

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14173

研究課題名（和文）ヘテロコア光ファイバによる高感度バイオセンサの開発

研究課題名（英文）Development of highly sensitive biosensors based on Hetero-core fiber optics

研究代表者

細木 藍（Hosoki, Ai）

富山大学・学術研究部理学系・特命助教

研究者番号：30748835

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、極微量の標的核酸を直接高感度に検出するための新たな技術基盤として、ヘテロコア光ファイバによる革新的バイオセンサの構築を目的とした。ペプチド結合やビオチン-アビジン複合体などによるプローブ核酸の固定化方法を検討し、表面プラズモン共鳴（SPR）や局在表面プラズモン共鳴（LSPR）によるヘテロコア光ファイババイオセンサを構築した。標的核酸の濃度の違いによる検出感度を詳細に調査し、本センサで極微量として捉えられる濃度を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コロナウイルス感染症に伴い、PCR検査装置の需要が一気に高まった。近年では、迅速・高感度に特定の核酸を検出可能なセンサデバイスの実現が期待されている。本研究では、ヘテロコア光ファイバセンサの高感度化を図り、標的核酸を高感度に検出可能なバイオセンサの開発に取り組んだ。センサ感度やセンサ作製の再現性には課題が残ったものの、本研究によって、SPRやLSPRによるヘテロコア光ファイババイオセンサの基盤技術を確立できた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to construct an innovative biosensor based on Hetero-core fiber optics as a new technological platform for direct and highly sensitive detection of extremely small amounts of target nucleic acid. Methods for immobilizing probe nucleic acid were investigated using peptide bonds and biotin-avidin complexes, and Hetero-core optical fiber biosensors using surface plasmon resonance (SPR) and localized surface plasmon resonance (LSPR) were developed. We investigated in detail the detection sensitivity depending on the concentration of the target nucleic acid, and clarified the concentration which can be detected as extremely small by the sensors.

研究分野：光ファイバセンサ、ケミカルセンシング

キーワード：ヘテロコア光ファイバ バイオセンサ 局在表面プラズモン共鳴 DNA

### 1. 研究開始当初の背景

コロナウイルス感染症に伴い、PCR 検査装置の需要が一気に高まった。PCR 法は原理上、極微量の DNA を増幅させることから、高感度である反面、結果が出るまでに時間がかかるといった特徴がある。近年では、迅速・高感度に特定の核酸を検出可能なセンサデバイスの実現が期待されている。中でも、局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) によって鮮やかな呈色を示す金ナノ粒子を使用し、金ナノ粒子に修飾されたプローブ DNA と標的 DNA との相互作用を色の変化として捉える方法が有望である。標的 DNA と相補的である場合、ナノ粒子に表面プラズモンがカップリングすると、粒子の色が赤色から青色に変化する。ナノ粒子を活用すれば、PCR-free で高感度に標的核酸の直接検出を目指した光バイオセンサの開発も期待できるが、実現にはいまだ至っていない。

ヘテロコア光ファイバセンサは光ファイバ本来の機械的強度を維持しつつ、LSPR の励起に必要なエバネッセント光を容易に生じさせることができる。そのため、極微量の標的核酸を LSPR の変化として検出可能なセンサデバイスとして適性が高い。ヘテロコア光ファイバは光の伝送路となるマルチモードファイバ (MMF) にセンサ部として機能するシングルモードファイバ (SMF) を挿入・融着することにより成り立っている。この構造下では、伝搬するマルチモード光波がセンサ領域との境界面において大部分が、センサ部のクラッド層へ導光される。この時、クラッド層と外界との境界面において、全反射条件を満たした環境下で、エバネッセント波を励起する。一般に光が全反射する際のエバネッセント波の浸透度は臨界角度に近いほど深く、外界との相互作用を効率よく行える。そこで本研究では、光ファイバ内の全反射が生じる角度を臨界角度に近づけることで、高感度化したヘテロコア光ファイバによる LSPR バイオセンサの構築を目指した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヘテロコア光ファイバセンサの高感度化を図り、標的核酸を高感度に検出可能な革新的バイオセンサを構築することである。通信用の偏波保持ファイバ (PMF) などの特殊な光ファイバは、コア周囲にクラッドの屈折率よりも低い円形の領域が存在する。従来の SMF を特殊な光ファイバに置き換えた場合、MMF から漏れ出た大部分の光が、この円形の領域を通過すると、全反射が臨界角度に近づいた状態で起こると考えられる。プローブ核酸を修飾した金ナノ粒子と浸透度が深くなったエバネッセント光がカップリングした時に、標的核酸との相互作用を高感度に検出できると期待できる。

