

走査型電気化学顕微鏡(SECM)による局所センシング

末永智一

東北大学大学院工学研究科

〒980-77 仙台市青葉区荒巻

Microsensing using Scanning Electrochemical Microscopy

Tomokazu Matsue

Graduate School of Engineering, Tohoku University

Aramaki, Aoba-ku, Sendai, 980-77

要旨 *このドキュメントは、ビー・イー・エス(株)主催によるECセミナーの抄録です。

走査型電気化学顕微鏡(SECM)を用いた局所生体関連反応のセンシングと応用に重点を置き、以下の項目に関して概説した。

1. SECMの原理. 2. SECMを用いた局所酵素反応の評価. 3. SECMを利用した酵素パターンの作製. 4. SECM/ELISAシステムによる生体タンパク質の極微量・多項目センシング. 5. SECMを用いた生体膜の機能評価. 6. 単一細胞の機能評価.

最近、マイクロ電極を探針とした走査型電気化学顕微鏡(Scanning Electrochemical Microscopy, SECM)が開発され¹⁾、局所領域の電気化学センシングなど種々の系で用いられるようになってきている。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評価・画像化でき、また局所領域にコントロールされた化学反応を誘起することが可能である。

本稿では、SECMを用いた局所生体関連反応の探索と応用に関して、我々の研究を中心に紹介する。

1. SECMの動作原理

図1にSECMの基本原則の概略を示した。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、(1)式で示されるよう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。

$$i_{T,oo} = 4nFDaC \quad (1)$$

n, 反応電子数; F, ファラデー定数; D, 拡散係数;
a, 電極半径; C, 濃度

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れるため、酸化還元電流が増加する。また、基板表面に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。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。

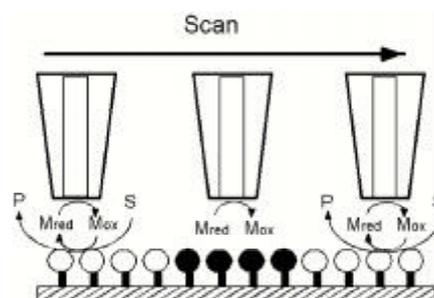


Fig. 1. Principle of SECM

2. SECMを用いた局所酵素反応の評価

SECMのプロブであるマイクロ電極上を酸化還元酵素などの触媒が固定された表面に探針を近接させると、酸化還元電流応答は増加する。この現象を

解析することにより、基板表面で進行する酵素反応の速度論的評価が可能である²⁾。

図2は、フォトリソグラフィーによりline-and-space (幅10 μm, 間隔10 μm) でジアフォラーゼをパターンニングしたガラス基板のSECM像である。ここでは、基板を電子移動媒体(メディエータ)として1.0 mM フェロセニルメタノール(FMA)が溶解した溶液に浸漬し、電極電位0.40 V vs Ag/AgClでFMAの酸化電流をモニターすることによりSECM像を得ている。ジアフォラーゼの基質であるNADHが溶液に存在しない場合には、SECM像には何らパターンが認められない。NADH添加後ではジアフォラーゼが固定化されている部分では、NADHが触媒酸化されるために、FMAの酸化電流が増加し、SECM像にはジアフォラーゼのパターンが観測された。一方、メディエータにCo(phen)₃²⁺を用いた場合には、明確なパターンは得られなかった。この現象は、ジアフォラーゼとメディエータ間の反応速度の差異を反映していると考えられる²⁾。

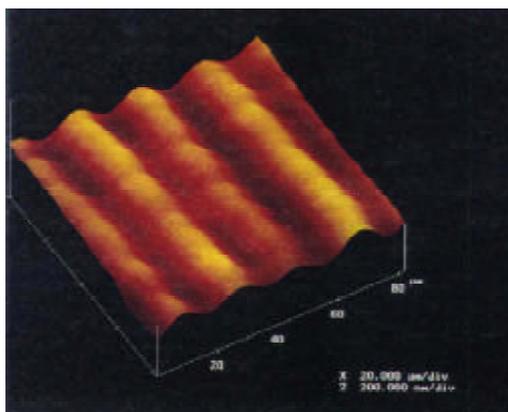


Fig. 2. An SECM image of a line-and-space pattern of diaphorase at a glass substrate. Line width, 10 μm. Space width, 10 μm. Tip radius, 0.75 μm.

