

氷マイクロフルイディクス

—氷内部に形成したナノ・マイクロ構造を利用した分離・分析場の構築—

自然界に存在する水の多くは水溶液が凍結してできている。このような水は多結晶であり、内部には溶質が濃縮された溶液で満たされたナノ・マイクロ空間が存在する。本稿では、この氷内部に形成されたマイクロ構造を利用した新たな分離・分析場を紹介し、それらを用いて明らかになった氷/水溶液界面における水の表面物性や物質との相互作用について解説する。

稲川 有徳, 岡田 哲男

1 はじめに

近年のナノテクノロジーの目覚ましい発展は、ナノ材料やナノデバイスの創製に大きく寄与し、化学のみならずあらゆる科学技術分野の進展に貢献している。ナノテクノロジーは材料デバイスの構築という観点から二つのアプローチに分けることができる。すなわち、積み木のように1分子を自発的に組み立ててナノ構造を構築する「ボトムアップ型」と、彫刻のように大きな材料を加工することによってナノ構造を構築していく「トップダウン型」である。それぞれのアプローチには長所短所があるものの、これらを駆使することでイメージング材料の創製や化学プロセスの集積化が可能になっている。一方で、狭く閉じ込められた空間は比表面積が大きいことから、このような空間に存在する物質は界面との相互作用を大きく受けその物性がバルク状態とは異なることが報告されている。すなわち、化学分野においてナノ・マイクロサイズの空間を効果的に利用するためには、空間が有する特異的な性質の解明が必須である。

材料のような人工物のみならず、ナノ・マイクロメートルサイズの微小空間を有する構造は自然界にも数多く存在する。例えば、細胞や小胞体内空間やそれらを仕切る細胞膜内空間のほか、土壌や鉱石内などに存在する空隙などが挙げられる。このような空間内で起こる自己組織化現象や化学反応を解明することは、生命の起源や自然界内における物質循環のメカニズムを明らかにする。しかし、このような空間に外からアクセスすることは難しく、バルク空間では見られない機能を発現させた状態で物性を解明することは困難である。それを可能にするアプローチの一つとして、解明したいターゲットを分離分析場として用いることが挙げられる。このような例はすでに報告されており、例えば脂質二重膜内における分子間相互作用を見るために、脂質二重膜を電気泳動場と

Ice Microfluidics: Separation and Analytical Fields with Nano/micro-sized Structures Formed in Ice.

して用いる計測方法などが報告されている¹⁾。このようなアプローチは、測定したいターゲットの機能を最大限に生かした状態で計測することができるため、従来の分析手法では明らかにすることができなかった新しい性質を評価することができるようになる。

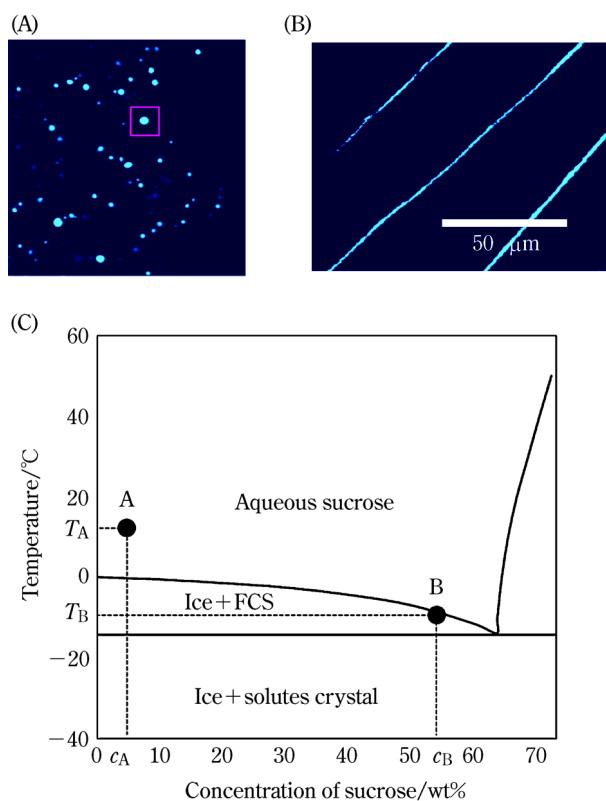
筆者らのグループは、特に氷の中に生じるナノ・マイクロ構造に着目し、その物理化学的特性を明らかにするために「氷を材料とした分析手法」の開発を行っている。本誌でも2014年6号において「氷を用いる分離と計測」という題目で、特に氷の粒子を固定相とする「アイスクロマトグラフィー」および氷内部で化学反応を生じさせる「氷マイクロリアクター」について解説している。これらの研究により、氷表面における物質の相互作用のメカニズムを解明し、氷内部を直接測定する方法論が確立されている。特に、水溶液を凍結することによって生じる氷の単結晶間に生じるナノ・マイクロ構造の性質が、氷が有する化学的性質の特異性を誘発していることを示唆する結果を得ている。実際、このような空間の化学的性質は温度や凍結する溶液の濃度、溶質の種類によって大きく変化する。そこで筆者らは、氷のナノ・マイクロ構造を分離・分析場として用いることで、その物理化学的性質を明らかにすることができるのではないかと考えた。

本稿では、筆者らがこれまでに構築してきた氷の内部に存在するナノ・マイクロ構造を利用した分離および分析手法を紹介する。筆者らは水溶液を凍結して自然にできるマイクロ構造を分離計測場として利用する方法と、大きな氷の塊の中にマイクロチャネルを形成してそれを計測場として利用する方法を検討してきた。ナノテクノロジーの観点から見れば、前者は「ボトムアップ型」、後者は「トップダウン型」といえるであろう。そこで、本稿では筆者らの研究成果をこの二つのアプローチに要約し、それぞれで形成されたナノ・マイクロ構造を利用して何ができるのか、そして何がわかるのかを紹介したい。

2 凍結濃縮溶液とその性質

地球上に存在する氷のほとんどは、塩や糖などの不純物を含む水溶液が凍結してできている。また、そのほとんどが多結晶であると考えられる。水溶液を凍結すると、相分離が起こり純粋な氷結晶と溶質が高濃度に濃縮された溶液が生じる。このような溶液は凍結濃縮溶液 (Freeze Concentrated Solution : FCS) と呼ばれる。「不純物」は氷の単結晶間であるグレインバウンダリー (GB) やグレインバウンダリーが交差するトリプルジャンクションへと排除される。図 1(A), (B) に LiCl およびスクロースの水溶液を凍結して生じた FCS の蛍光画像をそれぞれ示す。凍結する水溶液にはフルオレセインナトリウムを溶解した。フルオレセインナトリウムは氷結晶から FCS 内に排除されるため、FCS の部分が緑色に染色されている。LiCl 水溶液を凍結すると FCS は孤立した球状構造を有する一方で、スクロース水溶液を凍結すると直線状の構造を有することがわかる。

