硝子管微小電極における尖端電位の発生原因と尖端部硝子薄膜電位*

岡 田 泰 伸 井 上 章**

要 旨 通常 3 M KCl を充填されたガラス管微小電極（正しくは微小塩橋）の尖端部には電極内液-外液間に 予測される正常の液間電位では説明のつかない電位差（いわゆる尖端電位）が認められ、これまでの発生原因に関して数々の議論があったが一致をみていない。最近の実験結果で尖端部のガラス薄膜が予想以上に水和を受け高い電気伝導性を持つことが明らかとなった。そのため尖端電位はこれまで主に考えられてきたところの尖端孔を介しての拡散電位のみならず、尖端部ガラス壁を介してのガラス薄膜電位にも由来することが明らかとなった。この事実は、尖端電位を利用しての細胞内イオン活量の測定という新しい可能性を現実のものとしつつある。このような微小電極尖端電位をめぐる諸問題について最近の実験結果を参考にしつつ述べ、あわせて低い尖端電位の微小電極を得るための技術的な点についても議論する。

はじめに

1. 尖端電位発生原因をめぐる問題点
2. 硝子壁上の固定陰電荷
3. 尖端部での硝子壁の電気伝導性
4. 尖端部硝子膜を介しての電位差
5. 高尖端電位の発生源
6. 尖端開孔-非絶縁型イオン選択性硝子電極
おわりに-尖端電位低減のための技術的問題

はじめに

単一細胞に微小硝子管を刺入して直接膜電位を測定するいわゆる微小硝子電極法は、たとえ *Nitella* あるいはイカ巨大細胞に 100 μm 以上の径の硝子管を用いたものとはいえ、すでに1930年代の Osterhaut¹⁾ および Hodgkin と Huxley²⁾ の試みにはじまることは周知のとおりである。Gerard 一派^{3,4)} による μm 程度の毛細管電極の導入は、細胞膜の傷害の軽減、適用対象の拡大をもたらすものであったが、電極内液が海水または等張電解質溶液である限り、尖端部のきわめて高い電気抵抗のために測定技術に特別の工夫が要求され、さらに尖端部に

ける電極内液と細胞内液間に発生する液間電位に基づく測定誤差は無視し得ないものであった。これらの難点を著しく軽減し、今日見られるように広くこの方法が利用されるようになったのは、Nastuk と Hodgkin⁵⁾ による 3 M KCl を内液として用いる方法の導入に負っている。

しかし、このように cation と anion の移動度がほぼ等しい電解質の高濃度溶液を充填したところの Ling-Gerard 型微小塩橋においても、その尖端部には物理化学的に予測される普通の意味での junction potential では説明のつかない電位——いわゆる尖端電位（以下 TP と略す）が認められ、ある条件下では -100 mV 近くにも達する。すでに Adrian⁶⁾ も尖端直径が 5 μm 以上の電極では TP の膜電位測定への影響は無視し得るが、それより細い微小電極では比較的大きな TP をもつことが多く、その影響は無視し得ないことを指摘している。し

* Origin of the tip potential of glass microelectrodes

** Yasunobu Okada & Akira Inoue: 京都大学医学部生理学教室 (606 京都市左京区吉田近衛町)

たがって一部の巨大細胞を除き、大部分の細胞の膜電位測定においては、TP に基づく誤差が問題となるであろう。

ところで、従来 TP の影響が云々されることの少なかったのは、一つには対象が主として膜電位の大きい興奮性細胞であり、さらにその相対的变化——たとえ spike generation —— がもつぱら問題とされてきたためのようと思われる。しかしいわゆる非興奮性細胞の場合のごとく、膜電位の絶対値が近似的にせよ問題とされる場合には、この TP の影響を考慮することが必要となってくる⁷⁾。Adrian⁶⁾ は蛙筋細胞において、5 mV 以下の TP の場合には測定に対する影響は無視しうるほど小さいとしているが、どのような条件下でも常にこれが当てはまるという保証はなく、現段階では、TP は小さいほど無難であるという他はない。そこで、TP をできるだけ小

さくするという技術的課題を解決するためにも、また TP が実際どの程度の測定誤差をもたらすかを理論的に評価するためにも、TP の発生原因の究明は重要な課題である。微小電極法が広く用いられる今日、今さら——という感がなくもない TP の問題を取りあげたのはこのような観点からである。

1. 尖端電位発生原因をめぐる問題点

Adrian⁶⁾ の仕事以来、電極尖端部におけるタンパクや塵等の汚染に基づく固定陰電荷のためにイオン移動度が修飾されることが TP の原因と一般に考えられてきた(たとえば Frank と Becker⁸⁾)。実際 Adrian は Planck 式を用いて Cl^- の移動度が K^+ のそれに対して約 1/3 に減少していると推定している⁶⁾。