3. SECMを利用した酵素パターンの作製

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。そこで、プロブ上で生成した反応活性種(HOBrおよびHOラジカル)の局所化学反応を利用した酵素のパターンニングに関して検討した。

HOBrは非常に強力な酸化剤、臭素化剤でもあ

り、酵素分子を不活性化する。HOBrは25mM KBr/0.1 M KCl水溶液中でBrを電気化学的に酸化することにより発生させることができる。そこで、ジアフォラーゼを全面に単分子固定したガラス基板を溶液中に浸漬し、マイクロ電極(半径:7.5 μmのPt disk, 基板-プロブ距離:7 μm)に1.7 V vs. Ag/AgClの酸化電位を印加することにより、HOBrを局所的に発生させた。生成したHOBrは基板表面に拡散し、近傍の酵素を不活性化する。その後、基板を0.5 mM FMA, 5.0 mM NADH/0.1 M KCl溶液に移し、SECM測定を行った。

図3に得られたSECM像を一例を示した。円形にメディエーション電流が小さい(固定化されたジアフォラーゼの活性が低い)領域が観測された。不活性化のためのチップを基板上で走査すると、任意の形状で酵素が固定化された基板を得ることが可能である³⁾。

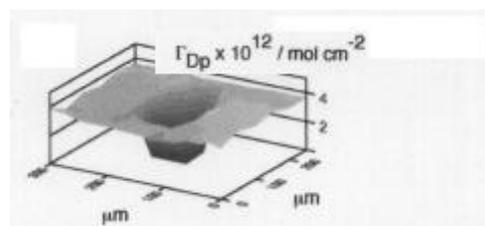


Fig. 3. An SECM image of a diaphorase immobilized substrate with a deactivated circle created by electrogenerated HOBr..

また、HOラジカルは以下に示す反応で発生させた。



この場合には、(3-アミノプロピル)トリエトキシシラン、N-スクシンイミジル6-マレイミドカプロレート(EMCS)、あるいはスルホスクシンイミジルピリジルジチオプロピオンアミドヘキサノエート(Sulfo-LC-SPDP)により活性化した基板を使用した。活性化処理したガラス基板を、FeCl₃/2.0 M H₂O₂/0.05 M H₂SO₄溶液に浸漬し、半径1.2 μmのPtマイクロディスク電極を用い、電極-基板間の距離を5 μm以下に近接させ、電極電位0.0 V vs. Ag/AgCl、走査速度15 μm/sで30 μm間隔に電極を走査した。その後、よく洗浄した後、ジアフォラーゼ溶液で処理することにより、酵素パターン化基板を得た。次いで、この基板を0.5 mM FMA/5.0 mM NADH/0.1 M KCl溶液に移し、電極電位0.4 V vs. Ag/AgClにおいて、FMA

の酸化電流および固定化ジアフォラーゼを介する触媒酸化電流をモニターし、SECM 像を得た。

図 4 にジアフォラーゼをパターニングした基板 (アミノ基で活性化) の SECM 像を示した。30 μm 間隔に線幅 10 μm のジアフォラーゼ濃度の低い領域が観測された。HO ラジカルは非常に反応性が高く、基板表面のアルキルアミノ基を破壊したためこの領域ではジアフォラーゼが固定化が起らなかったものと考えられる。

また、SECM の駆動系に生体試料が充填された

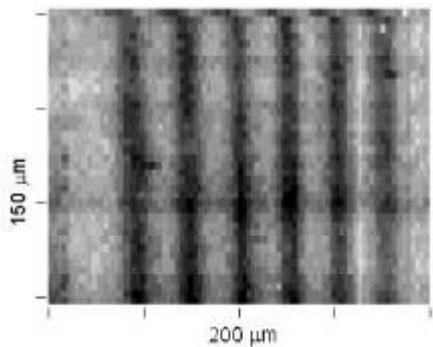


Fig. 4. An SECM image of a line-and-space pattern of diaphorase created by electrogenerated HO.

