

# 薄膜形光アドレス電極の開発とその応用

## Development and application of thin-film light-addressable electrodes

硯川潤

Jun SUZURIKAWA

指導教員 高橋宏知 講師

(Professor, Hirokazu TAKAHASHI)

**Keywords:** neuron, electrical stimulation, photoconductor, cell culture, calcium imaging

### 1. はじめに

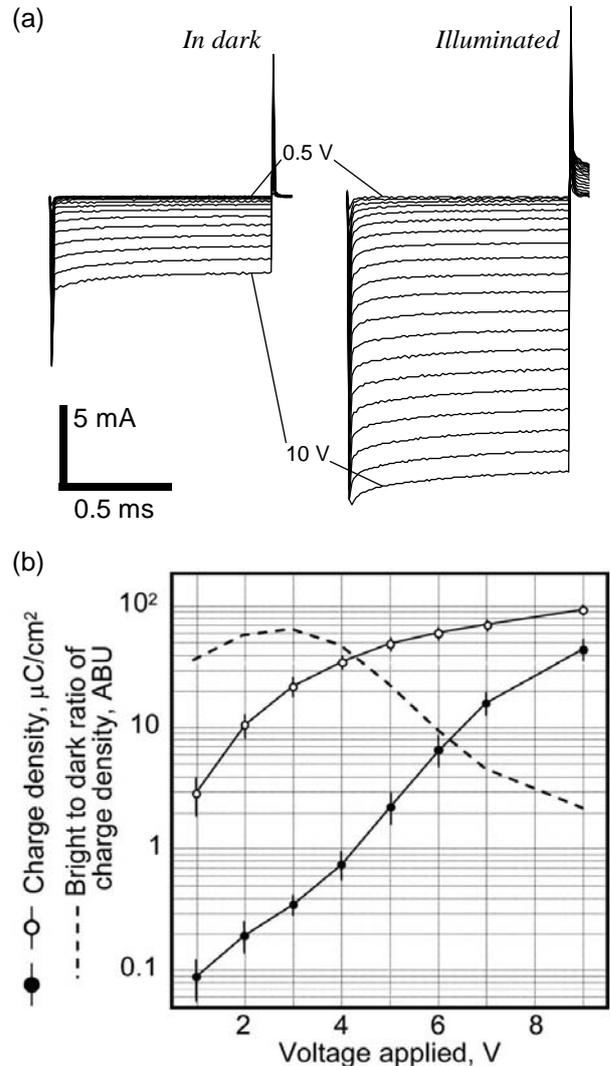
微小電極を用いた電気化学的な生体計測・操作は、電極 - 溶液界面での電子移動を伴う「酸化還元形」と、電子移動を伴わない「容量形」とに大別できる。光導電性半導体への光照射で仮想的に微小電極を生成する「光アドレス法」では、主に後者への応用が試みられてきた。しかし、酸化還元形への応用は、i) バルク半導体中での電荷担体の側方拡散が大きくなる、ii) 半導体表面の劣化が顕著になる、などの理由から発展していない[1]。本研究では、これらの問題を解決するために、図 1 に示したような、薄膜型光アドレス電極を提案・開発・試用する。まず、保護膜の有無や電気伝導率が、電極の光電特性に与える影響を網羅的に調査・検討し、薄膜形光アドレス電極の設計指針を構築する。さらに、神経細胞の電気刺激や、微小 pH 勾配生成への応用を通じて、同電極の有用性を実証する。