硝子を水溶液に長くさらすときにはかなりの量のイオ

Fig. 1 微小電極の尖端電位 (a), とその尖端部硝子薄膜を介しての抵抗と電位差 (b) の測定系の模式図

Fig. 2 酒精置換法(A), 硝子線維法(F)および直接充填法(D)によって作製された微小電極の先端電位値の比較。—○, △: KCl 溶液中, ●, ▲: PBS 中の TP 値。カッコ内数字は順にヒーター電流(A), 電極抵抗(MΩ, mean±SE), 測定された電極数を示している。

ンで溶出し, その結果, 硝子壁に固定陰電荷が形成されることはよく知られた事実である。したがって, 従来用いられた置換法によって電極液充填を行う場合には, 先端部の汚染ではなくして, 長時間の水溶液中での充填操作中に生じたこの硝子壁上の固定電荷の形成に TP の成因を求める考えが現われたのも当然であろう^{9,10}。川端ら¹⁰はこの固定電荷の Cl⁻ の移動度への直接的影響を想定し, Lavallée ら¹¹は壁上に形成された電気的二重層による表面伝導のために先端部が cation selective に振舞うものと考えたのであった。

このような“先端部における拡散電位”の固定陰電荷による修飾から TP を説明する立場(以後“固定陰電荷説”と呼ぶ)に対して, 先端部付近における“硝子膜を介しての電位発生”が TP の発生に関与している可能性(“相界電位説”)をはじめて示唆したのは Bingley¹²である。すなわち, 先端外径約 0.5 μm の場合, 先端部硝子壁の厚さは約 0.1 μm ときわめて薄く, Corning 7740 (Pyrex) のような硬質硝子といえども semipermeable な膜として挙動する可能性を指摘したのである。これに続いて Agin ら^{13,14}はこのような硝子薄膜の電気抵抗が水和および膨潤によって約 5~10 桁落ちるとして, TP を先端部硝子壁を介する相界電位に帰したのである。しかし彼らの考え方の前提となる先端部硝子壁の高い conductivity に関してはなんらの実験的根拠も提出されてこなかった。

上に述べた“固定陰電荷説”と“相界電位説”の二つ

Fig. 3 硝子管の酸による前処理と充填液の酸性化の先端電位への影響。—a: 酸処理なし (7.2±0.1 MΩ), b: 1% HCl 溶液で32時間処理 (7.5±0.3 MΩ), c: 重クロム硫酸で72時間処理 (7.5±0.3 MΩ), d: 内液として pH 2 の 3 M KCl 使用 (14.6±0.8 MΩ), 電極: 上記の処理を行った硝子管より各群それぞれ 5 本宛, 同一条件で同時に A 法にて作製

の考え方が現在でも TP 発生の説明として対立して存在していることは, たとえば Lavallée らの編書^{11,14})等からも伺われるところである。したがって, まず解決されねばならない問題点は次の二点に集約されよう。すなわち, 1) 先端部の固定陰電荷が TP 発生に寄与するか, するとすればそれは何に由来するか, 2) 先端部付近の薄い硝子壁が, それによって硝子膜を介しての電位差が TP 発生に寄与するほど高い conductivity をもつか, である。これらの点に関してわれわれは若干の実験を行ったので^{15~20}, その結果を中心としてこの問題に考察を加えてみることにする。

2. 硝子壁上の固定陰電荷

測定に当っては, 試料とする個々の電極間の TP 値のバラツキを極力少なくするために, 電極作製条件(硝子管径, 厚さおよび長さ, pulling の条件, 電極内液の汙過等)および測定条件(温度: 25±1°C, Ag-AgCl 電極対間電位差 ≈ 0 mV)等を一定に保つことに充分の注意を払った。電極内液充填には酒精置換法(A)²¹, 硝子線維法(F)²²および直接充填法(D)^{18,19})を用いたが, A 法は特に TP 値のバラツキが大きくなりやすいので, これを防止するため電極作製に注意を払うと共に, 内液置換には 37°C 下で一定の期間(通常 7 日間)汙過した 3 M KCl 中に保存する方法をとった。電位測定系は, TP のみを忠実に拾うように, 他の junction potential をできるだけ小さくすると共に, それが互に相殺される

ように配慮した (Fig. 1a).

各種濃度の KCl 溶液および磷酸緩衝生理的食塩水 (PBS) 中で得られた TP 値は Fig. 2 に示すごとくであって、同一条件下で pulling された F 法および D 法による電極はほとんど同一のわずか数 mV の負の TP を示すに過ぎないが、A 法によるものはきわめて高い TP 値を示した。F 法が A 法より低い TP をもつ電極を与えることは後藤ら²³⁾によっても注意されている。

