

令和 3 年 10 月 15 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K04636

研究課題名(和文)電気生理学的ライブセルイメージングシステムの構築

研究課題名(英文)Development electrophysiological imaging system of live cells

研究代表者

山田 弘(Yamada, Hiroshi)

防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群)・応用科学群・教授

研究者番号：10545974

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文):細胞の生理機能をつかさどる細胞膜表面のイオンチャネル分布や、細胞近傍の酸素流束分布をイメージングするため、ナノイオン選択性電極、ナノ白金電極、およびこれらを非侵襲でプローブ/試料間距離を制御し走査する機構を開発した。先端がnmサイズのガラスキャピラリー内部にイオン選択性を有するクラウンエーテル溶液を入れることでアンペロメトリックカリウムイオン選択性電極を作成した。また、酸素流束測定のためのナノ白金電極を作成した。これらの電極をダブルバレルの電極へ改良し、イオン伝導度により距離制御し、カリウムイオン、あるいは酸素流束をイメージングする走査プローブ顕微鏡システムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在用いられている細胞の生理学的な評価は、パッチクランプや特定のたんぱく質を蛍光ラベルして観察する方法等で行われている。これらは非侵襲ではなく、細胞の生理機能を長期にイメージングできるわけではない。本研究課題で構築したナノメートルサイズのイオン選択性電極およびナノ白金電極を用いた走査プローブ顕微鏡システムによれば、ナノメートルレベルの解像度で試料表面に沿ってプローブを走査し、カリウムイオンあるいは酸素流束のイメージングが可能である。本システムを用いれば、非侵襲で単一細胞近傍の細胞の生理機能と関連の深い物質の流束分布をイメージングし、細胞機能評価の新たな手段となりうる。

研究成果の概要(英文): A nanometer-sized ion selective and Pt electrodes were fabricated to image the distribution of ion channels at the living cell membrane and local oxygen flux for the investigation of electrophysiological activities of a live cell. The scanning probe microscopy (SPM) system was also developed using these electrodes.

An ion selective crown ether was introduced in a nano-meter sized glass capillary to form an amperometric ion-selective electrode. A nano-meter sized Pt electrode was fabricated to measure the local oxygen flux over living cells. These electrodes were fabricated with a double barrel capillary to form the dual probe for distance control of SPM system.

研究分野：電気化学

キーワード：走査プローブ顕微鏡 走査電気化学顕微鏡 走査イオンコンダクタンス顕微鏡 イオン選択性電極

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 研究の学術的背景

細胞の生理機能を詳細に検討するためには、細胞のイオン調整機能や呼吸活性をモニタリングすることが必要である。しかし、これまでの電気生理学的測定手法では、細胞表面のイオンチャンネル分布や呼吸活性を単一細胞レベルでイメージングすることは不可能であった。近年、サブミクロンの解像度を有する走査電気化学顕微鏡 (SECM) が開発され、細胞観察に用いられているが、局所的なイオンチャンネル分布や局所的な酸素流束の分布をイメージングするには至っていない。

### 2. 研究の目的

単一細胞のイオンチャンネル分布や酸素流束分布をイメージングする走査プローブ顕微鏡 (SPM) を開発するためには、SPM プローブと試料表面との距離をナノメートルレベルの精度で制御しつつ、細胞表面に沿ってプローブを走査し、カリウムイオンや酸素流束を測定するシステムが必要である。このためには、チャンネル分布および酸素流束をイメージングするためのナノイオン選択性電極、ナノ白金電極、およびこれらを非侵襲でプローブ/試料間距離を制御し走査する機構の開発が必要である。

### 3. 研究の方法

#### (1) SPM 観察用セルの構築

細胞を光学顕微鏡で観察しながら SPM でイメージングするため、倒立顕微鏡ステージ上にピエゾ駆動 XY ステージおよびピエゾ駆動 Z ステージからなる SPM 走査システムを構築し、細胞培養環境で SPM 測定可能なチャンバーを作成した。

