マイクロ電極システムを用いた生体材料の 局所機能探索と応用

末 永 智 一*

Characterization of Localized Biomaterials with Microelectrode System and Its Application

Tomokazu MATSUE*

Key Words : Microelectrode, Biomaterial, Localized Function

マイクロ電極システムを用いた局所機能探索に関して、マイクロ電極の特長、局所生体機能の評価、膜機能の評価、局所表面反応の評価、極微量・多項目センシングに関して解説する。

1. はじめに

電気化学計測は、溶液内のみならず各種固体表面上で進行する化学反応の解析や機能評価に大きく貢献してきたが、最近のマイクロテクノロジーの発達に伴い、電気化学計測の探針である電極の小型化、更にはシステムの小型化・高精度化が著しく進展し、新しい局所電気化学計測法が開発されている。小型化された電極(ここではマイクロ電極と称することにする)は通常サイズの電極とは異なった挙動を示し¹⁾、(a) 高抵抗媒体中での計測が可能、(b) 反応の解析が容易、(c) 高速反応の追跡が可能、(d) 高感度計測が可能、(e)局所領域の計測が可能などの特長を有する。これまで種々のマイクロ電極が作製されているが、本稿ではディスク型マイクロ電極に焦点を絞り、その特長と生体材料の局所機能評価への適用に関して解説する。

2. マイクロ電極の特長

多くの電極反応は、電極へのあるいは電極からの電極活性物質の物質移動(拡散)により律速される。従って、電流応答は、拡散層の広がりや電極サイズに大きく依存する。拡散層の広がりは大まかに $(Dt)^{1/2}$ (D : 拡散係数、 t : 電解時間) で与えられる。電解時間を 10 秒とすると、拡散層は 0.1 mm 程度の厚さとなる。これまで多くの計測で用いられてきた電極は、サイズ(mm~cm 程度)が

拡散層に比べ非常に大きいため、電極表面での拡散は一次元と見なすことができる。この場合、電極電位を一定速度(v)で走査しながら電流を計測する(ボルタンメトリー)と、ピークを持つ曲線(ボルタモグラム)が得られる。一方、拡散層に比べ電極サイズが小さい場合には、電極のエッジ効果が顕著になる。十分に長い時間においては半球状の定常拡散層が形成され、観測される電流値(i_d)もまた次式に示される定常値となる²⁾。

$$i_d = 4 n F C^* D r \dots\dots\dots(1)$$

n : 電子移動数, F : ファラデー定数, C^* : バルク濃度, D : 拡散係数, r : 電極半径

マイクロ電極で観測される酸化還元電流は極めて小さい(通常、ナノアンペア~ピコアンペア)。これは外部ノイズの影響を受け易いなど計測上の困難さをもたらしているが、逆にマイクロ電極の大きな特長の一つでもある。通常の電気化学計測においては、溶液抵抗による電圧降下(iR ドロップ)を防ぐため、多量の支持塩を溶液に添加する必要がある。しかし、マイクロ電極を用いることにより、 iR ドロップを大幅に低減することができる³⁾。表 1 に比抵抗 $1 \times 10^{-3} \Omega \text{cm}$ の溶媒中(1.0 mM KCl 水溶液に相当)における、1.0 mM の電極活性種($D = 1 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)の電気化学応答をまとめた。電極半径が 1 cm のディスク電極を用いた場合の iR ドロップは 750 mV であり、正確な電位制御が不可能であることを示している。これに対して、半径 $1 \mu\text{m}$ の電極を用いた場合には、 iR ドロップは 1 mV と無視し得る。また、マイクロ電極を用いた場合の時定数も小さい。支持塩濃度を高くすることにより時定数を更に下げることができ、ナノ秒オーダーの高速反応を追跡できる。

* 東北大学大学院 工学研究科 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻 7)
Graduate School of Eng., Tohoku Univ. (Aramaki 7, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8579)

表1 マイクロ電極の特長

電極半径 r	1秒の計測で観測 される電流 (nA)	溶液抵抗 R (Ω)	容量 C (pF)	iRドロップ V (V)	時定数 RC (sec)
1.0 mm	~ 0.4	2.5×10^6	0.31	0.001	7.8×10^{-7}
10 mm	~ 4	2.5×10^5	31	0.001	7.8×10^{-6}
1.0 cm	~ 3×10^6	250	3.1×10^5	0.75	7.8×10^{-3}