F, D 両法では充填後 3 時間以内に測定しているのに対して、A 法は置換のために 7 日間 3 M KCl 中に保存された後測定されていることから、この大きな TP の大部分は保存期間中に形成されたものと考えられるが、事実 F 法で作製した電極を 7 日間保存する時には A 法による電極と同程度の高い TP をもつようになる。また使用硝子管に予め酸処理を施すと Fig. 3 のように TP は有意に減少し、酸処理が rigorous であるほどその減少度は大きい。さらに電極内液を塩酸で pH 2 に調整する時には、7 日間保存後にもかかわらず F 法による電極とほとんど同程度の TP を示すようになる (Fig. 2, 3)。この電極内液の酸性化による TP の著明な減少はすでにこれまでも指摘されていることであり²⁴⁻²⁶⁾、それはまた固定陰電荷説の一つの根拠となるものであった。実際、硝子管の酸処理によって保存期間中に溶出する cation²⁷⁾の量、したがって壁上に形成される陰電荷量が減少し、また内液の酸性化によって荷電の中和消滅を生ずると考えれば、Fig. 2, 3 に見られる結果は少なくとも定性的には説明し得る。したがって従来の置換法による電極の

TP 発生に固定陰電荷の関与している可能性は否定し得ない。しかし、電極内液として常に汙過した新鮮なもののみを使用しており、Fig. 2, 3 に示された標準誤差に見られるような電極ごとの TP のバラツキが小さい以上、TP 発生源としての充填液または尖端部の汚染^{6, 8)}はその本質的な要因とは考えられない。

ところで、硝子壁上の固定陰電荷が尖端孔部の拡散電位を介して Fig. 3 に見られるとき大きな TP の発生に関与するとすれば、その電荷密度 (σ) はかなりの大きさを持つと考えねばならない。その場合、もし Agin のように尖端部硝子壁がある程度高い conductivity を有するならば、電荷そのものに由来する相界電位が TP の発生に直接関係してくるはずである。たとえば硝子膜をはさんで 3 M KCl と CM KCl の溶液が存在する場合硝子膜を介しての電位を Gouy-Chapman 流に扱えば、式(1)と表わすことができる。(1)式から明かなように、 σ が充分大 ($\sigma \rightarrow \infty$) であれば、Fig. 2, 3 に示された程度の TP は相界電位としても得られなくはない。また、この Gouy-Chapman 型の電位はイオン強度 ($C^{1/2}$) にのみ依存するが、Fig. 2, 3 に示したように PBS 中での TP はそのイオン強度に等しい KCl 濃度中の TP にほぼ一致する。したがって、TP 発生に固定陰電荷が大きく関与するとしても、尖端部硝子壁の conductivity の知見なしには固定陰電荷の影響を尖端孔における拡散電位を介してのみ考えるいわゆる“固定陰電荷説”をそのままの形では受け入れられない。

$$E_g = \frac{2RT}{F} \cdot \left\{ \sinh^{-1} \left(\sqrt{\frac{1000\pi}{2\epsilon RT}} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{3}} \right) - \sinh^{-1} \left(\sqrt{\frac{1000\pi}{2\epsilon RT}} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{c}} \right) \right\} \\ \simeq -25.7 \left\{ \log \frac{3}{C} + 2 \log \frac{1 + \left(1 + \frac{C}{0.0895\sigma^2} \right)^{1/2}}{1 + \left(1 + \frac{3}{0.0895\sigma^2} \right)^{1/2}} \right\} \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$G_g(x) = \int_x^l \frac{2\pi \cdot r(x)}{\delta(x) \cdot \rho(x)} dx = 2\pi k \int_x^l \frac{dx}{\rho(x)} \quad \dots\dots\dots (2)$$

$$dG_g(x)/dx = -2\pi k/\rho(x) \quad \dots\dots\dots (2')$$

$$E = (R/R_g)E_g + (R/R_t)E_t \quad \dots\dots\dots (3)$$

$$E/E_g = R_t/(R_t + R_g) + (E_t/E_g) \cdot R_g/(R_t + R_g) \quad \dots\dots\dots (3')$$

Fig. 4 尖端部を絶縁された微小電極の抵抗とコンダクタンス。—横軸：絶縁部の尖端よりの距離 縦軸：a) 抵抗 (MΩ), b) コンダクタンス (10^{-10} mho), 電極：○) F法作製後で3時間以内, 4, 7) A法で作製, 3 M KCl (37°C) 中にそれぞれ4日および7日保存

3. 尖端部での硝子壁の電気伝導性

そこで第2の問題点である尖端部の硝子壁の conductivity を推定するために, Fig. 1 b に示した方法によって, 電極尖端を次第に深く流動パラフィン中に刺入し, 尖端部のみを部分的に絶縁した時の非絶縁部硝子壁の電気抵抗の変化を直接測定することを試みた. 測定された抵抗値を絶縁された部分の長さ, x , に対して plot すると Fig. 4 a のようになった. 電極を 3 M KCl 中に保存する期間, すなわち aging が長ければ長いほどこの抵抗値が著明に減少することは明らかである.