#### (2) プローブ/試料間距離制御法の検討

我々は、距離制御機構としてプローブ先端と試料表面に働くシアフォースを用いる方法を用いていたが、細胞など柔らかい試料であっても非侵襲で正確な距離制御が可能であるかを検証した。シアフォースを検出するため、プローブを水晶振動子に固定し、数十ナノメートルの振幅で水平に振動させつつ、試料表面に近接させた。プローブ先端と試料表面との距離を正確にモニターするため、プローブには、電解質水溶液を入れた微小ガラスキャピラリを用いる走査イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) により、キャピラリ内外のイオン伝導度の変化を測定し、距離を見積もった。水溶液中で基板上のヘキサデカン液滴にプローブを近接させ、シアフォースが働くことによる水晶振動子の振幅の減少とイオン伝導度変化を測定した。

#### (3) ナノイオン選択性プローブの作成

我々が以前報告したナノイオン選択性電極 (ISE) は、ガラスキャピラリ内部を表面処理し、イオン選択能を有するクラウンエーテル溶液を入れて作成していた。このように作成したプローブは、複数回の使用が不可能であること、長期時間使用には耐えられないこと、表面処理過程が煩雑であることから、新たなプローブ作成法の構築が必要となった。そこで、キャピラリ先端に熱分解したポリジメチルシロキサン (PDMS) を詰めたガラスキャピラリにクラウンエーテル溶液を入れることで、安定で複数回の使用に耐えうる ISE を作成した。また、距離制御にイオン伝導度を用いるため、ダブルバレルの電極で、一方をイオン伝導度測定用電極、他方を ISE とする SICM/ISE デュアルプローブを作成した。(Fig. 1)

#### (4) ナノ白金プローブの作成

報告されているナノ白金電極は、先端をエッチングにより細線化した後、側面をガラスコートする方法や、ガラス管に入れた白金細線をプラーで同時に引く方法で作成されている。しかし、これらの方法では、シール部も含めた全体径が小さい電極を作成することが難しい。そこで、キャピラリ先端に熱分解したポリジメチルシロキサン (PDMS) を詰めたガラスキャピラリ内部にカーボンを析出させたのち、白金メッキを行うことで RG (電極径に対するシール部も含めた電極全体径の比) が 1.5 以下となるようなナノ白金電極を作成した。また、距離制御にイオン伝導度を用いるため、ダブルバレルの電極で、一方が白金電極である SICM/Pt デュアルプローブを作成した。

### 4. 研究成果

#### (1) プローブ/試料間距離制御法の検討

細胞など柔らかい試料にプローブを近接させた時のシアフォース変化の挙動は明らかになっていない。そこで、これを明らかとするため、水溶液中での油滴を細胞モデルとし、この油滴へガラスキャピラリを近接させた時のプローブの振動とイオン電流の変化を測定することによりシアフォースが試料に与える影響を詳細に検討した。プローブを試料表面と水平に振動させながら試料に近接させた時、ごく近傍で、プローブ/試料表面間でシアフォースが働くため振動が減少する。油滴や細胞など極めて柔らかい試料表面に近接させた場合には、振動は緩やかに減少することを見出した。これは、プローブ先端が試料表面を押し下げ、試料が変形するためであることを明らかにした。また、振動の大きさを変化させた時の挙動から、振動が大きいつき、より遠い距離から試料表面に相互作用を及ぼしていることを明らかにした。また、様々な粘度の有機溶媒を用いた油滴での挙動から、有機溶媒の粘度が大きいほど振動の減少量が

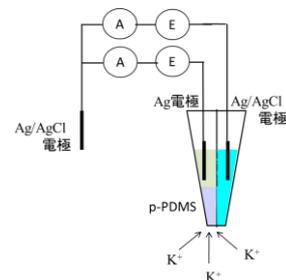


Fig. 1 SICM/ISE デュアルプローブ

きくなることを明らかにした。これらの検討結果から、細胞を走査する際に、シアフォースを用いた距離制御法では、プローブ先端と柔らかい試料表面との相互作用が無視できないことが示唆された。したがって、細胞を走査する場合には、シアフォースで距離制御するよりは、イオン伝導度による距離制御法である SICM で行ったほうが良いことが示唆された。そこで、ISE, Pt 電極それぞれをダブルバレルとし、一方を SICM 測定用の電極とするデュアルプローブを開発する必要ある。

