

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26820359

研究課題名(和文) 赤血球の直接電子移動反応と酸素還元能で発電する革新的バイオ燃料電池カソードの開発

研究課題名(英文) A Novel Biofuel Cell with Human Red Blood Cells Reducing Oxygen

研究代表者

綾戸 勇輔 (AYATO, Yusuke)

信州大学・先鋭領域融合研究群環境・エネルギー材料科学研究所・助教(特定雇用)

研究者番号：70415769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、血管中に電極を挿入し(酸素結合)赤血球や糖(水素燃料)などにより燃料電池反応(酸素+水素=水)を起こさせることで電気エネルギー変換し、心臓ペースメーカー用電源として用いることを目指している。これまで赤血球(中のヘモグロビン)は酸化インジウムスズ(ITO)電極上でメディエーター等を介することなく直接電子移動することがわかっていたが、本課題ではITOを自作することで組成比(Sn/(Sn+In))や焼成温度によりヘモグロビンの直接電子移動反応及び酸素還元反応能に対する影響を調べた。その結果、ITOの組成や焼成温度がヘモグロビンの反応活性に影響することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Biofuel cells (BFCs) are nature-inspired electrochemical systems. Natural bio-materials (e.g. glucose as the fuel and enzymes as the electrocatalysts) are used under mild conditions at around body temperature at near-neutral pH. We have developed BFCs with hemoglobin (Hb), making it possible for use as body implantable power supplies applied to medical devices such as pacemakers for cardiac resynchronization therapy and deep brain stimulation. In this study, indium tin oxide (ITO) thin films were synthesized on glass plates with different metal molar ratio or different calcination temperature by dip-coating methods and used as bio-electrodes for Hb. The ITO calcined with 773 K with In:Sn=1:1 showed the highest ORR activity of Hb. There are specific active sites for electron transfer between proteins and electrodes. These findings are scientifically very interesting as well as great advantages for practical use of the Hb-ITO system, in particular for body implantable power supplies.

研究分野：電気化学、燃料電池

キーワード：ヘモグロビン 酸化インジウムスズ 燃料電池 直接電子移動 酸素還元

1. 研究開始当初の背景

**バイオ燃料電池**は、これまでほとんどが単位電極面積当たりマイクロワット ( $\mu\text{W cm}^{-2}$ ) もしくはそれ以下の発電能力のため、大きな注目を集められていなかったが、近年 15 ミリワット ( $\text{mW cm}^{-2}$ ) という**太陽電池発電並みの性能**が得られ始めている。特に、酵素等の生体材料を電極触媒として用いるため、生命の代謝 (化学反応) 過程における電子移動を電極で授受することで電気エネルギーに直接変換でき、中性、体温付近で発電可能のため、将来安全安心な**体内埋込型電源としての応用が期待できる唯一のクリーンエネルギー変換デバイス**である。しかし、酵素等の生体材料は、巨大な蛋白質 (絶縁体) の殻の奥深くに反応活性中心が存在するため、**電極と蛋白質間で直接電子移動 (DET)** させるのは困難であり、電子移動を仲介するメディエータ利用型、酵素の配向制御などを目的とした酵素固定型及び電極修飾型 (MET 型) の複雑な電極構造で研究が展開されている ( $15\text{mW cm}^{-2}$  の性能も MET 型) (図 1)。

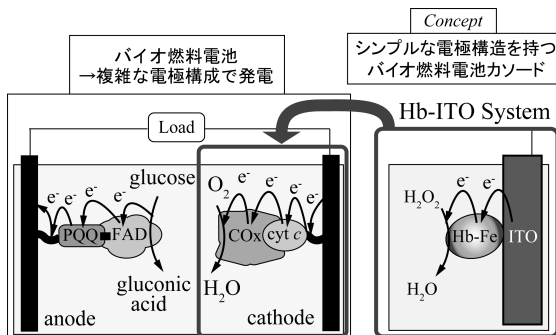


図 1. 従来型のバイオ燃料電池の構成 (左) とヘモグロビンの DET を利用した新規バイオ燃料電池カソード (右)

