

## 紙基板型センサーアレイデバイスの創製と パターン認識に基づく多成分分析

佐々木 由比, 南 豪

### 1 はじめに

化学情報は、食品管理や環境分析、さらには病理診断において重要な指標となる。体液や環境サンプルには、目には見えないサイズの分子やイオンから構成される多種多様な物質が存在している。したがって、これらの化学情報を取得するためには、標的物質の種類と濃度範囲に応じたセンサー設計が求められる。1982年出版の「化学センサー その基礎と応用」に、「化学センサーの開発には、化学の寄与が大きいことは当然であるが、多くの科学技術の総合結集がなければならない」と記載されている<sup>1)</sup>。事実、標的物質を捕捉するためのレセプターは、分子認識化学に基づき設計され、標的物質の認識情報を可視化するレポーター（またはトランスデューサー）の設計には、色素化学、光化学、電気化学、分子生物学、電子工学、計測工学、情報科学など多岐にわたる知見を必要とする。先の化学センサーに関する教科書が出版されて、およそ半世紀弱経過した現在では、「ハード」の開発に留まらず、機械学習の発展に伴い、データ処理に注力した「ソフト」の研究は益々精力的に行われている。すなわちこの半世紀弱で、化学情報を扱う研究は、情報を取得するセンサーの開発から、処理に渡る一連の流れを組み込んだシステムの確立へと変遷を遂げてきた。しかし、たとえデータ処理側が強力であったとしても、入力情報が不十分であれば、化学情報を反映した分析は達成されない<sup>2)</sup>。換言すると、有益で豊富な化学情報の取得が、センシングシステムにおいて最も重要なプロセスとなる。有益かつ豊富な化学情報とは、標的物質の種類とその濃度の違いによって異なる特徴を持つセンサー応答を意味する。

本稿では、数ある化学センサーのプラットフォームの中から、ケモセンサーに着目した。ケモセンサーは、分子やイオンレベルの認識情報を色調や蛍光応答変化として読み出すことを可能とする<sup>3)</sup>。ケモセンサーの検出能はレセプターとレポーター（発色団または蛍光団）の組み合わせによって決定される。鍵と鍵穴の関係に従う酵素や抗体を含む生体由来材料は、高選択的な認識機構を有する。他方、人工レセプターは、固有の交差応答性を具えている。これは、哺乳類の嗅覚受容体を持つ認識機構に対応する。天然の分子認識では、これまでの経験に

基づき、におい分子の捕捉情報をパターン認識することで、においを判別している<sup>4)</sup>。天然の認識機構に着想を得た分析アプローチによって、アレイ状に並べたケモセンサーの光学応答をパターン学習することで、標的物質の同時検出が可能となる。本稿では、オンサイトでの多成分分析を指向した理化学機器に依らないセンサーアレイの作製と光学応答の取得法、続く画像解析とケモメトリックスを活用した化学情報の定性・定量的可視化について紹介する。

### 2 紙基板型センサーアレイ

#### 2.1 紙基板型センサーアレイの設計と作製

ケモセンサーを担持する固体基板の候補となる紙は、日常生活に馴染みのある環境負荷が少ない材料である。紙が持つ特有の吸水性やファイバー構造、高い加工性は、オンサイト分析用デバイスの開発において優れた特徴となる<sup>5)~7)</sup>。画像解析による定性・定量分析を達成するために、高い均一性と再現のある光学特性変化を示すことが望ましい。これには、紙基板と光学材料の両設計が必要である。身近なオフィスプリンターを用いる作製条件において、ウェルの形状、サイズ、光学センサーインクの吐出量や印刷回数などのパラメーターが変数となる。中心複合デザイン（central composite design, CCD）は数多くの条件からパラメーターを最適化するための実験計画法である<sup>8)</sup>。CCDを用いてパラメーターを変えて一定数の実験を実施することで、デバイス作製の条件を

