

マイクロダイアリシスによる細胞外物質濃度の測定

中原 大 一 郎¹⁾・加 藤 武²⁾

(¹⁾浜松医科大学心理学・²⁾横浜市立大学大学院総合理学研究科分子認識部門)

I. は じ め に

1960年代初めに、ホルムアルデヒド蒸気と反応させた生体アミンを蛍光で見ることができるようになった。この技法を用いてモノアミンの脳内分布を調べていた Ungerstedt (スウェーデンのカロリンスカ研究所) は、ニューロンの細胞体や終末だけでなく遠く離れた血管周囲にも多数の蛍光が存在することに気がついた。そこで、彼は腎透析に用いられる細い人工血管を脳に埋めてモノアミンを回収することを思いついたという。1974年に彼らが初めて試みた中空糸状の透析チューブによる組織透析を一般にマイクロダイアリシスと呼んでいる [1]。

生きている動物を用いて細胞外液からさまざまな物質を連続的に回収する技法として最も古いのはプッシュ・プル法である [2]。この方法は幾つかの研究室で今でも使われている。プッ

シュ・プルカニューレは、送液と吸液用の2つのステンレス管からなり、先端のところで灌流系が開放されている (図1)。灌流液の回収率が高く、微量な神経伝達物質の測定に有効と考えられるが、一般に送液速度が速く、組織の剥離によるダメージや感染をおこすなどの欠点がある。そこで、1972年に Delgado (スペインの生理学者) らによってこれを補うための改良がなされた [3]。カニューレの先端に半透膜を張りつけたダイアリトロード (dialyetrode) の考案である。マイクロダイアリシスプローブの登場はその2年後のことになる。図に示すように、ダイアリトロードとマイクロダイアリシスプローブに構造上の大きな違いはない。しかし、前者に比べ、後者は製作が容易であり物質の回収量が大きいという利点がある。その結果、プッシュ・プルカニューレやダイアリトロードに代わって、マイクロダイアリシスプローブが次第

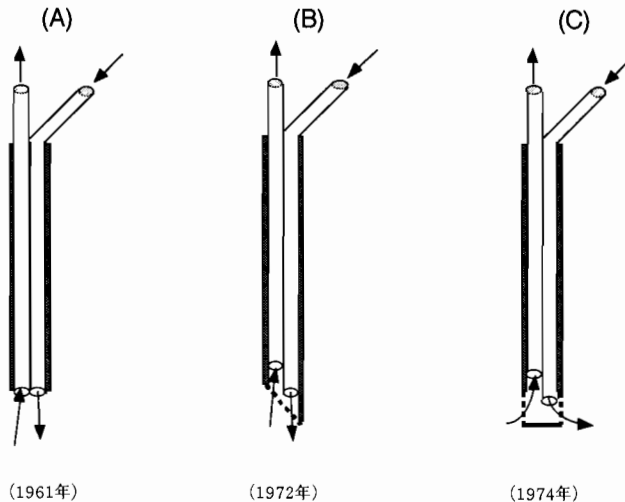


図1. (A): プッシュ・プルカニューレ, (B): ダイアリトロード, (C) マイクロダイアリシスプローブ

に普及するようになった。こうして、現在では、マイクロダイアリシスは神経化学領域における標準的手技の一つに加えられるまでに発展している。これまでにマイクロダイアリシスは、神経伝達物質系に対する各種薬物の作用機構、薬物誘発性行動や記憶・学習行動と神経伝達物質の関係、および虚血、パーキンソン病、てんかんなどのヒトの病気のモデル動物における脳内伝達物質機序の探索、などさまざまな神経科学的研究に応用され、多くの成果を挙げている。

Ⅱ. 原 理

マイクロダイアリシスは、基本的には、中空糸状の透析膜を用いて生体組織の細胞外液に含まれる物質を抽出する技術である。図2のような細い透析チューブ(直径0.2~0.5mm)を特定の脳領域に植え込み、細胞外液と灌流液を半透膜で隔てる。次に、微量注入ポンプを用いて人工脳脊髄液(またはリンゲル液)を透析チューブの中にゆっくりと送り込む。その結果、半透膜の分画分子量より小さい物質は細胞外液あるいは灌流液からそれぞれ濃度勾配の低い方向へ

と拡散していく。マイクロダイアリシスの原理は、この半透膜の性質を利用して、細胞間隙に存在するさまざまな物質を灌流液に回収することである。逆に、薬物を溶かした灌流液を組織内に送り込めば、局所的な微量薬物注入法としても利用できる。

マイクロダイアリシスでは、注入される人工脳脊髄液(もしくはリンゲル液)は膜の内側を灌流することになるので組織と直接接触することはない。したがって、神経などの組織損傷は比較的少なく長時間にわたる試料の採取が可能になる。透析膜の種類によっては大きさや性質の異なる分子が回収される。一般に、低分子量の物質の透析には再生セルロースやセルロースアセテート膜が使用され、神経ペプチド類の透析にはポリアクリロニトリル(PAN)、ポリカーボネート(PC)などが使用される。透析膜はフィルターの役目をしており、分解酵素などの高分子量の物質を通過させない。したがって、回収した伝達物質が灌流液の中で分解されることはない。また、膜を介して得られるサンプルは汚れが少なく精製しなくても分析できる。以上の