キャピラリーを用いたパターンニングについても検討した。この場合も、ガラス基板を (3-アミノプロピル)トリエトキシシラン、グルタルアルデヒド溶液の順に浸漬し、表面を活性化した。次いで、ジアフォラーゼ溶液を充填したガラスキャピラリーでガラス基板上を走査することにより、ジアフォラーゼマイクロパターンを作製した。得られた基板を SECM で観測したところ、ジアフォラーゼ固定化ラインが明瞭に観察された。

4. SECM/ELISA システムによる生体タンパク質の極微量・多項目センシング

上記の局所酵素反応検出系を、抗原・抗体反応と組み合わせた SECM-ELISA システムへと展開した。測定原理を図 5 に示す。本測定では、ペルオキシダーゼ (HRP) を標識した抗体を利用し、サンドイッチ法で抗原の検出を行った⁴⁾。HRP は H_2O_2 によるメデイエーター分子 (FMA) の酸化を触媒する。従って、酵素反応により生成した FMA^+ をマイクロ電極で検出することにより、局所領域の HRP つまり CEA 分子を捉えることができる。

図 6 に、CEA 抗原をサンドイッチ法によりスポット固定した基板の SECM 像を示した。測定では、プローブ電極 - 基板間の距離を 10 μm に保ち、基板上を 14.6 $\mu\text{m/s}$ で走査した。表面に固定された HRP の

触媒作用により生成した FMA^+ の還元電流ピーク (白色の部分) が 100 μm 間隔で観測され、CEA 抗原の所在を SECM の電気化学応答として検出可能であることが示された。この還元電流のピークは、固定された CEA 抗原量に依存し、 10^4 分子/スポットでも CEA 抗原を検出できることが明らかとなった。

また、多項目分析に関する検討も行った。5) フォトファブ리케이션によって凸凹部を作製した基板の凸部分に、異なる抗体をマイクロキャピラリーを用いてスポットした。基板をよく洗浄した後、抗原を含む試料溶液、次いでペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗体混合溶液に浸漬し、その後よく洗浄し測定に供した。図 7 に、1.0 mM FMA 溶液中での基板の SECM 像の一例を示した。この場合には、2 個の凸部がある基

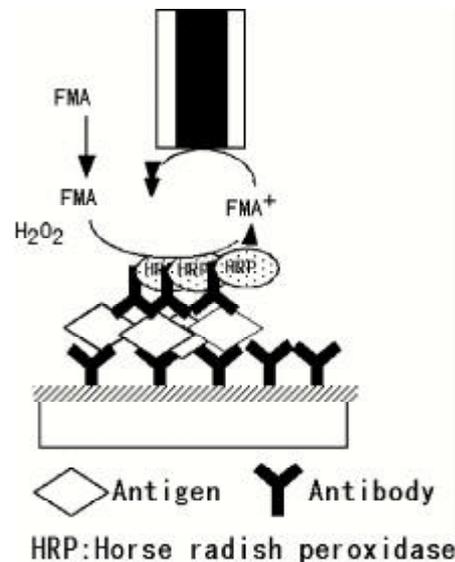


Fig. 5. SECM/ELISA system for trace analysis of antigen.

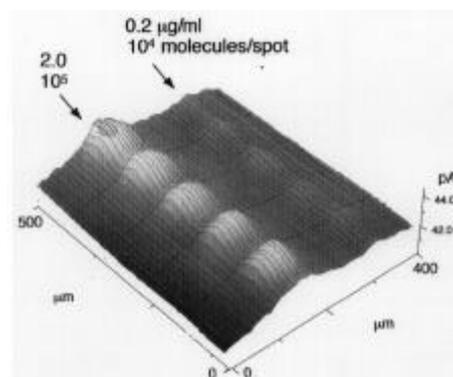


Fig. 6. An SECM image of CEA-anti CEA spots at a glass substrate. CEA molecules in a spot, left 1×10^5 , right 1×10^4 .

板を使用し、また抗原として human chorionic gonadotropin (hCG)と human placental lactogen (hPL)を用いた。探針電位を 400 mV vs Ag/AgCl に設定した場合には、基板表面の凹凸に起因する FMA の酸化電流の二次元

プロファイルが得られた。図 8 B および C は、それぞれ、hCG および hPL 試料溶液で処理した基板の SECM 像である。この場合、測定溶液に 0.5 mM H₂O₂ を添加し、電位は 50 mV vs Ag / AgCl に保持した。それぞれ、対応する抗体が固定化された凸部のみで顕著な還元電流の増加が観察された。

これは、この領域で抗原-HRP 標識抗体複合体が生成し、HRP が H₂O₂ による FMA の酸化を触媒することにより FMA⁺ が生成したことを示している。従って、FMA⁺ の還元電流を画像化することにより、抗原の所在を特定し、さらに定量することができる。異なる抗体が固定された凸部を多くすることによって、極微量の試料中 (数 μl) の数種の抗原を迅速に定量することも可能である。