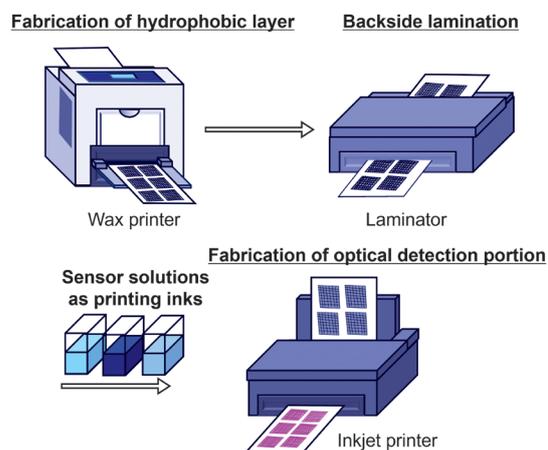


図1 紙基板型センサーアレイの印刷プロセス<sup>8)</sup>

最適化することができる。CCDによって導かれた条件に基づき設計した隔壁層は、ワックスプリンターを用いて紙基板に印刷される。紙基板の背面はラミネートフィルムで疎水性処理を施し、インクジェットプリンターを用いてパターンウェル内に光学センサーを印刷する(図1)。

## 2.2 画像解析とケモメトリックスによるデータ処理

印刷した紙基板型センサーアレイデバイスは、標的種を含むサンプル溶液の滴下によって比色ないし蛍光応答を示す。本光学応答はデジタルカメラ、スマートフォン、フラットベッドスキャナーを用いることで迅速に記録できる<sup>7)</sup>。蛍光センサーの場合には、小型のブラックライトで励起しながら撮影する。取得したデジタル画像を解析するために、MATLABを用いて独自に設計したアルゴリズムを使用した<sup>8)</sup>。本アルゴリズムには形態素解析と光学情報抽出を実装しており、デジタル画像のピクセルから複数のカラーチャネルを自動で抽出することができる。カラーチャネルは、red, green, blue, gray scale,  $Y C_b C_r$ が含まれている( $Y$ :輝度信号,  $C_b$ と $C_r$ :色差信号の青系統と赤系統の色相と彩度)<sup>9)</sup>。データマトリックスは、センサー数、評価の対象(標的物質の種類と濃度)、繰り返し測定数に応じたカラーチャネルに対応する高次元な化学情報で構成される。ケモメトリックスを用いたデータ解析により、二次元または三次元のアウトプットデータとして化学情報が可視化される。データマトリックスは事前にパラメトリック検定によって処理すると、外れ値が排除された入力データが得られる。ケモメトリックスの手法は教師あり、教師なし学習法の二つに大別される。教師あり学習法には、線形判別分析(linear discriminant analysis, LDA)やサポートベクターマシン(support vector machine, SVM)などが含まれる。

教師あり学習法は交差検定を行いながら分類または回帰(予測)できるため、センサーの正確性を評価し得る。他方、主成分分析(principal component analysis, PCA)や階層クラスター分析(hierarchical clustering analysis, HCA)などが該当する教師なし学習法では、交差検定を含まないが、出力データのクラスター位置に基づき、入力データ自体の質を評価することができる。PCAとLDAは高次元な化学情報を保持したまま低次元化を可能とし、PCAは化学情報の特徴が最大化する次元を、LDAは分析対象物のクラスを最も分けられる次元を探す手法である<sup>10)</sup>。両者を組み合わせてデータ解析を行うことで、パターン認識において大きな寄与を示すケモセンサーをスクリーニングすることができる<sup>11)</sup>。HCAは、入力データ内にある特徴の類似性に従って階層的に樹形図を作成するようにクラスターをまとめる手法であり、各クラスター間の距離によって各成分の類似