## (2) ナノイオン選択性プローブの評価

熱分解 PDMS を先端につめた石英キャピラリーにカリウム選択能を有するクラウンエーテルを溶解させたジクロロヘキサンを入れたカリウムイオン選択性電極を作成した。この電極がアンペロメトリックなセンサーとして機能することを確かめた。さらに、上記の微小カリウム選択性電極を、シータ型ガラス管をもとに SICM/ISE デュアルプローブを作成した。このプローブを用い、 $MgCl_2$  水溶液にカリウムイオンを添加していった時の ISE 側 (Fig. 2 上) および SICM 側 (Fig. 2 下) のサイクリックボルタモグラム (CV) を示す。

K<sup>+</sup>存在下で ISE 側に負の電位を印可すると、外側より ISE 側へカリウムイオンの促進移動が起こって負の電流が流れ、定常電流値はカリウムイオンの濃度に

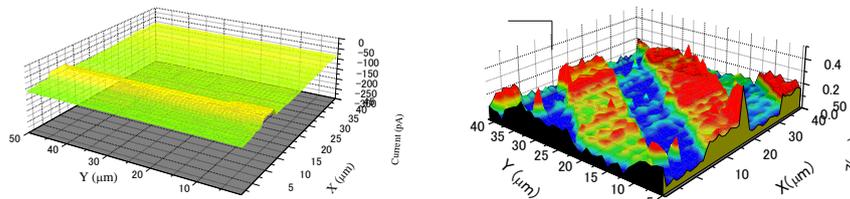


Fig. 3 SICM/ISE デュアルプローブで白金バンドアレイ電極を走査したときの K<sup>+</sup>流束(左)と形状(右)イメージ。  
白金バンドの幅 10  $\mu m$ , 間隔 10  $\mu m$ , 膜厚 150 nm.

ほぼ比例した。一方、SICM 側では、支持電解質濃度に比べ、添加した K<sup>+</sup>濃度は十分小さいため、イオン伝導度に変化はないので、CV は K<sup>+</sup>濃度に依存しなかった。ISE を試料表面に近接させたとき、SICM 側でのイオン伝導度の減少が一定となるよう距離制御し、膜厚 150 nm の白金バンドアレイ電極表面を走査した結果を Fig. 3 に示す。白金バンド電極の形状イメージと同時にカリウムイオン流束イメージを同時取得することができた。

## (3) ナノ白金プローブの評価

PDMS 熱分解生成物を先端につめた石英キャピラリーにカーボン析出させたのち、白金をメッキすることにより、先端に白金が析出した電極径 100 nm 程度でシール部の極めて小さい電極を作成した。Fig. 4(a)にカーボン析出後に測定した 1.0 mM フェロセニルメチルアンモニウム水溶液中で測定した CV を示す(青線)。FA<sup>+</sup>の酸化定常電流は約 3 pA でキャピラリー内径から予想される電流の 10%以下であった。これは、キャピラリー先端までカーボンが析出していないためと考えられる。このカーボン電極に 10 mM H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>/0.1 M HCl 中で -0.1 V vs. Ag/AgCl で定電位電解したときの電流の経時変化を Fig. 4(b)に示す。4000 s あたりまでほぼ一定の電流が観測されているときは、キャピラリー内部への白金析出過程と考えられる。Pt メッキ後の CV を Fig. 4(a)に示す(赤線)。FA<sup>+</sup>の酸化電流は、キャピラリー内部が白金が満たされ、ディスク電極となったと仮定したときの

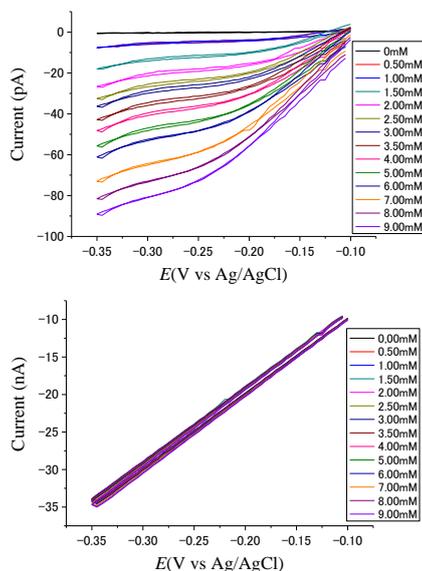


Fig. 2 75 mM  $MgCl_2$  水溶液に K<sup>+</sup>を添加していった時の SICM/ISE デュアルプローブの CV。  
上: ISE 側, 下: SICM 側