$r=1 \times 10^3 \text{ } \Omega\text{cm}$ (1 mM KClに相当), 界面容量= $10 \text{ } \mu\text{F}/\text{cm}^2$ の場合

図1 マイクロ電極システムを用いた細胞機能の探索

3. 局所生体機能の評価

上述したように、マイクロ電極は魅力的な特長を有するが、最大の特長は、サイズが小さく微小領域での計測が可能であることである。特に、生体局所領域の計測に大きな威力を発揮している⁴⁾。マイクロ電極は、その理論が提案された当時から生体局所領域の計測への使用を意図されてきた。1970 年前半に Adams ら⁵⁾ は、カーボン系マイクロ電極をラット脳内に挿入し、代表的神経伝達物質であるカテコールアミン類の検出を行った。この測定法の有用性が認識され、マイクロ電極を用いた生体内計測はさまざまな方面に研究が展開されている⁶⁾。最近では、個々の細胞機能の評価にも、マイクロ電極が用いられるようになってきた⁷⁾。

細胞内には多くの電極活性種が存在するが、その中でも酸素は各種生体内反応に深く関わっており、細胞内濃度を知ることは、生命現象を理解する上で極めて重要である。そこで、マイクロ電極で酸素還元電流を計測することにより、細胞内外の酸素濃度を決定する試みがなされている(図1)。例えば、マイクロ電極を植物細胞に挿入し、外部から光を照射した場合の酸素還元電流の変化を測定すると、光合成反応による酸素発生のため、光を照射・消光に応じ、迅速でしかも特異な酸素還元電流応答が得られる(図2)⁸⁾。強光照射直後の酸素還元電流ピークから、明反応に起因する酸素発生速度を計算することができる。この種のマイクロ電極を用いると、迅速に細胞内酸素濃度の変化を追跡でき、化学物質が光合成

図2 光照射、消光に伴う植物細胞(プロトプラスト)内の酸素濃度変化
DCMU 濃度: a, 0; b, 0.6 μM . 光強度: 25 klx.

に与える影響に関しても機構の詳細に踏み込んだ議論が可能である。また、光照射に対する特徴的なレスポンスから、明反応および暗反応それぞれに対する50%阻害濃度を、単一細胞レベルで迅速に決定することができる。

光照射に伴う酸素発生パターンは、細胞が置かれた外部環境に大きく影響される。例えば、ハネモプロトプラスト溶液に、光合成阻害剤である3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素(DCMU)を極微量(0.6 μM 程度)加えると、酸素発生パターンは劇的に変化する(図2)。つまり、この細胞は外部溶液に加えられた化学物質を察知し、酸素発生量を減らすように応答したことになる⁹⁾。細胞は僅かな環境変化にもすばやく応答するので、細胞応答を電気的なシグナルとして取り出すことにより、新しいタイプの環境モニタリングシステムを構築できる。

また外部溶液にキノンを添加すると、逆に酸素発生量が増加する¹⁰⁾。キノンは極めて細胞膜を透過しやすく、細胞内に進入したキノンは光合成系電子伝達鎖の電子受容体となるため、光合成による酸素発生が加速されるこ

とに起因する。マイクロ電極システムを用いて計測することにより、単一細胞レベルでの物質収支の定量的評価が可能となる。

4. 膜機能の評価

細胞膜を含む生体膜は、エネルギー変換や情報伝達などの生命活動維持のため様々な生体反応の場となっている。それゆえ、膜の機能と生体反応を理解することは極めて重要である。生体膜やそのモデルである人工脂質二分子膜(BLM)の機能評価¹¹⁾にはマイクロ電極システムを用いた計測は極めて有効である。また、生きた単一細胞の細胞膜の各種レドックス種に対する透過性を評価できることも、大きな特長である。

