科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 28年 6月 8日現在

機関番号: 17102

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2013~2015

課題番号: 25420409

研究課題名(和文)分子プロファイル認識材料の創成による匂いクラスターのセンシング

研究課題名(英文)Odorant cluster sensing based on molecular profile recognition materials

研究代表者

劉 傳軍 (Liu, Chuanjun)

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:70599654

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文):生物の嗅覚機構を模倣するバイオミメティックの視点から匂いセンサを開発するため,1)分子インプリント(MIP)という手法を用い,匂い物質の分子プロファイル特徴を認識できる様々なMIP吸着材料を作成した,2)分子認識材料に基づいた匂い吸着・脱着モジュールとガスセンサに基づいたセンシングモジュールに構成された匂い計測装置を開発し,匂いのセンシングを行った,3)匂い物質の分子パラメーターに関するデータ解析を行い、分子プロファイル特徴に応じたクラスタリングができた。これらの吸着材料,センシングデバイス及び匂い分子情報解析手法の開発によって,匂いのクラスターセンシングが実現可能となった。

研究成果の概要(英文): A bioinspired odorant cluster sensing system was developed to imitate the olfactory sensory. A variety of molecular profile recognition materials were prepared by using molecular imprinting (MIP) technique. Their recognition ability was confirmed by GC/MS measurement and QCM sensing. The cluster sensing system was fabricated by the integration of a MIPs-loaded absorption/desorption modules and metal oxide semiconductor gas sensors based sensing modules. The system succeeded in the detection and recognition of odorants with different molecular profiles. The clustering of odorants based on molecular parameters was carried out by using different analysis approaches, among which t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) showed a good result in the odorant clustering. The above accomplishments make it possible to design sensor systems to detect odor in a way close to the olfactory perception.

研究分野: 工学

キーワード: 匂いセンサ 分子インプリント クラスターセンシング バイオミメティック QCMセンサアレイ 多変

量解析

1. 研究開始当初の背景

嗅覚のように匂いを測定または認識でき るセンサが実現されれば、その用途は多種 多様で様々な分野への応用が期待できる。 しかし、匂いセンサの開発はほかの感覚セン サと比べて最も遅れている。その原因は、嗅 覚の感知対象が化学物質であり、その種類が 非常に多く数十万種類と、濃度が極めて低い ことが主な理由である。また、色の三原色、味 の五つの基本味と比べて、匂いには基本臭が なく、嗅覚は人間にとって非常に感性的であ り、数値化が難しいことも理由の一つである。 これまで、様々な匂いセンサの研究・開発が 行われてきたが、その中の多くは、匂いに対 しての感度が不十分で、分子認識能力が低く、 匂いセンサに必要な要素、つまり匂い物質の 分子プロファイルに関する情報を得ることが 難しく、感性的な匂いを客観的に評価できる 匂いセンサはまだ実現されていない。一方で、 Alex と Buck 両博士の 2004 年のノーベル生理 学・医学賞の受賞を象徴として、急速に発展 している嗅覚の分子生物学は、匂いの受容お よび嗅覚システムの組織化の機構を徐々に解 明し、匂いセンシング技術の開発においてバ イオミメティックの観点から新たな道を開い てきた。

2. 研究の目的

研究代表者は既に、嗅覚の生理学の発展と 知見に基づいた匂いセンサの開発に注力して いる。例えば、独自の電気化学手法を用い、導 電性ポリマーナノファイバー匂いセンサを作 製し、センシング材料の低次元化によりセン サを高感度化することができた。また、嗅覚 受容体タンパク質の特定認識部位のアミノ構 造を模倣した人工匂い受容ペプチドナノレセ プターを作製し、上記のナノファイバーとの 複合によって、匂い物質に対しの特異選択性 も実現した。このような手法で、ヒトの嗅覚 のような優れた認識能力をセンサに与えるこ とができる。しかし、匂い受容体はおよそ400 種類あり、そのうちのほとんどは、タンパク 質の構造および匂い分子に対する特定アミノ 結合サイトが未解明のままで、匂い受容ペプ チドレセプターの設計は分子生理学の進展に 律速されている。こうした理由から、新しい 嗅覚センシングモデルの探索が必要となる。 本研究の目的は、嗅覚の匂い受容機構を模倣 するバイオミメティックの視点から、匂い物 質に対しての分子プロファイル認識および匂 いクラスター識別を行い、ヒトの嗅覚認識に 近い匂いセンシングシステムを開発すること である。分子インプリントポリマ (MIP) とい う方法を用いて、様々な MIP 分子認識材料の 創成により匂い物質の分子プロファイル認識 を実現する。MIP 分子認識材料に基づく匂い の吸着・分離およびセンシングのシステムを 組み立て、クラスター分類により匂いの識別 を実現する。また、匂い物質の分子パラメー ターに関するデータ解析を行い、匂いのクラ スターセンシングに役立つ分子特徴指標を探求する。以上の展開によって、感性的な匂いを客観的に評価できる匂いセンサに関する基盤技術の構築を目指す。

