

# DNA 超薄膜の電場増強エバネセント励起蛍光によるガスセンシング

長村 利彦

## Gas Sensing by Fluorescence Measurements of DNA Ultrathin Films upon Excitation with Electric-Field Enhanced Evanescent Light

Toshihiko NAGAMURA

Highly sensitive fluorescence measurements were made for dyes immobilized in ultrathin films of DNA or hydrophobic DNA upon excitation with electric-field enhanced evanescent light at surface plasmon resonance or guided wave mode conditions. They were successfully applied to detect nitrogen oxide gases with very high sensitivity and fast response through electron transfer quenching of fluorescence.

**Key words:** highly sensitive fluorescence measurements, ultrathin films of DNA or hydrophobic DNA, surface plasmon resonance, guided wave mode, nitrogen oxide gases

地球規模での温暖化や環境問題の顕在化、高齢化社会の進展に伴い、高感度・高速応答・小型軽量などセンシングデバイスのさらなる高性能化が望まれている。さらに、高度情報化社会を支える超高速応答材料・デバイスの開発も必要である。このような観点からわれわれは、光と分子の相互作用を活用した分子フォトニクスに関する研究を展開している。これまでに、新しい超高速・広波長域応答分子材料の開発、薄膜状態での光応答評価と物性制御、薄膜への閉じ込め光による新しいデバイスの開発などを行ってきた。本特集の主題である導波路あるいはエバネセント光に関しても、超薄膜のパルスレーザー励起による励起三重項状態生成や光誘起電子移動などによる過渡光応答計測に適用している。具体的には、通常の熱イオン交換導波路法に加えて、導波路に閉じ込めた白色光をプローブとして吸収スペクトル変化の観測、また通常の熱イオン交換導波路の上に屈折率の高い二酸化チタン超薄膜を配置してエバネセント電場をその表面へより多く偏らせて、感度を直接透過法に比べ3000倍も増加させた複合光導波路(OWG)による超高感度計測などを行っている<sup>1-4)</sup>。

さらにそのような導波路計測の展開として、新しい光制

御デバイスを提案した。金属薄膜や低屈折率高分子薄膜上に種々の色素を含む高分子薄膜を形成し、それに配置したプリズム側からプローブ光を入射した。このような配置では入射角、波長、各層の複素屈折率(実数部・虚数部)と膜厚(入射波長の約半分以上)に依存して、単一あるいは複数の導波モード(GWM)が形成され、全反射以上の狭い入射角範囲で反射率が非常に小さくなる。GWM条件では光は、エバネセント波として薄膜に閉じ込められている。そこに薄膜側から別の光を照射して色素を光励起し、それに伴う複素屈折率変化をおこすとGWM条件が変わるので、プローブ光の反射特性を二次元的に超高速で制御できる。このような新しい空間光変調の提案と基礎的実証を行い、フェムト秒応答が可能な新材料の開発と超高速並列光情報処理への応用も検討している<sup>5-15)</sup>。

またわれわれは最近、表面プラズモン共鳴(SPR)あるいはGWMによるエバネセント波をプローブ光としてのみならず、励起光として用いて超薄膜中に分散固定化された有機色素の高感度蛍光スペクトル測定とセンシング応用や超薄膜の分子運動特性評価などもめざしている<sup>16)</sup>。本稿では、その特異な構造から新しい光・電子デバイスへの