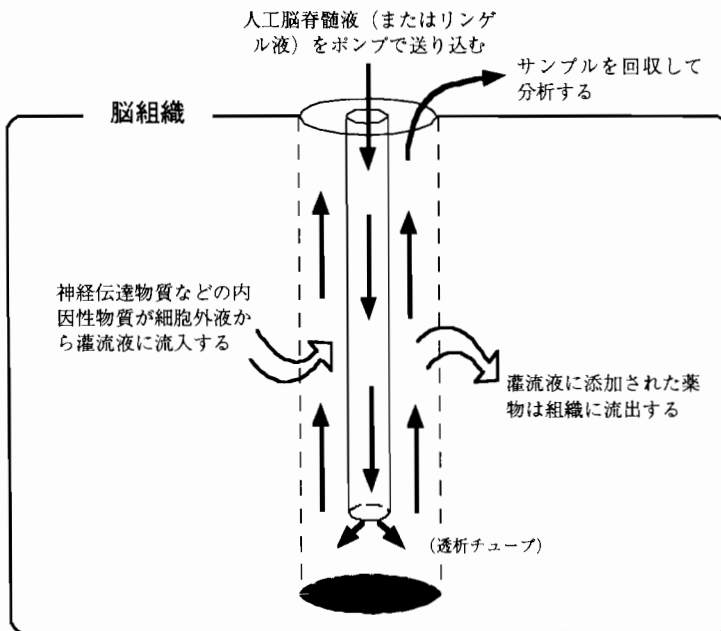


図2. マイクロダイアリシスの原理

ような利点がある反面、伝達物質や各種イオン、その他の物質を絶えず排出することになるので、細胞外液のホメオスタシスを崩す危険がある。これが欠点である。そのため、できる限りゆっくりとした灌流を行ったり、グルコースなどの栄養源を補充した灌流液を使用する研究者もいる。

マイクロダイアリシスによって回収した物質は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ラジオエンザイムアッセイやラジオイムノアッセイ、あるいはエンザイムアッセイなどを用いて分離定量する。どのアッセイを用いるかは測定物質の性質による。ドーパミン、ノルアドレナリンのカテコールアミン類とセロトニンなどの電気化学的活性を有する物質については、電気化学検出器(ECD)を備えたHPLC法により高感度分析が簡便におこなえる。アセチルコリンやアミノ酸などの電気的に不活性な物質でも酸素反応や化学反応により電気化学的に活性な物質に誘導化すればHPLC-ECD法で測定できる。神経ペプチドの分析にはラジオイムノアッセイやエンザイムアッセイを利用する。現在では、ECDや蛍光検出器を組み合わせたHPLC法により、nMのオーダーのモノアミン、アセチルコリンおよびアミノ酸の測定が素人でも簡単にできる。神経ペプチドの細胞外濃度はpMオーダーであり、高感度な抗血清と高い回収率で灌流を行えば測定も可能である[4]。

Ⅲ. 方 法 論

マイクロダイアリシスプローブには、U字型と貫通型とI字型の3種類がある(図3)。I字型の中には慢性実験用の着脱式のプローブも含まれる。Ungerstedtが最初に用いたプローブはU字型である。このプローブは短時間で簡単に作ることができる。しかし、当時のプローブの径は大きかったので、その分組織損傷も大きくなり、小さな脳部位(例えば視床下部)への適用は難しかった。貫通型のプローブは他のプローブに比べ透析範囲が広く、それゆえ物質の回収率(後述)は高い。微量物質の高感度分析が困難であった初期の研究で主に回収量を稼ぐために使われた。このプローブは深部の脳組織には適用しにくい。深部構造にはI字型プローブが使われる。着脱型プローブは、ガイドカニューラを用いることによって、取り外しができる。つまり、手術による損傷から回復させた後に挿入するため、測定したい部位をフレッシュに使用できる。これによってプローブの再使用と長期の行動実験が可能になった。例えば、回転ケージ、トレッドミル、水迷路、記憶課題、オペラント学習などの行動事態におけるマイクロダイアリシスが行われている。

慢性実験を行う際、感染に充分注意する必要がある。以前、脳には免疫反応がないと考えら

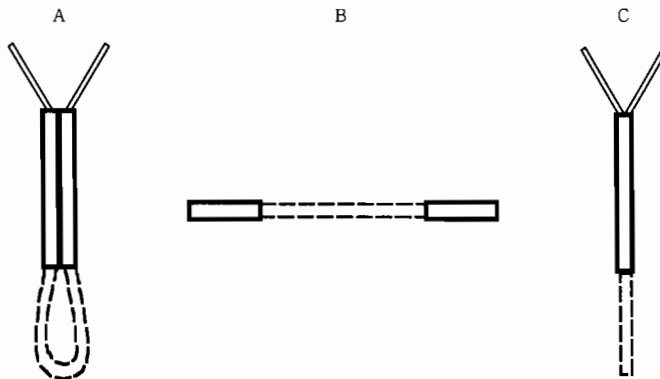


図3. 3種類のプローブ
A: U字型, B: 貫通型, C: I字型

れていたが、グリア細胞による反応が明らかとなっており、利用するプローブは必ず消毒済みであるか、消毒可能なプローブをエチレンガスなどで消毒する必要がある。サルなどの実験では繰り返し実験したいことがある。しかし、同じ脳部位に何回もプローブを挿入することは、組織を破壊するため、行ってはならない。