ところで, この尖端部硝子壁の比抵抗値の order は次のようにして評価し得る. いま微小電極尖端を Fig. 5 の

ような円錐体で近似すると, 尖端からの距離 x における内径 $r(x)$ と硝子壁の厚さ $\delta(x)$ の比は定数 (k) となり, その部位の比抵抗を $\rho(x)$ とおけば, 長さ x の部分を完全に絶縁した場合の長さ l の電極の conductivity $G_g(x)$ は, 式 (2) で表わされ, (2') 式という関係が得られる. したがって尖端からの距離 x の範囲だけ絶縁した時の非絶縁部分の抵抗測定から得られた $G_g(x)$ を Fig. 4 b のように x に対して plot すれば, その勾配から $\rho(x)$ を求めることができる.

F法により充填した直後の電極では, 尖端から15~20 μm 以上の部分の ρ は $10^{11} \Omega\text{-cm}$ の order であるのに対して, 15 μm 以内の尖端近くでは 10^7 以下に急激に減少している. 水和していない“乾いた”Pyrex 硝子の比抵抗は $10^{15} \Omega\text{-cm}$ の order であるから, Agin^{13,14)} の推測したように尖端部付近の比抵抗は水和によって10桁近く落ちていることになる. しかもこの低抵抗部分の長さは aging が長いほど増大し, aging 4日以上では $10^7 \Omega\text{-cm}$ 以下の部分の長さは約 100 μm にも及んでいる (Fig. 4 b). 硝子水を水溶液または湿室中に置く時には著しい水和が起り, 水和層は硝子の厚さ 1 μm にもおよび得ること, またこの水和層ではイオンの移動度や拡散定数が乾いた硝子と著しく異なることはすでに Eisenman²⁸⁾ の指摘しているところである. したがって, 尖端部の, おそらくは 0.1 μm 程度の水和した硝子薄膜のきわめて高い conductivity ($=1/R_g$) が, 前項で指摘し

Fig. 5 硝子管微小電極尖端部の模式図

Fig. 6 微小電極尖端電位の等価回路モデル

Fig. 7 KCl 溶液および PBS 中の尖端電位と電極抵抗(a), ならびに尖端部硝子壁抵抗(b)の 3 M KCl 液中 (37°C) 保存による変化. 一数值は a) : KCl 濃度(M), b) 絶縁された部分の長さ

た硝子膜を介しての電位差 (E_g) の発生の可能性と相俟って TP 発生に寄与することは, Fig. 6 の等価回路からも容易に相俟できる. このような E_g の寄与は, 電極の aging に伴う TP の増大 (Fig. 7 a) と R_g の減少 (Fig. 7 b) とがほぼ平行していることからもうかがえる. また尖端を絶縁しない状態における普通の意味での電極抵抗 (R) が TP の増大に伴って減少し, 約 1 週間の aging で半減することも, 保存に伴う尖端孔抵抗 (Fig. 6 の R_t) の変化があまり大きくないとすれば, 水和によって R_g が R_t と同程度の水準にまで減少し得ることを示唆する. したがって, この尖端部の水和した高い conductivity を有する硝子膜を介して発生する電位差 E_g の大きさ如何が, R_g/R_t の大きさと共に TP 発生に大きく影響するといえよう.

4. 尖端部硝子膜を介しての電位差

電極尖端部の硝子膜を介しての電位 E_g の大きさを見積るために, われわれは Fig. 1 b に示した方法で尖端を絶縁して直接この電位を測定することを試みた. Fig. 8 はそれを絶縁部の長さ x の関数として測定した結果の一例である. 図から明らかなように, 電極の aging 如何にかかわらず, ごく尖端に近い部分には通常の TP, [すなわち $x=0$ の値, をはるかに上回る電位が存在し, これは aging によって増大している. [尖端 1-2 μm の部位の測定ができなかったが, x の増大と共にほぼ exponential に減少する電位の $x \rightarrow 0$ への外挿を許すとすれば, 尖端部の E_g は PBS 中で -40 mV にも達する. したがって Fig. 6 の等価回路における有効な E_g の大きさ

Fig. 8 尖端部を絶縁された電極の PBS 中の尖端電位と絶縁部の長さとの関係. ○: 電極作製 (F 法) 直後に測定, ●: 3 M KCl 中 (37°C) で 7 日間保存された後に測定

はただちに定めがたいとしても、数 + mV の order と考えてよいであろう。このような E_g の直接測定をわれわれ以前にも Caillé と Gagné²⁹⁾ がすでに試みていることを最近知ったが、彼らの結果もわれわれの成績を裏書きするものであった。換言すれば、この E_g の本性はともあれ、これを抜きにしては TP の解析が不可能であるということになるであろう。

TP (=E) は Fig. 6 の等価回路から式 (3) (3') となり、 E および R は通常の方法で測定され、 R_g は式 (2) を用いて求めることは原理的に可能であるから、 R_t も定まるはずである。したがって E_g の order が上述のような測定によって推定できれば、式 (3) は E_t の order の推定を可能とする。しかし有効な E_g , R_g を実験値から外挿法によって推定することも、また算出するための有効長を定めることも困難である。そこできわめて粗い近似ではあるが、次のような方法を試みた。すなわち Fig. 8 が示すように $E < E_g$ であるから、常に $E_t < E_g$ であるので、式 (3') 右辺第二項を無視すると、 E_g として $x = 5 \mu\text{m}$ における実測値 (Fig. 8) を用いることにより、 R_t/R_g の order を推定することができる。ここに $E_t \ll E_g$ と置いた仮定は、電極内液が高濃度 KCl であるので、 E_t が拡散電位からなる限り、仮にそれが壁上の固定陰電荷によって修飾されるとしても、近似的に成立するとして不合理ではないだろう。実

