

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760246

研究課題名（和文） 高輝度紫外線LEDを用いたNADH蛍光検出型生化学式ガスセンサ

研究課題名（英文） NADH-fluorometric biochemical gas sensor using UV-LED

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

これまで、室内環境中に存在する数多くの化学物質の中から、極微量に含まれる化学物質のみを選択的に連続計測し、その推移を調べることは困難であった。本研究では、酵素の物質認識機能を利用して環境中に含まれるホルムアルデヒドを認識し、NADH と呼ばれる蛍光物質を生成するフローセルと、紫外線 LED を用いた蛍光検出系を構築することで、選択的かつ極めて高感度に連続計測することを可能とした。

研究成果の概要（英文）：

High sensitive and high selective fiber-optic biochemical gas sensor was constructed and tested. The biochemical gas sensor measures fluorescence of NADH, which is the product of formaldehyde dehydrogenase reaction. Using ultraviolet LED as an excitation source, and flow-cell with enzyme immobilized membrane, indoor formaldehyde was successfully measured at sub-ppb sensitivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2100000	630000	2730000
2011年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学 ・ 電子デバイス・電子機器

キーワード：バイオデバイス

1. 研究開始当初の背景

近年、環境と健康への関心、社会に対する問題意識の高まりなどを背景に、健康・環境志向のライフスタイルに対する需要が高まっている。健康的な生活環境の構築は、シックハウス症候群などへの対策としても有効であり、この目的には環境中に存在する各種有害物質の量を的確にモニタリングできる

センサが必要である。しかし、現状では個人が日常生活の中で、身の回りの環境にどのような有害物質がどの程度存在し、またどのように推移しているのかを知る手段は全く提供されていない。

他方、研究代表者らはこれまで、酵素や抗体など生体分子の物質認識機能を活用した各種のバイオセンサを開発してきた。特に、生体適合性に優れた MPC ポリマーにて酵素

を包括固定化し、バイオセンサの感応膜として利用できることを明らかにした(Kudo H et.al.: Biosensors and Bioelectronics, 22, 558-562, 2006)。上記のポリマーは、含水性が高い上紫外線に大きな吸収を持たないため、紫外線励起型の光ファイバ式バイオセンサとして利用可能であり、アルコール脱水素酵素を用いた還元型 nicotineamide adenine dinucleotide(NADH: excitation 340nm, fluorescence 491nm)蛍光検出型のバイオセンシングシステムを開発し、優れた性能を確認している (Kudo H et.al., Sens. Actuator B-Chem, 141, 20-25, 2009)。

そこで、本研究では前述の知見を活かし、従来型の環境計測とは異なる、個人レベルで生活環境における各種化学物質のその場 (*on-site*) 計測を可能とし、環境医学的な見地から健康的な生活環境を支援するための高感度センサデバイスを提案する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、個人レベルで生活環境における各種化学物質のその場 (*on site*) 計測を可能とし、環境医学的な見地から健康的な生活環境を支援するためのガスセンシングデバイスを提案することである。この目的には、ppt レベルの超高感度にて、環境中のガスを選択的・連続的にモニタリングする技術が必要となる。そこで、モデル成分としてホルムアルデヒドを対象に高輝度紫外線 LED を用いた小型の NADH 蛍光検出型バイオセンシングシステムを開発し、生化学式ガスセンサとして利用できる光学設計、感応部の構造設計を行い、住環境や医療環境評価に応用する。

3. 研究の方法

NADH 蛍光検出型の生化学式ガスセンサは、本質的には「環境中の計測対象を感応部に取り込み」、「脱水素酵素反応によって NADH を生成し」、「生成された NADH を高感度に検出する」ものである。そこで本研究では、平成 22 年度にまず①高感度型の NADH 蛍光検出系を開発し、次に、②効果的にガス成分を取り込み脱水素反応を生じるセルを構築し、①のシステムと組み合わせる。平成 23 年度には、MEMS 技術によるセンサデバイスの高度化のほか、本生化学式ガスセンサを用いた各種製品のホルムアルデヒド放散量や、環境医学的な応用展開についても検討を行うこととした。

