様式 C -19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　21 年　6 月　5 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19760575
研究課題名（和文）　マイクロ加工技術を応用した現場型金属イオン定量分析装置の開発と実海域展開
研究課題名（英文）　Development and field application of in situ metal ion quantitative analysis system with microfabrication technique
研究代表者
福場　辰洋（FUKUBA TATSUHIRO）
東京大学・生産技術研究所・特任准教授
研究者番号：80401272

研究成果の概要：
本研究は、海洋の現場においてマンガンに代表される金属イオンを高感度に定量分析することのできる装置の開発と実海域への展開を目指したものである。ルミノール反応を用いた発光による金属イオン定量機能、競合金属イオンの除去機能を全て超小型のマイクロ流体デバイス上に集積化し、実際にマンガンイオンの定量が可能であることがわかった。また、送液系・光検出系と組み合わせ、現場で運用可能なプロトタイプ装置を完成させた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：工学
科研費の分科・細目：総合工学・船舶海洋工学
キーワード：環境分析、海洋探査、深海環境、マイクロ・ナノデバイス、海洋科学

1．研究開始当初の背景

海洋環境における物質循環に関する情報を得るためには、海水成分の分析が必要である。特に金属イオンなど、海底からの熱水噴出に関連する物質の定量的な分析は極めて重要である。本研究開始当初までに、海洋の現場において連続的に金属イオン分析を行うことのできる装置が開発・運用されてきたが、今後さらなる小型化や・多成分分析を行うなどの多機能化が求められていた。

一方で、「マイクロ流体デバイス」と呼ばれる超小型の分析装置については、近年国内外各地で盛んに研究が行われるようになっていた。しかし、そのほとんどが医療・製薬分野への応用や卓上での生化学分析操作を高速・自動化することを目的としており、海洋に代表されるような屋外環境、しかも深海などの極限的な環境下で使用することを想定した研究例はほとんど無かった。以上の様な背景のなかで、研究代表者のグループではマイクロ流体デバイスを積極的に応用して「現場型微生物遺伝子解析装置」の開発に取り組んできており，実海域における評価実験を通して、その有用性が確認されつつあった。

２．研究の目的

本研究の目的は、マイクロ流体デバイスを応用することで、深海も含む海洋環境において使用可能な超小型の「現場型金属イオン定量分析装置」を開発し、その性能を評価することである。定量分析の対象としては熱水活動のマーカ物質であるマンガンイオンとする。高水圧・低温の極限環境において、連続的な金属イオン定量分析が可能な装置を実現する。

３．研究の方法

本研究ではまず、マンガンイオンの高感度な定量分析を実現するために、「ルミノール反応」を用いた。また、ルミノール反応において主な競合イオンである鉄イオンをサンプルから除去するために、キレート樹脂を用いることとした。そこで、ルミノール反応及びキレート樹脂による鉄イオンの除去機能を有するマイクロ流体デバイスを設計し、マイクロファブリケーション（微細加工）技術を応用して製作した。マイクロ流路の材料としては光透過性に優れ、反転型を用いた微細構造の製作が容易（PDMS:polydimethylsiloxane）を採用した。基板としてはガラス板を用いた。PDMSとガラスは酸素プラズマ処理を施した後に永久接合した。接合後に、溶液導入用のチューブを取り付け、またキレート樹脂カラムを充填してマイクロ流体デバイスを完成させた。

キレート樹脂は、ビニル重合体（TSK HW-75(F)）上に有機合成によって8-キノリノールを付加することで製作した。

製作したマイクロ流体デバイス内における試薬の混合状況や鉄イオンの除去、マンガンイオンの定量性能について、卓上型シリンジポンプ、バルブ、顕微鏡及び光電子増倍管などを用いて卓上評価を行った。発光強度データはPCに記録した。また、小型で且つ油漬状態において海中環境で使用可能なポンプ・バルブからなる送液系、耐圧容器内に収納可能な光検出系を構築し、現場型装置のプロトタイプを製作した。