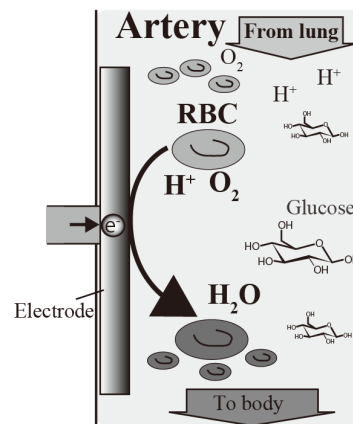
一方、我々は反応活性中心が蛋白質の殻の表面付近に 4 つ存在する**ヘモグロビン (Hb) に注目し、ITO 電極と DET 活性を示すことを見出した**。さらに過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) の還元触媒として機能させることで、全く新しいバイオ燃料電池カソードを開発した。

2. 研究の目的

本研究課題では、多量の Hb を内包する赤血球 (RBC) に注目する。赤血球は、 $\text{O}_2$  運搬体として知られているが、**ITO 電極と赤血球中の Hb との DET を利用し  $\text{O}_2$  を還元するバイオ燃料電池カソードの開発を目的とする** (図 2)。ペースメーカーが心臓に送る信号は、 $10\mu\text{A}$  程度の電流で十分であり、本研究では  $10\mu\text{A cm}^{-2}$  程度の性能を得ることを目指す。本課題を成し遂げられれば、将来電極を血管に挿入するだけで、バイオ燃料電池カソードが構築できる。また以下の本分野の中でも特有の実用的利点が期待できる。

- (1) 酵素の精製や電極への固定化・修飾の必要性が全くない。
- (2) 赤血球は生命の代謝過程で生成・排出されるため、本分野で課題である寿命の問題がない。
- (3) 赤血球が肺で  $\text{O}_2$  を受け取るため、反応ガス供給の必要がない。
- (4) 特別な装置なくフロー型 (心臓がポンプ) 約  $100\text{mmHg}$  の背圧 (血圧) の環境で発電できる。
- (5) 生体外材料への拒絶反応の心配が少ない。

図 2. 血管(動脈)内のバイオ燃料電池カソード構築の構想イメージ



ド構築の構想イメージ

3. 研究の方法

準備実験により、市販の ITO 及びゾルゲル法や CVD 法で作製した ITO 電極上でヘモグロビンや赤血球が DET 活性を示し、 $\text{O}_2$  還元能を示すことは、平板 ITO を試験電極として用いた 3 電極法による半電池試験で明らかとなっている。**本課題では、ITO の組成や焼成条件が及ぼす赤血球の DET 活性について検討を行うことで、何故タンパク質(細胞)と ITO 電極間で電子が直接授受されるのかについて知見を集積するとともに、最終的に単セル発電を行い、心臓ペースメーカーが送る  $10\mu\text{A}$  の信号電流を満たす  $10\mu\text{A cm}^{-2}$  程度の発電性能を目指した。**

具体的には次の 3 つの項目を立ててデータを蓄積し、結果を考察することで研究課題を遂行した。

- (i) ITO の組成比 ( $\text{Sn}/(\text{Sn}+\text{In})$ ) や焼成温度  $350\text{-}950$  の条件を振り分けて ITO を合成し、SEM, XRD 等で生成物のキャラクター化を行った。
- (ii) その後、基礎電気化学データ取得のため ITO を電極として電解液に赤血球やヘモグロビンを含む溶液を使用して主にサイクリックボルタモメトリー法により評価した。(図 3)

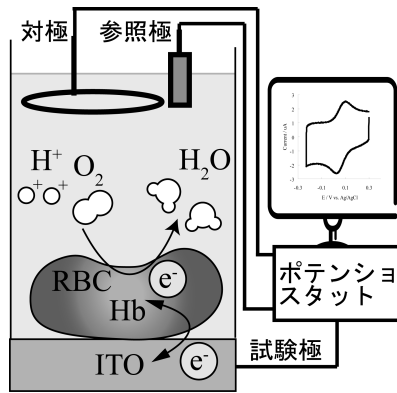


図 3 . 電気化学計測 (3 電極法) 系

(iii) 単セルを実際に組み立て電池評価試験 (発電実験) を行った。(図 4)

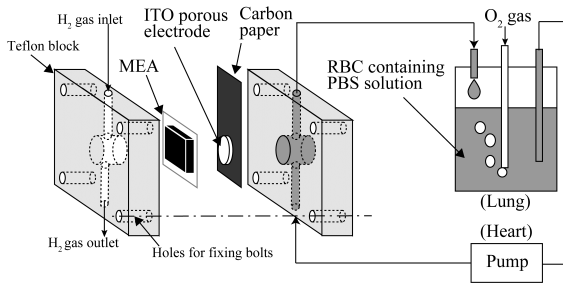


図 4 . 単セル実験系

#### 4 . 研究成果

本課題では 1 年目に ITO の組成 (Sn/(Sn+In)) をだまかに変えて合成したところ明らかにヘモグロビン (Hb) の反応量が異なったことから 2 年目を通して組成比を 10% 刻みで振り、Hb の活性の違いに注目した。図 5 にスズの組成比が 0.05 から 0.2 までの ITO を用いて測定したサイクリックボルタモグラム (CV) を示す。

