

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05892

研究課題名(和文)ハイブリッド型電気化学マイクロセルの構築と微量生体試料分析への応用

研究課題名(英文)Construction of a hybrid electrochemical micro-cell and its application to the analyses of trace biological substances

研究代表者

石田 晃彦(Ishida, Akihiko)

北海道大学・工学研究院・助教

研究者番号：20312382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血液や尿の検査で使用する次世代小型検査装置のための電極式検出器を開発した。検体を液体の流れに乗せて検出器(電極)まで運ぶことで測定を自動化する装置の小型化が、患者のそばでの迅速な診断が可能になるとして世界中で進められている。一方でこのような装置の感度の向上が課題となっている。しかし、電極面積を大きくすることは逆効果であり、それ以外の試みもほとんど行われてこなかった。そこで、本研究では、電極の面積ではなく形状に着目し、従来円盤型であった形状を多数の円環電極を同心円状に配列した形状にすることで感度が向上することを実証した。また、血中の微量ドーパミンを特別な濃縮なしに測定可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、独自の着想に基づいて電極の形状に着目することで微量成分を高感度に測定できる電極を開発した。複数の円環電極を同心円状に配列した電極の形状を詳細に検討して従来にはない形状を提示した。さらに、その信号特性は従来の円盤型電極とは異なることが示唆された。この成果は電気化学分析の国際誌に掲載され、電極デザインはその表紙を飾った。一方で、パーキンソン病に関係するドーパミンを血中レベルで測定可能であることを実証した。生体成分には電気化学的に検出できるものが多いことから、本研究の成果が小型分析装置に掲載されることで、近い将来、医療現場でのポイントオブケア検査に大いに貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：An electrochemical detector for next-generation miniaturized analytical devices for testing blood and urine has been developed. Miniaturization of devices allowing automatic flow-based measurement is one of the worldwide topics because it enables rapid diagnosis near the patient. These devices also require improving sensitivity. However, increasing the electrode area is counterproductive, and no other approach has been attempted. Therefore, this study focused on not the electrode area, but the geometry of the electrode. It demonstrated that the sensitivity was successfully improved by changing the geometry of the conventional shape of a disc to a concentric array of multiple ring electrodes. The proposed array electrode allowed the detection of a trace amount of dopamine in blood without special pre-concentration of a sample.

研究分野：分析化学

キーワード：電気化学分析 ウォールジェット電極 フローセル フロー分析 HPLC ポイントオブケア検査 数値シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

近年、臨床診断、食品衛生、環境保全、科学捜査のような現場では検査結果にもとづく迅速な対応が求められており、検体を採取後直ちにその場で分析できる超小型システムへのニーズが増大している。我々は、このニーズに応えるため充填カラムと検出器(電極)を集積したマイクロ流体チップおよび電気浸透流式超小型ポンプを開発し、B5サイズで総質量4kgの超小型液体クロマトグラフィー(HPLC)装置の実現に成功している¹⁾。現時点でこれほど小型のHPLC装置はなく、現場で希少な試料を共存物質から分離して定量できることから、様々な現場での普及が見込まれている。

このような超小型分析システムでの有効な検出法の一つに電気化学検出法がある。測定器を含む検出系が小型で、無標識で感度よく検出できる物質が多いからである(Talanta, 2007, 74, 342; Talanta, 2011, 85, 28)。しかし、その実用化にはさらなる検出感度の向上が必要である。多くの対象成分が数nMまたはそれ以下であるのに対して、超小型分析システムの一般的な検出限界は数百nMまたは μM オーダーに留まっているからである(Anal. Chem., 2004, 76, 3749.; Anal. Chem., 2002, 74, 3690.)。これまでの研究では、マイクロ流路の底面に電極を設置するだけで電気化学検出器を構成できることから、電気泳動などの分析素子との集積だけに関心が集中し、検出性能を向上する試みはほとんどなかった。その少ない試みの例としては、無数の微小柱状構造を電極内に形成して電極面積を大きくする(Anal. Chem., 2009, 81, 4762)というものである。一方、超小型分析システムに限らず、噛み合わせた2つのくし形電極で酸化還元サイクルを繰り返すことにより電流値を増幅する手法が以前から提案されている。しかし、適用条件が酸化還元反応が可逆的な物質とサイクル効率が高い低流量域に限られていた。

