

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360181

研究課題名(和文) ナノレポーター粒子とナノファイバセンサアレイによる匂いの可視化

研究課題名(英文) Visualization of odor using nano-reporter particles and nano-fiber sensor array

研究代表者

林 健司 (HAYASHI, Kenshi)

九州大学・システム情報科学研究科(研究院・教授)

研究者番号：50202263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：匂い情報の可視化(匂いコードによる匂いの質の可視化)を可能とする技術として、i) 匂い分子認識能力の学習・再構築が可能な分子鋳型材料、ii) 蛍光標識した抗体を用いた表面プラズモン共鳴励起増強蛍光法による匂い分子の特異的・高感度検出、iii) 金ナノ粒子アレイ、および金ナノ粒子の局在プラズモン共鳴とカップリングする有機半導体ナノファイバによる匂い分子を検出できる材料・技術を開発した。これらの匂い分子認識材料や分子検知技術を可視化フィルム化、あるいはアレイセンサ化したデバイスを実現することで光学的な空間測定が可能であり、化学物質空間を可視化できるセンサが実現可能となった。

研究成果の概要(英文)：Visualization of odor quality and odor space information was examined using nano-reporter particle, which can respond to odor molecular information and sensor array. Selective odor sensing films were realized using molecular imprinted polymer and selectivity was analyzed with SPME-GC/MS method. The selectivity of the film could be reconfigured by a certain treatment, and then the film was suitable for the sensor array for the odor space measurement. Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence Spectroscopy was also examined to attain the selective and sensitive optical sensor, and the trial sensing system was developed. Gold nanoparticles were also used for the nano-reporter particle, which were coupled with organic nano-fiber conductor. The sensitivity of the coupled sensor was higher than ordinal plasmonic sensors and could be addressed with optical method, which can be utilized for the odor space measurement.

研究分野：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：匂いセンサ 可視化 分子認識 表面プラズモン 有機エレクトロニクス 分子鋳型 励起増強蛍光

1. 研究開始当初の背景

匂いのセンシングデバイスは食品、医療、セキュリティ、環境、防災など、我々の安全と安心に関わる重要で広範な分野への応用が可能である。その必要性からこれまでに多くの匂いセンサの研究・開発が行われてきたが、極めて多数の化学物質を高い感度で検出、識別、認識できる生物の嗅覚に匹敵する柔軟で包括的な化学物質検出能力を持つセンサは存在しなかった。一方で、生物の嗅覚生理学は分子生物学の急速な発展により、匂い物質が数百種類の匂い受容タンパク質により認識され、匂い物質により活性化された受容体の組み合わせ（匂いコード）と嗅球における匂いクラスターマップが匂い情報であることが明らかとなっている。様々な化学物質をその特徴により識別することができる生物の嗅覚は化学物質に満ちあふれた世界を認識する優れた化学センサである。ナノ構造により分子を認識する匂いコードセンサはケミカルワールドをイメージ化するキーデバイスであり、退化した人の嗅覚では見ることができない化学物質に関連する広い応用分野への波及効果を持つ。本研究はこのような背景のもと、膨大な種類の構造情報から成り立つ匂い分子情報をグルーピングし、抽象化する匂いのコーディング方法を用いることで匂いのセンシング、匂い情報通信、さらに匂いの合成が可能になり、人が見ることができない化学物質世界を可視化することができる技術の開発を目指す。そのために、ナノテクノロジー、バイオミメティクス、電子デバイス技術、表面科学などの手法を用いて、ナノ構造を持った柔軟なデザインが可能なセンサ表面を構築することで、化学物質世界を可視化する情報エレクトロニクスのキー技術である新しい化学センサデバイス技術を構築する。

2. 研究の目的

人は匂いを見ることができない。匂いに代表される生物の優れた化学感覚をセンサ技術として利用し、さらに化学物質の質や空間を可視化する技術がもたらすインパクトは極めて大きい。可視化された化学物質世界の情報は、環境、医療、食料生産、防災など様々な分野への応用が可能である。本研究は我々を取り囲む化学物質世界を匂いコード情報により可視化することを目的とする。この目的を達成するために、化学物質情報を嗅覚バイオモデルに基づいて計測し、匂いコードによって化学物質世界をデジタル化する。すなわち、複数の分子認識ナノレポーター粒子による匂い情報のコーディングとアレイセンサによる匂い空間コーディングによって包括的な化学物質情報の可視化が可能なセンシング技術を実現する。本研究では匂いを可視化する柔軟な機能設計が可能なセンシングデバイスとして、ナノ領域の匂いコード分子情報を捉えるプローブである匂い分子

