

「平成19年度工学部予算重点配分研究テーマに係る研究報告書」

## バイオセンシングデバイスのプラットフォームとして光導波路を用いた チップ型オプトバイオセンサー

末 信一郎（福井大学工学研究科生物応用化学専攻・准教授）

榎波 康文（アリゾナ大学光科学部・博士研究員）

高山 勝巳（福井工業高等専門学校・准教授）

### 背景及び目的

生体細胞を観測する手段としての蛍光タンパク質（GFP）を利用した測定システムの研究において、細胞からの蛍光観測を行う際、レーザ光やLED光を用いた蛍光顕微鏡や簡易型蛍光測定装置の蛍光強度は弱く、蛍光強度測定などの定量的な評価が困難であった。本研究では、新規性の高いGFPドープ導波路型蛍光観測装置を開発し、蛍光の経年変化や外的刺激に対する蛍光量変化の評価を行う。酵母等やモデルサンプルの細胞表層に発現させたGFPをドープしたゾルゲルシリカ光導波路コアに励起光を導波させ、極めて再現性の高い蛍光を導波路から取り出しGFP蛍光強度を定量的に測定することに主眼をおいた。ここでは、モデルGFP集合体での蛍光量の定量的測定実験及び経時変化の測定を行い、その後酵母や大腸菌を用いた蛍光観測へと移行し、単一細胞観測の可能性を模索する。

### 研究成果の概要

**GFP・ゾルゲル光導波路の作製** GFPをゾルゲル光導波路コア（コア寸法：幅2-10  $\mu\text{m}$ 、高さ4  $\mu\text{m}$ 、長さ5-10 mm）にドープしたモデルGFPドープゾルゲル光導波路を作製し、波長488 nm励起光による波長511 nm蛍光観測を行った。光損失の低減やGFP死滅を避ける方法を見いだすためのデバイス実験を行い、ゾルゲル導波路に混入する屈折率調整剤のドープ量やGFPを混入するゾルゲルコアの処理方法を最適化した。ゾルゲルクラッドはゾルゲル溶液に対する屈折率調整剤ジルコニウムの混合率88/12モル%を使用し、スピコートとUV照射とウェットエッチングによるパターンニング後80°C24時間加熱した。ゾルゲルコアの屈折率調整剤混合率は85/15とし、ゾルゲルコア溶液1mlに対し、GFP溶液0.001gを添加した。GFP混入したゾルゲル溶液をパターンニングしたゾルゲルクラッド上にスピコートし、窒素環境下で照射量を最適化したUV照射を行い完全なガラス状態になる前のゲル状態とした。その後、50°Cで5時間及び24時間加熱したサンプルと熱処理をしないサンプルを作製しGFP蛍光量を比較検討した。作製したGFP・ゾルゲルコアはUV照射のみで端面を直線的に切断処理が可能であることを確認した（0.1dB以下の光結合損失）。

**蛍光測定** 図1に示す実験系を用い、励起波長488nmのアルゴンレーザ光を導波路に入射し、波長511 nmの蛍光を顕微鏡レンズで集光した後、波長488nmレーザ光を色フィルターで遮断し、波長511 nm蛍光をシリコンパワーメーターで検出した。波長511 nm帯の単一モード蛍光のみを肉眼で確認するとともにシリコンパワーメーターで蛍光パワーを検出した。励起パワー（<20 mW）に対する蛍光パワーは線形的な関係を示した。GFPをゾルゲルにドープ10日後経過後も蛍光を肉眼観測し蛍光パワーを測定した。GFP混入してから冷蔵で10日保存後でも

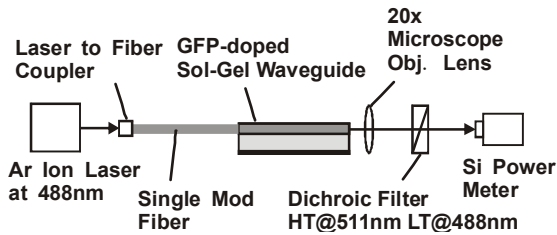


図1 蛍光測定実験系統図

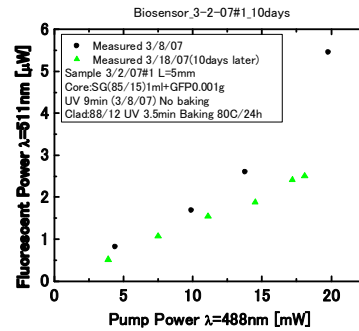


図2 GFP・ゾルゲル導波路からの蛍光パワー  
●GFP・ゾルゲル光導波路作製1日後 ▲GFP・ゾルゲル光導波路作製10日後

作製直後の60%程度の蛍光を維持することを確認した。GFPをゾルゲルに混入後50℃で5時間熱処理を行った導波路の蛍光

は、熱処理を行わなかった導波路の10日経過時の蛍光パワーの半分以下であった。したがって、GFPをドーブしたゾルゲルは、熱に対する影響が大きいことが確認された。

### 結言および今後の予定

GFPドーブゾルゲル光導波路の蛍光パワーを測定するとともに肉眼での観測に成功した。励起光20 mWに対し5.5 μWの強い蛍光を測定した(図2)。蛍光波長に対する導波路の光損失が小さいことやゾルゲル内部でのGFP寿命が現時点(10日後)で60%の蛍光パワーを維持したことから、ゾルゲルシリカは導波路型GFP蛍光観測に有望な材料として採用可能であることを確認した。また、類似のGFPをドーブしたゾルゲル光導波路による蛍光観測を実現した例はなく、極めて新規性の高い実験を行った。今後は、大腸菌や酵母等の表面に出現された蛍光強度の強いEGFPを用いてのデバイス作製及び蛍光測定を行う。さらに、バイオセンサーとしての機能確認のため、ゾルゲルに混入した酵母等EGFPのリンに対する蛍光減衰の定量的評価を行う。GFPを混入したゾルゲルコアの熱処理を行わなかった場合のゾルゲルはゲル状態であり、リン等を含んだ液体やガスの浸透は容易である。最終的には、単一モード光ファイバと接合することにより、人体に有害なリン化合物を検出するバイオセンサーネットワークを構築する。

### 配分額及び経費の支出額内訳

#### 経費の支出内訳

経費の支出内訳	配分額	合計
	輸送費	
	合計	

### その他特記事項

#### 関連論文

1. Y. Enami, T. Fukuda, and S. Suye, Sol-gel Silica Planar Waveguide Doped with Green Fluorescent Protein for In-line Biosensors. Appl. Phys. Lett., 91, 203507-1-3 (2007).
2. H Makishima, S,Suye, et al; Organophosphorus Compounds Sensing System Using Organophosphorus Hydrolase and EGFP Displayed Arming Yeast. The 10th World Congress on Biosensors, May 14-16, 2008, Shanghai, China

その他 本研究に関連して平成20年6月～8月の2ヶ月間、台湾国立成功大学へ大学院生が派遣されることになった。(財団法人交流協会より若手研究者育成事業の助成)