FCS 内の溶液組成は水-溶質系の相図から算出できる。図 1(C) に水-スクロース系の相図を示す²⁾。水溶液を冷却し、凍結温度に到達すると相分離する。FCS の濃度は温度の低下に伴い凝固点降下曲線に従って上昇する。そして共晶点 (T_{eu}) に到達すると、すべての成分



(A) 凍結 LiCl 水溶液中の FCS の蛍光画像 (B) 凍結スクロース水溶液中の FCS の蛍光画像。 (C) 水-スクロース 2 成分系の相図。

図 1 凍結水溶液内部に形成された FCS。相図のデータは文献 2) から取得。

が結晶として析出する。例えば、図中の点 A の水溶液 (濃度 c_A) を凍結温度以下かつ共晶点以上の温度 T_B まで冷却する。相分離により生じた FCS の濃度は凝固点降下曲線上の c_B に対応する。この時、溶液の濃縮率 α は以下の式で表すことができる。

$$\alpha = \frac{c_B}{c_A} \dots \dots \dots (1)$$

c_B は FCS の温度のみによって決まり、凍結前の水溶液によらず常に一定である。そのため、 c_A の値が小さいほど高い濃縮率が得られる。相図における溶液濃度は通常質量パーセント濃度で表される。そのため、先ほどの c_A および c_B を用いると、氷と FCS の体積比率は以下のように表すことができる。

$$\frac{V_{FCS}}{V_{ice}} = \frac{\rho_{ice}}{\rho_{FCS}} \frac{c_A}{c_B - c_A} \dots \dots \dots (2)$$

ただし、 V_{FCS} , V_{ice} , ρ_{FCS} , ρ_{ice} はそれぞれ FCS の体積、氷の体積、FCS の密度、氷の密度である。この式から、FCS の体積は凍結前の水溶液濃度 c_A および凍結後の FCS の濃度が c_B となる温度、すなわち T_B によって制御できることがわかる。

食品科学において、凍結による濃縮は果汁飲料の濃縮還元法などに用いられている。これは、溶質の化学的性質を変えることなく高濃度に濃縮できるためである。このような考え方は、分析化学の前処理における濃縮にも適用することができる。筆者らの研究グループではこれまでに FCS を利用した高感度検出法を報告している。Ito らはキャピラリー電気泳動用の試料を凍結により濃縮することで、キャピラリー電気泳動の高感度化を実現した³⁾。また、Hashimoto らは aL-fL サイズの FCS 中でマグネシウムイオンを 8-ヒドロキシキノリン-5-スルホン酸と錯形成させることで、zmol オーダーの高感度検出を実現した⁴⁾。

数 mM の塩の水溶液を凍結すると、サブナノメートルオーダーサイズの FCS が生じることが確認されている。このナノ・マイクロサイズの FCS の中では通常バルク水では見られない化学反応の特異性を有することが報告されている。例えば、亜硝酸イオンの酸化反応や⁵⁾クラウンエーテルの錯形成反応⁶⁾、そして RNA の複製反応の促進⁷⁾が挙げられる。この他にも、化学反応の特異性は数多く報告されているものの^{8)~11)}、そのメカニズムについてはいまだ議論が絶えない。Takenaka らは、凍結に伴う濃縮効果のみならず、氷へのイオンの取り込みによって生じる凍結電位や FCS の凍結に伴う FCS の pH 変動など様々な氷/FCS 界面および FCS の物理化学的性質によることを示唆している¹²⁾¹³⁾。しかしながら、実験的に FCS および氷/FCS 界面の物理化学的性質を解明している報告例は非常に少ない。そのた

め、FCS が有する特異性のメカニズムを深く議論するためには、これらの物性を明らかにすることが必要である。

筆者らのグループでは、分析化学的手法を用いて FCS および氷/FCS 界面が有する物理化学的性質の解明を行い、その特異的な性質を明らかにしてきた。例えば、氷/FCS 界面におけるイオン種の取り込み¹⁴⁾、粘性率の測定¹⁵⁾、凍結リン酸緩衝液内の FCS における pH 変動とそのシミュレーション¹⁶⁾、サイクリックボルタンメトリーによる FCS 内における疎水性化合物の溶解度上昇の発見¹⁷⁾などが挙げられる。一般的に、水をナノ空間に閉じ込めると、界面の性質の影響を受けてその化学的性質がバルク状態とは異なる性質を示すことが数多く報告されている^{18)~23)}。しかしながら、筆者らは FCS 内の特異性がサブマイクロメートルサイズでも生じることを見いだした。氷/FCS 界面は「H₂O 分子」を主成分とする固相および液相からなる。そのため、界面近傍でマクロな視点では界面の動的挙動は平衡状態に達しているものの、ミクロな視点では固液相転移が絶えず生じていると考えられる。そのため、氷/FCS 界面の揺らぎが通常の固液界面よりも大きくなり、FCS のサイズが比較的大きくても界面の影響を受けやすいと考えられる。このような FCS が有する特異的な物理化学的性質の解明は、FCS 内で起こる化学反応特異性のメカニズムの解明の一助となると考える。その一方で、FCS は氷に囲まれたナノ・マイクロ空間に存在するため、従来の分析手法を適用することは容易ではない。そこで、筆者らは FCS を利用した分析法を新たに開発し、その結果から FCS や氷/FCS 界面が有する性質を解明できると着想した。

3 ポトムアップ型氷マイクロフルイディクス

筆者らはスクロース水溶液を凍結すると FCS の体積が温度によって制御できることに着目し、これをサイズチューナブルな分離場として用いることができなかと考えた。興味深いことに、糖やアルコールの水溶液を凍結すると、FCS によって満たされた数百 μm の GB が生じることが報告されている²⁴⁾²⁵⁾。このようなサイズの FCS チャンネルはマイクロ～サブマイクロメートルサイズの物質を分離する場としては十分に長いと考えられる。FCS チャンネルは凍結により自発的に生成しているため、ここではこれを用いる手法を「ボトムアップ型」と称する。そこで、この FCS チャンネルのサイズチューナビリティを利用して、これまでになく物質のサイズ分離方法を考案した²⁶⁾。

分離モードの概念図を図 2 に示す。大きさの異なる粒子を分散させたスクロース水溶液を凍結する。すると、ターゲットの粒子は氷結晶から排除され、FCS チャンネルに導入される。この時、FCS チャンネルの幅が

