

機関番号：12602  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21760310  
 研究課題名（和文） UV-LEDを用いたNADH蛍光検出式バイオセンシングに関する研究  
 研究課題名（英文） A NADH-dependent fiber-optic biosensor with a UV-LED excitation system  
 研究代表者  
 宮島 久美子 (MIYAJIMA KUMIKO)  
 東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・技術職員  
 研究者番号：10516298

## 研究成果の概要（和文）：

高輝度紫外線LEDを励起光源とした新規な光ファイバ式NADH蛍光検出システムを応用し、湿潤した酵素固定化膜をプローブに装着することで、アルコール計測用生化学式ガスセンサ（バイオスニファ）を作製した。アルコール脱水素酵素の反応生成物であるNADHの蛍光特性を利用することで、高い選択性にてエタノールガスの計測が可能である。本センサにエタノールガスを負荷し、蛍光出力の変化を調べたところ、濃度に応じた著しい出力変化が観察された。

## 研究成果の概要（英文）：

A fiber optic bio-sniffer for high-selective alcohol vapor monitoring with an UV-LED was constructed and tested. In order to achieve high selectivity, the sensor utilizes fluorescence of nicotianamide adenine dinucleotide (NADH), which is produced by the enzymatic reaction of alcohol dehydrogenase. The bio-sniffer was fabricated by attaching a wet enzyme immobilized membrane to the fiber-optic NADH measurement system. The fluorescent intensity significantly increased with a stable value related to the ethanol gas concentration when ethanol vapor was exposed.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医用工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・計測工学

キーワード：バイオセンサ、高輝度紫外線LED、NADH、アルコール脱水素酵素、光ファイバ

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来に伴い、医療費・社会保障費の高騰と問題解決への社会の取り組みは連日メディアを賑わせ、国民一人一人が自らの問題として考えざるを得ない時期に来ている。一連の取り組みの中で大きな柱とし

て、大病院完結型の医療から地域の診療所や家庭での予防医療・ヘルスケアを中心とする医療へと制度の改革が進められている。予防措置と疾病の早期発見による治療コストの低減が期待できるのは当然であるが、本質的には患者の社会復帰と経済活動を促進する

ことで、経済効果としても患者自身の暮らしの質の向上においても大きな意義がある。

将来の臨床検査学の在り方においても、このような動きを科学的な側面から支援する検査技術は、必要不可欠である。POCT (Point Of Care Testing) による簡易検査は患者の病院滞在時間を短縮し、検査データの付加価値を向上させるなどのメリットがあり、急速に普及し始めている。POCTは、熟練を必要とせず測定できる簡易検査の中でも、大学病院から在宅看護まで施設・場所を問わず患者のベッドサイドで行う検査で、特に緊急時の診療に対応する迅速検査と定義される。POCTを緊急時の迅速検査だけでなく、家庭や「かかりつけ医」による予防医療及び簡易検査でも利用できるようなセンシングシステムを開発できれば、身近な医療の質の向上に寄与できるものと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、非侵襲的な検査法の一つであり、計測時の肉体的・精神的負担が極めて小さい呼気中成分の計測に着目した。呼気中には、疾患特異的に検出される成分が含まれている事が報告されており、これらのガス成分を小型軽量で簡便なセンシングシステムにて選択的にリアルタイム計測できれば、新しい POCT 技術として疾患患者の病院滞在時間の短縮や、家庭や診療所における予防医療及び簡易検査において有用である。