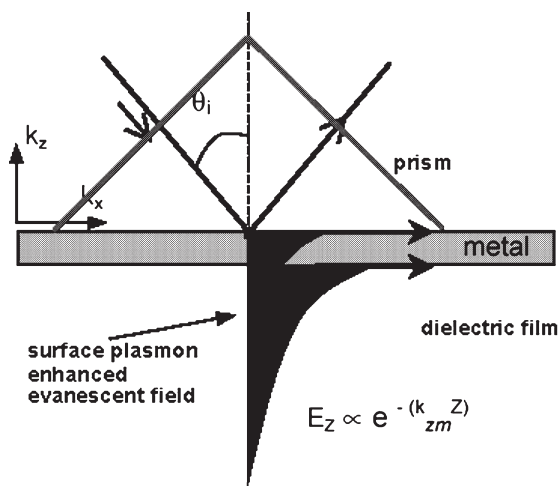


図1 SPRでの入射エバネセント光の電場増強の模式図。

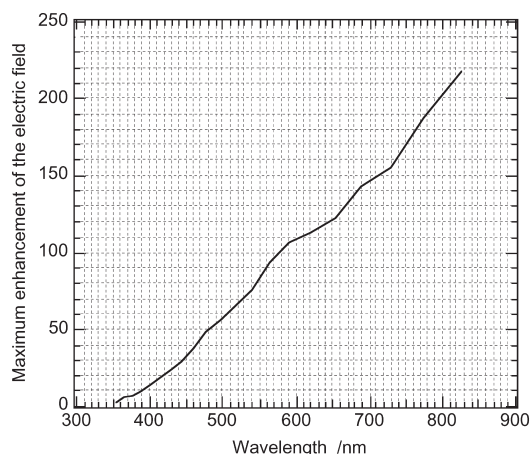


図2 銀薄膜による電場増強度の波長依存性の計算結果。

応用が期待されているデオキシリボ核酸 (DNA) およびその疎水化誘導体に蛍光色素を取り込んだ薄膜系の構成と SPR 励起蛍光による高性能センシング応用について、合成高分子を用いる系との比較も交えて最近の進歩を解説する。

### 1. 従来のガス・湿度センサーと問題点

ガス・湿度センサーは、検出対象ガスとの吸着・反応・接触などによってセンサー媒体の物性変化を引き起こし、特定のガスを認識する機能とセンサー媒体の物性変化を容易に検出可能な電気信号に変換する機能を兼ね備えていなければならない。別の方法として、光物性（吸収や発光）の変化を用いることもよく使われている。原理的には光子1個の検出も可能であるという非常に高感度に加えて、非接触・並列計測、屈折率変化計測できるなど多くのすぐれた特性をもっているからである。センサーとしての性能は、感度、応答速度、選択性、耐久性、小型、安価、取り扱いやすさなどさまざまであるが、これらについてすべての方法には利点と欠点（課題）がある。例えば二酸化窒素ガス (NO<sub>2</sub>) 等の検出には、上記のように有機または無機半導体薄膜を用いた電気的方法、有機化合物を担持させた多孔質ガラス系で発生する蛍光または吸収変化、色素会合体累積膜の増幅蛍光消光、表面プラズモンの共鳴角変化に応じた反射率変化等を利用した光学的方法等が採用されている。これらの方法によるとき、ppm (10<sup>-6</sup>) 程度から ppb (10<sup>-9</sup>) オーダーの感度で目的物が検出される。しかし、数分～数時間と遅い応答速度のため測定に時間がかかり、濃度、物性等が短時間で変化する目的物の検出には適していないものが多い。酸化窒素ガス (NO) のオゾン酸化により生成する励起状態の二酸化窒素 NO<sub>2</sub>\* からの発

光を検出する化学発光法が感度・応答速度とも優れている。しかし通常の NO<sub>2</sub> は金属触媒を用いた熱反応でいったん NO に還元してから定量する必要がある、装置が高価で複雑である。本論文においては、DNA 誘導体超薄膜に固定した色素のエバネセント励起蛍光を用いて、感度・応答速度を両立させ、小型で選択性も有する窒素酸化物ガスセンサーについて述べる。