図3 マイクロ電極システムを用いた膜透過性の評価

我々は、マイクロ電極-細胞間距離を変え、レドックス電流を計測することにより、生きた単一細胞の細胞膜の各種レドックス種に対する透過性を評価した¹²⁾。レドックス種が細胞膜を透過し得ない場合には、マイクロ電極を細胞膜に近づけるとレドックス電流は大きく減少する。しかし、レドックス種が細胞膜を透過し得る場合には、電流値はそれほど減少しない。この挙動を定量的に解析することにより、膜透過係数を決定できる(図3)。その結果、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ の膜透過係数(P_m)は 10^{-4}cm/s 以下、 $\text{Co}(\text{Phen})_3^{2+}$ では $P_m=1\times 10^{-3}\text{cm/s}$ 、フェロセニルメタノールでは $P_m=5\times 10^{-3}\text{cm/s}$ 、ヒドロキノンやキノンは $P_m>10^{-2}\text{cm/s}$ と非常に細胞膜を透過しやすいことが明らかとなった。この手法を利用すると、膜中に埋め込まれたイオンチャンネルのイオン選択性を評価することも可能である¹³⁾。

5. 局所表面反応の評価

マイクロ電極で試料表面を走査し、その酸化還元電流応答を2次元マッピングすることにより、表面の局所化学反応をイメージ化することが可能である。この装置は、電気化学顕微鏡(SECM)と呼ばれ、最近市販されるようになった¹⁴⁾。SECMの空間分解能は探針であるマイクロ電極径に依存するため、STMやAFMのような原子、分子レベルの解像度は期待できない。しかし、SECMを用いると、固体試料表面のみならず局所空間で化学反応を画像化でき、また局所領域に化学反応を誘起することが可能である。図4にSECMの基本原則を示した。探針であるマイクロ電極が基板から十分離れている場合には、電極表面上に半球状の定常拡散層が形成されるために、溶存する電極活性種の濃度に比例した定常電流応答が得られる。探針を絶縁基板に近接させると、拡散による物質供給が基板により妨げられるため応答電流値は減少する。しかし、試料基板が導体であれば、探針であるマイクロ電極上で生成した電気化学的活性種が再生さ

図4 走査型電気化学顕微鏡の動作原理

れるため、酸化還元電流が増加する。また、基板表面に酵素などの酸化還元触媒が固定されている場合にも、応答電流の増加が観測される¹⁴⁾。この応答変化を定量的に解析することにより、基板表面で進行する化学反応を評価できる。

SECMのプロブであるマイクロ電極上で進行する極微化学反応を利用すると局所的な反応場を構築し、表面改質をおこなうことが可能である。SECMによるマイクロファブリケーションでは、探針であるマイクロ電極の酸化還元電位を制御することにより、様々な化学反応系が設計可能であるという特長がある。例えば、プロブで発生させたHOラジカル¹⁵⁾やHOB¹⁴⁾などを利用することにより、試料表面に化学反応を誘起し、酵素など生体材料の微細加工を行うことができる。

6. 極微量・多項目センシング

マイクロ電極システムを利用した局所酵素反応検出系は、生体物質の極微量システムへと展開できる。例えば、表面局所領域に異なる抗体を固定した基板(抗体チップ)上での、抗原-抗体反応を上述のSECMにより検出することが可能である(図5)¹⁶⁾。この場合、抗体チップに抗原(一般にタンパク質)を含む溶液を滴下すると、抗原はチップ上の特定抗体に捕捉される。その後、適当な酸化酵素(例えばパーオキシダーゼ)で標識された抗体で処理すると、この標識酵素をSECMによりイメージングできる。標識酵素が存在する場所には抗原が捕捉されているので、レスポンスが現れた場所から試料中に含まれるタンパク質の種類を特定できることになる。

非常に低濃度の特定物質を検出・定量するためには、一般にその物質を濃縮する必要がある。抗体チップを用いると、微小領域に試料中の抗原を濃縮固定できる(図6)。そこで、シミュレーション法を用いてこの濃縮効果を定量的に検討した結果を概説する。この計算では、一面に抗体を固定した平面基板と半径10μmの微小円部のみに抗体を固定した基板(抗体局所固定化基板)を、100pMの抗原溶液に浸漬した場合の捕捉抗原量の経時