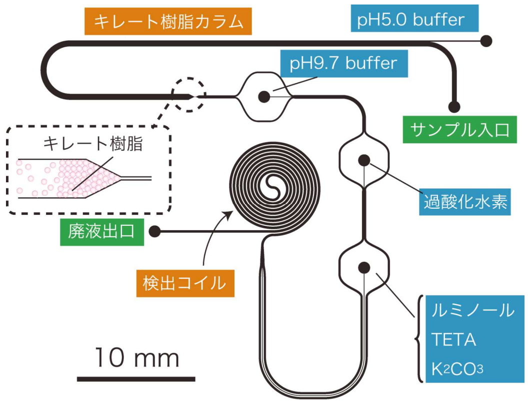

図１　マイクロ流体デバイスの構造

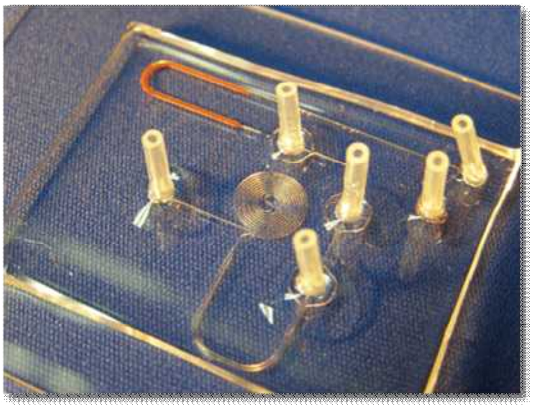

図２　マンガン定量用マイクロ流体デバイス

４．研究成果

本研究ではまず、現場型金属イオン定量分析装置の中核となるマイクロ流体デバイスについて，主に感光性樹脂を用いた鋳型構造の製作と透明シリコーンゴムの型取り法を応用して，設計・製作を行った。具体的には，マンガンイオン（Mn^{2+}）定量の為のルミノール反応に必要な溶液の混合を確実、かつ効率的に行うことのできるマイクロ流路の設計を行った。微弱な発光を効率よく検出するための光検出用のマイクロ流路構造についても最適化した。その結果、図１に示すよ

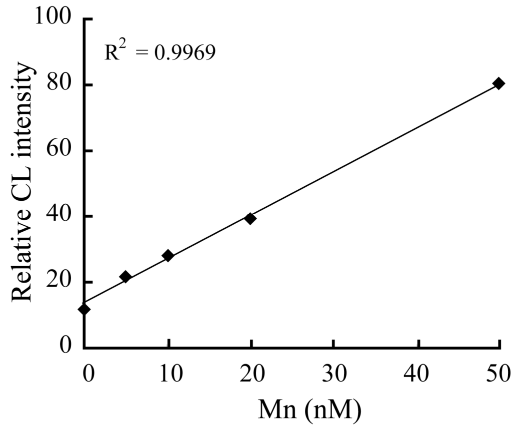

図３　マンガン定量評価の結果

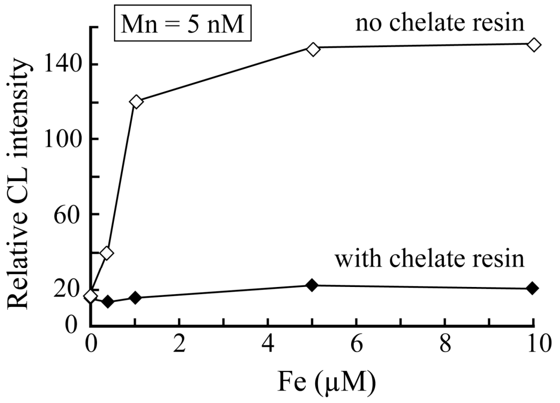

図4　鉄イオン除去カラムの性能評価の結果

うなマイクロ流体デバイスを設計した。ルミノール反応に必要な溶液がそれぞれの溶液入口から導入され、次々に海水サンプルと混合される。始めにpH調整用バッファと混合された後に、鉄イオン除去用のキレート樹脂が充填されたカラム部を通過する。その後再度pHを調節し、過酸化水素、ルミノール溶液と順次混合され、最後にコイル状の発光検出部に到達する。発光を終えた溶液は廃液出口から排出される。マイクロ流路の幅は50μm～500μm、深さは200μmとした。キレート樹脂カラム部は多くの樹脂を保持するために太い流路で構成されており、終端部は直径50μmのキレート樹脂をせき止めるために10μmまで絞り込んである。各試薬の導入部は上流からの溶液が分岐した後、新たに導入された溶液を挟むように合流する「sprit-merge」構造とした。これにより、試薬成分の拡散による混合を促進することができた。発光検出用のコイル状マイクロ流路の大きさは、光検出に用いる光電子増倍管の受光部の大きさに合わせた。以上の様に設計したマイクロ流体デバイスを、実際にマイクロファブリケーション技術を応用して製作することができた。

マンガンイオン標準溶液を用いた評価実験の結果、現状の感度としては10 nMオーダーのマンガンイオンの検出と定量が可能であることを確認した（図3）。

さらに，マンガンイオンの検出の際に競合的に作用し，定量性に影響を与える鉄イオンを除去する為のイオン交換カラムの集積化についても実施した。その結果，8-hydroxyquinolineキレート樹脂ビーズを合成し、それを充填したマイクロ流体デバイスを用いてμMオーダーの鉄イオンを除去しながらnMオーダーのマンガンイオンを定量できることが確認できた（図4）。