我々は以前、電気化学検出で最も典型的なチャンネルフローセルについて検証し、新たな検出器の設計に繋がる課題を明らかにした(基盤研究(C)H23~25)。チャンネルフローセルは直線流路の底面に設置した帯状電極を試料が横切るように流れる単純な構造を有している。電流値は電極面から垂直方向に形成する濃度勾配($dC/dz, z=0$)を流れ方向に積分した値と各種定数との積で得られる。ここで、電極を下流方向に拡張するとシグナル/ノイズ(S/N)比が低下する。流れ方向に濃度勾配が小さくなり、電流値の増加は鈍化するのに対し、ノイズが電極面積に比例して増大するからである。一方で、電極の縮小はS/N比を向上させるが、電流値を低下させ低濃度側での小さな電流値の測定を困難にする。以上から、電極面積の単純な増減では感度の向上が困難であった。我々は、このジレンマを解決するため、電極反応を断続化させて濃度勾配の減少をリセットし、大きな濃度勾配のみが形成するよう複数の微小電極からなる「単一くし形電極」を考案した。これは従来困難だった電流値とS/N比を同時に増大させることを可能とし、従来よりも約3桁の検出感度向上を達成した。

つづいて、我々は、チャンネルフローセルの一方向流れを2次元に展開して感度を向上させるため、試料が電極に垂直に衝突したのち放射状に流れるウォールジェットセルに着目し、単一くし形電極を発展させた同心円型アレイ電極を考案した。さらに、予想に反して、同心円電極の幅をすべて等しくするよりも外側に向かって減少させるほうがより高感度であるという興味深い知見を見いだした。また、同心円型アレイ電極の電流応答はウォールジェットセルで典型的な円盤型電極の応答²⁾を示しておらず、電極中心部と周辺部でそれぞれ2つのセルの応答モードが融合している可能性を見いだした。

以上から、我々は、同心円型アレイ電極および流路をさらに詳細に検討すれば、より高感度な電気化学検出器を構築できると着想した。

2. 研究の目的

本研究では我々の「単一くし形電極」の成果を2次元に発展させ、新たな応答モードが同時に機能する新たな検出原理を確立するとともに、実際に分析ニーズが高いバイオ試料のHPLC分析に適用してその性能と有用性を実証することを目的とした。本研究では、以下のことに取り組んだ。

1) 新たな電極による電流応答の基盤となる放射状流れを形成する流路を設計し、そこでの流速

分布を確認することで放射状流れを形成する有効範囲を明らかにする。

2) 上記流速分布を考慮しながら新たな電流応答が発現し、最も高感度な同心円型電極アレイの形状パターンを明らかにするとともに、電流応答特性を明らかにする。

3) ハイブリッド型セルを申請者らがこれまでに開発したマイクロ流体ベースの HPLC に組み込み、医薬分野で分析ニーズが高い生体試料に適用することで、その性能を明らかにする。

本研究には次のような意義がある。本研究の成果によって、酸化還元反応が可逆的な物質に限らず多くの電気活性物質を高感度に検出できるようになる。また、酸化還元サイクルを利用する場合に必要な、複数の電位を印加できる高価なポテンシostatが不要となり、比較的安価なポテンシostatで高い感度が得られ、電気化学検出法の用途が格段に拡張される。また、本研究により性能が向上した検出器を用いてマイクロ分析システムを構築することができれば、患者のそばでの検査（ポイント・オブ・ケアテスト）、環境汚染物質等のオンサイト測定、品質工程管理、鑑識などでの広範な利用が想定され、大きな社会的効果も期待できる。

3．研究の方法

1) 流路および電極の設計において、そのパラメーター（形状、寸法、構成）を変えた様々なモデルでの流体速度および濃度プロファイルならびに電流値を数値シミュレーションするために有限要素解析ソフトウェア COMSOL Ver.5.2 を用いた。

2) シミュレーションにより設計した電極（作用電極および対電極）を、真空蒸着、フォトリソグラフィ、および化学エッチングにより作製した。流路および関連部品は NC 旋盤により PEEK 樹脂およびステンレスブロックを加工することで作製した。電極、流路、その他の部品を組み立ててフローセル（ウォールジェットセル）とした。参照電極には市販の Ag/AgCl 参照電極を用いた。

3) 検出セルの性能評価のため、検出セルにキャリア液を連続的に流し、評価用のモデル物質フェロシアン化カリウムの水溶液を所定体積注入し、所定電位（+0.35 V vs. Ag/AgCl）で電流値を時間の関数として測定した。

4) 検出セルを小型クロマトグラフィ装置の検出器として評価するため、ポリカーボネート基板にカラム管（0.8 × 30 mm）を切削加工し、3 μm の逆相系充填剤粒子を充填したクロマトグラフィチップを作製した。これと上述のフローセルからなる LC デバイスを組立て、HPLC ポンプ、インジェクター、電気化学アナライザーとともに小型 HPLC システムを構成した。

4．研究成果

1) ウォールジェットセル用流路の設計

本研究で開発するフローセルは、ウォールジェット型セルの一つで、円形流路の底面に微細加工した円形電極をそれぞれの中心軸が一致するよう設置したものである。流体は円形電極の中心に垂直に衝突したのち電極面に沿って放射状に流れる。そこで放射状流れを形成する流路の設計を行った。