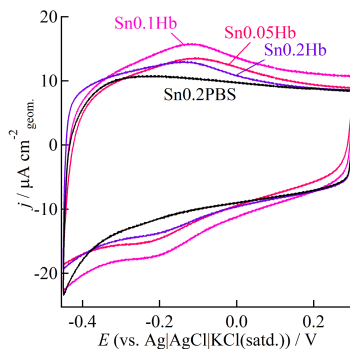
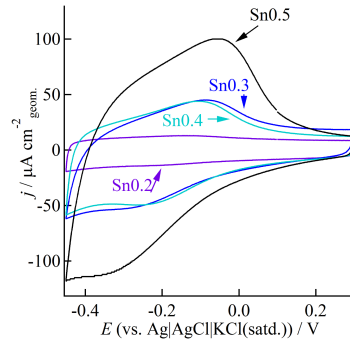


図 5 スズの組成が 0.05-0.2 の時の ITO で測定した CV 曲線

黒が Hb 無しでとった CV に対して Hb を含む溶液を用いると -0.1V 付近に 1 対の酸化還元ピークが観察された。したがって、本研究で合成した ITO 上でも Hb が直接電子移動反応活性を示すことが明らかとなった。さらに反

応量を算出するとこの組成比領域では反応量にそれほど差がなかった。次に図 6 に組成比が 0.2 以上で作製した ITO を用いて測定した CV を示す。組成比 0.6 以上がないのは、ITO の電気抵抗が大きくなりすぎて電極として使用できなかったためである。

図 6 スズの組成が 0.2 以上の時の ITO で測定した CV 曲線



組成比 0.2 と比べると 0.3、0.4 で Hb の反応量が一段大きくなり、0.5 で最大の反応量を示した。反応量は 0.2 で 8.6pmol, 0.4 で 77.1pmol, 0.5 で 222.3pmol を記録した。これまで市販の ITO (おそらく組成比 0.05-0.1) では単分子層吸着量に当たる 8.3pmol 周辺の値が得られてきたが、それを大きく上回る Hb の反応量が得られた。それぞれの ITO のシート抵抗を測定したところ、組成比が 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 でそれぞれ 714, 255, 167, 147, 800, 10989, 62500 /sq. であった。したがって、最も電気抵抗が低いのは組成比が 0.3, 0.4 あたりであるのに対してシート抵抗が高くなった組成比が 0.5 で Hb 反応量が最大であったと考えられる。したがって、Hb の反応活性と ITO のシート抵抗の間にはっきりとした相関性はないといえる。このことから Hb の活性サイトが ITO 電極上に存在し、それは Sn が鍵を握っていると示唆された。一方で SnO2 などの酸化スズは不導体であるのであまり Sn 組成が大きすぎると今度は電気抵抗が高すぎて電極としては用いることができなくなったと考えられる。つまり、Hb 活性と ITO のシート抵抗のバランスが最も良い組成比が 0.5 だったと考えることができる。

図 7 にいくつかの SEM 像を示した。ITO の表面は低倍率でも大きく表面の形態が異なることがわかった。結晶やその業種謡のように見える白っぽい部分がスズの組成比をあげると少なくなり、0.7 では完全に均質な表面になった。

次に合成した各 ITO の XRD パターンを示す。図 8 をみるとスズの組成比が 0.05-0.5 の時  $In_2O_3$  とほぼ一致する回折ピークが現れている。スズの組成比の違いによりピーク位置がシフトしており (図 9) スズが酸化インジウムに固溶されていると考えられる。スズの固溶限界は 10% 程度といわれており、本研究で