### 3. 研究の方法

本研究では、極微量の標的核酸を直接高感度に検出するための新たな技術基盤として、LSPR の励起に必要なエバネッセント光を容易に生じさせることができるヘテロコア光ファイバと、プローブ核酸を修飾した金ナノ粒子とを組み合わせた革新的バイオセンサを構築する。そのために、以下の研究を推進した。

1. 特殊な光ファイバによるヘテロコア光ファイバセンサの高感度化
2. SPR/LSPR によるヘテロコア光ファイババイオセンサの構築

### 4. 研究成果

#### (1) 特殊な光ファイバによるヘテロコア光ファイバセンサの高感度化

図 1 (a) にセンサ部を PMF としたヘテロコア光ファイバセンサの構造を示す。センサは、コア径 50  $\mu\text{m}$  の MMF の途中にコア径 3  $\mu\text{m}$  程度の PMF を挿入・融着することで作製した。PMF では、コアの両側に数十  $\mu\text{m}$  のクラッドより屈折率が僅かに低い円形の応力付与部が配置されている。PMF 内の応力付与部は、コア中心から 27.5  $\mu\text{m}$  に位置しているため、コア径 50  $\mu\text{m}$  の MMF からの伝搬光の一部は、応力付与部を通過する (図 1 (b))。さらに、光ファイバ内の入射角度は、応力付与部の有無によって、図 1 (c) と (d) の 2 パターンが考えられる。

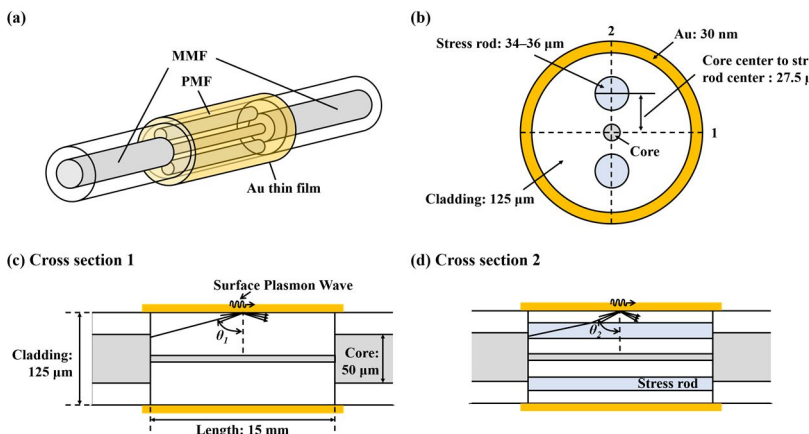


図 1 PMF を用いたヘテロコア光ファイバ SPR センサ

MMF からの伝搬光が応力付与部に導光されることで、入射角度が臨界角度に近づくと想定される。また、センサ感度比較のために、応力付与部の直径が異なる 2 種類の PMF (PMF-1、PMF-2) を用いた。PMF-1 および PMF-2 の応力付与部の直径はそれぞれ、34  $\mu\text{m}$ 、36  $\mu\text{m}$  である。高周波スパッタリング装置を用いて金薄膜 (膜厚 40 nm) を成膜し、グリセリン水溶液の屈折率変化に対するセンサ感度を白色光源-分光器の装置構成を用いて調査した。

