

課題名 B-0912 化学センシングナノ粒子創製による簡易型オールプリント水質検査チップの開発

課題代表者名 チツェリオ ダニエル（慶應義塾大学理工学部応用化学科）

研究実施期間 平成21～23年度

累計予算額 81,200千円（うち23年度 26,100千円）  
予算額は、間接経費を含む。

## 研究体制

(1) 化学センシングナノ粒子創製による簡易型オールプリント水質検査チップの開発（慶應義塾大学）

### 1. はじめに（研究背景等）

水は人間の生活にとって最も重要であり、身近な資源である。そのため、水資源の汚染を抑制し防止することは、環境の改善のための重要な鍵となる。農業用水や飲料水に使われる水の汚染は、人間の健康に重大な影響を与える。このような背景から、水の質と安全性をモニタリングすることは極めて重要である。先進工業国では、水質汚染に伴うリスクが調査されており、汚染の防止や排水の浄化といった対応策が実施されている。水質分析のための高度な研究室レベルの方法が利用できるようになってきており、日々の水質検査に使われている。しかしながら、発展途上国では全く異なる状況に直面している。水質汚染に伴うリスクは知られているが、その防止策に関連する技術や財源が一般化されていない。その結果、世界人口の約61億人の中で、10億人がきれいな水を飲めず、明らかに人間の健康に悪影響を及ぼしている。

これまで利用されてきた高度な水質分析法の多くは、空調を含めた長期の分析試薬の管理や冷蔵保存が必要な試薬の供給、高度にトレーニングされた人材などを必要としていた。このような水質分析法は発展途上国では利用しにくく、特に水の安全性の検査が重要となる現場では利用が難しい。そのため、それらの分析法を簡易化する必要がある。発展途上国では、扱いやすさや測定時間の短さ、安全性と携帯性、そして特にデバイスと試薬の低価格化といった、分析技術の「経済性（安価）・簡便性」が必要である。

本研究ではこれらの課題を実現するため、紙ベースのマイクロ流体デバイスとしての水質センシングチップを、インクジェットプリント技術を用いて開発することが目的である。水サンプルを分析するマイクロ流体デバイスは小型化や複雑な機能の融合を可能にし、高度な水分析ツールを発展途上国に提供できる。

### 2. 研究開発目的

本研究の目的はグローバルに使用可能なペーパーベースの水質センシングチップ（オールプリントケミカル（もしくはバイオ）センサーデバイス）を、インクジェットプリント技術を用いて開発することである。その概要を図1に示す。インクジェットプリント技術の利点と低コスト紙基板の使用により、作製されるセンサーは発展途上国のみならず、先進国における一般家庭などでも利用可能である。このセンサーの実現により、安価かつ簡便迅速に水サンプルの多項目同時定量をすることができる。作製されるセンサーは、色変化あるいは発色を判定するものであり、目視あるいは安価なカラーアナライザーでの定量が可能である。

この研究においては、ケミカルセンシングあるいはバイオセンシングを行うために、インクジェットプリンタを用いて紙基板上に印刷可能なセンシングインクの開発が重要である。コアシェル型のポリマーナノ粒子や、ヘア鎖を表面に有するナノ粒子などをベースとし、それらにセンシング機能試薬を固定化して、ナノ粒子状のセンシングインクとして使用する。開発したそれぞれのセンシングインクを基板上にインクジェットプリンタにより印刷し、固定化することでセンサーデバイスを作製する。このデバイスでは、あらかじめ分析に必要な化学物質を全て紙基板に印刷し、固定化することで追加試薬を加えることなく、試料を滴下するだけで簡便に分析を行うことができる。

具体的には以下の3項目の研究から、ペーパーベースの水質センシングチップの完成を目指した。

(1) ポリマーナノ粒子を用いた化学的および生化学的に応答するインクジェットプリント用センシングインクの開発：

環境検査における水質分析のためのオプティカルケミカルセンシング機能物質のキャリアーとなるポリマー粒子の開発、合成および最適化を行う。また、環境検査に関連する項目分析のための、化学的および生化学的に応答するさまざまなポリマーナノ粒子ベースのインク開発を行う。

(2) 水質多検体モニタリングのための“オールインクジェットプリント技術による”ケミカルセンシングペーパーの作製：多項目の水質検査を定量的に行える、インクジェットプリント技術を用いたマイクロ流体ケミカルセンシングペーパーの作製を行う。この場合、紫外線硬化樹脂をインクとして利用することにより、紙基板上にさまざまなマイクロ流路パターンを作製し、さらにセンシングインクを流路内の最適な部分にプリントすることで、センサーデバイスを作製する。

(3) 環境検査のための安価な水質検査トータルシステムの開発：水質検査項目に従った多項目同時定量が可能なマルチセンシングチップを作製する。これにより、安価かつ簡便、迅速な測定が可能な紙基板水質センシングチップを作製する。また、センサー応答の定量性の確保のため、色情報分析としてのデジタルカラーアナリシスの適応化と最適化の検討を行い、安価かつ高性能な定量分析システムを構築する。



### 3. 研究開発の方法

(1) ポリマーナノ粒子を用いた化学的および生化学的に応答するインクジェットプリント用センシングインクの開発

1) pHセンシングインクの作製（コア・シェルナノ粒子）

pHセンシングが可能なインク材料として、ポリスチレンコアとポリビニルピロリドンシェルを持つコアシェル粒子にブロモチモールブルー、チモールブルー、メチルレッドをそれぞれ別々に内包させたポリマーナノ粒子を開発した。その際、ブロモチモールブルーとチモールブルーは、アルキル鎖をつけることによって疎水性を大きくし、ポリビニルピロリドンのシェル内に内包させた。また、メチルレッドはそのままシェルに内包させて、ナノ粒子インクを作製した。

2) 亜硝酸イオン( $\text{NO}_2^-$ )センシングインクの作製（コア・シェルナノ粒子、ヘアナノ粒子）

$\text{NO}_2^-$ センシングが可能なインク材料として、ポリスチレンコアとポリビニルピロリドンシェルを持つポリマーナノ粒子とヘアナノ粒子から成る二種のセンシングインクを開発した。ヘアナノ粒子は、表面にヘア（髪）のような糸状構造を持つ。このようなセンシングインクを用いることで、検査試薬の安定性の向上やセンシングエリアの色ムラの改善、使用するインク量の減量などが行える。

3) マルチセンシングインクの作製（イオン交換型コア・シェルナノ粒子）

イオン交換法を利用することで、様々な色素の固定化が可能な汎用性の高いナノ粒子インクを開発した。ポリスチレンコアとポリアミノメチルメタクリレートヒドロクロライドシェルを持つポリマーナノ粒子から成るセンシングインクを開発した。作製された粒子は表面に正電荷を持つため、粒子間に静電斥力が生じ、分散安定性が高いナノ粒子である。また、作製にミニエマルジョン重合を用いる

と小さい粒径に制御することができる。

#### 4) 鉛イオンセンシングインクの作製（イオン選択性オプトード型コア・シェルナノ粒子）

イオン交換法をベースにしたイオン選択性オプトードの原理を用いたセンシングインクを開発した。検出目的のイオンと結合する試薬と色変化を生じる試薬を別々に選択して使用することが可能である。本研究では、鉛イオン検出用のセンシングインクを開発した。

### (2) 水質多検体モニタリングのための“オールインクジェットプリント技術による”ケミカルセンシングペーパーの作製

#### 1) インクジェット技術を用いた亜硝酸イオンセンシングペーパーおよびラテラルフローイムノセンシングペーパーの作製法の開発

紙基盤上でのマイクロ流路の作製法を利用し、亜硝酸イオンセンシングおよびイムノセンシングが同一紙基盤上で行えるセンシングペーパーの開発を行った。ろ紙をポリスチレントルエン溶液に2時間浸漬し、室温で乾燥した。得られた疎水性のポリスチレン包括ペーパーにインクジェットプリンタからトルエンを吐出することで、親水性のパターンを作製した。1スポットにつき10回トルエン液滴を、150マイクロメートルのスポット間隔を置いて吐出することで、疎水性ペーパーのポリスチレンを除々に溶解・除去し、本来のろ紙としての親水性部位を、トルエンを印刷した部分だけに露出させてパターンニングした。このようにして、マイクロ流路、反応部位、センシングエリアをそれぞれパターンニングした。

インクジェット技術を用いたラテラルフローイムノセンシングペーパーの作製法では、ろ紙に親水性パターンを作製する方法は上記と同様に行い、異なる点としては、まず、免疫反応のテストラインおよびコントロールラインだけを先に作製した。次に、その2つのライン上に、イムノセンシングインクを印刷した。その後、すべてのマイクロ流路をトルエンの印刷により完成させた。完成したマイクロ流路を含むろ紙をアルブミン（BSA）溶液（溶媒はリン酸バッファ）に1時間浸漬することで、ブロッキングを行った。最後に、金ナノ粒子でラベル化したヒトIgG抗体を用いて、作製した流路上のコンジュゲートエリアに抗体をスポットした。このヒトIgGイムノセンサーには、ヒトIgG（コントロールライン）、ヒトIgG抗体（テストライン）、金ナノ粒子でラベル化したヒトIgG抗体（コンジュゲートエリア）をインクとして用いて作製した。

#### 2) UVインクを利用したインクジェットプリント技術によるマイクロ流路の作製法の開発

上記1)のセンシングペーパーの作製法には揮発性有機化合物であるトルエンが使われており、環境に対して課題があった。そこで、揮発性有機溶媒を用いない環境に優しい流路の作製法（UVインクによる流路の作製法）を考案した。

UV照射によって重合し、疎水性のバリアを形成できるインク（UVインク）を開発した。開発したUVインクは、疎水性のモノマーと光重合開始剤から構成されるインクである。その構成は、モノマーとしては、アクリル酸オクタデシルと1,10-デカンジオールジアクリレートの混合物を用い、開始剤としてはベンジルジメチルケタールを使用した。このUVインクをろ紙上にインクジェットプリンタにより印刷し、その後UVランプを照射することでモノマーを重合させる。これにより、疎水性のバリアを形成させ、流路を作製した。

#### 3) 鉛センシングペーパー作製法の開発

上記2)の方法とイオンオプトード型センシングインクを用いて、マイクロ流路をもつ鉛センシングペーパーチップを開発した。インクジェットプリンタを用いてセンシングインクを流路中央付近に線状にプリントし、鉛イオンセンシングチップペーパーを作製した。このセンシングペーパーの性能は、pH 5.2に調整した濃度の異なる鉛試料20マイクロリットルを5回滴下して評価した。

#### 4) 新規蛍光ナノ粒子型ラベル化剤を用いたイムノセンシング技術の開発

高感度なイムノセンシングを実現するために、蛍光ナノ粒子型ラベル化剤を開発した。まず、ポリエチレングリコール鎖を金ナノ粒子表面に修飾した後、テトラエトキシシラン（TEOS）をモノマーとしてシリカシェルを合成した。次にユウロピウムリガンドをアミノ基のついたシラン化剤と結合させ、ユウロピウムイオンを配位させ、ユウロピウム錯体-シランカップリング剤複合体を得た。その後、これをTEOSと共重合させることで、ユウロピウム錯体内包シリカシェルを合成した。この操作を5回繰

り返すことによって、多量のユウロピウム錯体を固定化した。抗体はナノ粒子表面へ結合させた。この蛍光ラベル化剤の評価は、マウスIgGを測定することにより、一般法である酵素免疫法と比べてセンサーの性能を評価した。

### (3) 環境検査のための安価な水質検査トータルシステムの開発

#### 1) デジタルカラーアナリシスを用いた定量分析法

作製したチップによる半定量測定を目視で行ったほか、より客観的かつ定量的な判定をするためにデジタルカラーアナリシス(DCA)を行った。DCAは、吸光光度分析などの従来の光学的手法に代わる、新しい光学分析手法である。デジタルカラーアナライザーやデジタルカラーメーターを用いることによって色を測定し、色の座標系を用いて数値に変換する。色をデジタル情報として扱うことにより、半定量的な分析しかできなかった比色分析より精度の高い定量測定が可能となる。

#### 2) イムノケミカルマルチセンシングチップの開発

一つの紙基板上で化学センシングおよび生化学センシングを同時に行えるイムノケミカルセンシングペーパーを開発した。これにより、試料を一度注入するだけで、同時に多項目の検査を行うことができる。ケミカルセンシングの一例としてpHセンシングを、多項目バイオセンシングの一例としてマウスIgGセンシングとヒトIgGセンシングの二種類のセンシングを行った。流路の作製からセンシング試薬の印刷までを、全て同一のインクジェットプリンタで作製した。

#### 3) 多項目水質センシングチップの開発

一つの紙基板上で同時に多項目の化学センシングを行えるマルチセンシングチップを作製した。センシング項目は、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{F}^-$ 、pHの7種類である。チップ中心部から8方向に進む形の流路をインクジェットプリンタにより作製した。その後7種のイオンに対応した検査試薬を流路エンドに印刷した。使用したセンシング試薬は先に挙げた測定イオン項目の順に、ジンコン、アゾメチン、キシレノールオレンジ、フタレインコンプレキソン、鉛イオノフォア(ETH5418)、アルフゾン、ブロモクレゾールパープル・プロモチモールブルー・クレゾールレッド混合物であり、それぞれの試薬を内包したナノ粒子を調製し、センシングインクとして使用した。

#### 4) ヒ素センシングペーパーの開発

還元剤である水素化ホウ素ナトリウム( $\text{NaBH}_4$ )の水の還元により水素を発生させ、発生した水素が試料溶液中のヒ素と反応し、水素化ヒ素(アルシingas、 $\text{AsH}_3$ )を発生させる。 $\text{AsH}_3$ はろ紙に含ませておいた塩化金(III)( $\text{AuCl}_3$ )を還元し、発色する。この原理を用いて、ヒ素を色変化から定量するセンシングペーパーを作製した。

## 4. 結果及び考察

### (1) ポリマーナノ粒子を用いた化学的および生化学的に応答するインクジェットプリント用センシングインクの開発

#### 1) pHセンシングインクの作製(コア・シェルナノ粒子)

pHセンシングが可能なインク材料として、ポリスチレンコアとポリビニルピロリドンシェルを持つコアシェル粒子にプロモチモールブルー、チモールブルー、メチルレッドをそれぞれ別々に内包させたポリマーナノ粒子を作製した。これらの色素をナノ粒子へ含有させるために色素にアルキル鎖を導入し、その効果を確認するために、色素漏れの評価を行った。アルキル化させない場合は溶液に色素漏れが確認された。一方、アルキル鎖を導入して疎水化させたプロモチモールブルーを用いると、ナノ粒子から漏れ出ないことが確認できた。また、同様にアルキル鎖を導入したチモールブルーおよびメチルレッドでも同様な結果を得た。作製した3種類のナノ粒子分散液を混合した結果、緑色になったことを確認した。また、pH変化による変色応答は良好であった。

#### 2) 亜硝酸イオン( $\text{NO}_2^-$ )センシングインクの作製(コア・シェルナノ粒子、ヘアナノ粒子)

$\text{NO}_2^-$ センシングが可能なインク材料として、表面にヘア(髪)のような糸状構造を持つヘア粒子が最適であった。得られたヘア粒子の粒子径は約210ナノメートルであり、インクジェットプリンタでの吐出が可能な粒径であった。このコア粒子は粒子表面に官能基を導入し、粒子表面を反応場として使用

するため、本来であれば清浄な表面を有する粒子を作製することが望ましい。しかし、インクジェットプリンタでの吐出を考慮し、必要最小限の界面活性剤を加えることで、小さい粒子径を有し、また表面を反応場として使える粒子を作製した。ヘア粒子表面には、メタクリレート由来のカルボキシル基が存在し、アミノ基を持ったナフチルエチレンジアミン (NEDA) と共有結合させることでヘア鎖にセンシング試薬を固定化させた粒子 (SVMN粒子) が作製できた。SVMN粒子は元素分析の結果、反応前後でNEDA由来のN元素の存在比が増加し、NEDAと粒子の結合が確認された。結合された後でも、 $\text{NO}_2^-$ との反応から生ずるジアゾ色素化合物の生成が確認され、センシングインクが作製された。

### 3) マルチセンシングインクの作製 (イオン交換型コア・シェルナノ粒子)

ポリスチレンコアとポリアミノメチルメタクリレートヒドロクロライドシェルを持つ約 180~300 ナノメートルのポリマーナノ粒子センシングインクを開発した。作製された粒子は表面に正電荷を持ち、分散安定性が高い。ジンコン (Zincon) は亜鉛、銅の比色分析試薬であり、酸性溶液中では赤~赤紫色、中性~微アルカリ性で黄~橙黄色となり、強アルカリ性では紫色となる。pH5 から pH9 の領域で、青色の呈色を確認することで銅の存在を確かめることができる。金属イオンセンシングを行う色素は固定化されると pKa が変化し、キレート能が低下する場合がある。そのため Zincon がナノ粒子に固定化された場合においても、銅への配位能を失わずに、濃度に対応した呈色を示すことを確認する必要がある。その結果、色変化が認められた検量線より求めた検出限界は、48 マイクロモル ( $\mu\text{M}$ ) であった。溶液状態よりは感度が低くなるが、現在販売されている Merck 社製鉛検出デバイス Merckoquant® では検出限界が 25 mg/L = 120  $\mu\text{M}$  であることから、開発した鉛検出チップは市販の検出キットよりも高感度に鉛を測定できる。開発したナノ粒子インクは、試薬を変えることで、さまざまな物質の検出に使える。

### 4) 鉛イオンセンシングインクの作製 (イオン選択性オプトード型コア・シェルナノ粒子)

イオン交換をベースにしたイオン選択性オプトードの原理を用いたセンシングインクを開発した。インク材料には、ポリスチレンコアとポリビニルピロリドンシェルを持つポリマーナノ粒子を用いたが、エタノールとコアシェル粒子を混ぜるとシェルは膨潤するがコアは膨潤しない。一方テトラヒドロフラン (THF) はシェルもコアも膨潤する。エタノールではシェルのPVPのみが膨潤するため、クロモイオノフォアがシェルのPVPの部位に内包されていた場合、エタノールにクロモイオノフォアは溶解、膨潤して溶け出したクロモイオノフォアによって溶液に色がつくことが予想された。しかし、溶液に色は付かなかった。よって、クロモイオノフォアはコアシェル粒子のコアの部分に内包されていると考えられた。この理由は、本研究で使用した試薬は比較的疎水性が高く、親水性のシェルではなく疎水性のコアの表面付近に内包されたと思われる。

## (2) 水質多検体モニタリングのための“オールインクジェットプリント技術による”ケミカルセンシングペーパーの作製

### 1) インクジェット技術を用いた亜硝酸イオンセンシングペーパーおよびラテラルフローイムノセンシングペーパーの作製法の開発

亜硝酸イオンセンシングおよびイムノセンシングが同一紙基盤上で行えるセンシングペーパーの開発を行い、性能を評価した。亜硝酸イオンを含む  $\text{NaNO}_2$  水溶液をサンプルエリアに滴下し、浸透させた。センシングエリアの色変化は目視で  $10^{-4}\text{M}$  まで観察できた。色変化はサンプルを滴下して、5分後にスキャナを用いて記録した。その結果、コアシェル粒子に比べ、ヘア粒子の方が、色変化が急激に起こる濃度域が低濃度であり、検出下限が低かった。この原因として、コアシェル粒子と比べ、検査試薬が粒子表面に固定化されているため、色変化が観察されやすい、ということが考えられる。また、ヘア鎖が架橋されておらず、柔軟性を持っているため、検査対象物質が検査試薬に触れ、反応しやすい。WHOのガイドラインによれば、亜硝酸イオンの水質基準は  $6.5 \times 10^{-5}\text{M}$  である。即ち、 $\log[\text{NO}_2^-]$  が -5 から -4 で急激に変化しているヘア粒子を用いることで、明確にこの基準を満たすか否かを知ることができる。

また、インクジェット技術を用いたラテラルフローイムノセンシングペーパーを作製し、評価した。0.01-5 mg/Lの濃度(溶媒: PBS (pH=7.4))のヒトIgGサンプル20  $\cdot$  lを用いてサンドウィッチイムノアッセイを行った。ヒトIgGのポジティブサンプルおよびネガティブサンプルを用い、試料を滴下して20分後に得られた色変化を測定した。ポジティブサンプルを用いた場合には、テストラインおよびコントロールラインで色変化が確認された。テストラインにおける色変化は、分析対象であるヒトIgGが金ナ

ノ粒子でラベル化された抗体と結合し、その複合体がサンプルの毛細管現象によりテストラインまで流れたことを意味している。しかし、異なるセンシングペーパーにおいて金ナノ粒子によってラベル化された抗体を均一に流すことはできなかった。そのため、テストラインとコントロールラインの色変化の強度の比をとることで、ヒトIgGの濃度に応じた検量線を作製した。この方法により、誤差の小さい検量線を得ることができた。

## 2) UVインクを利用したインクジェットプリント技術によるマイクロ流路の作製法の開発

開発したUVインクは、アクリル酸オクタデシルと1,10-デカンジオールジアクリレートが7:3（重量比）の混合物を用い、開始剤としてはベンジルジメチルケタールをモノマー比15%で使用した場合が最適であった。このUVインクをろ紙上にインクジェットプリンタにより印刷し、その後UVランプを照射することで重合させて疎水性のバリアを兩岸にもつ流路を作製した。このUVインクで作製した流路に、色素（赤色二号）水溶液を流したところ、漏れや詰まりがなく、水溶液が流れることが確認された。色素溶液は流路内のみを流れ、流路外や裏面には漏れでていない。同様のことが断面図からも確認できた。疎水性バリアが紙の内部まで形成されていた。この方法は、有害な有機溶媒を使用せずに、さまざまなパターンの流路をもつペーパーベースのマイクロ流体チップが作製できるため、特許を出願した。

## 3) 鉛センシングペーパー作製法の開発

作製した鉛イオンセンシングチップペーパーを評価したところ、DCAのRGB法でのR (Red) 値で最も良好な相関を得られたため、色情報のR値を用いて鉛イオンセンシングを行った。R値は濃度に応じて変化し、鉛の検出下限は $8.1 \times 10^{-6}$  Mとなった。比較実験として粒子ではなくフィルムを用いた場合の検出下限は $1.1 \times 10^{-5}$  Mであり、粒子を用いることで感度が向上することがわかった。これは粒子のほうが鉛試料と接触する面積が大きく、より効率的にイオン交換を行えるためである。また、粒子が流されてしまうことはなかった。この理由として、粒子により色素を固定化する上で、インクの粘度調整にグリセリンではなくエチレングリコールを利用した効果があったと考えられる。エチレングリコールはグリセリンよりも沸点が低く、乾きやすい。そのため、余計な水分などが蒸発し、紙と強い物理吸着したことが考えられる。

## 4) 新規蛍光ナノ粒子型ラベル化剤を用いたイムノセンシング技術の開発

高感度イムノセンシングを可能にする蛍光ナノ粒子型ラベル化剤を開発し、マウスIgGをモデル抗原として、ラテラルフローイムノアッセイを行った。まずニトロセルロース上にテストラインとして抗マウスIgGを、コントロールラインとしてマウスIgGをインクジェットプリンタを用いて印刷した。その後に吸着用パッド、試料用パッド、そしてラベル化抗体を固定化したコンジュゲートパッドを重ねることによってラテラルフローイムノアッセイ用のデバイス構築した。マウスIgG抗原を流し、UVランプとデジタルカメラ、フィルタを用いて蛍光シグナルを撮影した。その後、色表現法のひとつであるRGBのうち、R (Red) の値を利用することによって蛍光シグナルの数値化を行ったところ、0.57 ng/mLの検出限界を持つ良好な検量線を得た。

### (3) 環境検査のための安価な水質検査トータルシステムの開発

#### 1) デジタルカラーアナリシスを用いた定量分析法

色情報から定量的な測定を行うためにデジタルカラーアナリシス(DCA)を用いた。DCAは、色を構成する3つの値の三刺激値を基本とする。そのうち、RGB法は色スペクトルの赤、緑、青の三原色の組み合わせによる色を数値化する方法である。光のない状態(Black)にR、G、Bの色光を加えていくと、その割合によりあらゆる色が表現できる。RGB法は三刺激値によって色は3次元直交座標の中の1点で表すことが出来る。しかし、三刺激値が装置の特性に依存してしまうという問題点がある。これを改善するために、定義した均等色空間の一つがCIE 1976 L\*a\*b\*である。ある色と他の色の色差は、L\*a\*b\*座標系から算出できる。本研究では、目視定量のほか、定量精度を上げるために、色情報はRGBまたはL\*a\*b\*の数値を使って算出したところ、定量性は高かった。

#### 2) イムノケミカルマルチセンシングチップの開発

一つの紙基板上で化学センシングおよび生化学センシングを同時に行えるイムノケミカルセンシングペーパーを開発し、評価した。用いた試料は、ヒトIgGとマウスIgGを共に含むpH6.0とpH9.0の溶液、およびヒトIgGとマウスIgGのどちらかしか含まないpH6.0の溶液の計4種類である。いずれもIgGを含

む場合に限り、明瞭な色が観察された。また、同時に測定されたpHは、pH6.0とpH9.0それぞれに対応する色変化を示した。これにより、一台のインクジェットプリンタで簡便に多項目測定ができる汎用性の高いイムノケミカルマルチセンシングペーパーが作製可能であることを実証した。

### 3) 多項目水質センシングチップの開発

一つの紙基板上で同時に多項目の化学センシングを行えるマルチセンシングチップを作製し、評価を行った。評価用に滴下した試料は、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{F}^-$ 、pHの7種類に対して、それぞれpH： $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ：1 mM、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ ：10 mM、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ：1 mM、 $\text{CaCl}_2$ ：100 mM、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ：1 mM、 $\text{NaF}$ ：10 mM、pH=5.2であり、それぞれの測定試料の色変化を目視で確認できた。

### 4) ヒ素センシングペーパーの開発

還元剤で水素化ヒ素(アルシingas、 $\text{AsH}_3$ )を発生させ、ろ紙に含ませておいた塩化金(Ⅲ)( $\text{AuCl}_3$ )を還元して、発色する色変化を測定した。ヒ素を含む試料の色変化を目視で確認したところ、目視での検出下限はおよそ1mg/Lであった。ヒ素が含まれない試料でもわずかな色変化が観察されたため、デジタルカラーアナリシス(DCA)を用いてろ紙の色変化の評価を行った。CIE  $L^*a^*b^*$ を利用し、色変化を解析したところ、 $L^*$ の値とAs(Ⅲ)の濃度の関係では、検出下限は約0.1mg/Lで、目視での判断より高感度でヒ素を検出できた。

## 5. 本研究により得られた主な成果

### (1) 科学的意義

- 1) 環境中の水質検査チップにおける検査試薬としてのポリマーナノ粒子状化学センシングインクを数種開発できた。
- 2) 安価で高性能の水質検査チップのマイクロ流路を、市販のインクジェットプリンタで、有機溶媒を用いずに作製する方法が確立できた(紫外線硬化インクが開発された)。
- 3) 金コア・ユウロピウム錯体内包シリカシェル複合体の設計と合成を行い、新規高感度ラベル化剤が開発できた。その有用性を確かめたところ、極めて高感度な測定が可能であるとされる化学発光ELISAよりも高感度で測定が行えることが確かめられた。
- 4) マルチセンシングチップとして、一度にケミカルセンシング(色変化のケミカルセンサー)とバイオセンシング(ラテラルフローイムノセンサー)の多項目の同時センシングが可能な安価な紙ベースのセンサーが作製できた。
- 5) 目視およびスキャナーを用いたデジタルカラーアナリシスにより、定量が可能な水質検査センサーが1台のインクジェットプリンタにより作製できることを実証した。

### (2) 環境政策への貢献

研究結果は、ペーパーを用いる安価なマイクロ流体センサーデバイスの大量生産を可能にする。また、このような安価なセンサーデバイスを用いることで、その場で簡便に水質検査や排水検査を行うことが可能になるため、グローバルな利用が期待できる。

## 6. 研究成果の主な発表状況

### (1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) K. Abe, K. Kotera, K. Suzuki, D. Citterio: Anal. Bioanal. Chem., 398, 885–893 (2010).  
“Inkjet-printed paperfluidic immuno-chemical sensing device”
- 2) D. Citterio, K. Maejima, K. Suzuki: Proc. MicroTAS 2011, 2099–2101 (2011).  
“VOC-free inkjet patterning method for the fabrication of paperfluidic sensing devices”

### (2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) D. Citterio, K. Abe, K. Kotera, Y. Kameoka, T. Ii, and K. Suzuki: Pittcon 2010, Orlando, USA, 2010.  
“Chemical sensors and immunosensors fabricated by inkjet printing”
- 2) D. Citterio, K. Suzuki: Pacificchem 2010, Honolulu, USA, 2010.  
“Chemical sensors and immunosensors fabricated by inkjet printing”
- 3) D. Citterio, K. Abe, T. Ii, K. Kotera, Y. Katayama, S. Imoto, K. Maejima, K. Suzuki: Pittcon 2011,

- Atlanta, USA, 2011. (招待講演)  
 “Nanoparticle-based (bio)chemical sensing inks for inkjet printed paperfluidic devices”
- 4) 前島健人・伊井智明・鈴木孝治・Citterio Daniel: 日本化学会第91春季年会、神奈川県横浜キャンパス、2011.  
 「UVインクを用いた紙ベースマイクロ流体チップの作製」
- 5) D. Citterio, K. Abe, T. Ii, K. Kotera, Y. Kameoka, Y. Katayama, K. Maejima, S. Imoto, A. Morita, K. Suzuki:  
 International Conference on Analytical Sciences (ICAS), Kyoto, Japan, 2011. (招待講演)  
 “(Bio)chemical sensing inks and inkjet printers: an approach to low-cost (bio)chemical sensors”
- 6) D. Citterio, K. Maejima, K. Suzuki: MicroTAS, Seattle, USA, 2011.  
 “VOC-free inkjet patterning method for the fabrication of paperfluidic sensing devices”
- 7) D. Citterio: Society for Chemistry and Micro-Nano Systems (CHEMINAS), Osaka, Japan, 2011.  
 (招待講演)  
 “Inkjet printing and paper: a different approach to microfluidic devices”
- 8) D. Citterio: 産総研第6回ナノバイオデバイスワークショップ, つくば, 2012. (招待講演)  
 “Inkjet-printed microfluidic devices made from paper”
- 9) D. Citterio, K. Maejima, B. Guirao, N. Komuro, S. Imoto, Y. Katayama, K. Suzuki: Pittcon 2012, Orlando, USA, 2012.  
 “Inkjet printing for simple and rapid fabrication of microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs)”
- 10) D. Citterio: 電気化学会第79回大会、第53回化学センサー研究発表会、浜松、2012. (招待講演)  
 “Microfluidic paper-based analytical devices (microPADS) fabricated by inkjet printing technology.”
- 11) D. Citterio: Asia-Pacific Conference on Analytical Sciences, Manila, Philippines, 2012. (招待講演)  
 “Inkjet printing: a versatile approach to low-cost microfluidic (bio)chemical sensors”

## 7. 研究者略歴

課題代表者: チツテリオ ダニエル

1967年生まれ。スイス連邦工科大学(ETH)大学院薬学部博士課程修了、自然科学工学博士。  
 神奈川科学技術アカデミー研究員などを経て、現在慶應義塾大学理工学部准教授。

研究参画者

(1): チツテリオ ダニエル (同上)

(2)1): 鈴木 孝治

1954年生まれ。慶應義塾大学大学院工学研究科博士課程修了、工学博士。

慶應義塾大学理工学部助手、スイス連邦工科大学(ETH)客員教授、慶應義塾大学理工学部助教授を経て、現在慶應義塾大学理工学部教授。



**B-0912 化学センシングナノ粒子創製による簡易型オールプリント水質検査チップの開発**

<研究代表者>

慶應義塾大学工学部            チッテリオ   ダニエル

<研究協力者>

慶應義塾大学工学部            鈴木孝治

平成21～23年度累計予算額：81,200千円

(うち、平成23年度予算額：26,100千円)

予算額は、間接経費を含む。

**[要旨]** 本研究の目的は、グローバルに使用可能な紙ベースの水質センシングチップを、インクジェットプリント技術を用いて開発した。インクジェットプリンタのインクとしての利用を考慮し、ポリスチレンからなる疎水性コア、ポリビニルピロリドンからなる親水性シェルを持つ200ナノメートル径のコアシェル型粒子に、分析試薬を内包し、センシングインクを開発した。さらに、光リビングラジカル重合により、機能性高分子鎖を持った高分子微粒子である“ヘア粒子”を作製し、この粒子に検査試薬を共有結合により固定化することで新規ケミカルセンシングインクを開発した。作製したヘア粒子は、このコアシェル型粒子に比べ、ヘアが柔軟性を持っており分析対象が検査試薬と反応しやすく、また検査試薬が粒子表面に露出しているため色変化が見やすいことなどから、大幅に検出感度を向上させることができた。その例としては、グリース反応により亜硝酸イオンに対して色変化を示す検査試薬をヘア部分に固定化し、それを用いて亜硝酸イオンの定量が可能なセンシングペーパーを開発した。

紫外線を照射し、硬化するインク（UVインク）を用いて、オフィス用インクジェットプリンタを利用し、紙基板上に微細な流路を作成する方法を確立した。インクジェットプリンタで吐出可能な特性を持ったUVインクを作製し、そのインクをインクジェットプリンタで吐出し紙基板上にパターンを描き、UVを照射しインクを硬化させ、微細な流路を作製する技術を確立した。この方法を利用することによって、環境に悪影響を与えず、センサーチップ作製の全行程をインクジェットプリンタ1台で作ることが可能になる。

開発したナノ粒子センシングインクを用いて、ペーパーベースマイクロ流体デバイス上に複数のセンシング部位をインクジェットプリンタで印刷し、簡易かつ高性能の水質検査チップの作製技術を確立した。

**[キーワード]**

インクジェットプリントセンサー、ポリマーナノ粒子インク、マイクロ流体デバイス、ペーパーイムノクロマトグラフィー、水質検査チップ

## 1. はじめに

水は人間の生活にとって最も重要であり、身近な資源である。そのため、水資源の汚染を抑制・防止することは、環境の改善のための重要な鍵となる。農業用水や飲料水に使われる水の汚染は、人間の健康に重大な影響を与える。このような背景から、水の質と安全性をモニタリングすることは極めて重要である。先進工業国では、水質汚染に伴うリスクが調査されており、汚染の防止や排水の浄化といった対応策が実施されている。水質分析のための高度な研究室レベルの方法が利用できるようになってきており、日々の水質検査に使われている。しかしながら、発展途上国では全く異なる状況に直面している。水質汚染に伴うリスクは知られているが、その防止策に関連する技術や財源が一般化されていない。その結果、世界人口の約61億人の中で、10億人がきれいな水を飲めず、明らかに人間の健康に悪影響を及ぼしている。これまで利用されてきた高度な水質分析法の多くは、空調設備を含めた長期の分析試薬の管理や冷蔵保存が必要な試薬の供給、高度にトレーニングされた人材などを必要としている。このような水質分析法は経済的余裕がなく十分なインフラが確立されていない発展途上国では利用しにくく、特に水の安全性の検査が重要となる現場では利用が難しい。そのため、扱いやすさや測定時間の短さ、安全性と携帯性、そして特にデバイスと試薬の低価格化といった、分析技術の「経済性（安価）・簡便性」が必要となる。そのうえで感度と定量性などの信頼できる分析法が求められる。

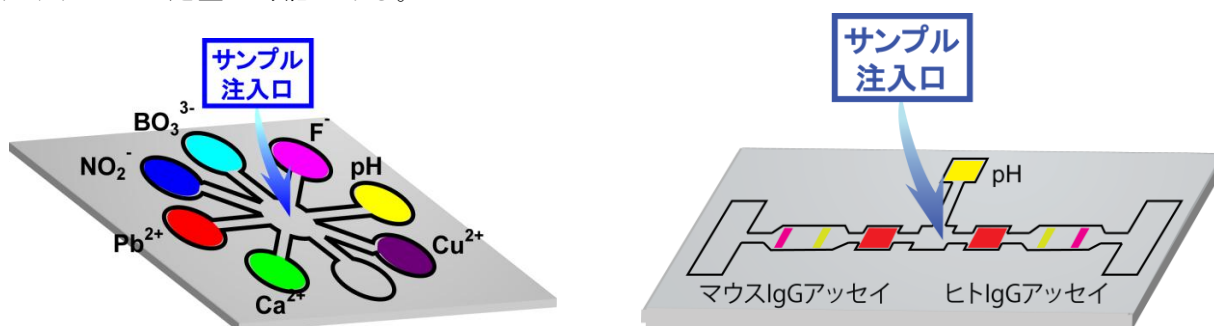
しかしながら、そのような要求を満たす携帯用分析デバイスは、まだ開発されていない。そのため、本研究では環境検査における簡便な水質分析を目的とした、低コストで発展途上国でも使用できるような信頼性の高いセンサーチップの開発を目指している。これにより、実用のための要求に応え、発展途上国での使用を実現できる。

