

要 旨

微小パターン電極を用いて細胞に電気刺激を与え、細胞膜電位に及ぼす影響について検討した。表面を絶縁した微小パターン電極上にマウス腹腔マクロファージを播種し、電極に電圧を印加した際の細胞膜電位を膜電位感受性蛍光色素を用いて測定した。その結果、電圧の印加により細胞膜電位は正の方向にシフトするが、印加電圧が± 20mV ~ ± 200mV の範囲では電圧の大きさに依存しないことが示唆された。

1・緒言

近年、細胞の融合や活性化など細胞レベルでの研究が数多くおこなわれており、細胞が有する機能を誘導・制御することが可能になれば、さまざまな分野での幅広い応用が期待できる。

本研究では、細胞膜電位が多くの細胞機能に関係することに着目し、細胞機能の誘導・制御を目的として、マクロファージに電気刺激を与えた際の膜電位変化を膜電位感受性蛍光色素を用いて調べた。

2・実験方法

微小パターン電極（図1：セイコー電子工業）はφ 60mm のガラスシャーレに固定して使用した。パターン電極部は幅 4 μ m、間隔 3 μ m、高さ 1 μ m で、2本の櫛を噛み合わせたような構造をしており、電極表面上には厚さ 1 μ m の p-SiN の絶縁膜が蒸着されている。

パターン電極部に 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml に調整したマクロファージの細胞浮遊液を 100 μ l 滴下した。細胞を電極に接着させるために 30 分間放置した後にリン酸緩衝液を 15ml 注入し、膜電位感受性蛍光色素（DiBaCa<sub>4</sub> (3)<sup>-</sup>）を 30 μ l 滴下した。この色素は毒性が少ないが、反応するまでに 20 分程度かかる。また、膜透過性の陰イオンで、膜電位にしたがって細胞に取り込まれるので、蛍光強度が増大するほど膜電位は正の方向にシフトする。

電極には、蛍光色素注入 20 分後に 0mV ~ ± 400 mV の電圧を印加し、30 分後に解除した。蛍光強度の測定は電圧印加前、電圧印加 20 分後、30 分後、電圧解除 20 分後、30 分後の計 5 回おこなった（図 2）。

蛍光強度の測定には共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡（日本 BIO RAD）を使用し、顕微鏡による蛍光画像は、画像処理装置（MRC-500：日本 BIO RAD）

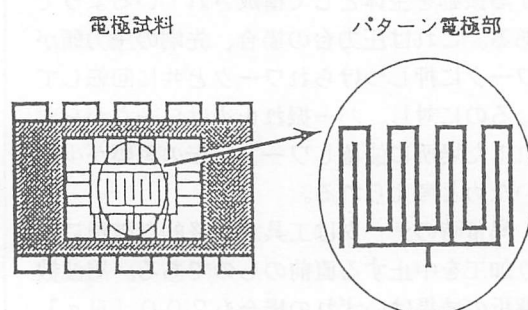


図1 微小パターン電極の概略図

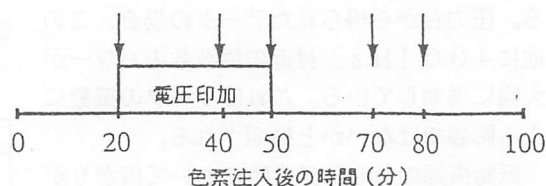


図2 蛍光強度の測定(↑)

によって処理した。蛍光強度の平均（平均輝度）は処理画像より求められるが、各実験において電極上に存在する細胞数が異なるため、単純に比較をおこなうのは困難である。

そこで、(1)式のように電圧印加前とそれ以降の平均輝度の差を蛍光画像中に存在する細胞数（視野細胞数）で割って規格化し、比較をおこなった。以後、これを規格輝度と呼ぶ。

$$SLI = (LI - LI_c) / NC \quad (1)$$

SLI:規格輝度

LI:平均輝度

LI<sub>c</sub>:平均輝度（電圧印加前）

NC:視野細胞数

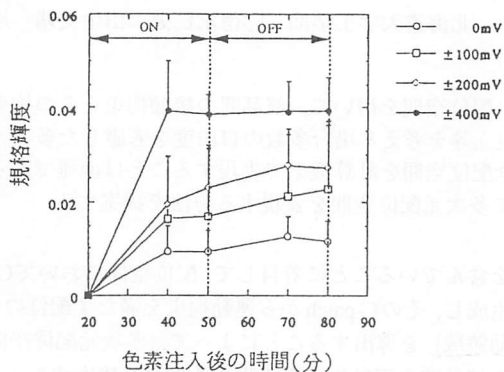


図3 電圧印加による蛍光強度の変化 (0mV~±400mV)

