

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02001

研究課題名(和文)バイポーラ電気化学マイクロデバイスの高性能化と高機能化

研究課題名(英文)Highly functional bipolar electrochemical devices with high performance

研究代表者

鈴木 博章 (Suzuki, Hiroaki)

筑波大学・数理工学系・教授

研究者番号：20282337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：バイポーラ電気化学は、外部装置とは接続されない孤立した電極(バイポーラ電極)と接触する溶液の界面に電位差を生じさせ、これを酸化還元駆動力として電気化学反応を解析する新手法である。バイポーラ電極の一部に銀/塩化銀またはナトリウムイオン感応膜を形成してその部分の界面電位を固定し、両極での酸化還元反応を制御した。また、バイポーラ電気化学をもとに、マイクロ電気化学デバイス上で分離された溶液間の電氣的接続を、従来の液絡から金属接続に置換できることを示し、高度な集積化電気化学/マイクロフルイディクデバイスの実現の可能性が拓かれた。金属接続は、金属置換クーロメトリーの高感度化にも有効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

従来の3電極系と比べ、バイポーラ電気化学系は多数の分子の一括同時検出に有利であるが、その基本的挙動については未知のところが多かった。本研究では、従来の研究から一歩踏み込んで、バイポーラ電極の挙動をより詳細に解析し、これまで知られていなかった性質を明らかにした。本研究では、電氣的に浮いたバイポーラ電極上の界面電位制御を試みたが、これは検出感度の向上等、バイポーラ系の高性能化に有利である。また、この研究を通じて、従来の液絡接続に代わる金属接続という手法が新たに生み出されたが、これは高度な電気化学/マイクロフルイディクデバイスを構築する上での基盤となりうる。

研究成果の概要(英文)：Bipolar electrochemistry is a new electrochemical technique that features generation of potential difference between a solution and electrically isolated electrodes (bipolar electrode) that are not connected to any external instruments. By forming Ag/AgCl or an ion-selective membrane on a part of the bipolar electrodes, the interfacial potential differences of the parts were fixed and redox reactions on both poles could be controlled. The technique was also used to connect solutions in microfabricated electrochemical systems using metal connections, which can be a basis in creating more advanced integrated electrochemical microfluidic devices. The metal connection was also effective in improving the sensitivity of a coulometric device that features detection of silver deposited accompanying the oxidation of an analyte.

研究分野：化学センサ、マイクロフルイディクス

キーワード：バイポーラ電気化学 銀/塩化銀 イオン感応膜 金属接続 クーロメトリー マイクロフルイディクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

従来の3電極系による電気化学反応の解析では、検出に用いられる作用極に電位が印加され、酸化・還元に伴い発生する電流が調べられる。ここでは、支持電解質の添加により、溶液中の電圧降下を抑え、作用極/溶液界面に効果的に電位差を印加する。21世紀初頭に、この点において対照的なバイポーラ電気化学系が提案された。バイポーラ電気化学系では、単一あるいはアレイ状の矩形状電極パターン(バイポーラ電極)が溶液中に浸漬され、別の一对の駆動用電極により、溶液に電圧が印加される。ここで、意図的に溶液抵抗を大きくし、溶液中に大きい電位勾配を形成すると、バイポーラ電極/溶液界面の電位差はバイポーラ電極上の位置により異なるため、電極活物質が存在すると、一端で還元反応が、他端で酸化反応が進行する。バイポーラ電極は外部装置には接続されないため、バイポーラ電極の一端で進行する酸化・還元反応の検出には、電気化学発光が用いられる。このような系は、「開いた」(open)バイポーラ系と呼ばれるが、両端で酸化・還元反応を同時に進行させるバイポーラ電極や電位差を制御する駆動用電極が同一の溶液に浸漬されているため、センシングの用途には不都合が多かった。そこで、溶液を2つに分離し、バイポーラ電極の両端および電位印加用電極をそれらの溶液に分離する「閉じた」(closed)バイポーラ系が近年では主流になっている。