験から得られた E/E_g 比は、作成当日の電極では 0.15 ± 0.02 ($n=7$)、7 日間 KCl 液中で aging を受けた電極では 0.75 ± 0.03 ($n=7$) であった。したがって少なくとも新しい電極では、 R_g が R_t より一桁大きく、aging 後には両者は同じ order になると推論されるが、これは今まで述べてきた実験結果と矛盾しない。したがって、作成直後の新しい電極、あるいはすでに Adrian が注意したように $5 \mu\text{m}$ 以上の太い電極では、aging の後も $R_g \gg R_t$ のために、Fig. 8 に見られるようなかなり大きい E_g があってもその TP への寄与は少なく、通常用いられるイオン環境下では TP は無視できるが、細い電極では aging に伴う水和の進行につれて、 R_g の減少、 E_g の増大が E_g の TP に占める比重を増し、大きな TP をもたらすと考えることができる。

5. 高尖端電位の発生源

以上述べたような尖端部硝子壁を介しての電位差、 E_g として Gouy-Chapman 型の相界電位の可能性については第 2 項で触れたが、外液が $0.03\text{--}0.003 \text{ M KCl}$ の場合に式 (1) から期待される E_g は、 $\sigma \rightarrow \infty$ としても高々 $-50\text{--}-75 \text{ mV}$ であるのに対して、実測 TP 値のあるもの (たとえば Fig. 7 a) ではこの値を上廻っている。もし水和の効果が著しく $R_g \ll R_t$ ならば $E \approx E_g$ となるわけだが、この高い電位は Gouy-Chapman 型では説明できず、その上原理的に、高伝導性膜を介しての (拡散電位成分を含みぬ) この絶縁型電位ということ自体矛盾概念である。また、すでに述べたように aging で $R_g \approx R_t$ になるとすれば、この E_g を上廻る E_t が存在することになり $E_t < E_g$ なる条件と矛盾する。さらに、Fig. 9 に示すように、外液を NaCl, KCl とした場合には、同一イオン強度でありながら KCl の場合と少しく異なった TP 値が得られ、これも TP の中にはかなりの拡散電位に由来する部分が含まれているか、または E_g が単なる Gouy-Chapman 型 (あるいは Stern 型) の電位 (のみ) ではないことを示している。

しかし周知のように、硝子薄膜を介しての電位差発生機転に関しては相界電位説と拡散電位説とに從來から意見が分かれており³⁰⁻³²⁾、また硝子の構成成分によって様々なイオン選択性を示すことも良く知られた事実である^{33,34)}。Pyrex 硝子といえども水和薄膜においてはある程度のイオン選択性を持った膜電位を発生することは充分あり得る。したがって式 (1) に代えて E_g に Eisenman の式^{32,34)}などを用いることによって、今まで述べてきたわれわれの考え方を保存しつつ上述の問題点を説

Fig. 9 尖端電位に対する外液一価イオン効果。— a) : 7 日間 3 M KCl 中に保存された電極, b) 作製 (F 法) 直後の電極。

明することも可能かと考えるが、われわれは残念ながら定量的議論をするに足る data を持ち合せていない。唯定性的な一般論としていえることは、 E_g が $(RT/F) \log C$ に比例するようになり得るので、 $E_t \ll E_g$ と仮定した式 (3') に関する議論は上に述べたような矛盾に陥らなくてすむであろうし、 Na^+ 、 Li^+ の効果も説明は不可能でなくなるであろう。

他方 E_t の寄与を直接評価することはきわめて困難である。Fig. 2 に見られる aging を受けない電極の TP が仮にすべて E_t に由来する (すなわち $R_t \ll R_g$) と仮定すると、それは低濃度 KCl 中で数 mV の負電位を持つことになり、Henderson および Planck 型の拡散電位では 1–2 mV の正電位が期待されるので、なんらかの機序でこの拡散電位は修飾されていることになる。aging による固定陰電荷の増大がこの修飾度を増大させることはありそうなことである。その修飾メカニズムとして、尖端部硝子壁上固定陰電荷によりそれに沿っての cation の吸着(電気的二重層の形成)が起こり、結果として bulk に陰電荷の蓄積が起こり、anion の移動度が減少するというモデル¹⁵⁾が第一に考えられる。しかしこの場合も、3 M KCl 中での二重層の厚さ(Debye の長さ)は Å の order にすぎず、管径が 0.1 μm の order の細い電極においてもこの影響はそれほど大きなものとはなり得ないだろう。第二に、このような固定陰電荷による electrostatic な効果に加えて、すでに古く Cole³⁵⁾ によって論ぜられているような electrokinetic な表面伝導による影響があるかもしれない。Lavellée と Szabo¹¹⁾