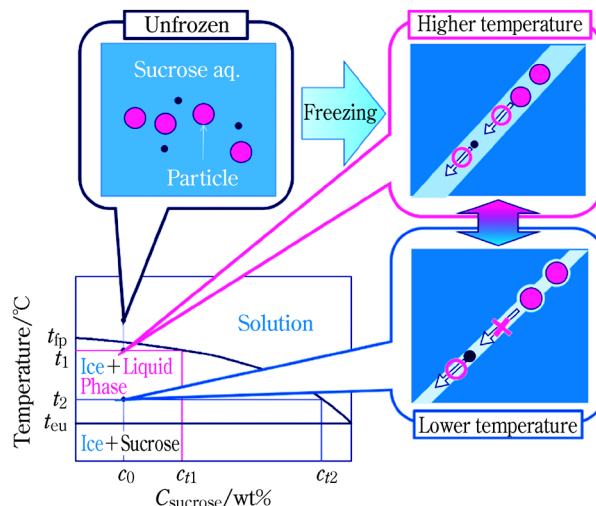
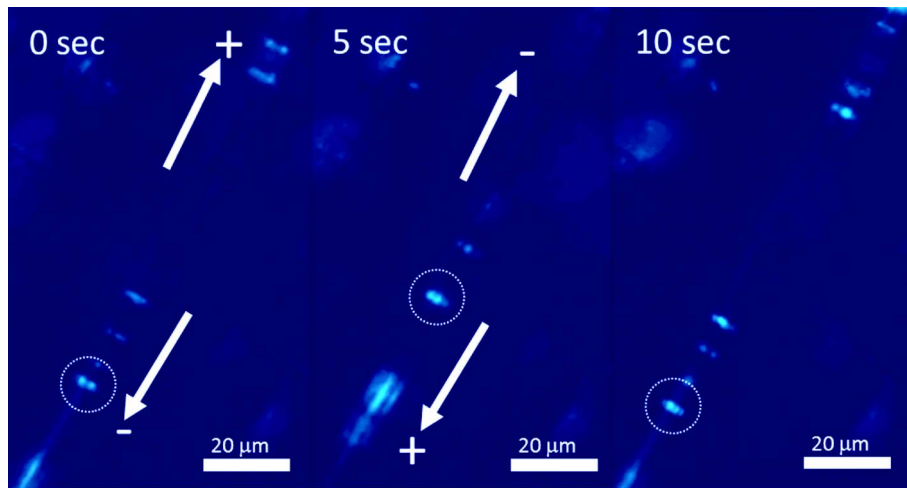


図 2 FCS チャンネルのサイズチューナビリティを利用したサイズ認識メカニズム

十分に大きければ、すべての種類の粒子は氷の壁面から物理的相互作用を受けることはない。しかし、試料温度を低下させ FCS チャンネルの幅を徐々に狭くすると、まず最も大きな粒子が氷壁面により捕捉される。一方、他の小さな粒子ははまだ氷壁面からの物理的相互作用を受けることなく自由に動くことができる。さらに温度を低下させて行くと、次に大きな粒子が捕捉される。このように、温度により FCS チャンネルの幅を制御することで、大きさの異なる粒子に対する氷壁面からの物理的な相互作用を調整することができる。筆者らは、このサイズチューナブルな FCS チャンネルを電気泳動場として用いて、温度によるチャンネル幅の制御を行い、粒子の泳動挙動の温度依存性から粒子のサイズ選択的識別を行った。

75 mM スクロース水溶液を凍結して形成した FCS チャンネル中で直径 1.0 μm のマイクロ粒子を泳動したときの蛍光画像を図 3 に示す。粒子の表面はカルボキシ基修飾されているため、負に帯電している。粒子はアノードに向かって泳動していることがわかる。また、電極の極性を反転させると泳動方向も反転した。このことから、FCS チャンネルがマイクロ粒子の電気泳動場として機能することがわかった。

FCS チャンネルのサイズチューナビリティを評価するために、チャンネル幅の決定を行った。温度が高い時、粒子は物理的相互作用を受けずに泳動することができる。しかし、温度を下げていくと、ある温度で粒子が泳動できなくなったこの温度では、FCS チャンネルの幅が粒子の直径と同じであると考えられる。この時のチャンネル幅を「実効チャンネル幅」とした。図 4 にスクロース水溶液を凍結したときに生じる FCS チャンネルの実効チャンネル幅を示す。縦軸は凍結するスクロース水溶液の濃度 (c_{ini})、横軸は試料温度を示す。サイズを決定するために直径 3.8 μm 、1.3 μm 、0.59 μm 、0.20 μm の粒子を使用した。たとえば 75 mM スクロース水溶液を凍



測定温度： $-2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$. 凍結水溶液：75 mM スクロース水溶液, 印加電圧：50 V

図3 FCSチャンネルにおける $1.0\text{ }\mu\text{m}$ ポリスチレン粒子の泳動挙動

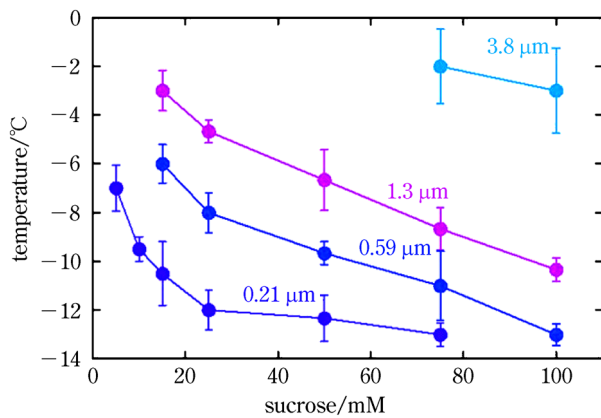


図4 凍結スクロース水溶液中に形成したグレインバウンダリーの有効チャンネル幅の温度および濃度依存性。
Reproduced from Ref. 26, with permission from Springer Nature.

結すると、実効チャンネル幅は $-12.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ の時には $0.20\text{ }\mu\text{m}$ まで狭くなり、 $-2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ のときには $3.8\text{ }\mu\text{m}$ まで広がるのがこの図からわかる。式2によって得られるチャンネルの変化は実効チャンネル幅の変化よりも小さいものと推定される。これは、FCSチャンネルの断面がV字型であり、深さ方向には大きく体積変化していないためであると考えられる。この結果から、作製したFCSチャンネル中での粒子の泳動挙動を様々な大きさの粒子に対して温度により制御できることがわかった。

次に、複数のサイズを有する粒子を同一のFCSチャンネルに導入し、それぞれの泳動速度の温度依存性を測定した。図5は75 mM スクロース水溶液に $3.8\text{ }\mu\text{m}$, $1.3\text{ }\mu\text{m}$, $0.59\text{ }\mu\text{m}$ 蛍光マイクロ粒子を分散させて凍結したときの各温度における粒子の泳動挙動を撮影したものである。最も温度が低い $-12.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ の時はすべての粒子が泳動しなかったが、 $-10.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ では $0.59\text{ }\mu\text{m}$, $-6.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ では