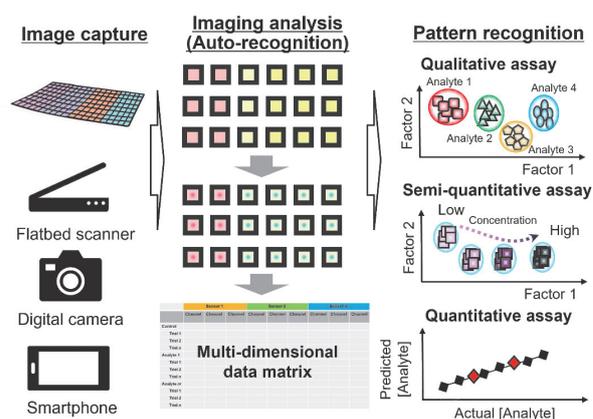


図2 画像解析とケモメトリックスによるデータ処理と化学情報の可視化<sup>5)</sup>

度が判断される<sup>10)</sup>。例えば、HCAを用いた解析結果から、標的種の分子構造に依存するセンサー応答を議論することができる<sup>12)</sup>。SVMは、分類する境界とデータとの距離(=マージン)が最大化する境界線を引き、データの分類・予測を行う手法である。クラスの境界線が非線形である場合には、カーネル法を用いてデータを高次元の特徴空間上へ写像することで、クラスを分類する境界が引かれる<sup>10)</sup>。SVMは実サンプル分析など、センサーが非線形性の複雑な応答を示す場合に用いることができる<sup>13)</sup>。本稿では、LDAとSVMをそれぞれ用いて、定性分析(標的物質の種類判別)、半定量分析(標的物質の種類とその濃度の判別)、定量分析(実サンプル中の標的物質濃度の予測)を実施した例について記述する(図2)。

## 3 比色指示薬を実装した紙基板デバイス

3節では、紙基板型センサーアレイのポテンシャルを探るために、身近な分析試薬を活用した例を示す。すなわち、小学校の理科の実験で用いられているpH指示薬を使った高精度pH検出を試みた内容を紹介する<sup>14)</sup>。

ヒト汗は、非侵襲で採取可能な実サンプルであり、心理的および生理的な変化に関連する豊富な化学情報を含んでいる。例えば、心理的ストレスによって自立神経系が活性化されると、発汗量の増加と共に皮膚pHが変動する。ヒト汗に含まれる細菌は、小数点以下で変化するpHによって活性化されるため、高精度でのヒト汗pHのモニタリングは重要である。市販のpH試験紙は古くから使用されているが、小数点以下の精度での正確な分析には難がある。実際の分析環境において求められる高精度のpH検出を達成するために、三つのpH指示薬を用いた比色センサーアレイを設計した<sup>14)</sup>。プロモフェノールブルー(1)(酸性領域)、メチルレッド(2)(弱酸領域)、プロモチモールブルー(3)(弱酸から弱塩基領域)は、それぞれのpH応答範囲が互いに重なる

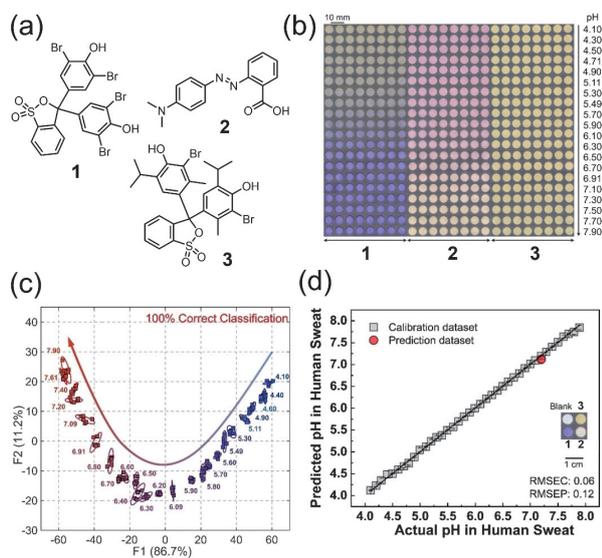


図3 (a) アレイに使用した pH 指示薬の分子構造；(b) pH 指示薬を印刷したマイクロウェル紙基板の pH 変化に伴う色素応答；(c) LDA による pH 変化の可視化；(d) SVM を用いたヒト汗の pH 分析<sup>14)</sup>