### 2. 電場増強エバネセント励起蛍光によるガスセンシング

図1に模式的に示すように、SPR 条件を満たす入射角において金属自由電子のプラズマ振動と入射 p 偏光の共鳴により入射光の電場が増強され、金属上の薄膜にエバネセント波としてにじみだす。膜厚が波長の半分程度以上になると GWM が形成され、反射率の入射角依存性に SPR の場合よりも鋭いディップがみられるようになる。これは p および s 偏光のいずれにもエバネセント波の干渉として膜厚と波長に依存した入射角でモードを形成し、薄膜内の入射部分に定在するものであり、電場増強効果が期待できる。図2に H. Raether の式によって、銀薄膜の複素屈折率の波長依存性から SPR によるエバネセント波の電場増強因子を計算した結果を示す<sup>17)</sup>。最大2桁以上の電場増強が示されており、長波長側での増加はおもに複素屈折率の虚数部が寄与している。われわれの方法は、このように電場増強され、薄膜～超薄膜に閉じ込められたエバネセント波を励起光源とし、高感度と高速応答を同時に実現するものである。具体的には、図3に模式的に示すように光透過性固体基板の励起光入射側表面にプリズムを設置し、他面に金属薄膜を介して光応答薄膜を配置し、光応答薄膜（合成高分子あるいは DNA 誘導体薄膜）の上方に透光板で閉

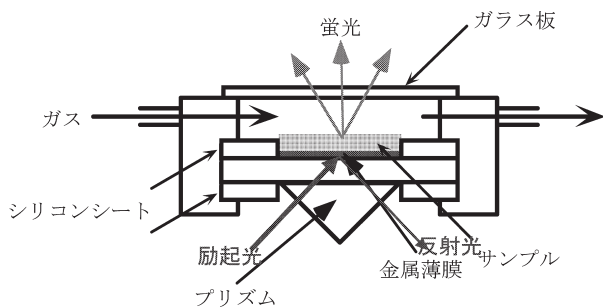


図3 SPRおよびGWM励起蛍光によるガスセンシングで用いたフローセルの模式図。

じられた測定空間を設け、全反射角を超えた入射角で励起光がプリズムの一面に入射するように固体基板を含むフローセル全体を回転する。SPR または GWM 条件を満足する入射角で光応答薄膜に閉じ込められた入射光によって励起された光応答薄膜から発する蛍光が、測定空間に送り込まれた測定対象流体を通して測定系に送られる。銀薄膜を蒸着し、その上に DNA あるいは疎水化 DNA (H-DNA と略称) あるいは合成高分子超薄膜をスピコートしたガラス基板とプリズムとを、図3に示すような小型のフローセルにセットした。励起光はそのまま、フローセル全体の回転に伴う反射率と蛍光強度の変化あるいは一定の入射角での蛍光スペクトルや時間変化を計測した。

分子間相互作用を回避して高濃度で色素を取り込み固定化するために、DNA あるいは H-DNA 薄膜を用いた。DNA はその特異な構造から、新しい光・電子材料として

期待され、多くの提案がなされている。しかし導電性に関しては研究者によって導体、半導体、絶縁体などさまざまなデータが報告されており、デバイスレベルでの応用はまだ見当たらないようである。われわれは DNA を高秩序な媒体薄膜として用い、電場増強エバネセント光と組み合わせることを最近提案した。図4に模式的に示すように、二重螺旋部に蛍光分子 (EB: エチジウムブロミド, AO: アクリジンオレンジ) をインターカレートまたはグループに取り込んだ DNA の水溶液から、光応答性 DNA 薄膜をスピコート法により成膜 (dye/DNA film) した。あるいは、対カチオンであるナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ ) を長鎖アルキルトリメチルアンモニウムイオンまたは長鎖ジアルキルジメチルアンモニウムイオンで置換した H-DNA の二重螺旋部に蛍光分子 (AO: アクリジンオレンジ, RhB: ローダミン B) をインターカレート、グループあるいは長鎖アルキル外周部に取り込んだ H-DNA の有機溶液から光応答性 H-DNA 薄膜を同様に成膜 (dye/H-DNA film) した。このようにして DNA 誘導体を用いると、高色素濃度で通常みられる会合やダイマー形成などの不都合な分子間相互作用を抑制できる。一例として2-メトキシエタノール中およびそれに H-DNA を添加した系での種々の濃度における RhB の吸収スペクトルを 0.005 mM に規格化したものを示す。2-メトキシエタノール中では、規格化してもスペクトル形状が異なり、分子間相互作用の存在が強く示唆された。一方、H-DNA 存在下では3つの濃度でのスペクトルは規格化すると重なり、RhB 色素を高濃度ま