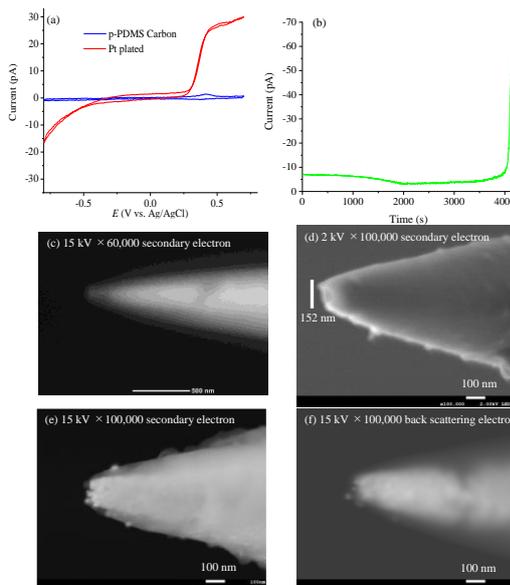


Fig. 4 (a) 1.0 mM FA<sup>+</sup>/0.14 M NaCl 水溶液中で測定したカーボン析出後(青線)および Pt せき後(赤線)の CV. (b) 10 mM H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>/0.1 M HCl 中で -0.1 V vs. Ag/AgCl で定電位電解したときの電流の経時変化. (c) 90° および (d-f) 45° 傾けて上面より撮影した SEM 像. (d) 加速電圧 2 kV での 2 次電子像, (e) 加速電圧 15 kV での 2 次電子像, および (f) 加速電圧 15 kV での反射電子像.

電流値よりやや大きくなった。これは白金がガラス先端より盛りあがった状態であるためと考えられる。また、カソード領域に酸素還元に基づく還元電流が観測された。カーボン電極上での酸素還元電流より電流の立ち上がりがアノード方向にシフトしていることから、円滑に酸素流束を観測できることが明らかとなった。Fig. 4(c-f)に Pt 電極の SEM 像を示す。(c) は上面から撮影した二次電子 SEM 像、(d-f)は電極を 45° 傾けて撮影した SEM 像で、(d)は低加速電圧、(e)は高加速電圧での二次電子像、(f)は反射電子像をそれぞれ示す。白い部分は白金であり、キャピラリー内部に白金が析出しているのがわかった。低加速電圧電の 2 次電子像ではガラスキャピラリー表面の形状が観測され、加速電圧を大きくした 2 次電子像および反射電子像ではキャピラリー内部に析出した Pt が観測されていることがわかった。

このナノ白金電極を FA+水溶液中で平滑な白金表面に、白金ナノ電極と基板との間にトンネル電流が観測されるまで近接させて測定したアプローチカーブを Fig. 5(a-c)に示す。(a,b)はローパスフィルタを介さない電流(b)は(a)の拡大図で(c)は 10 Hz のローパスフィルタを介した電流である。ローパスフィルタを介さないアプローチカーブ(a,b)では、表面より数 nm の距離に近づいたとき、急激なトンネル電流の増加が観測され、電流が 100 pA を超えたとき、近接を停止した。ローパスフィルタを介した電流では、トンネル電流による増加が急激であるため、それは観測されていない。Fig.5(d)はアプローチカーブ測定後に撮影した Pt ナノ電極の SEM 像である。Fig.5(c)のプロット(黒丸は電極反応が拡散律速であるとき、白丸は見かけの電子移動速度定数が  $2.2 \times 10^{-2}$  cm/s としたとき)は Fig.5(d)に示した電極の模式図の大きさでデジタルシミュレーションにより計算した結果である。