### 2. 薄膜形光アドレス電極の設計指針の構築

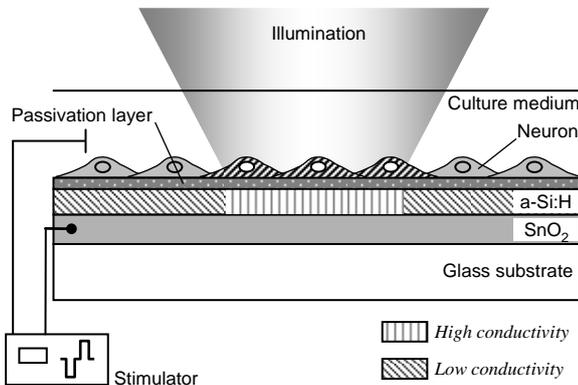
本節では、様々な薄膜構成を有する光アドレス電極の性能を評価・比較することで、同電極の設計指針を構築する。酸化還元形光アドレス電極の性能は、電圧印加で得られる明電流の大きさに加えて、光照射部外の暗電流をどの程度抑制できているか、という視点で議論されるべきである。そこで、電圧パルスの印加で明暗部を通過する単位面積当たりの電荷量(明/暗電荷密度)を測定し、一定の暗電荷密度または明暗電荷密度比を保って得られる最大明電荷密度を性能の指標とした。薄膜半導体のモデル材料には、水素化アモルファスシリコン(a-Si:H)を用いた。a-Si:H膜の膜厚が電極の光電特性に与える影響を調べるために、厚さがそれぞれ50, 150, 1000 nmのa-Si:H膜を用いた。また、保護膜の抵抗率と電極特性との関係を調べるために、エポキシ系ポリマーをバインダ材料として導電性のアンチモン酸亜鉛ゾル微粒子を分散させた ZADE

(Zinc antimonate-dispersed epoxy) 膜とポリ-3, 4-エチレンジオキシチオフェン (PEDT) 薄膜を保護膜に用いた電極、保護膜を持たない電極をそれぞれ製作した。

図 2 に、定電圧パルスを電圧に印加した際の明暗電流波形と、同波形を時間積分して得られた電荷密度とその明暗比をそれぞれ示す。光照射が無い場合でも、5 V 以上では電流が非線形に立ち上がり、明暗電荷密度



**Fig. 2** Dark and bright currents injected by voltage application. (a) Current waveforms. Stimulus pulses of 0.5 – 10 V with a duration of 1ms were applied with and without illumination. (b) Charge density injected by the voltage-controlled pulses and the bright-to-dark ratios against the test voltage. The mean and standard deviation are given from four test electrodes.