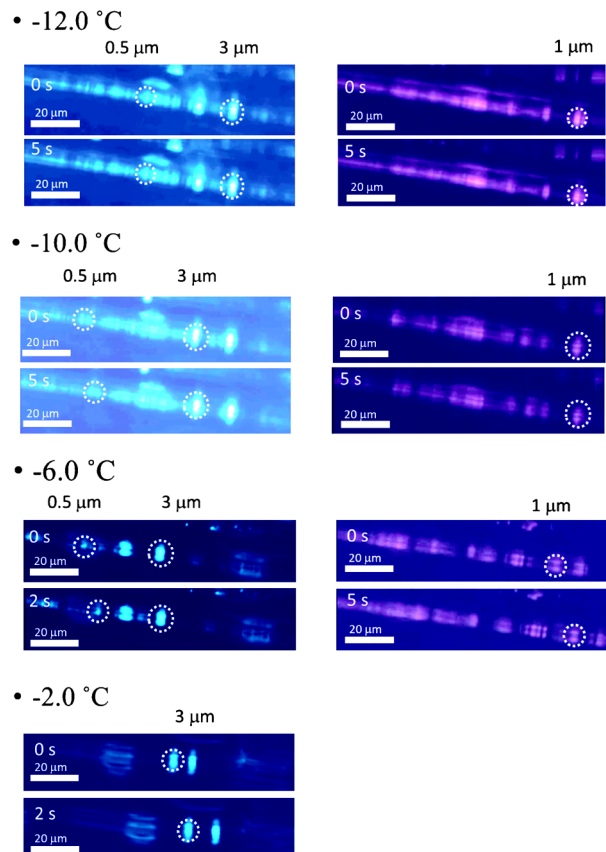


図5 同一グレインバウンダリー中における3種類の粒子の各温度における泳動挙動

$1.3\text{ }\mu\text{m}$, $-2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ では $3.8\text{ }\mu\text{m}$ の粒子がそれぞれ泳動を開始した。この結果は、温度によって同一FCSチャンネルに存在する大きさの異なる粒子の泳動挙動を制御できることを示している。これによりFCSのサイズチューナビリティにより粒子をサイズ識別できることがわかった。しかしながら、本手法ではFCSチャンネルへの粒子の導入は凍結による自発的に起こるため、任意のFCS

に試料注入することは困難である。また、泳動挙動も顕微鏡で観察できる範囲でのみしか確認できない。そのため、FCSのサイズチューナビリティを用いてサイズ分離を実現するには異なる実験系を組まなければならない。

そこで、筆者らは凍結水溶液をセプタムとして電気泳動場に組み込むことで実際に粒子を分離することを着想した²⁷⁾。ガラスキャピラリー中に数百 μm 幅のスクロース水溶液を導入して凍結すると、凍結水溶液を貫くように FCS チャンネルが形成する。このスルーポアを有する氷セプタムの両側に FCS と同様の溶液組成を有する濃厚スクロース水溶液を導入する。片側の溶液には分離対象物である蛍光ナノ・マイクロ粒子を分散させておき、キャピラリーの両側から銀塩化銀電極を挿入して電圧を印加する。これにより粒子を電気泳動によって氷セプタム中を通過させることができる。

凍結するスクロース水溶液の濃度を変化させて FCS チャンネルの幅を制御し、粒子を泳動させた。図 6 は分離対象物として直径 $3.0 \mu\text{m}$ と $0.50 \mu\text{m}$ の粒子をスクロース水溶液 ($c_{\text{ini}}=1.70 \text{ wt}\%$) を凍結して作成した氷セプタム中を通過させたときの蛍光画像を示す。図中の黄色の枠内が氷セプタムである。 $3.0 \mu\text{m}$ の粒子では氷セプタムを挟んだ左側の領域では何も検出されず、 $0.5 \mu\text{m}$ の時は蛍光を発する粒子があるのがわかる。このことから、氷セプタムがマイクロおよびナノ粒子のサイズ分離のフィルターとして機能することがわかった。温度コントロールによる FCS チャンネルのサイズ制御ができるようになれば、さらに小さい粒子への適用や、複数のサイズを有する粒子の混合物を分離することが可能になると考える。また、サイズチューナビリティを利用したこれまでにないサイズ分離モード実現できると考える。

サイズチューナブルな分離場を用いた新たな計測法の一つとして、変異型バクテリオファージから抽出された T4GT7 DNA (MW: $1.0 \times 10^8 \text{ Da}$) が有するランダムコイル状態およびグロビュール状態を以下のようなメカニズムで識別することを試みた²⁶⁾。pH が高い時、DNA はプロトン解離により負に帯電する。この時、分子内静電反発によりランダムコイル状態を取る。分子内の排除

体積が大きいことから、ランダムコイル状態は外部の圧力に対して柔軟に形状を変化させることができる。一方、pH が低い時は静電反発がなくなるため凝集してグロビュール構造をとる。この時、DNA 鎖は高い密度で集まっていることから、外部の圧力に対して DNA はその形状を変形させることはできない。この「分子の柔軟性」をサイズチューナブルな電気泳動場で見分けることができる。すなわち、各々の構造を有する DNA を FCS チャンネルに導入し、チャンネル幅を温度により制御しながら DNA を電気泳動させる。ランダムコイル状態は柔軟性が高いため、チャンネルが狭くなっても全体の形を変形させることで泳動することができる。しかし、グロビュール型では柔軟性が低いため狭いチャンネルでは泳動することができない。T4GT7 DNA を pH が調整された FCS チャンネル中で電気泳動させたときの蛍光画像を図 7 に示す。蛍光画像から、pH によって DNA の構造が異なっていることがわかる。pH 8.41 では DNA はランダムコイル構造をとり、 -4.0°C と -6.0°C の両方の温度で泳動が確認された。一方、pH 2.16 ではグロビュール構造をとり、 -4.0°C でしか泳動が確認されなかった。このように、DNA の形状をサイズチューナブルな FCS チャンネルのサイズチューナビリティを利用することで、巨大 DNA のコンフォメーション識別に成功した。このような形状識別は DNA 以外にもタンパク質