4. 研究成果

①PMT を用いた高感度型 NADH 蛍光検出系

NADH の生成量は基質である FA の濃度に依存するため、生成された NADH を蛍光計測 (励起波長:340nm、蛍光波長:491nm) することで FA の定量が可能となる。特に、励起光源として従来の NADH 蛍光計測に用いられていた紫外線ランプに代えて、高輝度の紫外線 LED を用いることで、小型で扱いやすい蛍光検出系とした。

NADH 蛍光検出系は、UV-LED (UVTOP® BL335, Sensor Electronic Technology, Inc., USA) 光源及び、光電子増倍管 (PMT, C9692, Hamamatsu Photonics, Co., Ltd, Japan) を、それぞれバンドパスフィルタ (BPF: $\lambda = 340 \pm 10\text{nm}$, BPF: $\lambda = 500 \pm 10\text{nm}$, Asahi Spectra Co., Ltd.) を介して Y 字型の光ファイバ (BIF600-UV/VIS, SMA-905, Ocean Optics, Inc., FL, USA.) にて、光ファイバプローブ (F1000-900 PROBE, Ocean Optics, Inc., FL, USA.) に接続することで構築した。

構築した NADH 蛍光計測系を用いて NADH に対する定量特性の評価を行なったところ、NADH 溶液の滴下に伴う著しい蛍光強度の増加と濃度に応じた定常値での安定が確認され、NADH を 25nmol/L~1.0mmol/L の範囲で定量可能であった。

②フローセルを用いた生化学式ガスセンサ

フローセルの構築では幅 1mm、深さ 1mm の流路を有する外径 4.0mm、内径 2.0mm のシリコンチューブ及び、外径 6.0mm、内径 4.0mm アクリルパイプを同心円状に組み合わせで作製した。シリコンチューブの下部端面にシリコン製の O リングにて FALDH 固定化膜を装着した。FALDH 固定化膜は、第一に多孔質の親水性ポリテトラフルオロエチレン膜 (Omnipore Membrane Filter, Millipore, Japan.) を 2×2cm の大きさに切断し、膜表面に FALDH (formaldehyde dehydrogenase T-0072, Funakoshi, Co Ltd, Japan) 及び 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) と 2-ethylhexyl methacrylate (EHMA) の共重合体 (PMEH) の混合物を均一に塗布した。次に、4℃にて 3 時間乾燥し、リン酸緩衝液で残留した余剰酵素を洗浄することで作製した。

特性評価の結果、厚生労働省の室内濃度指針値である 80ppb や医療現場におけるガイドラインである 100ppb を含み、住環境の改善に必要な感度を十分に満たす 2.5ppb から 15.0ppm の濃度範囲にて FA ガスの定量が可能であった。また、他のアルコールやアセトアルデヒドなどのガス成分を負荷した際にはセンサの出力は見られず、酵素の分子認識機能による極めて高い選択性が確認された。

③環境評価への応用に関する検討

センサの環境評価への応用に関しては、特に天然物によるホルムアルデヒドの発生や、低減効果について本センサを用いてリアルタイムに計測した。この結果、本センサを用いることで、室内環境中のホルムアルデヒド濃度の変化を高感度かつ連続的にモニタリングすることが可能で、本研究結果が室内の空室改善に有効であることが示唆された。

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5件)