従来のバイポーラ電気化学の研究では、バイオセンシングへの応用が中心的なテーマであった。しかし、センシングデバイスの高感度化、高機能化を進める上で、バイポーラ電極自体の基本的な挙動に関しては未知の点が多く、検討すべき技術的課題も多く残っていた。一方、上記の「閉じた」バイポーラ系については、電気化学デバイス一般、特にマイクロ電気化学デバイスの高度化に資する多くの利点が存在する。世界的に見ても、このような視点でバイポーラ電気化学の研究を進めている例は極めて少ない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、バイポーラ電気化学に新たな手法を導入して化学/バイオセンシングデバイスの格段の性能改善、新機能付加を図り、DNA、タンパク質等の生体関連分子を格段にハイスループットで高感度に検出するデバイスを実現し、細胞計測等の有望な分野への応用を目指すことである。

3. 研究の方法

3.1 デバイスの作製

本研究で用いたデバイスの作製は、スパッタリング、リフトオフ等の薄膜プロセスにより行った。反応容器は、アクリルあるいは厚膜フォトレジスト(SU-8)により形成した構造を型として用い、ポリジメチルシロキサン(PDMS)により形成した。

3.2 バイポーラ電極の電位制御

バイポーラ電極は電気的に浮いており、従来の3電極系と異なり、その電位制御を外部装置により行うことはできない。そこで、白金バイポーラ電極の一部に、参照極として用いられる非分極性の銀/塩化銀を配置し、バイポーラ電極/溶液間の界面電位差の制御を行うことを試みた(図1、2)。バイポーラ電極の一端では酸素の還元を、他端では電気化学発光を起こし、その強度より、バイポーラ電極内での酸化還元反応を調べた。バイポーラ電極の形状、銀/塩化銀の位置を変え、発光強度の変化を調べた。ここで、溶液と銀/塩化銀界面で銀/塩化銀の電極反応により電流が発生してしまい、これがアノード、カソードでの電極反応を検出する上での誤差を生じる点が問題として浮上した。そこで、銀/塩化銀の代わりに、界面での電子

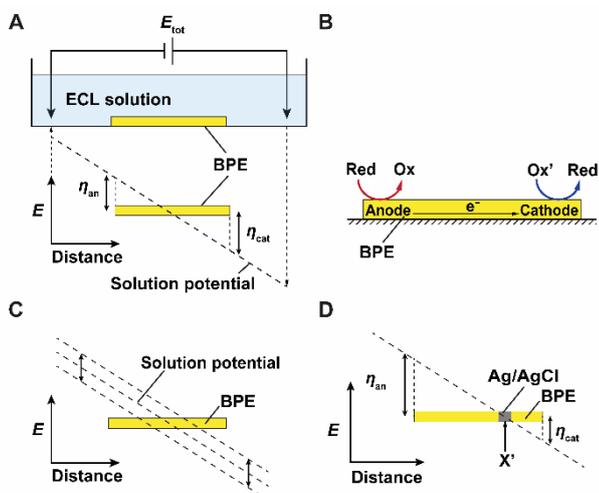


図1. オープンバイポーラ電気化学系。(A)基本構成と溶液中の電位勾配。(B)アノード端、カソード端での反応。(C)電位勾配とバイポーラ電極電位の関係。(D)銀/塩化銀による界面電位の固定。

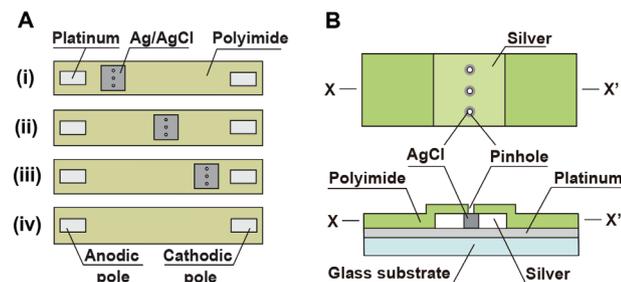


図2.(A)銀/塩化銀を異なる位置に形成したバイポーラ電極。それぞれの長さは8mm。(B)銀/塩化銀部分の平面図と断面図。塩化銀は図のピンホールから銀層内部に形成した。