いずれのプローブも、慣れれば、誰にでも容易に作製できる。現在最もよく使われるプローブはI字型である。その作製法を簡潔に述べると次のようになる。(図4)。

- ① 電動ドリル(またはカッター)を用いて注射針(23G x 1 インチ, テルモ)ハブを肩の位置で切断する。注射針のステンレス管は植え込み部位に適した長さに切断する。たとえば、ラットの線条体に挿入する場合、注射針起始部から先端までのステンレス管の長さは5~7 mm とする。次に、別の注射針(同径)のステンレス管を長(12 mm)、短(8 mm) 2つに切断する。
- ② フューズドシリカチューブ(内径 75 μm ; 外径 150 μm , エイコム)をハサミで長短2

本に、線条体の場合 30 mm と 10 mm の長さで、切断して、①で切断した2本のステンレス管の中を通してエポキシ樹脂(アラルダイド・ラピッド, ニチバン)で接着する。このうち長い方をインレットチューブ, 短い方をアウトレットチューブとして用いる。

- ③ インレットチューブとアウトレットチューブを本体(①で作製した注射針)の中に挿入する。インレットチューブは本体のステンレス管の先端より4 mm 以上突き出るようにする。次に上端部にエポキシ樹脂を流し込み、2本のチューブと本体ステンレス管の隙間を充填して、チューブを固定する。
- ④ 透析膜チューブ(再生セルロース膜; 外径 0.23 mm; ALF-80G, 日機装)を約7~8 mm の長さにハサミで切断して、切り口の一端をエポキシ樹脂で塞ぐ。封入幅は0.2~0.3 mm にする。
- ⑤ エポキシ樹脂が完全に硬化した(3時間から1日)後に、③で作製した本体ステンレス管の先から突き出ているフューズドシリカチューブを一定の長さに切断する。線条体の

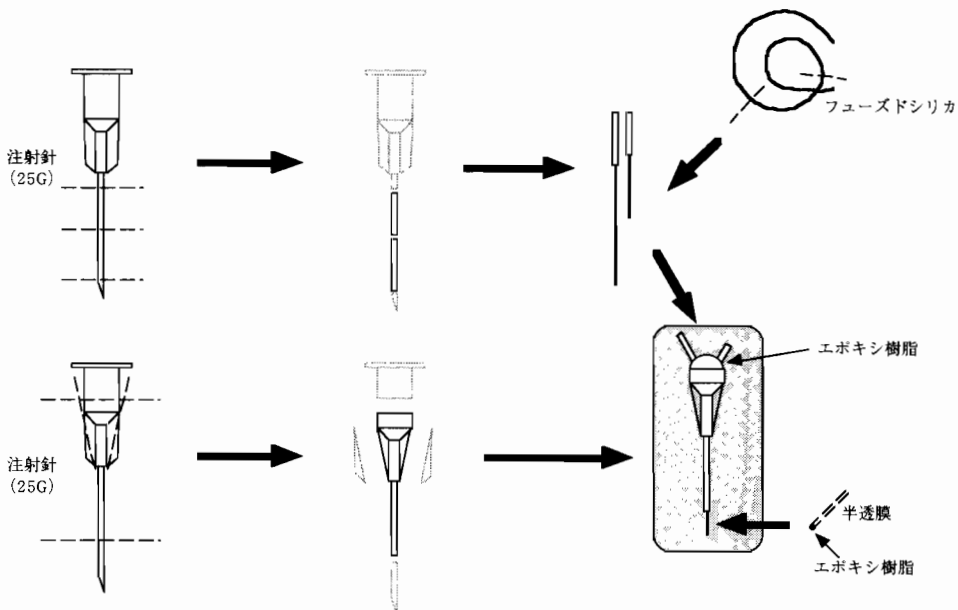


図4. I字型プローブ作製法の概略

場合には3~4 mmとする。次に、④で作製した透析チューブの開口している側をフューズドシリカチューブの上にかぶせながら、慎重に本体ステンレス管の中に挿入する。フューズドシリカチューブの先端と透析膜チューブの先端封入部の間は0.2~0.3 mm前後の隙間を残す。最後に、エポキシ樹脂で透析チューブを本体に接着する。この作業は実体顕微鏡下でおこなう。