円形流路のモデルを構築し、そこでの流体挙動をシミュレーションによって確認した。実際には、円形流路の 3 次元モデリングを行い、この中の様々な位置での流体流れの方向と速さの有限要素シミュレーションを行った（図 1）。これにより設計した流路で放射状流れが形成されることを確認し、中心から 4 mm を有効範囲（電極の最大直径に相当）として決定した。

流路を実際に作製した場合、流路のインレットと電極の位置合わせが重要となるため、位置ずれが小さくなるよう設計した流路を作製した。流路は、素材に溶媒耐性と高い機械強度をもつ PEEK 樹脂を選択し、NC 旋盤加工により作製した。高精度な組み立てができるよう位置決めピンを採用することにより、組み立ての繰り返しによる電極応答の再現性は 3.5% ($n = 3$) と、位置合わせのずれが小さいことを確認した。

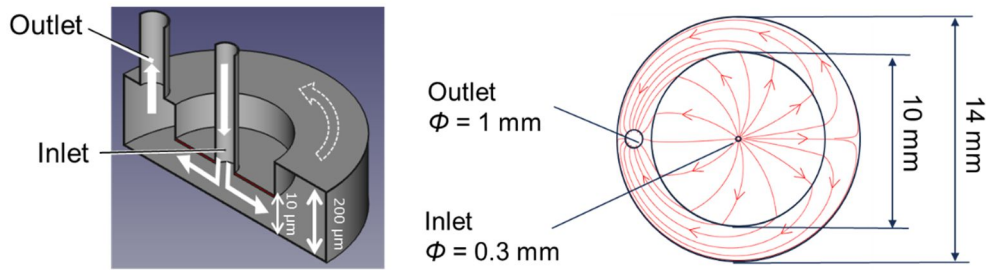


図1 流路のモデルと流路内での流体の速度分布プロフィール

2) 電極形状の設計

同心円型アレイ電極は、その線幅を内側から外側へ向かって減少させると、感度が高くなるという知見に基づいて設計した。さらに、詳細な電極モデルをデザインし、パラメーター（円環電極の線幅、間隔、個数）を変えながら濃度プロフィールをシミュレーションした。図2に本研究で用いたシミュレーション空間を示す。このとき各パラメーターにおける電流値および電流密度を求めた。特定のパラメーターでその値の変化とともに電流値が増加し、電流密度が減少する場合には、電流値が大きく、電流密度が最大値の約90%となる条件を最適値として採用した。以上から、図2のような最適形状を得た。本研究で設計した円形電極は、等間隔で配置した複数の同心円電極とそれらを結ぶ1本のリード線（電極としても作用）からなる同心円アレイ電極である。電極間隔は100 μm（固定）、環状電極数は5、環状電極の幅は内側から順に100, 50, 40, 40 μmである。

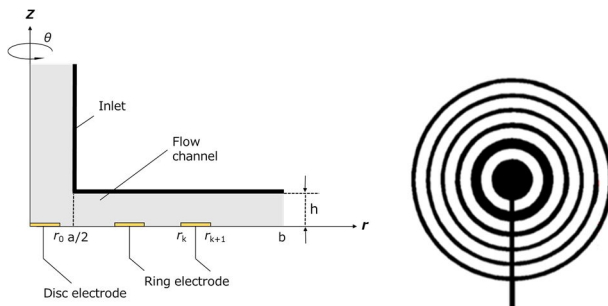


図2 電極設計のためのシミュレーション空間とシミュレーションにより決定した電極形状

3) 電極の基本性能の評価

同心円型アレイ電極は、基板に金薄膜を蒸着後、微細加工技術により作製した。同心円型アレイ電極の有効性を確認するため、上述の流路を用いてフローセルを組み立て、フローインジェクション方式で電気活性物質を注入してその電流応答を測定した。その電流値は、同心円型アレイ電極の最大直径と同じ直径をもつ円盤型電極の1.4倍高く、シグナル/ノイズ比については4倍高かった。

次に、フェロシアン化カリウムの検量線を作成した。同心円型アレイ電極と円盤型電極において、検量線はいずれも1 nM ~ 1 mMの範囲で直線性を示したが、検出限界はそれぞれ0.28 nM (S/N=3), 1.9 nM (S/N=3)であった。電極を同心円型にすることにより、検出感度が約7倍向上したことが明らかとなった。以上から同心円アレイ電極の感度の高さが実証された。

4) 同心円型アレイ電極の応答特性

上述の同心円型アレイ電極を組み込んだウォールジェットセルの応答挙動を明らかにするために電流値と流量の関係を検討した。円盤型電極からなるウォールジェット電極では、電流値は流