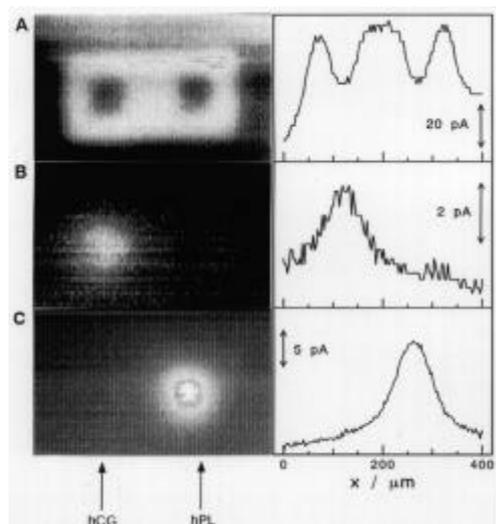


Fig. 7. SECM images of the substrates for dual immunosay. Potential; A 0.40 V, B and C 0.05 V vs Ag/AgCl. Sample solution; B hCG, C hPL.

5. SECM を用いた生体膜の機能評価

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)の機能評価にはSECM やそのファミリーである走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)を用いた計測は極めて有効である。

生体膜は選択的な物質透過膜としても機能もしており、その機能を適切に評価することは、生命現象を理解する上で極めて重要である。被透過物質が脂溶性である場合には、膜そのものの透過は極めて速い。しかし、膜の両側に溶液が攪拌されない領域(つまり拡散層)が存在し、拡散層を通過するのに時間を要するため、真の膜透過係数を決定することは困難であった。このような場合でも、マイクロ電極を拡散層内に挿入し、膜の反対側から透過してきた物質を電極反応により捉えることにより、膜透過係数を決定することができる⁶⁾。

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、マイクロ電極を用いたセンシングシステムの大きな長特である。我々は、SECMの探針(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。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8)。その結果 Fe(CN)₆⁴⁻/Fe(CN)₆³⁻の膜透過係数(Pm)は10⁻⁴ cm/s以下、Co(Phen)₃²⁺ではPm=1x10⁻³ cm/s、フェロセニルメタノールではPm=5x10⁻³ cm/s、ヒドロキノンやキノンはPm>10⁻² 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。

小さな無機イオン類もまた生命活動を維持するために必須であるが、無機イオンの膜透過は通常膜中に存在するタンパク質であるイオンチャンネルを介して行われる。膜局所領域におけるイオンチャンネルのイオン選択性もSECMにより評価することが可能である。SECMの探針であるマイクロ電極を膜電位依存性イオ

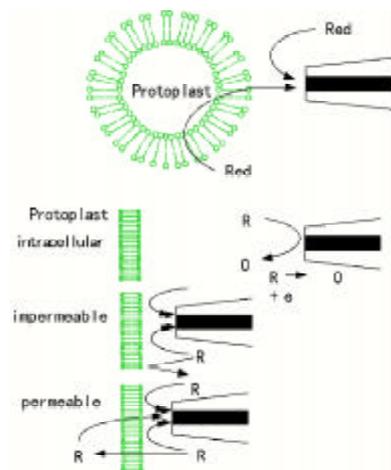


Fig. 8. Characterization of membrane permeation by SECM.

ンチャンネルが埋めこまれたBLMに近接させ、膜電位を印加した際に、イオンチャンネルを通過したレドックスイオンをマイクロ電極でアンペロメトリックに計測することにより、イオン透過性を評価できる。抗生物質の一種であるアラメシチンが形成するイオンチャンネルを介した各種酸化還元イオン種の移動過程に関して検討したところ、アニオンに比べカチオンはチャンネルを通過しやすいことが明らかとなった⁷⁾。

SECMは非レドックス種の膜透過現象の解析に用いることはできないが、SECMのファミリーである走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(Scanning, Ionic Conductance Microscopy, SICM)を用いるとK⁺やNa⁺チャンネル分布の観察できる。SICMでは、電解質の充満したガラスキャピラリー電極を探針とし、イオン電流を計測する。このSICMの探針であるガラス電極先端をアラメシチンを組み込んだ脂質二分子膜に接触させた状態で走査することにより、イオンチャンネルの開閉に基づくイオン電流応答を画像化した。応答は膜電位の極性および大きさに依存し、アラメシチンチャンネルは電位依存性であることを示した。この手法を用いることにより、脂質二分子膜上のチャンネル分布を観察できる。

