

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32682

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656252

研究課題名(和文) 気液隔膜における生体分子とガス分子の相互作用に基づく超高感度ガスセンサ

研究課題名(英文) High-sensitive biochemical gas sensor based on the gas-biomolecule interaction

研究代表者

工藤 寛之 (Kudo, Hiroyuki)

明治大学・理工学部・准教授

研究者番号：70329118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：補酵素としてビタミンの一種である酸化型のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD<sup>+</sup>)を電子受容体として各種の基質を酸化触媒するとともに還元型であるNADHを生成する各種の脱水素酵素を用いたバイオセンサ(NADH依存型バイオセンサ)を開発した。特に、反応生成物を再度酸化し、NADHを化学的に増幅する手法などを検討し、ホルムアルデヒドガスをサブppbレベルの高感度にて計測可能とした。また光触媒反応による環境ホルムアルデヒド低減のリアルタイム計測など、実用展開に向けた試みについても検討を行った。この結果、環境管理に向けた応用の可能性と、多様な成分への展開についての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A biosensor using NADH as an electron acceptor was developed. The biosensor measures the presence of the substrate as fluorescence of NADH. In order to enhance the sensitivity to formaldehyde, chemical amplification of NADH was investigated. Aldehyde dehydrogenase produces formic acid and NADH by oxidizing formaldehyde under the presence of NAD<sup>+</sup>. We co-immobilized formic acid dehydrogenase to reproduce NADH using formic acid. Consequently, the sensor showed sub-ppb level sensitivity to formaldehyde. Also, real-sample test using photocatalytic TiO<sub>2</sub> was carried out. The sensor successfully traced the change of formaldehyde by the effect of photocatalytic reaction in real-time.

研究分野：計測工学

科研費の分科・細目：センシングデバイス

キーワード：バイオセンサ ガスセンサ 環境計測 生化学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、「環境と健康に関心、社会に対する問題意識、自己啓発・精神性の向上に関心が高く、実際の行動に移す」Lifestyles Of Health And Sustainability (LOHAS) と呼ばれる層が増加している。LOHAS という言葉は米国ではビジネス用語として普及しているが、我が国では広く一般消費者に「健康と環境を志向するライフスタイル」として認知されている。環境配慮住宅や家庭用品などの製品群は市場で一定の評価を受けており、環境と健康への理解広く浸透しつつあることを裏付けている。他方、東日本大震災と原発の事故を経て、国内では一般の市民がガイガーカウンターを持って身の回りの線量を計測するなどの動きがある。こうした動きについても、人々にとって安全・安心な生活環境を求める事のプライオリティが高まっている事を示唆していると言える。

こうした安全・安心を求める傾向は、環境や食品に含まれる化学物質についても同様であると考えられるが、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するのか、またどのように推移しているのかを簡便に知る手段は、全く提供されていない。つまり、環境や食品中、あるいはそうした外的要因によってもたらされる生理的状態の変化に対し、我々が自ら調べる手段を供することは暮らしの質の向上において極めて重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では従来型のクロマトグラフィなどによる環境計測とは異なる、個人レベルで自らの生活空間における各種化学物質のその場 (on site) 計測を可能とし、身近な環境あるいは自身の状態を容易に調べることで健康的な暮らしを支援するための新規なデバイスを提案する。

これまで、タンパク質の分子認識機能を用いることで高い選択性を実現した生化学式ガスセンサを開発してきた。特に、生体触媒であるホルムアルデヒド脱水素酵素 (formaldehyde dehydrogenase: FALDH) を分子認識素子として用い、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 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide: NADH) の蛍光を調べることで、ホルムアルデヒドガスを高い感度で計測可能であることを示してきた。本研究では、この計測原理に加え、反応系の改良と microelectromechanical systems (MEMS) 技術で嗅覚の粘膜構造と機能を模倣したフローセル型の全く新しい感応部構造を形成し、簡便でありながら超高感度をめざした新規ガスセンサを提案する。研究期間内の具体的な目標として、ホルムアルデヒドガスを従来より 1000 倍の高感度である ppt レベルに

高めるとともに、センサデバイスを多様な成分、あるいは手法との比較の中でより成熟したものとすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

本研究では、補酵素としてビタミンの一種である酸化型のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD<sup>+</sup>) を電子受容体として各種の基質を酸化触媒するとともに還元型である NADH と水素イオンを生成する各種の脱水素酵素群を用いたバイオセンサ (NADH 依存型バイオセンサ) を開発する。

