

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300068

研究課題名(和文) UV-LED励起蛍光法と代謝酵素を組合せた、超高感度な蛍光式匂い成分モニタリング

研究課題名(英文) High sensitive fluorometric biosniffer based on UV-LED emission light and metabolizing enzyme

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円、(間接経費) 4,680,000円

研究成果の概要(和文)：光学素子であるUV-LEDを利用したNADH蛍光計測システムを開発し、自家蛍光の少ない高分子材料PMEHを独自に合成し、代謝酵素の固定化に用い、また自作の洗浄システムを組み合わせることにより、匂い成分を選択的かつ高感度に連続モニタリング可能な生化学式ガスセンサシステムを開発した。本センサはホルムアルデヒドガスを高感度に検出でき、750ppt(1兆分の1)より定量可能であった。また他の脱水素酵素を適用することで多様な匂い成分の測定が可能であった。

研究成果の概要(英文)：A fluorometric biochemical gas sensor (biosniffer) for odor chemicals was developed by incorporating with an UV-LED emission light, a novel polymer PMEH (with low auto fluorescence) and metabolizing enzymes. The gas sensor immobilized formaldehyde dehydrogenase can successfully measure gaseous formaldehyde (lower detection limit: 750 ppt [parts per trillion]; human smell detection limit: 400 ppb [parts per billion]) with high gas selectivity. The sensor system was applicable for monitoring a different volatile chemical by changing it with other dehydrogenase enzyme.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学 知覚情報処理・知能ロボティクス

キーワード：UV-LED 匂い 高感度 選択性 代謝酵素 蛍光 揮発成分

1. 研究開始当初の背景

知覚情報の高機能化が進んでいるなか、嗅覚情報に相当する匂いの情報化は社会のニーズに応えるレベルに至っていない。しかしながら、その基礎となる計測技術において、半導体ガスセンサや、QCM、SPRなどの高感度デバイスを中心に精力的な研究が進められ、匂い成分の認識、生体臭の検知、可燃性危険物の検出、食品工程への匂い評価などの展開が進められ、匂いの情報化は21世紀において極めて重要であることは議論するまでもない。

申請者らはこれまでに酵素や抗体などの生体認識素子を利用し、多種多様な生化学式ガスセンサ(バイオ・スニファ)を開発し、匂いの情報化研究を進めてきた。このバイオスニファの特徴として、極めて高い選択性を有する、測定環境における湿度の影響を受けない、さらに多様な検出系との組み合わせが可能で、高感度化や広いダイナミックレンジを実現できることが挙げられる。例えば、飲酒後の口臭に含まれるアルコールガスやアセトアルデヒドガスを、ほかの飲食物のガスや、口腔由来の口臭等に影響されることなく、検知・定量することが可能である。つまり、センサがガス成分に高い選択性を持ち、ガス成分とセンサが1対1の関係であることから、匂い成分を情報化することに成功した。上述した半導体ガスセンサやQCMなどのガス選択性が十分でないセンサでは、このような匂いの情報化は不可能である。

そして申請者はこれまでの多様な匂い計測研究を通じて、酵素や抗体などの生体反応を介して、匂い成分を高感度な光学モニタリング計測へと誘導できることを見出してきた。特に近年、開発が進んでいる紫外線領域の発光ダイオード(UV-LED)を励起光源として用い、匂い成分の酵素触媒反応にて生まれる生成物等を高感度に蛍光モニタリングできることを示した。例えば、生体の多様な酵素群は食物の消化・分解・代謝と同様に、匂いや臭気成分を分解する消臭・無臭化機能を持っている。そして、これら酵素群の触媒反応において、「補酵素」や「酸素分子(O₂)」が電子受容体として機能している。主要な補酵素である酸化型NADは、多様な脱水素酵素の電子受容体として機能し、匂い成分を分解する。その触媒反応において、酸化型NADが電子を受容することで還元型NADHが生成される。この還元型NADHは蛍光特性を有しており、340nmの励起光(紫外光)を照射することで、可視光領域の491nmにて蛍光を発する。この蛍光を光検出器で捉えることで、匂い成分の存在を検知し、その蛍光強度で成分濃度を測定することができる。これまでは残念なことに、340nmの紫外光励起は容易でなく、一般的な水銀ランプでは、装置が大型で、消費電力や発熱も大きく、光量が不安定である欠点があった。しかしながら光学半導体の発展に伴い、小型、低消費電力かつ安