水などのサンプルを分析するマイクロ流体デバイスは小型化や複雑な機能の融合を可能にし、高度な分析ツールを発展途上国に提供できる可能性を秘めている<sup>1)</sup>。様々な化学的機能を有したマイクロ流体デバイスは多項目のセンシングに適したツールとして考えられている<sup>2,3)</sup>。しかしながら、発展途上国で使用する場合には、かなり低価格化する必要がある。紙は利用できる基板の中で最も低コストであり、近年、従来のディップスティック試験紙の性能を超える分析ツールとなり得るとい研究成果が見られるようになってきた。これに関連して、米国ハーバード大のWhitesidesらの研究グループは、簡易的バイオアッセイを目的としてフォトリソグラフィーによりパターン形成された紙のマイクロ流体化学センサーデバイスを開発している<sup>4,5)</sup>。ディップスティック型試験紙と比較して、マイクロ流体チャンネルが形成された紙を使えば、微量なサンプルで多項目を同時に測定することができ、そのため高価な試薬の使用量も少なく抑えることができる。一方、このデバイスでは基板に使う材料が低コストであっても、マイクロ流体デバイスを大量生産する方法が低コストでなければ、十分ではないという欠点がある。そこで本研究では、チャンネルが形成された紙を使って水質分析をするために必要となる化学試薬を同時に使用することができる技術として、フレキシブルかつ精度の高いインクジェットプリント技術が適していると考えている。これまでに我々は、オランダ・アイントホーフ工大のSchubertら<sup>6)</sup>の研究グループが提案した「インクジェットポリマーエッチング」を利用することで、インクジェットプリント技術で紙にマイクロ流体パターンを形成できることを確認している<sup>7)</sup>。本研究では、試薬の印刷とパターンの形成を組み合わせることで、マイクロ流体化学センサーデバイスの全ての製造プロセスにインクジェットプリント技術を適用させた「オールプリント化学センサーデバイ

ス」を開発し、今まで他の技術では成しえなかったフレキシビリティ（様々な化学センサーが作製可能）と低コスト化を実現する<sup>7)</sup>。

## 2. 研究開発目的

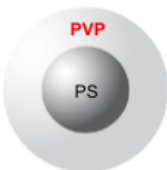
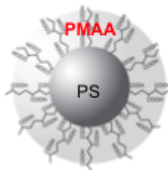
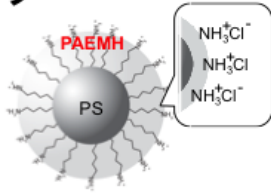
本研究の目的はグローバルに使用可能な紙ベースの水質センシングチップ（オールプリントケミカル、バイオセンサーデバイス）（図(1)-1）を、インクジェットプリント技術を用いて開発することである。インクジェットプリント技術の利点と低コスト紙基板の使用により、作製されるセンサーは発展途上国のみならず、先進国における一般家庭などでも利用可能である。このセンサーの実現により、安価かつ簡便迅速に水サンプルの多項目同時定量をすることができる。作製されるセンサーは、色変化あるいは発色を判定するものであり、目視あるいは安価なカラーアナライザーでの定量が可能である。



図(1)-1 オールプリントセンサーデバイス

この研究においては、バイオセンシングもしくはケミカルセンシングをするために、インクジェットプリンタを用いて紙基板上に印刷する、インクの作製が主題となる。ケミカルセンシングは、図(1)-2のような構造をもつポリマーナノ粒子に機能性試薬を固定化したものを作製し、インクとして利用することで行う。

## 機能性ポリマーナノ粒子インク

		
<p>poly(vinylpyrrolidone) 疎水性コア 親水性シェル 粒径: 250 nm</p>	<p>poly(methacrylic acid) カルボン酸官能基 粒径: 275 nm</p>	<p>poly(aminoethyl methacrylate) 正電荷表面 粒径: 180 nm</p>
<p>疎水性指示薬 物理的内包 pH, Pb<sup>2+</sup> 等</p>	<p>アミノ官能基を持つ指示薬 共有結合 NO<sub>2</sub><sup>2-</sup></p>	<p>スルホン酸基を持つ 水溶性指示薬 電荷相互作用 Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 等</p>

図(1)-2 作製した機能性ポリマーナノ粒子インク

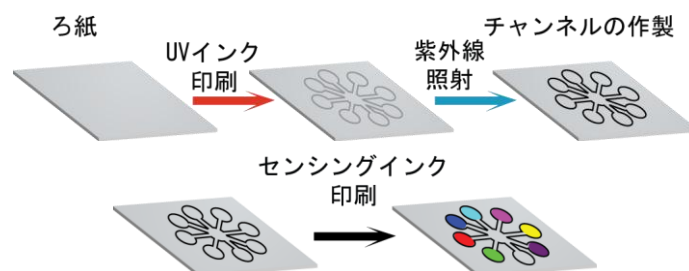
また、バイオセンシングインクは、ラテラルフローイムノアッセイにおいて、農薬や殺虫剤などの検査対象を分析できるインクを作製する。作製したそれぞれのインクは紙基板上にインクジェットプリントにより印刷し、固定化することで、紙上にセンシングを行う場を提供する。この時、あらかじめ分析に必要な化学物質は全て紙基板に印刷し、固定化することで追加試薬を加えることなく、試料を滴下するだけの簡便さで分析を行うことができる。

具体的には3年間で、以下の3項目の研究から、図(1)-1に示すような紙ベースの水質センシングチップの完成を目指した。

(1) ポリマーナノ粒子を用いた化学的および生化学的に応答するインクジェットプリント用センシングインクの開発：

水の汚染の原因としては有機物、重金属、細菌など多様な物質が挙げられる。したがって水質検査において、その水が安全かどうかを調べるためには、さまざまな物質を検出する必要がある。このため、マルチセンシングを行うことのできるセンシングインクを開発する。

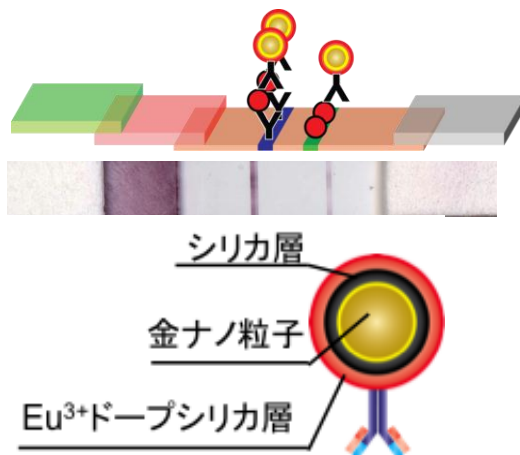
(2) 水質多検体モニタリングのための“オールインクジェットプリント技術による”ケミカルセンシングペーパーの作製：



図(1)-3 オールインクジェットプリントケミカルセンシングペーパーの作製法

多項目の水質検査を定量的に行える、インクジェットプリント技術を用いたマイクロ流体ケミカルセンシングペーパーの作製を行う。この場合、紫外線硬化樹脂をインクとして利用することにより、紙基板上にさまざまなマイクロ流路パターンを作製し、さらにセンシングインクを流路内の最適な部分にプリントすることで、図(1)-3に示すような方法からセンサーデバイスを作製する。

一方、免疫センサーについては、これまでにインクジェットプリント技術を用いて、一枚のろ紙上に流路を作製、試薬を固定化し、シングルパッドでラテラルフローイムノアッセイを行える技術を開発してきた<sup>8)</sup>。しかしながら、その検出感度には未だ課題が残り、水中に微量存在する農薬や細菌などを測定するためには感度が不足している。そこで、イムノアッセイに利用するラベル化剤の改良という観点から、感度の向上を目指す。そこで、高感度かつラテラルフローイムノアッセイに応用可能なラベル化剤として、蛍光色素内包シリカナノ粒子が着目されているが、図(1)-4に示すような金ナノ粒子をコアとして、ユーロピウム蛍光材料をシリカシェルに使った新規高輝度蛍光・吸光ラベル化剤の開発を行い、簡便かつ高感度の免疫センサーを作製する。



図(1)-4 金ナノ粒子コアとユーロピウム蛍光材料内包シリカシェルから成る新規高輝度蛍光・吸光ラベル化剤

(3) 環境検査のための安価な水質検査トータルシステムの開発：

水質検査項目に従った多項目同時定量が可能なマルチセンシングチップを作製する。これにより、安価かつ簡便、迅速な測定が可能な紙基板水質センシングチップを作製する。また、センサー応答からの定量性の確保のため、色情報分析法としてのデジタルカラーアナリシスの適応化と最適化の検討を行い、安価かつ高性能な定量分析システムを構築する。図(1)-5に、本研究の水質センシングチップ開発のまとめ図を示す。



図(1)-5 本研究の水質センシングチップ開発のまとめ図

### 3. 研究開発方法

(1) ポリマーナノ粒子を用いた化学的および生化学的に応答するインクジェットプリント用センシングインクの開発

#### 1) pHセンシングインクの作製 (コア・シェルナノ粒子)

本研究ではpHセンシングのためのインクとして、ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルを持つコアシェル粒子にプロモチモールブルー (BTB)、チモールブルー (TB)、メチルレッド (MR) をそれぞれ別々に内包させたものを開発した。その際、チモールブルーとプロモチモールブルーは、アルキル鎖をつけることによって疎水性を大きくし、ポリ(1-ビニルピロリドン)のシェル内に内包させた。また、メチルレッドはそのままシェルに内包させた。

##### a. BTBのナノ粒子への含有

BTBへのアルキル鎖の導入

- ① BTB-Na (147.85 mg, 0.229 mmol, 1 eq)とトリメチルステアリルアンモニウムクロリド (79.51 mg, 0.228 mmol, 1eq)をmilli-Qに溶解した。
- ② ①の溶液を、連続抽出装置を用いて終夜でクロロホルム層へ抽出した。
- ③ 翌日、クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、乾燥剤をろ別した。クロロホルムを減圧除去し、さらに真空ポンプで乾燥させた。収量136.6 mg、収率64.0 %で得られた。

アルキル鎖を導入したBTBを含むナノ粒子の作製

- ② □ アルキル化したBTB 17.7 mgをエタノール 20 mLに溶解した。
- ② ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルを持つコアシェル粒子 (38% w/w、水中粒径245 nm)エマルジョン1.05 g、milli-Q 40 mL、ethanol 80 mLを300 mLナスフラスコに取って攪拌し、(1)を徐々に滴下した。
- ③ エタノールおよび水を減圧除去し、得られた濃縮液にmilli-Qを加えて10 gとした。
- ④ ③で得られた分散液100  $\mu$ Lをマイクロチューブに取り、マイクロチューブ用遠心分離機でフィルターを用いて遠心分離(RCF=10,000、Time=30 min)した。

## b. TBのナノ粒子への含有

## TBへのアルキル鎖の導入

- ① TB-Na (49.12 mg, 0.101 mmol, 1 eq) とトリドデシルメチルアンモニウムクロリド (58.24 mg, 0.102 mmol, 1 eq) をmilli-Qに溶解した。
- ② ①の溶液を、分液漏斗を用いて3回抽出を行い、クロロホルム層を取り出した。
- ③ 得られたクロロホルム層に飽和塩化ナトリウム水溶液を加えてもう一度抽出した。
- ④ 無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、乾燥剤をろ別した。クロロホルムを減圧除去し、さらに真空ポンプで乾燥させた。収量92.5 mg、収率67.6 %で得られた。

## アルキル鎖を導入したTBを含むナノ粒子の作製

- ① アルキル化したTB 18.63 mgをエタノール 20 mLに溶解した。
- ② ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルを持つコアシェル粒子 (38% w/w) エマルジョン 1.05 g、milli-Q 40 mL、ethanol 80 mLを300 mLナスフラスコに取って攪拌し、(1)を徐々に滴下した。
- ③ エタノールおよび水を減圧除去し、得られた濃縮液にmilli-Qを加えて10 gとした。
- ④ ③で得られた分散液100  $\mu$ Lをマイクロチューブに取り、マイクロチューブ用遠心分離機でフィルターを用いて遠心分離(RCF=10,000、Time=30min)した。

## c. MRのナノ粒子への含有

MRは前二者に比べて脂溶性が高く、MRナトリウム塩が有機層に溶解してしまうため、アルキルの無い状態でナノ粒子に内包させた。

- ① MR 8.1 mgをエタノール 20 mLに溶解した。
- ② ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルを持つコアシェル粒子 (38% w/w) エマルジョン 1.05 g、milli-Q 40 mL、エタノール 80 mLを300 mLナスフラスコに取って攪拌し、(1)を徐々に滴下した。
- ③ エタノールおよび水を減圧除去し、得られた濃縮液にmilli-Qを加えて10 gとした。
- ④ 減圧除去の過程で(3)から、ナノ粒子に収まりきらなかったMRの沈殿物が生成した。これらを1.2  $\mu$ mシリンジフィルターで取り除いた。

- ⑤ ④100  $\mu\text{L}$ をマイクロチューブに取り、マイクロチューブ用遠心分離機でフィルターを用いて遠心分離(RCF=10,000、Time=30 min)した。

d. pHセンシングインクの調整

- ① a節、b節、c節で作製した分散液を、BTB : TB : MR=120 : 60 : 240 ( $\mu\text{L}$ )の割合で混合した。
- ② インクのpH応答性を明確にするため、①の分散液 : 0.1M NaOH溶液=420 : 12.6 ( $\mu\text{L}$ )で混合した。
- ③ ②のインク : グリセリン : milli-Q=432.6 : 200 : 1367.4 ( $\mu\text{L}$ )の割合で混合し、粒子の固形分率が1%(w/w)になるように調整した。また、グリセリンは粘度調整のために加えた。

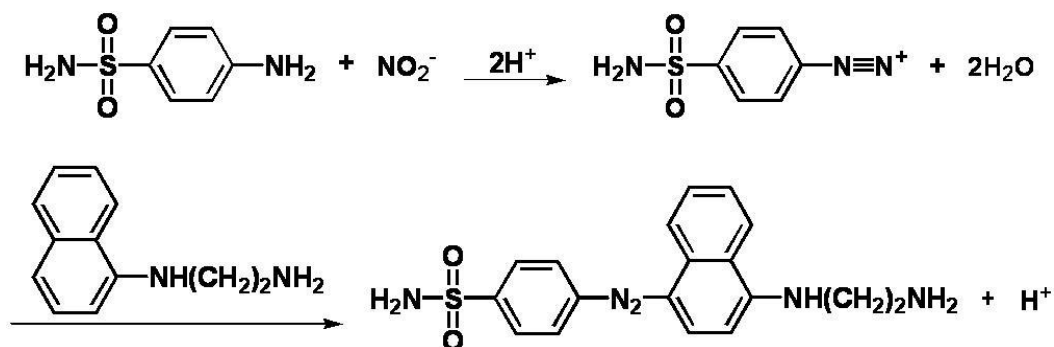
2) 亜硝酸イオン( $\text{NO}_2^-$ )センシングインクの作製 (コア・シェルナノ粒子、ヘアナノ粒子)

本研究では、高分子微粒子ベース (ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルポリマー粒子とヘア粒子) のセンシングインクを開発した。このようなセンシングインクを用いることで、検査試薬の安定性の向上やセンシングエリアの色ムラの改善、使用するインク量の少量化などを行える。なお、本研究では、高分子微粒子ベースのセンシングインクの一例として亜硝酸イオンセンシングインクを開発した。

a. 亜硝酸イオン分析メカニズム

本研究では、亜硝酸イオンの分析に最もよく用いられているグリース反応 (Griess Reaction) を採用することとした (図(1)-6)。亜硝酸イオンの存在下でSulfanilamideは亜硝酸イオンと結合し、さらにその化合物と*N*-1-naphthylethylenediamine (*N*-1-ナフチルエチレンジアミン)

(NEDA) が結合することで、540 nm付近に吸収をもつ化合物を生成する。その吸収の強さで亜硝酸イオンを定量する。



図(1)-6 亜硝酸イオン定量メカニズム

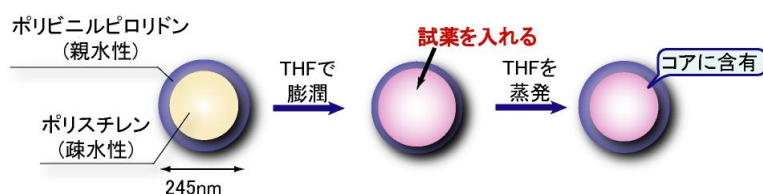


## b. ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルポリマー粒子

グリース反応を用いた亜硝酸イオンの比色分析を目的とし、この反応で用いられる検査試薬（N-1-ナフチルエチレンジアミン）のポリマーナノ粒子への内包を行った。まず、N-1-ナフチルエチレンジアミンを1-ブロモオクタデカンにより、アルキル化させた。

Ar気流下、NEDA 25.1 mg (0.097 mmol)、炭酸セシウム127.1 mg (0.390 mmol)、1-ブロモオクタデカン73.8 mg (0.221 mmol)をDMF 5 mLに溶かし、150 °Cにて2時間加熱還流を行った。冷却後、減圧乾燥し、クロロホルム/ヘキサン= 2/1にてシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーを行い、分離精製し、16.9 mg (収率25.2%)を得た。

アルキル化により疎水化させたN-1-ナフチル-N,N-ジオクタデシルエチレンジアミンをナノ粒子に内包させる手順は以下の通りである<sup>9)</sup> (図(1)-7)。ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルを持つコアシェル粒子をTHFと水の混合溶媒に加える。この時、疎水性であるポリスチレンコアが膨潤する。疎水化させた検査試薬をTHFに溶解させ、これをナノ粒子の分散液に滴下し、加えることで、膨潤したナノ粒子のコアに検査試薬が導入される。最後にTHFを減圧によって除去すると、THFによって膨潤していたコアは元の状態に戻り、検査試薬はナノ粒子に内包される。このよう作製した、検査試薬を内包したナノ粒子の分散液である、ナノ粒子インクを以下ではN-1インクと表記する。



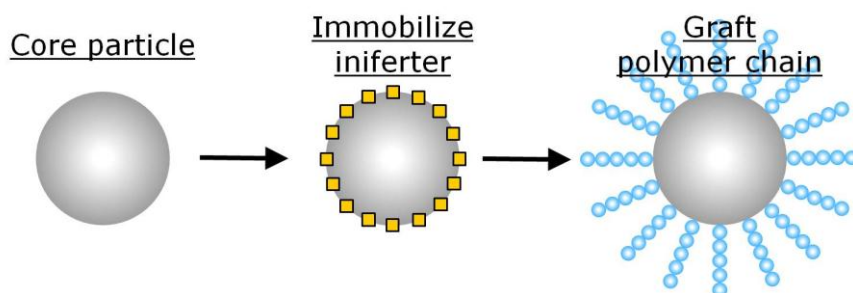
図(1)-7 コアシェルポリマー粒子の疎水性コアへの試薬

また、検査試薬のナノ粒子への内包の効果を調べるため、N-1-ナフチルエチレンジアミンをそのままクエン酸水溶液に溶解させたインクを作製し(N-1bインク)、比較を行った。

さらに、グリース反応に必要な検査試薬であるスルファニルアミドをクエン酸水溶液に溶解させたインクも作製した(N-2インク)。

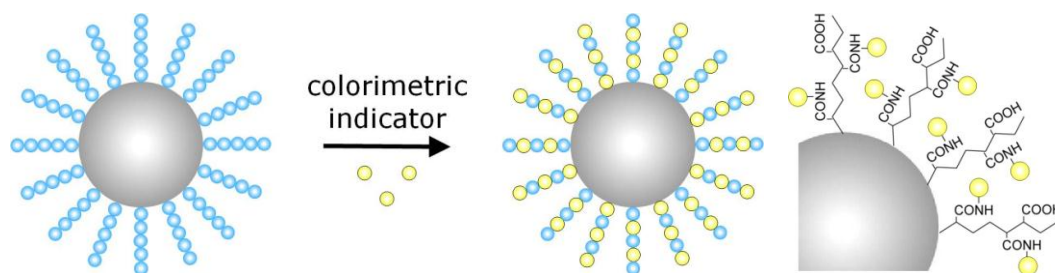
## c. ヘア粒子

Kawaguchiらは、graft-from法によって微粒子表面から温度応答性ポリマーであるpoly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) をグラフトし、粒子表面にブラシ状のシェルを持つ“ヘア粒子”を創製した<sup>10)-13)</sup> (図(1)-8)。



図(1)-8 ヘア粒子の作製

この粒子のヘア鎖は髪の毛のように1本1本独立しており、通常のコア/シェル粒子における架橋されたシェルよりも高感度な環境応答性を示すことが明らかになっている。また、ヘア鎖の重合方法に、リビングラジカルグラフト重合を適用することによって、グラフト鎖の構造設計が可能になり、複数の機能を併せ持った機能性微粒子としてその有用性が認められている。



図(1)-9 ヘア粒子を用いたケミカルセンシングインクの作製

本研究では図(1)-9のようにヘア粒子のヘア鎖に検査試薬を共有結合させ、固定化させることで、ケミカルセンシングインクを作製した。

この方法の利点として、

- 1) 検査試薬をそのまま固定化させることができる（疎水化などの必要がない）
  - 2) 検査試薬が粒子の表面に固定化されている  
⇒呈色が粒子表面でおこるため、目視で確認しやすい
  - 3) ヘア鎖は架橋されておらず、柔軟性を持っている  
⇒サンプルが検査試薬に届きやすい
  - 4) 有機溶媒が不要  
⇒酵素や抗体などの生体分子の固定化が可能
- などが挙げられる。

グリース反応を用いた亜硝酸イオンの比色分析を目的とし、この反応で用いられる検査試薬（N-1-ナフチルエチレンジアミン）の“ヘア粒子”への固定化を行った。

ヘア粒子インクの作製は、i. コア粒子の作製、ii. 光iniferter基の導入、iii. ヘア鎖の導入、iv. 試薬の固定化という4ステップからなる（図(1)-8,9）。以下、ステップごとに詳細を述べる。

## i. コア粒子の作製(SV粒子)

コア粒子となるSt (styrene) -VBC (4-vinylbenzylchloride) 共重合体微粒子 (SV粒子) は potassium persulfate (KPS) を開始剤とする乳化重合法によって作製した。

攪拌棒、冷却管、セラムラバー、攪拌シールを取り付けた200 mL四つ口丸底フラスコに、モノマーとしてstyrene (St)、4-vinylbenzylchloride (VBC)、必要に応じて界面活性剤としてsodium dodecyl sulfate (SDS)、溶媒として水を入れ、70 °Cで300 r. p. m. にて攪拌した。所定温度の恒温槽中で30 分間窒素置換を行ったのち、開始剤を水に溶解させたものを注射器で系内に添加した。その後、さらに30 分間窒素置換を行い、重合反応を24 時間行った。重合終了後の粒子分散液は13500 r. p. m.、10~25 min (粒子径により異なる)、15 °Cの条件で遠心分離を行い、上澄みをデカンテーションにより除去した後、下層の粒子を水で再分散させる操作を4 回繰り返して精製した。得られた粒子分散液は遮光し、4 °Cで保存した。

## ii. 光iniferter基の導入(SVDC粒子)

グラフト重合の開始点となるN,N-diethyldithiocarbamate (DC) 基を微粒子表面に導入するため、SV粒子のクロロメチル基をsodium N,N-diethyldithiocarbamate trihydrate (NaDC) と置換させる改質反応を行った。

200 mL三つ口丸底フラスコにSV粒子を固形分で2.0 g入れ、全量が70 gとなるように水を加えた。この反応容器に攪拌棒、攪拌シールを取り付け氷冷下200 r. p. m. で攪拌した。NaDC 0.74 gを30 gの水に溶解させ、系内に少しずつ加えた。その後、室温にて24 時間反応させた後、13500 r. p. m.、10~25 min (粒子径により異なる)、15 °Cの条件で遠心精製を4 回行った。このようにして、表面にリビングラジカル重合の開始点であるiniferter基を有するSVDC粒子を得た。得られた粒子分散液は遮光し、4 °Cで保存した。

## iii. ヘア鎖の導入 (SVM粒子)

表面にiniferter基を有するSVDC粒子を用いて、UV照射によるリビングラジカル重合によって methacrylic acid (MAA) をグラフト導入した。

専用の反応容器にSVDC粒子を固形分で0.5 g、MAA を2.0 g入れ、全量が400 gとなるように水を加えた。反応容器にUVランプ、リービヒ冷却管、セラムラバーを取り付け、スターラー攪拌下にて30 分間窒素置換を行った。使用したUV装置は内部照射型であり、反応容器中心部からUVを放射するため、効率的な光反応が可能である。

窒素雰囲気下、室温にて400 Wの高圧UVランプで所定時間UV照射をした。重合中は光源から熱が放出されるため、水銀ランプ周囲に冷却水を流して系内の温度を一定に保った。重合後の粒子分散液は13500 r. p. m.、25~30 min (粒子径により異なる)、15 °Cの条件下で遠心精製を4 回行った。この粒子をSVM粒子とした。得られた粒子分散液は遮光し、4 °Cで保存した。

## iv. ヘア粒子への亜硝酸イオン検査試薬の固定化（NEDA固定化粒子～SVMN粒子）

ヘア鎖が持つカルボキシル基と検査試薬の持つアミノ基との縮合反応を用いて、ケミカルセンシングインクの作製を行った。

- ① 粒子の分散液を凍結乾燥し、溶媒を完全に除去した。その後、10 mg/mLになるようにpH 6.8 リン酸バッファーを加えた。
- ② EDC  $1.5 \times 10^{-2}$  M溶液、NHS  $3.75 \times 10^{-3}$  M溶液、NEDA  $3.0 \times 10^{-3}$  M溶液をpH 6.8 リン酸バッファーを用いて作製した。
- ③ SVM分散液1 mL、EDC溶液2 mL、NHS溶液2 mL、NEDA溶液10mLを混合し、4 h攪拌した。
- ④ 反応後の粒子分散液は13200 r. p. m.、10～25 min、20 °Cの条件下で遠心精製を6 回行った。得られた粒子をSVMN粒子とし、粒子分散液を亜硝酸イオンセンシングインクとした。得られたセンシングインクは遮光し、4 °Cで保存した。

また、ヘア粒子の有効性を調べるために、アシェル型のナノ粒子に分析試薬を内包したインクとの比較を行った。具体的には、ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルをもつコアシェル粒子に、アルキル化により疎水化させたN-1-ナフチル-N,N-ジオクタデシルエチレンジアミンを内包させたインクを作製した。

- ① アルキル化したN-1-ナフチルエチレンジアミン 12.0 mgをTHF 40 mLに溶解させた。
- ② ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルを持つコアシェル粒子(38% w/w) エマルション1051.9 mg、水100 mL、THF 60 mLを300 mLナスフラスコに取り、攪拌した。ここに①を徐々に滴下した。
- ③ エバポレーターでTHFおよび水を減圧除去した。得られた濃縮液を水でメスアップして10 mLとした。これを亜硝酸イオンセンシングインクとする。得られたセンシングインクは遮光し、4 °Cで保存した。

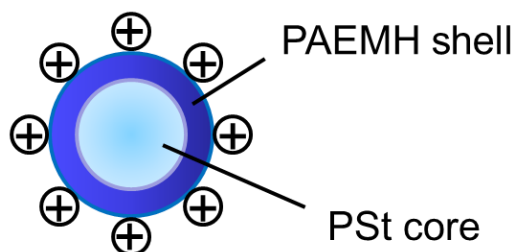
## 3) マルチセンシングインクの作製（イオン交換型コア・シェルナノ粒子）

本研究では、イオン交換法を利用することで、様々な色素の固定化が可能な汎用性の高いナノ粒子インクを開発した。これにより、より簡便にマルチセンシングチップを作製できる。

## a. イオン交換法を利用した色素の固定化が可能なポリマーナノ粒子

本研究において開発する粒子は、コア層に疎水的なpolystyrene (PSt)、シェル層に親水的でカチオン性のpoly(2-aminoethyl methacrylate hydrochloride) (PAEMH)を持つコアシェル型の形状

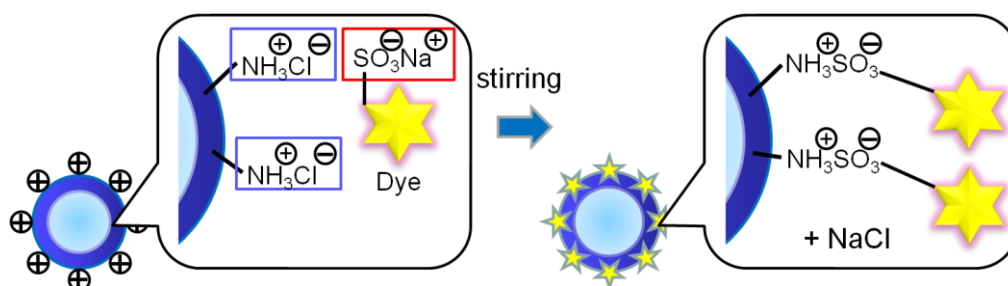
である。作製された粒子は表面に正電荷を持つため、粒子間に静電斥力が生じている。このため、分散安定性が高い粒子となる。また、作製にミニエマルジョン重合を用いることで小さい粒径に制御することができ、インクジェット応用に適した基盤技術となる。図(1)-10にその模式図を示す。



図(1)-10 カチオン性コア/シェル粒子の模式図

一般的に比色分析に用いられる色素は、水溶性を向上させるために、スルホン化によって、スルホン酸ナトリウム塩となっている場合が多い。カチオン性シェルは塩化アンモニウム部位を持つため、イオン交換法による多様な色素の固定化が可能となる。

イオン交換法は、ラテックスと色素を混合・攪拌を行うだけで、固定化できるため、非常に簡便かつ迅速に行える修飾法であると言える。図(1)-11にイオン交換法の模式図を示す。



図(1)-11 イオン交換による色素の固定化

また、この修飾方法を用いれば、一つの粒子基盤を用いて、様々な色素を固定化することができる。したがって、マルチセンシングに向けたインクを作製が可能である。

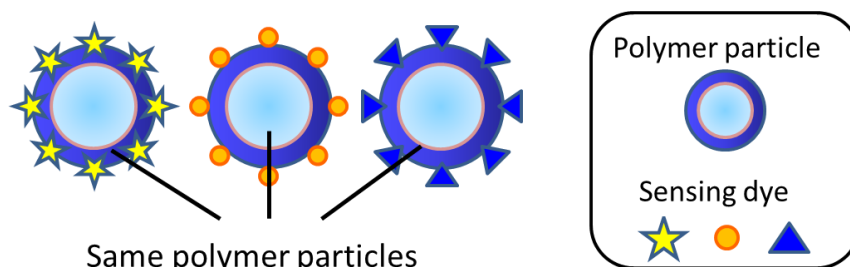
よって、本粒子は多くの色素を固定化でき、マルチセンシングに適した形状である。また、色素が表面に存在するため、発色が見やすくなり、応答を得やすいと言える。カチオン性コアシェル粒子の特徴を以下にまとめ、その模式図を図(1)-12に示す。

#### 作製上の特徴

- 一段階で作製することができる
- イオン交換による粒子への色素の修飾が可能  
⇒混合・攪拌だけで修飾できる。また、有機溶媒を要さず、環境負荷が小さい。
- 幅広く色素を選択することができる

## 構造上の特徴

- 表面に色素が存在している
- 分散安定性が高い

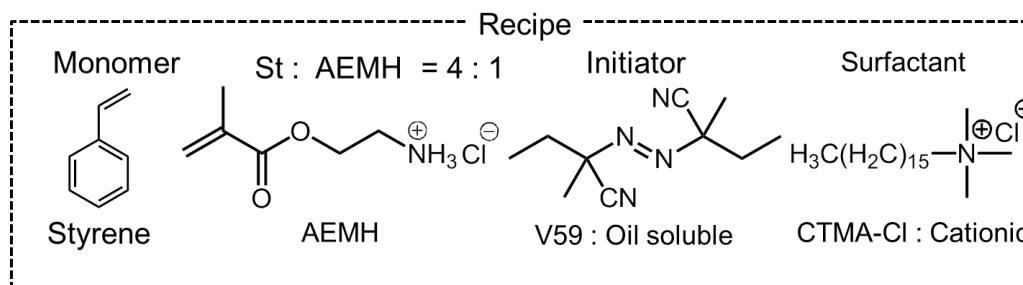


図(1)-12 カチオン性コア/シェル粒子のマルチセンシング能

## b. インク基板粒子の開発 (SA粒子)

カチオン性コア/シェル粒子は、モノマーを2-aminoethyl methacrylate hydrochloride (AEMH)、styrene (St)、界面活性剤CTMA-Cl、開始剤をV-59 とするミニエマルジョン重合法によって作製した。モノマー比はAEMH : St = 1 : 4 (w/w)とした。

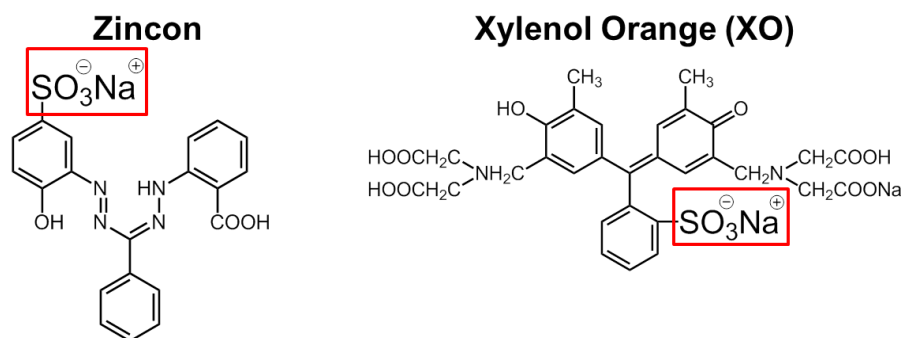
作製した粒子を以後SA粒子とする。図(1)-13にモノマー、界面活性剤、開始剤の構造を示す。そして、透過型電子顕微鏡 (TEM) または動的光散乱法 (DLS) による粒径の測定により、この粒子の形状と粒径の観察を行った。



図(1)-13 SA粒子作製のための試薬

## c. 試薬の固定化

作製した粒子にイオン交換法を用いて色素を固定化した。マイクロチューブに固形分率1 wt%の粒子のラテックスと、0.1 mMとなるように純水で希釈した色素水溶液を1 : 1 (v/v)で混合し、24 h攪拌を行い、センシングインクとした。修飾する色素として、銅イオン検出試薬Zincon、鉛イオン検出試薬Xylenol Orange (XO)を設定した。Zinconを修飾した粒子をSAZ粒子、XOを修飾した粒子をSAX粒子とした。図(1)-14にZinconおよびXOの構造を示す。



図(1)-14 修飾試薬の構造

このSAZ粒子とSAX粒子それぞれを評価した。

#### i. SAZ粒子の評価

まず、限外濾過による色素の固定化度合いの評価を行った。方法として、作製したインクを限外濾過用マイクロチューブに入れ、5500r. p. mで攪拌し、ZinconのpH6.8における吸収波長である464 nmにおけるろ液の吸光度を測定した。また、固定化後の粒子の状態を測定するためにTEMを用いて形状、粒径の変化を測定した。

#### ii. SAX粒子の評価

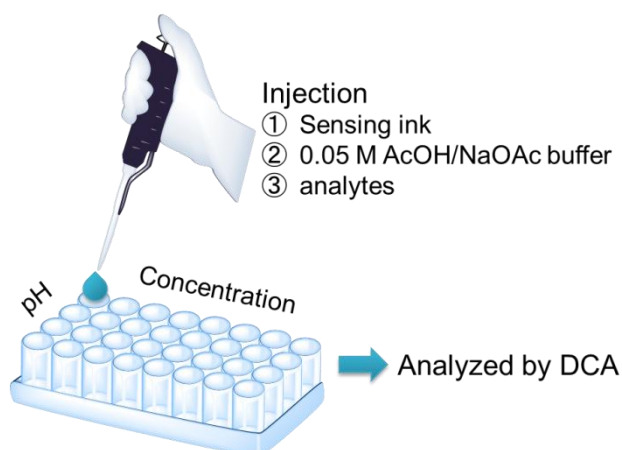
限外濾過による色素の固定化度合いの評価を行った。方法として、作製したインクを限外濾過用マイクロチューブに入れ、5500r. p. mで攪拌し、XOの吸収波長である440 nmにおけるろ液の吸光度を測定した。また、固定化後の粒子の状態を測定するためにTEMおよびDLSを用いて形状、粒径の変化を測定した。

#### d. 溶液系での応答

溶液系において、pHおよび測定対象の濃度を変化させて、測定における至適pHおよびその呈色を確認した。

#### i. SAZ粒子の溶液中での銅イオンセンシング

吸光度測定用のマイクロプレートのウェルに、作製したインクをピペットマンを用いて滴下した。インクに各pHの0.05 M酢酸/酢酸ナトリウムバッファーを加え、各濃度のサンプルを滴下し、よく攪拌した。5 min後の呈色の変化を、スキャナーを用いて画像データとして取り込み、解析した。解析にはDigital Color Analysis (DCA)を用いて色変化を定量的に測定した。図(1)-15に本実験の操作を示す。pHは3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0に振り分け、サンプルの濃度は銅(II)イオン0  $\mu$ M、5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、25  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M、1 mM、10 mMに設定した。