認識性ナノレポーター粒子とナノレポーター粒子とナノファイバセンサアレイという2つの要素技術により実現する。

3. 研究の方法

本研究で行った匂いセンシング技術は3つの基盤技術、i)柔軟性を持つ分子鑄型ポリマによる匂い分子吸着膜（匂いコード検出膜）の作成、ii)表面プラズモン励起増強蛍光法（SPFS）による匂い物質の検知、iii)金ナノ粒子の局在プラズモン共鳴による匂い物質の検知技術から成り立つ。これらは匂い分子をその特徴によって選択的に検知できる技術であり、匂いのコーディングを可能とする。また、いずれもセンサアレイ化することが可能な技術であり、匂いの空間情報を可視化できる技術である。

まず、分子鑄型ポリマ膜は表面ゾルゲル法により作成した。匂い物質の吸着剤であるPDMSの表面にリンカーとしてTiアルコキシド層を形成し、その上に適切な濃度に調整したテンプレート匂い分子とポリアクリル酸、メタクリル酸、あるいはペプチドを堆積することで分子鑄型層を作製する。その後、テンプレート匂い分子を溶液および真空加熱により取り去り、テンプレート分子の吸着サイトを持つ匂い分子吸着膜とする。匂い物質に対する選択性の評価はSPME-GC/MS法により実施した。また、匂い応答は吸着膜から加熱脱着した気体をガスセンサにより計測することで調べた。

次に、表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance: SPR）法と、蛍光測定を組み合わせた表面プラズモン励起増強蛍光分光（Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence Spectroscopy: SPFS）法について、SPFSはSPRによる増強電場を励起場としており、励起の為の強いレーザー光は不要であり、半導体レーザー（635 nm）とビームエキスパンダを用いることで可変部の無いコンパクトなSPFS測定系を構築した。匂い物質のモデルとして軍用爆薬として用いられるトリニトロトルエン（2,4,6-trinitrotoluene: TNT）のppt (pg/mL) オーダーの検出を目標として、金薄膜表面にオリゴエチレングリコールを有する自己組織化単分子膜とTNT類似物質（DNP-glycine, 抗体結合部）の固定化によるセンサチップを作製した。抗体は市販の抗TNTモノクローナル抗体をAlexa Fluor 647により蛍光標識した。構築したSPFS測定装置と市販のSPR装置（BIACORE J）に同濃度の蛍光標識化抗体を流通させた時の結合量を調べ、結合の検出限界を比較した。さらに、SPFS測定装置で間接競合法によるTNTの検出を行った。

最後に、金ナノ粒子を用いた光学的に匂い物質を検知可能な匂い可視化フィルムの作製技術として、金ナノ粒子-有機材料をカップリングさせたトランスデューサ系を作成し

た。金ナノ粒子は局在プラズモン共鳴 (LSPR) により光と相互作用する。この金ナノ粒子を用いる技術として、金ナノ粒子を固定化する技術、さらに匂い分子と相互作用するオリゴペプチド、あるいは有機半導体ポリマ (ポリアニリンナノファイバ、あるいは P3HT) をカップリングさせたセンサ作製を行った。金ナノ粒子はガラス基板上にスパッタによる島状構造、あるいは金コロイドの固定化により作成した。匂い検知層はキャストあるいは浸漬による吸着により形成した。このセンサデバイスを電気伝導性変化と光による検知特性の変化という 2 つの観点から評価した。

4. 研究成果

まず、匂い情報を可視化 (匂いコードによる数値化) を行うため、匂い物質と匂い検知剤である匂い吸着プローブ (ナノレポーター粒子) を作成した。その際、分子鑄型および匂い物質親和性を持つペプチドを用い、主として水素結合による分子間力を相互作用として匂い検知剤に取り込んだ。プローブの匂い分子選択能力はプローブへの吸着匂い分子を SPME (固相マイクロ抽出) 法によって濃縮サンプリングし、ガスクロマトグラフィ質量分析器 (GC-MS) を用いて吸着分子の組成を分析し、匂い分子選択性があることを確認した。また、GC-MS は可視化対象の匂い物質を決定する際にも用い、例として人の掌から得られる匂い物質について分析を行い、有機酸類を候補として絞り込んだ。匂い検知剤はこの有機酸類を対象として構築を進め、有機酸分子選択性を得ている。一方で、匂い検知プローブとしてバニロイド親和性を持ち、金結合性を有するトリペプチドを合成し、導電性ナノファイバ (ポリアニリン) 上に金ナノ粒子を介して結合させた。結果として得られた匂い分子認識部位を持つ低次元導電層薄膜を櫛型電極上にキャストし、これを匂いセンサ電極として、バニリン選択性がある導電性変化を得た。この際の導電性変化は金ナノ粒子を介した分子認識性ペプチドと導電性ナノファイバとの縦カップリング、ナノファイバに沿った横カップリングによるものである。