ため、シームレスな pH 応答情報が取得される (図 3 (a))。当該 pH 指示薬をそれぞれ印刷したマイクロウェル型の紙基板は、pH 変化に応じたカラーグラデーションを示した (図 3 (b))。当該センサーデバイスの比色応答は、フラットベッドスキャナーによって記録され、画像解析によって入力データを作成した。交差検定の一種である Jackknife 法を組み合わせた LDA を用いてデータ解析を行ったところ、小数点以下 2 桁の pH の差を 100% の精度で判別した (図 3 (c))。各 pH に該当するプロットのばらつきは、信頼楕円を用いて評価した。信頼楕円は、データプロット分布の中心からの距離によって、ばらつきを可視化する手法である。図 3 (c) には、95% 信頼楕円を使用しており、ばらつきが小さいことがわかる。さらに、SVM を用いて前処理無しのヒト汗 pH に対する定量分析を行った。図 3 (d) には、SVM によって作成した検量線 (灰色プロット) と予測した未知濃度の汗 pH のデータセット (赤色プロット) を示す。未知濃度のプロットは、検量線上に分布しており、市販の電気化学 pH メーターと同等の精度で、前処理無しのヒト汗の pH 検出を達成した。

このように、誰もが一度は触れたことのある身近な pH 指示薬でも紙基板型センサーアレイに実装し、画像解析とパターン認識を組み合わせることで、高精度な定量分析を可能とすることが明らかとなった。

この実証例では、pH のみの化学情報の可視化に成功したが、続く 4 節では、多種多様な成分に対する定性・定量分析に焦点を当てる。

## 4 蛍光ケモセンサーアレイによる分析

### 4.1 カテゴリー分けを可能とする紙基板型アレイ

食品には、呈味成分や食品鮮度にかかわる成分が数多く含まれており、網羅分析が望まれている。そこで、呈味成分の糖類と食品鮮度のマーカーとなる含硫アミノ酸類の同時分析を目指した蛍光性ケモセンサーアレイについて紹介する<sup>15)</sup>。本アレイでは、二つのカテゴリー (糖類と含硫アミノ酸) に対する選択性を持ちながら、各カテゴリー内では交差応答性を示すケモセンサーを設計した。糖類検出用には、3-ニトロフェニルボロン酸 (4) をレセプターに採用した。蛍光団のアリザリンレッド S (5) と 4-メチルエスクレチン (6) は 4 との複合化に伴い、それぞれ蛍光 ON と蛍光 OFF の変化を示した。動的共有結合型ケモセンサーを印刷した紙基板上の蛍光は、標的糖類の添加に伴う競合応答に基づき変化した。他方、含硫アミノ酸類の検出には、亜鉛 (II) イオン ( $Zn^{2+}$ ) との配位結合を活用した (図 4 (a))。本設計では、同一蛍光団 (5 と 6) であったとしても、複合化させる構成要素を変えることで、糖類と含硫アミノ酸類に対するセンサーを合目的かつ簡便に作り分けられる。事実、同一蛍光団に 4 と  $Zn^{2+}$  をそれぞれ複合化させたケモセンサーは、糖類と含硫アミノ酸類のいずれかのカテ