現在、医療計測や食品検査、環境分析など、多様な領域においてバイオセンサが利用されている。その中でも各種酸化酵素を認識素子とするセンサが多く、基質である測定対象物質の酸化反応に基づく溶液中の溶存酸素の消費や生成される過酸化水素を検出することで、基質濃度を計測することができる。しかしながら、酸素を触媒反応での電子受容体として用いるため溶存酸素を必要とすることから、酸素濃度が反応を律速し、定量性が制限される問題点がある。一方、酵素の中には酸化型 NAD<sup>+</sup> を電子受容体とし、NADH を生成する脱水素酵素が多数存在する。NADH は蛍光特性 (励起波長: 340nm、蛍光波長: 491nm) を有することから、酵素反応に伴う NADH 濃度の変化を蛍光測定することで、溶存酸素に依存しない高感度で定量性に優れた光学バイオセンサの開発が考えられる (図 1)。また、近年 NADH 励起波長領域を含む、低波長領域の UV-LED が開発され、既存の水銀ランプに比して小型で省エネルギー、高い安定性等の特徴を有している。

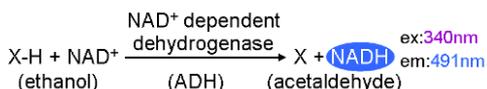


図 1 脱水素酵素反応による NADH の生成

そこで本研究は、UV-LED を用いた小型 NADH 蛍光検出システムを構築し、NAD<sup>+</sup> 依存型脱水素酵素の一つであるアルコール脱水素酵素 (ADH) を用いて、ADH 固定化バイオセンサを開発し、エタノールの液相及び気相計測に適用することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) UV-LED を用いた NADH 蛍光検出システムの構築

NADH の蛍光検出システムの構成を図 2 に示す。

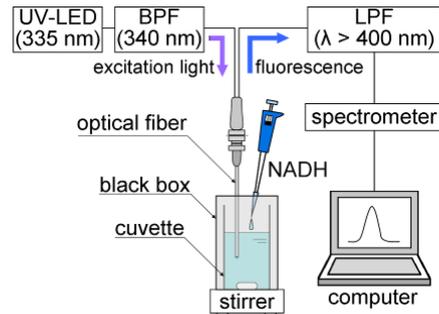


図 2 UV-LED を用いた NADH 蛍光計測システムの概略図

本システムは、UV-LED からの照射光 (335nm) を band pass filter (BPF: 340 ± 10 nm) 及び光ファイバを介して試料溶液中の NADH を励起し、生じた蛍光 (491 nm) を long pass filter (LPF: λ > 400 nm) を介して分光器にて検出し、NADH 濃度を測定する。

実験では、暗箱内にて超純水を満たしたキュベットに励起光を照射した光ファイバ先端を浸し、標準 NADH 溶液の滴下に伴う蛍光強度の出力変化を分光器を介し、コンピュータにて計測した。

### (2) NADH 蛍光検出によるエタノール用バイオセンサ

予備実験としてまず、脱水素酵素 ADH (EC: 1.1.1.1) を用い、酵素溶液系にてエタノール計測を行った。実験では図 2 の実験系にて、NAD<sup>+</sup> と ADH を含むリン酸緩衝液を満したキュベットに光ファイバ先端を浸し、標準エタノール溶液の滴下に伴い、生成される NADH の蛍光出力変化を計測した。次に、ADH 固定化バイオセンサを作製し、エタノール計測を行った。バイオセンサの作製ではまず、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) とメタクリル酸 2-エチルヘキシル (EHMA) との共重合体 (PMEH) に ADH を加え、その混合液を親水性の多孔質ポリテトラフルオロエチレン膜 (PTFE: thickness 80 μm, pore size 0.2 μm) に塗布し、冷所 (4° C) にて 3 時間乾燥させ PTFE 膜に酵素を包括固定化した。次に、作製した酵素固定化膜を光ファイバプローブ (φ: 1.6 mm) の先端に装着し、

エタノール用バイオセンサとした。なお固定化材料として用いた PMEh は MPC ポリマーの一種で、生体膜の構成成分であるリン脂質極性基を導入した擬似細胞膜で、高い生体適合性を有している。