次に、匂い分子を分子認識により補足・吸着する材料と匂い物質を光学的に検知できるセンシングフィルムの開発を行った。分子認識層には分子鑄型法による分子吸着サイトを持つ高分子フィルムを用い、その分子認識能力を SPME (固相マイクロ抽出) 法によって濃縮サンプリングし、ガスクロマトグラフィ質量分析器 (GC-MS) を用いて吸着分子の組成を分析し、匂い分子選択性があることを確認した。また、GC-MS は可視化対象の匂い物質を決定する際にも用い、例として人や食品などのサンプルから得られる匂い物質について分析を行い、有機酸類やケトン類、アルデヒド類を候補として絞り込んだ。匂い

吸着層はこれらの匂い物質を対象として開発を進め、対象匂い分子への選択性を確認した。一方で、表面プラズモン共鳴 (SPR) による励起増強蛍光法 (SPFS) を用いて、蛍光標識した抗体により匂い分子を特異的かつ高感度に検出することを目的とし、SPR による励起方法の検討を行った。光源の選定を行い、635nm の半導体レーザー、プリズム、CMOS カメラを用いてクレッチマン配置による SPR 光学系を構築した。また、蛍光観察用のフローシステムを構築した。以上の匂い物質認識と吸着検知原理を金ナノ粒子の局在プラズモン共鳴 (LSPR) 現象とカップリングさせるために、LSPR フィルムの光透過性変化による匂い物質吸着の検出能力を確認した。さらに、金ナノ粒子を用いたアレイ電極の作製を行い、匂い物質吸着を電気的なシグナルとして検知する技術を検討した。

最後に、分子認識層には分子鑄型法による分子吸着サイトを持つ分子認識フィルムが持つ可塑性によって分子認識能力の学習・再構築が可能で、匂い分子と匂いコードに応じたテイラーメイド的な分子認識表面作成ができ、センサアレイに適した分子認識膜を実現できることを確認した。一方で、表面プラズモン共鳴 (SPR) による励起増強蛍光法では蛍光標識した抗体により匂い分子を特異的かつ高感度に検出が実現可能であることを示す結果を得た。また、金ナノ粒子を用いた LSPR フィルムの光透過性変化による匂い物質吸着の検出能力を確認した。さらに、金ナノ粒子を用いた高い配向性を持つアレイ電極の作成技術について検討を行い、気液界面に自己組織化的に配列する金ナノを応用する技術を実現した。電極技術については単一金ナノ粒子の化学物質応答性を確認する基礎デバイス開発を行い、簡便なナノギャップ作成技術を実現した。そしてそのガス応答性を電気的なシグナルとして確認できた。LSPR による可視化技術については有機半導体と金ナノ粒子の光学的なカップリングを電気信号として取り出し、高速な化学物質応答が可能でデバイスを実現した。このデバイスは光学的なアドレッシングによる空間測定が可能である。

以上の研究成果の詳細を研究項目ごとに示す。

(1) 分子鑄型ポリマによる匂い分子吸着膜 (匂いコード検出膜) の作成

この分子認識膜は分子認識能力に関する柔軟性を持ち、適切な条件下で匂い分子認識能力を初期化・構築することができる。つまり、センサ表面に適切な分子認識能力を付与でき、アレイセンサに応用することができる。図 1 に分子鑄型膜の模式図を示す。このように、検知対象となる匂い分子に対して鑄型を構築することで吸着サイトの形成が可能である。分子認識能力を SPME-GC/MS 法で調べた結果を図 2 に示す。鑄型匂い分子に対する選択係数が高く、鑄型分子認識能力を有す