Fig. 10 尖端電位に対する外液 pH の効果。—○: Corning 0150 硝子で作製、電極内液は 0.5 M KCl, ●: Pyrex 硝子で作製、内液は 3 M KCl. いずれの電極も 7 日間の aging 後に測定。

はこの表面伝導による硝子壁に沿った K^+ -selective な電位を発生する pathway を、bulk の拡散電位と並列に考えた。しかし capillary 中での表面伝導が全伝導度を増加させる程度としては、表面伝導度を K_s (普通、硝子で 10^{-9} mho の order)、溶液の比伝導度を K (mho-cm⁻¹)、管半径を r とおくと $2K_s/rK$ であり³⁹⁾、ごくわずかの寄与しか予測されない。また、bulk に並列なこの K^+ -selective な pathway のコンダクタンスは二重層の厚さによって決まるだろうから、bulk のそれに比し前述のごとくきわめて小さなものでしかありえない以上、たとえこの表面伝導からもたらされる K^+ -selective な電位が存在するとしても、 E_t に対してはきわめて小さな寄与しか与らないであろう。したがっていずれにせよ、-100 mV にも及ぶ高い TP を説明するに足るだけの高電位を E_t に期待することはできないように思われる。その上前項で述べたように、われわれの実験結果は aging の有無にかかわらず $E_t < E_g$ であることを示しているし、aging に伴い、 $R_t \approx R_g$ となることから、特に aging 後の高 TP の主原因は電極尖端部の硝子薄膜電位と考えてよいであろう。

6. 尖端開孔-非絶縁型イオン選択性硝子電極

上で述べたように高 TP の主な構成要素が電極尖端部の硝子薄膜電位であるとするれば、適当なイオン選択性を

Fig. 11 pH 微小電極の等価回路モデル、—Subscript は G : pH 非感受性部分, H : pH 感受性部分, T : 尖端孔部, をそれぞれ意味する

Fig. 12 尖端部絶縁電極のコンダクタンスと絶縁部の長さ。—①: 7日間 aging 後の Corning 0150 硝子電極. pH 感度 10 mV/pH, 電極抵抗 250 MΩ, ②: 12日間 aging 後の 0150 硝子電極. 電極抵抗 990 MΩ, ③: 7日間 aging 後の Pyrex 硝子電極. pH 感度 0.5 mV/pH, 電極抵抗 8 MΩ, ④: 作製直後の Pyrex 硝子電極, pH 応答なく 電極抵抗 21 MΩ

有する硝子を選んで電極を製作すれば、この TP によって細胞内イオン活量を測定することも原理的に不可能でない。事実、Pyrex 硝子製の微小電極においても硝子壁の水和の程度の高い条件下では無視できない pH 応答があることは知られており^{15,23)}、さらに積極的に pH 感受性硝子 (Corning 0150) を用いれば Fig. 10 に見るような比較的高い pH 応答を示すものが得られる。これらの事実はわれわれの前節で論じたことを間接的に支持す

るものといえるが、他方この種の尖端開孔型微小電極を用いたこれまでの報告^{9,36)}は、第3, 4節で論議した事柄を顧慮していないので、われわれの所論の拡張としてこの問題に触れておく。

このような open-tip の pH 電極においては、Fig. 11 の等価回路から明らかなように尖端孔抵抗 (R_T) および pH 非感受性硝子壁抵抗 (R_G) によって尖端の pH 感受性硝子膜部分の pH 応答電位 (E_H) が短絡されるが、実際その pH 応答は常に Nernst 勾配より小さい (Fig. 10)。そこで pH 応答が 20-30 mV/pH のものにつき Fig. 1 b の方法で尖端部の抵抗および pH 応答性を測定すると、 $R_H \approx R_G \approx R_T$ のものを選べば、その多くは pH 感受部および高電気伝導性部分が尖端から約 10 μm 以下のところに局限していた (Fig. 12 の②)。したがって、このような電極を選んで Fig. 13 のごとき等価回路解析を行えば、尖端孔の seal や硝子壁の絶縁を行うことなく直径 15 μm 以上の細胞の細胞内 pH 測定に用い得るはずである。実際この種の電極を用いてわれわれはラット小腸上皮細胞の pH を 7.0 と合理的な結果を得ており、また、glucose の輸送あるいは高 K⁺ 溶液の中でそれがそれぞれ約 0.3 および 0.2 減少することを観察している。

この型の電極は、従来のように^{9,36)} 尖端部の性質に対する顧慮、等価回路解析を抜きにして用いると不正確であり、これらを考慮するためには測定が煩雑であるという欠点があるが、尖端孔の seal や硝子壁の絶縁という厄介で問題の多い操作が不必要である上に、その操作過程が必然的に伴う尖端の鋭利さを犠牲にすることもなく、非常に鋭利な電極が容易に得られる利点があり、小腸上皮細胞のような小細胞にも使用可能である。