図(1)-15 溶液系での応答の確認

ii. SAX粒子の溶液中での鉛イオンセンシング

吸光度測定用のマイクロプレートのウェルに作製したインクを、ピペットマンを用いて滴下する。インクに各pHの0.05 M酢酸/酢酸ナトリウムバッファーを加え、各濃度のサンプルを滴下し、よく攪拌する。5 min後呈色の変化をスキャナーを用いて画像データとして、取り込み解析する。解析にはDigital Color Analysis(DCA)を用いて色変化を定量的に測定した。図(1)-15に本実験の操作を示す。pHは3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0に振り分け、サンプルの濃度は鉛(II)イオン0 nM、50 nM、500 nM、1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、100  $\mu$ M、1  $\mu$ Mに設定した。

e. 紙基盤上での応答

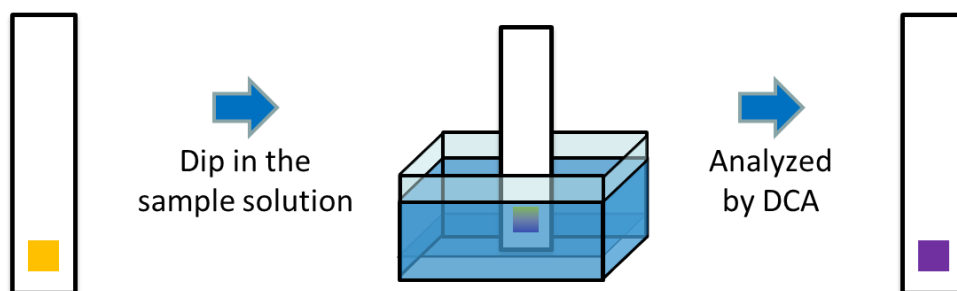
紙基盤上において

i. SAZ粒子の紙基盤上における銅イオンセンシング

ii. SAX粒子の紙基盤上における鉛イオンセンシング

を行った。作製した粒子をインクジェットプリンタにおける適した組成に調整し、インクとする。この際、インク：エチレングリコール=9：1の体積比で混合した。これをセンシングインクとする。センシングインクをカートリッジにシリンジとシリンジ針を用いて注入した。センシングインクを3 mm平方のパターンで15 layersまで重ねて印刷した。作製したチップをサンプル溶液に浸し、インクの呈色の変化をスキャナーを用いて画像データとして、取り出した。このデータを同様に解析した。この実験の概要を図(1)-16に示す。





図(1)-16 紙基盤上での応答

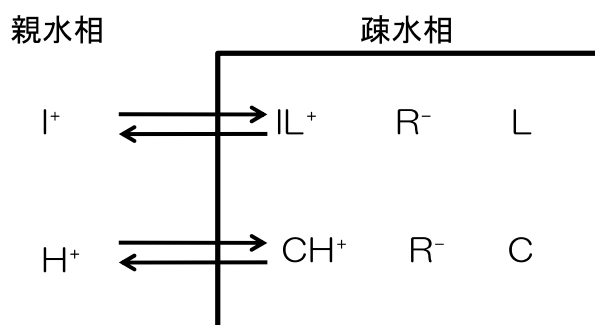
#### 4) 鉛イオンセンシングインクの作製（イオン選択性オプトード型コア・シェルナノ粒子）

本研究では、イオン交換をベースとしたイオン選択性オプトードの原理を用いたセンシングインクを開発した。イオン選択性オプトードの原理を用いることで、目的のイオンと結合する試薬と色変化を生じる試薬を別々に選択することが可能となる。本研究では、鉛イオンのセンシングインクを開発した。

##### a. イオン交換型イオン選択性オプトードの応答機構<sup>14)</sup>

イオン選択性電極の応答は、油水界面での電荷分離による膜電位の寄与に支配される。この原理に基づいて中性イオノフォアをオプトードに応用する際には、イオノフォアのイオン抽出の際に劇的に色変わりするクロモイオノフォアを油相中に存在させる。従ってオプトードの応答は油相に存在する検出素子全体の量に依存する。Simonら<sup>15)</sup>はその検出素子にプロトンの着脱によって色変化するプロトン選択性クロモイオノフォアを用いたオプトードの開発をした。ここではこのオプトードの応答機構と理論式について述べる。

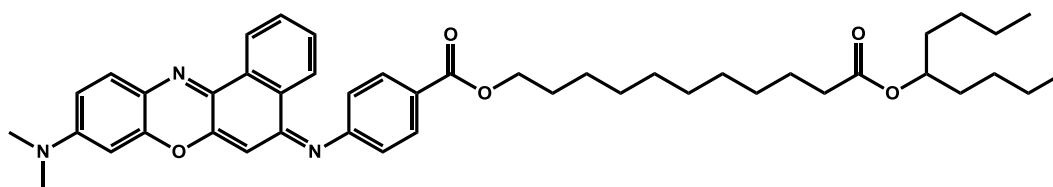
中性イオノフォア (L) とプロトン選択性クロモイオノフォア (C) とアニオン添加剤 ( $R^-$ ) に基づくオプトードの応答機構は図(1)-17に示す通りである。



図(1)-17 イオン交換モデル

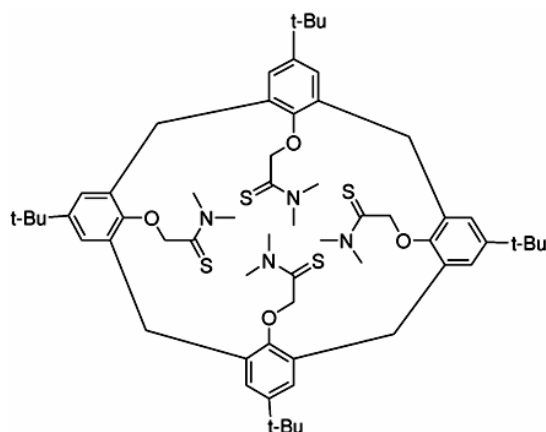
まず、中性イオノフォアと目的カチオン ( $I^+$ ) が錯形成すると同時に、カチオン性色素 ( $CH^+$ ) は脱プロトンし中性となる。イオン-イオノフォア錯体は水相へ分配された脂溶性アニオン添加剤とイオン対を形成し、油相に抽出される。

プロトンの着脱によって吸収スペクトルが変化するクロモイオノフォアとしてETH5418 (図(1)-18) を用いることとする。ETH5418は長いアルキル鎖を有しているため、非常に疎水性が高い物質である。



図(1)-18 ETH5418

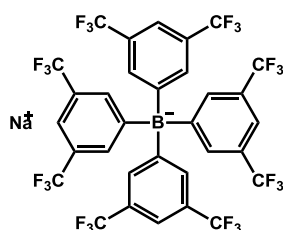
イオノフォアとしてはlead ionophore IV (図(1)-19) を用いる。



図(1)-19 Lead ionophore IV

このイオノフォアは籠の形をしており、その籠の内部に鉛イオンが収まるような形で配位する。このイオノフォアは鉛に対してだけでなく、カドミウムに対しても高い選択性を示してしまう。

アニオン添加剤として用いるNaTFPBの構造を図(1)-20に示す。

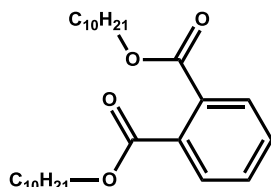


図(1)-20 NaTFPB

## b. イオン交換型イオン選択オプトードポリマーナノ粒子の作製

先行研究ではポリ塩化ビニル粒子を利用してイオン選択オプトードを作製していた<sup>16)</sup>。このポリ塩化ビニル粒子の粒径は13  $\mu\text{m}$ であり、これはインクジェットプリンタを用いて印刷することができる粒径(200~300 nm)をはるかに超えている。そのため、インクジェットプリンタで印刷することができる245 nmのポリスチレン(PSt)コア/ポリビニルピロリドン(PVP)シェル粒子(PSt : PVP = 64 : 36)を利用してセンシングインクを作製した。

クロモイオノフォアETH5418 1.81mg、イオノフォアlead ionophore IV 6.70mg、アニオン添加剤NaTFPB 2.50mg、可塑剤であるDIDP 3.64mg、THF 20mlを混ぜて溶解させ、これをA液とした。ここでDIDPの構造を図(1)-21に示す。



図(1)-21 DIDPの構造

ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルを持つコアシェル粒子(38% w/w)エマルジョンを519.5mg、milli-Q 50ml、THF 30mlをナスフラスコに入れてよく攪拌し、これをB液とした。B液を激しく攪拌し、その上から滴下漏斗を用いて20分以上かけてA液をゆっくり滴下した。

この混合溶液をロータリーエバポレーターにかけTHFを除去した。さらに全重量が10 g (固形分率が約2%)になるまで水を除去した。

(2) 水質多検体モニタリングのための“オールインクジェットプリント技術による”ケミカルセンシングペーパーの作製

本研究では三種類のインクジェットプリンタを使用した。使用したインクジェットプリンタの仕様をTable(1)-1に示す。

Table(1)-1 使用したインクジェットプリンタの仕様

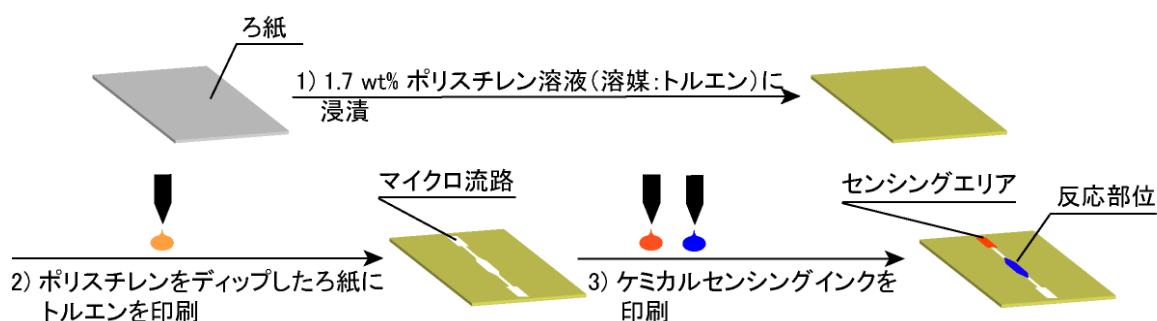
プリンタ	特徴	ノズル	最小吐出量 [pL]
PicoJet-2000 (Microjet)	Inkjet dispensing system (piezo)	Single ink reservoir 1 nozzle / printhead	20-180 (depending on head)
DMP-2831 (Dimatix)	Material inkjet printer (piezo)	Single ink reservoir 16 nozzles / printhead	1-10 (depending on head)
PX-101 (Epson)	Office printer (piezo)	5 ink reservoirs 59-180 nozzles / printhead	3

1) インクジェット技術を用いた亜硝酸イオンセンシングペーパーおよびラテラルフローイムノセンシングペーパーの作製法の開発

本研究では、紙基盤上でのマイクロ流路の作製法<sup>7)</sup>を利用し、亜硝酸イオンセンシングおよびイムノセンシングが同一紙基盤上で行えるセンシングペーパーの開発を行った。

a. 亜硝酸イオンセンシングペーパーの作製

i. 流路の作製



図(1)-22 インクジェットプリンタを用いた亜硝酸イオンセンシングペーパーの作製

センシングを行うためのマイクロ流路を紙基板に作製した。ろ紙 (Filter Paper ADVANTEC 5C) を 1.7 wt% ポリスチレン溶液 (溶媒: トルエン) に 2 時間浸漬させ、室温で乾燥させた。得られた疎水性のポリスチレン包括ペーパーをインクジェットプリンタ (PicoJet-2000) のステージ上に置き、トルエンを吐出することで親水性のパターンを作製した。スポットにつき 10 発のトルエン液滴を、スポット間を  $150 \mu\text{m}$  として吐出することで疎水性ペーパーのポリスチレンを除々に溶解・除去し、本来のろ紙としての親水性部位を決まったところにだけパターンニング再露出させた (図 (1)-22)。このようにして、マイクロ流路および反応部位、センシングエリアを作製した。

## ii. 亜硝酸イオンセンシング

次に、作製した流路上で亜硝酸イオンセンシングを行うために二種類の方法で試薬の印刷を行った。一つ目は、ナノ粒子をベースとした N-1 インク (もしくは粒子を用いていない N-1b インク) をセンシングエリアに、N-2 インクを反応部位に、それぞれインクジェットプリンタ (PicoJet-2000) を用いて印刷した (図 (1)-23)。二つ目は、ヘア粒子をベースとしたインクをセンシングエリアに、グリース反応に必要な検査試薬であるスルファニルアミド (クエン酸溶液) を反応部位に印刷した。このようにして、亜硝酸イオンセンシングペーパーを作製し、亜硝酸イオンを含むサンプルを流すことで、色変化を観察した。

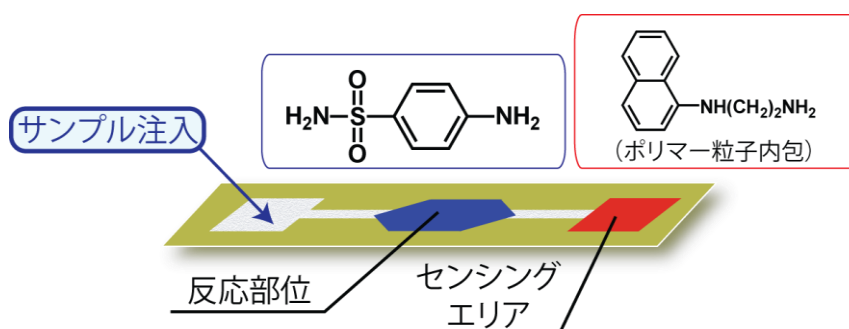
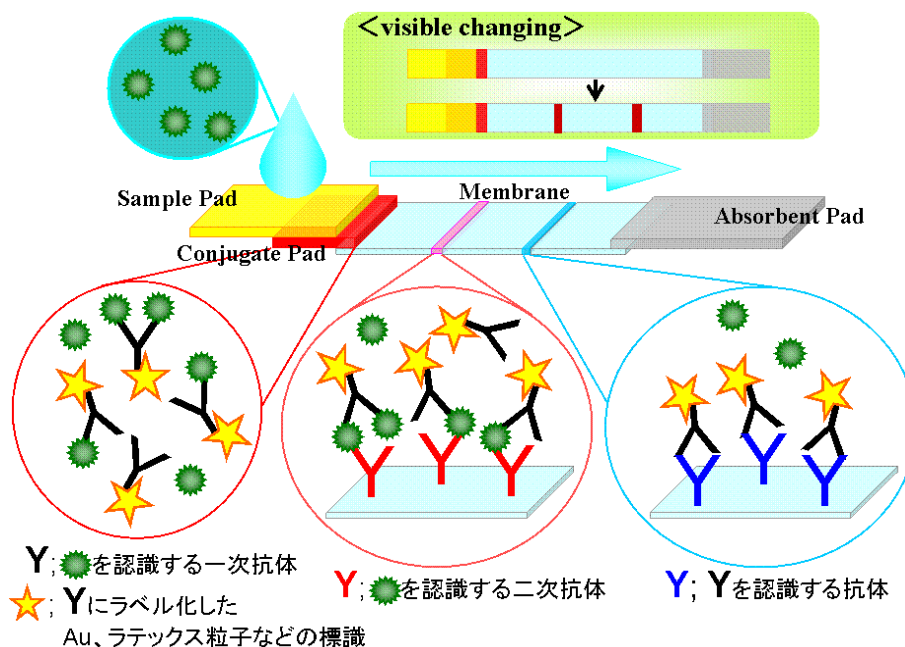


図 (1)-23 亜硝酸イオンセンシングペーパー

## b. ラテラルフローイムノセンシングペーパーの作製

## i. イムノセンシングの原理



図(1)-24 ラテラルフローイムノセンシングの概略図

イムノセンシングは、抗原抗体反応を利用した分析法のことである。その反応の特異性の高さから、高感度・高選択的な分析法として知られている。このイムノセンシングと、簡便な検出手法であるペーパークロマトグラフィーとを組み合わせ、ラテラルフローイムノセンシングは特別な機械などを必要としない最も簡便な測定法のひとつである。一般的なラテラルフローイムノセンシングは検体採取部 (Sample Pad)、標識粒子塗布部 (Conjugate Pad)、固相化メンブレン (Membrane)、吸収部 (Absorbent Pad) の各構成部品を重ねて連結したマルチパッド構造になっている (図(1)-24)。固相化メンブレンにはリファレンス部 (Control Line) と判定部 (Test Line) があるが、これらは反応前は全くの無着色状態である。以下に測定の手順を説明する。

- ① サンプルパッドに滴下されたサンプルは、コンジュゲートパッドへと流れていく。そこでサンプル中の特定の物質 (抗原) は、それを認識するラベル化された抗体 (一次抗体) と抗原抗体反応を起こし、結合する。
- ② ラベル化された抗原抗体複合体を含むサンプルは毛細管現象によりメンブレン中を流れていき、判定部に到達する。判定部にはこの抗原抗体複合体に対して特異的に反応する第二の抗体 (二次抗体) が固定化されている。そのためここで、抗原はラベル化された抗体およびメンブレン上のそれによってサンドイッチ状に結合される。つまり、サンプル中に特定の物質 (抗原) が含まれている場合、この判定部が着色する。

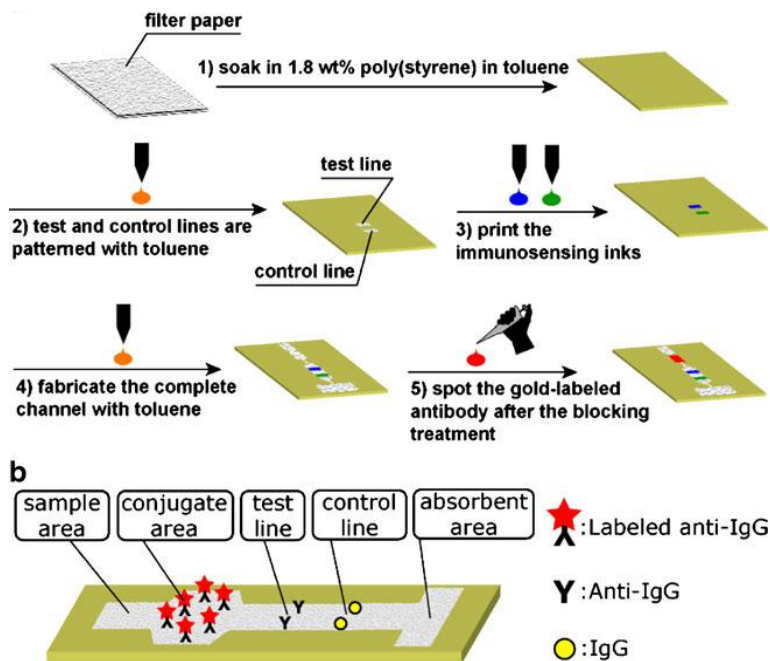
- ③ レファレンスラインには一次抗体を認識する抗体が固定化されており、抗原と反応していない抗体がここで反応する。

このラインが着色すれば、コンジュゲートパッドに含まれている抗体がそこまで運ばれたことを示すので、判定が正確に行われたことが示される。

- ④ アブソorbentパッドはメンブレンを流れてきた検体を吸い取って、反応液をさらに継続的にクロマト移動させる。

## ii. 作製方法

環境水中の農薬などの分析を行うために、インクジェット技術を用いたラテラルフローイムノセンシングペーパーの作製法を検討した。その際、基盤としてろ紙を使用し、モデル分析として human IgG抗体を検出する「シングルパッド」のイムノクロマトグラフィの製造を行った。ろ紙に親水性パターンを作製する方法は上記と同様に行い、異なる点としては、まず、テストラインおよびコントロールラインのみを作製した。次に、その2つのライン上に、イムノセンシングインクを印刷した。その後、すべてのマイクロ流路をトルエンの印刷により完成させた。完成したマイクロ流路を含むろ紙をBSA溶液(溶媒:PBSバッファー)に1時間浸漬させることで、ブロッキングを行い、乾燥させた後にPVP水溶液をサンプルエリアおよびコンジュゲートエリアにスポットした。最後に、作製した流路にてイムノセンシングの有効性を確認するため、金ナノ粒子でラベル化したヒトIgG抗体を用いて、コンジュゲートエリアに抗体をスポットした。このヒトIgGを用いたイムノアッセイのためには、ヒトIgG(コントロールライン)、ヒトIgG抗体(テストライン)、金ナノ粒子でラベル化したヒトIgG抗体(コンジュゲートエリア)をインクとして用いた(図(1)-25)。



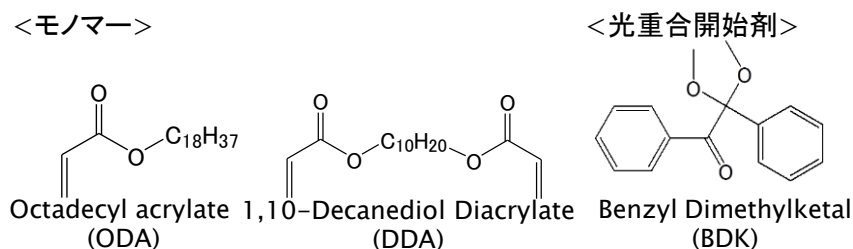
図(1)-25 インクジェットプリンターを用いたラテラルフローイムノセンシングペーパーの作製

## 2) UVインクを利用したインクジェットプリント技術によるマイクロ流路の作製法の開発

(2)―1) のセンシングペーパーの作製法には揮発性有機化合物であるトルエンが使われており、環境に対して課題があった。そこで、揮発性有機溶媒を用いない環境に優しい流路の作製法を考案した。

## a. UVインクによる流路の作製法

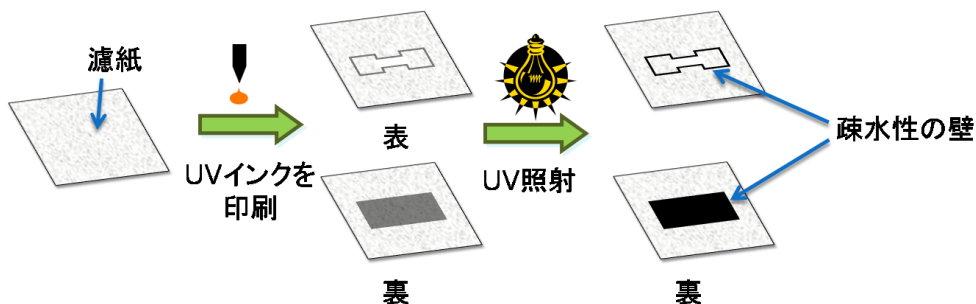
UV照射によって重合し、疎水性のバリアを形成できる揮発性有機溶媒を含まないインク（UVインク）を開発した。開発したUVインクは、疎水性のモノマーと光重合開始剤から構成されるインクである。その構成は、モノマーとしては、アクリル酸オクタデシルと1,10-デカンジオールジアクリレートが7:3（w/w）の混合物を用い、開始剤としてはベンジルジメチルケタールをモノマー比15%（w/w）で利用した（図(1)-26）。このUVインクを濾紙(Filter Paper ADVANTEC 5C)上にインクジェットプリンタにより印刷し、その後UVランプを照射することでモノマーを重合させる。これにより、疎水性のバリアを形成させ、流路を作製する。



図(1)-26 UVインクの構成

## b. UVインクを用いた流路の作製方法

濾紙にUVインクを、オフィス用インクジェットプリンタ（PX-101）を用いて、まず表面に流路の壁を描くように印刷した。その後、UV（600 mW/cm<sup>2</sup>、365 nm）を60秒間照射した。次に裏面からの漏れを防ぐために、濾紙の裏面にも流路全体をカバーするような長方形の図形を印刷した。そして同様にUV照射を行い、疎水性のバリアを作製した（図(1)-27）。



図(1)-27 UVインクによるマイクロ流路の作製

図2 UVインクによるマイクロ流路の作製

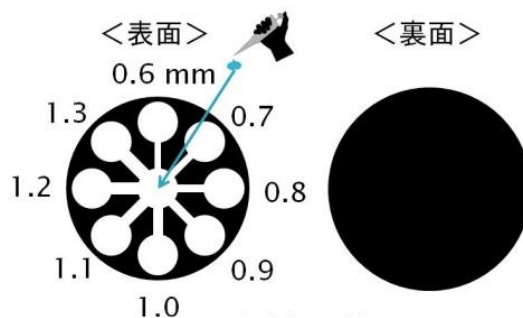


## c. 流路の評価

食品用色素である赤色2号水溶液を流路に流すことで、流路のバリア性の評価を行った。また、ブロモチモールブルー、チモールブルー、メチルレッドをコアシェル粒子に内包したpH指示薬を印刷し、pHを変化させたサンプルを流すことで、センシングペーパーとしての有用性を評価した。

## d. 流路幅の検討

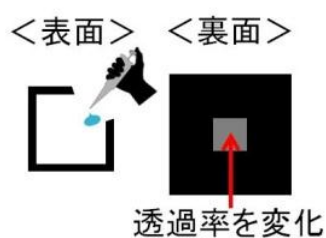
流路幅の検討を行うために、図(1)-28のような流路を濾紙にUVインクで、インクジェットプリンタ（PX-101）を用いて印刷した。これは、中央に円形のサンプル注入口があり、ここから放射状に8本の流路（0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3 mm）が伸び、各流路の端部に円形の反応スポットが位置する形状である。この流路を印刷した後すぐに、UVを照射した。また、裏面には流路全体をカバーするような円形の図形を印刷し、UV照射を行った。作製後、赤色二水水溶液を流し、実際に流れた流路幅をデジタル顕微鏡により測定した。



図(1)-28 流路幅の検討

## e. 裏面の透過率変化の検討

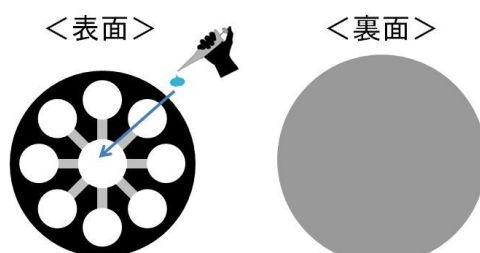
通常流路の作製時に、流路は完全な黒色として印刷設定しているが、その黒色の透過率(印刷の濃さ)を変化させた場合の検討を行った。透過率の変化は、表面は正方形の縁、裏面はそれを十分にカバーできる大きさの正方形の形状で印刷し、その中央部の透過率を0%(完全な黒色)から10%ずつ増やすことで黒色を薄くし、100%(印刷されていない状態)まで変化させた(図(1)-29)。作製後、赤色2号水溶液を滴下し、染色した厚さをデジタル顕微鏡により観察した。



図(1)-29 透過率の検討

#### f. 表面カバーが施された流路の作製

流路上の表面にカバーを施して水の蒸発を軽減できるような流路の作製を行った。図と同様の形状の図形を用いたが、流路幅は1.0mmと均一とし、その流路上に透過率を上げたドーナツ型の図形を印刷した。また、裏面もdと同様の円形を用いたが、こちらも透過率を上げて印刷した(図(1)-30)。できた流路に、赤色2号水溶液を滴下し、流れた流路の断面をデジタル顕微鏡で観察した。

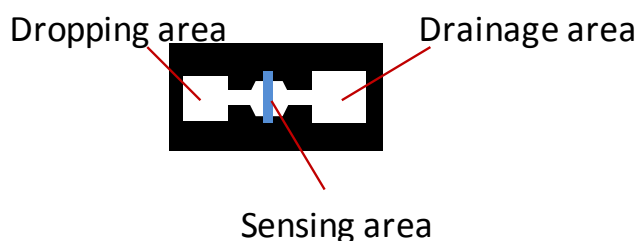


図(1)-30 表面カバーされた流路の作製

#### 3) 鉛センシングペーパー作製法の開発

セクション(1)-3)で作製したインクを利用して、図(1)-31のような流路をもつ鉛センシングペーパーを開発した。流路印刷はセクション(2)-2)の方法で作製した。ただし、表面の透過率は0%、裏面の透過率は35%にした。インクジェットプリンタ(DMP-2831)を用いてセンシングインクを図(1)-31の中央の部分に印刷し、鉛イオンセンシングチップペーパーを作製した。

次に、このセンシングペーパーの評価を行った。バッファー希釈(MES-TMAOH: 50 mM-100 mM、pH 5.2)で作製した鉛サンプルをDropping areaに20  $\mu$ l $\times$ 5回滴下した。



図(1)-31 実験に用いた流路のデザイン

#### 4) 新規蛍光ナノ粒子型ラベル化剤を用いたイムノセンシング技術の開発

より高感度なイムノセンシングを行うために、蛍光ナノ粒子型ラベル化剤を開発した。現在、イムノアッセイのためのラベル化剤として、蛍光色素内包シリカナノ粒子が着目されている。これは蛍光色素内包シリカナノ粒子が、高感度かつ迅速測定が可能で、ラテラルフローイムノアッセイへ応用可能であるためである。しかしながら、未だ蛍光や発光ELISAに比べると感度の点で劣る。そこで本研究では、この蛍光シリカナノ粒子を改良することで、より高感度な測定を実現し

た。

#### a. 新規ナノ粒子型ラベル化剤

提案するラベル化剤の模式図を図(1)-32に示す。このラベル化剤のポイントは下の3点である。

##### ① 金ナノ粒子をコアとして用いること

金ナノ粒子をコアとして用いることで、多量に色素を固定化してもシリカナノ粒子の形態が崩れることがない。また、LFIAへの応用を考えた場合、目視でControl line (=テストの終了) が確認でき、Test lineの半定量的な濃さを判別できることは大きなメリットとなる。

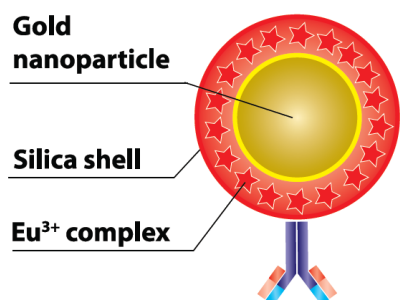
##### ② ユウロピウム錯体 (BHHCT-Eu<sup>3+</sup>) を色素として用いること

ユウロピウム錯体は非常にストークスシフトが大きい色素である。このため、多量の色素を固定化し、色素濃度が高くなっても濃度消光を起こしづらい<sup>17)-20)</sup>。

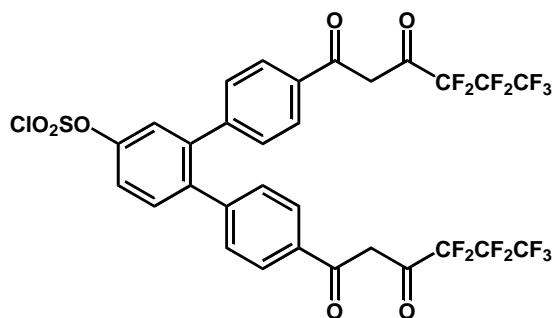
また、用いる配位子であるBHHCTは、非常に高輝度であり、アミノ基と反応し硫酸アミド基を容易に形成することができるクロロ硫酸基を有している。ナノ粒子の高輝度化に、色素の漏れを防ぐ共重合法を用いるのは非常に重要であるため、この色素を選択した。

##### ③ デンドリマーをリンカーとして用いること

デンドリマーをリンカーとして用いることで、分散性を維持したまま、高いラベル化効率でラベル化を行うことができる<sup>21)</sup>。



図(1)-32 ラベル化剤のデザイン



図(1)-33 B H H C T

#### b. ラベル化剤の合成

上記で提案したラベル化剤の合成を行った。(図(1)-32)

① クエン酸還元法を用い、粒径約30 nmの金ナノ粒子を合成した。

② 金ナノ粒子表面にシリカシェルをコーティングした。まずPEG (ポリエチレングリコール) 鎖

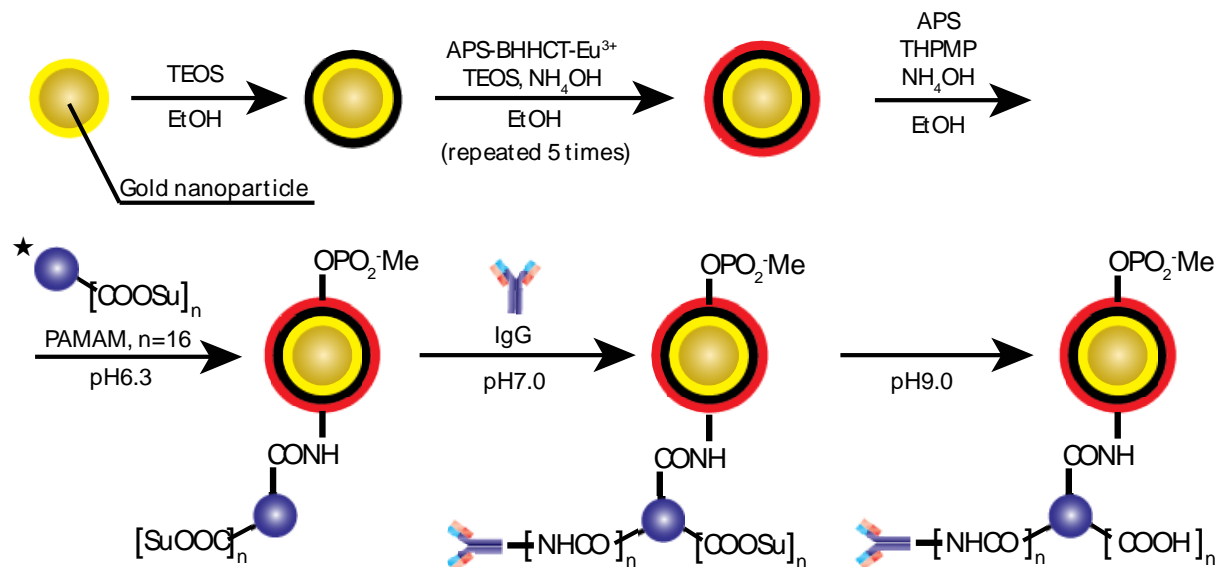
を金ナノ粒子表面に修飾した後、TEOS (tetraethoxysilane) をモノマーとしシリカシェルを合成した。

- ③ ユウロピウム錯体内包シリカシェルをコーティングした。ユウロピウムリガンドであるBHHCT (4,4'-bis(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-heptafluoro-4'',6''-hexane-dion-6''-yl)chlorosulfo-o-terphenyl) (図(1)-33) を合成により得た。これをAPS (3-aminopropyl-triethoxysilane) と結合させ、ユウロピウムイオンを配位させ、ユウロピウム錯体-シランカップリング剤複合体であるAPS-BHHCT-Eu<sup>3+</sup>を得た。その後、これをTEOSと共に共重合させることで、ユウロピウム錯体内包シリカシェルを合成した。この操作を5回繰り返すことによって、多量のユウロピウム錯体を固定化した。
- ④ アミノ基修飾を行った。APSを不活性の負電荷を持つTHPMP (3-(trihydroxysilyl) propyl methylphosphonate) と共に共重合させることで、分散性を維持したままアミノ基修飾を行った。
- ⑤ 抗体への結合を行った。多官能基性のデンドリマーをリンカーとして用いた。PAMAM (poly(amido amine)-succinamic acid) デンドリマー第2世代をNHS (N-hydroxysuccinimide) によって活性化した後、まずナノ粒子表面のアミノ基とこれを結合させた。その後、抗体のアミノ基と残ったスクシンイミド基を結合させた。

このような手順を踏んで新規ナノ粒子型ラベル化剤を作製した。その際検討事項として、

- i. 合成したBHHCT-Eu<sup>3+</sup>の吸収・蛍光スペクトル測定
- ii. THPMPによる分散安定性向上の評価
- iii. 色素コーティング回数の最適化

を行った。



-Su = Succinimidyl  
 TEOS = Tetraethoxysilane  
 APS = 3-aminopropyltriethoxysilane  
 THPMP = 3-(trihydroxysilyl)propyl methylphosphonate  
 Dendrimer = PAMAM (poly(amidoamine))-succinamic acid dendrimer, Generation 2

図(1)-34 ナノ粒子ラベル化剤の合成方法

### c. イムノアッセイ

#### i. Salmonella Typhimuriumに対するイムノアッセイ

水質モニタリングのための応用としてSalmonella Typhimurium (ネズミチフス菌) に対し、マイクロプレート上でサンドイッチイムノアッセイを行った。サンプルとして熱処理されたSalmonella Typhimurium、抗体としてAnti-Salmonella antibodyを用いた。まずAnti-salmonellaを96穴マイクロプレート上に物理吸着した後、ブロッキング剤 (Bovine serum albumin)、サンプル、ラベル化抗体を順にインキュベートすることによってイムノアッセイを行った。その後、マイクロプレートリーダーによって蛍光検出 (励起 : 335 nm、蛍光 : 618 nm) を行った。

#### ii. ラテラルフローイムノアッセイ

Mouse IgGをモデル抗原とし、ラテラルフローイムノアッセイを行った。まずニトロセルロース上にテストラインとしてAnti-mouse IgGを、コントロールラインとしてMouse IgGをインクジェットプリンタ (DMP-2831) を用いて印刷した。その後アブソバントパッド、サンプルパッド、そしてラベル化抗体を固定化したコンジュゲートパッドを重ねることによってラテラルフローイムノアッセイを構築した。サンプルを流し、UVランプとデジタルカメラ、フィルタを用いて蛍光シグナルを撮影した。その後、色表現法のひとつであるRGBのうち、R (Red) の値を利用することによって蛍光シグナルの数値化を行ったところ良好な結果を得た。