ることが分かる。また、図 3 に示すように、ヘプタン酸鑄型を持つ分子認識層に対し、新たにヘキサン酸、ヘプタナール、アセトフェノンの鑄型を再学習させることで、新しい分子認識能力を付与できることが分かる。このように本研究で開発された分子認識膜はアレイセンサを構築する際に優れた特徴を持ち、また検知対象分子を多重化できることから匂いコード検知も可能であることが分かる。

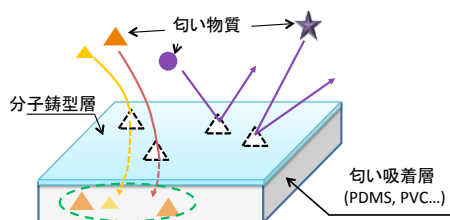


図 1 分子鑄型による匂い分子認識膜。

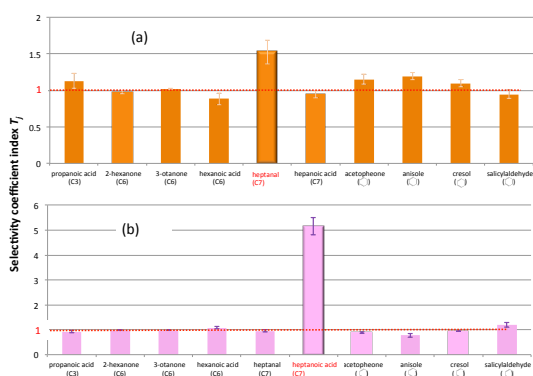


図 2 匂い分子選択性. (a) ヘプタナール分子鑄型膜, (b)ヘキサン酸分子鑄型膜. 鑄型とした匂い分子 (テンプレート物質) に対する選択性を有する。

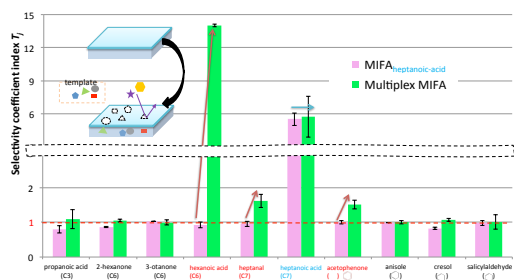


図 3 匂い分子認識能力の初期化・再構築. 鑄型ポリマの作成後、適切な処理により新たな匂い分子を検知できる表面再構築が可能。

(2) 表面プラズモン励起増強蛍光法による匂い物質の検知

匂い物質と匂い認識ナノレポーターとの相互作用計測メカニズムの解明には、分子間相互作用測定法や蛍光検出手法が必要となる。SPFS 法はプリズム側から金属薄膜に光を共鳴条件で入射した際に発生するエバネッセント場により、金属膜近傍に存在する蛍光分子を励起し、その蛍光を検出することに

より対象を測定する方法である。そのため、センサ表面にリガンド分子 (特定分子と結合する受容体分子) を配置することにより、様々な対象物質の高感度蛍光検出が可能である。また、SPR によるエバネッセント場は界面から数 100nm の範囲にしか存在しないので、表面近傍に存在する蛍光分子だけを選択的に励起でき、溶液中の蛍光分子からのバックグラウンド蛍光を小さく抑えることができる。

構築した SPFS 測定装置を図 4 に示す。ゴニオメーターを使用せず、くさび形の光を入射する構成のため、コンパクトな測定系が実現できた。試作 SPFS 装置と市販 SPR 装置にセットした DNP-glycine 固定化金薄膜チップ上に各濃度 (0.05~1 ppm [$\mu\text{g/mL}$]) の標識化抗体を流通し、応答特性 (標識化抗体の結合量) を調べた。その結果、試作 SPFS 測定装置の蛍光標識抗 TNT モノクローナル抗体に対する検出限界は 11.7 ppb (ng/mL)、市販 SPR 装置における検出限界は 2.3 ppb となった。また、TNT を間接競合法により測定した結果を図 2 に示す。用いた蛍光標識抗体の濃度は、500 ppb である。標準偏差の 3 倍を考慮し、TNT の検出限界は 215 ppt となった。しかしながら、高濃度側 (10 ppb) では、抗体結合率があまり減少しなかった。これは、センサチップの金薄膜の形状に由来する散乱光の影響やフローセルへの非特異吸着などが考えられる。したがって、フローセル内部の親水性化処理、センサチップや光学系の改良により、さらなる応答特性、感度と測定精度の向上が期待できる。また、2 次元 SPR の測定方法を応用すれば、イメージングに対応した測定方法へも拡張することが可能であると考えられる。