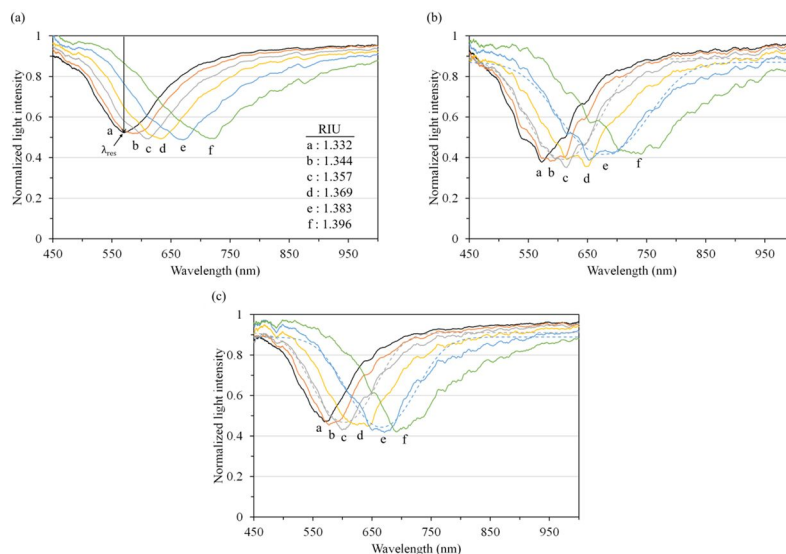


図 2 屈折率変化に対する SPR スペクトル  
(a) SMF、(b) PMF-1、(c) PMF-2

図 2 にグリセリン水溶液の屈折率変化 (1.332、1.334、1.357、1.369、1.383、1.396 RIU) に対するセンサ応答を示す。図 2 (a) は、センサ部が SMF のヘテロコア光ファイバ SPR センサの結果である。図 2 (b) (c) はセンサ部がそれぞれ PMF-1 と PMF-2 の結果である。図 2 より、センサ部を PMF にした場合でも、SPR スペクトルを得られることがわかり、屈折率の増加に伴った SPR 共鳴波長のピークシフトも確認できた。また、PMF センサの特徴として、SMF センサのシングルピークと異なり、ダブルピークが見られた。例えば、1.369 RIU に着目すると、PMF-1 の場合は、波長 615 nm と 652 nm に、PMF-2 のセンサでは 625 nm と 643 nm にそれぞれピークが生じた。これは、PMF 特有の応力付与部が寄与していると考えられる。

図 3 は、屈折率変化に対する波長 850 nm における光損失値の変化である。図 3 より、センサ部を PMF-1 としたヘテロコア光ファイバ SPR センサの屈折率感度が最も高いという結果を得た。従来のヘテロコア光ファイバセンサと比較すると、センサ感度を 1.5 倍向上させることに成功した。

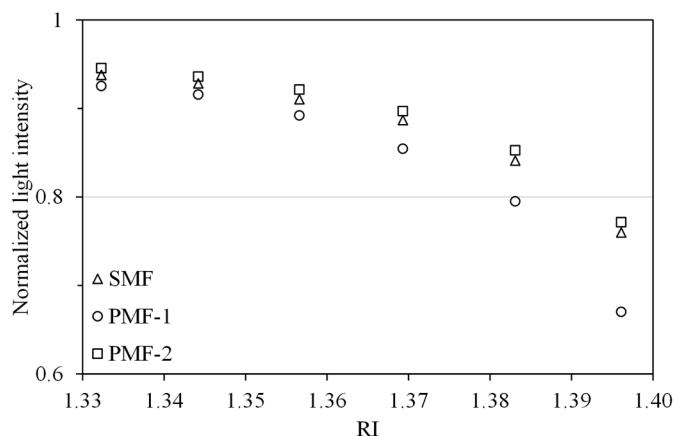


図 3 波長 850 nm における光強度変化

## (2) SPR/LSPR によるヘテロコア光ファイババイオセンサの構築

ヘテロコア光ファイバセンサ表面上に形成した金薄膜や金ナノ粒子上へのプローブ核酸の修飾方法を検討し、バイオセンサを構築した。プローブ核酸の修飾方法としては、ペプチド結合やビオチン-アビジン複合体を採用した。

金薄膜上へのプローブ核酸の固定化は以下の方法で進めた。まず、10-カルボキシ-1-デカンチオールを用いて、金薄膜を形成したヘテロコア光ファイバ上にカルボキシル基を導入した。次に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) と N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) の混合液に浸して、センサ部のカルボキシル基を活性化させた。最後に、アミノ基が修飾された DNA 溶液 (pDNA) に浸し、センサ部のカルボキシル基と DNA のアミノ基とのペプチド結合によって、プローブ DNA を固定化した。相補的な DNA (tDNA) と相補的でない DNA (Non-tDNA) に対する光損失スペクトルを計測した。

図 4 (a) に 1  $\mu\text{M}$  の pDNA を固定化したセンサの tDNA (100  $\mu\text{M}$ 、10 nM、1  $\mu\text{M}$ ) に対する SPR スペクトルを示す。まず、DNA のハイブリダイゼーションによって、SPR スペクトル

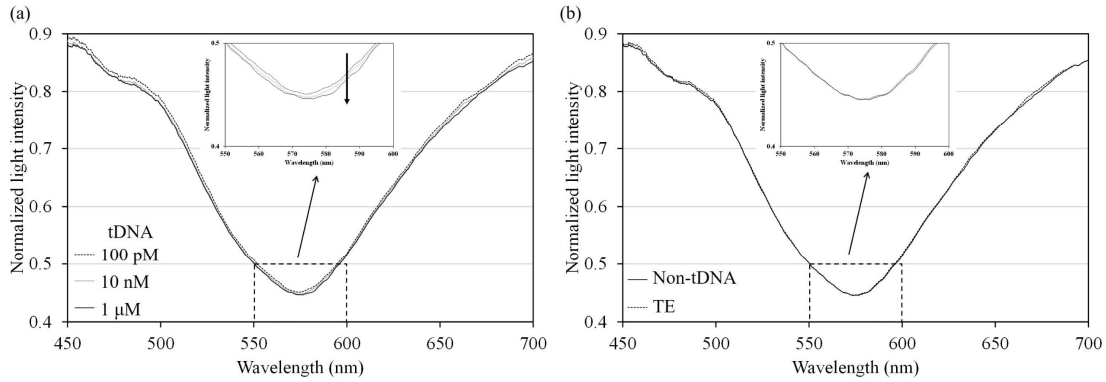


図4 DNAハイブリダイゼーションによるセンサ応答  
(a) 異なる濃度の tDNA、(b) 相補的でない DNA (Non-tDNA) と TE (pH8.0)