センサの特性評価では上述の実験と同様に、暗箱内にて  $\text{NAD}^+$  を混合したリン酸緩衝液を満たしたキュベットにバイオセンサ感応部を浸し、エタノール溶液滴下に伴う蛍光強度の出力変化を計測した。

### (3) ADH バイオセンサによるエタノールガスの蛍光計測

エタノール用バイオセンサ(ガスセンサ)は、シリコンチューブとアクリルパイプから構成されるフローセルに ADH 固定化光ファイバプローブを組み構成した。なおフローセル内にリン酸緩衝液を循環させることにより、余剰基質と酵素生成物の除去及び  $\text{NAD}^+$  の供給を行い、連続的なガス計測が可能となる。

ガス計測実験ではまず、標準ガス発生装置にて発生した一定濃度のエタノールガス (0.32 - 300.0 ppm) を反応セルに導入し、酵素反応により生成される  $\text{NADH}$  の蛍光強度 (491 nm) を分光器を介し、コンピュータにて計測した (図 3)。

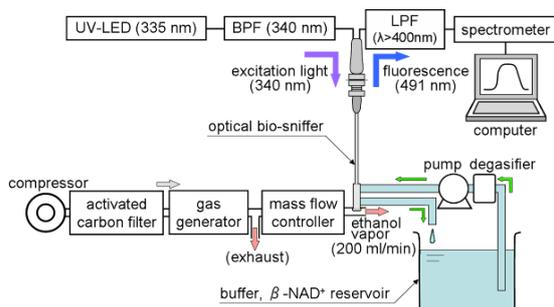


図 3 エタノールガス計測実験系

## 4. 研究成果

### (1) UV-LED を用いた $\text{NADH}$ 蛍光検出システムの構築

超純水を満たしたキュベット光ファイバ先端を浸漬し、励起光を照射したときの、標準  $\text{NADH}$  溶液の滴下に伴う蛍光強度の出力変化と定量特性を図 4 に示す。 $\text{NADH}$  濃度に応じた蛍光強度のスペクトルが観察され、スペクトルピークの出力定常値をもとに定量特性を評価したところ、 $\text{NADH}$  を 1.0 - 300.0  $\mu\text{mol/l}$  の濃度範囲で定量が可能であった。

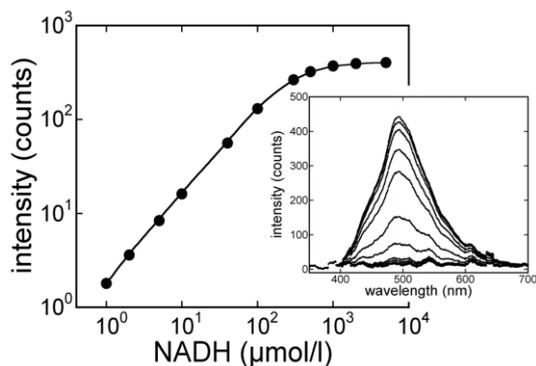


図 4  $\text{NADH}$  滴下に伴う蛍光スペクトル変化と定量特性

### (2) $\text{NADH}$ 蛍光検出によるエタノール用バイオセンサ

図 2 の実験系にて、 $\text{NAD}^+$  と ADH を含むリン酸緩衝液を満たしたキュベットに光ファイバ先端を浸し、標準エタノール溶液の滴下に伴い、生成される  $\text{NADH}$  の蛍光出力変化を計測したところ、エタノール溶液の滴下に応じた出力が得られた。この結果をもとにエタノール濃度に対する定量特性を調べたところ、エタノール溶液を 5.0 - 10000  $\mu\text{mol/l}$  の濃度範囲で定量が可能であった (C.V. : 1.91 %, 1000  $\mu\text{mol/l}$ ,  $n = 5$ )。