変化を求めた(表2)。平面基板に比べ抗体局所固定化基板に捕捉された抗原の密度は、基板浸漬後10秒では約10倍、10分後には680倍高い。つまり、抗体局所固定化基板を使用することにより、溶液中に存在する希薄抗原を、短時間で局所濃縮できることになる。これは、微小円部と接する抗原溶液中に、半球状拡散層が形成され、抗体が固定されている微小円部に、周囲の抗原分子が集中することに起因している。この結果は、微細加工を施した基板の利用は、サンプル量の少量化や集積化という観点だけでなく、計測時間の短縮や検出感度の向上にも

図5 走査型電気化学顕微鏡(SECM)を利用した抗体チップのイメージング

図6 平板および微小ディスク領域に抗体を固定した場合の抗原分子の拡散様式

表2 抗体局所固定化基板および平板基板上で捕捉された抗原の表面濃度

時間 ^{a)}	捕捉抗原濃度/ fmol/cm ²	
	平板	局所固定化 ^{b)}
10秒	0.87	8.2
1分	2.1	46
10分	6.8	460

a) 溶液中への基板の浸漬時間。
b) 直径20μmの微小円部のみに抗体を固定。溶液中の抗原濃度：1.0 x 10⁻¹⁰
M. 拡散係数；6 x 10⁻⁶ cm² /s

有効であることを示している。

7. おわりに

以上、マイクロ電極システムの特長と局所領域での生体材料の機能評価に関して最近の研究を紹介した。生体材料に限らず、種々の物質の機能を評価するためには、マイクロメートルからナノメートルの領域における特性を定量的に把握し、反応を制御することが必要である。この領域の機能を探索・制御するために我々がとり得る選択肢はそれほど多くないが、マイクロ電極を利用した電気化学的手法は有効な手法の一つである。現在、電極の更なる微小化を目指して種々の試みがなされており、今後、マイクロ電極システムが幅広い分野で局所機能探索に用いられていくものと期待している。

(1999-7-12 受理)

文 献

- 1) Fleischmann, M. et al.; Ultramicroelectrodes, Datatech Science, (Morganton, N. C., 1987)
- 2) 青木幸一; 電気化学, **56**, 608 (1988)
- 3) R. W. Wightman; *Anal. Chem.*, **53**, 1125 A (1981)
- 4) 末永智一; 表面技術, **43**, 759 (1992).
T. Matsue, I. Uchida; Chemical Sensor Technology. Vol. 3, p. 263 (Kodansha, 1991)
- 5) P. T. Kissinger, J. B. Har, R. N. Adams; *Brain Res.*, **55**, 209 (1973)
- 6) R. M. Wightman, L. J. May, A. C. Michael; *Anal. Chem.*, **60**, 769 A (1988)
- 7) 末永智一; バイオサイエンスとインダストリー, **53**, 27 (1995)
安川智之, 末永智一; 応用物理, **67**, 314 (1998)
- 8) T. Matsue, S. Koike, T. Abe, T. Itabashi, I. Uchida; *Biochim. Biophys. Acta*, **1101**, 69 (1992)
- 9) T. Matsue, S. Koike, I. Uchida; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**, 1283 (1993)
- 10) T. Yasukawa, I. Uchida, T. Matsue; *Biophys. J.*, **76**, 1129 (1999)
- 11) H. Yamada, T. Matsue, I. Uchida; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**, 1330 (1991)
T. Matsue, H. Shiku, H. Yamada, I. Uchida; *J. Phys. Chem.*, **98**, 11001 (1994)
- 12) T. Yasukawa, I. Uchida, T. Matsue; *Biochim. Biophys. Acta*, **1369**, 152 (1998)
- 13) R. C. Engstrom, C. M. Pharr; *Anal. Chem.*, **61**, 1099 A (1989).
A. J. Bard, F.-R. Fan, J. Kwak, O. Lev; *Anal. Chem.*, **61**, 132 (1989)
- 14) H. Shiku, T. Takeda, H. Yamada, T. Matsue, I. Uchida; *Anal. Chem.*, **67**, 312 (1995)
- 15) H. Shiku, I. Uchida, T. Matsue; *Langmuir*, **13**, 7239 (1997)
- 16) H. Shiku, T. Matsue, I. Uchida; *Anal. Chem.*, **68**, 1278 (1996)
H. Shiku, Y. Hara, T. Matsue, I. Uchida, T. Yamauchi; *J. Electroanal. Chem.*, **438**, 187, (1997)