

# 選択的な分子認識表面を利用した差圧式濃度デバイスの開発

## Application of a Surface with Molecular Recognition Site to Differential Pressure Type Chemical Sensor

京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 助教 内藤豊裕  
Department of Material Chemistry, Kyoto University, Toyohiro Naito

### 要旨

環境汚染物質の調査や、医療現場での診断、出入国における検疫や薬物検査など、大規模調査のスクリーニングや緊急性の高い現場での迅速分析において、試料採取現場で分析を可能にするオンサイト分析技術が求められている。微小流体技術による分析装置の小型化は注目されている一方で、装置構成要素の小型化とその集積化という手法は、装置・操作の複雑化の原因にもなる。

本研究では、微小流体技術と分子インプリント技術を組み合わせることで、目的分子の吸着による材料表面電荷の変化をポンプの送液性能変化から測定可能とした。まず、内部構造を最適化することで、6 V程度で駆動するポンプの作製に成功した。また、材料表面への化学修飾量と送液性能の関係についても調べた。分子インプリント技術による化学修飾を用いることで、目的分子と選択的に相互作用することが確認された。

### 1. はじめに

大型な装置を必要としない、試料採取現場で分析を可能にするオンサイト分析技術の需要が高まっている。例えば、水・大気・土壌の汚染物質調査においては、精密分析が必要な試料のスクリーニングをすることで分析にかかるコストを削減できる。また、医療現場での診断、出入国における検疫や薬物検査など、緊急性の高い現場での迅速分析において求められている。

Micro Total Analysis System ( $\mu$ TAS) は1980年代に提唱され、現在に至るまで多数の有用なデバイスが開発されている。 $\mu$ TASは微細加工技術を駆使して実験室レベルの実験操作を小型化し、一連の実験操作全てを数cm角の基板上に集積した小型分析装置である。微細加工によって作製する微小な空間・構造では、熱交換が速く、流体制御が容易なため、実験環境の安定化、操作の自動化・並列化など分析装置開発において多くの利点を有する。

$\mu$ TAS開発におけるオンサイト分析デバイスの近年の主流は、妊娠検査デバイスのように抗原抗体反応などの特異的な反応を利用した特定タンパク質の検出を目的にしたデバイスである。これらの分析では比色分析がほとんどであり、定性的な

分析には適しているが、定量的な分析には課題もある。電気化学計測による定量分析手法も数多く報告されているが、高選択・高感度な電極や計測機器が必要となる。

一方で、より汎用性の高い分離手法のオンサイト化を目的として、小型ポンプと組み合わせた液体クロマトグラフィー (LC) の小型デバイスの報告もある。分析種が多岐にわたる現在、様々な現場に応用可能な汎用性の高いオンサイト分析デバイスは今後ますます重要になる。しかし、その小型化の開発思想は、既存の分析装置の構成要素の小型化による、装置全体の小型化であり、装置全体の小型化・制御の簡便化には限界がある。

本研究では、LCに用いられるポンプ、分離カラム、検出器の機能を集積したデバイスを開発することで、分析装置の根本的な小型化と簡便化を目指した。まず、静音・小型のポンプとして注目されている電気浸透流ポンプ (EOP) が、材料の表面電位に依存して送液能が変化することを利用して、ポンプと検出器の機能を集積化した。さらに、EOP表面に分子インプリント技術によって分子認識場を構築することで、目的の分子のみと相互作用する分離カラムの機能を付け加えた。これによ

って、目的分子の吸着を流量変化から検出可能とした。

## 2. 動作原理

EOPは電気浸透流 (EOF) を駆動源とする小型ポンプである。電気浸透流の源となるのは、電解質溶液と電気浸透材界面に形成される電気二重層中のイオン拡散層である。電気浸透材を電解質で満たしたのち、その両端に電圧を印加すると、イオン拡散層中のイオンは電場によって移動する。EOPでは多孔質体などの比表面積が大きい材料を用いることで、イオン拡散層の移動によってバルク溶液の移動を引き起こす。このときEOFの速度は、印加された電場強度と固液界面の電位とにそれぞれ比例する。