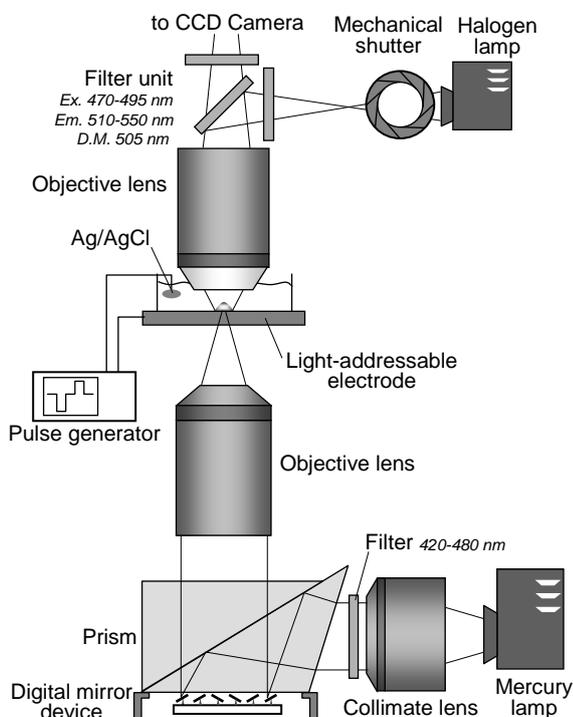


**Fig. 1** Schematic diagram of the light addressable electrode with low conductive passivation layer.

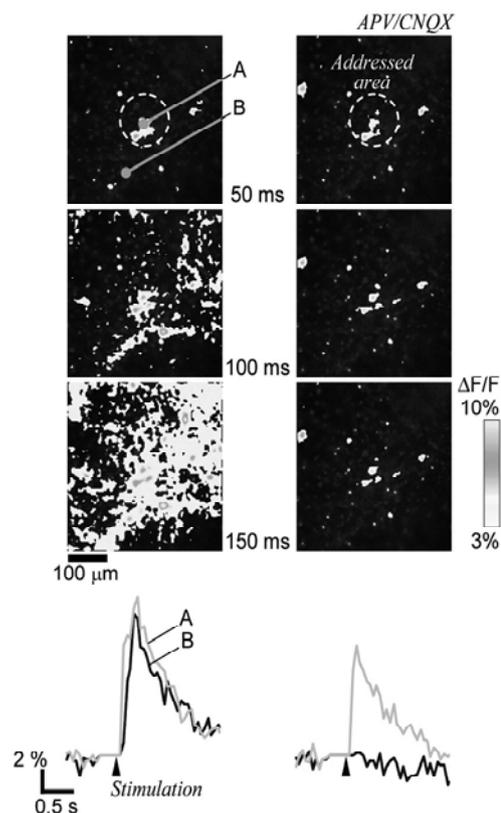
比が減少することがわかる。これは、薄膜半導体中で電界強度が著しく上昇して、アバランシェ効果による絶縁破壊が生じたためと考える。表1には、試作した9種類の電極について絶対的な絶縁性能を調べるために、暗電荷密度が $1 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 以下という条件下での最大明電荷密度を集計して示した。ZADE膜を有する電極では、a-Si:H膜の厚い電極ほど暗電荷密度が低く抑えられ、最大明電荷密度は大きくなった。一方、PEDT膜を有する電極では、明暗電荷密度の値に差が開き難く、a-Si:Hの膜厚によらず最大電荷密度が小さかった。以上の結果から、電極性能の向上には、アバランシェ効果による暗電荷密度の上昇を抑えることが重要であり、光導電層の厚膜化や低導電性保護膜の導入が有用であることがわかった。このようにして暗電荷密度を抑えることは、電極のインピーダンスを高めることに直結するため、明電荷密度の減少にもつながる。しかし、印加電圧に対して線形に上昇する明電荷密度に対して、暗電荷密度は非線形な立ち上がりを示すため、暗電荷密度を抑えても最大明電荷密度には影響を与えなかった。すなわち、電極のインピーダンスが上がっても、

**Table 1** Maximum bright charge densities and the applied voltages ( $[\mu\text{C}/\text{cm}^2] / [\text{V}]$ ) of each electrode.

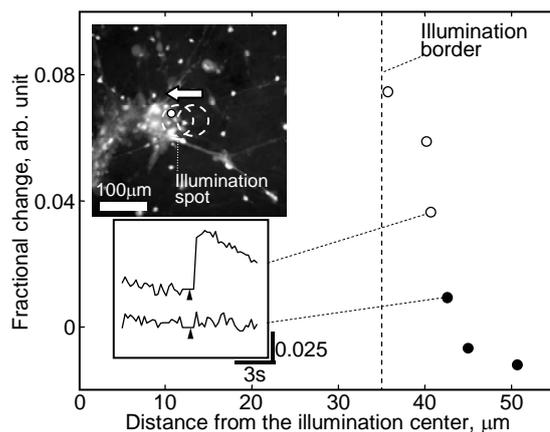
	Dark charge density <math> < 1 \mu\text{C}/\text{cm}^2 </math>		
	No coating	PEDT	ZADE
50 nm	4 / 1.2	9 / 1.6	16 / 3.6
150 nm	14 / 2.9	4 / 0.9	44 / 5.4
1000 nm	>160 / >10	9 / 1.9	>130 / >10



**Fig. 3** Optical configuration;  $\text{Ca}^{2+}$  imaging from above and light-addressed stimulation from underneath.



**Fig. 4** Neuronal activities evoked by light-addressed stimulation. Response patterns at indicated post-stimulus latency. Fractional changes of fluorescence intensities above 3% are color-coded and imposed on the raw fluorescence images. Fluorescence transients at indicated loci are also shown: Left column, activity without synaptic blockage; right column, activity under synaptic blockade (APV/CNQX). The experiment was carried out at 15 day in vitro (15 DIV).



**Fig. 5** Spatial resolution of the light-addressed stimulation. Dashed circles and a white dot in the upper fluorescence image indicate addressing spots and a responsive neuron in a cell aggregation, respectively. Black then white dots in the main plot indicate non-activation then activation of this cell's  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics as the addressing spot was moved closer towards the cell. The diameter of illumination spot was  $70 \mu\text{m}$ .