この結果を踏まえ、ADH 固定化バイオセンサを作製し、エタノール計測を行った。 $\text{NAD}^+$  を混合したリン酸緩衝液を満たしたキュベットにバイオセンサ感応部を浸し、エタノール溶液滴下に伴う蛍光強度の出力変化を計測し、エタノール溶液に対する定量特性を調べたところ、0.01 - 100 mmol/l の濃度範囲でエタノールの定量が可能であった (図 5)。

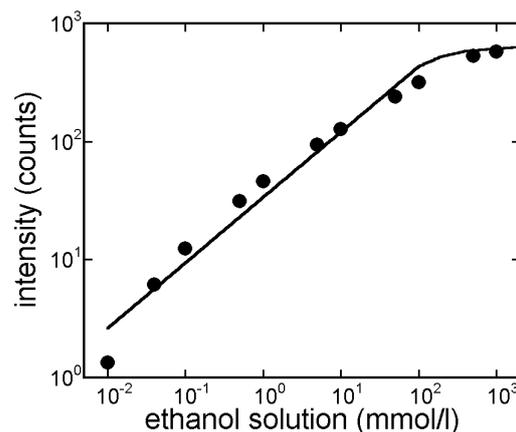


図 5 エタノール溶液に対するバイオセンサの定量特性

### (3) ADH バイオセンサによるエタノールガスの蛍光計測

図 3 の実験系を構築し、標準ガス発生装置にて発生したエタノールガスを反応セルに導

入し、酵素反応により生成される NADH の蛍光強度を測定したところ、各エタノールガス濃度に応じた蛍光出力の増加が観察された。そこで、センサの定量特性を調べたところ、酒気帯び運転の域値(78ppm)及び人の嗅覚による検出限界(0.36 ppm)を含む、0.32 - 100.0 ppm の範囲でエタノールガスの定量が可能であった(図 6)。

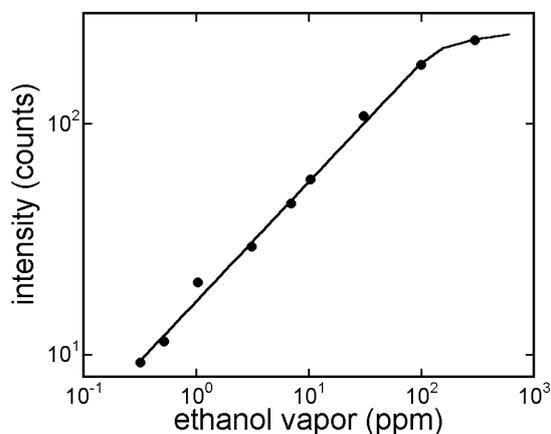


図 6 エタノールガスに対する定量特性

また、本センサのガス選択性を市販の半導体式ガスセンサと比較したところ、半導体式ガスセンサでは全てのガス成分に応答を示すし、低いガス選択性が確認され、本センサでは、酵素の基質特異性に基づく高い選択性が得られた(図 7)。