本研究では、目的分子とイオン性官能基を介して静電相互作用する認識場を表面に構築した微小流路を電気浸透材として用いた。目的分子が認識場と相互作用すると、流路壁面の電位が減少し、EOFが低下する。この低下量から表面と相互作用している目的分子量を測定できる。

## 3. 実験方法

polydimethylsiloxane (PDMS) 製の微小構造体配列をEOPとして用いた (図1)。フォトリソグラフィによって、シリコン基板上にフォトレジストの鋳型を作製した。その鋳型にPDMSのプレポリマーを流し、100°C、30分で硬化した。鋳型からPDMS製構造体配列を剥離させ、プラズマ処理後、スライドガラスと接合した。

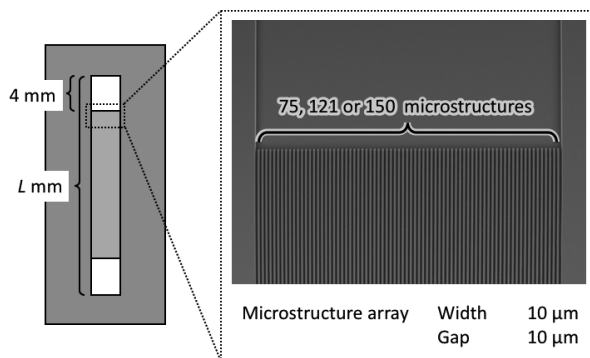


図1

EOPの両末端に電極として、それぞれ白金棒と白金管を挿入した。流量およびポンプ吐出圧を測定するため、白金管は抵抗管を通して試料導入口と接続した。抵抗管には内径100 μmのフューズドシリカキャピラリーを用い、試料導入口から29.5 mmの位置に検出窓を作製した。(図2)

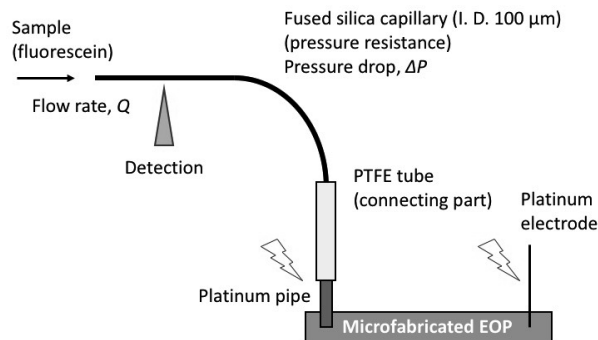


図2

EOPに電圧を印加すると、EOP内部でEOFが誘起され、抵抗管内部に蛍光試薬が試料導入口から流入する。EOPが出力する圧力は、EOP内部の電場強度、EOP表面の電位、EOP内部構造の形状等に依存するが、同一条件においては一定の定圧ポンプである。そのため管内流量は、EOPに接続された配管内の圧力損失に依存して変化する。本実験においては、異なる長さの抵抗管における管内流量を計測し、EOPの最大吐出圧と最大流量を推測した。

Hagen-Poiseuille式を用いて管内流量と抵抗管長さから圧力損失 ( $\Delta P$ ) を算出し、管内流量 ( $Q$ ) に対してプロット ( $\Delta P$ - $Q$ プロット) した。抵抗管なしの時、ポンプ内部の流量は最大流量であるため、 $\Delta P$ - $Q$ プロットのx切片 ( $\Delta P=0$ ) はポンプの最大流量を示していると考えられる。逆に、ちょうど $Q=0$ となるような抵抗管を用いた時、管内圧力損失とポンプの最大吐出圧は等しくなる。よって、 $\Delta P$ - $Q$ プロットのy切片 ( $Q=0$ ) はポンプの最大吐出圧を示すと予想される。よって $\Delta P$ - $Q$ プロットのx切片、y切片をそれぞれ、最大流量と最大吐出圧として、EOPの性能の評価基準とした。

## 4. 実験結果と考察

はじめに、異なる長さの抵抗管を用いた時の流量の変化に対する抵抗管内圧力損失の関係を調べた。抵抗管内の流量は、検出窓における蛍光強度の変化から算出した。予想通り、抵抗管を長くすると、EOPの流量は低下し、その流量減少は抵抗管内部の圧力損失と一次相関があることが確認できた。