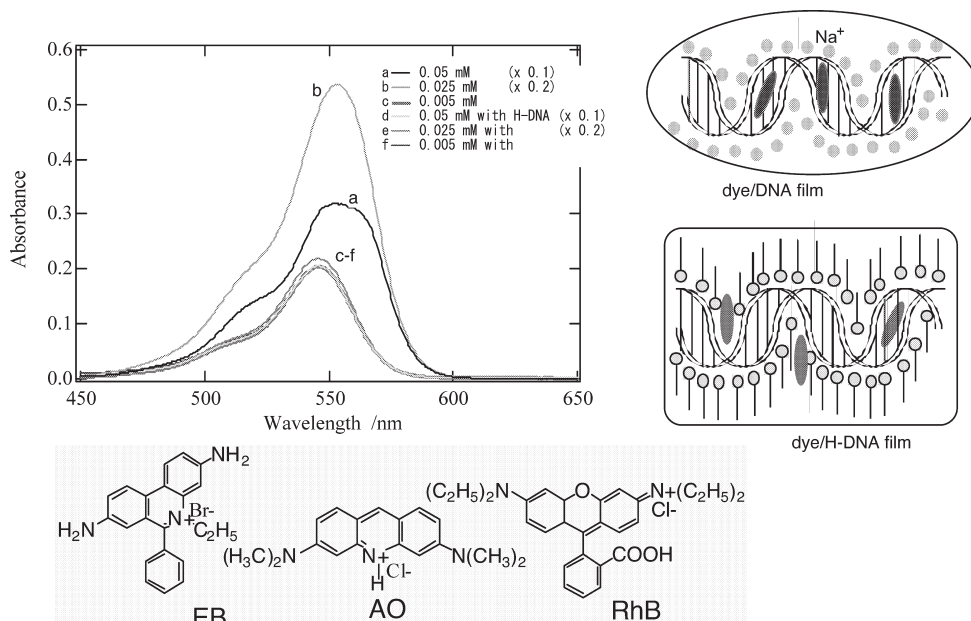


図4 色素分子 (EB, AO, RhB) を DNA や H-DNA に取り込んだ模式図と、有機溶液中および H-DNA 存在下での Rh-B の規格化した吸収スペクトル。

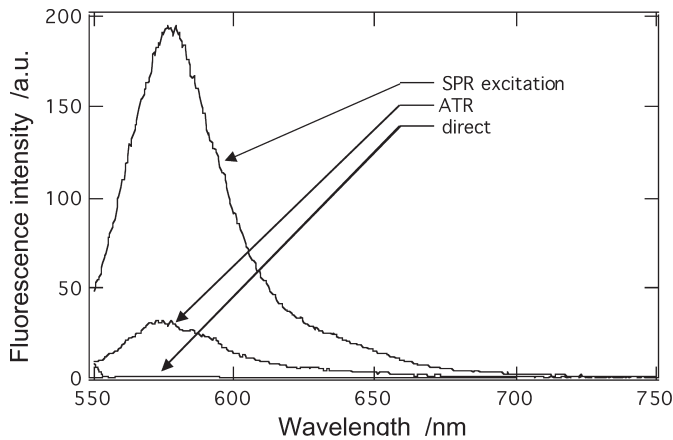


図5 RhB/H-DNA (1:50) 超薄膜 (20 nm厚) の種々の励起法による蛍光スペクトルの比較. 入射角 51.4 度, 励起光 543.5 nm, ATR 法ではプリズムのみを使用.

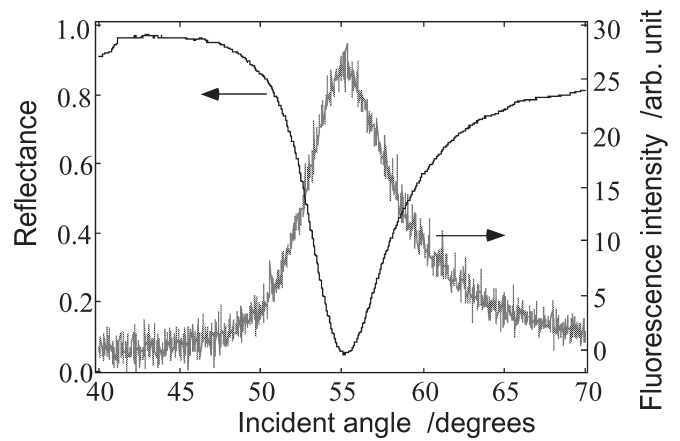


図6 銀薄膜上の AO/DNA (1:20) 超薄膜 (30 nm) の 496 nm 励起による 528 nm での蛍光強度および反射率の入射角依存性.