この型の微小電極はその他のイオン選択性硝子を使用して H⁺ 以外のイオン細胞内活量測定に用いることも可能であろう。われわれも試みているが、これからの課題である。

Fig. 13 細胞内刺入された pH 微小電極の等価回路モデル。— E_t' : 細胞内液中の尖端孔部での起電力, E_H' : 細胞内液中の pH 感受性部分の起電力, E_g : 細胞外液中の pH 非感受性部分の起電力, E_m : 細胞膜電位, R_m : 細胞膜抵抗, その他は Fig. 11 と同じ。

おわりに——尖端電位低減のための技術的問題

以上のごとく, TP が尖端孔での拡散電位 (E_t) と尖端付近の硝子壁の状態に依存する電位 (E_g) とに由来し, 高い TP は主として水和による後者の寄与の増大に基づくと結論される。しかも E_g は電極外液のイオン組成の変化に伴って変化し, これを定量的に評価して細胞内液中の TP を補正することは現段階においてはきわめて困難といわざるを得ない。したがって, 膜電位測定を正しく行うには, TP は小さければ小さいほど良いというはじめの結論^{6,7,26,27)}に戻ることであり, TP を低く抑える実際的方法が改めて問題となる。

このためには Fig. 6 から明らかのように, $R_g \gg R_t$ の時には E_t を, $R_g \ll R_t$ ならば E_g を, $R_g \approx R_t$ では両者を小さくすることを要求されるが, 3 M KCl を内液として用いる電極の E_t は本来無視し得る程度に過ぎないはずであるから, ここで問題となるのは主に尖端孔径に依存する R_t と尖端部の硝子の水和状態に依存する R_g と E_g である。実際尖端孔径が大きいほど $R_g \gg R_t$ の条件が確保されて E_g の寄与は減少し, 固定陰電荷等の影響を受けない電極内外液界面も大となり, TP は著しく低くなる。したがって使用目的に合致する範囲で電極が太いほど TP は低く, Adrian も指摘するように $5 \mu\text{m}$ ともなれば TP は無視できる。しかし, 固定陰電荷による E_t の修飾と E_g の増大を軽減するためにも, また Adrian のような尖端部汚染を避けるためにも, 尖端孔の大小を問わず, 使用する硝子管, 硝子線維の酸処理と洗浄を予め行う方が望ましいことは明らかである。

細く鋭利で, しかも比較的 TP の低い電極を得るためには, 尖端部硝子膜の水和を受ける時間をできるだけ少

なくすることがまず第一に必要である。したがって酒精置換法よりは硝子線維法, 芯入硝子管法または直接充填法が優れているのは明らかで, しかも使用するまでの電極を液中または湿室中に保存する期間を短くする必要がある。

これに付随して, 水和された硝子壁部分に関連した膜電位測定におけるもう一つの誤差要因を指摘しておかねばならない。長く保存された細い電極では conductive な硝子膜部分が拡大し, 時には $100 \mu\text{m}$ におよぶことがある (Fig. 4 b)。このような電極を小細胞に用いると, 細胞内に刺入された電極の細胞外の低抵抗硝子膜を通じての電気的短絡を生じ, 思わぬ誤差の原因となる²⁹⁾。Pyrex 硝子製微小電極を $15 \mu\text{m}$ 以上の細胞に対して用いる場合, 作成後数時間以内では多くの場合問題はないようであるが^{19,29)}, 硝子組成や aging の期間によっては顧慮する必要を生じよう。pH 微小電極について Fig. 13 のような等価回路を顧慮したのもこの点からである。

あらかじめ充填液を酸性化しておくことにより低 TP 電極を得ること^{18,19,24~26)} や, いったん発生した TP を使用に当たって尖端部充填液を酸性化して減少させること (岡田, 未発表) も実用上便利ではあるが, この場合電極内液中の高濃度の H^+ が細胞に与える影響を予め check する必要があるだろう。金剛砂を散布した寒天またはゼラチン⁸⁾, もっと簡便には煉歯磨 (岡田, 未発表) に軽く刺入する方法は, 最近別の目的を持って盛んになってきた尖端部の斜角研磨法³⁰⁾と共に尖端部の水和硝子薄膜を機械的に破壊・除去することによって TP を著しく低減する有効な方法である。しかし尖端部の太くなるのは不可避で, できれば, この種の機械的处理を用いなくとも, TP の低い鋭利な細い微小電極を作成使用する

のが望ましいであろう。

われわれのところで、先端直径 $0.5\ \mu\text{m}$ 以下の微小電極の作成は、硫酸混液で酸処理後蒸留水洗浄した Pyrex 硝子管および硝子線維を用いて硝子線維法で行い、冷蔵庫内の湿室中に約 1 時間保存し、この間に電極抵抗や TP (PBS 中で $\pm 3\text{ mV}$ 以下) が安定するのを待ってただちに使用することにしており、止むを得ぬ場合も低温湿室保存は 2 日にわたらないように注意していることを参考までに付記してこの稿を終えることにする。