NADH の蛍光検出にあたっては、光ファイバ端面に酵素の固定化膜、及び感応部の化学的な反応条件を一定に保つための緩衝液及び NAD<sup>+</sup> を循環させるフローセルを設け、NADH の励起波長である 340nm の紫外線を照射し、端面近傍にて生じた波長 480nm の蛍光が、光ファイバに再度カップリングされる。この蛍光を光ファイバ光学系にて光電子増倍管に導入することで観察する。NADH の検出にあたっては蛍光検出法をまずは実施し、その最適化をはかる。これに加えて、吸光、電気化学的検出方などの方法を比較検討し、形状、感度、機能といった点で目的にあった簡便なバイオセンシングシステムを構築することをめざす。

また NADH 依存型バイオセンサを用いることで暮らしの質を向上させるための新しい応用展開として、環境、食品、非観血的な生体成分の簡便計測などの分野での利用可能性についても評価する。

## 4. 研究成果

### 4.1 反応系の改良による高感度化

反応系の改良では、FALDH の反応生成物として、NADH と同時に 1 分子のギ酸が生ずる点に注目し、これをギ酸脱水素酵素にて触媒することで、更に 1 分子の NADH を生成する新しい手法を考案した。つまり、この複合酵素系にて、1 分子のホルムアルデヒドに対して最大 2 分子の NADH が生成し感度の向上を図る。また FALDH と比較して比活性が 20 倍程度高いアルデヒド脱水素酵素 (aldehyde dehydrogenase) を用いることで、NADH の産生能力を向上させる。そこで、ギ酸脱水素酵素とアルデヒド脱水素酵素を共固定することで作製した酵素膜を前述の光学系に組み込み、ホルムアルデヒドガス計測に供することで ppt レベルのガスモニタリングを行った。

実験の結果、このセンサの 10ppb のホルムアルデヒドガスに対する蛍光出力は 780cps から 1600cps へと約 2 倍の出力上昇が確認され、サブ ppb レベルのガス計測が可能であった。このことは、反応生成物の再利用により測定において参照する物質の生成を促進する酵素反応系のサイクルが有効に働いてい

ることを示している。

この手法は、信号の増幅度という観点からは数桁のオーダーで改善する劇的なものではないものの、技術的には極めて多くの反応系に応用可能であり、最終的な検出法も対象とする物質によって自由に選択することができる。たとえば酸化還元酵素を用いる場合、その検出法は光学的な手法でもアンペロメトリック計測でも良い。また物質によってはさらに多段の反応系を用いることも可能と考えられる。例えば、メタノール(CH<sub>3</sub>OH)の場合はアルコールの脱水素酵素によって酸化されてホルムアルデヒドを生じるため、メタノール1分子から最大で3分子のNADHを生成可能である。

それに加えて、信号の増幅は検出器に入力される前段で行われるため、検出器側の感度の限界に依存しない点が特徴である。つまり、検出器の改良とNADH増幅の手法は併用可能で、この点が大きなメリットである。

#### 4.2 生活環境計測に向けた応用

本センサを用いて実際に環境中の化学物質が変化の様子をモニタリングし、その応用可能性について検討した。具体的には、TiO<sub>2</sub>の光触媒反応によって環境中のホルムアルデヒドが分解され、濃度が低減していく様子をリアルタイムにて調べる系を構築し、評価を行った。

実験にあたっては光源として従来1つのLEDを用いていたが、感度の向上を目的として4LEDに増加した光源システムを用いることで、センサの検出感度を750pptまで向上させた。本計測においてはガスの選択性を重視するため、ホルムアルデヒド脱水素酵素のみを用いる反応系にて実施した。計測システムでは、光触媒が塗布形成されたガラス板をボックス内に設置し、入力ガスが全てのガラス板表面を通過して出力される光触媒セルを作製した。なお、ダミーのガラス板を設けることで、光触媒の表面積を容易に変更できるようになっている。このセルを環境基準の2.5倍である200ppbのホルムアルデヒドガスを標準ガス発生装置にて生成し、マスフローコントローラにて流量を制御し光触媒セルに通過させる構造とした。また、バルブの切り替えにより、光触媒セルを通過させるかバイパスするか選べる構造とした。この系の下流にて出力されるガス成分をモニタリングすることで、光触媒を通過した際のホルムアルデヒド濃度の変化を調べた。