量の 3/4 (0.75) 乗に比例することが報告されている²⁾。様々な流量でモデル物質の溶液を同心円型アレイ電極からなるフローセルに導入して電流値を測定したところ、電流値と流量の両対数プロットの傾きから、電流値は流量の 0.64 乗に比例することが明らかとなった。一方で、シミュレーションによれば 0.83 乗に比例した。これは、円盤型電極を組み込んだ従来のウォールジェットセル(3/4 乗に比例)やチャンネルフローセル(1/3 乗に比例)とは異なる挙動である。このことは、本セルの応答挙動の特徴を示すものであるが、その挙動および実験とシミュレーションの間の不一致については今後さらなる検討が必要である。

5) 超小型 HPLC デバイスの検出器としての性能

同心円型アレイ電極からなるフローセルを小型 HPLC システムの検出器として応用した。小型 HPLC システムは、我々がこれまでに開発したもので、その分離部(小型カラム)および検出部を小型基板に組み込んで一つの小型モジュールとしているところに特徴がある¹⁾。本研究では、同心円型アレイ電極からなるフローセルをこのモジュールに組み込んだ小型 HPLC デバイスを構築した。カテコール、カテキン、カテコールアミンをモデル物質としたところ良好に分離と検出ができた。特に、カテコールについては、0.55 nM (S/N = 3) という検出限界が得られ、生体成分分析への応用に十分な感度を有することを確認した。

次に、上記のシステムを用いてドーパミン、エピネフリン、ノルエピネフリンの分離・検出を試みたところ、すべての成分はベースライン分離され、ドーパミンの検出限界は、0.8 nM (S/N = 3) であった。この検出限界は血中濃度と同等であることから、本研究で開発したセルは、高倍率の特別な前濃縮を必要とせずに測定できる優れた感度をもつことを示している。ドーパミンはパーキンソン病に関係する物質であることから、その治療への本システムの応用が期待される。

6) 結論

本研究では、独自の着想に基づいて、同心円型アレイ電極からなり、高い感度を示すウォールジェット式電気化学セルを開発し、これが微量生体成分の HPLC 分析に有用であることを実証した。生体成分には、電気化学的に検出できるものが多いことから、本研究の成果を小型 HPLC システムと融合させることで、近い将来、医療現場でのポイントオブケア検査をはじめ様々な分野で大いに貢献することが期待される。

引用文献

- 1) A. Ishida, M. Fujii, T. Fujimoto, S. Sasaki, I. Yanagisawa, H. Tani, M. Tokeshi, Anal. Sci. 2015, 31, 1163–1169.
- 2) J. Yamada, H. Matsuda, J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. 1973, 44, 189–198.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishiyama Keine, Hoshikawa Koki, Maeki Masatoshi, Ishida Akihiko, Tani Hirofumi, Tokeshi Manabu	4. 巻 31
2. 論文標題 A Concentric Ring Electrode for a Wall jet Cell in a Microfluidic Device	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Electroanalysis	6. 最初と最後の頁 1736 ~ 1743
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/elan.201900109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 干川 晃生, 真栄城 正寿, 石田 晃彦, 谷 博文, 渡慶次 学
2. 発表標題 マイクロ電気化学分析システムの高感度化のための同心円型アレイ電極の設計と評価
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2018年夏季研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 干川 晃生, 真栄城 正寿, 石田 晃彦, 谷 博文, 渡慶次 学
2. 発表標題 オンチップ液体クロマトグラフィーのためのウォールジェット式電気化学検出器の開発
3. 学会等名 日本分析化学会 第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koki Hoshikawa, Masatoshi Maeki, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi
2. 発表標題 Wall-jet concentric array electrode for electrochemical detection in on-chip liquid chromatography
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田晃彦, 西山慶音, 干川晃生
2. 発表標題 オンチップ液体クロマトグラフィーのための電気化学検出器の開発 - 電極設計への幾何形状からのアプローチ
3. 学会等名 第64回ポーラログラフィーおよび電気化学分析討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koki Hoshikawa, Keine Nishiyama, Masatoshoi Maeki, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi
2. 発表標題 An Electrochemical Wall-jet Cell with Concentric Array Electrode as a Detector for Microchip-based Liquid Chromatograph
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 干川晃生, 真栄城正寿, 石田晃彦, 谷博文, 渡慶次学
2. 発表標題 同心円型アレイ電極を検出器とする小型HPLCシステムによるドーパミンの分析
3. 学会等名 化学系学協会北海道支部2020年冬季研究発表会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	渡慶次 学 (Tokeshi Manabu) (60311437)	北海道大学・大学院工学研究院・教授 (10101)	