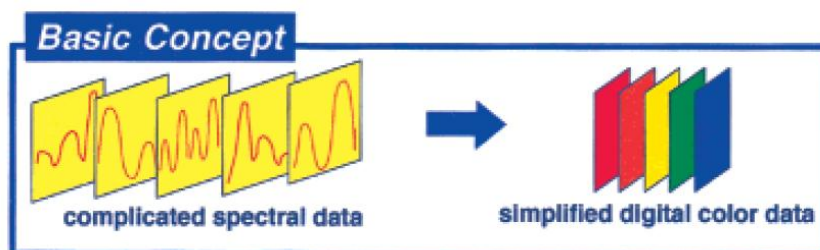
### (3) 環境検査のための安価な水質検査トータルシステムの開発

#### 1) デジタルカラーアナリシスを用いた定量分析法

本研究では、作製したチップでの半定量測定を目視で行ったほか、より客観的かつ定量的な判定をするためにデジタルカラーアナリシス(DCA)を行った。そこで、DCAを行うにあたり前提知識となる事項について解説する。

##### a. デジタルカラーアナリシス

デジタルカラーアナリシス(DCA)とは、吸光光度分析などの従来の光学的手法に代わる、新しい光学分析手法である。デジタルカラーアナライザーやデジタルカラーメーターを用いることによって色を測定し、色を数値に変換することによって分析情報を取り出す。色をデジタル情報として扱うことにより、半定量的な分析しかできなかった比色分析でより精密な測定が可能となるため、このDCAは従来の光度分析よりも有益な分析手法であるといえる。基本的なコンセプトを図(1)-35に示す。測定した色に由来する複雑なスペクトルから、よりシンプルなデジタル情報を読み取る。



図(1)-35 DCAのコンセプト<sup>22)</sup>

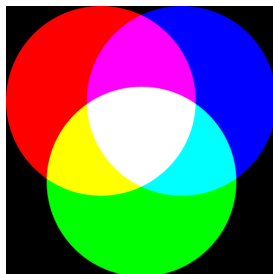
##### b. 分析方法

本研究で用いた二つの分析法について説明する。

##### i. RGB (Red, Green, Blue)

光とは、可視領域の全ての波長が混合したものであり、混合の割合によって様々な色が作り出される。これを波長ごとの光のエネルギーに分解したものをスペクトルと呼ぶ。スペクトルは最も正確に、かつ完全に色の情報を表しているデータであり、これを基に色を様々な方法で数値化したり、記号化したりすることができる。このスペクトルを基にした色の表現方法の中で最もよく使われるのが、3つの値を1組とした数値で表す方法である。このような3つの要素のことを色の三属性といい、構成する3つの値を三刺激値と呼ぶ。RGB法は色スペクトルの赤、緑、青の三原色

の組み合わせによる色を数値化する方法である。光のない状態（Black）にR、G、Bの色光を加えていくと、その割合によりあらゆる色が表現できる。R、G、Bの量が等しく最大に混合されたときの光がWhiteの光である。この考え方を加法混色という（図(1)-36）。

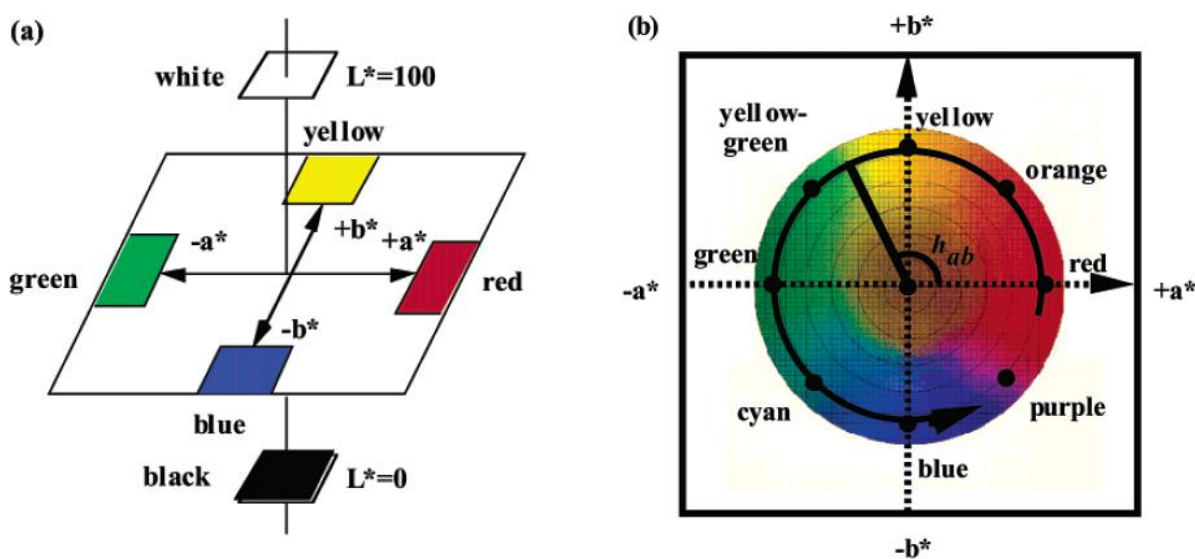


図(1)-36 RGB（加法混色）

ii. CIE表色系（CIE 1976  $L^*a^*b^*$ ）

RGB法は三刺激値によって色は3次元直交座標の中の1点で表すことができる。しかし、三刺激値が装置の特性に依存してしまうという問題点がある。これを改善する為に、国際照明委員会（CIE）は定義した均等色空間の一つがCIE 1976  $L^*a^*b^*$ である。知覚と装置の違いによる色差を測定するために定められた。ある色と他の色の色差は、(1)-1式によって表すことができる。 $L^*a^*b^*$ 座標の概念図および $a^*b^*$ グラフを図(1)-37に示す。

$$DE^* = \sqrt{(DL^*)^2 + (Da^*)^2 + (Db^*)^2} \quad (1)-1$$



図(1)-37 CIE 1976  $L^*a^*b^*$  ((a) 概念図、(b)  $a^*b^*$ グラフ)

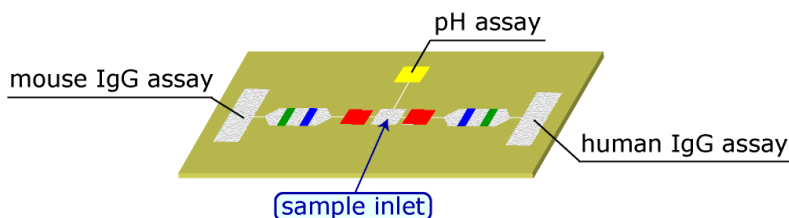
## 2) イムノケミカルマルチセンシングチップの開発

本研究では、一つの紙基板上で化学センシングおよび生化学センシングを同時に行えるイムノケミカルセンシングペーパーを開発した。これにより、試料を一度注入するだけで、同時に多項目の検査を行うことができる。さらに、流路の作製からセンシング試薬の印刷までを、全て同一のインクジェットプリンタで行った。これにより、一台のインクジェットプリンタで簡便に多項目測定ができる汎用性の高いイムノケミカルマルチセンシングペーパーが作製可能であることを実証した。

### a. イムノケミカルセンシングペーパーの作製法

本研究では、化学センシングのパラメーターの一例としてpHセンシングを、多項目生化学センシングの一例としてマウスIgGセンシングとヒトIgGセンシングの二種類のセンシングを行った。

(図(1)-38) 流路はセクション(2)-1)の方法によりインクジェットプリンタ(PicoJet-2000)で作製した。まず、親水性のイムノセンシングインクがラインから広がらないように、イムノセンシング用のテストラインおよびコントロールラインのみをエッチングし、その後そこにイムノセンシングインクを印刷した。そして、イムノセンシング用の流路の残りの部分をエッチングして完成させ、ブロッキング処理をした。次に化学センシング用の流路をエッチングして完成させ、センシングエリアにpHセンシングインクを印刷した。最後に、金ナノ粒子でラベル化した抗体をコンジュゲートエリアにスポットした。なお、用いるpHセンシングインクはセクション(1)-1)と同様のものを作製して用いた。



図(1)-38 イムノケミカルマルチセンシングペーパー

### b. イムノケミカルセンシングペーパーの評価

作製したイムノケミカルセンシングペーパーを評価するために、センシング対象が含まれたサンプルを滴下した。用いたサンプルは、ヒトIgGとマウスIgGを共に含むpH6.0とpH9.0の溶液、ヒトIgGとマウスIgGのどちらかしか含まないpH6.0の溶液の計4種類である。



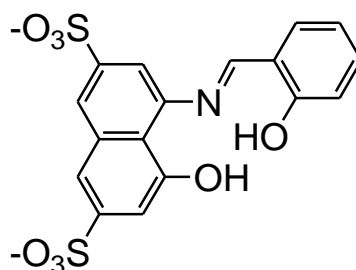
### 3) 多項目水質センシングチップの開発

本研究では、一つの紙基板上で同時に多項目の化学センシングを行えるマルチセンシングチップを開発した。これにより、サンプルを一度注入するだけで、簡単に、同時に多項目のイオンの測定を行うことができる。さらに、試薬の印刷もインクジェットプリンタで行えるため、容易に作製でき、且つ簡便に同時多項目の水質検査ができる汎用性の高いマルチセンシングチップを作製可能であることを示す。

#### a. 色素溶液を使った簡易的なセンシングペーパーの開発

今までのセンシング法では、センシング色素を粒子に内包することで試薬の安定性の向上や色ムラの防止などを行い、より正確なセンシングを行った。しかし、粒子に内包しなくてもセンシング色素は目的のイオンに反応するため、色素を単にバッファーに溶解した簡易的な試薬でも測定は可能であるといえる。そこで本研究では、色素をただ溶解させた溶液を用いてセンシングを行い、より簡易的な測定も行えることを示す。簡易的なセンシングの例として、ホウ素センシングペーパーを作製した。

流路の作製はセクション(2)-2)で開発したUVインクを用い、それをインクジェットプリンタ(DMP-2831)で紙の表面のみに印刷することで流路を作製した。そして、ホウ素の存在下で色変化を起こす色素であるAzomethine H(図(1)-39)をpH 7.5のリン酸バッファーに溶解し、それを流路のセンシングエリアに印刷することでホウ素センシングペーパーを作製した。

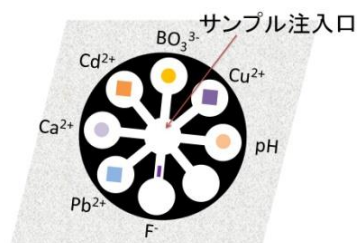


図(1)-39 Azomethine H

#### b. マルチセンシングチップの開発

今までの研究を統合し、目視で色変化が観察可能なイオン(およびpH)を選択し、図(1)-40に示すような一度に多項目のイオンを測定できるマルチセンシングチップを作製した。センシング項目は、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{F}^-$ 、pHの七種類である。セクション(2)-2)の流路の作製方法を用い、図(1)-41の手順で、中心部から8方向に進む形状をした流路(流路幅1.0mm)をインクジェットプリンタ(PX-101)により作製した。そして、その先にこれらのイオンに対応した検査試薬を印刷した。使用した検査試薬は順に、Zincon(セクション(1)-3)による粒子内包(SAZ粒子)、Azomethine H(色素溶液)、Xylenol orange(セクション(1)-3)による粒子内包(SAX粒子)、Phthalein Complexone(色素溶液)、ETH5418-lead ionophore IV(セクション(1)

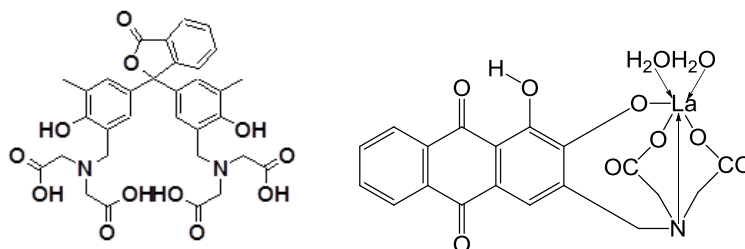
- 4)による粒子内包)、Alfusone (色素溶液)、Bromocresol Purple-Bromothymol Blue-Cresol Red(セクション(1)-1)による粒子内包)である。なお、Phthalein Complexone は $\text{Ca}^{2+}$ に応答する色素であり、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ バッファー(pH10.5)に溶解した。また、AlfusoneはF<sup>-</sup>に反応するLanthanum(III)-Alizarin Complexoneを含んだフッ素センシング用に調整された色素であり、水に溶解して用いた。図(1)-42にそれらの構造を示す。



図(1)-40 マルチセンシングチップ



図(1)-41 マルチセンシングチップ作製手順



図(1)-42 センシング色素の構造 (左: Phthalein Complexone、右: Lanthanum(III)-Alizarin Complexone)

### c. マルチセンシングチップの評価

作製したセンシングチップの評価を行った。上のb. で作製した3つのチップのサンプル注入口にそれぞれ3種類のサンプルを滴下した。滴下したサンプルは、サンプルA (pH: 5.2,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ : 1 mM,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ : 10 mM,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ : 1 mM,  $\text{CaCl}_2$ : 100 mM,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ : 1 mM) とサンプルB (pH=5.2, NaF: 10 mM) であり、バッファーは tetramethylammonium hydroxide 2-N-morpholino ethanesulfonic acidを用いた。そして、それぞれの検査試薬の色変化を目視で確認できるか確認した。

#### 4) ヒ素センシングペーパーの開発

現在、発展途上国ではヒ素汚染が深刻となっており、簡易的にヒ素を測定できる方法が求められている。そこで本研究では、基板としてろ紙を用いることで、低コストで使い捨てが可能であり、持ち運び・使用が簡単、そして外部機器・電源が不要といった特徴を持つヒ素検査紙基板チップを作製した。

##### a. ヒ素

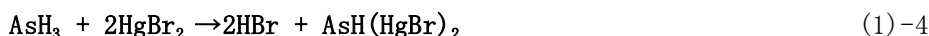
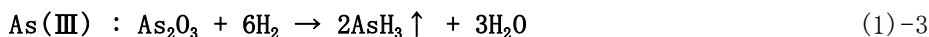
現在、世界人口の約1/3が高度の水質汚染下で暮らしている。特に、水質管理された水道が普及しておらず井戸水を飲料水として利用している地域は、常に水質汚染の危険にさらされている。中でもバングラデシュなどの発展途上国では有害金属であるヒ素による井戸水の汚染が深刻である。したがって、水質検査をする上で特にヒ素を検出することは重要である。ヒ素は硫化物、ヒ化物、酸化物などとして様々な鉱山に随伴して産出され、自然界で広く分布する元素である。また、他元素とヒ化物などの化合物を作りやすく、更に分離しにくいために、鉱石類を原料とする多くの金属、無機工業製品中には、微量のヒ素が常に不純物として混入する。高度に精製された金属材料中にも微量のヒ素が不純物として混入するが、金属中のヒ素は不純物として有害な場合が多い。ヒ素化合物は有毒なものが多いので食品中や水道水中への混入は厳しく制限されている。一般的に環境水中のヒ素の検出にはICP-MSなどの大型分析機器を用いるが、分析機器の設置された場所は限られていること、またコストや手間がかかることなどを考慮に入れると、ヒ素汚染の深刻な発展途上国のような地域ではより簡易的に判定できる体制が望まれる。

##### b. ヒ素の比色分析法

###### i. Merck法

ろ紙を用いる最も一般的な方法であり、この方法に基づくキットも市販もされている。

As(III)を含む塩酸あるいは硫酸性溶液に金属亜鉛を反応させると、ヒ素はアルシingas(AsH<sub>3</sub>)として揮発する。発生したAsH<sub>3</sub>を臭化第二水銀(HgBr<sub>2</sub>)を浸したろ紙に接触させるとろ紙が黄色～黄褐色に色変化する。一連の化学反応を式(1)-2～(1)-5に示す。



ろ紙の色変化の程度を調べることでヒ素を定量することができる。このとき、溶液中のヒ素はAs(III)でなければならない。As(V)のヒ素はヨウ化カリウムと塩化第一スズでAs(III)に還元しておく。試料溶液中に銅など還元されやすい重金属が多量に共存するとAsH<sub>3</sub>の発生が妨げられるので、

蒸留法などによりあらかじめヒ素を重金属から分離しておく必要がある。

反応時間は2009年発売の最新のキットを用いると、20 minであり、更にヒ素の検出下限は0.005 mg/Lである。

Merck法に基づく分析法のメリットとしては、次のことが挙げられる。

- ① 分析が容易
- ② ヒ素の検出下限が低い

しかし、次に挙げるようなデメリットもある。

- ① 有害な  $\text{AsH}_3$  の発生
- ② 有害な  $\text{HgBr}_2$  の使用
- ③ インクジェットプリンタに応用できない金属粉末の使用

そこで、本研究では次の方法によりヒ素分析を行う。

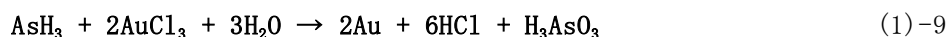
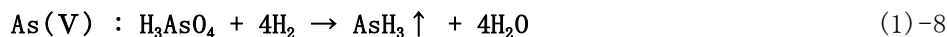
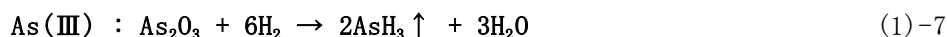
#### ii. $\text{NaBH}_4$ 法

既存の大型分析機器を使用しないヒ素分析法は、水素発生源(以下、水素発生試薬と示す)として、金属と酸を用いた。この方法は金属を用いない分析法であり、インクジェットプリンタを用いた応用が可能ではないかと考えている。

なぜなら、インクジェットプリンタで試薬を吐出する際に、水に不溶の金属のように試薬の粒径が大きいとプリンターで試薬を吐出することが困難なためである。更に、試薬である金属は空気中で不安定なために、試薬印刷後にろ紙上で酸化されてしまう可能性がある。試薬が酸化すると反応が起こらなくなってしまう。

この方法の仕組みは、還元剤である  $\text{NaBH}_4$  の水の還元により水素を発生させ、発生した水素が試料溶液中のヒ素と反応し、 $\text{AsH}_3$  を発生させるというものである。 $\text{AsH}_3$  はろ紙に含ませた  $\text{AuCl}_3$  を還元し色を発する。

$\text{NaBH}_4$  は還元剤の中では強い方ではないが、酸性もしくは中性条件下であると分解して水素を発生させる。一連の化学反応式を(1)-6～(1)-9に示した。



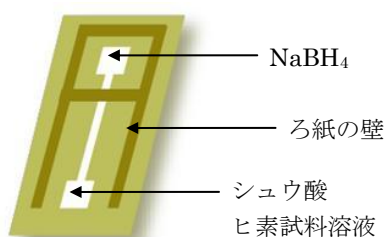
ろ紙上に滴下した黄色の  $\text{AuCl}_3$  が Au へ還元され、水中のヒ素濃度に応じて茶色く色変化する。

この方法で用いる発色試薬は  $\text{AuCl}_3$  であり、他の方法に比較して環境に大きな害を与えず、さらにインクジェットプリンタで印刷可能な試薬のみ扱っている点で大きなメリットがある。したがって、この方法を用いてヒ素センシングチップを作製する。

## c. ヒ素センシングペーパーの作製方法

実際に、簡易的にヒ素が測定可能なヒ素検査紙基板チップを作製する。

- ① セクション(2)-1の方法によりインクジェットプリンタ(PicoJet-2000)でろ紙上に流路を作製する。
- ② 図(1)-43に示したように、作製した流路の周りに幅2.3 mmの細くカットしたろ紙を用いて囲い(壁)を作製した。細くカットしたろ紙は両面テープを使って4枚重ねた。また、壁に用いたろ紙はポリスチレンでディップコーティングしたものである。
- ③ 作製した流路に水素発生試薬を滴下し乾燥させた。用いた試薬および滴下位置は図(1)-43に示す。また、滴下した試薬の量は、シュウ酸、 $\text{NaBH}_4$ 溶液共に $1\mu\text{L}$ である。
- ④ 発色試薬である $\text{AuCl}_3$ を $4\text{ mm}\times 4\text{ mm}$ カットしたろ紙に $70\mu\text{L}$ 滴下し30 min. 乾燥させた。
- ⑤ ④のろ紙を $16\text{ mm}\times 14\text{ mm}$ にカットしたろ紙(ポリスチレンでディップコーティングしたもの)に $3.5\text{ mm}\times 3.5\text{ mm}$ の両面テープを用いて貼り、これを②の流路に蓋として両面テープで貼り付けた。(図(1)-44)
- ⑥ センシングエリアに $100\text{ mg/L}$ のヒ素の試料溶液を $4\mu\text{L}$ 滴下し、30 min. 放置後蓋を取り、ろ紙の色変化を確認した。



図(1)-43 作製するチップのモデル



図(1)-44 ヒ素センシングペーパーの作製手順

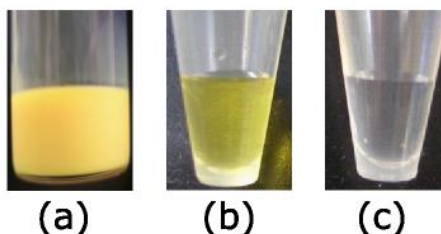
#### 4. 結果及び考察

(1) ポリマーナノ粒子を用いた化学的および生化学的に応答するインクジェットプリント用センシングインクの開発

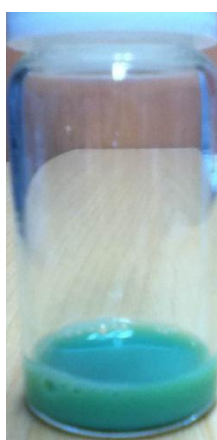
##### 1) pHセンシングインクの作製 (コア・シェルナノ粒子)

今回、色素をナノ粒子へ含有させるために色素にアルキル鎖を導入した。その効果を確認するために、漏れの評価を行った。図(1)-45にブチルチモールブルー(BTB)をナノ粒子に含有した溶液(ろ過前)とのBTBにアルキル鎖をつけずにナノ粒子を内包させようとした場合の限外濾過のろ液、およびBTBにアルキル鎖を導入してからナノ粒子に内包させた場合の限外濾過のろ液の写真を示す。アルキル化させない場合はろ液が染色されており、色素が漏れていることがわかる。一方、アルキル化させた場合は透明なろ液が得られたため、アルキル鎖を導入して疎水化させたBTBはナノ粒子から漏れ出ないことが確認できた。また、同様にアルキル鎖を導入したチモールブルー(TB)でもナノ粒子から漏れ出ないことを確認した。

また、作製した3種類のナノ粒子分散液を混合した結果、図(1)-46のように緑色になったことを確認した。このようにpHセンシングインクを作製できた。今後pHセンシングを行う際はこのインクを用いることとする。



図(1)-45 BTBの漏れテスト、(a) BTBをナノ粒子に含有した溶液(ろ過前)、(b) BTBをナノ粒子に含有した時のろ液、(c) アルキル化したBTBをナノ粒子に含有した時のろ液

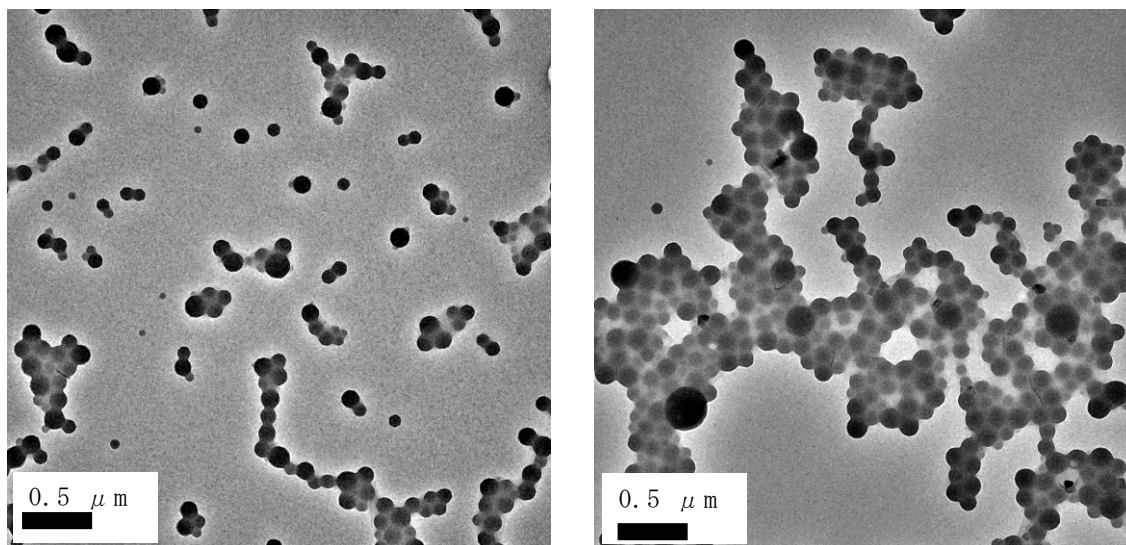


図(1)-46 調整後のインク

## 2) 亜硝酸イオン(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)センシングインクの作製 (コア・シェルナノ粒子、ヘアナノ粒子)

### a. ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルポリマー粒子

研究開発方法でも述べたように、ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルポリマー粒子を用いたケミカルセンシングインクの作製は有機溶媒を用いて容易に行うことができる。TEMにより亜硝酸イオン検査試薬 (アルキル化したNEDA) の内包前後の粒子を観察した (図(1)-47)。



図(1)-47 ポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルポリマー粒子を用いたケミカルセンシングインク (左:内包前 右:後)

用いたポリスチレンコア/ポリビニルピロリドンシェルポリマー粒子はALDRICHより購入した市販品で、平均粒径は245 nmである。検査試薬内包前のTEM像を見てもわかるように、その粒径には大きなばらつきがあることが分かる。本研究において、検討は行っていないが、粒径によるセンシングへの影響、ろ紙への吸着能の差異などがあるとすれば、それらの条件については考慮しづらい粒子であったと言えるだろう。

TEM像からは検査試薬内包前後で粒子の形状等にあまり大きな変化は見られない。しかし、内包前からひとつひとつの粒子の大きさなどにはばらつきがあり、内包前後での変化について議論するのは困難である。

### b. ヘア粒子

#### i. コア粒子の作製 (SV粒子)

本研究では、単分散な反応性微粒子を安定に作製する方法として、乳化重合法を採用した。乳化重合法は安定な高分子微粒子が得られる、重合時の温度制御が容易、水系で扱われるなど、多くの利点を持ち、工業的にも広く利用されている重合法である。

最終的にインクジェットプリンタでの吐出を考慮し、作製される粒子はできるだけ小さいことが望ましい。そのため、条件を変えてコア粒子を作製した。作製時の条件とそれぞれの粒子径をTable (1)-2に、またTEM像を図(1)-48に示した。

Table (1)-2 SV粒子の作製

	St (g)	VBC (g)	KPS (g)	回転数 (r. p. m.)	粒子径 (nm)
SV1	2.85	0.15	0.10	300	365.0
SV2	2.70	0.30	0.10	300	367.7
SV3	2.85	0.15	0.15	300	336.0
SV4	2.85	0.15	0.10	400	338.4

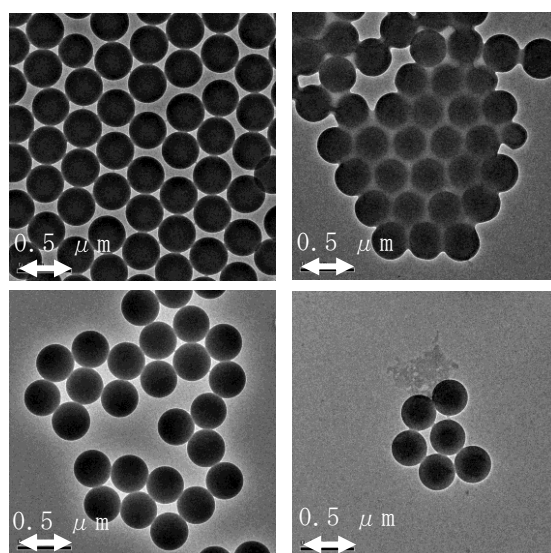
TEM像から、粒子径の揃った単分散な粒子が得られたことが分かる。

今回は、粒子径を小さくするために、モノマー比<sup>23)</sup>、開始剤量<sup>24)</sup>、回転数を変化させることで粒子核数の増加を期待した。

Table (1)-2からもわかるように、期待されるような粒子径の減少は見られなかった。当研究室で行われた研究で平均粒子径が245 nmの粒子がインクジェットプリンタで吐出できることが確認されている。そのため、作製するコア粒子はこの粒子径に近いことが望ましい。

そこで、さらなる粒子径の減少を目指し、SV1の系に界面活性剤を31.3 mg加えて同様にSV粒子を作製した。得られた粒子のTEM像を図(1)-49に示した。

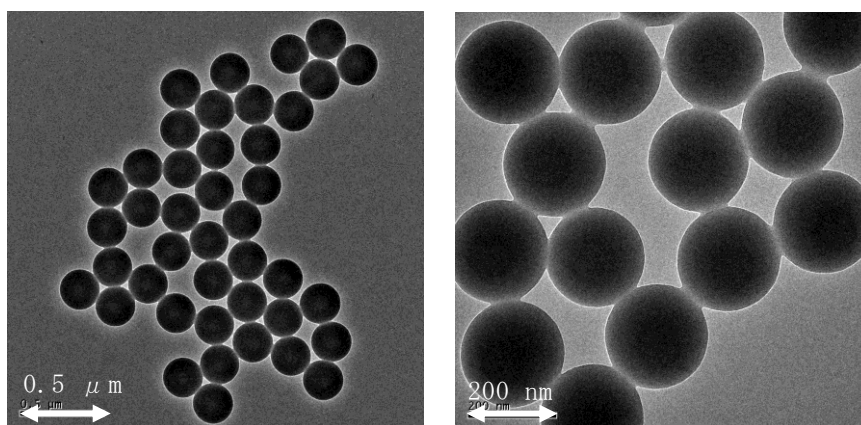
得られた粒子の粒子径を動的光散乱(DLS)によって測定したところ、213.8 nmであり、インクジェットプリンタでの吐出が可能だと思われる粒径となった。このコア粒子は粒子表面に官能基を導入し、粒子表面を反応場として使用するため、本来であれば清浄な表面を有する粒子を作製することが望ましい。しかし、インクジェットプリンタでの吐出を考慮し、必要最小限の界面活性剤を加えることで、小さい粒子径を有し、また表面を反応場として使える粒子を作製した。今後のセンシングインク作製においては、SDSを加えたこの粒子を用いた。



図(1)-48 SV粒子の作製

左上：SV1 右上：SV2 左下：SV3 右下：SV4





図(1)-49 SDSを用いたSV粒子の作製

ii. 光iniferter基の導入 (SVDC粒子)

SV粒子表面には、VBC由来のクロロメチル基が存在し、NaDCと反応させることでクロロメチル基のClとNaDCのNaとが脱離する脱塩反応が起こり、ポリマー中のClの一部がジチオカルバメート基で置換される。この反応によって、粒子表面に光iniferter基であるジエチルジチオカルバメート基を固定化させた。

Iniferter基の導入を元素分析によって追跡した結果をTable (1)-3に示す。

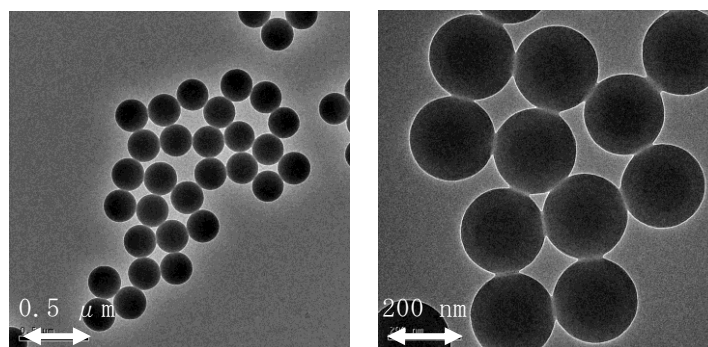
Table (1)-3 SVDC粒子の作製

	N (wt%)	C (wt%)	H (wt%)
SV粒子	0.000	90.25	7.567
SVDC粒子	0.037	90.42	7.678

反応前後でiniferter基由来のN元素の存在比が増加し、これらは定量範囲外の値であるものの、iniferter基が粒子に存在していることを示唆している。

粒子へのiniferter基固定化量の定量はiniferter化試薬のUV吸収からの算出が最も適しており、反応前後のNaDC濃度の減少量を算出し、さらに、粒子の比重を $1 \text{ g/cm}^3$ と仮定し、DLSにて測定した水中粒径から全粒子表面積を求め、iniferter化試薬の減少量を全粒子表面積で割り、求めた粒子表面のiniferter固定化量は $3.2 \text{ units/nm}^2$ であった。従って、十分量のリビングラジカル重合の開始点が導入されたことが示された。

また、得られたSVDC粒子の粒子径を、DLSによって測定したところ、 $230.3 \text{ nm}$ であった。TEM像を図(1)-50に示す。



図(1)-50 SVDC粒子

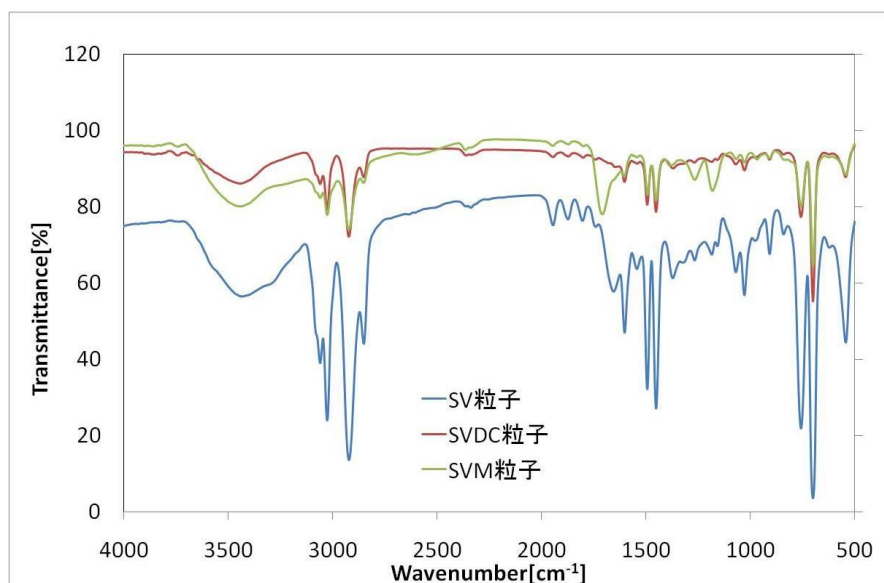
## iii. ヘア鎖の導入 (SVM粒子)

フーリエ変換赤外分析法 (FT-IR) による粒子の分析

IR測定では、 $2300\sim 2400\text{ cm}^{-1}$ 、および $667\text{ cm}^{-1}$ の波数には空気中の炭酸ガスによる吸収が、また $1300\sim 1950\text{ cm}^{-1}$ と $3500\sim 3900\text{ cm}^{-1}$ 付近には $\text{H}_2\text{O}$ 分子の吸収が現れる。これを考慮して各試料のスペクトルについて検討した。

SV粒子、SVDC粒子、SVM粒子のIRスペクトルを図(1)-51に示す。SV粒子およびSVDC粒子のスペクトルでは、炭素鎖やベンゼン環由来の吸収ピークが確認された。SVDC粒子において、iniferterに由来するC-S、C=S、C-Nの結合ピークは検出されなかった。これは試料中のiniferter量が圧倒的に少なく、 $\text{H}_2\text{O}$ に由来する吸収ピークに隠れてしまったためであると考えられる。

SVM粒子のスペクトルには、エステル基に帰属される結合ピークが $1710\text{ cm}^{-1}$ に明確に現れており、カルボキシル基を有するmethacrylic acid (MAA)の導入が確認された。



図(1)-51 各粒子のIRスペクトル

### 動的光散乱（DLS）による粒径の測定

まず、本研究で取り上げているヘア粒子の光散乱における特徴を述べたい。動的光散乱法では、粒子のブラウン運動に由来する散乱強度のゆらぎから流体力学的粒径が導出される。コアシェル粒子には、硬質なコア部と溶媒を取り込んでゲル状に膨潤したシェル部があり、構造的不均質性を有する。そのため、両者の間で光散乱の様子が異なり、動的光散乱法による粒径の測定値には必然的に不正確性が伴う。

Poly(*N*-isopropyl acrylamide) (PNIPAM) ヘア粒子に関するTsujiらの先行研究においても、同様の問題が記述されている。彼らは、静的光散乱法によるヘア粒子の解析ではヘア層による光散乱は起こらない、と述べている<sup>25)</sup>。そのため、静的光散乱の実験では、ヘア粒子の粒径はコア部分の大きさとして解析される。そこで、ヘア鎖の広がりを含めた粒径を測定するためには、粒子のダイナミクスから解析を行うことが有効であり、動的光散乱法が適していると判断した。ただし、拡散係数を解析する過程においても、Einstein-Stokesの式から粒径を得る際にも、コア部とヘア部の構造的不均質性のためにヘア粒子の排除体積の範囲を明確に得ることは困難である。しかし、粒子状態の変化を知ることができ、相対的なサイズを比較することが可能であるため、Tsujiらは動的光散乱法より求められる粒径を流体力学的半径として扱う、と結論づけている。