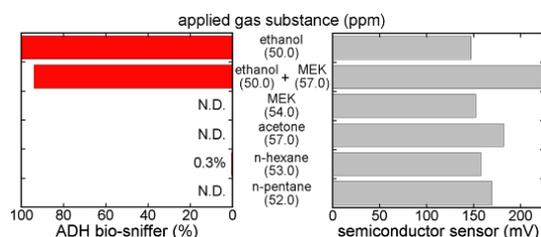


図 7 ガスセンサのガス選択性の比較

本研究では、UV-LED を用いることで小型 NADH 蛍光計測システムを構築し、NAD<sup>+</sup>依存型脱水素酵素である ADH を用いて NADH 蛍光検出式バイオセンサを開発した。さらに、本センサをガス計測へ適用したところ、酒気帯び運転域値、並びに人の嗅覚検出限界を含む、0.32 - 100.0 ppm の濃度範囲で、高い選択性にてエタノールガスの定量が可能であった。今後は、他種の脱水素酵素との組み合わせることで、多様な化学物質計測が可能となり、医療・環境・食品分野での診断や検査に利用できるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① K. Miyajima, G. Itabashi, T. Koshida, K. Tamari, D. Takahashi, T. Arakawa, H. Kudo, H. Saito, K. Yano, K. Shiba, K. Mitsubayashi, Fluorescence immunoassay using an optical fiber for determination of *Dermatophagoides farinae* (*Der fl*), Environmental Monitoring and Assessment, in press, 2011.
- ② T. Arakawa, T. Koshida, T. Gessei, K. Miyajima, D. Takahashi, H. Kudo, K. Yano, K. Mitsubayashi, Biosensor for L-phenylalanine based on the optical detection of NADH using a UV light emitting diode, Microchimica Acta, 173, pp.199-205, 2011.
- ③ M. X. Chu, K. Miyajima, D. Takahashi, T. Arakawa, K. Sano, S. Sawada, H. Kudo, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, M. Mochizuki, K. Mitsubayashi, Soft contact lens biosensor for in-situ monitoring of tear glucose as non-invasive blood sugar assessment, Talanta, 83, pp.960-965, 2011.
- ④ Y. Miyoshi, K. Miyajima, H. Saito, H. Kudo, T. Takeuchi, I. Karube, K. Mitsubayashi, Flexible humidity sensor in a sandwich configuration with a hydrophilic porous membrane, Sensors and Actuators B, 142, pp.28-32, 2009.
- ⑤ H. Ishimaru, H. Kudo, Y. Suzuki, T. Gessei, K. Miyajima, H. Saito, K. Mitsubayashi, A NADH-dependent alcohol gas sensor (bio-sniffer) with an UV-LED, Journal of Advanced Science, 21, pp.41-42, 2009.
- ⑥ H. Kudo, M. Sawai, X. Wang, T. Gessei, T. Koshida, K. Miyajima, H. Saito, K. Mitsubayashi, A NADH-dependent fiber-optic biosensor for ethanol determination with a UV-LED excitation system, Sensors and Actuators B, 141, pp.20-25, 2009.
- ⑦ M. X. Chu, H. Kudo, T. Shirai, K. Miyajima, H. Saito, N. Morimoto, K. Yano, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, K.

Mitsubayashi, A soft and flexible biosensor using a phospholipid polymer for continuous glucose monitoring, *Biomedical Microdevices*, 11, pp. 837-842, 2009.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 芳賀俊介, 北和昂, 王シン, 宮島久美子, 高橋大志, 荒川貴博, 工藤寛之, 三林浩二, アルコール代謝評価のための呼気中エタノールガス可視化システム, 第 58 回応用物理学関係連合講演会, 厚木, 2011 年 3 月.
- ② 山下俊文, 板橋玄, 月精智子, 宮島久美子, 高橋大志, 荒川貴博, 工藤寛之, 三林浩二, 住環境中ホルムアルデヒドの高感度モニタリングを目的とした生化学式ガスセンサ, 第 22 回 S A S インテリジェントシンポジウム, 平塚, 2010 年 11 月.
- ③ K. Miyajima, G. Itabashi, D. Takahashi, T. Arakawa, H. Kudo, H. Saito, K. Mitsubayashi, Fiber-optic fluoro-immunoassay for on-site detection of Dermatophagoides farinae allergen in residential environment, 13th International Meeting on Chemical Sensors, Perth, Jul. 2010.
- ④ 宮島久美子, 板橋玄, 玉利佳子, 高橋大志, 荒川貴博, 工藤寛之, 齊藤浩一, 矢野和義, 芝紀代子, 三林浩二, ダニアレルゲン Der f1 の住環境における動態評価のための蛍光免疫計測に関する研究, 第 71 回分析化学討論会, 松江, 2010 年 5 月.
- ⑤ G. Itabashi, T. Koshida, K. Miyajima, D. Takahashi, T. Arakawa, H. Kudo, K. Mitsubayashi, A high-sensitive fiber-optic biosensor for Phenylalanine using an UV-LED excitation system, 8th Asian Conference on Chemical Sensors, Daegu, Nov. 2009.
- ⑥ K. Miyajima, G. Itabashi, T. Koshida, D. Takahashi, T. Arakawa, H. Saito, H. Kudo, K. Mitsubayashi, Fiber-optic fluoro-immunoassay system for a determination of mite allergen in residential atmosphere, 8th Asian Conference on Chemical Sensors, Daegu, Nov. 2009.
- ⑦ H. Kudo, K. Miyajima, D. Takahashi, T. Arakawa, H. Saito, K. Mitsubayashi, Fiber optic Bio-sniffer (biochemical gas sensor) using UV-LED light for