より低い電圧で、高い送液圧力を実現するため、初期検討として、ポンプの長さ、印加電圧がEOPの送液性能に与える影響を評価した。電極間距離が30 mmと60 mmのEOPを作製し、それぞれのEOPについて、100 Vと200 Vの印加電圧における $\Delta P$ - $Q$ プロットを作成した。(図3)

まず、同じ長さのEOPを比較すると、印加電圧が高くなると、最大流量、最大吐出圧がともに高くなることを確認できた。印加電圧が等しい条件では、最大吐出圧に有意な差は見られないが、最大流量は短いポンプにおいて高くなった。

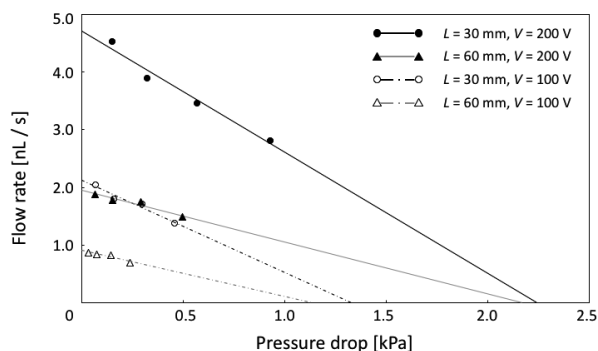


図3

EOFはEOPに印加された電場に比例して高くなるため、最大流量はEOP内の電場強度に依存すると考えられる。印加電圧が等しい条件において、最大流量に変化が生じたのは、電極間距離が短くなったことによる電場強度の増大によるものと考えられ、合理的な結果が得られている。

対して最大吐出圧は、印加電圧に依存することを示す結果が得られていた。通常のポンプは直列に接続することで吐出圧が高くなり、長いEOPは、短いEOPを直列に接続したEOPと見ることもできる。一方で、EOFが電場強度依存のため、ポンプの長さがキャンセルされたと考えられる。

これらのことから、電極間距離が短いほど低電圧でも高い流量が得られることと、高い吐出圧を得るためには、内部構造の形状や構造体表面の化学修飾などの検討が必要であることが明らかになった。

次に流路内部の構造について検討した(図4)。内部に配列した四角柱型の微小構造体の幅、長さ、配列間隔、配列個数の異なるEOPの送液性能を評価した。その結果、四角柱構造体の長さが長く、配列間隔が狭いほど、最大吐出圧が高くなる傾向があった。

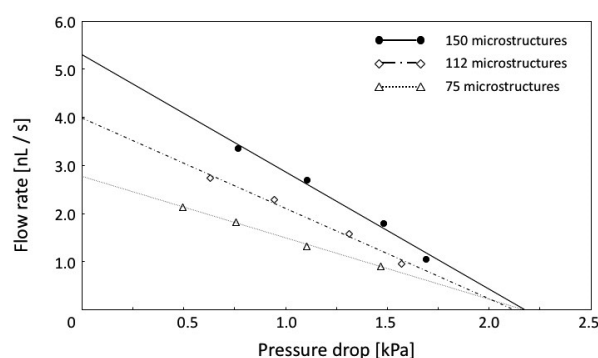


図4

電場に沿った固-液界面が広いほどEOFは速くなるので、流れ方向に構造体間隙を持たない柵状の構造体を、流れ垂直方向に密に配列したEOPが最大吐出圧が高くなると考えられる。また、流れ垂直方向の断面積を広くすることで、同じ印加電圧条件で最大流量が高くなることが分かった。これらの条件を考慮して再設計したEOPはわずか6 Vでも駆動することが確認された。

また、異なる濃度の3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) 溶液によって表面にアミノ基を導入したEOPの送液性能についても比較した(図5)。修飾溶液の濃度が0.001%から10%の範囲では、濃度が高くなるにつれて、最大流量および最大吐出圧が向上した。特に、0.001%から1%の範囲で、送液性能が比例して向上した。また、10%と100%溶液では、同等の送液性能を示した。このことから、高い濃度の修飾溶液によって構造体表面へのアミノ基導入数は増加するが、1%から10%の濃度範囲で修飾量は飽和することが分かった。このとき、