完成したプローブは、実験に使う前に、試験管内キャリブレーションを済ませておく。というのは、回収した物質の濃度は細胞外液の実際の濃度の一部に過ぎないからである。標的物質の細胞外濃度を正確に知るために、あらかじめ、その物質に対する回収率を求めておく必要がある。通常、回収率は次のような手続きで求める。まず、プローブを既知濃度の標準物質を含むテスト溶液の中に浸ける。たとえば、セロトニンとその代謝物質の測定をおこなう場合、テスト液には標準物質としてセロトニンと代謝物質であるジヒドロキシインドール酢酸(例えば各1 μMの濃度)を含むリンゲル液を用意する。次に、インフュージョンポンプを用いてリンゲル液をプローブの中に送り込む。数分灌流した後、一定のサンプリング間隔(通常10~20分間)で数個のサンプルを回収する。サンプルの分析はHPLC-ECD法などでおこなう。得られたクロマトグラムの数値から回収率を次式で求める。

$$\text{回収率} = \frac{\text{試験管内透析液の物質濃度}}{\text{テスト液の物質濃度}} \times 100 \quad \dots\dots(1)$$

このようにして算出した回収率(および単位時間あたりに回収される物質の絶対量)と灌流液速度の間には図5の関係が成立する。多くの実験では2~4 μl/分の灌流速度が用いられている。これは、図から明らかのように、その流速で最大の透析効率を得られる(単位時間あたりに回収される絶対量が最も多い)からである。図6は回収率と温度の関係を示している。回収率は温度の影響を受けるので、テスト溶液の温

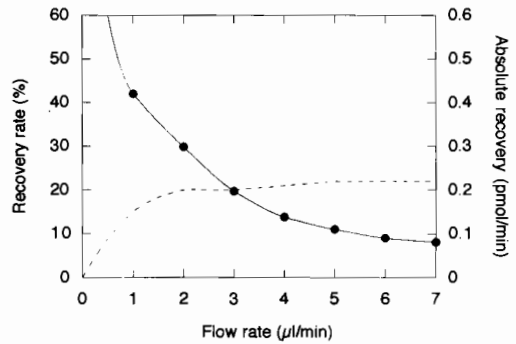


図5. 回収率と流速の関係
実線が回収率, 点線が1分当たりの回収量。
プローブの膜長は4 mm.

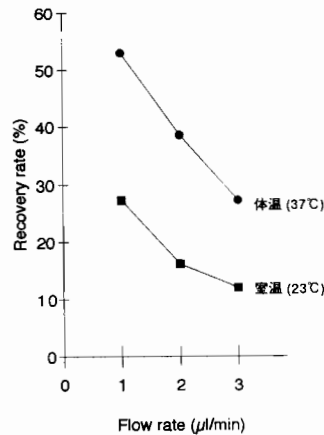
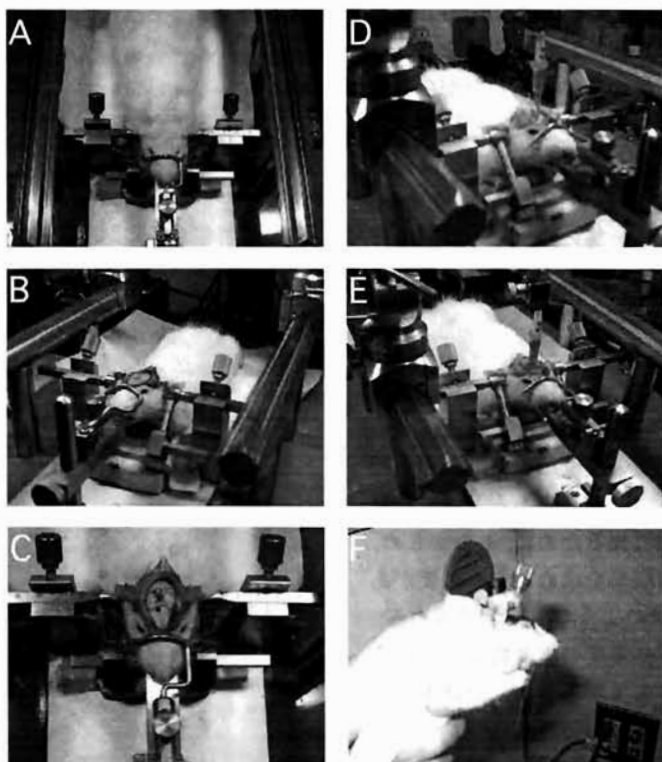


図6. 回収率と温度の関係
プローブの膜長は4 mm.

度は動物の体温(37~40℃)に近づける。

I字型プローブは脳のどの部位にも植え込むことができる。植え込み手術は、以下の手続きでおこなう(図7)。まず、ネンプタール麻酔下(40~50 mg/kg, 腹腔内投与)で脳定位固定装置に実験動物(ラット)の頭部を固定する。頭髪を消毒後刈り取る。頭皮を切開した後、出血しないようドリルで頭蓋に穴を開ける。その際、脳部位によっては硬膜の直ぐ下に血管があり、硬膜を丁寧に開けないと出血の原因になる。測定する脳部位にキャリブレーションを済ませたプローブを1~2分かかってゆっくりと挿入する(慢性実験では、ガイドカニューレ、プローブ、アンカーネジなどを十分に消毒して感染を防