3. 研究の方法

生物の嗅覚が匂いを受容すると, その匂い 分子のプロファイルに対応した脳の嗅球上に 存在する糸球体が活性化する。類似した分子 プロファイルを持つ匂い分子に対応する糸球 体同士は、嗅球上の近い部位に存在し、 匂い クラスターを形成している。嗅覚は、このよ うな糸球体クラスターの活性化パターンが脳 に伝達され、脳は匂いをまとまりごとで認識 している。匂い物質の数は膨大であるが、各 クラスターの糸球体を活性化させる匂い物質 を分子構造、官能基、サイズ、極性、形状など の分子プロファイルに応じておよそ10種類 のクラスターに分けている。さらに、炭素鎖 の長さなどにより、同じクラスター内にもサ ブクラスターがある。また、各クラスターに 属する糸球体が反応する匂いの典型的な分子 プロファイルが匂いの性質にも関連している ことが明らかになっている。これまで、匂い には基本となる単位というものが存在しない と言われていたが、この匂いクラスターの概 念に基づいて匂いを識別できるのではないか という着想に至った。本研究では、上述の嗅 覚の匂いの受容機構を模倣した匂いクラスタ ーセンシングのモデルを提案した。この匂い クラスターセンシングシステムは分子プロフ アイル認識部と匂いクラスター識別部の両部 分を設けている。分子プロファイル認識部で は、各匂いクラスター内の分子プロファイル の特徴に応じて、そのプロファイルを認識で きる分子認識材料を設計・作製した。匂いク ラスター識別部は分子プロファイル認識材料 の認識特性を基に、匂い物質を所属するのク ラスターに分類できるセンシング仕組みを構 築した。この匂いクラスターセンシングのモ デルを用い、嗅覚の匂い認識・識別機構に近 い匂いセンシングを実現しようと考えた。

4. 研究成果

4.1 分子プロファイル認識材料の作製と吸着 性能の評価

匂い物質をクラスター分類に基づきセンシングするためには、各匂いクラスターの分子プロファイル特徴を選択的に識別できるる認識材料の作製が必要になる。我々は分子イングリンティング(MIP)という手法を用いて、匂い分子認識材料を作製しようと考えた。MIP法は、鋳型重合法の一種で、認識対象をさるの子を鋳型として重合反応をおさまである。MIP法は、りても認識対象とする方法である。MIP法は、りても認識対象とすることができるので、現在幅広い分野に応用といる。本研究は、匂い物質の分子プロファイ

ル特徴に応じて様々な MIP 認識材料を作製し、 それらの材料の匂い吸着特性を GC/MS や QCM で評価した。

4.1.1 MIP フィルム材料の作製と評価

まず、糸球体上のクラスターA に所属する 脂肪酸匂い分子とポリアクリル酸(PAA)の強 い水素結合特性を利用し、各脂肪酸テンプレ ート分子(プロピオン酸 PA、ヘキサン酸 HA、 オクタン酸 OA) を溶かした PAA のエタノー ル溶液を QCM 電極上にキャスティングし、 MIP フィルムセンサを作製した。また、マル チ OCM センサアレイシステムを開発し、様々 な単一および混合脂肪酸匂い物質のセンシン グを行った。主成分分析法(PCA)とサポートベ クターマシン法(SVM)などを用い、マルチ OCM センサアレイの出力データを解析した。 図1は、各脂肪酸ターゲット匂い物質に対し ての PCA 結果を示している。マルチ MIP-OCM センサアレイを用いて、分子サイズが異 なる有機酸匂い物質を識別できることがわか った。SVM 解析の結果から、混合匂いに対し 95%の認識率を示した。また、同じ手法を 用い、アルデヒド類匂い物質の MIP 材料の作 製とセンシングを行い、同じ高い識別率を得 ることが分かった。以上の結果から、PAA-MIP フィルム材料の匂い認識有効性が検証できた。