本研究においても、粒径の絶対値に対する信憑性は低いものの、相対的な粒子の状態変化については十分議論が可能であると判断し、動的光散乱法による粒径解析を採用することとした。SV粒子、SVDC粒子、SVM粒子の粒径をTable (1)-4に示す。

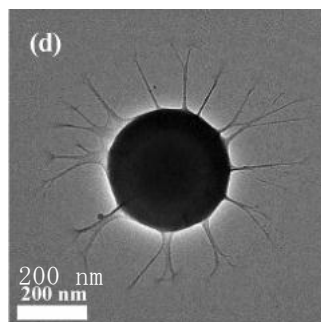
SVDC粒子に比べてヘア鎖を導入したSVM粒子は明らかな粒径の増大を確認することができた。これにより、IRの結果と同様にMAAの導入が確認された。

Table (1)-4 SVM粒子の作製

SV粒子	SVDC粒子	SVM粒子
213.8nm	230.3 nm	393.5nm

### TEMによるヘア粒子の観察

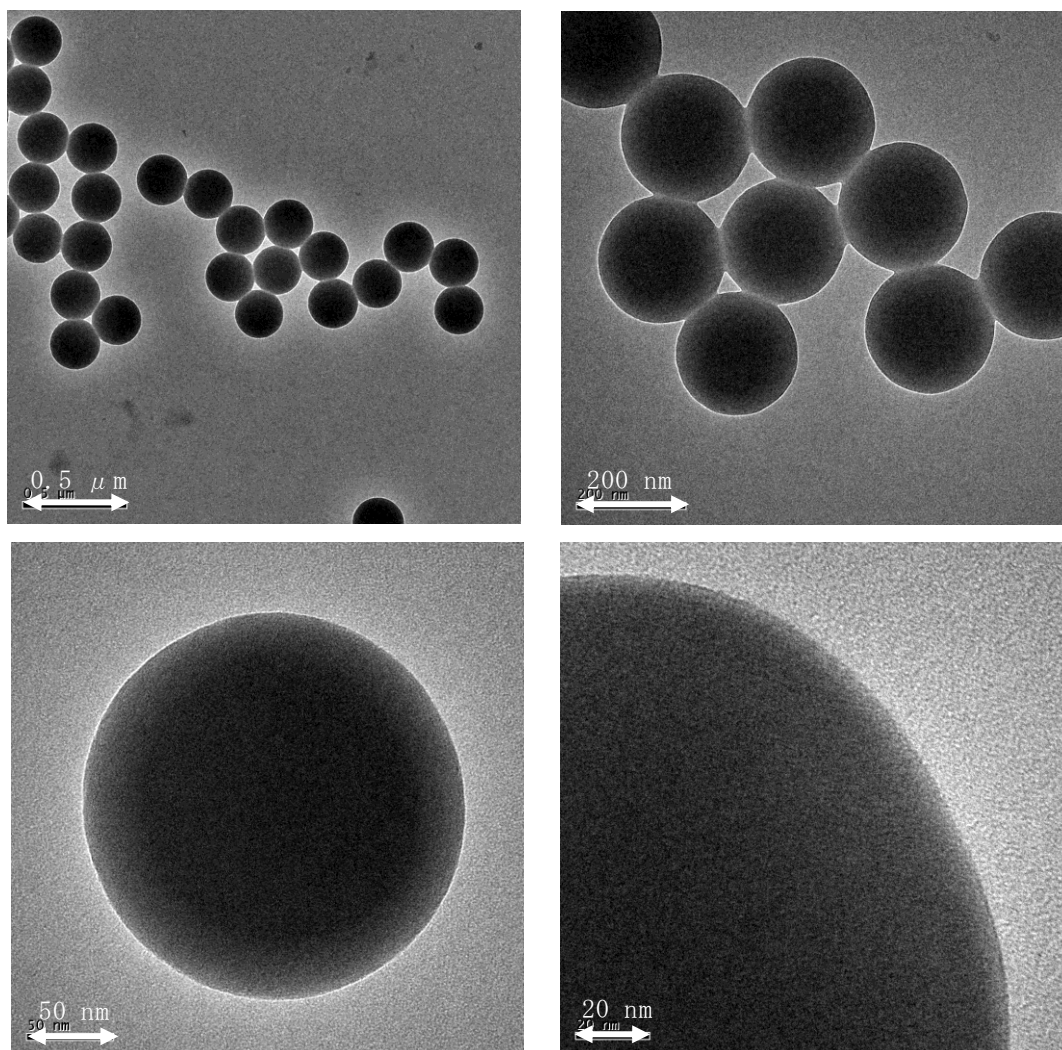
本研究の結果について考察する前に、Tsujiら<sup>26)</sup>が作製したPNIPAMヘア鎖を導入したヘア粒子のTEM像を図(1)-52に示す。TEM像から、ヘア鎖と思われる吸着斑が確認される。



図(1)-52 PNIPAMヘア粒子<sup>26)</sup>

ここで、本研究で作製したPMAAヘア鎖を導入したヘア粒子（SVM粒子）のTEM像を図(1)-53に示す。Tsujiらが作製したPNIPAMヘア粒子はヘア鎖が基板に吸着した状態で乾燥している様子が確認できる。これはPNIPAMが基板に対する強い固定化能を持っているため、水溶媒中で立体安定効果により膨潤していたPNIPAMヘア鎖がその膨潤状態を保ちながら乾燥し、乾燥過程で強く基板に吸着したためであると考えられる。

一方、本研究で作製したSVM粒子はTEM像からヘア鎖を確認することができなかった。SVM粒子はヘア鎖にカルボキシル基由来の負電荷を持ち、水溶媒中で静電反発によって膨潤している。しかしながらヘアがTEM像から確認できない理由としては、1)ヘア鎖の密度が確認できるほど十分ではない、2)立体安定効果を膨潤メカニズムとするPNIPAMなどのポリマーは乾燥過程においても（乾燥しきる直前まで）膨潤状態を維持できるが、静電反発を膨潤メカニズムとするMAAのようなポリマーは乾燥過程において（乾燥しきる直前まで）膨潤状態を維持できない、などが挙げられる。Iniferter基の導入量がTsujiらの先行研究と同様の値をとったことから、1)の理由である可能性は低いように思う。しかしながら、2)の理由についても推測にすぎず、この点については、今後ポリマー種によるヘア鎖のTEMによる見え方などの検討が必要である。



図(1)-53 SVM粒子

## iv. ヘア粒子への亜硝酸イオン検査試薬の固定化 (NEDA固定化粒子～SVMN粒子)

SVM粒子表面には、MAA由来のカルボキシル基が存在し、アミノ基を持った *N*-1-naphthylethylenediamine (*N*-1-ナフチルエチレンジアミン) (NEDA) とカップリングさせることでヘア鎖に検査試薬を固定化させた (SVMN粒子)。

SVMおよびSVMN粒子の元素分析の結果をTable (1)-5に示す。反応前後でNEDA由来のN元素の存在比が増加し、これらは定量範囲外の値であるものの、NEDAが粒子に存在していることを示唆している。

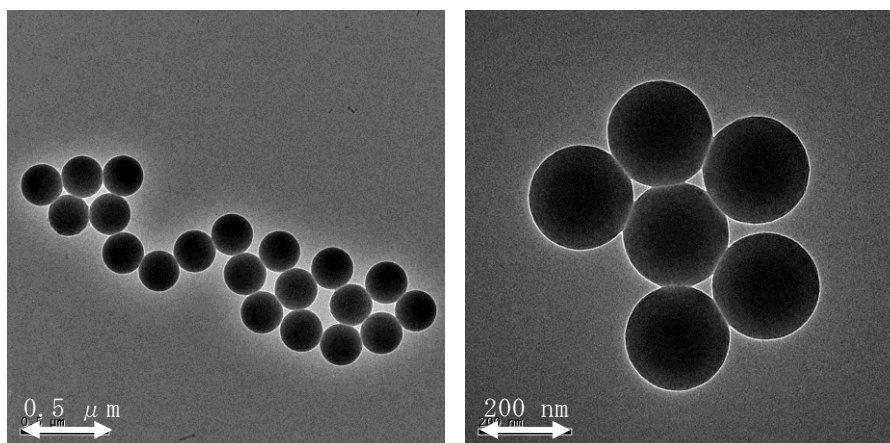
Table (1)-5 SVMN粒子の作製

	N (wt%)	C (wt%)	H (wt%)
SVM粒子	0.052	86.09	7.308
SVMN粒子	0.316	88.30	7.362

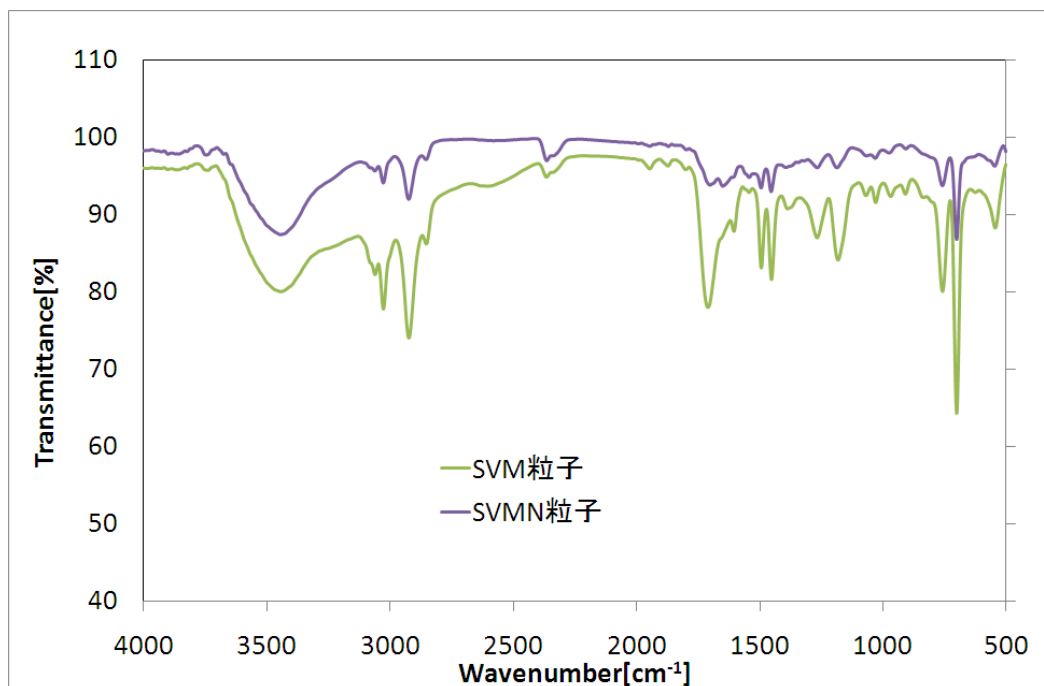
また、得られたSVMN粒子の粒子径をDLSにより測定したところ、273.6 nmであった。TEM像を図(1)-54に示す。

また、SVMおよびSVMN粒子のIRスペクトルを図(1)-55に示す。SVM粒子のスペクトルには、エステル基に帰属される結合ピークが $1710\text{ cm}^{-1}$ に明確に現れていたが、SVMN粒子では、このピークの強度が減少し、アミド基のC=O伸縮振動由来のピークが $1650\text{ cm}^{-1}$ に現れた。このことから、SVM粒子にNEDAが導入されたことが示唆された。

粒子へのNEDA固定化量の定量はNEDAのUV吸収から反応前後のNEDA濃度の減少量を算出し、仕込み粒子が全て反応に使われたと仮定すると、NEDA導入量は $2.55 \times 10^{-4}\text{ mol/g SVM粒子}$ であった。



図(1)-54 SVMN粒子



図(1)-55 SVM、SVMN粒子のIRスペクトル

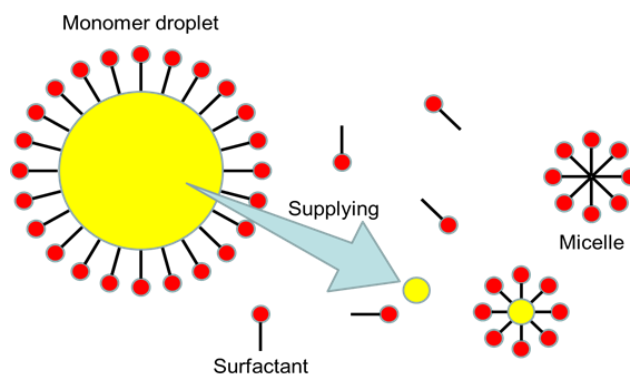
### 3) マルチセンシングインクの作製 (イオン交換型コア・シェルナノ粒子)

#### a. インク基板粒子の開発 (SA 粒子)<sup>27)-29)</sup>

カチオン性コア/シェル粒子はミニエマルジョン重合によって、作製した。インクジェットプリントにおけるインクの開発において、粒径制御は非常に重要なファクターである。使用するインクジェットプリンタのノズルは粒径が大きいほど目詰まりを起こしやすくなる。したがって、大きな粒子は基板として不適切であり、小さな粒子ほど印刷しやすくなる。

一般的にインクジェットプリントに適した粒径は200~300 nmと言われている。通常のスチレン系コア粒子の乳化重合法による作製では、300 r. p. m. の回転数においておよそ300 nmになることが報告されており、より適した粒径の基盤とするためミニエマルジョン重合による粒径の制御を行った。

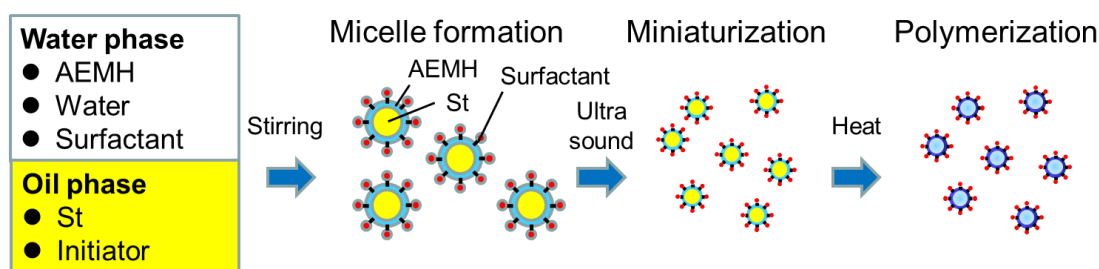
一般の乳化重合における構成成分はモノマー、乳化剤、水、重合開始剤である。重合開始剤は原則として水溶性である。したがって、重合開始剤ラジカルは水相で生じる。この系における粒子核は次の2つ機構によって生じる。1つは水中で生じ、オリゴラジカルに育ったものが析出し、これらが集まって粒子核になる機構である。そして、もう一方はオリゴラジカルがミセルに侵入し、ミセル内で重合が起こり、核が生成される機構である。乳化重合では、核あるいは重合初期の微粒子中にラジカルは複数存在できない。そのため粒子中のラジカル数は0または1となる。水相で発生したラジカルは重合の場への侵入頻度は粒子数増加とともに減少する。ラジカル数が1である期間の長さが、成長反応を続ける時間に相当し、重合度に比例する。乳化重合系の模式図を図(1)-56に示した。



図(1)-56 乳化重合系におけるモノマー油滴とミセルの模式図

乳化重合でモノマー油滴が粒子核になりえない理由はその数が少ないためである。モノマー油滴がサブミクロンやそれ以下のサイズになれば、油滴の全表面積が膨大になり、水相で生成するラジカルが効率良く油滴に入る環境が整う。これがミニエマルジョン重合の原理である。方法として超音波などで強いせん断力を与えることでモノマー油滴を微細化する。すると、乳化剤分子は微細化したモノマー油滴表面に集められ、系内にはフリーのミセルは存在しなくなる。これにより、モノマー油滴が粒子の核となり、各モノマー油滴がポリマー粒子へと重合される。

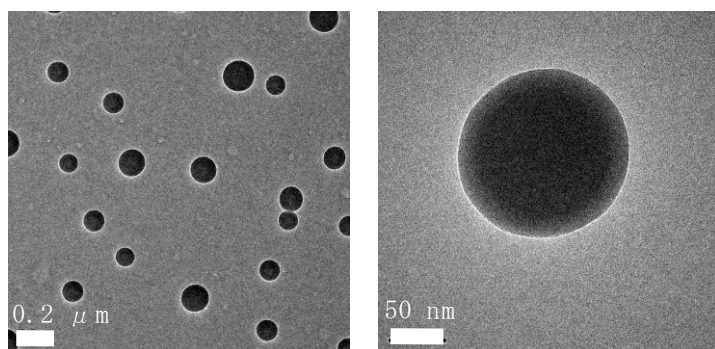
水相中で油滴が存在する場合、オストワルド熟成が生じる。オストワルド熟成とは、過飽和の溶液から析出した微粒子の大きさに差があるとき、時間経過につれ、小さな粒子が消滅し、大きな粒子が次第に大きくなる現象を指す。そこでミニエマルジョン重合では、オストワルド熟成を防ぐため、モノマー油滴にはハイドロフォブという難水性物質を加える。粒子の起源に加え、ミニエマルジョン重合が乳化重合と大きく異なる点は、重合中モノマーが水相を経由して重合場に拡散する必要がない点である。ミニエマルジョン重合系では、モノマーのみでなく、モノマーに溶解したものもその場で重合・固化される。この重合の模式図を図(1)-57に示す。



図(1)-57 ミニエマルジョン重合の模式図

DLS によって測定した粒径は  $181.4 \pm 33.9$  nm であった。印刷に利用したノズル径は  $21 \mu\text{m}$  である。一般的に粒径がノズル径の 10 分の 1 以下のサイズならば印刷が可能になるとされており、作製した SA 粒子は十分に小さく、印刷に適したサイズに制御できたとと言える。

次に SA 粒子の TEM 像を図(1)-58 に、粒子分散液を図(1)-59 に示す。



図(1)-58 SA粒子のTEM像



図(1)-59 SA粒子分散液

図(1)-58を見るときれいな球形の粒子を作製できたことがわかる。重合は水溶媒系で行った。したがって、コア/シェル型の粒子が作成される場合、疎水的なスチレン相がコアに、親水的なAEMH相がシェル側となる。また、図(1)-59に示した粒子は分散性が高く、表面の電荷による静電斥力が粒子の分散安定性に寄与していると考えられる。

## b. 試薬の固定化

### i. SAZ粒子の評価

Zinconは中性領域において、464 nmに吸収を持つ褐色の液体である。このZincon (aq)と作製したSA粒子ラテックスを混合すると、桃色のラテックスへ変化する。これは、ZinconがSA粒子との相互作用により固定化されたことを示す。このラテックスの画像を図(1)-60に示す。また、ラテックスを24時間攪拌後、遠心装置によって限外濾過を行った。このろ液を図(1)-61に示す。



図(1)-60 SAZ粒子

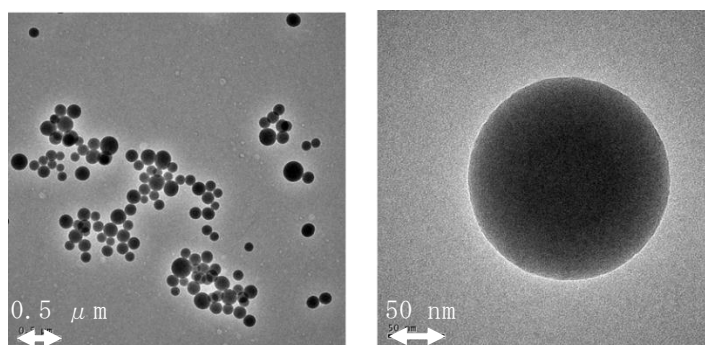


図(1)-61 限外濾過後のろ液

このろ液は無色透明である。また、ろ液の464 nmにおける吸光度は0であることから、0.1 mMで混合したZinconは全て修飾できたことがわかる。これより、粒子に対して10 nmol / mg (polymer)の割合で色素を固定化できたことがわかる。

続いて得られたSAZ粒子のTEM像を図(1)-62に示す。





図(1)-62 SAZ粒子のTEM像

図(1)-62を見ると、きれいな球状の粒子が存在しており、目立った凝集がないこともわかる。以上より、ZinconをSA粒子に修飾することができたと言える。

#### ii. SAX粒子の評価

SAX粒子においてもSAZ粒子と同様にによる修飾の有無を確認する。Xylenol orangeはpH6.3以下において440 nmに吸収を持ち、黄色を示す。このラテックスを図(1)-63、ろ液を図(1)-64に示す。同様に24時間攪拌した後に限外濾過を行い、ろ液の吸光度を測定した。すると440 nmにおいて吸光度は0であり、すべてXylenol orangeが修飾できたことがわかる。

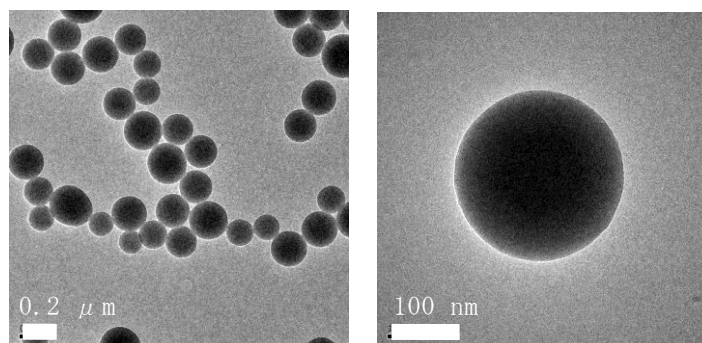


図(1)-63 SAX粒子



図(1)-64 限外濾過後のろ液

次に、SAX粒子のTEM像を図(1)-65に示す。



図(1)-65 SAX粒子のTEM像

TEM像を見ると目立った凝集は見られず、粒子はきれいな球形であることがわかる。また、同様にDLSによって粒径を測定したところ、 $176.5 \pm 30.7 \text{ nm}$ となった。このデータからも粒子は安定して分散状態を保っていることがわかる。

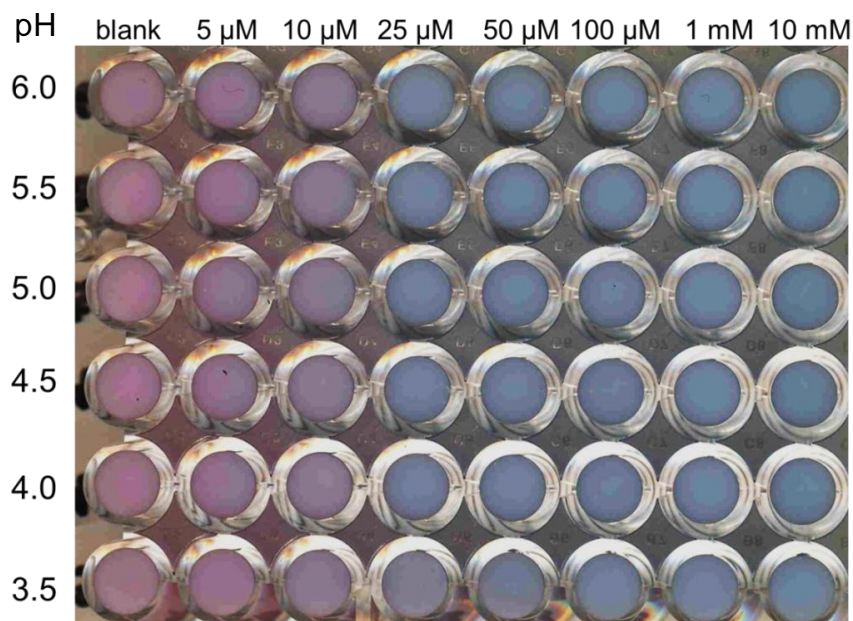
### c. 溶液系での応答

#### i. SAZ 粒子の溶液中での銅イオンセンシング<sup>30)-32)</sup>

銅は展性、延性、加工性に富み、古代から人間に知られた金属で、熱伝導性、電気伝導性にも富み、現在でもさまざまな用途に用いられており、重要な金属の一つである。慢性的な毒性は低い、過去に鉱毒被害を起こした事例もあり、水質検査の項目に設定されている。また、イオン化傾向の差よりアルミ容器や亜鉛メッキ製品鉄製品などを腐食させる原因となる。健康被害としては、人体に蓄積されないため、慢性毒性は低い、急性毒性として腹痛、吐き気、肝臓障害などが現れる。このため、環境基準はWHOにより  $2.0 \text{ mg/L} = 32 \mu\text{M}$  と設定されている。

Zincon は亜鉛、銅の比色分析試薬として、開発された。酸性溶液中では赤～赤紫色、中性～微アルカリ性で黄～橙黄色となり、強アルカリ性では紫色となる。pH 5～9 で Co(II)、Cu(II)、Hg(II)、Ni(II)と、pH 8.5～9.5 で Zn(II)と 1:1 の錯体を作って青色を呈する。銅錯体では  $\lambda_{\text{max}}=600 \text{ nm}$ 、 $\epsilon=1.9 \times 10^4$ 、亜鉛錯体では  $\lambda_{\text{max}}=620 \text{ nm}$ 、 $\epsilon=2.3 \times 10^4$ である。したがって、pH を 5～9 の領域で、青色の呈色を確認することで銅の存在を確かめることができる。

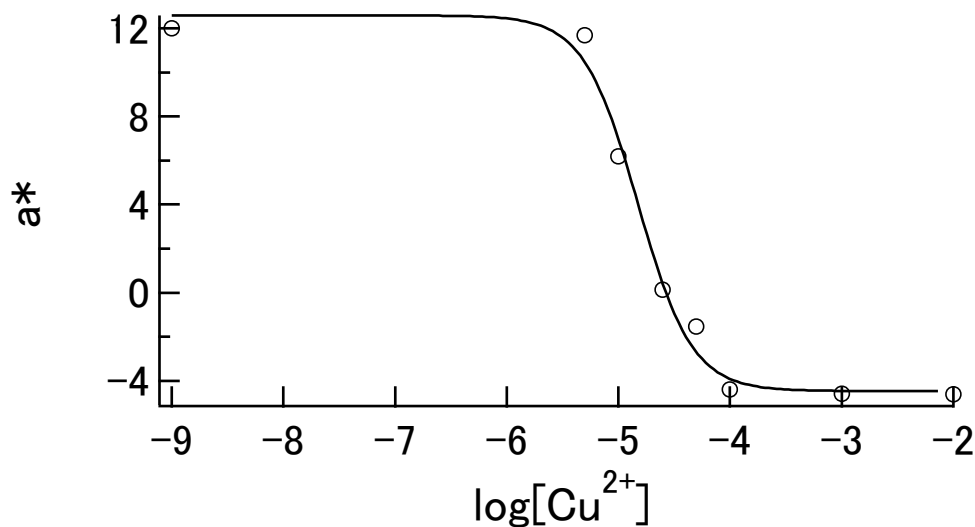
金属イオンセンシングを行う色素は修飾されると pKa が変化し、キレート能が低下する場合がある。そのため Zincon が粒子に修飾されたのちにおいても、銅への配位能を失わずに、濃度に応答した呈色を示すか、本研究におけるセンシングインクのコセプトを確認する必要がある。以上より液体中での SAZ 粒子の銅イオンへの応答を測定した。また、至適な pH を決定するため、pH を振り分けて応答を確認した。図(1)-66 にその応答を示す。



図(1)-66 SAZ粒子の各pHにおける濃度応答の比較

図(1)-66を見るとどのpHにおいても、濃度に応答した呈色が見られていることがわかる。また、pHが高いほど、低濃度域における応答が強く現れていることも確認でき、応答は中性領域が最も適していると考えられる。ここで、pH6.0における濃度による溶液の色変化を、DCAを用いて解析した。

グラフを図(1)-67に示す。DCAは色を光解析する系列はa\*とした。これは、桃色のラテックスが徐々に青へと呈色をシフトさせるため、a\*の値が徐々に小さくなっていくためである。解析したデータはIGOR pro(WaveMetrics 社)を用いて近似曲線を作製した。



図(1)-67 pH6.0における銅オン濃度とSAZ粒子の呈色の関係

図(1)-67を見ると、シグモイド型曲線近似に沿った応答であることがわかる。溶液系においても濃度に応答することがわかった。これより、イオン交換による修飾はキレート能を低下させないと推測でき、他の色素の関しても同様に修飾することで、様々なイオン種を測定することが可能であると思われる。

#### ii. SAX粒子の液体中での鉛イオンセンシング<sup>30)、31)</sup>

鉛は柔らかく加工しやすい金属であるため、ヨーロッパでは、有史以来水道管として使用されてきたが、鉛中毒は古来より知られていた。江戸時代の歌舞伎役者などが鉛含有化粧品を使用して中毒となった例もある。水中の鉛は低濃度では排斥されるが、0.5 mg/L以上の高濃度になると蓄積され、5~10 mg/日で数週間摂取すると中毒症状が現れる。特にイオン化傾向が高いため、日本のような硬度の低い水における水道管には適さない。鉛の人への暴露経路は、食物、飲料水、大気、たばこ等である。鉛の1日摂取量は0.1~0.5 mgで、実際に消化管から吸収されるのは10%程度である。水からの鉛摂取量は1日当たり0.02 mgと推定されている。人体からの鉛の排泄は主として尿、糞便からなされ、毛髪、汗、皮膚脱落および乳汁から少量排泄される。しかし、1日当たりの摂取量が0.5~1 mgを超えると、排泄量を上回って体内に蓄積されると言われている。このようにして体内に摂取された鉛は最終的には骨に沈着する。そのため体内の鉛の90%が骨に含ま

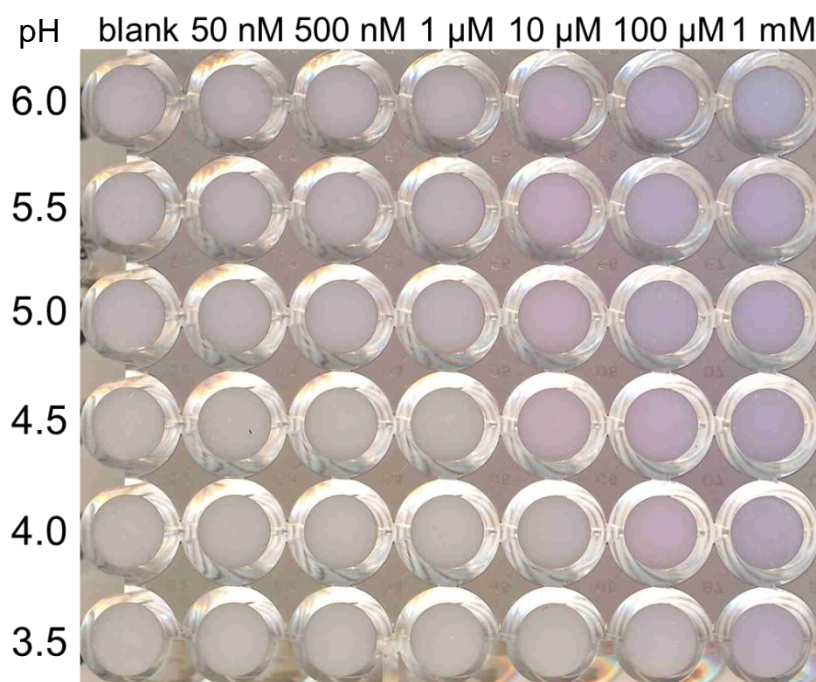
れている。

急性毒性としては嘔吐、腹痛、下痢、血圧降下、乏尿、昏睡などが報告されており、可溶性鉛塩の経口致死量は10 gと言われている。慢性毒性としては赤血球中のデルタアミノレブリン酸脱水酵素 (ALA-D) 阻害が、血液中鉛濃度0.1~0.2 mg/L付近から見られる。

また、高濃度の中毒症状は、貧血、消化管の障害、神経系の障害等である。血液中鉛濃度が0.4~0.5 mg/Lを超えて長時間暴露された場合に障害がみられる。このため環境基準をWHOが0.01 mg/L = 48 nMと非常に低い値で定めており、検出が求められている。

本研究では、重金属イオンの検出に用いられるXylenol orangeを採用することにした。pH<6.3で黄色、pH>6.5で淡紅色となる。鉛イオンと反応して使用できるのは酸性領域であると言われ、重金属がXylenol orangeに配位すると、黄色から赤紫色、青紫色へと変化する。この色変化により鉛イオンを定量する。

SAZ粒子と同様に、最適pHおよびキレート能の確認のため、溶液系での鉛イオンへの応答を測定した。この応答を図(1)-68に示す。



図(1)-68 SAX粒子の各pHによる濃度応答の比較

図(1)-68を見ると、どのpHにおいても濃度応答を示していることがわかる。したがってSAZ粒子同様、修飾後においてもキレート能を失っていないと思われる。しかし、blankにおける各pHにおける発色に変化していることが見受けられる。これは、pHによって、Xylenol Orange(XO)自体の呈色に変化したためだと思われる。XOはpH 6.3以下において黄色、pH6.8以上において紫色を示す。鉛イオンとキレートすると黄色→赤紫という呈色の変化を生じる。OFF-ON型の応答をより顕著にするためには、色変化が大きいほうが、評価を容易に行うことができる。最終的に紙基盤上への印刷を行い、センシングすることを目的としているため、pHは酸性領域に合わせる方が本研究の目的を達成させやすいと考えられる。また、特にpH 4.5~5.5の間において発色が強いと思われる。

X0の鉛イオン検出における最適pHは、4.8～5.2と報告されている。このデータとほぼ一致した結果となったことから、SAX粒子におけるセンシングはpH5.0付近が最も適していると思われる。

d. 紙基盤上での応答

i. SAZ 粒子の紙基盤上における銅イオンセンシング<sup>33)</sup>

最終的に流路上で応用するため、紙基盤上において応答を得る必要がある。液体中を紙基盤上で再現するため流路に用いるろ紙上に印刷し、その応答をDCAによって解析した。

銅イオンセンシングはSAZ粒子を用いて行った。Zinconは銅イオンと配位することで青色の呈色をする。これより、元の粒子の色が桃色であることからa\*の減少値をとることでその応答を見ることができる。したがって、反応前後でのa\*値の差をとり、解析を行った。Table (1)-6に濃度と色変化の関係を示す。

Table (1)-6 SAZ粒子の硝酸銅濃度とセンシングエリアの色変化







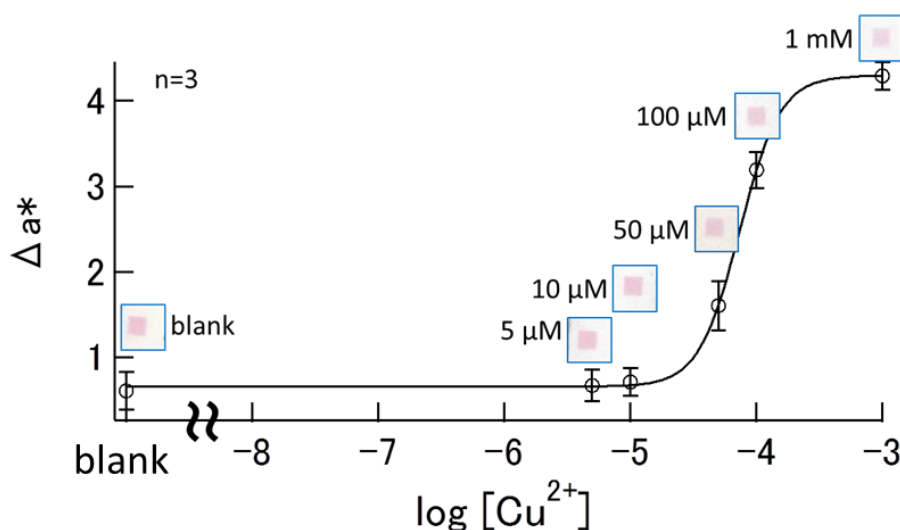
Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Color change
1000	
100	
50	
10	
5	
blank	

Table (1)-6を見ると硝酸銅濃度が高くなるほど、桃色の呈色が弱くなっていることがわかる。これは、SAZ粒子が銅濃度に応答し、青側への色変化が生じているためであると思われる。しかし、溶液中と同様の明瞭な反応は得られず、目視での応答はやや測定しづらい結果となった。

この応答における、DCAの結果を図(1)-69に濃度の対数値と色変化の関係をグラフとして示す。



図(1)-69 SAZ粒子の各銅イオン濃度における応答

図(1)-69を見ると、濃度に応じた応答を示していることがわかる。作製したフィッティングカーブの検量線からS/N比を取ることによって検出限界を決定した。S/N比とは、signal to noise ratio、つまり信号とノイズの比率から、その測定の精度を示す、主に情報工学において用いられる指標である。このS/N比は、blankにおける平均値とその標準偏差の3倍の値を足した値である。このS/N比の値を検量線に挿入することで検出限界が決定される。分析値の分布よりばらつき度合いは標準偏差と平均偏差によって定義される。一般に繰り返し測定時の値のばらつき度合い(振幅平均)の見積もりは標準偏差 $\sigma$ として式(1)-10に示される。

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{x=1}^i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1)-10$$