A : 脳定位置置による固定
B : 頭皮の切開
C : 頭蓋の穴空け

D : プロープの挿入
E : デンタルセメントでの固着
F : 手術の終了

図7. プロープ植え込み手術

ぐ)。次に、プローブ周辺の頭蓋内にアンカー用のネジを2～3個埋め込む。最後に、デンタルセメントを使ってガイドカニューラを頭蓋に固着して手術を終了する。

術後数日の回復期間を経てからマイクロダイアリシを行う。まず、インフュージョンポンプを用いて2～4 $\mu\text{l}/\text{分}$ の流速でリング液をしばらくの間灌流する。これは、図8に示すように、プローブの挿入によって神経組織の一部が壊れ、それにより細胞外液に大量に放出される伝達物質がクリアランスされるのを待つためである。約3時間後には基礎値が安定するので、そこからサンプルの採取を開始する。サンプリングの間隔は、物質の濃度にもよるが、一般的には5～20分とする。採取した脳内物質はなる

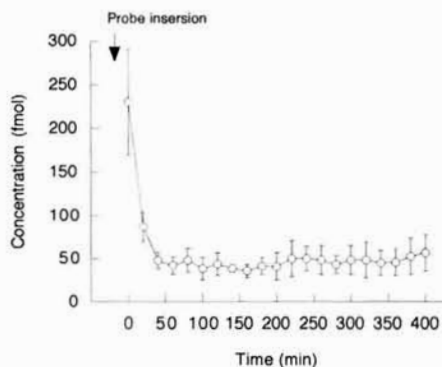


図8. プロープ挿入による細胞外ドーパミン濃度の経時的変化

べくその日のうちに分析を済ませる。後日分析する場合には -80°C で保存する。細胞外液の物

質濃度は次式で計算する。

$$\text{物質の細胞外濃度} = \frac{\text{生体内透析液の物質濃度}}{(1)} \times 100 \dots\dots(2)$$

ただし、この式が成り立つのは、生体と試験管の条件が等しい場合に限られる。しかし、生体内では、物質の拡散に種々の要因が影響を及ぼしており、試験管内条件は再現されない。したがって、(2)式から得た値はその物質の細胞外濃度の実際値と若干異なる。より正確な値を求める場合にはインビボキャリブレーション法を用いる。その手続を、ドーパミン濃度の測定を例として、述べると以下ようになる[5](図9)。すなわち、灌流液にまず低濃度の(外来性)ドーパミンを添加させ、その後徐々に濃度を上げていく。その結果、ある濃度に達すると、細胞外液からの(内因性)ドーパミンの流入がなくなる。この時、透析膜を横切るドーパミンの濃度勾配がゼロになる。すなわち、透析液のドーパミンの濃度とプローブ周辺組織のドーパミン濃度が平衡点に達する。したがって、添加したドーパミン濃度と回収液のドーパミン濃度が一致した時、その濃度が細胞外液の実際の濃度に相当すると考えればよい。図の例では、ドーパミンの細胞外濃度は2.72 nMと推測された。

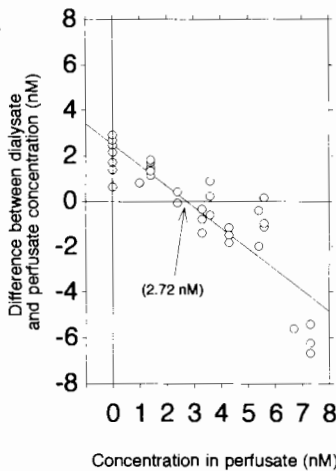


図9. インビボキャリブレーション：線条体細胞外ドーパミン濃度の実際値

もう一つの生体濃度の測定は、灌流液速度を例えば0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 μl/分で行い、得られた細胞外液濃度から、外挿法により、灌流液速度ゼロに相当する濃度を推定する方法である。ただし、これらの手続きは煩雑なので通常の実験で使うことはあまりない。

マイクロダイアリシスの時間分解能は分のオーダーである。時間分解能を決めるのは物質の回収率とアッセイの感度である。回収率は透析膜チューブの径と長さおよび物質の拡散特性などに依存する(図10)。最近の分析技術の進歩は目覚ましく、特にHPLC-ECDによるモノアミン、アセチルコリンおよびアミノ酸の感度が格段に向上した。モノアミンとアセチルコリンの検出限界値は今や1フェムトモル/サンプル、GABAやグルタミン酸については10フェムトモルにまで近づいている。この結果、アセチルコリンが生理的条件下でも(アセチルコリン分解酵素阻害剤を添加しなくても)検出できるようになった[6,7]。アセチルコリンのマイクロダイアリシスを行う時の重要な注意点は、灌流するラインをすべて70%アルコールなどで洗浄することである。そうすれば、灌流液が通過するラインに存在する細菌内アセチルコリン分解酵素を除去できる。

マイクロダイアリシスはオフラインだけでな

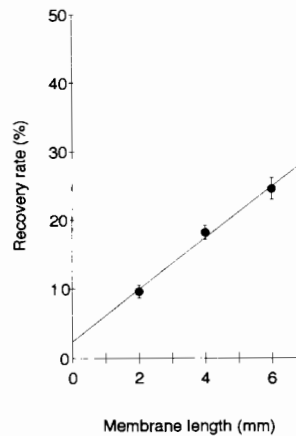


図10. 透析チューブの長さとの回収率の関係(流速 2 μl/分)