で分子分散できることが示された。さらに、DNA あるいは H-DNA を用いると、色素分子の運動性が束縛され、蛍光強度が著しく増加することも示された。このようなことから DNA あるいは H-DNA 誘導体は、蛍光によるセンシング媒体として非常にすぐれている。

次に、SPR 励起により、蛍光が実際に増強されるかどうかをいくつかの方法で確認した。図 5 に同じ入射角 (51.4 度) で 543.5 nm の He-Ne レーザーで Rh B を含む H-DNA (1:50) 超薄膜 (20 nm) をスピコートしたガラス基板を直接励起 (direct)、それにプリズムをつけて全反射条件のエバネセント波で励起 (ATR)、銀薄膜を蒸着したガラス基板に Rh B を含む H-DNA 超薄膜 (20 nm) をスピコートしてプリズムを配置し SPR 条件で励起した場合の蛍光スペクトルを示す。SPR 励起での蛍光強度は直接励起に比べて 2 桁程度大きいことが示された。また図 6 には、AO/DNA (1:20) 超薄膜 (30 nm) の 496 nm のアルゴンレーザーで励起した 528 nm での蛍光強度と、496 nm の反射率の入射角依存性を示す。この結果からも SPR 条件で超薄膜の蛍光増強が著しく増大することが確認された。金属に直接あるいは非常に近く蛍光分子が存在すると、蛍光消光がおこることが知られているが、本系ではそのような現象はみられず、この詳細についてはさらに検討中である。

DNA 誘導体超薄膜を用いる本センサーは、以下に示すようにいくつかのすぐれた特徴をもつ。図 7 には EB/DNA (1:10) 超薄膜 (20 nm) の 543.5 nm, 47.6 度での SPR 励起による 610 nm での蛍光強度の時間変化を、種々の窒素酸化物ガスおよび純窒素ガスを一定速度でセルに流した場合およびミニダイアフラムポンプで排気した場

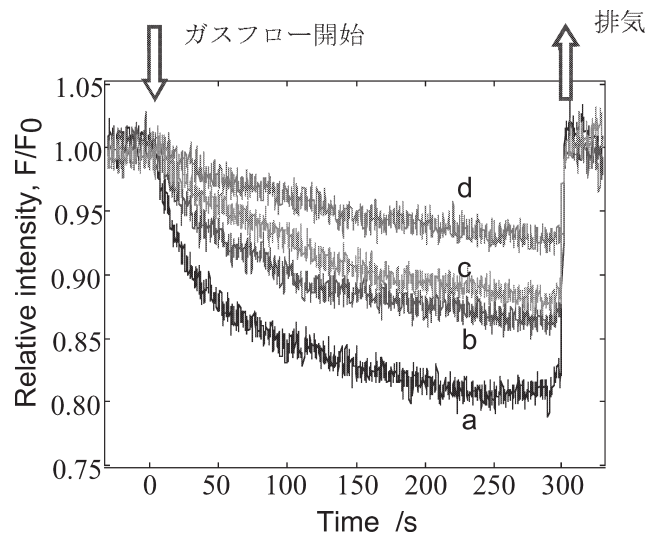


図7 種々のガスフロー (0.5 l/min) と排気に伴う EB/DNA (1:10) 超薄膜 (20 nm) の 543.5 nm, 47.6 度での SPR 励起による 610 nm での蛍光強度変化. (a) 0.5 ppm NO<sub>2</sub>, (b) 1 ppm NO, (c) 10 ppm N<sub>2</sub>O, (d) 純窒素ガス.