移動がないポリマーイオン感応膜を用い、同様の実験を行った。

銀/塩化銀、イオン感応膜の効果は、閉じたバイポーラ系でも調べた。銀/塩化銀を用いた場合には、カソード極側に酵素西洋ワサビペルオキシダーゼを固定し、過酸化水素の定量性を調べた。

3.3 金属接続電気化学系

閉じたバイポーラ系では、2つの異なる溶液がバイポーラ電極で接続される。通常、この電極上での酸化還元反応がセンシングに用いられるが、これを3電極系その他の電気化学系で、微小流路または微小反応容器に分けられた溶液を接続するのに用いることもできると考えられた。微細加工で作製される電気化学系の集積化が進むと、溶液間の電氣的接続を取るのが困難になる。これは、良好な微小液絡を形成するのが困難であることに加え、電極や流路のレイアウトが複雑化すると、液絡同士を交差させねばならない状況が生じるためである。金属接続であれば、この問題が容易に解決される。

溶液間の金属接続の効果を調べるため、図3のような微小3電極系を薄膜プロセスにより作製した。作用極、参照極、対極は別々の区画に收容した。それぞれの区画には電解液を導入し、これらは液絡(図3A、タイプI)または末端に塩化銀を形成した銀線を形成したイリジウム線で接続した。銀線、イリジウム線接続の場合、参照極-作用極-対極の順で接続する場合(図3B、タイプII)と作用極-参照極-対極の順で接続する場合(図3C、タイプIII)について調べた。前者では作用極-参照極間に電流が流れないが、後者では流れる。

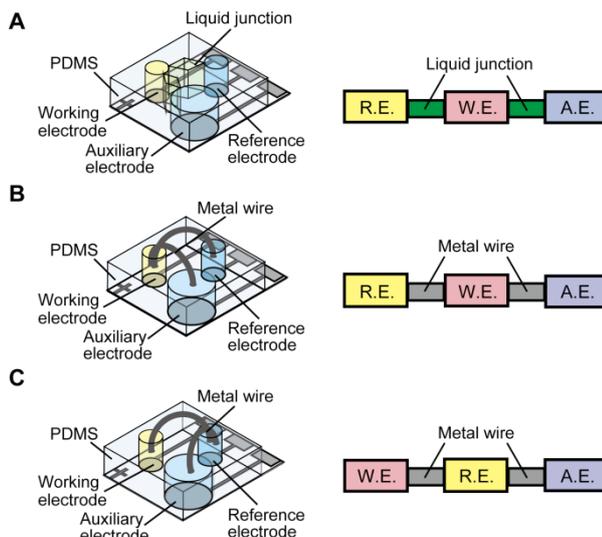


図3. 作用極、参照極、対極の溶液が分離され、これらが様々な方法で接続された微小3電極系。(A) 液絡接続。(B)、(C) 金属接続。右は金属線の接続方法を示す。

3.4 金属置換クーロメトリーへの応用

当グループでは、既に検出対象物質を一旦銀に変換し、これをクーロメトリーで測定する高感度分析デバイスを提案している。ここでは、液絡で接続された2本の微小流路の片方に検出対象物質検出用微小電極アレイを、他方の微小流路にこれと液絡で接続された銀析出用微小電極アレイとクーロメトリー用の参照極、対極を形成する。検出用電極を有する流路に検出対象物質(過酸化水素)を、他方の流路に硝酸銀溶液を導入すると、混成電位で過酸化水素の酸化と銀イオンの還元が同時に進行する。この量をクーロメトリーで測定する。本研究では、溶液間の接続に用いた液絡を金属接続に置き換え、高感度化を図る試みを行った(図4)。

4. 研究成果

4.1 バイポーラ電極の電位制御

開いたバイポーラ電気化学系において、白金バイポーラ電極上での銀/塩化銀の位置を変えることにより、それが無いバイポーラ電極の場合と比較して、電気化学発光強度に明らかな違いが認められた(図5)。また、銀/塩化銀の電位は Cl^- イオン濃度に依存して変化するが、これに伴う電気化学発光強度の変化も認められた(図5)。以上のことから、銀/塩化銀を配置することにより、バイポーラ電極上の電位が制御可能であることを確認した。ここで、銀/塩化銀では、酸化・還元に伴い電子の授受が行われる。実際にカソード極、アノード極と銀/塩化銀に流れる電流を調べたところ、その位置には依存するが、銀/塩化銀に流れる電流が、少なからず電気化学発光強度に影響していることが考えられた。そこで、次に界面での電子移動のない、ポリマーイオン感応膜を用いた。