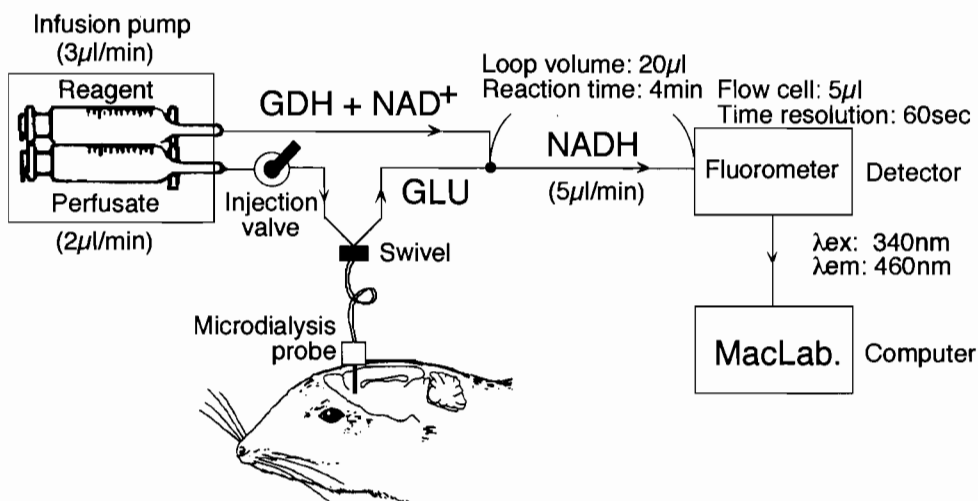


図11. オンラインでのグルタメート測定系

くオンラインの実験もできる(図11). その場合にはシーベルとオートインジェクターが必要になる. オンラインでの24時間の連続的モニタリングにより, サークアディアンリズムの研究も可能になる. しかしながら, プローブを数日あるいは数週間にわたって植え込んだままで実験を行う事には制約がある. プローブ植え込み後は, グリオシスなどの組織反応が徐々に起こり, 透析チューブ近傍の物質の拡散が妨げられる. その結果, 数日経つと回収率が徐々に低下する. したがって, プローブを植え込んで数日以降の成績は組織反応の程度により大きく影響されることを忘れてはならない.

IV. 意 義

シナプス前終末から放出された伝達物質はシナプス後(および前)膜にあるレセプターを介して情報の伝達を終えると, おもに再取り込みと酸素による分解処理によってシナプス間隙から速やかに取り除かれる. したがって, 細胞外液の伝達物質はシナプス間隙におけるクリアランスを免れた流出成分に相当する. つまり, 放出された伝達物質の一部に過ぎず, その細胞外濃度は極めて低い. シナプス間隙濃度の1/1000~1/10000程度になる(nMのレベル).

透析液の伝達物質が神経活動由来の成分であるか否かを定める古典的な基準は2つある. 1つは神経毒テトロドトキシン(TTX)に対する感受性である. TTXは電位依存性ナトリウムチャンネルを低濃度で阻害する. それゆえ, 回収した伝達物質が神経活動に由来すれば, TTXの投与により, その物質の透析液濃度は消失する(TTX感受性, 図12). 2つめは, カルシウム依存性である. カルシウムイオンは伝達物質がシナプス末端から放出される際の引き金となる. したがって, カルシウムイオンを含まないリンゲル液を用いると透析液からその物質は消失する(カルシウム依存性, 図13). ドーパミン

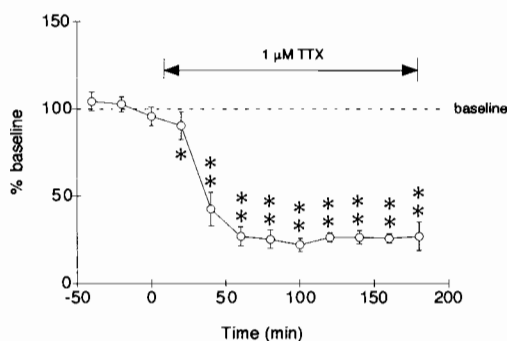


図12. テトロドトキシン感受性
*P<0.05; **P<0.01

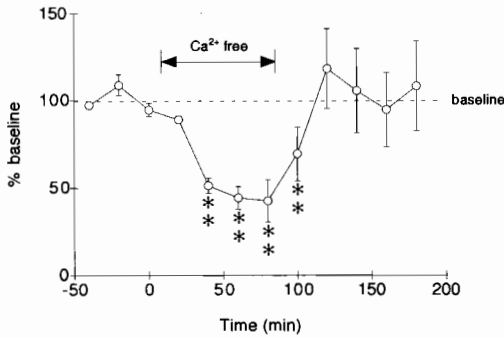


図13. カルシウム依存性
* * P < 0.01

やノルアドレナリンなどのカテコールアミン、セロトニンおよびアセチルコリンは、いずれも TTX 感受性を示す。ドーパミンの場合、ニューロンの発火活動を阻害する物質である、 γ -butyrolactone によっても同じ効果が得られる。また、カルシウム拮抗剤であるマグネシウムイオンや Verapamil を注入するとカルシウムイオンを含まないリンゲル液とほぼ同じ効果が得られる。これらのことから、透析液中のモノアミンとアセチルコリンはシナプス伝達に直接関係する成分であることが示唆される。