また，実海域での現場分析にむけて，マイクロポンプ・バルブからなる送液系に加え，独自開発の小型制御装置，光検出系，またそれらを収納する耐圧容器について，その基本的な要件について明らかにし、試作を行った。具体的には、１）送液の為の小型ポンプ・バルブ系の選定と流体マニホルドの製作、２）サンプル採集のためのポンプ選定と集積化、３）低ノイズかつ高感度なフォトンカウンティング光検出系を有する制御・電装系の設計・製作、４）アクリル製耐圧窓を有する制御・電装系用耐圧容器（チタン合金製）の設計・製作、及び５）上記システムをリアルタイムに操作・監視し、同時にデータの取得を行うためのソフトウエア開発を実施した。その結果、6000mまでの現場運用を可能とするプロトタイプシステムのモックアップを完成させた。これにより、サンプルを取り込み、マイクロ流体デバイス内において鉄イオンの除去、マンガンイオンの高感度検出までを全自動で行うことが可能になった。

平成20年6月及び12月に実施された研究航海（NT08-11, 24）及び平成21年3月に実施された石垣島・竹富島海底温泉調査に参加し、装置の評価に必要な現場海水サンプルを取得した。

本装置の現場運用を実施するにはプロトタイプシステムの安定性・信頼性に関する事前評価が必要であるため、本年度は実海域運用試験については実施しなかった。ただし、ほぼ同等の部品構成からなる「現場型微生物活性分析装置」に関しては深海域も含めた現場運用に既に成功している。よって本研究の目的である金属イオン定量分析装置の実現について技術的な課題はほぼ解決済みであるといえる。そこで、本年度は最後に平成21年度中の現場運用試験に向けた計画を立案した。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計１件）

① T. Fukuba, C. Provin, K. Okamura, T. Fujii, “Development of Microfluidic Device for Mn Ion Quantification in Ocean Environments” IEEJ Trans. SM, 129, pp. 69-72, 2009 査読有

〔学会発表〕（計７件）

① T. Fukuba, C. Provin, Y. Aoki, K. Okamura, K. Shitashima, T. Yamamoto, T. Fujii, “Development of Integrated In Situ Analyzers and its Application to Oceanography” PITTCON2009 (Chicago, USA, 2009. Mar 8-13) Abstract 2690-9P, 2009

② T.Fukuba and T. Fujii, “Microfluidic in situ Biological and Chemical Sensing”, 7th International Symposium for Subsurface Microbiology (ISSM) (Shizuoka, Japan, 2008. 11. 20) p 182, 2008

③ 福場 辰洋，クリストフ プロヴァン，藤井 輝夫，岡村 慶，「海洋環境におけるマンガンイオン定量のためのマイクロ流体デバイスの開発と評価」第25回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム（沖縄，2008, 10）講演概要集 p 101, 2008

④ C. Provin, T. Fukuba, T. Fujii, “Integrated in situ Analyzer for Manganese (IISA-Mn) for Deep Sea Environment” OCEANS’08 MTS / IEEE KOBE-TECHNO-OCEAN’08 (Kobe, Japan, 2008. 4. 10)

⑤ T. Fukuba, A. Miyaji, N. Fukuzawa, C. Provin, T. Yamamoto, L. Glutz, T. Okamoto, T. Fujii "Development of Integrated in situ Analyzers (IISA) for Oceanography Applications" Eleventh International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2007) (Paris, France 2007.10.9) Proceedings pp. 844-846, 2007

⑥ T. Fukuba and T. Fujii "Microfluidic-Based in situ Biological and Chemical Sensing –Towards Integrated and Real-Time Measurements in Deep-sea –"International Symposium on Underwater Technology 2007 (Tokyo, Japan 2007.4.17-20) Proceedings p. 210, 2007

⑦ C. Provin, T. Fukuba, T. Fujii "Development of Integrated *In Situ* Analyzer for Manganese (IISA-Mn) in Deep Sea Environment" International Symposium on Underwater Technology 2007 (Tokyo, Japan 2007.4.17-20) Proceedings pp. 658-662, 2007

〔その他〕

ホームページ等

http://www.microfluidics.iis.u-tokyo.ac.jp/index_j.html

６．研究組織

(1)研究代表者

福場　辰洋（FUKUBA TATSUHIRO）
東京大学・生産技術研究所・特任准教授
研究者番号：80401272