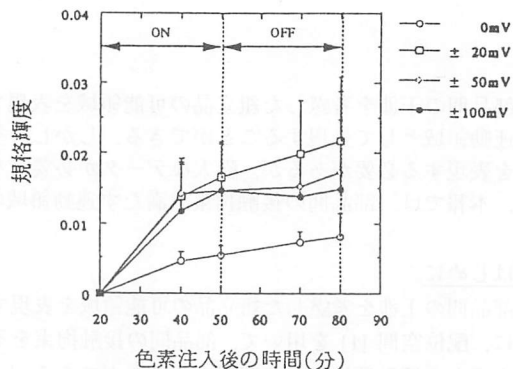


図4 電圧印加による蛍光強度の変化 (0mV~±100mV)

### 3・実験結果

図3に、0mV~±400mVの電圧を印加したときの時間と規格輝度との関係を示す。電圧印加前から電圧印加20分後にかけて、それぞれの場合において規格輝度が増加したが、その後はあまり変化がみられなかった。また、±100mV~±400mVでは0mVより増加量が大きく、±400mVと±200mV、±400mVと±100mVの間にはそれぞれの場合において有意差が見られた。

図4に、0mV~±100mVの電圧を印加したときの時間と規格輝度との関係を示す。電圧印加前から電圧印加20分後にかけて、それぞれの場合において規格輝度が増加したが、その後はあまり変化がみられなかった。±20mV~±100mVでは0mVとの間には有意差が見られたが、各印加電圧間には有意差は見られなかった。

また、図3、図4より±20mV~±200mVの範囲では電圧の大きさは蛍光強度に影響を与えない可能性があるといえる。

### 4・考察

本研究の実験系では、電極への電圧印加直後には絶縁膜より上部の電解質溶液や細胞に対し、パルス刺激に相当する分極電流が流れている可能性がある。

500mV/cm以下のパルス電圧を用いると、細胞内部の代謝系に影響を与えるという報告がされており<sup>1)~3)</sup>、これらの現象は、細胞膜のイオンチャンネルが影響を受けて細胞内外のイオン透過性が変化したために起こると考えられている<sup>4)</sup>。イオンチャンネルの中には、ある強さの電場を境にしてall or noneの現象を示す電位依存性のイオンチャンネルが存在する<sup>5)</sup>。

これらのことより、電極への電圧印加直後のパルス刺激がイオンチャンネルに影響を与え、all or noneの現象を起こしたと考えると、±20mV~±200mVの範囲では電圧の大きさが蛍光強度に影響を与えない可能性も考えられる。

### 5・まとめ

本研究により、次のような結果が得られた。

- 1) 電極間に±20mV~±400mVの電圧を印加した場合、マクロファージの細胞膜電位は正の方向にシフトする。
- 2) 印加電圧が±20mV~±200mVの範囲では電圧の大きさは蛍光強度に影響を与えない。

本研究より、微小パターン電極で細胞に電気刺激を与えると、細胞膜電位が変化する可能性があることが示唆され、微小パターン電極は小型で低電圧の細胞機能の誘導・制御装置として有望であるといえる。また、マクロファージに対して選択的に免疫作用の促進・抑制が可能となれば、体内埋込型の治療器としての利用も期待できる。

### 参考文献

- 1) B.F.Sisken and J.E.Sisken: Trans.Biol.Repair Growth Soc, 4 22~ (1984)
- 2) E.K.Onuma: J.Cell Biol, 106 2067~ (1988)
- 3) H.Grosse, E.Bauer and H.Berg: Bioelectrochem. Bioenerg, 20 279~ (1988)
- 4) 小島淳一郎: 動物細胞に及ぼす電気効果とその応用, 電気化学 59 194~ (1991)
- 5) 中村桂子, 松原謙一: 細胞の分子生物学 第2版, 教育社 (1991)