定した発光ダイオード(LED)が開発され、近年その発光波長が低波長(紫外領域)に達しつつある。つまり、匂い成分を認識する生体触媒と、光強度が安定なUV-LED蛍光計測系を組み合わせることで、小型かつ低消費電力の高感度(pptレベル)の光学式匂いセンサが開発できる。本センサシステムは生体触媒を交換することで、多様な匂い成分の計測へと利用でき、また「匂い情報を光情報へと変換」できることから、空間を拡散する匂い成分をモニタリングする新しい人工嗅覚システムへと展開できる。

2. 研究の目的

本申請課題では知覚情報の中でも、研究と実用化が遅れている匂い情報(揮発性化学情報)について、匂い成分の認識素子として、生体触媒である酵素(脱水素酵素群、酸化酵素群)を用い、その反応生成物である還元型NADH(励起波長:340nm、蛍光波長:491nm)や、電子受容体である酸素の感応物質:白金ポルフィリン錯体(励起:395nm、蛍光:648nm)の蛍光強度を測定し、低濃度レベルにて匂い成分を連続計測可能なセンサシステムを構築する。本システムでは、新規なUV-LED光源を多連装化して励起光源として用い、多軸の光ファイバや高感度フォトマルチプライアなどを組み合わせることで、小型で低消費電力、光安定性に優れた光学系を実現する。また酵素膜の担持材料にも蛍光ノイズの低い高分子膜を独自に合成し、pptレベルでの複合標準ガス発生装置を導入し、pptレベルでの匂いモニタリングとしての特性を調べ、新規な人工嗅覚へと発展させる。本研究は「匂い情報を光情報へと変換」するもので、匂いの可視化(二次元、三次元情報)としての匂い情報の有効性を高めることが可能となる研究である。

3. 研究の方法

本課題は、匂い情報つまり揮発性化学情報について、匂い成分の認識素子として生体触媒である酵素群を用い、その電子受容体の蛍光特性の変化を調べ、高感度に匂い成分を計測可能なセンサシステムを構築することである。そこでH23年度にはまず励起光源系の設計を行い、小型かつ光学安定性に優れたUV-LEDにバンドパスフィルターを組み込むことで、蛍光物質に対するピーク波長のズレを補正した。またこれに伴う光強度の低下を抑えるために、多連装式のUV-LED光源システムを組み込み、励起光源としての光強度を増大させた。さらに多連装光源での励起を効率的に行い、蛍光へと誘導するために、蛍光検出用の光ファイバ(1軸)を中心とし、周辺に6軸の光ファイバを配した7軸の光ファイバを導入した。加えて、蛍光ファイバ側から光検出器(光電子増倍管)への間にも蛍光を効率的に計測するため、バンドパスフィルターを設置し、ノイズの低減を図った。

平成 24 年度には、初年度の光学系の最適化による高感度な蛍光検出系にて、匂い成分の高感度計測を進めた。光学系の高度化において、生体触媒での反応部を最適化では酵素触媒を光ファイバ端面に装着する固定化法の検討が不可欠であった。既存の酵素固定化材である光架橋性樹脂は材料自身の自家蛍光がノイズを発生することから、包括固定化用の高分子材料 PME_H を独自に合成した。PME_H は生体適合性材料 MPC の一種で、細胞膜と同様なリン脂質基を有し、親水基と疎水基を有する両親媒性の高分子材料で、光学特性にも優れている。そこで MPC モノマーをベースに EHMA モノマーを加えて、ラジカル重合を行い、透析分離と乾燥工程を経てポリマーを合成した。

また初年度に励起光源系の設計として、バンドパスフィルター、多連装式の UV-LED 光源系、7 軸光ファイバにより構成したシステムを導入したが、感応部に匂い成分やその代謝産物が蓄積して、光学出力値の初期値へのシグナル復帰機能が得られなかった。そこで嗅覚の粘膜層に相当する自作の洗浄システムを光ファイバ先端に取り付け、酵素反応に不可欠な酸化型 NAD 溶液の循環システムを組み込んだ。

平成 25 年度ではさらに高輝度な UV-LED 光源装置として深紫外 LED ランプ & モジュールを導入し、センサデバイスの更なる高感度化を測った。また開発したセンサシステムでは、ppb (10 億分の 1) より低いガス濃度の測定が可能であることから、ppt (1 兆分の 1) レベルで匂い成分を発生できる装置として「低濃度複合標準ガス発生装置」を用い、開発した高感度匂いセンサの特性評価などを調べた。

