

機関番号：12602
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20300062
 研究課題名（和文） 体内の代謝・無臭化機能に基づく、代謝酵素群を用いた連続計測可能な高感度匂いセンサ
 研究課題名（英文） Biochemical gas sensors with drug metabolizing system based on body deodorant function
 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

研究成果の概要（和文）：代謝酵素である FALDH の固定化膜を隔膜とするフローセルと、光学素子である UV-LED 及び PMT を利用した NADH 蛍光計測システムを開発し、組み合わせることにより、揮発性有機化合物である FA 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を開発した。本センサは、2.5ppb～15.0ppm の濃度範囲にて FA を定量可能であり、FA ガスに選択性があり連続モニタリング可能であった。

研究成果の概要（英文）：Biochemical gas sensor for formaldehyde (one of volatile organic chemical, human smell detection limit: 400ppb) was developed by incorporating with an enzyme membrane (formaldehyde dehydrogenase) and an NADH fluorometric unit (UV-LED emission and PMT detector). The sensor is possible to monitor the formaldehyde concentration with high gas selectivity. The calibration range of the sensor is from 2.5 ppb to 15.0 ppm formaldehyde.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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：代謝酵素、揮発性有機化合物、光計測、人工嗅覚、匂いセンサ

1. 研究開始当初の背景

近年、半導体型ガスセンサやQCMデバイスを使った人工嗅覚やエレクトロニック・ノーズの研究が盛んに進められている。その応用には匂い成分の検知、芳香剤の分析や危険物の検知、食品工程での匂いに基づくプロセス制御など多様である。

一方、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

有することが挙げられる。酵素や抗体を利用することで、雑多な匂いの中でも目的とする匂い成分だけを検知することができる。例えば、飲酒後の血液を介して肺のガス交換にて口臭に展開するアルコールガスやアセトアルデヒドガスを、その時に食べた物や飲んだ物、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、各ガス成分と各センサが1対1の関係にあることから、情報のクロストークが無く、匂い成分を情報化することに成功している。

また申請者は半導体プロセスやスクリーン印刷技術を使った生化学式ガスセンサのほか、光ファイバ等の光学素子を利用した光技術による生化学式ガスセンサも多数開発している。例えば、匂いの酵素反応に伴い消費される酸素の変化を「蛍光」で検出したり、同様に酵素反応で生成される成分を「発光」へ誘導したりすることで、匂い成分を高感度な光計測（蛍光や発光）にて匂い成分を連続測定している。そこで近年、光学発光素子及び受光素子の高機能化及び高感度化が進んでおり、この光技術を代謝酵素系と組み合わせることで、犬の嗅覚に相当する感度で匂い成分の連続モニタリングを確立する。

2. 研究の目的

多様な揮発成分の中において、ホルムアルデヒド(formaldehyde: FA)は代表的な揮発性有機化合物(volatile organic compound: VOC)として知られ、その人での嗅覚閾値は400ppb程度で、国際がん研究機関において、発がん性が認められるグループ1に分類されている。FAは高い消毒効果や臓器・組織の保存効果から、器具の洗浄や病理標本の作製など、医療現場では特に病理検査室等で多く用いられている。このことから、医療機関などのFAを使用する作業環境では、FA濃度をモニタリングし、100ppb以下に保つよう求められている。また、医療教育現場における解剖実習等でも利用される他、歯科等でも少量のホルムアルデヒド製剤が使われている。このように様々な分野で広く用いられている実態に反し、FAの暴露による健康被害への懸念から代替材料の利用が求められている。しかし、有効な代替材料が存在しないのが現状である。FAの暴露に伴う健康被害としては、高濃度・長期に渡る職業的な暴露による鼻腔がんや悪性リンパ腫、低濃度・長期暴露によるシックハウス症候群が知られており、実際に病理医や病理を担当する検査技師などへの健康対策が急務となっている。

住環境においてもFAによる健康被害は大きな問題となっている。従来は、建物自身に由来するFAが主であったが、近年は厚生労働省などによる規制(室内濃度指針:80ppb)とメーカーによる対策が進み、住居内に持ち込まれる家具等の各種製品が主なFA発生源となっている。FAの放散量は温度に影響されるため、大きな日内変動を示す。そこで、住環境の改善においても、多様なガス成分が混在する環境中でFAを高感度・選択的に連続モニタリング可能なセンサが求められている。環境中のFAによる健康への影響は研究が進んでおり、近年の報告では50ppb程度の濃度であっても眼部の刺激や、小児アレルギーのリスク増加が指摘されている。このため、環境中FAのセンシングを通じて健康的

な室内環境を構築するには、高いガス選択性にて少なくとも20ppb以下の濃度領域で連続モニタリング可能な感度を有する極めて高性能なガスセンサが求められる。しかしながら、現在のところ上記を満たすようなモニタリング技術は提供されておらず、この目的には新規なセンシングシステムの開発が必要である。