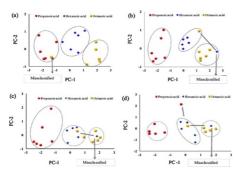


図1 MIP-QCM センサアレイによる匂い

4.1.2 分子インプリントナノビーズ (MIP-NBs) 材料の作製と評価

より高感度に匂いをセンシングするため、 ナノ構造の高い比表面積を利用した MIP-NBs を作製し、吸着性能の評価及びセンシングを 行った。まず、沈殿重合法によって、トリメチ ロールプロパントリメタクリラート (TRIM) が架橋されたポリメチルアクリル酸の MIP ナ ノビーズ (平均粒径 300nm) を作製した。MIP-NBs がコーティングされた QCM 電極は、ppm 濃度の匂い(ヘキサン酸を例として)に対し 高い感度を示した。各 MIP-NBs について、 QCM センシング及び GC/MS 評価の結果から、 非インプリントポリマービーズ (NIP-NBs) と 比べ、MIP-NBs はターケットに対してより高 い吸着量とセンシング感度を示すことが分か った (図2)。 三種類の MIP—NBs (PA-MIP, HA-MIP, OA-MIP)に基づいたセンサアレイを 構築し、匂いのマルチセンシング及び PCA デ ータ解析を行い、三種類の匂い物質の識別に 成功した。また、前述の MIP フィルム材料と

比べて、MIP-NBs のほうがより高感度、高選 択性的に匂いを識別できることが分かった。

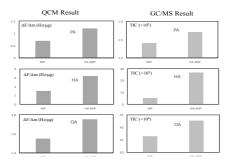


図2 MIP-NBs と NIP-NBs の吸着特性比

4.1.3 MIP 分子特徴グルーピング材料 (MFGM) の作製と評価

ポリジメチルシロキサン (PDMS)、ポリビ ニルベンゼン (DVB)、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリエチレングリコール (PEG) な どの材料は優れた加工性、高い吸着能力及び 分子極性・分子サイズなどの選択性を持つた め、固相マイクロ抽出 (SPME) の吸着材料と してよく使われている。本研究には、上記4つ の材料の溶解パラメーターに基づいた混合材 料を作製し、異なる官能基を持つ匂い分子に 対する吸着性を GC/MS により評価した。表 1 (a)は、PDMS への吸着量(TIC 値)を基準と して各吸着剤の吸着量を比較した結果である。 表1(b)は、PDMSへの吸着量が多いケトン類 である、2-ヘプタノンの値で除算することに よって規格化した値である。これらの値が1 以上であれば、PDMS よりも混合吸着剤があ る匂い物質を2-ヘプタノンよりも吸着して いることを表す。これらの結果、脂肪酸類で あるヘプタン酸に対して PDMS/DVB、 PDMS/PVA 吸着剤が有効であり、アルコール 類である 1-ヘプタノールに対しては、 PEG/PVA、PDMS/PVA 吸着剤が有効だと考え られた。また、ケトン類、アルコール類及び脂 肪酸類匂いの大まかなグルーピングが可能で あることがわかった。

PDMS-混合吸着剤/PDMS	2-heptanone	1-heptanol	heptanoic acid
PDMS-DVB/PDMS	0.82	0.92	8.71
PEG-PVA/PDMS	0.3	1.1	6.33 👚
PDMS-PVA/PDMS	1	1.08	3.02

表 1(a) 混合吸着剤を PMDS で規格化した特性

各匂い物質/2-heptanone	1-heptanol/2-heptanone	heptanoic acid/2-heptanone
PDMS	0.479	0.00215
PDMS-DVB	0.541	0.0229
PEG-PVA	1.779	0.046
PDMS-PVA	0.515	0.00647