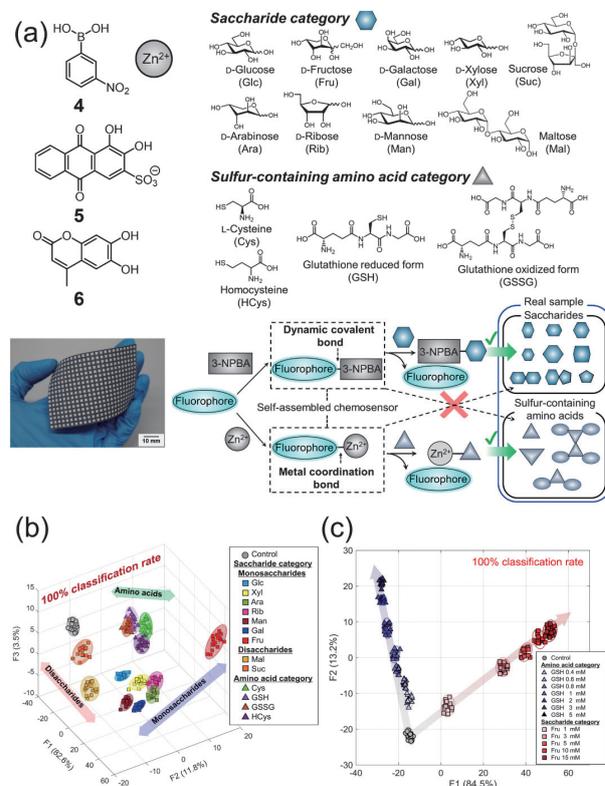


図4 (a) 食品分析を指向した蛍光性ケモセンサーの構成要素と標的物質の分子構造、ケモセンサーを印刷した 384 マイクロウェル紙基板型デバイスの写真、検出原理；LDA を用いた (b) 定性分析と (c) 半定量分析<sup>15)</sup>

ゴリーに対してのみ蛍光応答した。小型の遮光用ボックスにブラックライトとデジタルカメラを実装し、励起下で384マイクロウェルの紙基板型ケモセンサーアレイの蛍光応答を撮影した。画像解析によって取得した入力データはケモメトリックスを用いて分析したところ、LDAによる定性分析では、9種の糖類と4種の含硫アミノ酸を100%の精度でカテゴリー分けし、さらに単糖と二糖の構造の違いを判別した(図4(b))。続く半定量分析では、D-フルクトース(Fru)と還元型グルタチオン(GSH)をそれぞれ異なる濃度で判別し、濃度変化に追従したクラスター分布を観測した(図4(c))。また、本センサーデバイスはトマトの搾り汁に含まれるFruとGSHに対する定量分析も達成しており、実サンプル分析への実現可能性を示唆した。

このように、低分子をインクに使用した紙基板型センサーアレイは、比較的高い濃度で存在する標的物質の分析に向いている一方で、高感度検出が望まれる分析には適用が難しい場合がある。続く4・2節では、大型の機器分析装置に匹敵する感度で検出するためのアプローチに着目する<sup>16)</sup>。

#### 4・2 高感度検出用紙基板型ケモセンサーデバイス

ポリチオフェンは、3位または4位に容易に置換基導入が可能な $\pi$ 共役系高分子の代表であり、ポリチオフェン誘導体を基盤としたケモセンサーは精力的に開発されている<sup>17)18)</sup>。側鎖に分子認識能を賦与したポリチオフェン誘導体は、分子認識部位で標的物質を捕捉すると、その情報が主鎖骨格内で伝搬されるため、分子内ワイヤー効果により高感度検出が達成される<sup>17)</sup>。優れたセンシング能を示すポリチオフェンであるが、固体状態では自発的に凝集して消光するため、固体の蛍光センサー開発には、ポリチオフェンの自己凝集を抑制するアプローチが必須となる。これまでに、高分子ゲルにポリチオフェンを混ぜこんでワイヤーを分散させる手法や<sup>19)</sup>、側鎖にかさ高い官能基を修飾して自己凝集を抑制する分子設計などが報告されている<sup>20)</sup>。ここでは、ポリチオフェンワイヤーを分散状態で担持させるために、紙のファイバー構造に着目した<sup>16)</sup>。重金属イオン捕捉能を有するジピコリルアミンを側鎖に導入したポリチオフェン(7)をオフィスプリンターで紙に印刷し、384マイクロウェルのセンサーデバイスを作製した(図5(a))。ポリチオフェンの分散状態は、紙基板デバイスの表面形態観察と蛍光特性によって評価した。電界放出形走査電子顕微鏡画像では、紙のファイバー構造は観測されたのに対して、7に由来する凝集物は観測されなかった(図5(b))。さらに、7を構成する硫黄と窒素の元素マッピングが紙上に分布しており、高分散でポリチオフェンが塗布されていることを支持した。したがって、7を印刷した蛍光性ケモセンサーデバイスを用いて金属イオン種(銅(II)