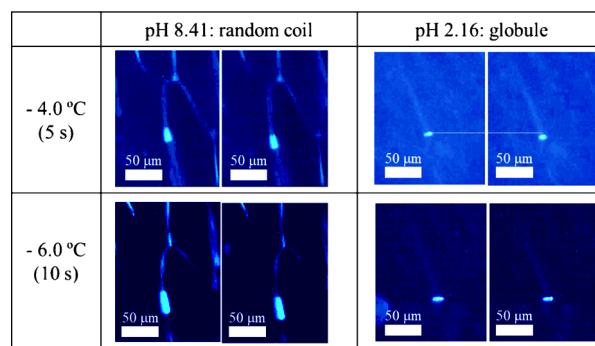
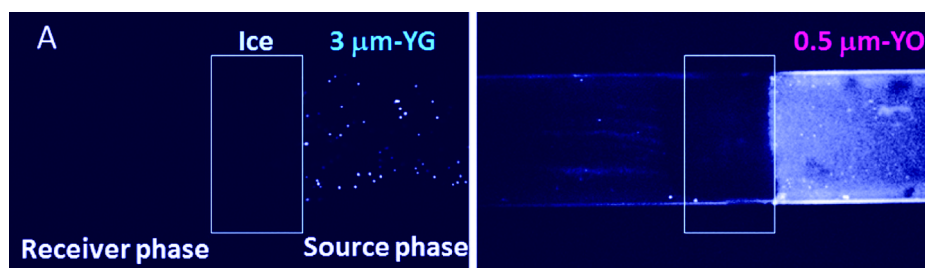


図 7 pH が調整されたグレインバウンダリー中を泳動する T4GT7 DNA。Reproduced from Ref. 26, with permission from Springer Nature.

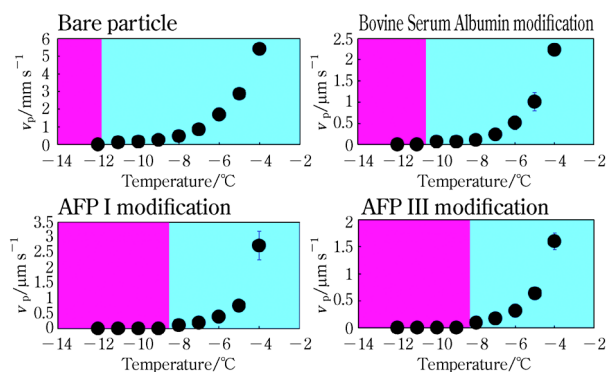


氷セプタムは $1.70 \text{ wt}\%$ スクロース水溶液を凍結して作成した。印加電圧: 40 V , 印加時間: 10 min 。

図 6 氷セプタムを用いた直径 $3.0 \mu\text{m}$ および $0.5 \mu\text{m}$ 粒子の分離。Reproduced from Ref. 27, with permission from the American Chemical Society.

やポリマーなどの形状分析にも適用できると考える。

また、FCS チャネルを氷と物質の間に働く相互作用を検出プラットフォームとして利用することを試みた²⁸⁾。ターゲットとして不凍タンパク質 (AFP) に着目した²⁹⁾。AFP は氷表面に吸着することで、氷の結晶成長を抑制する効果を有する³⁰⁾。AFP の吸着メカニズムは計算化学的なアプローチからは報告されているものの³¹⁾³²⁾、実験化学的なアプローチの研究例は少ない。そこで、FCS のサイズチューナビリティを利用して氷表面と AFP の間に働く化学的相互作用を計測することを着想した。AFP を修飾したマイクロ粒子を FCS チャネルに導入し、FCS チャネルの幅と粒子の幅を温度制御により一致させる。粒子と AFP の間に相互作用がなければ粒子は氷壁面からの影響を受けず泳動することができる。しかし、AFP と氷の間に相互作用があれば泳動することができない。そのため、粒子を泳動させるには温度を上昇させて、氷壁面からの相互作用の影響を及ぼさないほど FCS チャネルの幅を大きくすることで初めて泳動することができる。よって、粒子が泳動し始める 閾温度を AFP と氷の間に働く相互作用との大きさとして評価できると着想した。カレイ由来の I 型 AFP とゲンゲ由来の III 型 AFP をペプチド結合により修飾した直径 1.0 μm ポリスチレン粒子の FCS チャネル中における泳動速度の温度依存性を図 8 に示す。不凍タンパク質を修飾していない粒子は -12.0°C まで泳動がみられたが、I 型、III 型 AFP に関しては -9.0°C 以下では泳動しなかった。このことから、AFP は FCS チャネルの氷壁面と強く相互作用していることがわかった。AFP は吸着において結晶選択性が存在することが報告されている³³⁾。それによると、I 型 AFP と III 型 AFP はともに氷のプリズム面と強く相互作用することがわかっている。一方、FCS と接する氷の壁面は氷の結晶成長方向を考慮するとプリズム面であると考えられる。そのため、粒子表面に修飾された AFP は氷壁面と強く



100 mM スクロース水溶液を凍結して形成したグレインバウンダリー中で泳動した。

図 8 AFP を修飾した直径 1.0 μm 粒子のグレインバウンダリー中における泳動速度の温度依存性。Reproduced from Ref. 28, with permission from Elsevier.

相互作用すると考えられる。

以上のように、水溶液を凍結することで自発的に生成するナノ・マイクロ構造がサイズチューナブルな分離場として機能し、氷と物質の間に働く相互作用力を計測するためのプラットフォームとして機能することがわかった。凍結現象は確率論的ではあるが、FCS チャネルの形成は高い再現性を有することを見いだしている。この高い再現性から、ボトムアップ型氷マイクロフルイディクスが実験室レベルの実験だけではなく、再現性が重要視される工業的な分離および精製の場面においても活用されることを期待している。

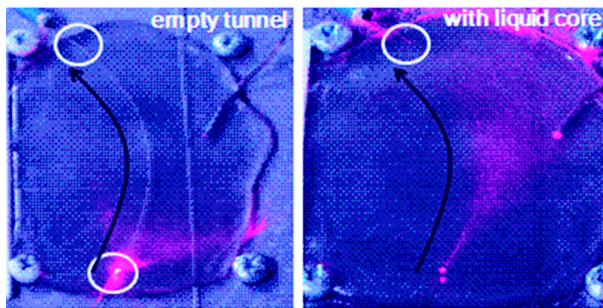
4 トップダウン型氷マイクロフルイディクス

前節では、水溶液の凍結により自発的できる FCS チャネルを用いた分離場を紹介した。凍結によりマイクロ～サブマイクロメートルの空間を形成できることは魅力的である一方で、その制御が難しいことから実際に用いるには困難な点も多い。そこで、筆者らは氷の中の任意の場所にマイクロチャネルを形成する手法を提案した。断熱性の高いセル中で超純水を凍結する。その上に作製したいマイクロチャネルの直径を有する金属ワイヤーまたはキャピラリーを置く。そして、超純水を上から注ぎこれをゆっくり凍結する。完全に凍結したのち、キャピラリーまたは金属ワイヤーを引き抜き、形成したチャネル内を目的の溶液で満たす。溶液はシリンジを用いて圧力により注入するため、形成するマイクロチャネルは 100 μm 前後が限度である。「ボトムアップ型」よりもチャネルの直径は大きくなるものの、均一な電場をかけられることや試料の注入が容易になることなどの利点があり、分離場としてよりも計測場としての利用価値が高い。大きなバルクの氷にマイクロチャネルを形成していることから、この方法を「トップダウン型」と呼ぶこととする。