表 1 (b) 各匂い物質に対する吸着量を 2-ヘプタノ ンへの吸着量で規格化した特性

4.1.4 MIFA 高機能吸着剤の作製と評価

図3に示すような表面ゾルゲル法によって、分子鋳型フィルタ薄膜を MFGM の表面に堆積させ、 Molecularly Imprinted Filtering Adsorbents (MIFA)と呼ぶ高機能性吸着剤を作製した。 MIP フィルタは分子ふるい効果を有するため、フィルタを通過できる分子のみMFGM 吸着層で選択的に濃縮できる。 MIFA 吸着剤は MFGM 層と MIP フィルタ層との組

み合わせによって数多くの特異的な吸着パタ ーンを自由に設計できることが期待する。

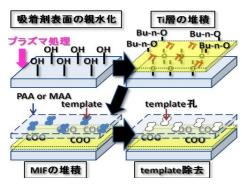


図3 MIFA の作製手順

表面に MIFA レイヤーを堆積したポリアクリル酸 (PAA) とポリメタクリル酸 (PMAA) の脂肪酸及びアルコール匂い物質に対するの吸着特性を調べた。鋳型とした対象分子を選択的に多く吸着していることがわかる。また、PAA と比べて、MAA による MIFA はより効果的、大きな選択性を持つことが示唆された。

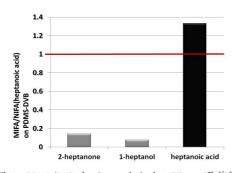


図4 PDMS/DVB をベースとした MIFA の吸着特

4.2 匂いクラスターセンシングシステムの構 築・検証・応用

4.2.1 匂いクラスターセンシング装置の構築 匂い物質をクラスターという形で認識する ため、大量の MIP 材料の分子認識能力を反映 できるセンサシステムの構築が必要である。 我々は、GC/MS の測定方式を模倣し、図5に 示すような匂いクラスターセンシングシステムを開発した。このシステムは、主に、測定す る匂い物質を吸着/分離するモジュールと、分

離した匂い物質を測定する酸化物半導体ガスセンサモジュール、LabVIEWに基づいた制御モジュールで構成されている。吸着/分離モジュールには、作製した MIP 分子認識材料を塗布したマイクロセラミックスヒーターが揃えつけられた。センサモジュールには市販の高感度、かつ安価な酸化物半導体ガスセンサを使用した。

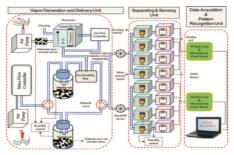


図5匂いクラスターセンシング装置の構図

4.2.2 匂いクラスターセンシング装置の検証

図 6 は PDMS 吸着剤を使用した場合のアセトンの吸・脱着プロセスに伴う、半導体ガスセンサの典型的な応答パターンを示している。匂い物質の種類によって、各階段のセンサの抵抗値(例えば、 R_b , R_a , R_d)が異なることがわかった。また、塗布材料のバラエティによって、多チャンネルの応答情報を得ることができた。PDMS、PVC 及び Carboxen による構成された8チャンネルのセンサアレイを構築した。応答波形解析の最適化によって、分子特徴が異なる Acetone, Benzene, Ethanol, Pentanal, Propenoic acid 匂いに対して83%のクラスター識別率を得られた。

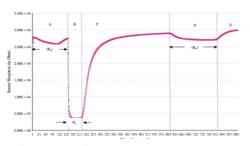


図6 匂いの吸脱着によるガスセンサの応答パター

4.2.2 クラスターセンシングの検証

我々は分子認識材料の作製とセンシングシステムの開発の成果を踏まえて、実際の匂いを対象とした検出・識別実験を行った。人の体臭は、生体に関する多くの情報を含むとされており、その検出は健康・医療・セキュリティなど広い分野に注目されている。SPME-GC/MSによる測定から、数多くの有機酸、アルデヒド、ケトンなどの匂い物質が体臭の中がら検出された。このような匂い物質を含サイズ、極性などの分子プロファイル特徴を認識しなければならない。体臭測定のアプローチとしては、我々は、まず匂い分子のサイズに着目し、4種類のゼオライト(3A,4A,5A,13X)