1. 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, *Sens. Actuators B Chem*, **161**, 486-492, 2012.
2. Arakawa T, Koshida T, Gessei T, Miyajima K, Takahashi D, Kudo H, Yano K, Mitsubayashi K, Biosensor for L-phenylalanine based on the optical detection of NADH using a UV light emitting diode, *Microchimica acta*, **173**, 199-205, 2011.
3. Kudo H, Suzuki Y, Gessei T, Takahashi D, Arakawa T, Mitsubayashi K, Biochemical gas sensor (bio-sniffer) for ultrahigh-sensitive gaseous formaldehyde monitoring, *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 854-858, 2010.
4. Kudo H, Sawai M, Suzuki Y, Wang X, Gessei T, Takahashi D, Arakawa T, Mitsubayashi K, Fiber optic bio-sniffer (biochemical gas sensor) for high selective monitoring of ethanol vapor using 335 nm UV-LED, *Sens. Actuator B-Chem*, **147**, 676-680, 2010.
5. Koshida T, Arakawa T, Gessei T, Takahashi D, Kudo H, Saito H, Yano K, Mitsubayashi K, Fluorescence biosensing system with a UV-LED excitation for l-leucine detection, *Sens. Actuator B-Chem*, **146**, 177-182, 2010.

[学会発表] (計12件)

1. 工藤寛之、医療と健康科学のためのバイオセンシングデバイス、電気学会・次世代センサ協議会 合同センサ研究会、石川、2011年12月。
2. 工藤寛之、医療と環境計測に向けたバイオセンシングシステムの現状と将来展望、次世代センサ協議会 第61回研究会、東京、2011年9月。
3. 工藤寛之、荒川貴博、三林浩二：環境と健康科

学を指向したセンシングバイオロジーの現状と将来展望、産総研 計測技術研究グループセミナー、つくば、2011年4月27日。

4. 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, Taipei, Taiwan, Nov 2011.
5. Yamashita T, Itabashi G, Suzuki Y, Miyajima K, Arakawa T, Kudo H, Yano K, Mitsubayashi K, High sensitive formaldehyde bio-sniffer (biochemical gas sensor) based on NADH fluorometry with UV-LED excitation, The 5th International Conference on Sensors, Jeju, Korea, Oct 2011.
6. Kudo H, Yamashita T, Ye M, Miyajima K, Wang X, Arakawa T, Mitsubayashi K. Fibre-optic biochemical gas sensor for high-sensitive and high-selective monitoring of environmental formaldehyde, 2nd International Conference on Bio-Sensing Technology 2011, Amsterdam, Netherlands, Oct 2011.
7. 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. UV-LED 励起光源を利用したホルムアルデヒドガス用バイオスニファ, 第1回次世代センサ研究発表会, 東京, 2011年10月
8. Gessei T, Nagashima T, Takahashi D, Arakawa T, Kudo H, Shiba K, Mitsubayashi K. Fiber-optic biosensor for sorbitol-induced diabetic complications using an UV-LED excitation system, the 13th international meeting of chemical sensors (IMCS-13), Perth, Western Australia, Jul. 2010.
9. Sawai M, Suzuki Y, Itabashi G, Takahashi D, Arakawa T, Kudo H, Mitsubayashi K. A fluorometric-sniffer (biochemical gas sensor) using UV-LED (340 nm) on NADH-excitation for monitoring ethanol vapor, the 13th international meeting of chemical sensors (IMCS-13), Perth, Western Australia, Jul. 2010
10. Suzuki Y, Gessei T, Takahashi D, Arakawa T, Kudo H, Mitsubayashi K. Fluorometric bio-sniffer (Opt nose) based on NADH detection with UV-LED for continuous monitoring of residential formaldehyde with sub-ppb sensitivity, 20th Anniversary World Congress on Biosensors, BIOSENSORS2010, Glasgow, UK, May 2010.
11. 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. 環境中ホルムアルデヒド評価のための生化学式ガスセンサ, 第58回応用物理学関係連合講演会, 厚木, 2011年3月。
12. 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.

〔図書〕 (計 1 件)

工藤寛之, 三林浩二, 2012 医療用エレクトロ
ニクス技術大全 「第 1 編・第 3 章 ヘルス
ケア向けデバイスの現状と動向」, 電子ジャ
ーナール, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 寛之 (HIROYUKI KUDO)
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