4. 研究成果

UV-LED を励起光源とし、代謝酵素を用いた超高感度な蛍光式匂いセンサシステムの開発を進め、以下の成果が得られた。

平成 23 年度には構築したシステムを用いてこれまでにアルデヒド脱水素酵素を認識素子として用いて、アルデヒド化合物をその電子受容体である酸化型 NAD より生じる、蛍光特性を有する還元型 NADH (励起波長 340nm) をピーク波長 335nm の UV-LED を用いることで、溶液系にて検出することに成功した。次にアルデヒド化合物の一つであるアセトアルデヒドについて、溶液中にて蛍光出力の変化を調べたところ、溶液濃度に伴う出力増加が確認された。

平成 24 年度には、PME_H で酵素触媒を H-PTFE 膜に包括固定化し、その酵素膜を光ファイバの感応部に装着して、蛍光計測プローブとしたところ、自家蛍光に伴うノイズが観察されず、良好な NADH 計測及びガス計測が可能となった。また酵素反応に不可欠な酸化型 NAD 溶液の循環システムを組み込むことにより酸化型 NAD を常時供給しな

がら、匂い成分の連続的な計測が可能となり、ホルムアルデヒドガスなどのガス成分を嗅覚閾値以上の感度で連続モニタリングすることに成功した。

平成 25 年度では、シックハウス症候群を誘発するホルムアルデヒドガスを対象ガスとして調べたところ、低濃度検出限界: 750 ppt にてホルムアルデヒドガスを連続的に測定できることに成功した。またガス計測に用いた酵素はホルムアルデヒドを特異的に触媒することから、既存の無機材料のガスセンサに対して極めて高いガス選択性を示した。なお本センサはバイオセンサ技術を利用していることから、湿度の影響やキャリアガス成分のノイズを受けない特徴が確認された。さらに認識素子として用いる各種脱水素酵素を用いることで、エタノールやアセトアルデヒドなどの多様な匂い成分の計測が可能であった。

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 2 件)(全て査読あり)

— Kudo H, Yamashita T, Miyajima K, Arakawa T, Mitsubayashi K, NADH-fluorometric Biochemical Gas sensor (bio-sniffer) for Evaluation of Indoor Air Quality, IEEE Sensors Journal, vol. 13, No. 8, 2828-2833, 2013.
DOI: 10.1109/JSEN.2013.2257739

— Kudo H, Wang X, Suzuki Y, Ye M, Yamashita T, Gessei T, Miyajima K, Arakawa T, Mitsubayashi K; Fiber-optic biochemical gas sensor (bio-sniffer) for sub-ppb monitoring of formaldehyde vapor, Sensors and Actuators B-Chemical, 161, 2012, 486-492.
DOI: 10.1016/j.snb.2011.10.065

〔学会発表〕(計 5 件)

Mitsubayashi K, Novel biosensor approaches for biomedical applications, 2013 International Workshop on Smart Info-Media Systems in Asia (SISA 2013), Sept. 30 – Oct. 2, 2013, Nagoya, Japan.

三林浩二、「健康・医療・福祉のためのバイオセンシングと近未来生体計測 ~ Soft-Device 技術を用いたウェアラブルセンサ・バイオスニファ・アクチュエータ ~」, 第 8 回 医療エレクトロニクスデバイス技術分科会、一般社団法人 電子情報技術産業協会、日時: 平成 25 年 8 月 23 日 (金)、会場: 経団連会館, 東京

叶明, 山下俊文, 月精智子, 宮島久美子, 荒川貴博, 工藤寛之, 三林浩二; 室内空質環境

の評価のためのホルムアルデヒドガス用バイオセンサに関する研究, 第2回次世代センサ研究発表会, Oct. 10-12, 2012, 東京.

Mitsubayashi K; Novel biosensor approaches for biomedical applications, E-MRS 2012 SPRING MEETING (Invited lecture), May 14-18, 2012, Strasbourg, France.

Ye M, Yamashita T, Itabashi G, Gessei T, Wang X, Arakawa T, Kudo H, Mitsubayashi K; Fiber optic biosensor with UV LED for assessment of formaldehyde vapor in indoor environment, 9th Asian Conference on Chemical Sensors, Nov. 15, 2011, Taipei, Taiwan.

〔図書〕(計 1件)

三林浩二、分筆「第1編 第3章 ユビキタス・ヘルスケアのための新規なバイオセンシング技術 - 健康ビッグデータ時代に備えて - 」、「パーソナル・ヘルスケア - ユビキタス、ウェアラブル医療実現に向けたエレクトロニクス研究最前線 - 」(2013年10月23日 株式会社エヌ・ティー・エス 刊)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/inst/inst-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

(H23-24 まで分担)

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