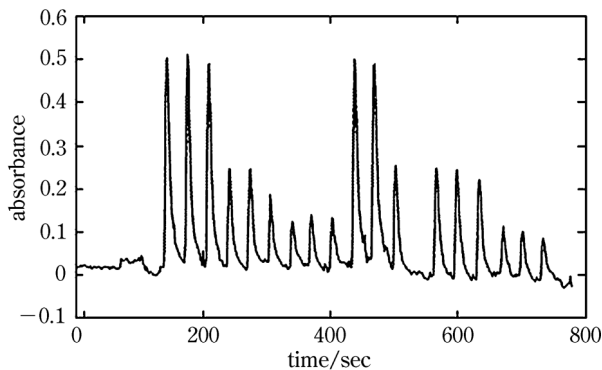
この氷マイクロチャネルを用いて、液体コア導波路 (LCW) を検討した³⁴⁾。LCW は屈折率の小さな材質でできたクラッド内を屈折率の高い液体で満たされた光学ファイバーの一つである。光は LCW 内を全反射しながら導波する。これにより光路を長くすることができ、高感度の分光測定が可能になる。一般的には固体の屈折率は液体の屈折率よりも大きい。そのため、LCW を用いて水中に含まれる成分を測定するには、水よりも小さな屈折率を持つ材料でできたクラッドが必要になる。テフロン®などフッ素ポリマー樹脂が低屈折率を有することから、これを用いた LCW も報告されている³⁵⁾³⁶⁾。一方、水の屈折率 1.33 に対して氷の屈折率は 1.31 であり、ガラスなどに比べて非常に小さい。そのため、氷を導波路のチャネル材料として用いることができれば、溶液試料に対して LCW を用いた測定が可能になる。

図 9 (A) は、氷の中の湾曲したチャネルにレーザー光

(A)



(B)



(A) 氷クラッド LCW 中のレーザー光の導波。左：中空チャンネル 右：塩化ナトリウム水溶液を液体コアとした LCW。(B) 濃度の異なるキニザリングリーン SS の氷クラッド-液体コア LCW による検出。

図 9 氷クラッド LCW。Reproduced from Ref. 34, with permission from the Royal Society of Chemistry.

を入射したときの光の進行を示したものである。中空のチャンネルの場合を左図に、NaCl 水溶液で満たしたチャンネルを右図に示す。中空の場合は、光は氷に透過、散乱してチャンネルを通過することができない。一方、チャンネルを溶液で満たした場合、光が出口まで導かれていることがわかる。このことから、氷マイクロチャンネルが LCW のクラッドとして機能することがわかった。図 9 (B) はヘキサンをを用いて異なる濃度のキニザリングリーン SS を氷クラッド-液体コア導波路中に導入したときの吸光度の変化を示している。このように、氷マイクロチャンネルを用いた LCW が流れ場を用いる分析において高感度化のためのツールとして利用できることを示すことができた。

自発的に生じる FCS チャンネルよりもこのように作成した氷マイクロチャンネルの方が均一な電場をかけられることに着目し、これを用いた氷のゼータ電位の計測法を確立した³⁷⁾。ゼータ電位の決定法の概略を記す。作製した氷マイクロチャンネル (直径 150 μm) にプローブ粒子であるカルボキシ修飾蛍光マイクロ粒子を分散させたグリセロール水溶液を導入する。グリセロール水溶液は、測定温度における FCS と同じ組成のものを調整する。これにより、安定な氷/水溶液界面を形成することができる。チャンネルの両側に挿入した銀-塩化銀電極を

用いて電圧を印加し、プローブ粒子を電気泳動させる。この時、粒子の見かけの電気泳動速度 v_{app} は粒子自体の電気泳動速度 v_p とマイクロチャンネル内の電気浸透流速度 v_{EOF} の和によって表される。

$$v_{app} = v_p + v_{EOF} \dots\dots\dots (3)$$

v_p は粒子の電気泳動移動度 μ_p と電場の大きさ E の積、 v_{EOF} は氷のゼータ電位 ζ_{ice} 、泳動液の比誘電率 ϵ 、真空の誘電率 ϵ_0 、泳動液の粘度 η を用いてそれぞれ以下のように表される。

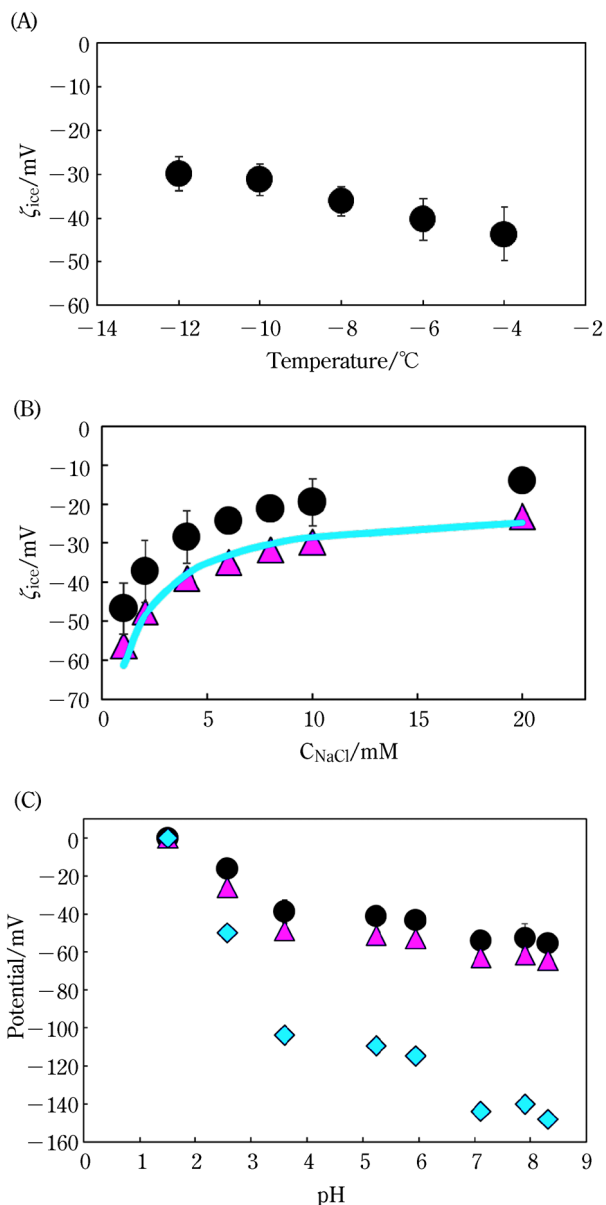
$$v_p = \mu_p E \dots\dots\dots (4)$$

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon_0 \epsilon \zeta_{ice}}{\eta} E \dots\dots\dots (5)$$