アミノ基導入数は、修飾溶液の濃度の対数に比例すると考えられる。

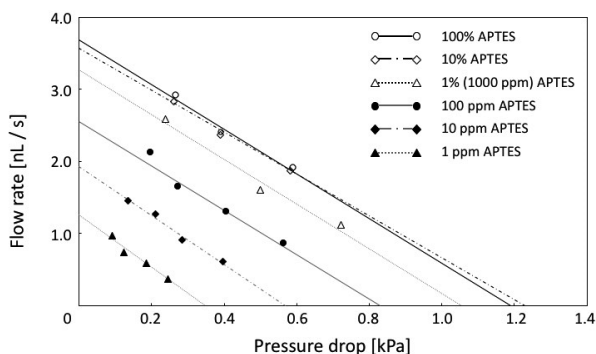


図5

ここまでの検討をもとに、オンサイト分析への応用に向けた小型分析デバイスの開発を行った (6)。EOFは材料の表面電荷によって誘起されるため、構造体表面に吸着した分子によって固体表面電荷が遮蔽されると、EOFの低下が期待される。APTESで構造体表面にアミノ基を導入したのち、benzyltributylammonium chloride (BTBA) と 4-sulfobenzoic acidのイオン結合型錯体で修飾した。その後、1M NaCl aq.によってBTBAを除去することで、表面にスルホ基を有するEOPを作製した。

アミノ基およびスルホ基導入後のEOFを測定したところ、EOFの向きが逆転することから、それぞれの官能基の導入が確認できた。その後、吸着溶液浸漬前後のEOPの流量変化を測定し、分子吸着によるEOF変化について評価した。吸着溶液には Ammonium chloride (AC), tetraethylammonium chloride (TEAC), tetrabutylammonium chloride (TBAC) の3種類のアンモニウム塩水溶液を用いた。

アンモニウム塩水溶液でEOP内部を30秒間満たした後、純水に置換して流量測定を行った結果、アンモニウム塩水溶液を導入後のEOPの流量が低下した。流量低下後のEOPを1M NaClで洗浄することで、流量が分子吸着前の流量程度まで回復することが確認できた。このことから、アンモニウム塩が材料表面に吸着することで、スルホ基による表面電荷が抑制され、流量が減少したと考えられる。1M NaCl洗浄後の流量は、アンモニウム塩吸着

前のEOP流量よりも低下しているものの、3回までの繰り返し計測が可能であることも確認できた。表面修飾法や脱着条件のさらなる検討によって、定量性と耐久性の向上が期待できる。

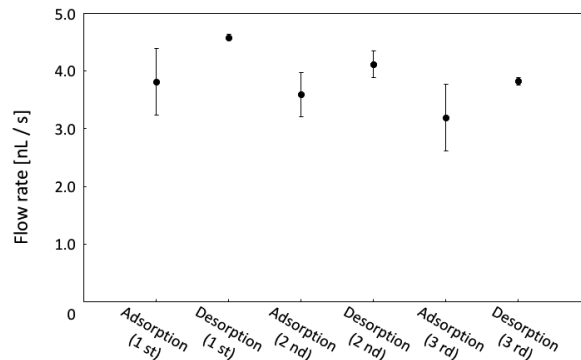


図6

流量減少量に注目すると、AC吸着時にもっとも流量が減少していた。吸着分子のサイズは、ACがもっとも小さいことから、AC水溶液導入時により多くの分子が構造体表面に吸着したと考えられる。

より高度な分離を可能にするため、分子インプリント法を用いて標的分子と選択的に相互作用する分子認識場 (1) をEOP表面に構築した。アミノ基導入後、4-(tributylammoniummethyl)benzyl tributyl-ammonium chloride (TBTA) と4-sulfobenzoic acidのイオン結合型錯体で修飾した。無水酢酸/ピリジン/クロロホルム混合溶液によって残存アミノ基をキャッピングしたあと、1M NaCl aq.によってTBTAを除去することで、官能基間距離がTBTAと同程度の微小構造体 (MI-EOP) を作製した。