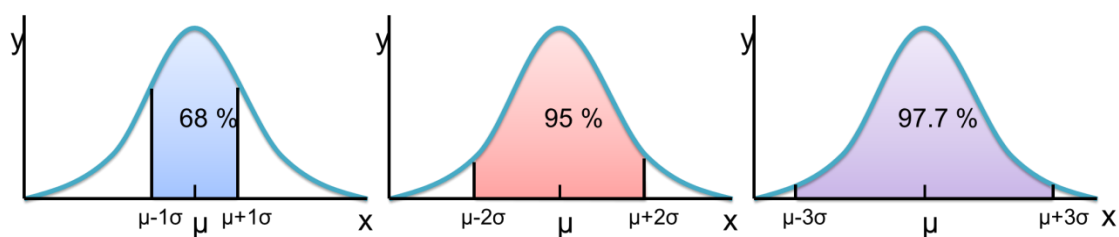
ここで $\bar{x}$ はn個の測定値 $x_i$ に対する平均値である。n-1で割る不偏平均(4)-2乗偏差(不偏分散)の平方根をもって標準偏差とする。十分な頻度の一群のデータは、平均値を頂点として、左右対称の正規分布またはガウス分布で表される。

この時、母集団の約68%は平均から $\pm \sigma$ 以内に収められる。同様に $\pm 2\sigma$ 内には約95%が、そして $\pm 3\sigma$ には99.7%が収まる。(図(1)-70)

S/N比は

$$y = \text{blank} + 3\sigma_{\text{blank}} \quad (1)-11$$

である。したがって、この99.7%の確かさを持って、blankにおける信号分布に測定対象が検出されない最大の濃度が検出限界の定義となっているのである。つまり、blankと「有意に異なる」信号を与える最低量、または濃度と考えることができる。



図(1)-70 ガウス分布に描かれる標準偏差の定義

以上よりS/N比を検量線に挿入して得られた検出感度は $41.0\mu\text{M}$ となった。銅イオンの環境基準は $32\mu\text{M}$ であることからSAX粒子による銅イオン検出において環境基準を満足しなかったが、紙基盤上において定量的な測定、コンセプトの確認をすることができたといえる。

ii. SAX粒子の紙基盤上における鉛イオンセンシング

続いて作製したSAX粒子インクを用いて鉛イオンセンシングにおける結果を考察する。Table (1)-7にそれぞれの濃度における呈色を示す。

Table (1)-7 ディップフローセンシングにおけるSAX粒子の塩化鉛濃度とセンシングエリアの色変化







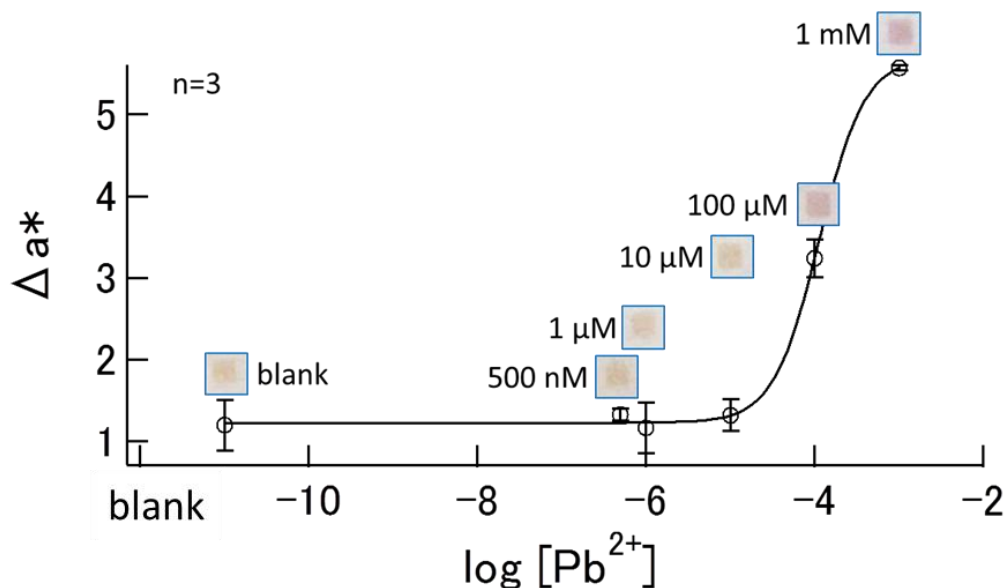
Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Color change
1000	
100	
10	
1	
0.5	
blank	

Table (1)-7を見ると濃度に応答して黄色から赤紫へのXO由来の呈色の変化がみられる。ディップフローセンシングにおける濃度と呈色の変化における解析結果を図(1)-71に示す。



図(1)-71 SAZ粒子の各鉛イオン濃度におけるディップフローセンシング応答

この解析結果を見ると、濃度に応答した色変化を見ることができる。検量線より求めた検出限界は、48  $\mu\text{M}$ であった。環境基準は48 nMであることから十分な感度を得ることができなかつたと言える。しかし、現在販売されているMerck社製鉛検出デバイスMerckoquant® では検出限界が25 mg/L = 120  $\mu\text{M}$ であることから、開発した鉛検出チップは市販の検出キットよりも高感度に鉛を測定できると言える。

#### 4) 鉛イオンセンシングインクの作製 (イオン選択性オプトード型コア・シェルナノ粒子)

##### a. イオン交換型イオン選択オプトードポリマーナノ粒子の作製

作製したインクの様子を図(1)-72に示す。



図(1)-72 作製したインクの様子

作製したインクは1日経過しても沈殿物や浮遊物は生じず、可塑剤は粒子内に内包し切れていると予想される。そこで、さらなるPst-PVPコア/シェル粒子における内包部位及び漏れの確認を行った。試薬がコアシェル粒子のどの部位に内包されているかで漏れやすさに変化してくる。疎水性のコアの部位に入っていれば漏れにくい、親水性のシェルの部位であると疎水性の試薬とは相互作用が弱いため漏れやすいと考えられる。そこで、エタノールとTHFを用いて内包部位の確認



を行った。エタノールとPVP-PStコアシェル粒子を混ぜるとPVPは膨潤するがPStは膨潤しない。一方THFはPVPもPStも膨潤する。膨潤した個所に内包されている試薬は漏れてくるため、エタノールの場合に試薬が漏れてこなければ親水性のシェルではなく疎水性のコアに試薬が内包されていることになる。そのため、エタノールとTHFを粒子に混合し、遠心ろ過後のろ液を見ることで、どの部位に試薬が内包されているのかを評価した。ろ液の様子を図(1)-73に示す。



milliQ

エタノール

THF

図(1)-73 ろ液の様子

THFはフィルターが溶けたため、下に溜まった液に粒子が垂れた。milli-Qとエタノールのろ液の色はどちらも透明であり、クロモイオノフォアはろ液に出てきていないことが分かった。milli-Qではコアシェル粒子のコアもシェルも膨潤しない。そのため、milli-Qではクロモイオノフォアが出てこないため透明であったと言える。一方、エタノールではシェルのPVPのみが膨潤する。そのため、クロモイオノフォアがシェルのPVPの部位に内包されていた場合、エタノールにクロモイオノフォアは溶けるため、膨潤して溶け出したクロモイオノフォアによってろ液に色がつくことが予想される。しかし、今回ろ液に色は付かなかった。よって、クロモイオノフォアはコアシェル粒子のコアの部分に内包されていると考えられる。この理由であるが、本研究で使用している試薬は疎水性が非常に高い。そのため、親水性のシェルではなく疎水性のコアに内包されたと思われる。

(2) 水質多検体モニタリングのための“オールインクジェットプリント技術による”ケミカルセンシングペーパーの作製

1) インクジェット技術を用いた亜硝酸イオンセンシングペーパーおよびラテラルフローイムノセンシングペーパーの作製法の開発

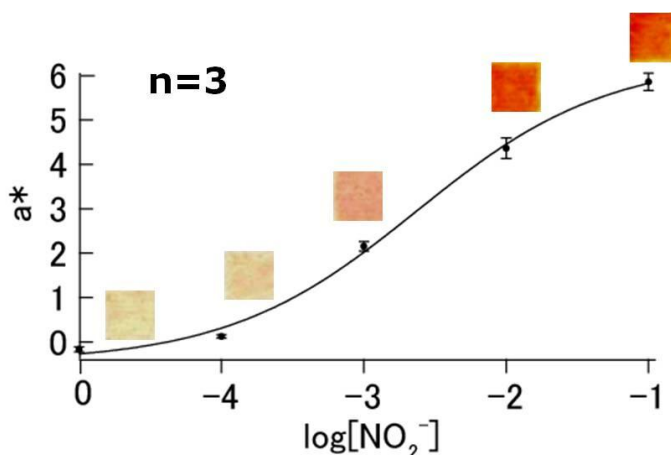
a. 亜硝酸イオンセンシングペーパーの作製

まず、一つ目のコアシェル粒子を用いた亜硝酸イオンセンシングペーパーの性能を調べた。亜硝酸イオンを含むサンプル( $\text{NaNO}_2$ 水溶液)をサンプルエリアに滴下し、浸透させた。センシングエリアの色変化は目視で観察できた。色変化はサンプルを滴下して、5分後にスキャナーを用いて記録した。

検査試薬のナノ粒子への内包の効果を評価した。ナノ粒子への内包を行わない場合(N-1bインク)、センシングエリアの色変化にはむらを確認された。これは、サンプルがセンシングエリアに流れてきた際に検査試薬がサンプルとともに流れてしまうためであると考えられる。一方、検査試薬をナノ粒子へ内包させた場合(N-1インク)はセンシングエリアの色変わりにはむらがなく、均等に起こった。これはナノ粒子がろ紙のセルロース繊維に吸着し、これによりサンプルが流れてもナノ粒子がその影響を受けなかったためであると考えられる。検査試薬のナノ粒子への内包により、センシングエリアの色むらは改善されたものの、色変化はナノ粒子への内包を行わない場合よりも強度が弱くなることが確認された。

今回、スルファニルアミド(N-2インク)はナノ粒子への内包を行わなかった。これは、反応部位で亜硝酸イオンと反応した生成物をサンプルの流れに伴いセンシングエリアへと到達させるためである。

スキャナーを用いて記録した色変化について、デジタルカラー分析を行った結果、検量線を作製できた(図(1)-74)。この検量線を用いて、サンプル中の亜硝酸イオン濃度の定量を行うことができる。



図(1)-74 デジタルカラー分析による亜硝酸イオン分析のための検量線 (コアシェル粒子)

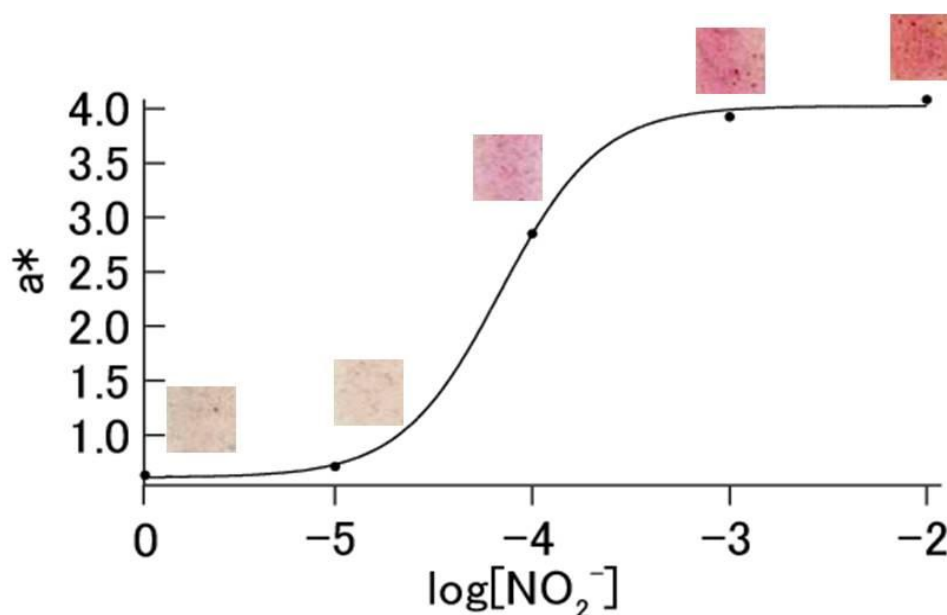
次に、二つ目に作製した“ヘア粒子”型亜硝酸イオンセンシングインクのパフォーマンスを調べるため、亜硝酸イオンを含むサンプル ( $\text{NaNO}_2$ 水溶液) をサンプルエリアに滴下し、浸透させた。センシングエリアの色変化は目視で観察できた。色変化はサンプルを滴下して、5分後にスキャナーを用いて記録した。

スキャナーを用いて記録した色変化について、デジタルカラー分析を行い、検量線を作成した。その結果、コアシェル粒子 (図(1)-74) に比べ、ヘア粒子 (図(1)-75) の方が、色変化が急激に起こる濃度域が低濃度であり、検出下限が低いことが判った。

この原因として、コアシェル粒子と比べ、検査試薬が粒子表面に固定化されているため、色変化が観察されやすい、ということが考えられる。また、ヘア鎖が架橋されておらず、柔軟性を持っているため、検査対象物質が検査試薬に触れ、反応しやすい、ということも挙げられる。

WHOのガイドラインによれば、亜硝酸イオンの水質基準は  $6.5 \times 10^{-5}$  M である。即ち、 $\log[\text{NO}_2^-]$  が -5 から -4 で急激に変化しているヘア粒子を用いることで、明確にこの基準を満たすか否かを知ることができる。

よって、この亜硝酸イオンセンシングインクの開発に成功したといえる。同時に、ヘア粒子は、ナノ粒子化による試薬耐久性の向上、色ムラの改善といった特性を持つことに加え、コアシェル粒子に比べより高感度な粒子といえる。



図(1)-75 デジタルカラー分析による亜硝酸イオン分析のための検量線 (ヘア粒子)

#### b. ラテラルフロー免疫センシングペーパーの作製

ラテラルフロー免疫アッセイを行うに当たり、紙基板および界面活性剤の最適化を行った。様々なタイプのろ紙があるが、その主な違いはポアサイズ (孔径) と水が流れる速度である。異なる物理特性を持った数種類のろ紙・界面活性剤を用い、金粒子でラベル化した抗体の流れ方を観察した。その結果、 $1 \mu\text{m}$  のポアサイズを持ったろ紙、界面活性剤として 1% (w/v) PVP を用い、6 cm / 10 min の流速で抗体を含む溶液を流す時が最適であると判断し、以後これを用いて実験を行っ

た。

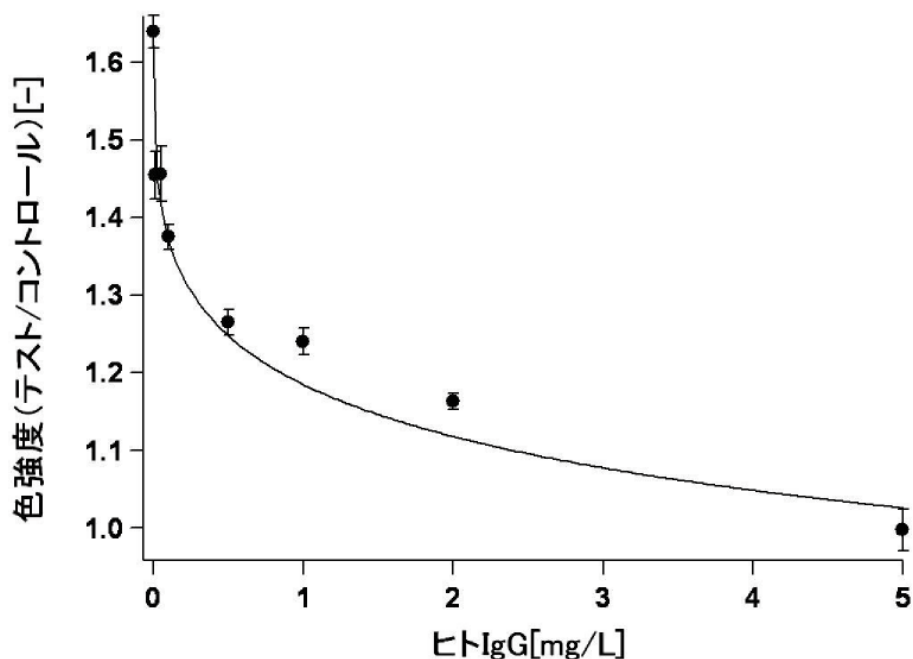
紙基板上でのマイクロ流路を作製するパターンは免疫アッセイに必要な3つの条件を満たすように設計した。まず一点目は分析対象となる抗原と抗体の複合体が流れやすい流路にすることである。流路が狭すぎる場合にはコンジュゲートエリアの出口やテストライン、コントロールラインにおいて抗原と抗体の複合体が詰まる現象が生じてしまう。二点目は、金ナノ粒子によってラベル化された抗体が十分に結合できるようなコンジュゲートエリアの大きさにすることである。最後に三点目として、実際に分析に用いることができる検体量を多くし、アッセイの感度を増加させるため、アブソバントエリアをデザインすることである。

インクのキャリアーとして用いた水には特に試薬は加えなかった。また、テストラインの最適化を行う際には、IgG抗体インクの濃度(200~2440 mg/l)および印刷回数(12~60 times)を変化させて評価を行った。結果として、色変化がもっとも強く表れた1220 mg/lの濃度が最適であると判断した。



図(1)-76 インクジェットを用いたヒトIgGの免疫クロマトアッセイ

作製したヒトIgGセンシングペーパーの性能を調べるため、0.01-5 mg/lの濃度(溶媒: PBS(pH=7.4))のヒトIgGサンプル20  $\mu$ lを用いてサンドウィッチアッセイを行った。ヒトIgGのポジティブサンプルおよびネガティブサンプルを用い、サンプルを滴下して20分後に得られた色変化を図(1)-76示す。ポジティブサンプルを用いた場合には、テストラインおよびコントロールラインで色変化が確認された。テストラインにおける色変化は、分析対象であるヒトIgGが金ナノ粒子でラベル化された抗体と結合し、その複合体がサンプルの毛細管現象によりテストラインまで流れたことを意味している。しかし、異なるセンシングペーパーにおいて金ナノ粒子によってラベル化された抗体を一定量流すことはできなかった。そのため、テストラインとコントロールラインの色変化の強度の比をとることで、ヒトIgGの濃度に応じた検量線を作製した(図(1)-77)。図(1)-77よりインクジェットプリント技術を用いた免疫センシングペーパーにおいて、誤差の小さい検量線を描くことができ、ヒトIgGの定量への応用が期待される結果となった。



図(1)-77 256ビットカラスケールを用いたヒトIgG分析のための検量線

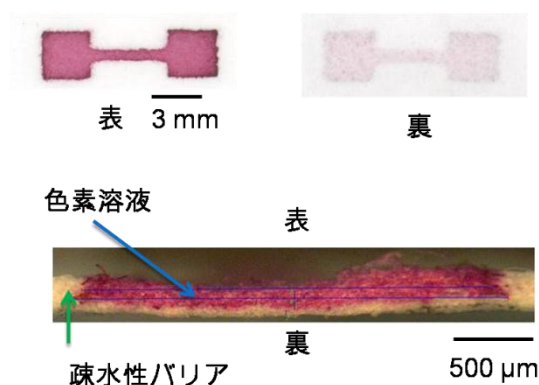
## 2) UVインクを利用したインクジェットプリント技術によるマイクロ流路の作製法の開発

### a. 流路の評価

モノマー組成、開始剤の割合、UVの照射時間、疎水性バリア幅は、実際に食品用色素である赤色2号水溶液を流路に流し、バリア効果を確認することで最適化した。その結果、次の条件が最適と結論づけた。

モノマー	アクリル酸オクタデシル:1, 10-デカンジオールジアクリレート=7:3 (w/w)
開始剤	ベンジルジメチルケタール (15 wt%)
UV照射	600 mW/cm <sup>2</sup> 、365 nm、60秒間
疎水性バリア幅	1.0 mm

上記の条件で作成した流路に、赤色二号水溶液を流したところ、漏れや詰まりがなく、水溶液が流れることが確認された (図(1)-78)。色素溶液は流路内のみを流れ、流路外や裏面に漏れていない。同様のことが断面図からも確認できる。疎水性バリアが紙の内部まで形成されていることが判る。



図(1)-78 UVインクにより作製したマイクロ流路（上段：左・表面、右・裏面 下段：断面）

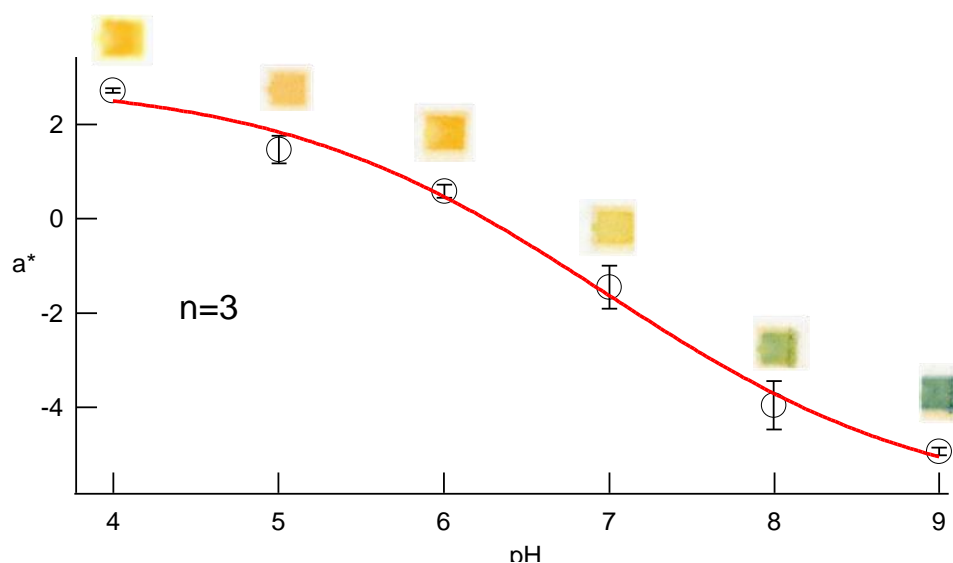
### pHセンシング

センシングエリアに、pH指示薬3種（プロモチモールブルー、チモールブルー、メチルレッド）を内包させたコアシェル粒子を印刷し、種々のpHのバッファをサンプルエリアに滴下したところ、pHに応じた色変化が観察された。

これを亜硝酸イオンセンシングペーパーと同様、スキャナーで取り込み、デジタルカラー分析を行ったところ、図(1)-79のようにpHに応じた色指標の変化が観察された。

この結果から、UVインクにより作製された流路も、ポリスチレンのトルエンによるエッチングにより作製された流路と同様に、マイクロ流体センシングデバイスとして応用可能であると言える。

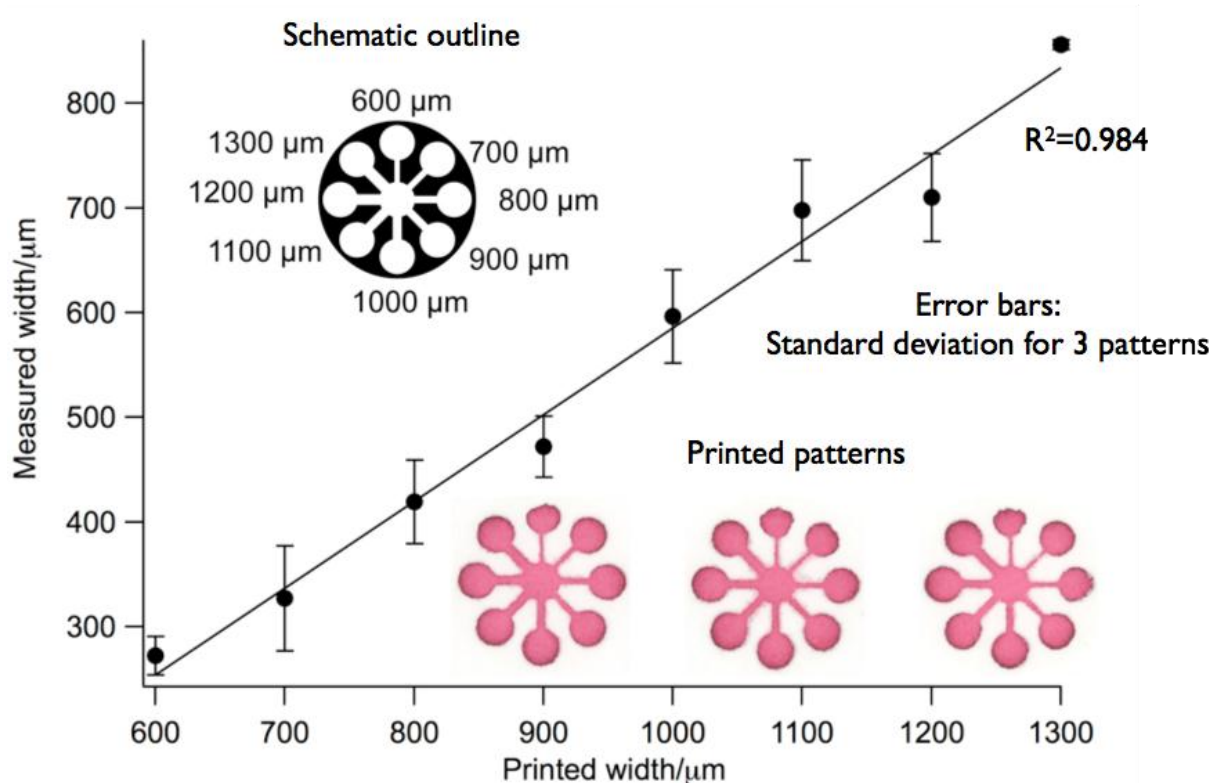
これより、UVインクによる流路の作製は、従来のトルエンによるエッチングによる方法と比べ、有機溶媒を用いず、ディップコーティングなどの作業が不要であることから、従来の方法に代わるより良い流路作製方法として期待される。



図(1)-79 デジタルカラー分析によるpH分析のための検量線

## b. 流路幅の検討

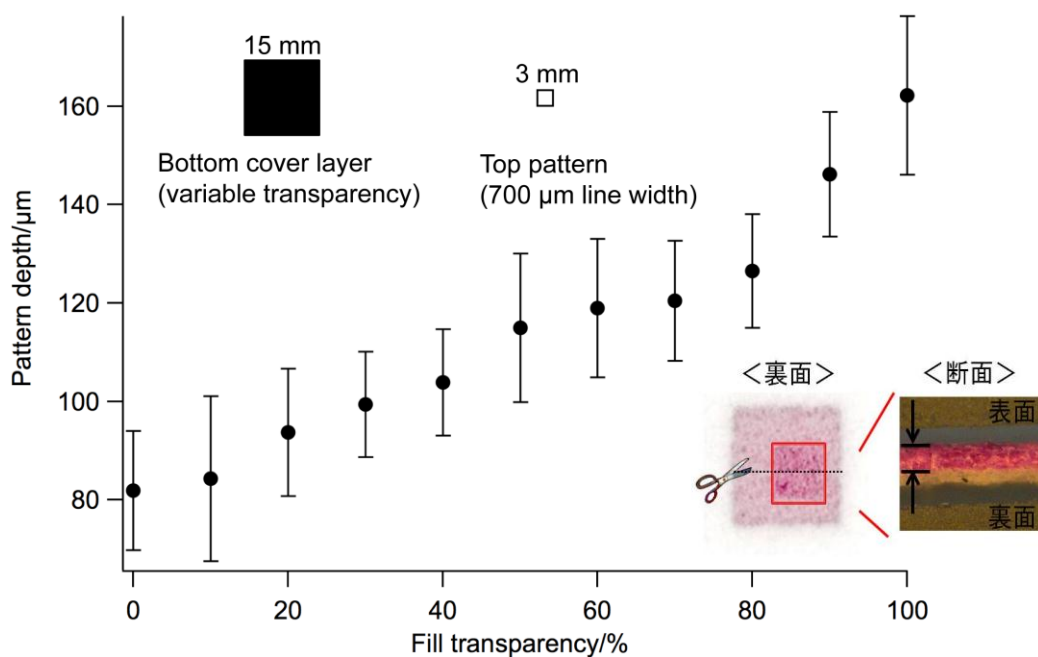
赤色溶液滴下後の流路を図(1)-80に示す。0.5 mmでは流路ができないことは確認できており、0.6 mmから1.3 mmまでの流路では均等に流路が流れていることが確認できる。この染色された部分の幅をデジタル顕微鏡で測定し、実際の流路幅とした。これと印刷した時点での流路幅を比較したものが図(1)-80である。横軸が印刷した流路幅、縦軸が実際に測定した流路幅を示している。印刷後、UVインクが完全に硬化する前に一部が流路側にしみこむため、実際の流路幅は印刷した時点より減少している。また、ほぼ直線の近似がとれており、実際の流路幅は印刷時の約0.8倍になるといえる。



図(1)-80 赤色溶液を流した流路（流路幅の検討）と実測値との比較

## c. 裏面の透過率変化の検討

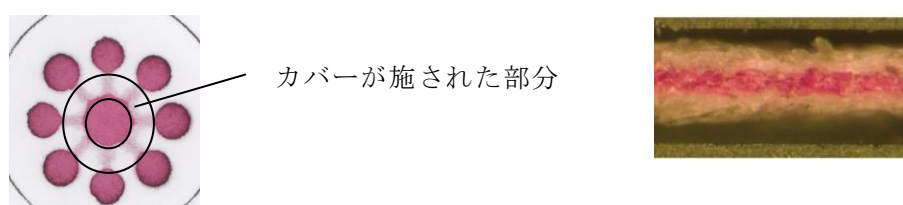
次に、透過率を変化させたときの裏面と、この断面をデジタル顕微鏡で撮った写真を図(1)-81に示す（写真の例は裏面の透過率が70%のもの）。断面図の赤く染色された部分の厚さを測定し、透過率との関係をプロットしたものが図(1)-81である。横軸が透過率、縦軸が厚さを示している。透過率を上げるほど染色される部分の厚さは増し、相関が得られていることがわかる。



図(1)-81 透過率と厚さの比較および画像（左：裏面画像、右：断面図）

d. 表面カバーが施された流路の作製

作製した流路に赤色溶液を滴下したものを図(1)-82に示す。左図のように表面カバーされた流路では赤色は表面に見えておらず、一方で赤色溶液は全体に行き届いていることが確認できる。また、この流路の断面をデジタル顕微鏡で撮影したものが右図である。表面および裏面がともに染色されておらず、紙の内部を赤色溶液が進んでいることが確認できる。この結果から、水の蒸発を軽減できる流路を作製できたといえる。

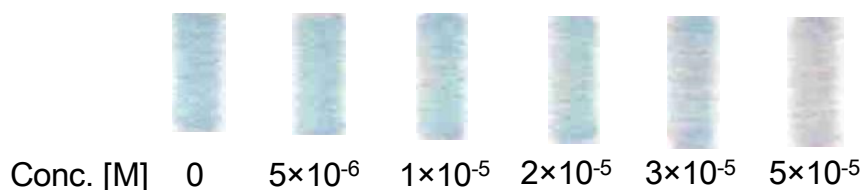


図(1)-82 赤色溶液を流した表面カバーされた流路とその断面図



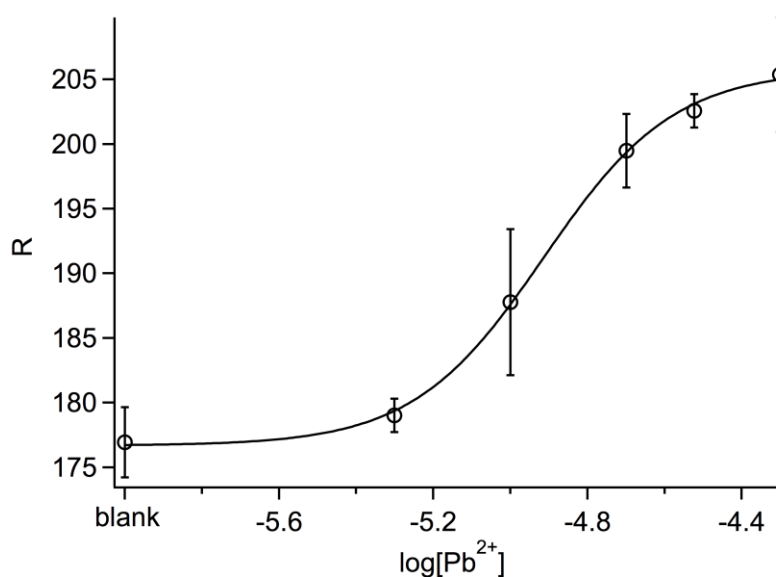
## 3) 鉛センシングペーパー作製法の開発

サンプル5回滴下後の様子を図(1)-83に示す。



図(1)-83 鉛イオンセンシングの紙上での色変化

鉛濃度に応じた色変化を目視で確認することができ、特に $3 \times 10^{-5}$  Mの以降でより明瞭に目視で判別できた。そこで、より定量的な測定を行うために、デジタルカラーアナリシスで評価を行った。図(1)-84に鉛濃度とR値の関係を示す。



図(1)-84 濃度とR値の関係

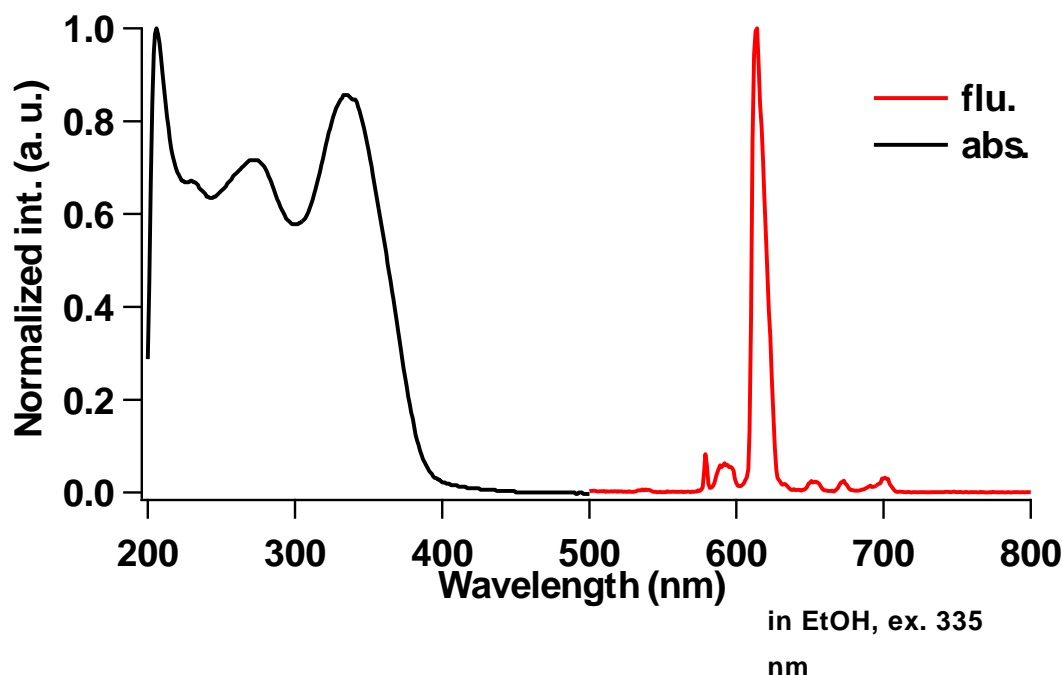
今回はRGB法でのR値で最も良好な相関を得られたため、R値で鉛イオンセンシングを行った。R値は濃度に応じて変化し、検出下限は $8.1 \times 10^{-6}$  Mとなった。比較実験として粒子ではなくフィルムを用いた場合の検出下限は $1.1 \times 10^{-5}$  Mであり、粒子を用いることで感度が向上することがわかった。これは粒子のほうが鉛サンプルと接触する面積が大きく、より効率的にイオン交換を行えたためだと考えられる。また、粒子がサンプルによって流されてしまうことはなかった。この理由として、粒子により色素の固定化する上で、インクの粘度調整にグリセリンではなくエチレングリコールを利用した効果もあったと考えられる。エチレングリコールはグリセリンよりも沸点が低く、乾きやすい。そのため、余計な水分などが蒸発し、紙としっかり物理吸着したことが考えられる。

## 4) 新規蛍光ナノ粒子型ラベル化剤を用いたイムノセンシング技術の開発

## a. ラベル化剤の合成

i. 合成したBHHCT-Eu<sup>3+</sup>の吸収・蛍光スペクトル測定

合成したBHHCT - Eu<sup>3+</sup>の吸収・蛍光スペクトルを測定した。その結果を図(1)-85に示す。これより、配位子の励起ピークは335 nm、蛍光ピークは613 nmと判った。