あらかじめ μ_p を実験的に求めることで v_{app} から ζ_{ice} を算出することができる。 μ_p は低温制御したマイクロチップ電気泳動により計測した。

図 10 (A) に上記の方法により算出したグリセロール水溶液と接する氷のゼータ電位の温度依存性を示す。氷のゼータ電位は負の値を示したことから、氷の表面は負に帯電していることがわかる。これは氷表面に存在する -OH ダングリングボンドからのプロトン解離によるものである。興味深いことに、温度が低くなるとゼータ電位は抑制される。安定した界面を形成するために、温度によってグリセロール濃度は異なる。グリセロールの添加により酸解離が抑制されることが知られており³⁸⁾、この効果が氷のゼータ電位に影響を与えているものと考えられる。

泳動液の組成を変化させることにより、様々な条件における氷のゼータ電位を測定することができる。図 10 (B) に NaCl の濃度を変化させたときの氷のゼータ電位を示す。塩濃度が上昇するとゼータ電位は抑制された。この抑制はイオン強度の上昇に伴う電気二重層の収縮の効果だけでは説明できないことに気付いた。そこで、氷表面へのイオン種の吸着が氷の表面電位に影響を及ぼしていると仮定し、Langmuir の吸着等温モデルと電気二重層キャパシタンスモデルを用いてイオン種の吸着挙動の解明を行った³⁹⁾。氷の表面とシュテルン面、シュテルン面とすべり面の間をコンデンサで置き換えることで、それぞれの面におけるポテンシャルを算出することができる。これによりシュテルン面に存在するイオンの吸着量を推算した⁴⁰⁾⁴¹⁾。様々な塩に対して実験を行い解析した結果、水和の強いイオンほど氷に吸着しやすいことが明らかになった。このことから、氷表面へのイオン種の吸着メカニズムは水溶液中における水和のメカニズムに類似していることが示唆される。加えて、フッ化物イオンのようなイオン半径の小さいイオンは氷内に取り込まれやすいことがわかった。このようなイオンは、界面におけるミクロな固液相転移の過程で氷内部に取り込



(A) 温度依存性 (B) 水溶液の NaCl 濃度依存性 (C) 水溶液の pH 依存性。丸, 三角, ダイヤはそれぞれ氷のゼータ電位, シュテルン電位および表面電位を表す。(B) の青い実線は Langmuir 吸着等温モデルと電気二重層キャパシタンスモデルを用いて氷の表面電位を再現した値である。

図 10 グリセロール水溶液と接する氷のゼータ電位。Reproduced from Refs. 37 and 39, with permission from the Elsevier and American Chemical Society, respectively.

まれるものと考え。

また、泳動液の pH を変動させることで、氷表面に存在する -OH ダングリングボンドにおけるプロトン解離を評価できる。図 10 (C) にグリセロール水溶液に接する氷のゼータ電位の pH 依存性を示す。pH が大きいほどゼータ電位が大きくなり、pH 4 以上ではゼータ電位は変動しなかった。このデータをもとに、-OH ダングリングボンドのプロトンの解離定数 K'_a を算出した。 K'_a の定義は以下のとおりである。

$$K'_a = [H^+] \exp\left(-\frac{F\Psi_s}{RT}\right) \frac{\alpha'}{1-\alpha'} \dots\dots\dots (6)$$

ここで、 $[H^+]$ は泳動液のプロトン濃度、 F はファラデー定数、 Ψ_s は氷の表面電位、 R は気体定数、 T は絶対温度、 α' は -OH ダングリングボンドの解離度である。図 10 のデータと式 6 から K'_a は 9.68×10^{-4} であった。この値は水の解離定数よりも大きいことから、氷表面のプロトンは解離しやすいことがわかる。氷内では水分子間に水素結合が強く働いており、そのため氷表面に存在するダングリングボンドは強く分極しているものと考えられる。このような現象は、水の薄膜表面に存在するプロトンの解離が促進されることに類似している。氷表面に存在するダングリングボンドが強く分極していることは、氷表面が高い反応性を有している可能性を示唆している。

以上のように、トップダウン型の氷マイクロチャンネルが光ファイバーのような高感度検出場や水溶液に接する氷表面の特性を理解するための電気泳動場として機能することを示した。特に氷物性の解明において、氷の表面の高い反応性の示唆は非常に興味深く、氷表面や FCS における反応特異性のメカニズム解明に寄与する結果が得られたと考える。今後、氷表面が有する高い反応性を利用した新たな分子分離手法が開発され、それと同時に氷表面が有する化学的機能が明らかにされていくものとする。

5 おわりに

本稿では、氷の中に自発的にできる、あるいは物理的な方法で形成した構造をマイクロ流体チャンネルとして利用した分離・計測法について紹介した。一般的なマイクロフルイディクスでは、ガラスやポリマーのような比較的「硬い」材料でできたデバイスが用いられている。このようなデバイスは堅牢で様々な溶媒条件で実験することができ、近年では単分子計測や微小空間を利用した反応場としても幅広く利用されている。しかし、デバイスの作製が難しいことや、デバイス作製後にチャンネルのサイズを変更することができないなどの限界がある。筆者らが提案する「氷マイクロフルイディクス」は氷という相転移を含む系を材料として用いているため、デバイスのディメンジョンを作製後でも容易に変えることができる。一方で、それが故にターゲットや手法の適用範囲を拡張することはチャレンジングな課題である。しかしながら、サイズチューナブルな分離場の構築は、氷表面が有する物質との相互作用と組み合わせることで、物理的分離場と化学的分離場の複合化を可能にすると思われる。また、安定した氷/水界面を形成することができることから、従来の計測法では困難であったミクロな固液相転移を有する氷/水界面の物性を明らかにするための分析

ツールとして有用であると考え。これらが、FCSが有する特異的な性質の解明につながり、地球環境や種々のプロセスで生じる凍結系における化学物質の循環や動態の理解の一助を担うことが期待される。

謝辞 本研究は、科学研究費基盤研究(A)、若手研究、日本学術振興会特別研究員奨励費および笹川科学研究助成の助成を受けて遂行された。この場を借りて御礼申し上げます。