この結果、光触媒セル内の光触媒塗布ガラス板の枚数に依存したホルムアルデヒドの濃度低下が観察され、条件の最適化により90%以上のホルムアルデヒドが除去されている可能性が示唆された。

#### 4.3 多様な成分・検出法への応用展開

NADH依存型のバイオセンサの有用性について、以上で述べた検討により明らかにしてきた。これに加えて、この手法をより多くの物質を対象として検出する目的に利用できるか、検討を行った。

脱水素酵素反応系においては、乳酸、コルチゾールの評価を行い、特に乳酸センサにおいて良好な検出結果が確認された。乳酸センサに関して、電気化学的・光学的検出法の両者について検討したところ、電極を用いて計測する手法においても1μM程度の感度にて計測が可能であった。神経伝達物質の多くは酸化反応によってアルデヒドを生成することが知られており、今後の応用が期待される。

#### 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)

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. Sems. Actuator-B, 161-166, 2012.

Arakawa T, Ando E, Wang X, Miyajima K, Kudo H, Saito H, Mitani T, Takahashi M, Mitsubayashi K, A highly sensitive and temporal visualization system for gaseous ethanol chemiluminescence enhancer, Luminescence, 27, 328-333, 2012.

Miyajima K, Miki D, Arakawa T, Kudo H, Saito H, Mitsubayashi K, Fiber-optic Fluoroimmunoassay for Determination of Dermatophagoides farinae Allergen by Flow Analysis Technique, Sensors and Materials, 25(9), 591-599, 2013.

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.

Arakawa T, Wang X, Kajiro K, Miyajima K, Takeuchi S, Kudo H, Yano K, Mitsubayashi K, A direct gaseous ethanol imaging system for analysis of alcohol metabolism from exhaled breath, Sensors and Actuators B: Chemical, 186, 27-33, 2013.

[学会発表](計 7 件)

Wang X, Kita K, Miyajima K, Arakawa T, Kudo H, Mitsubayashi K, Real-time bio-imaging

system of breath ethanol after drinking by optical bio-sniffer techniques. 3<sup>rd</sup> Int. Conf. Bio-sensing Technology, Sitges, Spain.

Ye M, Yamashita T, Gessei T, Miyajima K, Munkhjargal M, Arakawa T, Kudo H, Mitsubayashi K, A highly sensitive formaldehyde gas sensor “bio-sniffer” for monitoring of indoor environment., 12<sup>th</sup> Asian Conf. Anal. Sciences, Fukuoka, Japan.

Kudo H, Yamashita T, Gessei T, Arakawa T, Mitsubayashi K, NADH-fluorometric biochemical gas sensor (bio-sniffer) for control of indoor air quality, 22nd Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors 2012), Cancun, Mexico, May 15-18, 2012

Kudo H, Yamashita T, Gessei T, Ye M, Miyajima K, Arakawa T, Mitsubayashi K, NADH-fluorometric biochemical gas sensor (bio-sniffer) for assessment of indoor air quality, IEEE SENSORS 2012, Taipei, Taiwan, October 28-31, 2012.

Kudo H, Yamashita T, Ye M, Miyajima K, Gessei T, Arakawa T, Mitsubayashi K, Fiber-optic fluorometric biochemical gas sensor for monitoring of indoor formaldehyde at sub-ppb level, Europt(r)ode XI, Barcelona, Spain, Apr 2012.

工藤寛之, 越田智之, 宮島久美子, 荒川貴博, 矢野和義, 三林浩二, 先天性アミノ酸代謝異常症評価のための NADH 蛍光検出型バイオセンサ, 第 29 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2012 年 10 月 .

工藤寛之, 山下俊文, 叶明, 宮島久美子, 荒川貴博, 関口哲志, 三林浩二, 環境中の極微量ホルムアルデヒド計測を目的とした NADH 蛍光検出型生化学式ガスセンサ, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 仙台, 2012 年 11 月 .

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

工藤 寛之 (HIROYUKI KUDO)  
明治大学・理工学部・准教授  
研究者番号 : 70329118

### (2)研究分担者

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 : 40307326

### (2)研究分担者

荒川 貴博 (Takahiro Arakawa)  
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