文 献

- 1) W. J. V. Osterhaut: *Biol. Rev.*, **6**, 369 (1931)
- 2) A. L. Hodgkin, A. F. Huxley: *Nature* (Lond.), **144**, 710 (1939)
- 3) J. Graham, R. W. Gerard: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **28**, 99 (1946)
- 4) G. Ling, R. W. Gerard: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **34**, 383 (1949)
- 5) W. L. Nastuk, A. L. Hodgkin: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **35**, 39 (1950)
- 6) R. H. Adrian: *J. Physiol.* (Lond.), **133**, 631 (1956)
- 7) Y. Okada, M. Ogawa, N. Aoki, K. Izutsu: *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 116 (1973)
- 8) K. Frank, M. C. Becker: "Physical Techniques in Biological Research" (ed. by W. L. Nastuk) Vol. V, Electrophysiological Methods, Part A, p22, Academic Press, New York & London (1964)
- 9) M. Lavallée: *Circulat. Res.*, **15**, 185 (1964)
- 10) G. Kawabata, Y. Nakamura: *Bull. Yamaguchi Med. School*, **12**, 1 (1965)
- 11) M. Lavallée, G. Szabo: "Glass Microelectrodes" (ed. by M. Lavallée, O. F. Schanne, and N. C. Hébert) p95, John Wiley, New York (1969)
- 12) M. S. Bingley: *Nature* (Lond.), **202**, 1218 (1964)
- 13) D. Agin, D. Holtzman: *Nature* (Lond.), **211**, 1194 (1966)
- 14) D. Agin: "Glass Microelectrodes" (ed. by M. Lavallée, O. F. Schanne, and N. C. Hébert) p62, John Wiley, New York (1969)
- 15) 岡田泰伸, 井上章: 日本生物物理学会第12回一般講演会予稿集; p96 (1973)
- 16) 岡田泰伸, 井上章: 日本生理誌, **37**(5), 100 (1975)
- 17) 岡田泰伸, 井上章: 日本生理誌, **37**(7), 144 (1975)
- 18) Y. Okada, A. Inouye: *Experientia*, **31**, 545 (1975)
- 19) Y. Okada, A. Inouye: *Biophys. Struct. Mechanism*, **2**, 31 (1976)
- 20) Y. Okada, A. Inouye: *Biophys. Struct. Mechanism*, **2**, 21 (1976)
- 21) I. Tasaki, E. F. Polley, E. Orrego: *J. Neurophysiol.*, **17**, 454 (1954)
- 22) K. Tasaki, Y. Tsukahara, S. Ito, M. J. Wayner, W. Y. Yu: *Physiol. Behav.*, **3**, 1009 (1968)
- 23) 後藤司, 大場三栄, 富田忠雄: 日本生理誌, **37**(3), 63 (1975)
- 24) J. A. William, C. D. Withrow, D. M. Woodbury: *J. Physiol.* (Lond.), **212**, 101 (1971)
- 25) K. T. Wann, M. W. Goldsmith: *Nature* (Lond.), **238**, 44 (1972)
- 26) J. Riemer, C. Mayer, G. Ulbrecht: *Pflügers Arch.*, **349**, 267 (1974)
- 27) 乙黒源宏: 日本生理誌, **32**(10), 679 (1970)
- 28) G. Eisenman: "Glass Microelectrodes" (ed. by M. Lavallée, O. F. Schanne and N. C. Hébert) p32 John Wiley, New York (1969)
- 29) J. P. Caillé, S. Gagné: *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, **49**, 783 (1971)
- 30) 吉村寿人, 松下寛, 森本武利: pH の理論と測定法, 丸善, 東京 (1968)
- 31) R. H. Doremus: "Glass Electrodes for Hydrogen and Other Cations" (ed. by G. Eisenman) p101 Marcel Dekker, New York (1967)
- 32) G. Eisenman: "Glass Electrodes for Hydrogen and Other Cations" (ed. by G. Eisenman) p133 Marcel Dekker, New York (1967)
- 33) G. Eisenman: "Glass Electrodes for Hydrogen and Other Cations" (ed. by G. Eisenman) p223 Marcel Dekker, New York (1967)
- 34) G. Eisenman: 第1回国際生物物理学会議招待講演集録, p 227, 吉岡, 京都 (1962)
- 35) K. S. Cole: *Symp. Quant. Biol. Cold Spring Harbor*, **1**, 23 (1933)
- 36) D. H. Winship, C. R. Caflisch: *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 280 (1973)
- 37) D. F. Hülser, D. J. Webb: *Biophysik*, **10**, 273 (1973)
- 38) 田崎京二, 鈴木均, 渡辺譲二: 生体の科学, **27**(4), 320 (1976)
- 39) J. T. Davies, E. K. Rideal: "Interfacial Phenomena" Academic Press, New York (1963)