しかしながら、プローブにより大きな脳損傷を生じた場合や損傷後の回復が遅れた時にはこのような性質が観察されないことがある。たとえば、サイズの小さい貫通型プローブの場合、神経組織の損傷は比較的少なく、透析液のドーパミンは植え込んでから2時間後にはすでにカルシウム依存性を示し、24時間後には TTX 感受性も認められる。それに対してサイズの大きいU字型プローブの場合には、損傷範囲も広がり、植え込み3時間後ではこのような性質はまったく認められず、24時間後でも部分的なカルシウム依存性 (~70%) と TTX 感受性 (100%) が認められるに過ぎない [8]。このように、植え込み直後のU字型プローブで回収される伝達物質は、エキソサイトシス (exocytosis) によらない、すなわち、ニューロン活動に直接関係しない成分を含んでいる。これは恐らく損傷ニューロンから生じたものであ

ろうが、植え込み間もない時期にはプローブの大きさの違いが透析の結果に大きな影響をもたらす一つの例である。したがって、マイクロダイアリシスの利用に際しては、まず TTX 感受性とカルシウム依存性を示す実験条件を厳密に確立してから研究を開始すべきである。

いっぽう、脳内伝達物質の大部分を占めるアミノ酸には上に述べた神経伝達の基準は当てはまらない。すなわち、ほとんどの研究で、グルタミン酸と GABA の基礎値には TTX 感受性とカルシウム依存性の両性質が認められていない (図14)。この理由は、透析液に含まれるアミノ酸の基礎値のほとんどが、神経活動ではなく、非神経活動に由来する成分だからである。例えば、グルタミン酸の脳内分布は次のようになる。すなわち、神経終末に含まれるグルタミン酸が全体の20~30%余りで、残りの50%はニューロン内代謝性プール、15%はグリア、そして10% (あるいはそれ以下) が GABA ニューロンにある [9]。このように、透析液の伝達物質に寄与するプールが、ニューロンのみであるモノアミンやアセチルコリンとは異なり、アミノ酸の場合には多数個存在しており、それがシナプス伝達に由来する成分の検出を困難にしている。しかしながら、電気刺激や行動刺激によって誘発されるアミノ酸については、部分的ではあるが TTX 感受性あるいはカルシウム依存性が認められる。TTX 感受性やカルシウム依存性の程度は、刺激の種類によって異なり、おおよそ30

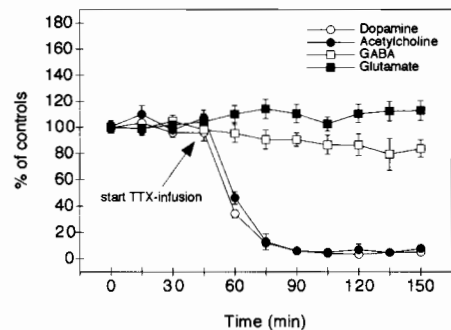


図14. グルタミン酸と GABA の TTX 非依存性 (Westerink (1995) より改変)

~70%の間にある。こうして、刺激時には神経活動と非神経活動が共に活性化され、両活動に由来する成分が共に透析液に回収される。

最近、この刺激誘発性のアミノ酸における2つの成分を分ける試みがなされている。中原らのデータについて述べてみよう。先に見た図11はオンラインでの酵素-蛍光分析とマイクロダイアリシスを組み合わせたグルタミン測定系を示している。この方法の特徴は高い時間分解能(60秒)にある。その原理は、透析液に回収したグルタミンを補酵素 NAD⁺(酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)とグルタミン酸脱水素酵素(GDH)に反応させ、この酸化的脱アミノ反応によって生じる NADH(還元型

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)の蛍光強度をモニターすることにより、透析液に回収されるグルタミン濃度を連続的にモニターすることである[10,11]。この方法によって得られた前頭葉におけるグルタミン反応を図15に示す。自己刺激行動と不動化ストレスの両刺激に対する前頭葉グルタミンの反応パターンは明らかに異なっており、刺激特異性の変化が認められる。図16から、これらの誘発反応は、部分的ではあるが、TTX感受性を示すことが見て取れる。興味あることに、原波形から TTX 非感受性成分を差し引いて得た TTX 感受性の波形は、ストレス誘発性の場合にも自己刺激誘発性の場合にも、共によく似た単峰性の増加パターンを示している(図17)。したがって、