6. 単一細胞の機能評価

ディスクタイプのウルトラマイクロ電極を用いると、個々の細胞機能を評価することができる。例えば、電子移動メディエーター共存下で、細胞極近傍で酸化還元電流を計測すると、細胞内の呼吸や光合成に関する情報を得ることが可能である(図9)。

また、細胞内にウルトラマイクロ電極を挿入して酸素還元電流を計測することにより、細胞内酸素濃度を決定できる。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したところ、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た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。例えば、25 klxを照射した場合にはハネモプロト

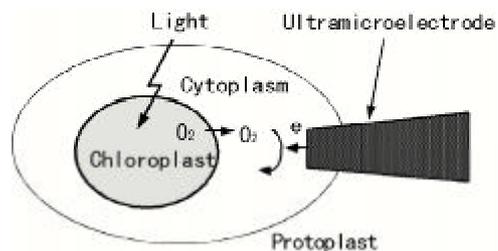


Fig. 9. Intracellular measurements by SECM.

プラストから 5×10^{-13} mol/s の速度で酸素が発生した。一方、定常酸素還元電流値から、暗反応律速の場合の酸素発生速度は 1×10^{-13} mol/s であることが示された。この種のウルトラ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(1 μM程度)加えると、酸素発生パターンは劇的に変化する。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⁾。細胞は極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。

前述したように、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細胞内の光合成系電子伝達鎖から電子を奪い取ることができる。そこで、細胞極近傍にマイクロ電極を設置し、溶液中にキノンが存在する場合の、光照射、消光に伴う電流応答(0.50 V vs. Ag/AgCl)を測定した。酸化電流は光照射により増加し、消光すると減少した。この現象は、光照射により細胞内でキノンが還元されヒドロキノンが生成したことを示しており、キノンが光合成電子伝達系の電子受容体として機能していることがわかる。この光応答は、キノン濃度が0.5 mM以上の場合にはほぼ一定となり、細胞近傍でのヒドロキノン濃度は0.038 mMであった。この結果から1個のプロトプラストが放出するヒドロキノンは 3.0×10^{-14} mol / sec と求められた。この光応答は、光合成阻害剤であるDCMUを添加すると小さくなった。

また、マイクロ電極上で誘起される局所誘電泳動現象を利用すると、細胞などの生体物質の捕捉やパターンニングなどの細胞操作を行うことも可能である¹⁰⁾。組織化されたマイクロ電極システムを用いると、生体物質のより高度なセンシングシステムへと展開できるものと考えている。

文献

- 1) R. C. Engstrom, C. M. Pharr, Anal. Chem., 1989, 61, 1099A; A. J. Bard, F. -R, Fan, J. Kwak, O. Lev. Anal. Chem., 1989, 61, 132.
- 2) H. Yamada, H. Shiku, T. Matsue, I. Uchida, Bioelectrochem. Bioenerg., 1994, 33, 91.

- 3) H. Shiku, T. Takeda, H. Yamada, T. Matsue, I. Uchida, *Anal. Chem.*, 1995, 67, 312.
- 4) H. Shiku, T. Matsue, I. Uchida, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 1278.
- 5) H. Shiku, Y. Hara, T. Matsue, I. Uchida, T. Yamauchi, *J. Electroanal. Chem.*, in press.
- 6) H. Yamada, T. Matsue, I. Uchida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, 180, 1330.
- 7) T. Matsue, H. Shiku, H. Yamada, I. Uchida, *J. Phys. Chem.*, 1994, 98, 11001.
- 8) T. Matsue, S. Koike, T. Abe, T. Iyabashi, I. Uchida, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1101, 69.
- 9) T. Matsue, S. Koike, I. Uchida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 197, 1283.
- 10) 末永智一, *電気化学*, 1994, 62, 1; 末永智一, *バイオサイエンスとインダストリー*, 1995, 53, 27; T. Matsue, N. Matsumoto, S. Koike, I. Uchida, *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, 1157, 332; N. Matsumoto, T. Matsue, I. Uchida, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1994, 34, 199; 松本伯夫, 齋木博, 末永智一, 内田勇, *IEEE Japan*, 1996, 116. 184.