本研究では、FAの認識材料として代謝触媒であるホルムアルデヒド脱水素酵素(formaldehyde dehydrogenase: FALDH)を用い、反応生成物である還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(nicotinamide adenine dinucleotide: NADH)を短波長の高輝度紫外線発光ダイオード(ultraviolet-light emitting diode: UV-LED)を励起光源とし蛍光検出することで、ppbレベルのFAを高感度・高選択性にて連続モニタリング可能な光ファイバ型生化学式ガスセンサ(バイオスニファ)を開発することを進めた。

3. 研究の方法

代謝酵素FALDHはFAの存在下で、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)を電子受容体とし、還元型のNADHを生成する。

NADHの生成量は基質であるFAの濃度に依存するため、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。タンパク質である酵素はその立体構造で基質を認識するため、気相中の基質を直接かつ連続的に計測することは容易でない。

そこで本センサでは、FALDH固定化膜を感応膜とし、フローセルを用いてFALDH固定化膜にNAD⁺を含むリン酸緩衝液(phosphate buffer: PB)を常時供給することで酵素の湿潤を保つとともに、消費されるNAD⁺の供給、余剰基質及び反応生成物の除去を行い、FAガスの連続モニタリングを可能とした。感応膜にFAが接触すると、式(1)の反応にてNADHが生成される。光ファイバプローブ端面より励起光を照射し、生成されたNADHの蛍光を同軸にて検出することで、FAガスをモニタリングすることが可能である。

本センサの作製では、まずフローセルを作製し、光ファイバ式NADH蛍光検出システムのプローブ先端に組み込んだ。更に、フローセルにリザーバタンクよりNAD⁺を含有したPBを循環させるためのチューブ及びポンプを接続し、FA用生化学式ガスセンサとした。

フローセルは幅1mm、深さ1mmの流路を有するシリコンチューブ(O.D. 4.0mm, I.D. 2.0mm)及び、アクリルパイプ(O.D. 6.0mm, I.D. 4.0mm)を同心円状に組み合わせることで作製した。シリコンチューブの下部端面にシリ

コーン製の0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を2×2cmの大きさに切断し、膜表面にFALDH及び2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine: MPC)とメタクリル酸2-エチルヘキシル(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、PBで残留した余剰酵素を洗浄することでFALDH固定化膜とした。

光ファイバ式NADH蛍光計測システムの構築では、UV-LED光源及び、光電子増倍管を、それぞれバンドパスフィルタを介してY字型の光ファイバにて、光ファイバプローブに接続することで構築した。最後に、プローブ先端にフローセルを装着し、FA用生化学式ガスセンサとした。

NADHの標準溶液を用いて、作製したNADH蛍光計測システムの定量特性を評価した。暗箱内に反射防止膜としてアクリル系塗料で黒色に着色したキュベットを設置した。その後キュベットを純水で満たし、 β -NADHを最終濃度25~10000 nmol/Lとなるように滴下した際のNADH蛍光強度変化を各濃度5回ずつ計測した。

無脈流インテリジェント・ポンプを用いて、リザーバタンク内の10mmol/Lの β -NAD⁺を含むPB(100 mmol/L)をフローセルに循環させた。また、アクリルパイプを介してFAの標準ガスを200 ml/minの流速にてセンサ感応部に負荷した。

汎用の標準ガス発生装置では、FAの希釈限界が30ppbと高く、評価のボトルネックとなる。そこで、本実験では、専用設計の低濃度ガス発生装置を用いて発生させた。低濃度ガス発生装置は、大容量の恒温槽を低温で厳密に管理することによりガス発生量を安定化し、希釈に用いるキャリアガスを多段フィルタで清浄化することで、20pptまでのFAガスを生成可能である。なおUV-LEDに印加する順方向電流は定格である20mAとし、生じるNADHの蛍光をPMTにて計測した。

実験では、まずセンサの動作条件を最適化するため、循環させるPBの流速及びpHが蛍光出力に与える影響を評価した。PBの流速を0.5-2.5 ml/minの範囲で変化させて、この時の蛍光強度の変化とガスの負荷停止によるセンサの立ち上がり時間をそれぞれ比較した。蛍光出力のpH依存性評価では、pH6.0から9.0の範囲のPBを循環させ、同一濃度FA負荷時の出力応答を比べた。

次に、低濃度ガス発生装置にて各濃度に調節したFAガスを各濃度5回ずつセンサ感応部に負荷した際の、蛍光強度の時間変化を、PMTを介してコンピュータで記録した。また

センサの感応部へ標準ガス発生装置にて発生させた5.0 ppmのホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、アセトン、ベンゼン、エタノール、メタノール、トルエンを、それぞれ負荷した際の蛍光出力変化を計測することでガス選択性を評価した。