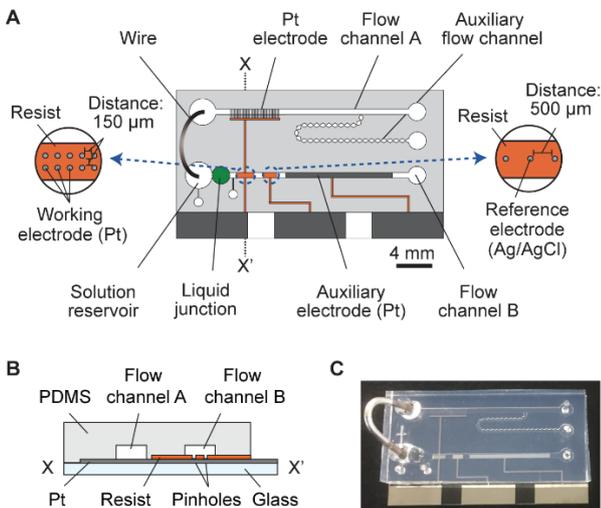


図4. 金属接続により2つの流路の溶液を接続したクーロメトリックデバイス。(A)平面図。(B)(A)のX-X'に沿った断面図。(C)作製したデバイスの写真。

その結果、バイポーラ電極上でのイオン感応膜の位置、ナトリウムイオン濃度の変化に伴い、電気化学発光の強度の変化が認められ、ナトリウムイオン感応膜を用いても、バイポーラ電極上の電位制御が可能ことが示された。

同様の電位制御効果は、閉じたバイポーラ系でも認められた (図6)。また、過酸化水素の検出を試みたところ、銀/塩化銀を有しない場合と比べ、高感度化が実現できることが示された。

4.2 金属接続電気化学系

図3の3電極系の挙動をフェリシアン化カリウムのサイクリックボルタモグラムにより調べた。まず、末端が銀/塩化銀とした銀線で作用極-参照極間を接続した。図3Bの接続のように、作用極-参照極間に電流が流れない場合には、金属接続両端の界面電位が等しくなるように Cl⁻イオン濃度を調節することにより、これらの電極間を液絡で接続した場合と同様のサイクリックボルタモグラムが認められた (図7A)。一方、図3Cのように、作用極-参照極間に電流が流れる場合、電流値が大きい場合に金属接続両端での分極による影響が認められ、サイクリックボルタモグラムのピーク間隔が増大し、形が崩れた (図7B)。しかし、濃度を下げ、作用極を小さくして十分に電流を小さくすることにより、波形のゆがみのない、液絡で接続した場合と同様のサイクリックボルタモグラムが認められた (図7C、D)。

図3のデバイスのように、参照極として銀/塩化銀を用いる場合には、被検液の Cl⁻濃度に合わせた金属接続両端の界面電位差の調整が容易ではない。そこでより一般的な使用を目指し、両端に pH 応答性酸化膜を形成したイリジウム線で接続した。フェリシアン化カリウムのサイクリックボルタモグラムを調べたところ、銀/塩化銀と同様に、低電流値では明瞭なピークを有するサイクリックボルタモグラムが得られ、液絡の代替となりうることを確認した。また、1個ずつの参照極と対極を含む溶液と、6個の別々の区画に形成された作用極中の溶液を個別にイリジウム線で接続して得られた6個のサイクリックボルタモグラムはほとんど一致し、再現性の良い多検体検出が可能であることを確認した。さらに、一つのチップ上の作用極と他のチップの参照極、対極の溶液をイリジウム線およびリード線で接続して離しても、上記のサイクリックボルタモグラムと同じものが得られることを確認した。これにより、リモートセンシングも可能になった。金属接続は、他の電気化学的手法にも用いることができる。図3のデバイスを用いて作製したグルコースセンサ、Na⁺センサの特性結果より、アンペロメトリー、ポテンシオメトリーにも適用可能であることが示された。