一定の光感度を保って印加できる電圧の上限も上がるため、電極の性能は低下しない。また、各層の伝導率・膜厚は、「膜厚方向への伝導率」を考慮することで、適切に設定できることがわかった。これらの知見は、薄膜半導体を二酸化チタン焼結膜に置き換えても確認できたため、材料に依存しない一般化された設計指針を構築できたと考える。

### 3. 培養神経細胞への光アドレス刺激と同時蛍光計測系の開発

培養神経細胞を用いた脳機能研究では、従来、電気生理計測・刺激のために微小多点電極アレイ (Microelectrode array, MEA) が用いられてきた[2]。しかし、MEA を用いた計測・刺激の分解能は、微小電極の数や密度に制約を受ける。本章では、薄膜形光アドレス電極の有用性を実証するために、同電極を用いた刺激・計測系の構築を試みる。

図3に構築した実験系の概要を示す。従来の光アドレス刺激に用いられていた単結晶シリコンとは異なり、半透明の薄膜形電極では、基板の上下方双方からの光学的アプローチが可能である。よって、アドレス光照射のための光学系と観察のための光学系を、完全に分離して設置できる。アドレス光照射では、水銀ランプを光源として、コリメートレンズからの平行光を digital micromirror device (DMD; Texas Instruments, Discovery 1100) に照射し、所望の光パターンを得た。DMD への入射光路と反射面からの出射光路は、全反射プリズム (total internal reflection prism; TIR prism) を用いて分離した。光パターンは 40 倍の対物レンズを通して、電極基板に縮小投影される。アドレス光は、計測系への干渉を防ぐために、420 - 480 nm のバンドパスフィルタを通した。本照射系で得られる光強度はおよそ  $800 \text{ mW/cm}^2$  である。カルシウムイメージングには、正立型の蛍光顕微鏡を用いた。蛍光像は、冷却 CCD カメラを用いて、 $500 \times 500 \text{ pixel}$  の解像度で取得した。励起光は、アドレス光への干渉を防ぐために、刺激電圧の印加と同時に電子制御機械式シャッターで遮蔽した。

図4に、興奮性シナプス伝達阻害時と無阻害時に、光アドレス刺激を与えた際の反応パターンをそれぞれ示す。無阻害時には、アドレス光照射部から周辺に反応が伝播したのに対して、伝達阻害時には、賦活領域はアドレス光照射部のみに局在した。一部、照射部外にも反応を示す細胞が存在しているが、これらの細胞は軸索や樹状突起を介して刺激されたと考える。この結果は、本節で構築した実験系により、局所的な光アドレス刺激と、同時カルシウムイメージングが可能であることを示している。

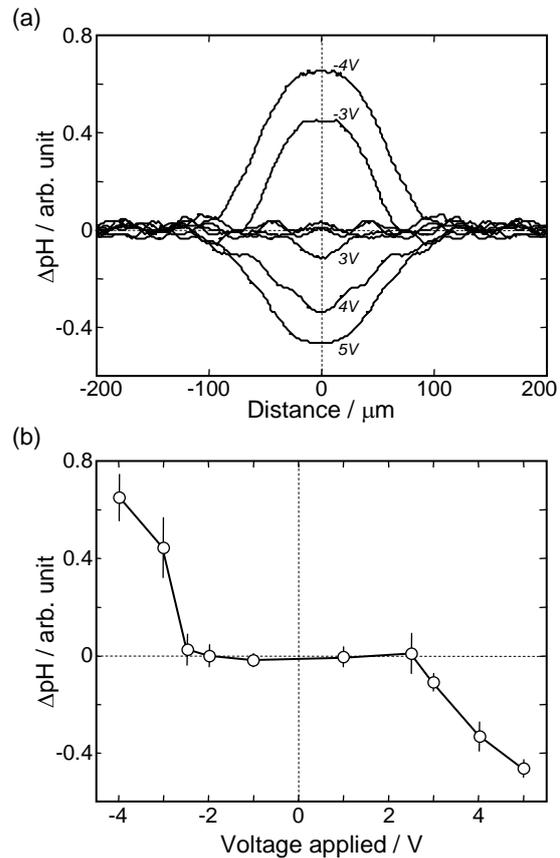
神経細胞が軸索を伸長している範囲を正確に知ることが困難なため、細胞が凝集した領域を用いて光アドレス刺激の分解能を調べた。図5に計測領域を示す。凝集体の周囲には神経線維に覆われていない領域がある場合が多く、逆行性刺激の影響を排除し易い。図5は、凝集体内部の神経細胞の応答を、光照射部からの距離に対して示している。横軸は神経細胞と光照射部中心との距離を、縦軸は光アドレス刺激後 400 ms の蛍