4. 研究成果

作製したNADH蛍光計測システムを用いて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。

NADH定量特性の再現性を評価した結果、各濃度における変動係数の平均値は0.75%であり、本システムにて高い再現性でNADHを計測可能であった。本実験の結果を、検出器として分光器を使用した場合と比較すると、NADH蛍光感度が100倍向上し、NADH蛍光検出型のセンサにおける感度向上に効果的であると考察された。

PBの流速を変化させた結果、低流速では洗浄が不十分なために応答時間が遅くなり、高流速になると、応答時間は早くなるものの蛍光出力が減少した。そこでセンサ蛍光出力の低下が比較的少なく、センサの応答時間の向上が平衡する流速1.5 ml/minを最適値とした。また蛍光出力のpHを調べたところ、pH8.0で最も高い蛍光出力を示した。この結果はFALDH活性のpH依存性によるものであり、以後の実験はpH8.0にて行うこととした。

実験の結果、FAガス負荷に伴う著しい蛍光出力の上昇と、濃度に応じた定常値及び負荷の停止に伴う初期値の回復が確認された。

出力応答の立ち上がりは、FAの暴露に伴いFALDH固定化膜にてNADHが生成され、安定値に至る過渡的状态を示している。安定値は、PBの循環による洗浄効果とガス濃度によって決まるNADHの産生速度のバランスで決定される。出力応答の立ち下りは、FAガスの供給を停止に伴いFALDHの触媒反応によるNADHの生成も止まり、PBの洗浄効果でフローセル内に残留するNADHが除去されるため、蛍光出力が初期値を回復することによるものと考えられる。これにより、本センサがFAガスの連続モニタリングに利用可能であることが確認された。

センサの蛍光出力定常値よりFAガスに対する定量特性を調べた。この結果、厚生労働省の室内濃度指針値である80 ppbや医療現場におけるガイドラインである100 ppbを含み、医療環境及び住環境の改善に必要な感度を十分に満たす2.5 ppbから15.0 ppmの濃度範囲にてFAガスの定量が可能であった。

なお、本センサにおけるFA濃度と蛍光出力の相関が確認され、相関係数は0.992であ

った。また FA 計測の再現性を評価したところ、変動係数の平均が 0.89%と算出され、優れた再現性が確認された。

以上の結果より、本センサは FALDH の活性、及び NADH の生成速度の影響を強く受ける。そこで、酵素反応系を変更することで、より高い感度にて FA モニタリングが可能かを検討した。具体的には、FALDH と同様の反応を触媒でき、より高い比活性を有するアルデヒド脱水素酵素を用いることを検討した。

次にセンサのガス種に対する選択性を調べた。FA 用生化学式ガスセンサの感応部に各種のガス成分 (5 ppm) を負荷した際の出力比較を行った。FALDH 固定化膜を用いた場合、FA に対する蛍光出力を 100%としたとき、構造の類似したアセトアルデヒドに対して 1.3%の蛍光出力が確認されたものの、他のガス成分には全く応答を示さなかった。これは、FALDH の高い基質特異性に基づくものであると考察される。