当研究グループでは、センシングデバイスの他に微量の流体を制御するマイクロフルイディクスにおいて、電気化学的原理を用いて、自動的、自立的に送液を制御するデバイスの研究も進めてきた。ここでは、複数の微小流路中の溶液同士を液絡で接続してきたが、微小で良質の液絡の作製は難しく、また微小流路の数が増え、電極、微小流路のレイアウトが複雑になると、液絡で溶液同士の接続自体不可能になる。しかし、液絡を金属接続に変えることができれば、これらの問題は解決される。3つの流路からなり、水素バブルの可逆的な生成・消滅により一つの流路の溶液に往復運動をさせる自立的電気化学アクチュエータを作製し、銀/塩化銀線で3流路の溶液を接続した (図8)。その結果、実際に液絡で溶液間を接続した場合と同様の溶液

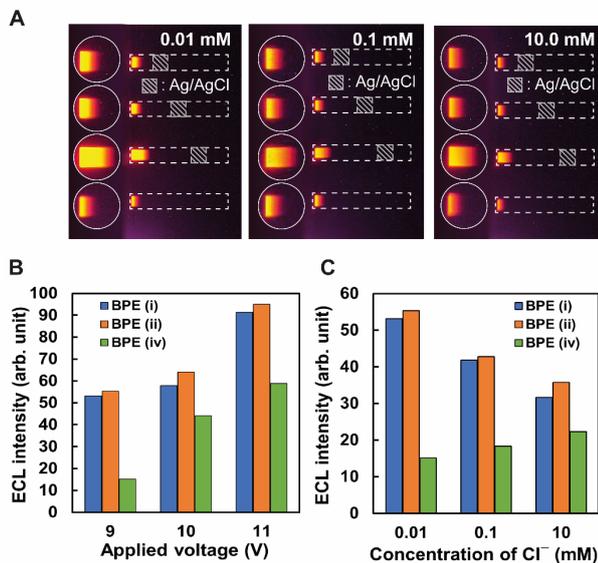


図5. 開いたバイポーラ電気化学系で白金バイポーラ電極上に銀/塩化銀を置いた効果. (A)図1の(i)-(iv)のバイポーラ電極を用い、Cl⁻イオン濃度を変化させた時の電気化学発光強度の違い. KCl 濃度: 0.01 mM. (C) 電気化学発光強度の Cl⁻ 濃度依存性. 印加電圧: 9.0 V.

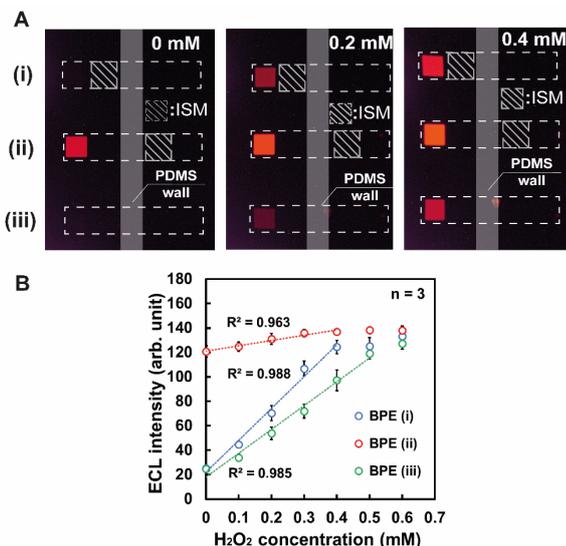


図6. 閉じたバイポーラ系における銀/塩化銀の効果. (A) 銀/塩化銀の位置と過酸化水素濃度を変化させた時の電気化学発光強度の変化. KCl 濃度: 0.1 mM. (B)電気化学発光強度の過酸化水素濃度依存性. (A)、(B)とも印加電圧