光強度変化率をそれぞれ表す。刺激前 5 秒間の平均蛍光強度から  $3 \sigma$  以上の強度変化を発火とみなした。光照射部のすぐ外側で、急峻に刺激への反応が消滅したことがわかる。光照射部のおよそ  $10 \mu\text{m}$  外側で刺激強度が閾値を下回ったことから、単一細胞レベルの空間分解能を達成できたと考える。

### 4. 光アドレス電極上での電気分解を利用した微小 pH 勾配の生成

本節では、薄膜形光アドレス電極上での酸化還元反応を、微小 pH 勾配の生成に利用することを試みる。電気分解による pH 勾配生成に用いられてきた微小金属電極を[3]、光照射でのパターンニングが可能な陽極・陰極で代替する。前章で構築した実験系を用い、電極基板上方からの蛍光イメージングで、光照射部周辺の pH 変化を計測した。

まず、光陽極・陰極での電気分解と、それによる pH 勾配生成が可能であることを確認した。図6に、直径  $32 \mu\text{m}$  の光スポットの照射下で、持続時間が 400 ms で電圧が



**Fig. 6** Light-addressed anodic and cathodic electrolysis. (a) Cross section profiles of generated pH gradients. An illumination spot of  $32 \mu\text{m}$  in diameter was used for addressing with a voltage-controlled 400-ms duration pulse of  $-4 - 5 \text{ V}$ . Across the central  $24\text{-}\mu\text{m}$  region, all single-pixel-width profiles were averaged with their line-symmetrically-reversed profiles for smoothing. (b) Peak  $\Delta\text{pH}$  against the pulse voltages.  $\Delta\text{pH}$  values across the central  $12\text{-}\mu\text{m}$  range were averaged and shown with error bars indicating standard deviations for three trials.

-4 ~ 5 V のパルス電圧を印加したときのイメージング結果を示す。図 6(a)に示したように、光陽極と陰極の周辺で、pH の下降と上昇がそれぞれ計測された。陽極と陰極でそれぞれ生じる水素イオンと水酸化物イオンによる pH 変化であると考えられる。印加電圧が -2.5 ~ 2.5 V の範囲では pH 変化が観察されなかった。電圧値が 3 V 以上では、陽極および陰極領域の双方で、勾配のピーク値は印加電圧値と相関関係を示した。図 6(b)には、印加電圧と  $\Delta\text{pH}$  ピーク値の関係性を示す。印加電圧値 2.5 V が PBS の電気分解が開始される閾値となっていることがわかる。次に、光陽陰極でそれぞれ生成される pH 勾配を連結することで、より広範囲の勾配を生成することを試みた。図 7(a)に示したように、120  $\mu\text{m}$  の間隔を空けて、光陰極と陽極での電気分解を逐次的に行った。図 7(b)に、両極間に生成された勾配の空間分布を示す。二種類の勾配が両極の中心で滑らかに接続され、 $\Delta\text{pH}$  が 1 に達する勾配が形成された。

以上より、変形・切換が可能で光陽陰極は、i) 電極形状に依存した勾配プロファイルの変化を容易に評価できる点、ii) 勾配プロファイルの微調整が可能で、iii) 多様な勾配の生成が可能で有用であることがわかった。

## 5. 考察

本研究では、薄膜半導体を光導電層に用いて、酸化還元形の光アドレス電極を開発した。バルク半導体とは異なり、薄膜半導体中では低電圧の印加でも高電界が発生する。この電界が原因で生じる暗電流の抑制が、薄膜形光アドレス電極を設計する上での最重要事項で