MI-EOPはTBTA水溶液導入後に流量が減少した。BTBA水溶液導入後も流量はわずかに減少するが、その流量減少量は有意な差があった。TBTAはBTBAよりも分子サイズが大きいのに関わらず、減少量が大きかったことから、MI流路表面にTBTAと選択的に相互作用する認識場の構築が確認された。

また、TBTA, BTBA混合溶液を吸着溶液に用いたEOPの流量変化についても評価した。混合溶液において、流量減少量はTBTA溶液を吸着溶液に用いた場合の流量と同程度であった。さらに、TBTA溶液浸漬後にBTBA溶液で置換した条件、BTBA溶



液浸漬後にTBTA溶液で置換した条件, どちらの実験においても, 流量減少量はTBTA溶液を吸着溶液に用いた場合と同程度だった。

これらのことから, 複数種のイオン種が存在する場合においても, 本MI-EOPは構造体表面に吸着したTBTA分子を選択的に強く相互作用し, 検出していることが示された。

作製したMI-EOPについて, TBTA溶液濃度依存性を評価した。1  $\mu\text{M}$ から10 mMのTBTA濃度範囲においてMI-EOPの流量変化量を評価したところ, 濃度が高くなるほど, 流量減少量が大きくなった。その関係は, 対数曲線のようにある値に漸近するような変化を示した。この時, 検出限界は10~100  $\mu\text{M}$ の間にあることが示された。

本研究の表面修飾では, 分子認識場は材料表面のみに構築されていると仮定できる。また, ひとつの認識場には1分子のTBTAしか吸着できない。これらのことから, 得られたグラフは, Langmuirの等温吸着式のモデルが適用できると考えられる。検出限界については, 表面修飾法, 認識場の最適化など課題が残っているが, 流量変化から表面吸着分子を定量できる可能性を示すことに成功した。まとめ

本研究によって, 電気浸透ポンプと分子インプリント技術を組み合わせることで, ポンプ送液性能変化から溶液中目的分子濃度を計測できることが明らかとなった。目的分子存在下で目的分子を選択的に相互作用することを確認し, 混合溶液中でも目的分子を検出することができた。検出限界やデバイス間誤差などに課題が残るが, 表面修飾条件や微小構造形状の検討により解決できると考えられる。本研究で開発したデバイスはシンプルな測定原理に基づいていると同時に, わずか数Vで駆動する。時計と色付きの水, モバイル電源さえあれば, どこでも分析可能な測定可能である。また, ことが確認されている, また, 大出力型のと時計

## 謝辞

本成果は, 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻の久保拓也准教授との共同研究によるもので

ある。

また, 本研究を遂行するにあたり, 研究助成を賜りました公益財団法人京都技術科学センターに心より感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) R. B. M. Schasfoort, S. Schlautmann, J. Hendrikse, and A. van den Berg: *Science* **1999**, 286, 942.
- 2) I. M. Lazar, and B. L. Karger: *Anal. Chem.* **2002**, 74, 6259.
- 3) M. R. Hossan, D. Dutta, N. Islam, and P. Dutta: *Electrophoresis* **2018**, 39, 702.
- 4) L. Chen, J. Ma, and Y. Guan: *J. Chromatogr. A.* **2004**, 1028, 219.
- 5) T. Kubo, K. Kuroda, Y. Tominaga, T. Naito, K. Sueyoshi, K. Hosoya, K. Otsuka, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, 89, 111-117.

## 成果発表

- 6) 内藤 豊裕, "本当に使いにくい3つの技術" すぐには役に立たない研究講座Part 2 (2018) (招待講演)
- 7) 内藤 豊裕, "マイクロ流体デバイスによる分離分析化学への新しいアプローチ" CUPALシンポジウム 微細加工とその応用研究シンポジウム (2018) (招待講演)
- 8) T. Naito, H. Inoue, S. Futagami, A. Kunisawa, T. Kubo and K. Otsuka, *Sensors and Materials* **2019**, 31, 1, 45.