合について示す。純窒素ガス以外でガスに依存した初期の蛍光強度低下は、励起状態の EB 色素が異なる酸化還元電位をもつ窒素酸化物ガスによって電子移動消光されるためである。排気するとただちに蛍光強度は元のレベルに回復した。NO<sub>2</sub> に対する感度は DNA 誘導体超薄膜で約 50 ppb である。窒素酸化物ガスに依存しないややゆっくりした蛍光減少は窒素ガスのみでもみられ、これはガス拡散による DNA 誘導体薄膜の屈折率低下で共鳴角が微小変化するためであることがわかった。ガス選択性は適当な色素を選ぶことによって可能であり、図 8 に RhB/H-DNA (1:50) 超薄膜 (20 nm) の 543 nm, 47.5 度での SPR 励起による 575 nm での蛍光強度の 0.5 ppm NO<sub>2</sub> ガスフロー

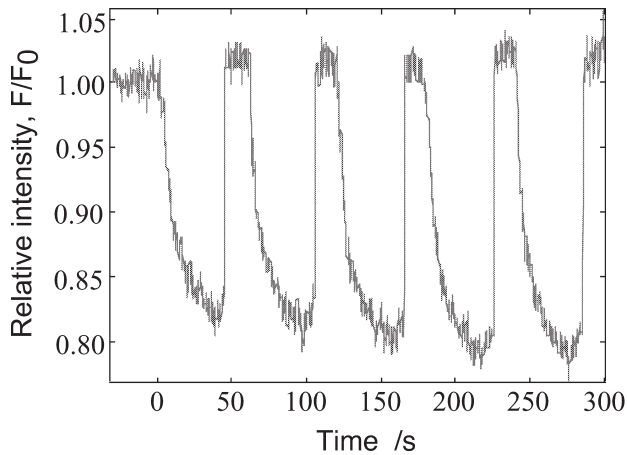


図8 RhB/H-DNA (1:50) 超薄膜 (20 nm) の 543 nm, 47.5 度での SPR 励起による 575 nm での蛍光強度の 0.5 ppm NO<sub>2</sub> ガスフロー (0.5 ℓ/min) と排気に伴う繰り返し変化。

(0.5 ℓ/min) と排気に伴う繰り返し変化について例示するように繰り返し応答性・耐久性も十分である。特に H-DNA 超薄膜は、吸湿性や腐敗の問題もなく実用的にすぐれている。通常の高分子に色素を分散する場合は、DNA 誘導体のような色素分散・固定化効果がほとんどないので、色素の分率をかなり小さくしないと色素間相互作用がおきる。そのため同様な S/N 比で信号を得るためには膜厚を 10 倍以上上げる必要があり、導波モード (GWM) 条件による励起となる。図 9 には、RhB/PVA (1:400) 薄膜 (500 nm) の 543.5 nm 励起による 576 nm での蛍光強度の入射角依存性の 0.5 ppm NO<sub>2</sub> フローと、排気に伴う変化を示す。スペースの関係で反射率の入射角依存性の図は省略しているが、2つの蛍光強度のピークに対応した角度で反射率は極小になり、この条件では広角側からそれぞれ 0 次と 1 次のモードが形成していることがわかる。このように GWM の場合もそれ以外の入射角度の場合に比べて蛍光が著しく増強していることが示される。図 9 に示すように GWM の入射角がガスフローで低角度側にシフトし、排気すると元に戻ることが観測された。これは、合成高分子薄膜を用いて厚みが数百 nm と DNA 系に比べて 10 倍以上あるため、同じような屈折率変化が生じても、GWM 条件が大きく変化するためである。このように合成高分子では屈折率変化も大きく効いてくるので、検出感度はさらに向上し NO<sub>2</sub> に対して約 1 ppb になった。しかし、後述のように膜厚の増加に伴って応答速度は少し低下した。

DNA 誘導体系では 20 nm 程度ときわめて薄い膜中の蛍光分子がガスに反応するため、同様な色素の蛍光消光を用いたセンシングの膜厚が大きい系に比べて応答性が桁違いに