のピークは長波長側にシフトすると予想していたが、結果としてピークシフトはほとんど見られなかった。一方で、tDNA の濃度増加に従って、SPR ピークの強度が線形的に減少する様子は確認できた。また、Non-tDNA や TE (pH8.0) に対する SPR スペクトルを計測したところ、SPR ピークの強度変化は起きなかった (図 4 (b))。以上の結果から、本センサによって DNA を検知可能であることが示された。

ビオチン-アビジン複合体による、金ナノ粒子や金ナノロッドへのプローブ核酸の固定化方法も検討した。まず、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライド (PDDA) /ポリスチレンスルホン酸 (PSS) /ポリアリアルアミン (PAH) 層を形成したファイバ表面に、負電荷を持つ金ナノ粒子を静電相互作用により固定化した。次に、金ナノ粒子表面にビオチン-ストレプトアビジンを形成し、ビオチン化 DNA を固定化した (図 5)。この時、ビオチン化 DNA の修飾に伴って、波長 570 nm において LSPR ピークの変化を確認できた。

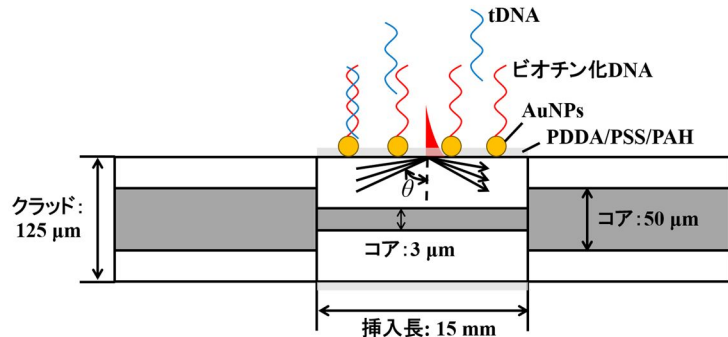


図5 構築したヘテロコア光ファイババイオセンサ

図 6 に tDNA (100 pM、10 nM、1 μM) に対する本センサの光損失応答を示す。図 6 より tDNA の濃度増加に伴った単調な光強度の減少を確認できる。また、PBS や相補的でない DNA に対しては、本センサは応答しなかった。この結果より、LSPR によるヘテロコア光ファイババイオセンサにおいても、DNA を検知可能であることが示された。一方で、プローブ核酸の修飾方法の違いによる劇的なセンサ感度の向上は見られなかった。円筒形の光ファイバへのプローブ核酸までの修飾過程がセンサ感度や安定したセンサ作製に影響を与えると考えられる。そのため、光ファイバを脱着可能な専用のフローセルの開発も進めている。

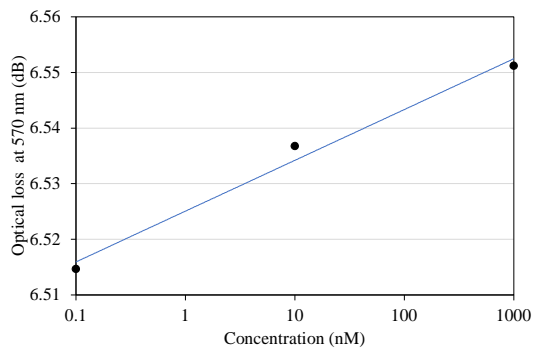


図6 tDNA に対する光損失応答

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ai Hosoki, Michiko Nishiyama, Kazuhiro Watanabe, Nozomu Sakurai	4. 巻 30(20)
2. 論文標題 Surface plasmon resonance sensor using a polarization-maintaining fiber on a hetero-core optical fiber structure with gold thin film	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Optics Express	6. 最初と最後の頁 35348-35360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/oe.469165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 細木 藍、西山 道子、渡辺 一弘、櫻井 望	4. 巻 55(5)
2. 論文標題 表面プラズモン共鳴を利用したヘテロコア光ファイバDNAセンサーの開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊「細胞」（特集：蛍光タンパク質センサー）	6. 最初と最後の頁 63-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細木 藍、須賀 愛梨、西山 道子、渡辺 一弘、櫻井 望、佐澤 和人、倉光 英樹
2. 発表標題 局在表面プラズモン共鳴によるヘテロコア光ファイバDNAセンサの開発
3. 学会等名 日本分析化学会第72年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 光ファイバセンサ	発明者 細木藍、櫻井望、西山道子、渡辺一弘、佐々木博幸	権利者 西山道子、渡辺一弘、佐々木博幸
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-155223	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------