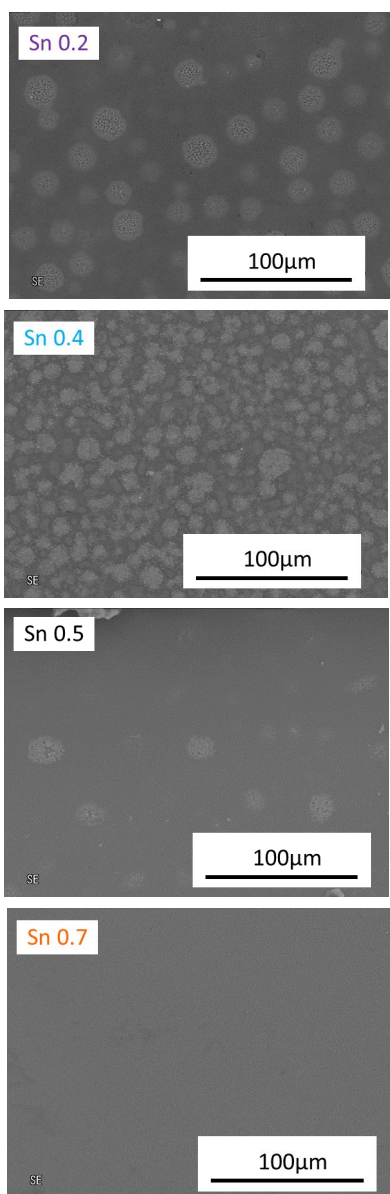


図 7 スズの組成比が 0.2, 0.4, 0.5, 0.7 の時の ITO 表面の SEM 像

は固溶限界を超えたところで Hb の活性が著しく増大しており、酸化インジウムの結晶構造ではない  $\text{In}_4\text{Sn}_3\text{O}_{12}$  や  $\text{SnO}_2$  などが非常に微小な粒子がアモルファス状態で生成していると XRD パターンから考えられ、そこが Hb の電子移動の活性点となっている可能性が示唆された。

次に ITO のスズの組成を 0.5 に固定して焼成温度の Hb 電子移動活性に与える影響を調査するために、350、500、650、800、950 で ITO を焼成した。ここでこれまでの実験では 500 固定で焼成を行っていた。温度以外の焼成条件は基板を石英を用いたことを除いて全て同じ条件で行った。

図 10 に各温度で焼成した ITO の XRD パターンを示す。350 では焼成温度が足りず  $\text{In}_2\text{O}_3$  の ITO の結晶構造が得られていないと考えられる。また試料の色も黒ずんでいた。抵抗も高く電極としては使用不可能であった。

一方、500 以上で  $\text{In}_2\text{O}_3$  の回折ピークが観察されている。回折ピークはシフトしており Sn は同様固溶されていると考えられる。20° 付近のブロードなバンドは基板由来と考えられるがこの強度に対するピーク比が異なることから各温度で ITO の結晶化度が変化していると考えられる。

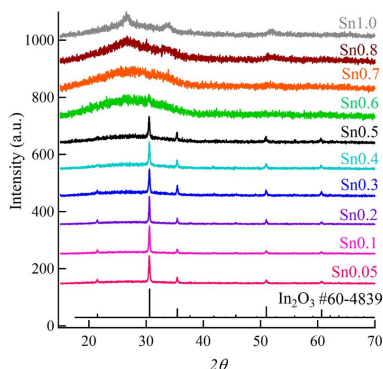


図 8 合成した ITO の XRD パターン

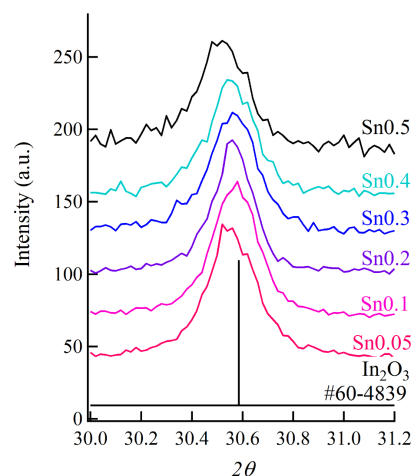


図 9 図 8 のメインピークあたりの拡大

次に CV 測定結果を図 12 に示す。各温度でそれぞれ Hb が ITO 上で直接電子移動活性を示すことがわかった。また Hb 反応量が最も大きかったのは 650 で 91.6pmol であった。この実験では基板をガラスから石英に変更したため、同じ 500 の熱処理でも Hb の反応活性に違いが見られた可能性が示唆されるが、ITO の結晶化度でも Hb の反応活性に与える影響があることがわかった。これらより、Hb は電極の材質や結晶構造に深く関連して電子移動が起きていることが明らかとなった。今後、ITO 以外の導電金属酸化物にも注目して Hb の直接電子移動がどのような要因や機構で誘発されているのか明らかにしたい。