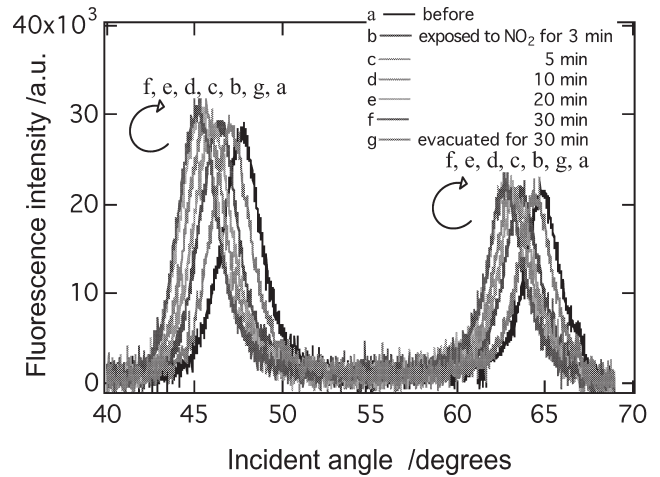


図9 RhB/PVA (1:400) 薄膜 (500 nm) の 543.5 nm 励起による 576 nm での蛍光強度の入射角依存性の 0.5 ppm NO<sub>2</sub> フローと排気に伴う変化。GWM に対応した 2 つの入射角で蛍光が増強して、ガスフローに伴い低角度シフトし、排気で回復。

すぐれている<sup>16)</sup>。例えば、多孔質ガラスにしみ込ませた蛍光色素の消光に基づく窒素酸化物ガスセンサーの応答は、数分から数十分と報告されている<sup>18)</sup>。ガスフロー時で約 1 秒、排気時で約 0.2 秒で、この応答速度はオゾン酸化による化学発光計測システムに相当する。DNA 誘導体の代わりに合成高分子を用いると、色素の分子間相互作用を抑制するため分散比率をさげる必要から膜厚が数百 nm と厚くなり応答速度は数秒であった。この場合でも多孔質ガラス系に比べれば圧倒的に応答が速い。

ガスセンサーの用途は、呼気アルコール検知用、住宅・オフィスビル・工場・商業施設等の防災・環境対策用、工場での防災・環境対策・製造プロセス制御用、医療用機器の各種制御・測定用、バイオ関連事業のプロセス制御用、農業分野における生産・品質管理用、その他である。本提案に基づく DNA 誘導体超薄膜中の蛍光色素のエバネセント励起を用いる小型、高性能、低価格のワンチップガスセンサーが開発されれば、これまで用いられてきたガスセンサーの一部が本技術に基づくガスセンサーに置き換わるだけでなく、新しい用途開発も期待される。

電場増強エバネセント波励起蛍光による高性能ガスセンシング素子は、高感度・高速応答性を両立できることを示した。今後、ワンチップ化のためにいくつかの構成要素 (光源としての半導体レーザーあるいは LED、検出器としてのフォトダイオードアレイや CCD など) の集積化、計測系の小型化・ネットワーク化など工学的課題が解決されれば、大きな展開が期待できる。SPR 励起蛍光はバイオ