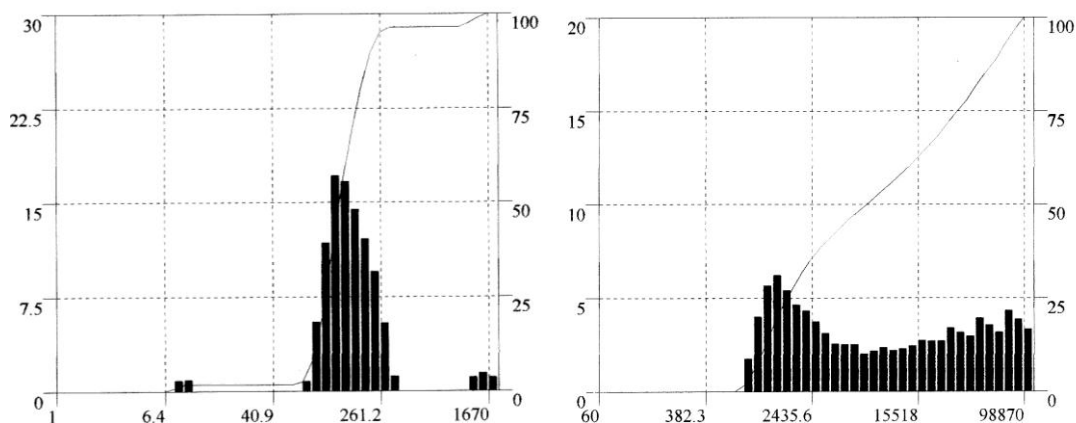


図(1)-85 BHHCT-Eu<sup>3+</sup>の蛍光・吸収スペクトル

## ii. THPMPによる分散安定性向上の評価

本研究では、アミノ基修飾の際、APSだけでなく分散性維持のためにTHPMPを共重合させた。そこで、DLSを利用し、ラベル化時に晒される塩濃度の溶液条件下（PBS, pH7.4, 10 mM）で、どのような分散性を取るか確認を行った。評価は、最初のステップの金にシリカコーティングした粒子を利用して行った。DLSによる粒径の測定結果を下に示す。図(1)-86の横軸は粒径、縦軸は散乱強度を示している。THPMP無の粒子では、塩濃度による凝集が確認できるが、THPMP有では凝集が確認されない。これより、THPMPは分散安定性の向上に大きく貢献していることが分かる。

THPMP無の粒子の粒子径	20632.3±28180.0 nm
THPMP有の粒子の粒子径	149.9±52.3 nm



図(1)-86 分散安定性評価 (左THPMP有、右THPMP無)

### iii. 色素コーティング回数の最適化

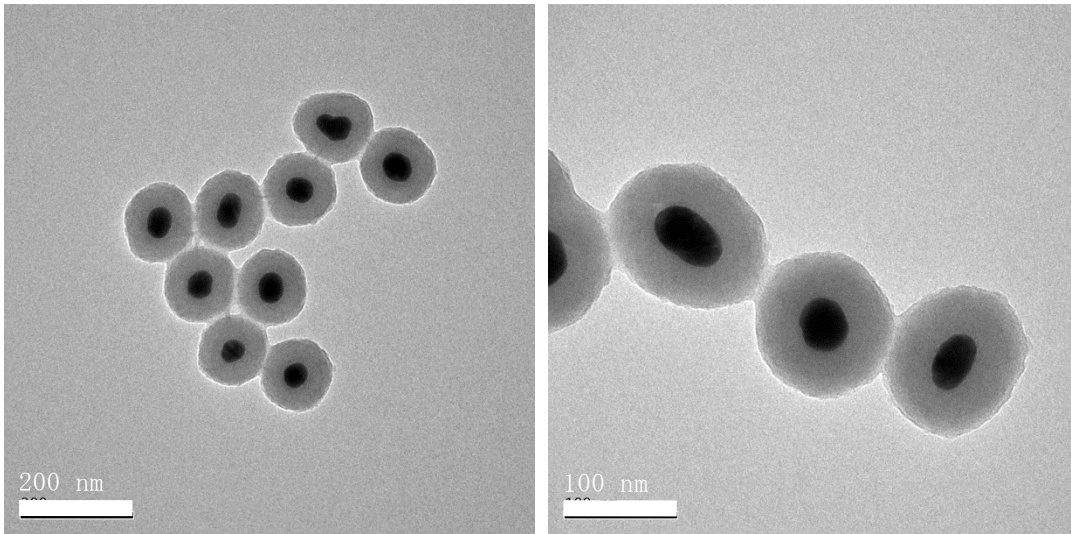
本研究では感度を高めるために、色素のコーティングを複数回行った。その評価をTEM、DLS、吸収スペクトル、蛍光スペクトルにより行った。

#### 【TEM】

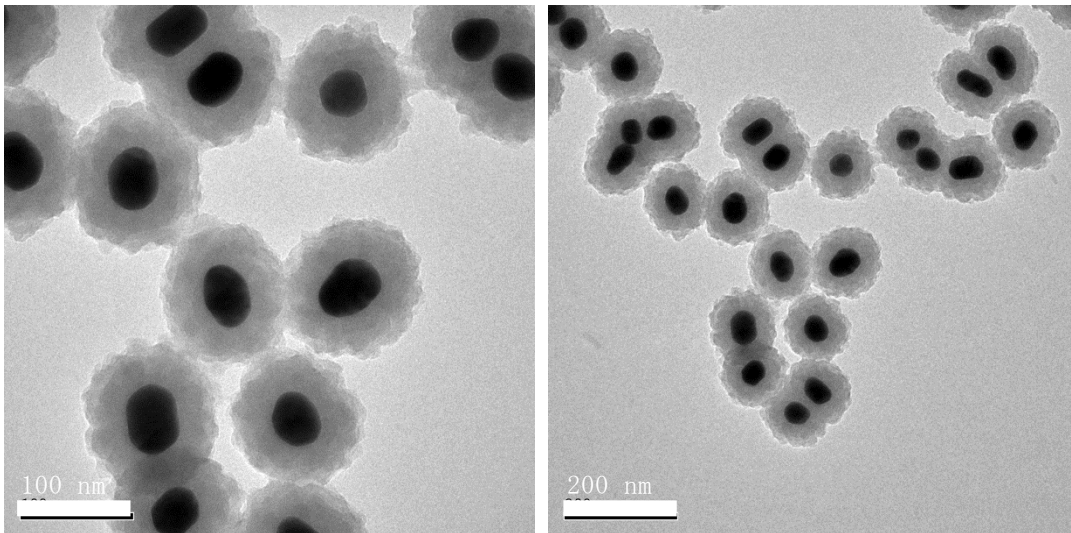
撮像したTEM像を図(1)-87～図(1)-92に示す。アミノ基修飾前の1層目、3層目、5層目を比較すると、層数が多くなるに連れ、表面が粗くなっていることが分かる。これは、シリカネットワーク中の色素或いはアミノ基末端の脆い部分が、TEM試料作製における乾燥中に破壊されたためであると考えられる。

APSを用いて、シリカ粒子表面を荒くし、より広い表面積を得る、という報告がある<sup>34)</sup>。これによると、シリカ粒子の表面に、APSをTEOSと共に共重合させシェルを合成し、乾燥させると表面が粗くなる(図(1)-93)。その度合いは、APSの量が多ければ多いほど、大きくなるという。APSはTEOSと異なり、シリカ元素に結合しているひとつの手がアミノプロピル基になっており、加水分解を経て重縮合できる手は3つしか無い。このため、シリカネットワークを形成した場合、その部分が欠陥サイトとなる。ここで、溶媒を蒸発させ乾燥させると、その欠陥部分が壊れ、その結果表面が粗くなるという。

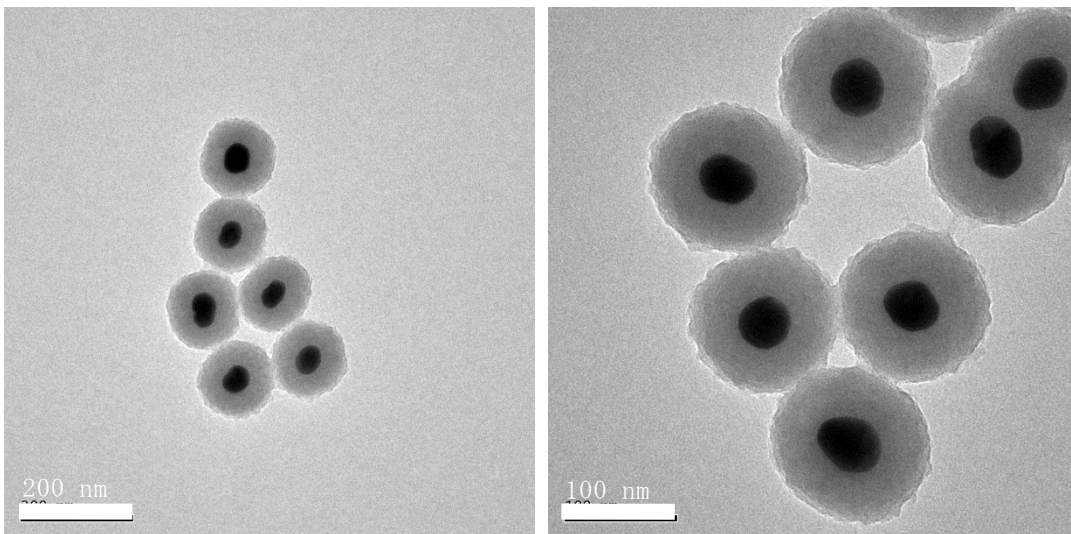
今回の場合もこれと同様の現象が生じたと考えられる。すなわち、コーティング回数を増やすに連れて、未反応のAPS或いはAPS-BHHCT-Eu<sup>3+</sup>由来の欠陥部位が増え、表面が粗くなっていく。また、その後のアミノ基修飾を行うと、粒径が30 nmほど大きくなり、表面が粗くなる。粒径の大幅な増大は、APS、TEOS、THPMPに由来するシリカシェルの重合である。また、表面粗さは、前述と同じ理屈であると考えられる。



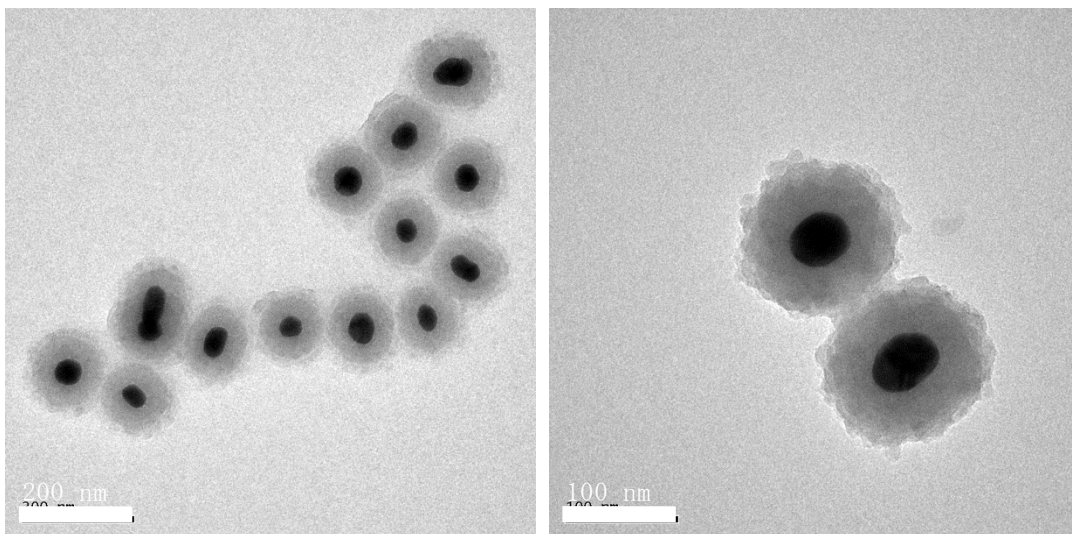
図(1)-87 色素層コーティング1回 (アミノ基修飾前)



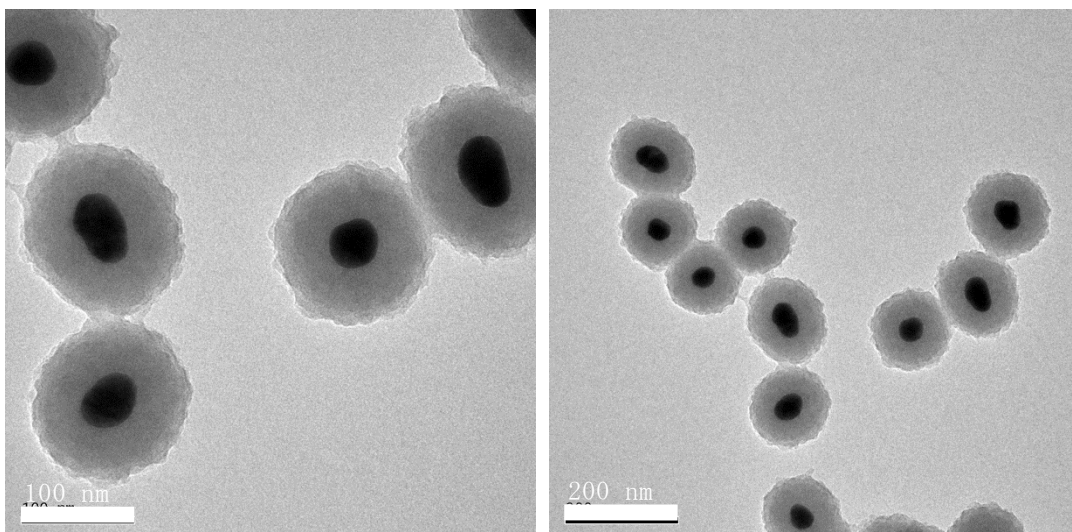
図(1)-88 色素層コーティング1回 (アミノ基修飾後)



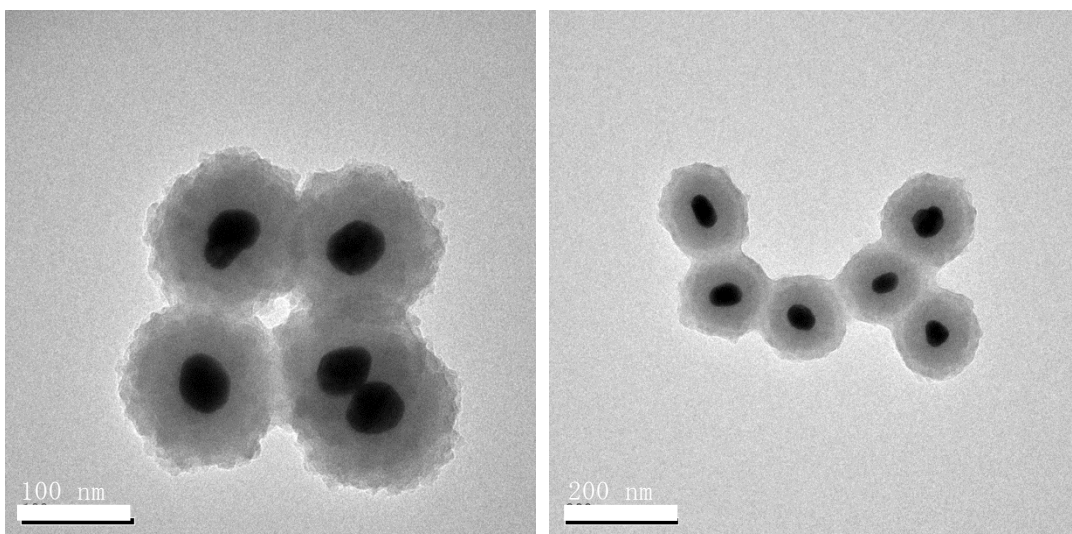
図(1)-89 色素層コーティング3回 (アミノ基修飾前)



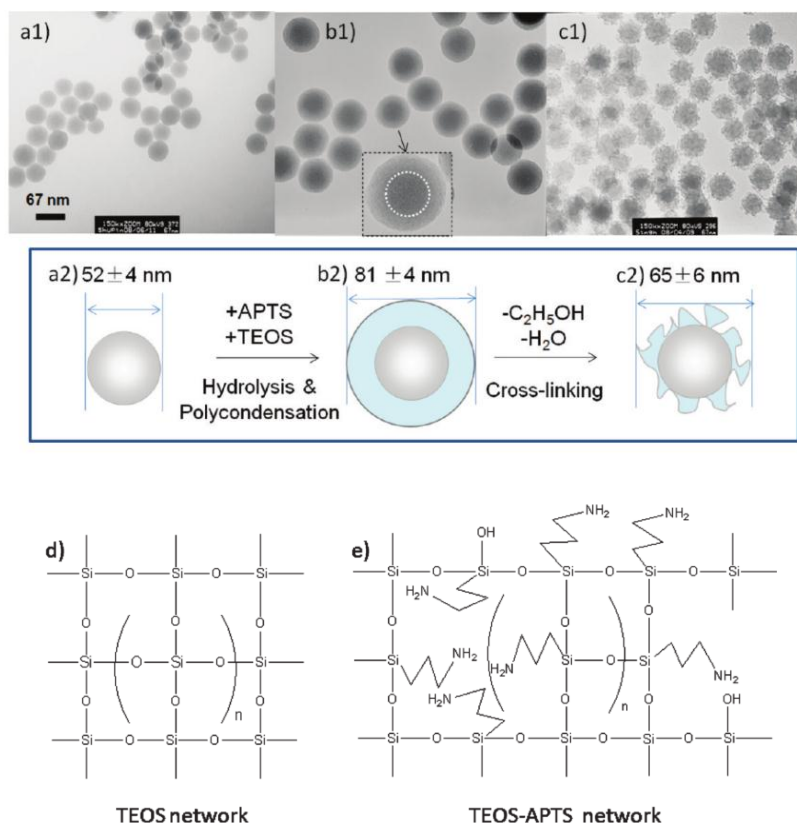
図(1)-90 色素層コーティング3回 (アミノ基修飾後)



図(1)-91 色素層コーティング5回 (アミノ基修飾前)



図(1)-92 色素層コーティング5回 (アミノ基修飾後)

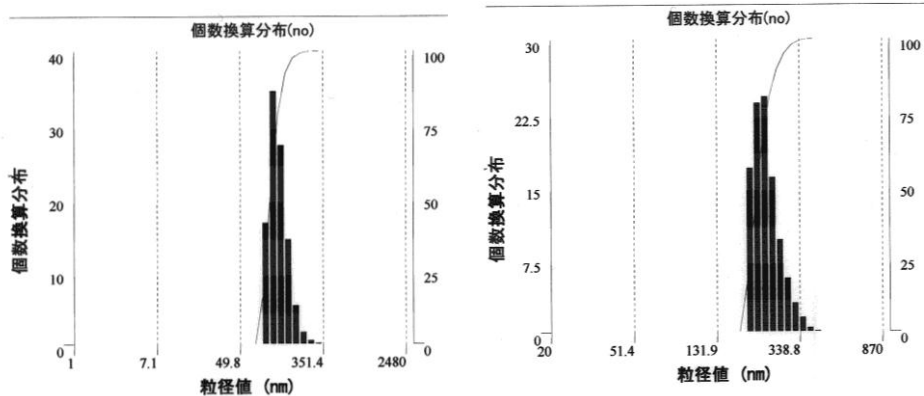
図(1)-93 APSとシリカ粒子の表面粗さ<sup>34)</sup>

## 【DLS】

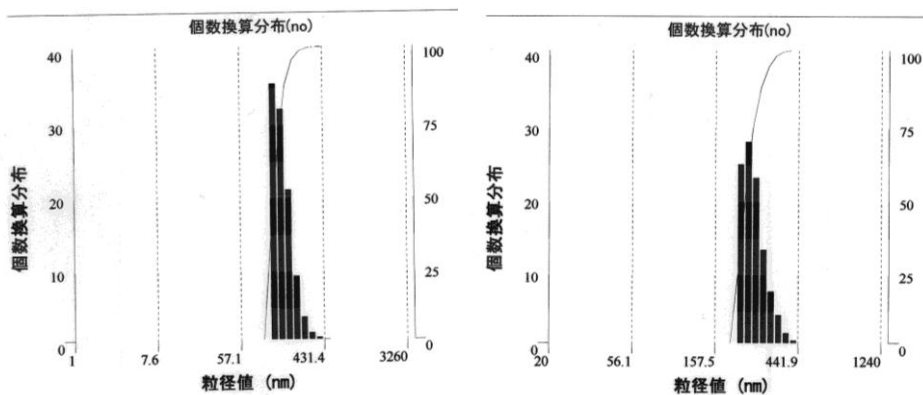
粒度分布のデータと、粒径を図(1)-94～図(1)-96に示す。アミノ基修飾を行うと、粒径が40 nm程度大きくなる。これは前述のとおり、APSそして共に共重合させているTEOS、THPMPによるものであると考えられる。それぞれ、色素層のコーティング回数を増やしても、あまり粒径に変化が出ず、凝集ピークも観察できないことが分かる。これは、色素を結合させたシランカップリング剤であるAPS-BHHCT-Eu<sup>3+</sup>がシラノール基となり、Si-O-Si結合を形成できる手が3本しか無いために、実際にはほぼ単層或いは数分子層しか粒子表面に重合しないためであると思われる。その後、同時に共重合させている極めて少量のTEOSが結合し、色素層に対して蓋をするような形で重合反応が起きる。このために、非常に薄い層しか形成されず、粒度分布に大きな変化が見られないと考えられる。

Table(1)-8 アミノ基修飾前後および色素コーティング回数による粒径の評価

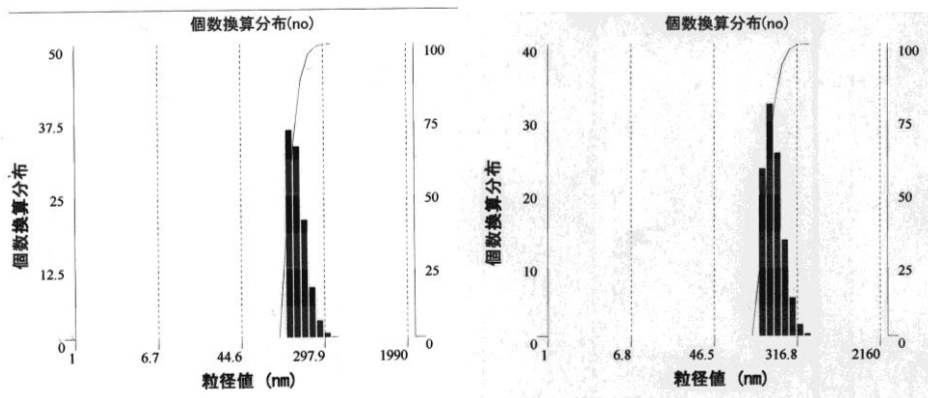
	Before - NH <sub>2</sub> coating	After - NH <sub>2</sub> coating
1 layer	128 ± 28 nm	172 ± 38 nm
3 layers	152 ± 38 nm	191 ± 43 nm
5 layers	156 ± 34 nm	177 ± 36 nm



図(1)-94 色素層コーティング1回での個数換算分布（左修飾前、右修飾後） in Milli-Q



図(1)-95 色素層コーティング3回での個数換算分布（左修飾前、右修飾後） in Milli-Q



図(1)-96 色素層コーティング5回での個数換算分布（左修飾前、右修飾後） in Milli-Q

### 【蛍光スペクトル】

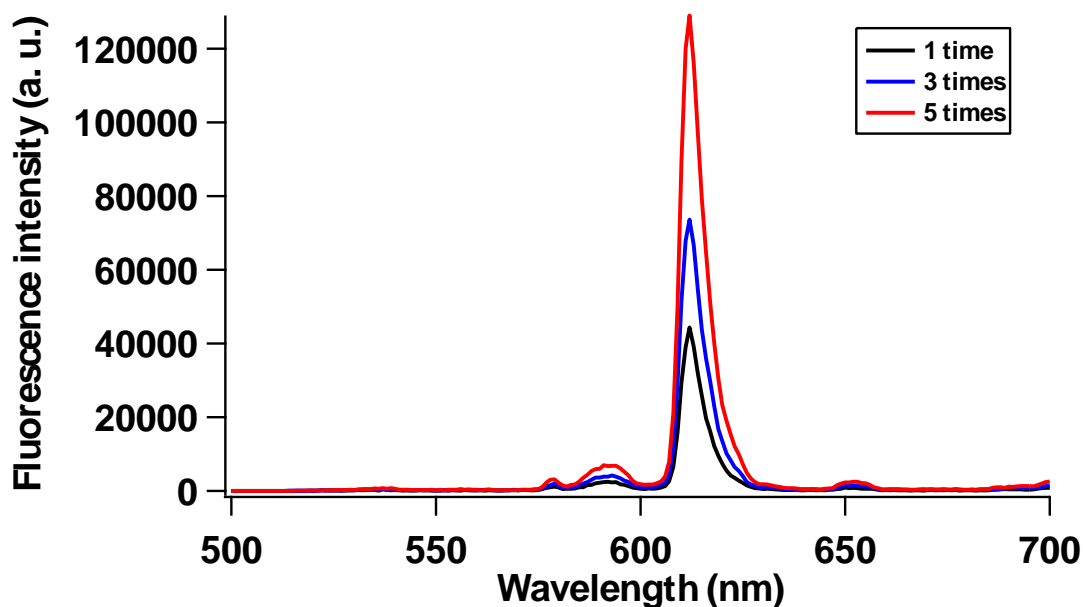
蛍光スペクトルを測定し、コーティング回数との相関を評価した。測定した蛍光スペクトルを図(1)-97に示す。コーティング回数が増えると、蛍光が増大していることがわかる。この時の粒子の濃度は、540 nmの吸収ピークが同じになるように濃度調整を行なっているため、凝集状態の変化により若干の差はあると考えられるが、ほぼ等しい。このため、この蛍光強度比は、そのまま粒子1個辺りの蛍光強度比を示しているといえる。

実際にピークである613 nmの蛍光強度を比較すると、以下のようになる。

$$1 / 3 / 5 \text{ layer (s)} = 1.00 / 1.66 / 2.91$$

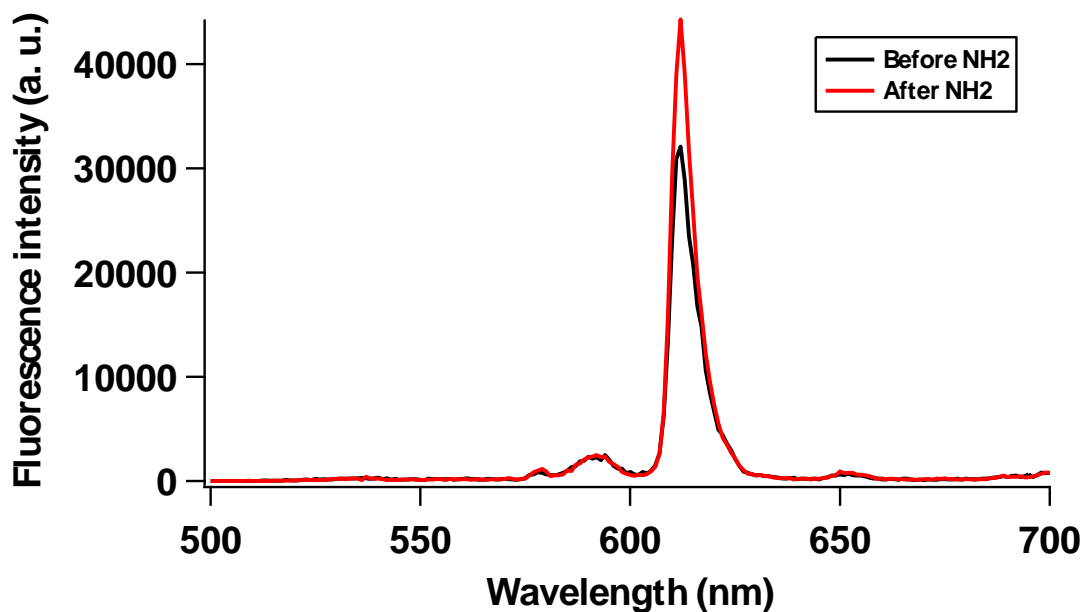
そのまま、線形の関係にならないのは、反応系に投入したAPS-BHHCT-Eu<sup>3+</sup>が全量粒子に結合しないためであると考えられる。色素層のコーティングを重ねてゆくと、末端が色素となる部分が増え、粒子表面の足場となるSi-OHの量が減る。このために、結合できる色素量がだんだんと減ってゆくと考えられる。

次に、アミノ基修飾前後での蛍光スペクトルの比較を行った。その蛍光スペクトルを図(1)-98に示す。色素層を1層コーティングしたものでは、修飾前後で蛍光強度が1.3倍ほど大きくなった。この現象は、色素層に対して、更にシリカシェルをコーティングすることで、色素の回転運動が抑制され、輝度が向上したためであると考えられる。<sup>35)-39)</sup>



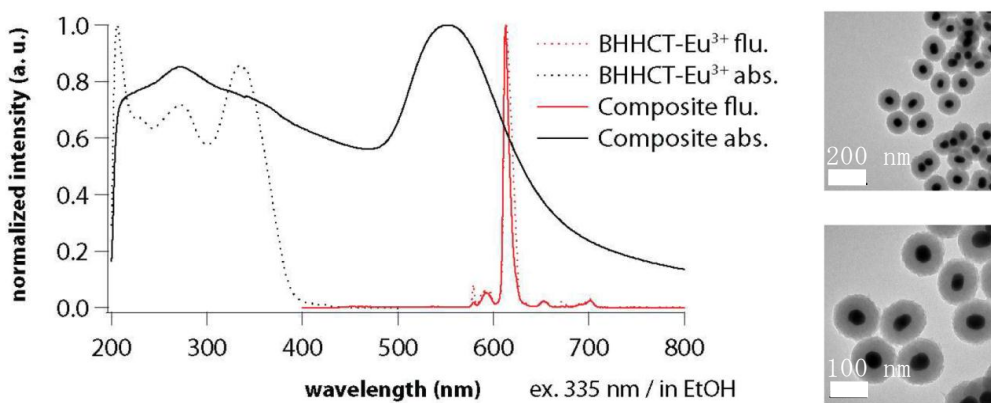
図(1)-97 色素層コーティング回数と蛍光スペクトル





図(1)-98 色素層1層に対するアミノ基修飾前後の吸収スペクトル

上記の検討により、最適化した粒子のTEM像と吸収・蛍光スペクトルを図(1)-99に示す。TEM像より、 $177 \pm 36$  nmの分散性の良い均一なコアシェル構造を持ったナノ粒子が合成できたことが判る。また、吸収スペクトルと蛍光スペクトルより、金ナノ粒子由来の540 nm付近の吸収(黒い実線)と、ユウロピウム錯体由来の615 nm付近の蛍光(赤い実線)、双方が存在することが確かめられた。吸収ピークはシャープであり、金ナノ粒子が凝集していないことがこのことから確かめられた。また、蛍光ピークもほぼBHHCT単体とほぼ同様である。



図(1)-99 合成したラベル化剤の吸収・蛍光スペクトルとTEM像

## b. イムノアッセイ

i. *Salmonella Typhimurium*に対するイムノアッセイ

最適化した5層コーティングのナノ粒子を用いて、*Salmonella Typhimurium*に対してイムノアッセイを行ったところ、濃度に応答した蛍光強度が得られた。(図(1)-100) このことから、今回合成したナノ粒子は、Anti-*Salmonella*にラベル化可能で、幅広く応用可能なイムノアッセイのためのラベル化剤であるといえる。

LODは以下のように得られた。

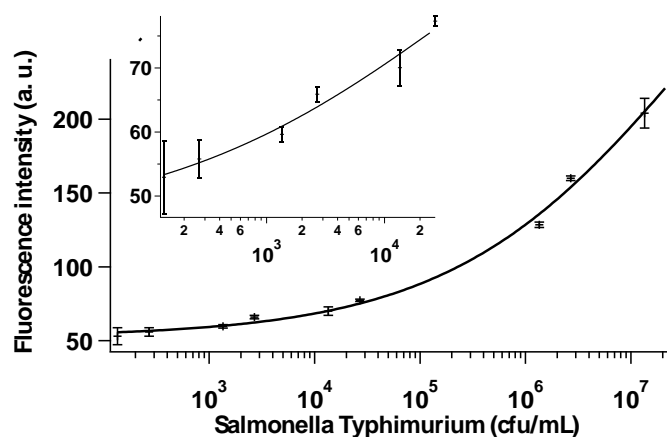
**LOD  $2.2 \times 10^3$  cfu/mL**

ここで得られた検出下限 $2.2 \times 10^3$  cfu/mLは、他の吸光、発光ELISA、QDイムノアッセイ、光ファイバを利用したイムノアッセイなど、高感度なラベル化剤・測定方法を利用したイムノアッセイの検出下限と比較しても優れている。

このことから、今回合成したラベル化剤は、モデル抗原のみならず、*Salmonella Typhimurium*のような細菌分析応用でも、非常に高感度かつ迅速測定を可能にする、優れたラベル化剤であるといえる。

Table(1)-9 先行研究で行われたイムノアッセイでの検出下限

Detection Methods	Platforms	LOD (cfu/mL)	Types	ref
免疫磁気分離法ELISA	Magnetic bead-Ab Ab-HRP	$10^5$ - $10^6$	Sandwich	40)
化学発光アレイIA	Ab array (Ab-HRP)	$10^6$ - $10^7$	Sandwich	41)
化学発光ELISA	Ab-HRP	$10^4$ - $10^5$	Sandwich	42)
フロー化学発光アレイ	Ab array (Ab-HRP)	$3 \times 10^6$	Sandwich	43)
蛍光多重分析アレイ	Ab-Cy5	$8 \times 10^4$	Sandwich	44)
量子ドットIA	Ab-QD	$10^4$	Sandwich	45)
FRET利用光ファイバ	Ab-Alexa Fluor 546/594	$10^3$	Direct	46)
CNT利用ELISA	Ab/SWCNTs/HRP	$10^3$	Direct	40)
	Ab-HRP	$10^6$	Direct	40)
CNT利用ELISA	Ab/SWCNTs/HRP	$10^4$	Sandwich	40)
	Ab-HRP	$10^6$	Sandwich	40)



図(1)-100 *Salmonella Typhimurium*に対するイムノアッセイ

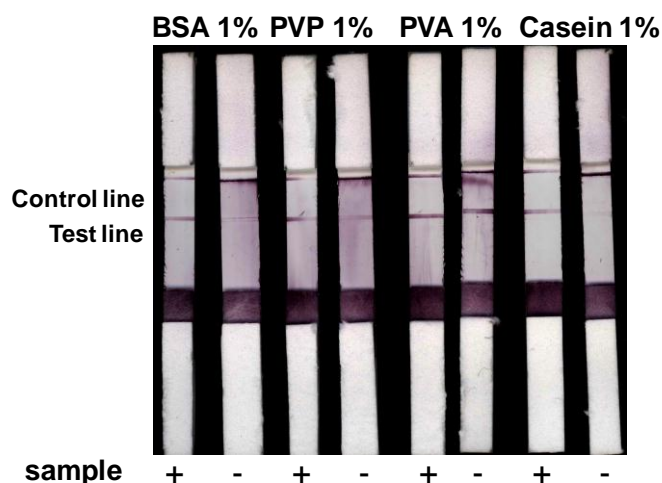
ii. ラテラルフローイムノアッセイ

ブロッキング剤の検討

検討はBSA (Bovine Serum Albumin)、PVP (Polyvinylpyrrolidone)、PVA (Polyvinyl alcohol)、Caseinの1%溶液 (in PBS Buffer, pH7.4, 0.1 M) の4種で行った。それぞれ、ブロッキングを行い、Mouse IgGのポジティブサンプル (10<sup>4</sup> ng/mL) とネガティブサンプル (0 ng/mL) を測定した。

図(1)-101より、BSA、PVP、PVAはかなり非特異吸着が多く、メンブレン全体が紫色 (金ナノ粒子の吸光色) に染まっていることが分かる。しかしながら、Caseinではその傾向がなく、メンブレンは比較的白い。また、ネガティブサンプルを流した時、PVAやPVPではかなりTest lineが呈色してしまっているが、Caseinではそれが見られない。

このことから、この系において最も優れたブロッキング剤はCaseinであると結論づけた。



図(1)-101 ブロッキング剤の検討

Mouse IgGに対するラテラルフローイムノアッセイ (LFIA)

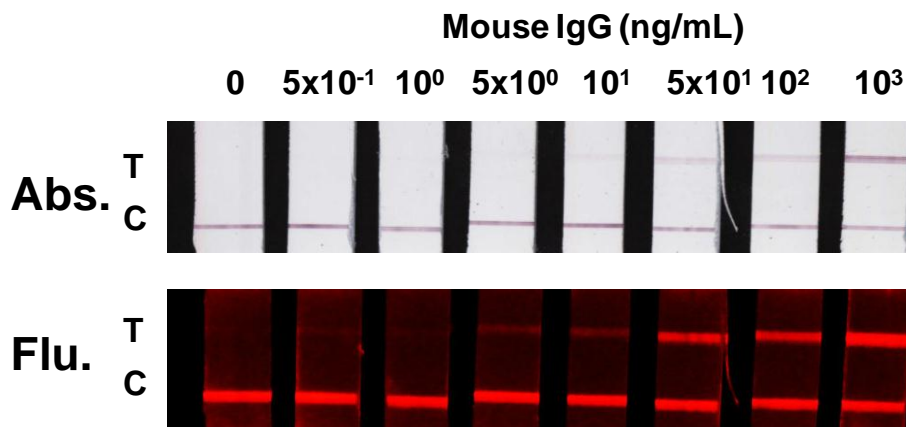
測定可能濃度範囲、LODは以下のようにになった。

目視	flu.	$10^0$ - $10^3$ ng/mL
	abs.	$10^1$ - $10^3$ ng/mL
RGB分析	flu.	0.59 ng/mL (LOD)
	abs.	2.56 ng/mL (LOD)