0.8  $\mu$ m の孔を有する Isopore 膜に Au をスパッタした表面(a,c)および HOPG 表面に Pt ナノ粒子を析出させた表面(b,d)を、トンネル電流を閾値とすることで探針/基板距離が一定となるよう走査して測定した形状イメージ(a,b)と SECM 像(c,d)を Fig.6 に示す。サブミクロンの孔および Pt ナノ粒子の形状を観測すると同時に表面の電気化学的活性を視覚化することができた。Fig.6(c)では、穴がない部分では FA+のレドックスサイクリングにより、電流が大きく観測された。また、Pt ナノ粒子と HOPG 表面における電子移動速度に大きな差がないため、Fig.6 (d)の SECM 像で明確な電流値の違いは観測されなかったと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Electrochemistry 89(3), 323-327, 2021

[学会発表] (計 8 件)

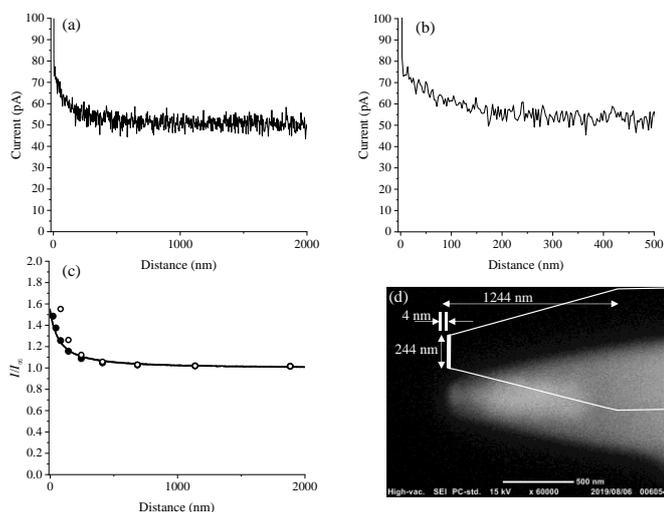


Fig. 5 (a) 1.0 mM FA/0.14 M NaCl 水溶液中で測定したローパスフィルタを介さないアプローチカーブと(b)その基板近傍の拡大図。(c) 10 Hz のローパスフィルタを介したアプローチカーブとデジタルシミュレーションによる計算結果(白丸:電極反応速度が拡散律速の時,黒丸:見かけの電極反応速度定数が  $2.2 \times 10^{-2}$  cm/s としたとき)。(d) 90° 傾けて上面より撮影した二次電子 SEM 像およびデジタルシミュレーションに使用した電極の大きさを示す模式図。

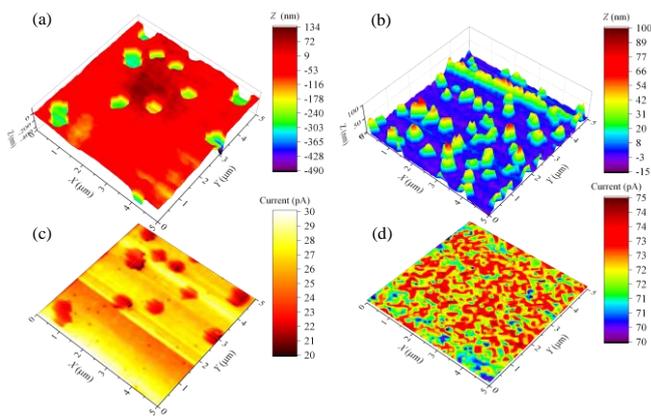


Fig. 6 (a) 1.0 mM FA/0.14 M NaCl 水溶液中で測定したローパスフィルタを介さないアプローチカーブと(b)その基板近傍の拡大図。(c) 10 Hz のローパスフィルタを介したアプローチカーブとデジタルシミュレーションによる計算結果(白丸:電極反応速度が拡散律速の時,黒丸:見かけの電極反応速度定数が  $2.2 \times 10^{-2}$  cm/s としたとき)。(d) 90° 傾けて上面より撮影した二次電子 SEM 像およびデジタルシミュレーションに使用した電極の大きさを示す模式図。

〔図書〕（計 0 件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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、研究者個人に帰属されます。