以上まとめると、代謝酵素である FALDH の固定化膜を隔膜とするフローセルと、UV-LED 及び PMT を利用した NADH 蛍光計測システムを開発し、それぞれを組み合わせることにより、揮発性有機化合物である FA 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を開発した。本センサは FALDH の触媒反応により生成される NADH を、光ファイバを用いた光学系にて蛍光計測するもので、PMT を検出器とすることで高い感度を実現した。本センサは、2.5 ppb から 15.0 ppm の濃度範囲にて FA を定量可能であり、既存の FA 計測デバイスでは困難であった 20 ppb 以下の濃度領域でも選択的に FA を連続モニタリング可能であった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① H. Kudo, Y. Suzuki, T. Gessei, D. Takahashi, T. Arakawa, K. Mitsubayashi, Biochemical gas sensor (bio-sniffer) for ultrahigh-sensitive gaseous formaldehyde monitoring, Biosensors and Bioelectronics, 26, 2010, 854-858
- ② X. Wang, E. Ando, D. Takahashi, T. Arakawa, H. Kudo, H. Saito, K. Mitsubayashi, 2-D spatiotemporal visualization system of expired gaseous ethanol after oral administration for real-time illustrated analysis of alcohol metabolism, Talanta, 82, 2010, 892-898.
- ③ H. Kudo, M. Sawai, Y. Suzuki, X. Wang, T. Gessei, D. Takahashi, T. Arakawa, K. Mitsubayashi, Fiber optic bio-sniffer (biochemical gas sensor) for high selective monitoring of ethanol vapor using 335nm UV-LED, Sensors and Actuators B: Chemical, 147, 2010, 676-680.
- ④ T. Koshida, T. Arakawa, T. Gessei, D. Takahashi, H. Kudo, H. Saito, K. Yano, K. Mitsubayashi, Fluorescence biosensing system with a UV-LED excitation for l-leucine detection, Sensors and Actuators B: Chemical, 146, 2010, 177-182.
- ⑤ T. Gessei, H. Sato, E. Kazawa, H. Kudo, H. Saito, K. Mitsubayashi, Bio-sniffers for ethanol and acetaldehyde using carbon and Ag/AgCl coated electrodes, Microchimica Acta, 165, 2009, 179-186.
- 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, 2009, 20-25.
- ⑦ 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, 2009, 28-32.
- ⑧ K. Mitsubayashi, G. Nishio, M. Sawai, E. Kazawa, H. Yoshida, T. Saito, H. Kudo, K. Otsuka, M. Takao, H. Saito, A biochemical sniffer-chip for convenient analysis of gaseous formaldehyde from timber materials, Microchimica Acta, 160, 2008, 427-433.
- ⑨ C. Fillit, N. Jaffrezic-Renault, F. Bessueille, D. Leonard, K. Mitsubayashi, J. Tardy, Development of Microconductometric Biosniffer for Detection of Trimethylamine, Materials Science and Engineering: C, 28, 2008, 781-786.
- ⑩ H. Saito, T. Shirai, H. Kudo and K. Mitsubayashi, Electrochemical sensor with flavin-containing monooxygenase for triethylamine solution, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 2008, 1263-1268.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Xin WANG, et.al., Spatiotemporal visualisation system for expired ethanol after drinking, Pacificchem 2010, 2010 年 12 月 15 日, Honolulu, Hawaii, USA.
- ② Tomoko GESSEI, et.al., Bioelectronic Gas Sensor (Bio-Sniffer) for Formaldehyde, 61st Annual Meeting of Intl. Soc. of Electrochem., 2010 年 9 月 26 日, Nice,

- France.
- ③ Kohji Mitsubayashi, Fluorometric Bio-Sniffer (Biochemical Gas Sensor) with UV-LED Light for Fomaldehyde Vapor as VOC (Volatile Organic Chemical), Optical MEMS and Nanophotonics 2010, 2010年8月9日, Sapporo, Japan.
 - ④ Tomoko GESSEI, et.al., High-sensitive Biochemical Gas sensor (bio-sniffer) for Evaluating Detoxification of Environmental Formaldehyde, 13th Intl. Meeting on Chemical Sensors, 2010年7月11日, Perth, Australia.
 - ⑤ Yuki Suzuki, et.al., Fluorometric bio-sniffer (Opt nose) based on NADH detection with UV-LED for continuous monitoring of residential formaldehyde with sub-ppt sensitivity, 20th Anniv. meeting of World Congress on Biosensors, 2010年5月26日, Glasgow, UK.
 - ⑥ Kohji Mitsubayashi, Bio-transducers for biomedical applications, 2009 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM 2009), 2009/10/7, Sendai, Japan.
 - ⑦ Hiroyuki Kudo, et.al., High sensitive fluorometric bio-sniffer with UV-LED based excitation technique for monitoring formaldehyde vapour, First Bio-Sensing Technology Conference, 2009/11/12, Bristol, UK.
 - ⑧ Tomoko Gessei, et.al., A bioelectronic gas sensor (bio-sniffer) for measurement of formaldehyde vapor, 8th Asian Conference on Chemical Sensors, 2009/11/11, Daegu, Korea.
 - ⑨ Yuki SUZUKI, et.al., Toluene bio-sniffer using enzyme inhibition, PRIME 2008, 2008年10月15日, Hawaii, USA.
 - ⑩ Tomoko GESSEI, et.al., Bioelectronic gas sensor (bio-sniffer) for formaldehyde vapor, PRIME 2008, 2008年10月15日, Hawaii, USA.
 - ⑪ Ryodai KATO, et.al., An odorless digital-code system with bio-sniffers and an inkjet printer, PRIME 2008, 2008年10月15日, Hawaii, USA.

[図書] (計1件)

- ① 齋藤浩一、三林浩二, 「第25章 生体臭 (生体由来の揮発成分) 用センサ」, 「ヘルスケアとバイオ医療のための先端デバイス機器 (監修: 三林浩二)」, CMC 出版、2009年、東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三林 浩二 (KOHJI MITSUBAYASHI)
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 (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

荒川 貴博 (TAKAHIRO ARAKAWA)

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

宮島 久美子 (KUMIKO MIYAJIMA)

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

高橋 大志 (DAISHI TAKAHASHI)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・特任助教

研究者番号: 50409637

齋藤 浩一 (HIROKAZU SAITO)

東京工業高等専門学校・機械工学科・准教授

研究者番号: 00205668