を吸着材料としてセンシングシステムに取り込み、成人男性の顔面から捕集した匂いのセンシングを行った。ガスセンサの応答の解チを図7に示す。被験者5人の体臭データの分子にがよりではアンケートのメタデータ調査(皮脂分泌量、喫煙習慣など)によるグルーピングした規算との一致が見られた。以上からした、開シンのとででは体臭を出来る。現在、より多ムをといるの応用が期待出来る。導入やシスの分子でコファイル吸着別能の向上を実施している。

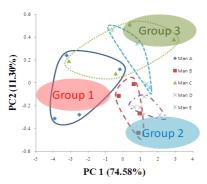


図7 体臭測定データに対する PCA 解析結果

4.3 匂いクラスターに関するデータ解析

122 個の匂い物質の分子(7つの官能基グループに属する)の 49 個のパラメーターを ChemBio3D というソフトウェアで抽出した。その分子パラメーターのデータマトリックス(122×49)に基づいた主成分分析(PCA)を行った。しかし、PCA の散布図を見ると、各分子が混ざってしまっていて、あまりクラスタリングできていないことがわかった。また、PC1と PC2の累積寄与率は 62.8%しかなかった。分子パラメーター変数が多すぎるため、二つの主成分だけで分子クラスターを表現できないと考えた。そのため、新たな解析・表現手法の探索が必要になった。

我々は、t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE)法を用い、匂い分子パラメーターの解析を試みた。t-SNE は、機械学習の

一種で、非線形高次元データの次元を圧縮するアルゴリズムである。全述の PCA の第23 成分まで(累積寄与率は99%)のデータを19ックスに基づいた t-SNE の解析結果を図8に示す。122個の匂い物質がおおむに7つの官能基に応じて分類できていることがの高次元分子パラメーターの特徴をうま化することが明らかになった。現匂いを開いて、より嗅覚でいるの方のであることが明らかになった。現匂いマップに近いクラスタリングアルゴリズムを検討している。

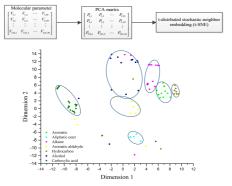


図8 t-SNE 解析による匂いクラスタリング結果

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 5 件)

- (1) K. Iwata, S. Yamashita, H. Yoshioka, <u>C. Liu</u>*, <u>K. Hayashi</u>, Preparation of Fluorescent Molecularly Imprinted Polymer Micropowder for Odorant Visualization, **Sensors and Materials** (2016) 28, 173-179 (查読有)
- (2) B. Chen*, <u>C. Liu</u>, Y. Xie, P. Jia, <u>K. Hayashi</u>, Localized Surface, Plasmon Resonance Gas Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer Coated Au Nano-Island Films: Influence of Nanostructure on Sensing Characteristics, **IEEE Sensors Journal** (2016) 16, 3532-3540 (查読有)
- (3) B. Chen, <u>C. Liu</u>, <u>K. Hayashi</u>*, Selective Terpene Vapor Detection Using Molecularly Imprinted Polymer Coated Au Nanoparticle LSPR Senor, **IEEE Sensor Journal** (2014), 14, 3458-3464 (査読有)
- (4) S. K. Jha*, <u>C. Liu</u> and <u>K. Hayashi</u>, Molecular Imprinted Polyacrylic Acids based QCM Sensor Array for Recognition of Organic Acids in Body Odor, **Sensors and Actuators B** (2014) 204, 74-78 (查読有)
- (5) S. K. Jha*, Y. Chiyomaru, M. Imahashi, <u>C. Liu</u> and <u>K. Hayashi</u>, Odor Filtering and Sensing System based Artificial Nose for Chemical Vapor Class Recognition, **Sensor Letters** (2014) 12, 1-16 (查読有)