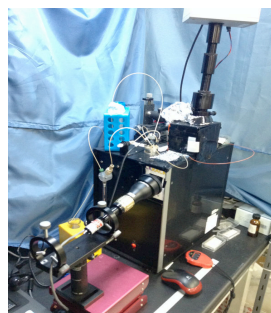


図 4 SPFS 測定装置

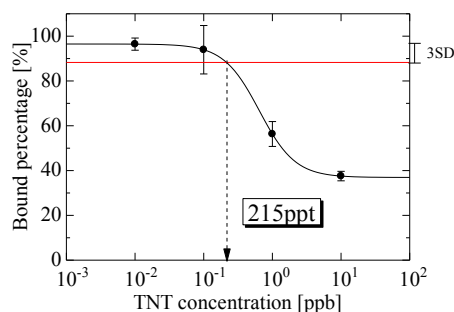


図 5 間接競合法による TNT 測定

(3) 金ナノ粒子の局在プラズモン共鳴による匂い物質の検知

金ナノ粒子を用いた匂い検知系としては金ナノ粒子架橋型ナノギャップ電極、高配向金ナノ粒子2次元レイヤを用いた抵抗変化型化学センサ(ケミレジスタ)、有機半導体カップリング匂いセンサについて研究を行った。そのうち、有機半導体カップリング匂いセンサについて説明する。図6はLSPR-有機半導体カップリングの原理図である。金ナノ粒子アレイ表面に形成された有機半導体層がLSPRによる強い近接場とカップリングし、その電気的特性の変化を鋭敏に検知できる。この方式は光によるアドレッシングが可能であるため、化学空間の可視化が可能なアレイ型化学センサとなり得る。吸収波長を変化させた様々な形状の金ナノ粒子を用いることで、吸収波長に応じた吸収ピークのスプリット・シフトが観測され、LSPR-有機半導体(P3HT)のカップリングが確認された。このような光照射により有機半導体層の変化を検知できるセンサにより、匂い物質を検知することができる。図7に示すようにエタノールガス応答が得られるが、この応答は光電流変化により得られる検出感度の方が通常のLSPR応答よりも高く、電気的なシグナルを出力とする光アドレッシング可能なセンサアレイが実現できることを示唆する。

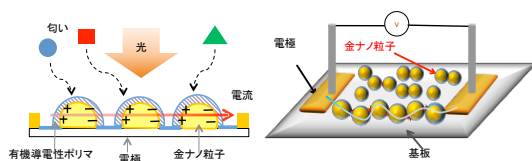


図6 LSPR-有機半導体カップリング

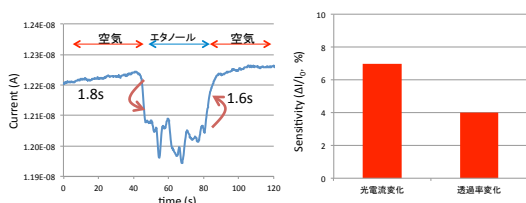


図7 LSPR-P3HT 光カップリングセンサのエタノール応答

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)

- 宮口, 林, 劉, 松永: 有機薄膜トランジスタによるガスセンシング, 電気学会研究会資料, 査読無, CHS-11, 2011, pp.5-8
- H. Matsuo, Y. Furusawa, I. Imanishi, S. Uchida, K. Hayashi: Optical odor imaging by fluorescence probes, J. Robotics Mechatronics, 査読有, 24, 2011, pp.46-54. <http://www.fujipress.jp/finder/xslt.php?mo>

de=present&inputfile=ROBOT002400010005.xml

- 中野, 今橋, 林, 分子ふるい吸着分離匂い測定システムの高機能化, Proc. 29th Sensor Symposium, 査読有, 2012, pp.37-42
- M. Watanabe, T. Matsunaga, C. Liu, K. Hayashi: Gas Sensor Based on a Nano-gap Electrode Bridged by Au Nanoparticles, Proc. 29th Sensor Symposium, 査読有, 2012, pp. 672-675
- M. Watanabe, M. Imahashi, K. Hayashi: Fabrication of AuNPs-bridged nanogap electrodes for chemosensitive sensors, Proc. CEEE, 査読有, 2013, pp.101 - 104. doi:10.3850/978-981-07-6260-5_22
- M. Imahashi, K. Hayashi: Concentrating materials covered by molecular imprinted nanofiltration layer with reconfigurability prepared by a surface sol-gel process for gas-selective detection, J. Colloid Interface Sci., 査読有, 406, 2013, pp186-195. doi:10.1016/j.jcis.2013.05.051
- 渡辺, 大岩, 陳, 劉, 林: 機能性金ナノ粒子による生体匂いセンシングデバイスの構築, 電子情報通信学会技術研究報告, 査読無, MBE-14-012, 2014