monitoring ethanol vapor with high sensitivity & selectivity, The 8th annual IEEE Conference on Sensors, Christchurch, Oct. 2009.

- ⑧ M. Sawai, K. Miyajima, D. Takahashi, T. Arakawa, H. Saito, H. Kudo, K. Mitsubayashi, Optical Bio-sniffer (gas sensor) using UV-LED for gaseous ethanol, 6th International Conference Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications, Athens, Oct. 2009.
  - ⑨ T. Koshida, M. Taniguchi, K. Miyajima, D. Takahashi, T. Arakawa, H. Kudo, K. Yano, K. Mitsubayashi, A flow analysis of E.coli O157:H7 by fiber optic fluorescent immunoprobe, FLOW ANALYSIS XI, Mallorca, Sep. 2009.
  - ⑩ 工藤寛之, 鈴木祐貴, 月精智子, 宮島久美子, 高橋大志, 荒川貴博, 齊藤浩一, 三林浩二, 住環境における高感度 VOC 計測をめざした生化学式ガスセンサ, 電気学会 バイオ・マイクロシステム研究会, 東京, 2009 年 7 月.
  - ⑪ H. Kudo, M. Sawai, T. Gessei, K. Miyajima, D. Takahashi, T. Arakawa, H. Saito, K. Mitsubayashi, Biochemical gas sensor (Bio-sniffer) using an ultraviolet LED for ethanol gas measurement, 9th Workshop on (Bio)sensors and Bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis, Montreal, Jun. 2009.
  - ⑫ 宮島久美子, 越田智之, 齊藤浩一, 工藤寛之, 三林浩二, ダニアレルゲン Der f I 測定のための光ファイバ式蛍光免疫計測システムに関する研究, 第 48 回日本生体医工学会大会, 東京, 2009 年 4 月.
- [図書] (計 2 件)
- ① 宮島久美子, 板橋玄, 玉利佳子, 高橋大志, 荒川貴博, 工藤寛之, 齊藤浩一, 矢野和義, 芝紀代子, 三林浩二, 光ファイバー技術を利用してダニアレルゲンをリアルタイムで測定, 第 71 回分析化学討論会「展望とトピックス」, 社団法人日本分析化学会 展望とトピックス委員会, 東京, 2010 年 5 月.
  - ② 宮島久美子, 齊藤浩一, 三林浩二, 第 34 章 ヘルスケアのための環境バイオセンサ, ヘルスケアとバイオ医療のための先端デ

バイス機器, 三林浩二 監修, シーエムシー出版, 東京, 2009年5月.

[その他]

- ① センサ EXPO2010, 東京ビックサイト, 2010年11月.
- ② センサ EXPO2009, 東京ビックサイト, 2009年4月.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮島 久美子 (Miyajima Kumiko)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
技術職員  
研究者番号: 10516298

### (2) 研究協力者

三林 浩二 (Mitsubayashi Kohji)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
教授  
研究者番号: 40307236

工藤 寛之 (Kudo Hiroyuki)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
講師  
研究者番号: 70329118

荒川 貴博 (Arakawa Takahiro)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
助教  
研究者番号: 50409637