文 献

- 1) 岡本行広, 西野 遼, 生島直樹: 分析化学, **68**, 663 (2019).
- 2) F. E. Young, F. T. Jones: *J. Phys. Chem.*, **53**, 1334 (1949).
- 3) K. Ito, T. Okada: *Anal. Methods*, **5**, 5912 (2013).
- 4) T. Hashimoto, Y. Tasaki, M. Harada, T. Okada: *Anal. Chem.*, **83**, 3950 (2011).
- 5) N. Takenaka, A. Ueda, Y. Maeda: *Nature*, **358**, 736 (1992).
- 6) Y. Tasaki, T. Okada: *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 6128 (2012).
- 7) J. Attwater, A. Wochner, V. B. Pinheiro, A. Coulson, P. Holliger: *Nat. Commun.*, **1**, 1 (2010).
- 8) A. Zelmer, N. Zhang, K. Komínková, D. Nachtigallová, H. H. Richnow, P. Klán: *Langmuir*, **31**, 10743 (2015).
- 9) K. Anzo, M. Harada, T. Okada: *J. Phys. Chem. A*, **117**, 10619 (2013).
- 10) T. F. Kahan, R. Zhao, D. J. Donaldson: *Atmos. Chem. Phys. Discuss.*, **10**, 843 (2009).
- 11) K. Kim, A. Yabushita, M. Okumura, A. Saiz-Lopez, C. A. Cuevas, C. S. Blaszczak-Boxe, D. W. Min, H. Il Yoon, W. Choi: *Environ. Sci. Technol.*, **50**, 1280 (2016).
- 12) N. Takenaka, A. Ueda, T. Daimon, H. Bandow, T. Dohmaru, Y. Maeda: *J. Phys. Chem.*, **100**, 13874 (1996).
- 13) N. Takenaka, M. Tanaka, K. Okitsu, H. Bandow: *J. Phys. Chem. A*, **110**, 10628 (2006).
- 14) H. Watanabe, T. Otsuka, M. Harada, T. Okada: *J. Phys. Chem. C*, **118**, 15723 (2014).
- 15) A. Inagawa, T. Ishikawa, T. Kusunoki, S. Ishizaka, M. Harada, T. Otsuka, T. Okada: *J. Phys. Chem. C*, **121**, 12321 (2017).
- 16) Y. Okada, M. Uyama, M. Harada, T. Okada: *Ind. Eng. Chem. Res.*, **58**, 18422 (2019).
- 17) H. Qu, M. Harada, T. Okada: *ChemElectroChem*, **4**, 35 (2017).
- 18) M. Kasuya, M. Hino, H. Yamada, M. Mizukami, H. Mori, S. Kajita, T. Ohmori, A. Suzuki, K. Kurihara: *J. Phys. Chem. C*, **117**, 13540 (2013).
- 19) A. Hibara, T. Saito, H. B. Kim, M. Tokeshi, T. Ooi, M. Nakao, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **74**, 6170 (2002).
- 20) T. Tsukahara, A. Hibara, Y. Ikeda, T. Kitamori: *Angew. Chemie Int. Ed.*, **46**, 1180 (2007).
- 21) T. Tsukahara, W. Mizutani, K. Mawatari, T. Kitamori: *J. Phys. Chem. B*, **113**, 10808 (2009).
- 22) R. B. Best, G. Hummer: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**, 6732 (2005).
- 23) K. V. Agrawal, S. Shimizu, L. W. Drahusuk, D. Kilcoyne,

- M. S. Strano: *Nat. Nanotechnol.*, **12**, 267 (2017).
- 24) A. Bogdan, M. J. Molina, H. Tenhu, E. Mayer, T. Loerting: *Nat. Chem.*, **2**, 197 (2010).
- 25) M. Uyama, M. Harada, T. Tsukahara, T. Okada: *J. Phys. Chem. C*, **117**, 24873 (2013).
- 26) A. Inagawa, M. Harada, T. Okada: *Sci. Rep.*, **5**, 17308 (2015).
- 27) S. Fujino, A. Inagawa, M. Harada, T. Okada: *ACS Omega*, **4**, 13570 (2019).
- 28) A. Inagawa, Y. Okada, T. Okada: *Talanta*, **183**, 345 (2018).
- 29) A. L. DeVries, D. E. Wohlschlag: *Science*, **163**, 1073 (1969).
- 30) J. A. Raymond, A. L. DeVries: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 2589 (1977).
- 31) Y. Furukawa, H. Nada: *J. Phys. Chem. B*, **101**, 6167 (1997).
- 32) H. Nada, Y. Furukawa: *J. Phys. Chem. B*, **112**, 7111 (2008).
- 33) L. L. C. Olijve, K. Meister, A. L. DeVries, J. G. Duman, S. Guo, H. J. Bakker, I. K. Voets: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **113**, 3740 (2016).
- 34) K. Sugiya, M. Harada, T. Okada: *Lab Chip*, **9**, 1037 (2009).
- 35) R. Manor, A. Datta, I. Ahmad, M. Holtz, S. Gangopadhyay, T. Dallas: *IEEE Sens. J.*, **3**, 687 (2003).
- 36) S. Tanikkul, J. Jakmunee, M. Rayanakorn, K. Grudpan, B. J. Marquardt, G. M. Gross, B. J. Prazen, L. W. Burgess, G. D. Christian, R. E. Synovec: *Talanta*, **59**, 809 (2003).
- 37) A. Inagawa, M. Fukuyama, A. Hibara, M. Harada, T. Okada: *J. Colloid Interface Sci.*, **532**, 231 (2018).
- 38) A. L. De, A. K. Atta: *J. Chem. Eng. Data*, **32**, 117 (1987).
- 39) A. Inagawa, M. Harada, T. Okada: *J. Phys. Chem. C*, **123**, 6062 (2019).
- 40) T. Okada: *Anal. Chem.*, **70**, 1692 (1998).
- 41) T. Okada: *Anal. Sci.*, **14**, 469 (1998).



稲川有徳 (Arinori INAGAWA)

宇都宮大学大学院地域創生科学研究科 (〒321-8585 栃木県宇都宮市陽東7-1-2)。東京工業大学大学院理工学研究科博士後課程修了。博士(理学)。「現在の研究テーマ」相分離により生じるミクロ構造を利用した分離・分析場の構築。「主な著書」“Ice Microfluidics” (Springer Nature)。「趣味」ハーモニカ。E-mail: ainagawa@cc.utsunomiya-u.ac.jp



岡田哲男 (Tetsuo OKADA)

東京工業大学理学院化学系 (〒152-8551 東京都目黒区大岡山2-12-1)。京都大学大学院理学研究科博士課程修了。博士(理学)。「現在の研究テーマ」凍結による機能創成、氷で制限された液相空間の化学。「主な著書」“分析化学の基礎—定量的アプローチ” (化学同人)。「趣味」昆虫写真。E-mail: tokada@chem.titech.ac.jp