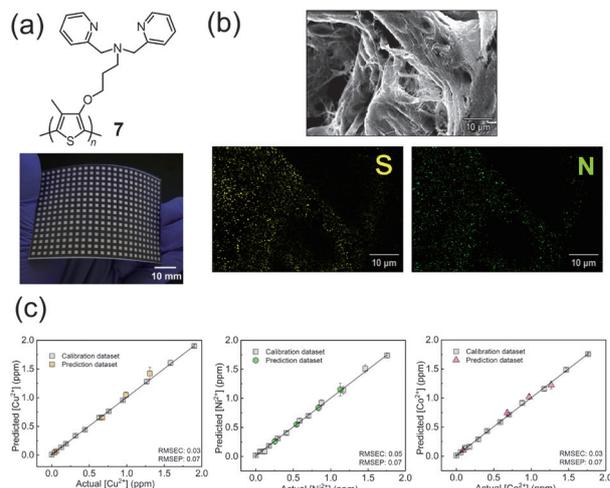


図5 (a) 蛍光性ケモセンサー(7)の構造と7を印刷した384マイクロウェル紙基板型センサーデバイス；(b) 7を印刷した紙基板のFE-SEMによる表面形態観察とEDXによる元素マッピング；(c) SVMを用いた河川水に添加した金属イオン種の定量分析<sup>16)</sup>

( $\text{Cu}^{2+}$ ), コバルト(II) ( $\text{Co}^{2+}$ ), ニッケル(II) イオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) に対する定量分析を試みた。当該金属イオン種の組み合わせは、藻類の成長を抑制する働きがあるため、環境モニタリングの観点から同時分析が望まれる。本検証では、河川水に添加した3種の金属イオン種の濃度予測を試みた。河川水の滴下に伴う紙基板上での7の蛍光応答は、スマートフォンで撮影した。画像解析を経て得た入力データをSVMによって分析した結果、高精度な添加回収率を得た(図5(c))。特筆すべき点として、本紙基板型センサーデバイスの $\text{Cu}^{2+}$ に対する検出限界値(48 ppb)は、溶液中での蛍光センシングによって算出された値(16 ppb)に比べて遜色なく、高分散した7は固体基板上でも分子ワイヤー効果を示すことが見いだされた。

#### 5 おわりに

本稿では、紙を基体に採用したセンサーアレイの設計・作製からデータ解析に渡る一連の流れを組み込んだシステムについて紹介した。自動化した画像解析技術をはじめ、高次元性のデータマトリックスを処理するパターン認識は、従来の1センサー=1標的種の分析を超え、1センサー=多種標的物質を達成するために、必要不可欠な技術である。機械学習を使いこなすことは、大なり小なり研究者にとって必須となるであろう(もしくはすでにになっている)。しかし、化学情報を扱う研究において最も重要なプロセスは、有益で豊富な化学情報を取得することである。如何にコンピューターの情報処理能力が発達したとしても、化学情報の有益さと豊富さの意味を理解し、出力されるデータの信頼性を判断するのは我々研究者のパターン認識能力(=経験と知見)であ

り、さらに研究の発展は、そこから得られるひらめきに委ねられている。化学センシングというキーワードを一つ取っても、生身の研究者にしかできないことがまだ沢山あると信じている。