〔学会発表〕(計 17件)

- 宮口, 林, 劉, 松永: 有機薄膜トランジスタによるガスセンシング, 電気学会センサマイクロマシン部門総合研究会, 査読無, 2011.6, 東工大
- 松永, 劉, 林: ナノワイヤ被覆 Au-NPsの導電性による化学センサ, 電気関係学会九州支部連合大会, 査読無, 2011.9, 佐賀大
- 松永, 劉, 林: チオール修飾 Au-NPs の非弾性トンネル電流を用いたガスセンサ, 応用物理学九州支部学術講演会, 査読無, 2011.11, 鹿児島大
- K. Nakano, M. Imahashi, K. Hayashi: Development of molecular sieving adsorbents for odor clustering, APCOT2012, 査読有, 2012.7, Nanjing
- モクメ, 陳, 劉, 林: AuNPs の局在プラズモン共鳴を用いた匂いの流れセンサの開発, 電気関係学会九州支部連合大会, 査読無, 2012.9, 長崎大
- モクメ, 陳, 劉, 林: 金ナノ粒子-有機導電材料複合体の光導電特性, 応用物学会九州支部学術講演会, 査読無, 2012.12, 佐賀大
- M. Watanabe, K. Hayashi: Nanostructure composed of nanogap electrodes and gold nanoparticles and its application for gas sensors, ISOEN2013, 査読有, 2013.7, Daegu
- モクメ, 渡邊, 大岩, 陳, 劉, 林: 金ナノ粒子-導電性ポリマ複合体を用いたガスセンサの開発, 査読無, 電気学会センサマイクロマシン部門総合研究会, 2013.8, 東京工科大
- 大岩, 渡邊, 陳, 劉, 林: 金ナノ粒子アレ

イを用いたガスセンサの作製, 電気関係学会九州支部連合大会, 査読無, 2013.9, 熊本大

10. M. Mokume, B. Chen, C. Liu, K. Hayashi: Plasmon coupling of organic conductive polymer and gold nanoparticles composite for gas sensing, ACCS2013, 査読有, 2013.11, Chiang Mai

11. S. Tanaka, R. Yatabe, T. Onodera, K. Toko: Measurement System for Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy Using ATR Method with Focused Beam, ACCS2013, 査読有, 2013.11, Chiang Mai

12. 田中, 矢田部, 小野寺, 都甲: フォーカシング ATR 法を用いた表面プラズモン増強蛍光分光測定装置の開発, 応用物理学会九州支部学術講演会, 2013.11, 長崎大

13. 渡邊, 林: 機能化金ナノ粒子の特性評価のためのナノギャップ電極の作製, 応用物理学会九州支部学術講演会, 査読無, 2013.11, 長崎大

14. 大岩, 渡邊, 陳, 劉, 林: 金ナノ粒子アレイによるガスセンシング用ケミレジスタの作成, 応用物理学会九州支部学術講演会, 査読無, 2013.11, 長崎大

15. 渡邊, 大岩, 陳, 劉, 林: 機能性金ナノ粒子による生体匂いセンシングデバイスの構築, 電子情報通信学会 MBE 研究会, 査読無, 2014.1, 佐賀大

16. 伊藤, 田中, 矢田部, 小野寺, 都甲: 表面プラズモン増強蛍光分光測定装置に用いるセンサ表面の開発, 年電気学会全国大会, 査読無, 2014.3, 愛媛大

17. 大岩, 渡邊, 陳, 劉, 林: 多層および単層金ナノ粒子アレイによるケミレジスタの作成, 電気学会全国大会, 査読無, 2014.3, 愛媛大

〔図書〕 (計 0 件)

〔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://o.ed.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 健司 (HAYASHI, KENSHI)

九州大学・システム情報科学研究院・教授
研究者番号: 50202263

(2)研究分担者

小野寺 武 (ONODERA, TAKESHI)

九州大学・味覚・嗅覚センサ研究開発センター・准教授

研究者番号: 50336062

(3)連携研究者

劉 傳軍 (LIU, CHUANJUN)

九州大学・システム情報科学研究院・助教
研究者番号: 70599654