ある。これまでも、空間分解能向上を狙った薄膜形電極は開発されてきたが、容量形電位計測への利用が主であった。そのため暗電流の影響は顕在化せず、その抑制を扱った研究も例が無い。暗電流抑制に有用な低導電膜は、電極上での安定した酸化還元反応を可能にする不活性保護膜としての機能も果たす。高分解能・低暗電流・高安定性の全てが達成されたことで、光アドレス法は微小電極法を完全に代替できる強力な手法となった。時空間的に、かつ、*in situ* での制御が可能な仮想電極を用いることで、バイオチップの構造は大きく簡略化できる。例えば、細胞の搬送、接着・培養、剥離、破碎、分子計測という一連の電気化学処理を、一枚の光アドレス電極上で実行することも可能になる。

## 6. おわりに

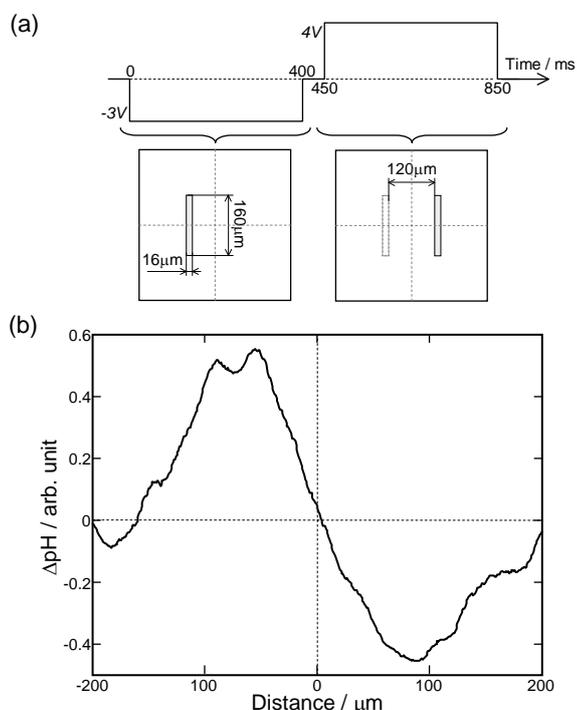
本研究で提案・開発した薄膜形光アドレス電極は、従来のバルク形光アドレス電極と比較して、i) 電荷担体の側方拡散が小さい、ii) 不活性な溶液接触面（導電性防水保護膜や酸化半導体）を有する、iii) 基板両面からの光学的アプローチが可能、という機能的特徴を持つ。第二章では、薄膜半導体を用いることで問題となる暗電荷密度に着目し、酸化還元形電極としての設計指針を構築した。バルク形電極と比較して設計項目が多い薄膜形電極を、一貫して材料横断的に扱える理論を構築できた意義は大きい。第三、四章では、前述した 3 点の特徴がもたらす有用性を、応用的に実証した。その結果、i) 従来のバルク形光アドレス電極よりも高い刺激空間分解能を有する、ii) 長期間の細胞培養や電気分解反応に耐える、iii) アドレス光照射のための光学系に加えて独立した光学系を設けられる、という有用性を確認できた。

## 謝辞

本研究で用いた a-Si:H の成膜は富士電機アドバンステクノロジー株式会社に委託した。ここに深く謝意を表す。

## 参考文献

- [1] Bucher V, Brugger J, Kern D, Kim GM, Schubert M and Nisch W, "Electrical properties of light-addressed sub-mm electrodes fabricated by use of nanostencil-technology.", *Microelectron. Eng.*, **61-62**, 2002, pp. 971-980.
- [2] Jimbo Y; Tateno T and Robinson HP, "Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons.", *Biophys. J.*, **76**, 1999, pp. 670-678.
- [3] Fiedler S; Hagedorn R; Schnelle T; Richter E; Wagner B and Fuhr G, "Diffusional Electrotitration: Generation of pH Gradients over Arrays of Ultramicroelectrodes Detected by Fluorescence.", *Anal. Chem.*, **67**, 1995, pp. 820-828.



**Fig. 7** Generation of steep  $\Delta\text{pH}$  gradient. (a) A time course of voltage pulse application and illumination switching. (b) A generated  $\Delta\text{pH}$  profile.