図3のデバイスを用いて作製したグルコースセンサ、Na⁺センサの特性結果より、アンペロメトリー、ポテンシオメトリーにも適用可能であることが示された。

当研究グループでは、センシングデバイスの他に微量の流体を制御するマイクロフルイディクスにおいて、電気化学的原理を用いて、自動的、自立的に送液を制御するデバイスの研究も進めてきた。ここでは、複数の微小流路中の溶液同士を液絡で接続してきたが、微小で良質の液絡の作製は難しく、また微小流路の数が増え、電極、微小流路のレイアウトが複雑になると、液絡で溶液同士の接続自体不可能になる。しかし、液絡を金属接続に変えることができれば、これらの問題は解決される。3つの流路からなり、水素バブルの可逆的な生成・消滅により一つの流路の溶液に往復運動をさせる自立的電気化学アクチュエータを作製し、銀/塩化銀線で3流路の溶液を接続した (図8)。その結果、実際に液絡で溶液間を接続した場合と同様の溶液

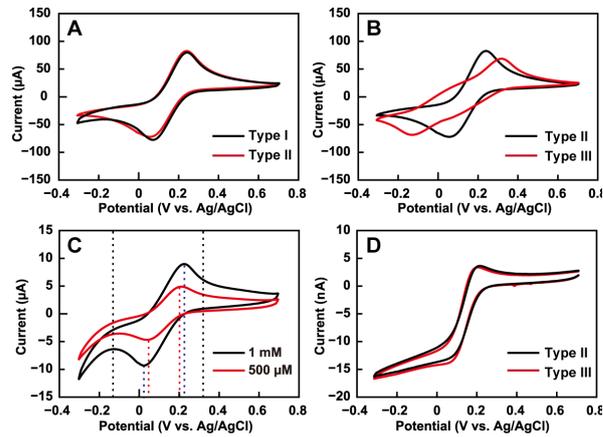


図7. 銀/塩化銀線で溶液が接続されたデバイスの 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ のサイクリックボルタモグラム. (A) タイプ I、II のデバイスの比較. (B) タイプ II、III のデバイスの比較. (C) タイプ III デバイスで $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 濃度を 1.0 mM、500 μM に変えた時のサイクリックボルタモグラムの変化. (A)~(C) のデバイスの作用極の直径は 3 mm. (D) 作用極直径を 50 μm にした時の 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ のサイクリックボルタモグラムの変化.

の往復運動を確認した。この手法を用いれば、液絡による接続では不可能であった、電気化学回路とも呼ぶべき、マイクロフルイディクスと電気化学の融合デバイスが実現できる。

4.3 金属置換クーロメトリーへの応用

図4に示すデバイスにおいて、各流路の溶液を液絡で接続すると、検出用白金電極両端での酸化・還元は同じ混成電位で進行する。したがって、検出対象分子とその濃度で反応の進行が決まってしまう自由度がない。しかし、流路間の液絡接続を金属接続で置き換え、金属接続両端の酸化還元反応を非対称にすると、酸化と還元の電位を独立にずらし、酸化・還元反応を増大させることができる。図9にその効果を示す。金属接続の一端に銀/塩化銀を、他端に鉛や亜鉛を用いて非対称にすることにより、微小電極上での上記の酸化還元反応を加速できることが示された。過酸化水素の検出限界は、液絡で接続した場合は 30 nM であったが、以上の新手法の導入により、2.4 nM まで下げることができた。

ここでは、過酸化水素の検出を試みたが、タンパク質、DNA の検出への応用も有用である。

これらの検出を行う場合には、酵素標識が多く用いられるが、酵素としてアルカリンフォスファターゼを用いると、酵素反応生成物によるレドックスサイクリングによる増幅を行うことができる。上記のデバイスに類似の微小櫛型電極を有するデバイスを作製し、特性を評価した。その結果、レドックスサイクリングによる増幅効果は認められたが、定量性の点で不十分であった。この点については、現在も引き続き検討を続けている。

この手法をタンパク質等の生体関連物質の検出・定量に応用する場合、上記の検出用電極と銀を析出させる電極を多数アレイ状に配置して別々の区画に收容し、閉じたバイポーラ系で同時に銀の析出を行うことができる。ここで、析出した銀のクーロメトリーを別に形成した3電極系で行う場合、それぞれの作用極に参照極、対極を形成すると、ポテンショスタットに接続するための端子数が激増する。そこで、作用極、参照極、対極を行列状に配置し、微量流路で分離することで、複数の作用極をパターンで接続しても、個々の作用極からの出力を分離できることを確認した。現在、この手法を図4のデバイス用いて、多数のタンパク質を一括して検出するデバイスの開発を進めている。