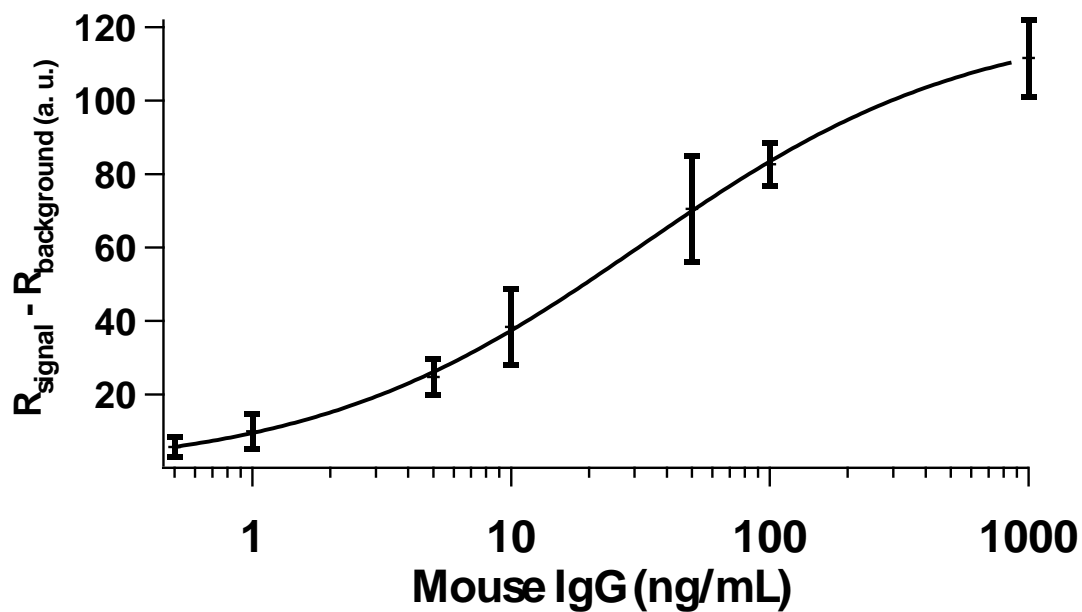
目視（図(1)-102）、RGB分析双方（図(1)-103, 104）において、吸収光より蛍光のほうが感度の良い分析を実現した。これは、蛍光のほうが一般的に吸収光より眼に見えやすいこと、また、蛍光色素の一粒子あたりの固定化量が非常に大きいため、金ナノ粒子の吸収光より大きなシグナルが得られたためと考えられる。

蛍光で得られた検出下限0.57 ng/mLは、Mouse IgGに対するLFIAの報告例が殆ど無いため、他の報告と比較しにくい。しかしながら、蛍光色素内包シリカナノ粒子を用いたMouse IgGに対する「マイクロプレート」での免疫アッセイの検出下限が0.31 ng/mL<sup>21)</sup>であるので、それと殆ど同じオーダーでの測定が「ラテラルフロー」で可能であった、ということは特筆すべきである。一般的に、ラテラルフロー免疫アッセイはマイクロプレート上での免疫アッセイに比べ、測定が非常に簡便であるが、感度が落ちることが知られている。

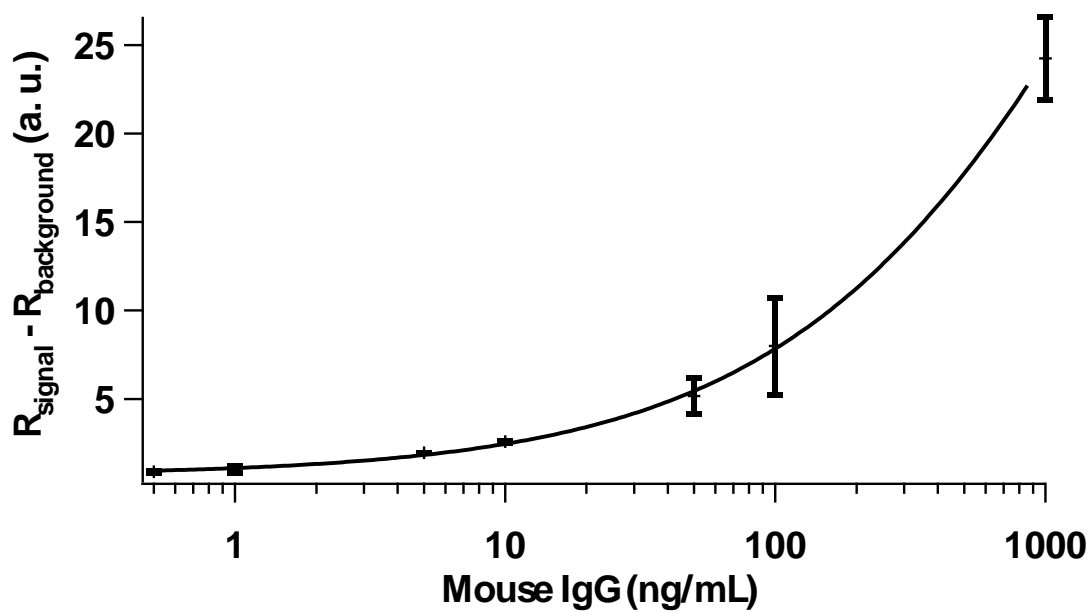
これより、今回合成したラベル化剤は、ラテラルフローにも応用可能であり、かつ非常に高感度な測定を実現することが確かめられた。



図(1)-102 Mouse IgGに対するLFIA（目視）



図(1)-103 Mouse IgGに対するLFIA (蛍光、RGB分析)



図(1)-104 Mouse IgGに対するLFIA (吸光、RGB分析)

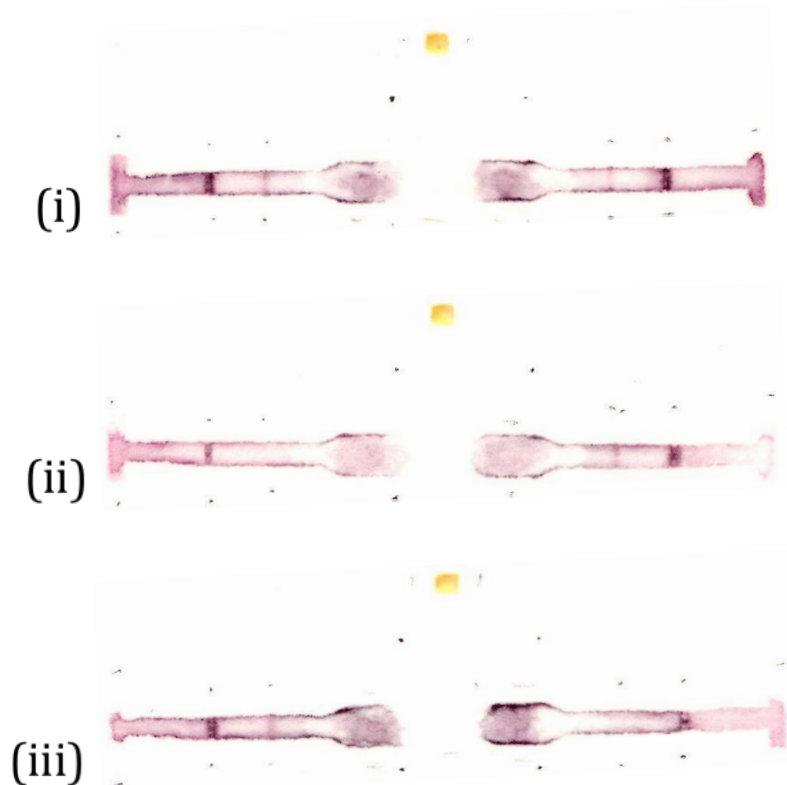
### (3) 環境検査のための安価な水質検査トータルシステムの開発

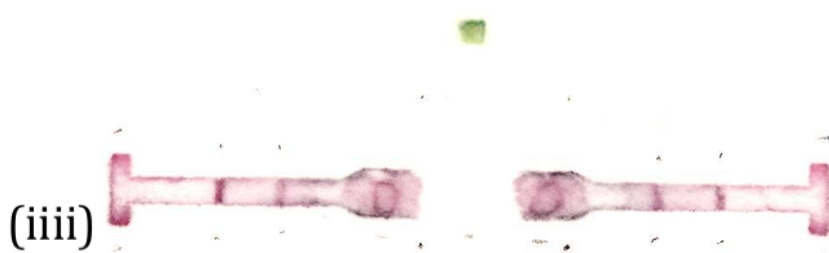
#### 1) イムノケミカルマルチセンシングチップの開発

##### a. イムノケミカルセンシングペーパーの評価

サンプルを滴下後の色変化をスキャンした画像を図(1)-105に示す。今回、サンプル滴下20分後のものをスキャンしたが、pHセンシングエリアでの色変化はサンプル滴下2.5分後には完結し、イムノセンシングエリアでは15から20分かかった。結果をみると、(ii)と(iii)よりマウスIgGとヒトIgGの選択性は維持できていることが確認できる。また、(i)と(iiii)から、イムノセンシングにおいては定性的にはpHの影響を受けずに、マウスIgGとヒトIgGの反応を得られることが確認できる。また、化学センシングエリアにおいてもpHの違いによる色変化が確認できる。

このように、本研究により、一台のインクジェットプリンタで、簡便に多項目同時イムノケミカルセンシングができる紙基盤検査チップの開発が行えることが示された。このセンシングメカニズムを利用することにより、化学センシングにおいては亜硝酸イオンセンシングや鉛イオンセンシングなど、生化学センシングではサルモネラセンシングやアトラジンセンシングなど、測定したい項目を組み合わせた環境分析ができ、容易な水質モニタリングが可能になるといえる。





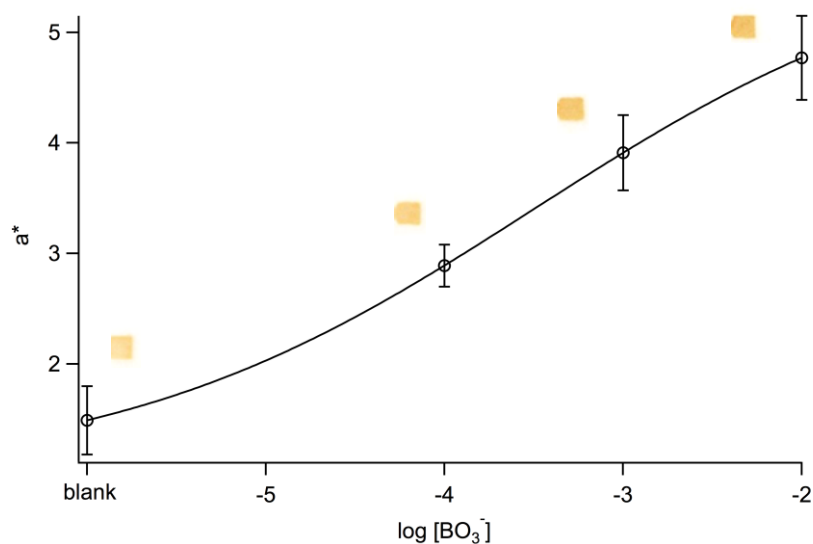
図(1)-105 サンプル滴下後のイムノケミカルセンシングチップ  
(上から順に、ヒトIgG—マウスIgG溶液 (pH6.0)、ヒトIgG溶液 (pH6.0)  
マウスIgG溶液 (pH6.0)、ヒトIgG—マウスIgG溶液 (pH9.0))

## 2) 多項目水質センシングチップの開発

### a. 色素溶液を使った簡易的なセンシングペーパーの開発

センシング結果を図(1)-106に示す。ホウ素イオンの濃度が高くなるほど、色が濃くなっていることがわかり、濃度に応じた変化を確認できる。また、印刷回数を54回とし、非常に多く試薬を印刷したことで、色素溶液であるにも関わらず色ムラを軽減できている。

次に、より正確な測定を行うためにデジタルカラーアナリシスを行った。その結果、相関を得られ、特に $a^*$ で最も良い相関を得られた。また、この時の検出下限は $0.3 \times 10^{-4}$ であった。



図(1)-106 ホウ素センシングの結果

## b. マルチセンシングチップの開発

実際に作製したマルチセンシングチップを図(1)-107に示す。このマルチセンシングを用いて評価を行った。本研究では、確実に目視で色変化を確認するために、滴下する溶液中に含まれるイオンの濃度は、環境基準より高い値を用いた。一方、フッ素に関しては、この濃度において他のイオンと難溶性の塩を形成するため、別のセンシングチップで測定を行った。サンプル滴下後のセンシングチップを図(1)-108に示す。バッファーのみの場合と比較して、 $\text{Cu}^{2+}$ は水色、 $\text{BO}_3^{3-}$ は濃い黄色、 $\text{Cd}^{2+}$ は暗い紫色、 $\text{Ca}^{2+}$ は紫色、 $\text{Pb}^{2+}$ は赤色、 $\text{F}^-$ は桃色と変化し、それぞれのイオンに対応して試薬の色が変化していることが目視で確認できた。また、本研究で用いた濃度では目視で十分に色変化を確認できたため、pHを一定にして実験を行ったが、流路上にバッファーの塩をあらかじめ印刷しておくことで、pH調整を行い、より高感度な測定を行うことも可能である。また、同様にマスキング剤を印刷することで、より選択性の高い検出も行うことができる。本研究より、今回作製したマルチセンシングチップは、一度に多項目の同時センシングが可能であることが示唆される。



図(1)-107 作製したマルチセンシングチップ



図(1)-108 センシング結果 (左からバッファー、サンプルA、サンプルB)

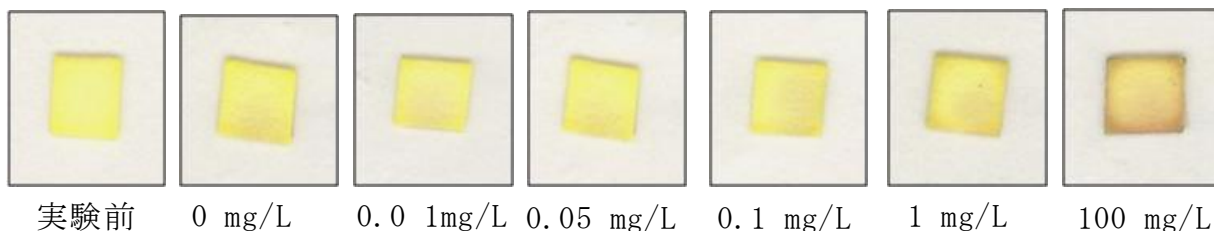
Table(1)-10 主なイオンの水質基準および本研究での検出下限

	水道水質基準	排水基準	Merckoquant 試験紙	ペーパーチップ LOD
$\text{NO}_2^-$	全窒素量で 10 mg/L以下( $7.1 \times 10^{-4}\text{M}$ )	全窒素量で 100mg/L( $71 \times 10^{-4}\text{M}$ )	0.5 mg/L ( $1.1 \times 10^{-5}\text{M}$ )	$1.2 \times 10^{-5}\text{M}$
$\text{Pb}_2^+$	0.01 mg/L( $4.8 \times 10^{-8}\text{M}$ )	0.1 mg/L( $0.5 \times 10^{-6}\text{M}$ )	20 mg/L ( $97 \times 10^{-6}\text{M}$ )	$8.5 \times 10^{-6}\text{M}$
$\text{Cu}_2^+$	1.0 mg/L( $1.6 \times 10^{-5}\text{M}$ )	3.0 mg/L( $4.7 \times 10^{-5}\text{M}$ )	10 mg/L ( $16 \times 10^{-5}\text{M}$ )	$4.1 \times 10^{-5}\text{M}$
$\text{F}^-$	0.8 mg/L( $4.2 \times 10^{-5}\text{M}$ )	8.0 mg/L( $4.2 \times 10^{-4}\text{M}$ )	-	-
$\text{BO}_3^-$	1.0 mg/L( $9.2 \times 10^{-5}\text{M}$ )	10 mg/L( $9.2 \times 10^{-4}\text{M}$ )	-	$0.3 \times 10^{-4}\text{M}$



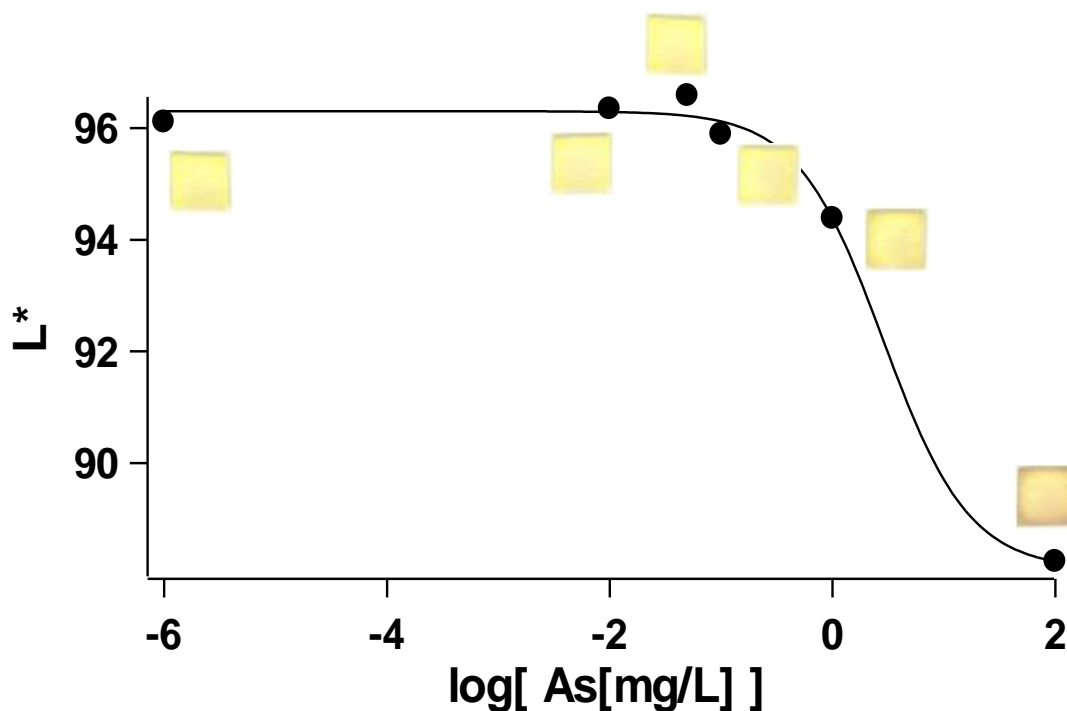
## 3) ヒ素センシングペーパーの開発

センシングの結果を図(1)-109に示す。結果から、100 mg/Lであればろ紙が全体的に色変化していることがわかる。また、色変化を目視で確認でき、目視での検出下限はおよそ1mg/L程度だといえる。



図(1)-109 ろ紙の色変化

ヒ素が含まれないサンプルでも色が変わってしまったが、ろ紙の色変化を客観的かつ定量的に判定し、さらに正確な評価を行うために、デジタルカラーアナリシス(DCA)を用いてろ紙の色変化の評価を行った。CIE L\*a\*b\*を利用し、中でもろ紙の色変化とよく相関関係が見られたL\*の値とAs(Ⅲ)の濃度の関係を図(1)-110に示した。この結果より、検出下限は0.1mg/L~1mg/Lの間で、目視での判断より高感度でヒ素を検出できた。



図(1)-110 ろ紙上での色変化におけるDCAの結果

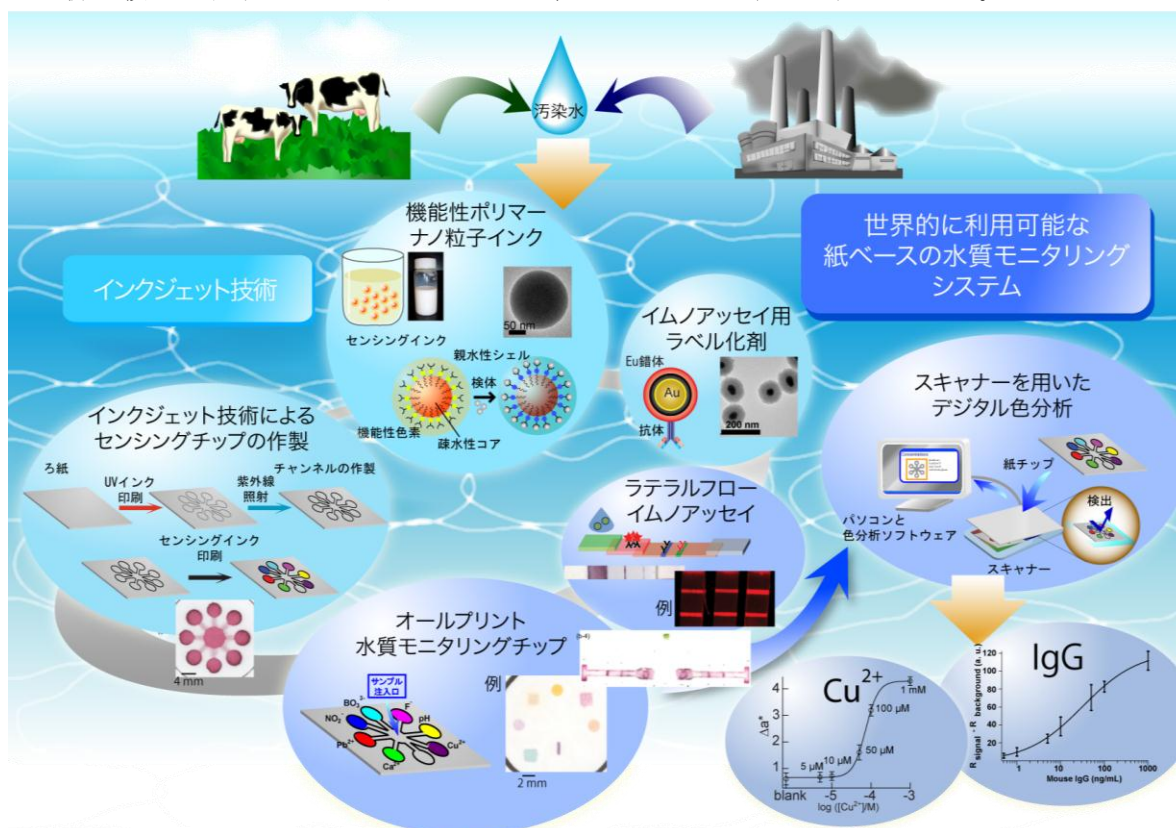
## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

- 1) 環境中の水質検査チップにおける検査試薬としてのポリマーナノ粒子状化学センシングインクを数種開発できた。
- 2) 安価で高性能の水質検査チップのマイクロ流路を、市販のインクジェットプリンタで、有機溶媒を用いずに作製する方法が確立できた（紫外線硬化インクが開発された）（図(1)-111）。
- 3) 金コア・ユウロピウム錯体内包シリカシェル複合体の設計と合成を行い、新規高感度ラベル化剤が開発できた。その有用性を確かめたところ、極めて高感度な測定が可能であるとされる化学発光ELISAよりも高感度で測定が行えることが確かめられた。
- 4) マルチセンシングチップとして、一度にケミカルセンシング（色変化のケミカルセンサー）とバイオセンシング（ラテラルフローイムノセンサー）の多項目の同時センシングが可能な安価な紙ベースのセンサーが作製できた。
- 5) 目視およびスキャナーを用いたデジタルカラーアナリシスにより、定量が可能な水質検査センサーが1台のインクジェットプリンタにより作製できることを実証した

### (2) 環境政策への貢献

研究結果は、ペーパーを用いる簡易なマイクロフルイディックセンサーデバイスの大量生産を可能にする。また、このような簡易なセンサーデバイスを用いることで、その場で簡便に水質検査や排水検査を行うことが可能になるため、グローバルな利用が見込まれる。



図(1)-111 ペーパーベースオールインクジェットプリント水質検査チップの概略図

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) K. Abe, K. Kotera, K. Suzuki, D. Citterio: *Anal. Bioanal. Chem.*, **398**, 885-893 (2010).  
“Inkjet-printed paperfluidic immuno-chemical sensing device”
- 2) D. Citterio, K. Maejima, K. Suzuki: *Proc. MicroTAS 2011*, 2099-2101 (2011).  
“VOC-Free inkjet patterning method for the fabrication of paperfluidic sensing devices”

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 阿部光司、小寺香織、鈴木孝治、チッテリオ・ダニエル: 日本分析化学会第58年会、展望とトピックス, 19(2009)  
「インクジェットプリンターで生化学検査紙をつくる」

### (2) 口頭発表(学会等)

- 1) D. Citterio, K. Abe, K. Kotera, Y. Kameoka, T. Ii, and K. Suzuki: Pittcon 2010, Orlando, USA, 2010.  
“Chemical sensors and immunosensors fabricated by inkjet printing”
- 2) D. Citterio, K. Suzuki: Pacifichem 2010, Honolulu, USA, 2010.  
“Chemical sensors and immunosensors fabricated by inkjet printing”
- 3) D. Citterio, K. Abe, T. Ii, K. Kotera, Y. Katayama, S. Imoto, K. Maejima, K. Suzuki: Pittcon 2011, Atlanta, USA, 2011. (招待講演)  
“Nanoparticle-based (bio)chemical sensing inks for inkjet printed paperfluidic devices”
- 4) 前島健人・伊井智明・鈴木孝治・Citterio Daniel: 日本化学会第91春季年会、神奈川大学横浜キャンパス、2011.  
「UVインクを用いた紙ベースマイクロ流体チップの作製」
- 5) D. Citterio, K. Abe, T. Ii, K. Kotera, Y. Kameoka, Y. Katayama, K. Maejima, S. Imoto, A. Morita, K. Suzuki:  
International Conference on Analytical Sciences (ICAS), Kyoto, Japan, 2011.  
(招待講演)  
“(Bio)chemical sensing inks and inkjet printers: an approach to low-cost (bio)chemical sensors”

- 6) D. Citterio, K. Maejima, K. Suzuki: MicroTAS, Seattle, USA, 2011.  
“VOC-free inkjet patterning method for the fabrication of paperfluidic sensing devices”
- 7) D. Citterio: Society for Chemistry and Micro-Nano Systems (CHEMINAS), Osaka, Japan, 2011.  
(招待講演)  
“Inkjet printing and paper: a different approach to microfluidic devices”
- 8) D. Citterio: 産総研第6回ナノバイオデバイスワークショップ, つくば, 2012. (招待講演)  
“Inkjet-printed microfluidic devices made from paper”
- 9) D. Citterio, K. Maejima, B. Guirao, N. Komuro, S. Imoto, Y. Katayama, K. Suzuki: Pittcon 2012, Orlando, USA, 2012.  
“Inkjet printing for simple and rapid fabrication of microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs)”
- 10) D. Citterio: 電気化学会第79回大会、第53回化学センサー研究発表会、浜松、2012.  
(招待講演)  
“Microfluidic paper-based analytical devices (microPADS) fabricated by inkjet printing technology.”
- 11) D. Citterio: Asia-Pacific Conference on Analytical Sciences, Manila, Philippines, 2012  
(招待講演)  
“Inkjet printing: a versatile approach to low-cost microfluidic (bio)chemical sensors”

### (3) 出願特許

- 1) 前島健人、伊井智明、鈴木孝治、チッテリオ ダニエル: 学校法人慶應義塾; 「紙ベース反応用チップ及びその製造方法」、特願2011-113638 (平成23年5月20日)、PCT/JP2012/056086 (平成24年3月9日)

### (4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

特に記載すべき事項はない。

### (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

### (6) その他

特に記載すべき事項はない。

## 8. 引用文献

- 1) P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam, B. H. Weigl, *Nature* **442**,

- 412-418 (2006).
- 2) H. Hisamoto, Y. Nakashima, C. Kitamura, S. i. Funano, M. Yasuoka, K. Morishima, Y. Kikutani, T. Kitamori, S. Terabe, *Anal. Chem.* **76**, 3222-3228 (2004).
  - 3) T. G. Henares, M. Takaishi, N. Yoshida, S. Terabe, F. Mizutani, R. Sekizawa, H. Hisamoto, *Anal. Chem.* **79**, 908-915 (2007).
  - 4) A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.* **46**, 1318-1320 (2007).
  - 5) A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas, H. Sindi, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **80**, 3699-3707 (2008).
  - 6) B. J. de Gans, S. Hoepfner, U. S. Schubert, *J. Mater. Chem.* **17**, 3045-3050 (2007).
  - 7) K. Abe, K. Suzuki, D. Citterio, *Anal. Chem.* **80**, 6928-6934 (2008).
  - 8) K. Abe, K. Kotera, K. Suzuki, D. Citterio, *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 885-893 (2010).
  - 9) S. M. Borisov, T. Mayr, I. Klimant, *Anal. Chem.* **80**, 573-582 (2008).
  - 10) H. Kawaguchi, Y. Isono, S. Tsuji, *Macromol. Symp.* **179**, 75-87 (2002).
  - 11) S. Tsuji, H. Kawaguchi, *Langmuir* **20**, 2449-2455 (2004).
  - 12) S. Tsuji, H. Kawaguchi, *Langmuir* **21**, 2434-2437 (2005).
  - 13) S. Tsuji, H. Kawaguchi, *Langmuir* **21**, 8439-8442 (2005).
  - 14) E. Bakker, P. Buhlmann, E. Pretsch, *Chem. Rev.* **97**, 3083-3132 (1997).
  - 15) K. Seiler, W. E. Morf, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Sci.* **5**, 557-561 (1989).
  - 16) M. Telting-Diaz, E. Bakker, *Anal. Chem.* **74**, 5251-5256 (2002).
  - 17) M. Tan, Z. Ye, G. Wang, J. Yuan, *Chem. Mater.* **16**, 2494-2498 (2004).
  - 18) Z. Ye, M. Tan, G. Wang, J. Yuan, *J. Mater. Chem.* **14**, 851-856 (2004).
  - 19) M. Tan, G. Wang, X. Hai, Z. Ye, J. Yuan, *J. Mater. Chem.* **14**, 2896-2901 (2004).
  - 20) H. Jiang, G. Wang, W. Zhang, X. Liu, Z. Ye, D. Jin, J. Yuan, Z. Liu, *J. Fluoresc.* **20**, 321-328 (2010).
  - 21) V. Gubala, X. Le Guevel, R. Nooney, D. E. Williams, B. MacCraith, *Talanta* **81**, 1833-1839 (2010).
  - 22) E. Hirayama, T. Sugiyama, H. Hisamoto, K. Suzuki, *Anal. Chem.* **72**, 465-474 (2000).
  - 23) A. Chaabouni, V. Massardier-Nageotte, B. Elleuch, M. M. Chehimi, A. Elaissari, *e-Polymers* **15**, 1-10 (2010).
  - 24) Y. Chonde, I. M. Krieger, *J. Appl. Polym. Sci.* **26**, 1819-1827 (1981).
  - 25) 辻早希子, 『環境応答特性を有するヘア粒子の創製と機能評価』, 慶應義塾大学大学院理工学研究科修士論文(2003).
  - 26) Tsuji, S.; Kawaguchi, H. *Macromolecules* **39**, 4338-4344 (2006).
  - 27) 監修:川口春馬『コアシェル微粒子の設計・合成技術・応用の展開』シーエムシー出版 (2010).
  - 28) 監修:川口春馬『ナノ粒子・マイクロ粒子の最先端技術』シーエムシー出版 (2004).
  - 29) 監修:蓮池幹治 他『7ラジカル重合ハンドブック』株式会社エヌ・ティー・エス (2010).
  - 30) 日本水道協会『WHO飲料水ガイドライン』 (2004).
  - 31) 日本環境管理学会『改訂4版 水道水質基準ガイドブック』丸善株式会社 (2009).

- 32) J. Ghasemi, Sh. Ahmadi, K. Torkestani, *Anal. Chim. Acta*, **487**, 181-188 (2003).
- 33) 上本道久『分析化学における測定値の正しい取り扱い方』, 新日本印刷(株) (2011).
- 34) S. Xu, S. Hartvickson, J. X. Zhao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **3**, 1865-1872 (2011).
- 35) H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, U. Wiesner, *Nano Lett.* **5-1**, 113-117 (2005).
- 36) A. Burns, H. Ow, U. Wiesner, *Chem. Soc. Rev.* **35**, 1028-1042 (2006).
- 37) E. Herz, A. Burns, D. Bonner, U. Wiesner, *Macromol. Rapid Commun.* **30**, 1907-1910 (2009).
- 38) D. R. Larson, H. Ow, H. D. Vishwasrao, A. A. Heikal, U. Wiesner, W. W. Webb, *Chem. Mater.* **20**, 2677-2684 (2008).
- 39) E. Herz, T. Marchincin, L. Connelly, D. Bonner, A. Burns, S. Switalski, U. Wiesner, *J Fluoresc.* **20**, 67-72 (2010).
- 40) L. P. Mansfield, S. J. Forsythe, *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 279-283 (2000).
- 41) N. Karoonuthaisiri, R. Charlermroj, U. Uawisetwathana, P. Luxananil, K. Kirtikara, O. Gajanandana, *Biosens. Bioelectron.* **24**, 1641-1648 (2009).
- 42) M. Magliulo, P. Simoni, M. Guardigli, E. Michelini, M. Luciani, R. Lelli, A. Roda, *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4933-4939 (2007).
- 43) A. Wolter, R. Niessner, M. Seidel, *Anal. Chem.* **80**, 5854-5863 (2008).
- 44) C. R. Taitt, Y. S. Shubin, R. Angel, F. S. Ligler, *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 152-158 (2004).
- 45) L. Yang, Y. Li, *Analyst* **131**, 394-401 (2006).
- 46) S. Ko, S. A. Grant, *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1283 (2006).

## **Development of Low-cost and Simple All-Inkjet-Printed Water Quality Monitoring Chip Using Nanoparticle-based Chemical Sensing Inks**

Principal Investigator: Daniel CITTERIO

Institution: Department of Applied Chemistry, Keio University  
3-14-1, Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama 223-8522, JAPAN  
Tel/Fax : +81-45-566-1568  
E-mail : citterio@aplc.keio.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Inkjet printing, nanoparticles, microfluidics, immunochromatography, ion sensing

In industrialized nations, the risks associated with water pollution have been recognized, and countermeasures for prevention and for treatment of wastewater have been implemented. In developing countries however, a different situation is encountered. Although the risks related to water pollution are known, neither technical means, nor financial resources for its control and prevention are available. Conventional analytical techniques for water quality monitoring were designed for an infrastructure normally not available in developing countries.

Microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs) have drawn attention as low-cost, portable and simple to use alternatives of conventional analytical systems, in particular for use in low infrastructure environments, such as for example found in developing countries or in remote field use.

Inkjet printing is a particularly useful tool for the fabrication of  $\mu$ PADs, because it is the only method applicable for both the creation of the microfluidic structure on the paper substrate and for the deposition of the reagents required for (bio)chemical sensing.

(Bio)chemical sensing inks are inkjet printable aqueous dispersions of functional polymeric nanoparticles (NPs). Chromogenic reagents required for chemical sensing have been encapsulated into the core or immobilized onto the surface of newly developed NPs. NPs included structures with a hydrophobic core for the encapsulation of hydrophobic metal ion indicators and a hydrophilic shell to achieve dispersion stability in water. Alternatively, linear hydrophilic carboxylic acid functionalized chains have been grafted on the surface of hydrophobic cores, allowing the covalent immobilization of amino group carrying sensing reagents. In a further approach, particles with positive surface charges were prepared and used for the immobilization of anionically charged chromogenic indicators.

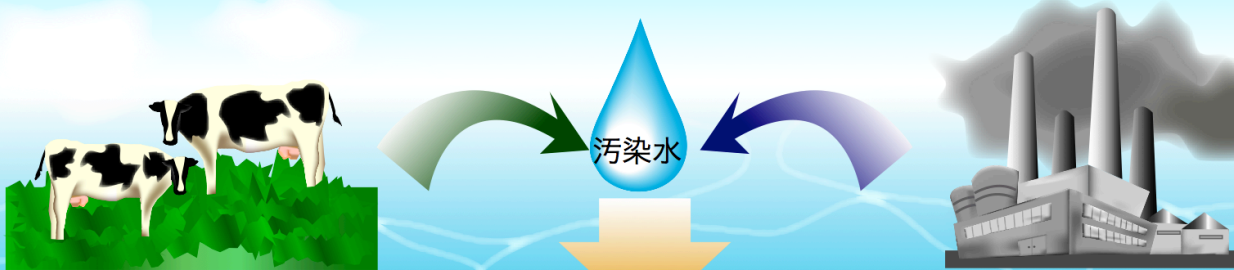
We have demonstrated for the first time an immunochromatographic sensor entirely fabricated by inkjet printing on a single piece of filter paper. In addition, a novel fluorescent labeling nanoparticle for antibodies has been developed and applied for immunosensing. Detection limits achieved were as low as those obtained with more work- and time-consuming ELISA approaches.

By developing a novel UV-curable ink based on a highly hydrophobic monomer mixture, we have achieved an inkjet paper patterning method, which does not use any volatile organic compounds (VOCs), and which is compatible with standard available printers.

Finally, combining the (bio)chemical sensing inks and the VOC-free paper patterning method, we have realized a  $\mu$ PAD for the simultaneous detection of multiple analytes relevant for water quality monitoring. The entire device can be fabricated on a single standard inkjet printer.



# B-0912 化学センシングナノ粒子創製による簡易型オールプリント水質検査チップの開発



世界的に利用可能な  
紙ベースの水質モニタリング  
システム

インクジェット技術