- (1) <u>C. Liu</u>, H. Yoshioka, H. Wang, <u>K. Hayashi</u>, Molecularly Imprinted Polymer Nanobeads Based QCM Sensor Array for Volatile Organic Acid Detection, Proceedings of The 16th International Meeting on Chemical Sensors (**IMCS 2016**, Korea) (查読有)
- (2) L. Shang, <u>C. Liu</u>, <u>K. Hayashi</u>, Molecularly Imprinted So-gel based LSPR Sensor for Fatty Acid Vapor Detection, Proceedings of The 16th International Meeting on Chemical Sensors (**IMCS 2016**, Korea) (查読有)
- (3) L. Shang, <u>C. Liu</u>, Yoichi, Tomiura, <u>K. Hayashi</u>, Artificial Odor Cluster Map of Odorant Molecular Parameters and Odor Maps in Rat Olfactory Bulbs, 17th International Symposium on Olfaction and Taste (**ISOT2016**, Japan) (查読有)
- (4) S. Yamashita, K. Iwata, H. Yoshioka, <u>C. Liu</u>, <u>K. Hayashi</u>, Odor Visualization Using Fluorescence-dyed Molecularly- Imprinted-Polymer Micro-powder, Proceedings of 16th International Symposium on Olfaction and Electronic Noses (Paper ID 1312) (ISOEN2015, France) (查読有)
- (5) <u>C. Liu</u>, <u>K. Hayashi</u>, Development of Molecular Recognition Materials for Bioinspired Odor Cluster Sensing, Proceedings of Second World Congress of the Digital Olfactory Society (**DOS2014**, **Japan**) (查読有)
- (6) <u>C. Liu</u>, S. K. Jha, M. Imahashi, and <u>K. Hayashi</u>, Detection of Volatile Fatty Acids by Using MIP Coated QCM Sensor Array, Proceedings of International Union of Materials Research Societies - The IUMRS International Conference in Asia 2014 (IUMRS-ICA 2014, Japan) (查読有)
- (7) S.K. Jha, <u>C. Liu</u>, and <u>K. Hayashi</u>, Molecular Imprinted Polyacrylic Acids Coated QCM Sensor Array for Recognition of Organic Acid Odors, Proceedings of The 7th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/ Nano Technologies (APCOT 2014 South Korea) (查読有)
- (8) B. Chen, <u>C. Liu</u>, X. Sun, <u>K. Hayashi</u>, Molecularly imprinted polymer coated Au nanoparticle sensor for α-pinene vapor detection, Proceedings of IEEE Sensors 2013 (IEEE Sensors 2013, USA) (查読有)
- (9) 篠原翔, <u>劉傳軍</u>, <u>林健司</u>, 分子鋳型ポリマーを用いたガス応答性ケミレジスタの作成, 電子情報通信学会技術研究報告(2016) 115, 59-62 (査読無)
- (10) 篠原翔, 千代丸瑶, <u>劉傳軍, 林健司</u>, 分子 鋳型フィルタ吸着剤を用いた匂いセンシ ング, 電気学会ケミカルセンサ研究会資 料 (2015) CHS-15, 1-28, 115-119 (査読 無)

- (11) 王晧宇,山下誠一,吉岡大貴,<u>劉傳軍</u>, 林健司,分子鋳型ポリマー蛍光ナノビー ズを用いた植物匂いの可視化,第 32 回 「センサ・マイクロマシンと応用システム」論文集(2015) 29pm3-PS-93 (査読有)
- (12) 千代丸瑶, 篠原翔, <u>劉傳軍, 林健司</u>, 分子鋳型フィルタ吸着剤による匂いクラスタリング, 電子情報通信学会技術研究報告(2015) 114,77-82 (査読無)
- (13) 阿部陽介, 高見澤忠*, 宮城和樹, <u>劉傳軍</u>, <u>林健司</u>, 分子サイズに基づくにおいクラ スタリングを利用したにおい測定システ ム, 日本味と匂学会誌 (2014) 21,477-478 (査読有)
- (14) 千代丸瑶, 劉傳軍, 林健司, 吸着剤特性 調整及び高機能吸着剤の開発による匂い 測定,平成 26 年度電気関係学会九州支部 連合大会(2014) (査読無)
- (15) 千代丸瑶, 今橋理宏, 林健司, 匂いセンシング用分子認識吸着剤の高機能化, 平成 26 年電気学会全国大会(2014)(査読無)

[図書] (計 1 件)

(1) <u>C. Liu, K. Hayashi</u>*, Part III Gas and Odor Sensing: Odor Sensing Technologies for Visualization of Odor Quality and Space, **Smart Sensors and Systems**, Edited by Y.-L. Lin et al. Springer International Publishing Switzerland (2015) 191-212

[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-.ac.jp/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

劉 傳軍 (LIU CHUANJUN) 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: 70599654

(2) 連携研究者

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