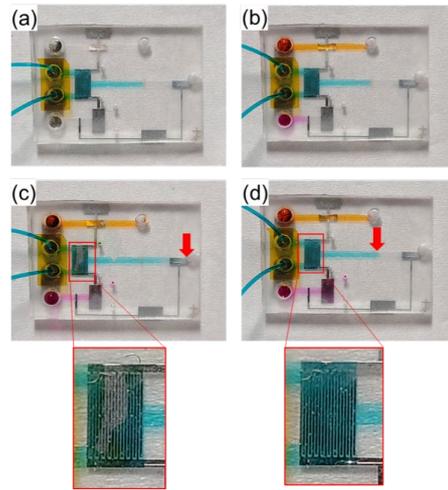


図8. 中央の微小流路の溶液を自立的に前方、後方に移動させるマイクロフルイディクスと電気化学の融合デバイス. (a) 中央の流路に溶液を導入. 溶液は疎水性バルブで止まる. (b)、(c) 上の流路に KCl 溶液を導入. これが流路中の亜鉛電極を濡らすと、これと接続している中央の流路中の微小櫛型電極で水素バブルが発生. 溶液は右に動く. (d) 下の流路に硝酸銀溶液を導入し、これが白金電極に到達すると、これと接続している中央の流路中の微小櫛型電極で水素バブルが収縮. 溶液は左に戻る.

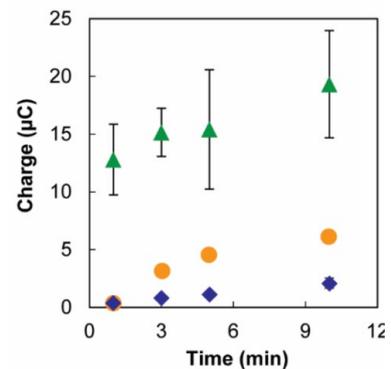


図9. 10 μM H_2O_2 を被検液として用い、銀の析出時間を変えた時の出力電荷量の変化. 金属接続部は両側とも銀/塩化銀 (◆)、銀/塩化銀とニッケル (●)、銀/塩化銀と鉛 (▲) とした. 5 回の測定の前平均と標準偏差を示す.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 F. Sassa, G. C. Biswas, and H. Suzuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Microfabricated electrochemical sensing devices	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab Chip	6. 最初と最後の頁 1358 - 1389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9lc01112a	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 該当する

1. 著者名 I. Anshori, S. Takie, and H. Suzuki	4. 巻 31
2. 論文標題 Active junctions to improve sensitivity and detection limit of a microdevice based on coulometry coupled with silver metallization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Electrianalysis	6. 最初と最後の頁 1630 - 1634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/elan.201800825	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Chia-Chien Wu, Nurul Asyikeen Ab Mutalib, 露木健、鈴木博章
2. 発表標題 イオン選択性膜によるバイポーラ電極上での 反応制御
3. 学会等名 令和2年電気学会全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤優成, 假屋洗希, 栗原寿明, 鈴木博章
2. 発表標題 微小電気化学デバイスにおける金属接続の効果
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nurul Asyikeen Ab Mutalib, Koki Kariya, Toshiaki Kurihara, and Hiroaki Suzuki
2. 発表標題 Control of the Potential on Bipolar Electrodes for Multiplexed Detection
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤優成、假屋洸希、栗原寿明、鈴木博章
2. 発表標題 金属接続された微小3電極系の挙動
3. 学会等名 令和元年度E部門総合研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ヌル アシキン アブ ムタリブ
2. 発表標題 銀/塩化銀によるバイポーラ電気化学系における電位制御
3. 学会等名 2019年電気化学会第86回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤優成
2. 発表標題 金属接続微小3電極系における参照極の分離
3. 学会等名 2019年電気化学会第86回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ヌル アシキン アブ ムタリブ
2. 発表標題 銀 / 塩化銀によるパイポラ電極の電位制御
3. 学会等名 平成31年電気学会全国大会
4. 発表年 2019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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関