センシングへの応用がいくつか報告されており<sup>19)</sup>, さらに発展すると期待される。

## 文 献

- 1) T. Nagamura, H. Sakaguchi, K. Sasaki, C. Mochizuki and K. Suzuki: "Optical waveguide studies on photoinduced electrochromism in ultrathin films of ion-pair charge-transfer complexes of 4,4'-bipyridinium ions," *Thin Solid Films*, **243** (1994) 660-663.
- 2) T. Nagamura, D. Kuroyanagi and K. Sasaki: "Highly sensitive optical waveguide detection of transient species in Langmuir-Blodgett films upon pulsed laser excitation," *Mol. Cryst. & Liq. Cryst.*, **295** (1997) 5-10.
- 3) H. Kawai, K. Nakano and T. Nagamura: "White light waveguide detection of transient absorption spectra in ultrathin organic films upon pulsed laser excitation," *Chem. Lett.*, **30** (2001) 1300-1301.
- 4) T. Nagamura, T. Adachi, K. Sasaki, H. Kawai, X.-M. Chen, K. Itoh and M. Murabayashi: "Highly sensitive detection of transient absorption in dye-doped ultrathin polymer films by the TiO<sub>2</sub>/K<sup>+</sup> composite optical waveguide method upon pulsed laser excitation," *Talanta*, **65** (2005) 1071-1077.
- 5) T. Nagamura and T. Hamada: "Novel all optical light modulation based on complex refractive index changes of organic dye-doped polymer film upon photoexcitation," *Appl. Phys. Lett.*, **69** (1996) 1191-1193.
- 6) K. Sasaki and T. Nagamura: "Ultrafast wide range all-optical switch using complex refractive-index changes in a composite film of silver and polymer containing photochromic dye," *J. Appl. Phys.*, **83** (1998) 2894-2900.
- 7) T. Nagamura, K. Sasaki, F. Iizuka, T. Adachi and I. Yoshida: "Ultrafast all-optical spatial light modulation based on complex refractive index changes of copper phthalocyanine-doped polymer film upon photoexcitation in guided mode geometry," *Opt. Commun.*, **205** (2002) 107-112.
- 8) T. Nagamura, A. Naito, I. Yoshida, Y. Chen and M. Hanack: "All-optical reflectance control based on photoinduced complex refractive index changes in guided mode thin films containing indium or gallium phthalocyanines," *J. Nonlinear Opt. Phys. Mater.*, **11** (2002) 205-218.
- 9) T. Nagamura: "Materials and devices for ultrafast molecular photonics," *Nanotechnology and Nano-Interface Controlled Electronic Devices*, ed. M. Iwamoto, K. Kaneto and S. Mashiko (Elsevier Science B.V., 2002) Chapt. 8, pp. 105-131.
- 10) 長村利彦: "色素含有高分子薄膜の光励起超高速複素屈折率変化に基づく分子フォトニクスデバイス", *高分子*, **51** (2002) 948-951.
- 11) 長村利彦監修: *有機エレクトロニクス・フォトニクス材料とデバイス—21世紀情報産業の新たな展開をめざして—*, *エレクトロニクス材料・技術シリーズ T359* (シーエムシー出版, 2003).
- 12) 長村利彦: "超高速分子フォトニクスの展開", *未来材料*, **4**, No. 7 (2004) 42-49.
- 13) T. Nagamura, Y. Nagai, A. Furube and S. Murata: "Ultrafast optical switching at the telecommunication wavelength by single electron transfer between fluorene-containing redox polymer and its counter anion," *Appl. Phys. Lett.*, **85** (2004) 3444-3446.
- 14) T. Nagamura, A. Naito, Y. Nagai, R. Matsumoto, Y. Yokoyama, A. Furube and S. Murata: "Materials and devices for ultrafast all-optical processing," *Proc. SPIE*, **5724** (2005) 1-12.
- 15) T. Nagamura, R. Matsumoto, A. Naito and Y. Nagai: "Highly-sensitive ultrafast all-optical light modulation by complex refractive-index changes in guided mode geometry composed of a photoresponsive polymer and a low-refractive-index polymer," *Appl. Phys. Lett.*, **87** (2005) 041107-1-041107-3.
- 16) T. Nagamura, M. Yamamoto, M. Terasawa and K. Shiratori: "High performance sensing of nitrogen oxides by surface plasmon resonance excited fluorescence of dye-doped deoxyribonucleic acid thin films," *Appl. Phys. Lett.*, **83** (2003) 803-805.
- 17) H. Raether: *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings* (Springer-Verlag, Berlin, 1988).
- 18) T. Ohyama, Y.Y. Maruo and T. Tanaka and T. Hayashi: "Fluorescence-intensity changes in organic dyes impregnated in porous glass on exposure to NO<sub>2</sub>," *Sensor. Actuator. B*, **59** (1999) 16-20.
- 19) T. Liebermann, W. Knoll, P. Sluka and R. Herrmann: "Complement hybridization from solution to surface-attached probe-oligonucleotides observed by surface-plasmon-field-enhanced fluorescence spectroscopy," *Colloid. Surface.*, **169** (2000) 337-350.

(2005年6月30日受理)