本研究では、食肉衛生試験所から豚の血のサンプルを受けたり、日本赤十字社から献血を購入したりしたが、本研究課題内では赤血

球内の Hb との直接移動現象は観察することはできなかった。これまで赤血球は市販のものを使用していたが、販売中止となり、冷凍や冷蔵などの赤血球を捜し購入したところ、反応するサンプルもあったが、溶血（赤血球内の Hb が漏れ出すこと）の疑いをはずされておらず、本報告ではデータを示さなかった。

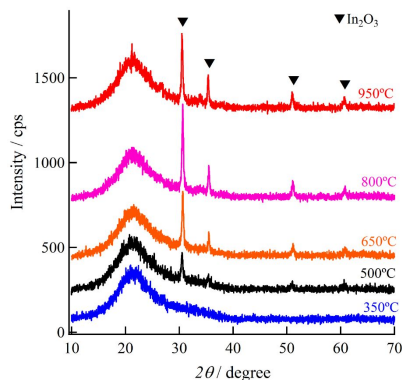


図 10 各焼成温度で合成した ITO の XRD パターン

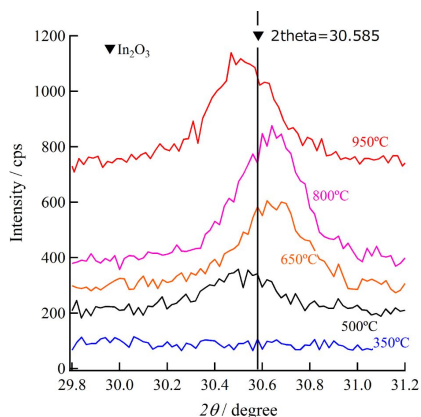


図 11 図 10 のメインピークの拡大図

最後に、ポンプを心臓、チューブを血管、ボトルを肺と見立てたフロー方の単セル（図 4）を構築して、最も性能が良かったガラス基板を用いて 500 で ITO を焼成し、Hb を入れた電解質に酸素を供給しながら、単セル試験を行った。測定の様子を写真を図 13 に、結果を図 14 に示した。起電力 0.66V、最大出力  $1.1 \mu\text{Wcm}^{-2}$ 、最大電流  $32.5 \mu\text{Acm}^{-2}$  を得た。赤血球ではないが、ITO の焼成方法を検討することで当初予定の  $10 \mu\text{Acm}^{-2}$  程度の目標電流値は達成することができた。

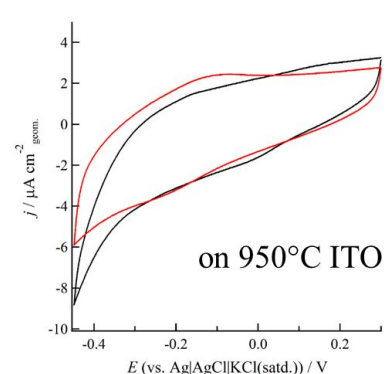
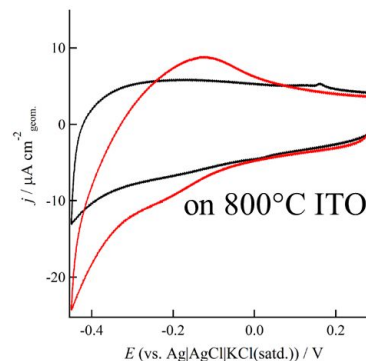
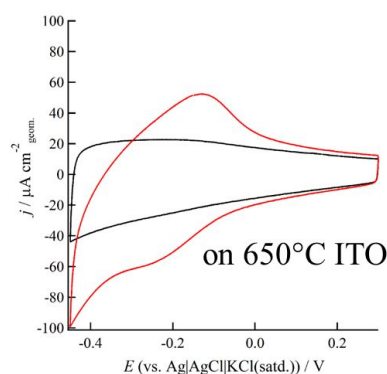
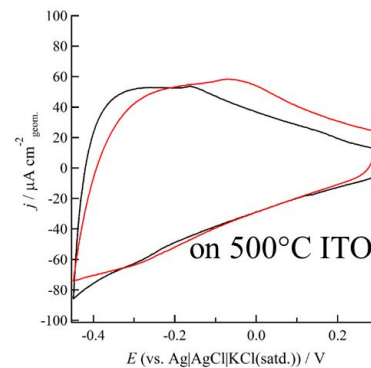