#### 文 献

- 1) 清山哲郎, 塩川二郎, 鈴木周一, 笛木和雄: “化学センサー その基礎と応用”, p. 1 (1982), (講談社サイエンティフィック).
- 2) 佐々木由比, 南 豪: *ぶんせき (Bunseki)*, **2022**, 253.
- 3) 早下隆士, 築部 浩: “分子認識と超分子”, p.157 (2007), (三共出版).
- 4) Y. Sasaki, R. Kubota, T. Minami: *Coord. Chem. Rev.*, **429**, 213607 (2021).
- 5) B. Mohan, Y. Sasaki, T. Minami: *Anal. Chim. Acta*, **1313**, 342741 (2024).
- 6) K. Yamada, T. G. Henares, K. Suzuki, D. Citterio: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 5294 (2015).
- 7) T. Komatsu, S. Mohammadi, L. Shayne Alamo Busa, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, M. Tokeshi: *Analyst*, **141**, 6507 (2016).
- 8) X. Lyu, V. Hamedpour, Y. Sasaki, Z. Zhang, T. Minami: *Anal. Chem.*, **93**, 1179 (2021).
- 9) 稲川有徳, 上原伸夫: *分析化学 (Bunseki Kagaku)*, **69**, 693 (2020).
- 10) P. Anzenbacher, Jr., P. Lubal, P. Buček, M. A. Palacios, M. E. Kozelkova: *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 3954 (2010).
- 11) Y. Liu, T. Minami, R. Nishiyabu, Z. Wang, P. Anzenbacher Jr.: *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 7705 (2013).
- 12) Y. Sasaki, V. Hamedpour, R. Kubota, Y. He, Y. Torii, T. Minami: *Chem. Lett.*, **48**, 1368 (2019).
- 13) T. Minami, N. A. Esipenko, B. Zhang, M. E. Kozelkova, L. Isaacs, R. Nishiyabu, Y. Kubo, P. Anzenbacher Jr.: *J. Am.*

*Chem. Soc.*, **134**, 20021 (2012).

- 14) Y. Sasaki, X. Lyu, T. Minami: *Anal. Sens.*, **3**, e202200097 (2023).
- 15) X. Lyu, Y. Sasaki, K. Ohshiro, W. Tang, Y. Yuan, T. Minami: *Chem. Asian J.*, **17**, e202200597 (2022).
- 16) Y. Sasaki, X. Lyu, T. Kawashima, Y. Zhang, K. Ohshiro, K. Okabe, K. Tsuchiya, T. Minami: *RSC Adv.*, **14**, 5159 (2024).
- 17) D. T. McQuade, A. E. Pullen, T. M. Swager: *Chem. Rev.*, **100**, 2537 (2000).
- 18) 南 豪, 南木 創: *ぶんせき (Bunseki)*, **2017**, 497.
- 19) Y. Sasaki, K. Asano, T. Minamiki, Z. Zhang, S. Takizawa, R. Kubota, T. Minami: *Chem. Eur. J.*, **26**, 14525 (2020).
- 20) C. Pan, K. Sugiyasu, J. Aimi, A. Sato, M. Takeuchi: *Angew. Chem., Int. Ed.*, **53**, 8870 (2014).



佐々木 由比 (Sasaki Yui)

東京大学先端科学技術研究センター (〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1). 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻博士課程修了. 博士 (工学). 《現在の研究テーマ》機能性分子集合体の創製とその応用.

E-mail: sayui@iis.u-tokyo.ac.jp



南 豪 (Minami Tsuyoshi)

東京大学生産技術研究所. (〒153-8505 東京都目黒区駒場 4-6-1). 首都大学東京大学院都市環境科学研究科環境調和・材料化学専攻博士後期課程修了. 博士 (工学). 《現在の研究テーマ》超分子化学に立脚した化学センサの創製.

E-mail: tminami@g.ecc.u-tokyo.ac.jp