図 12 各焼成温度で合成した ITO 電極で測定した CV 曲線（黒：Hb なし、赤：Hb 含）

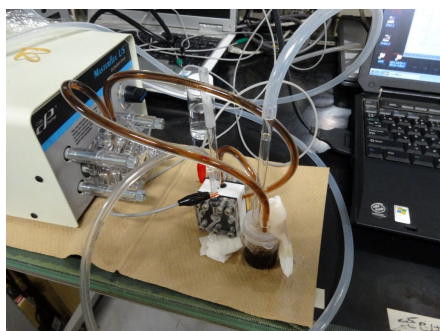


図 13 単セル実験の様子

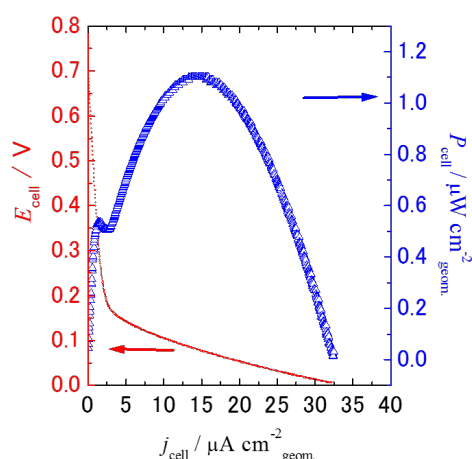


図 14 単セル試験の結果

## 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4件)

“Synthesis and Application of Carbon Nanotubes to Glucose Biofuel Cell with Glucose Oxidase and *p*-Benzoquinone”, Y. Ayato, T. Suganuma, H. Seta, K. Yamagiwa, H. Shiroishi, J. Kuwano, *J. Electrochem. Soc.*, **162(14)** (2015) .査読有り

“Oxygen reduction reaction of hemoglobin on indium-tin-oxide electrodes and its application to biofuel cell cathode”, Y. Ayato, W. Sugimoto, *ECS Transactions*, **66(39)** (2015) 29-37. 査読有り

“A simple biofuel cell cathode with human red blood cells as electrocatalysts

for oxygen reduction reaction”, Y. Ayato, K. Sakurai, S. Fukunaga, T. Suganuma, K. Yamagiwa, H. Shiroishi and J. Kuwano, *Biosensors and Bioelectronics*, **55** (2014) 14-18. 査読有り

“Evaluation of Biofuel Cells with Hemoglobin as Cathodic Electrocatalysts for Hydrogen Peroxide Reduction on Bare Indium-Tin-Oxide Electrodes”, Y. Ayato and N. Matsuda, *Energies*, **7(1)** (2014) 1-12. 査読有り

[学会発表](計5件)

“Direct Electron Transfer of Hemoglobin on Indium-Tin Oxide Electrodes Synthesized By Dip-Coating Methods Under Different Sintering Temperature”, Y. Ayato, D. Mochizuki, and W. Sugimoto, 230<sup>th</sup> Meeting of ECS (Pacific Rim Meeting: PRiME 2016), Honolulu, Hawaii, 2-7 October 2016.

「金属組成比の異なる酸化インジウムスズ電極とのヘモグロビンの直接電子移動」綾戸勇輔, 杉本渉, 2015年電気化学秋季大会, 埼玉工業大学, 埼玉県深谷市, 2015年9月12日

“Direct Electron Transfer and Oxygen Reduction Reaction on Hemoglobin with Indium Tin Oxide Synthesized with Different Metal Compositions”, Y. Ayato and W. Sugimoto, 227<sup>th</sup> ECS Meeting, Hilton Chicago, Chicago Illinois, USA, 24-28 May 2015.

“Direct electron transfer of hemoglobin on ITO electrodes and their application to a biofuel cell cathode”, Y. Ayato, EMN (Energy Material Nanotechnology) EAST Meeting, Beijing Xijiao Hotel, Peijin, China, 20-23 April 2015.

「ディップコート法を用い種々の組成比でガラス基板に焼成した酸化インジウムスズ電極上におけるヘモグロビンの電子移動反応及び電極触媒能」綾戸勇輔, 杉本渉, 2014年電気化学秋季大会, 北海道大学高等教育推進機構, 北海道札幌市, 2014年9月28日

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

綾戸 勇輔 (AYATO, Yusuke)

信州大学・先鋭領域融合研究群 環境・エネルギー材料研究所・助教(特定雇用)

研究者番号：70415769