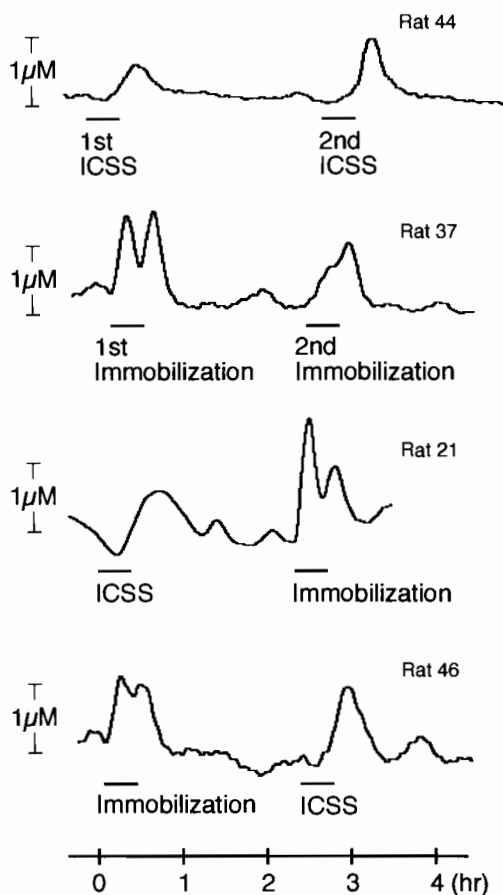


図15. 前頭葉内側部(MFC)のグルタミン反応 (ICSS: 脳内自己刺激行動, Immobilization: 不動化ストレス)

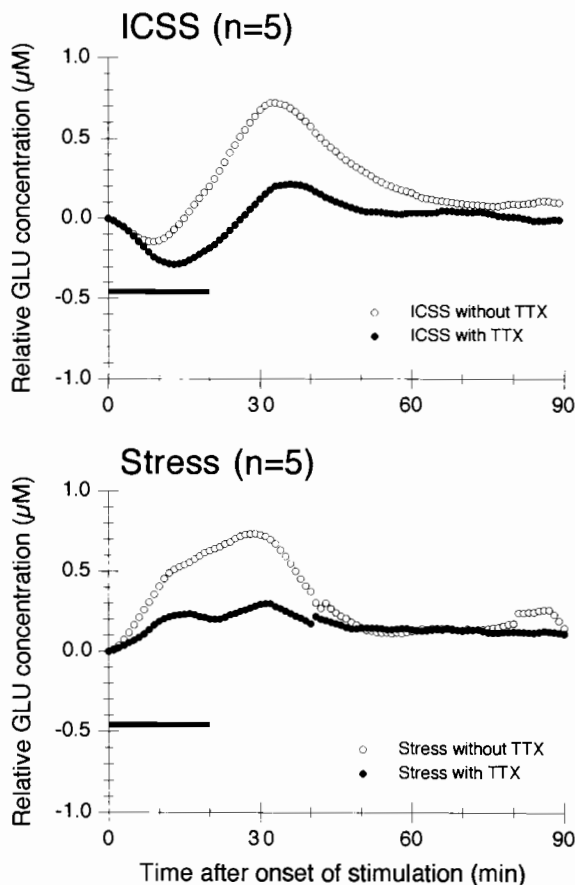


図16. グルタミンの TTX 感受性(平均値)

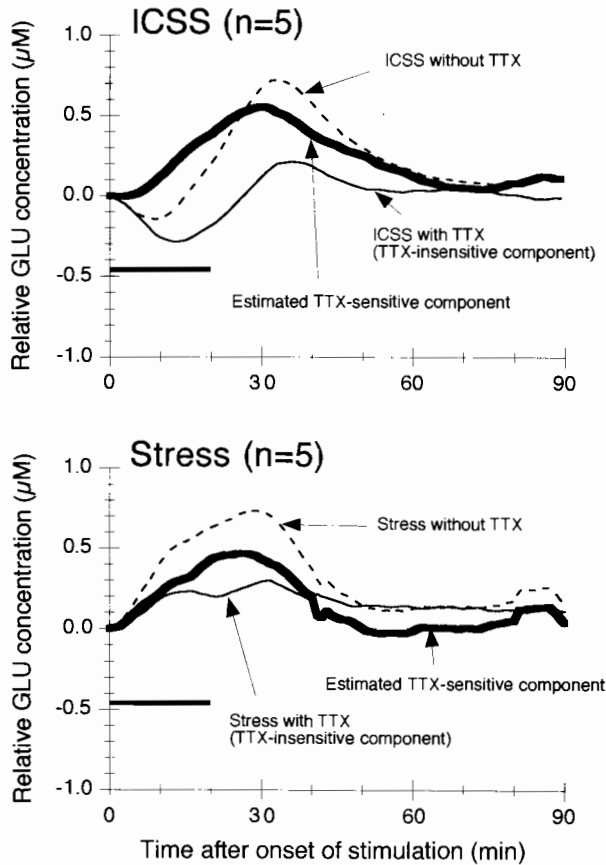


図17. TTX 感受性成分(平均値)

原波形にみられる反応パターンの違いはおもに TTX 非感受性成分によってもたらされたものであることがわかる。このように、より高い時分解能を有するグルタミン酸測定法により、刺激特異的な反応パターンを抽出することが可能になる。なお、これらの刺激誘発性グルタミン酸反応は取り込み阻害剤である PDC (1-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate) の影響を受けない。したがって、グルタミン酸が細胞外液に大量に放出される虚血などの病理的条件と異なり、生理的条件では TTX 非感受性成分の生成にトランスポーター機構の逆転 (reversal of uptake carriers) が関与する可能性は低い。

なお、神経ペプチドについては、細胞外濃度がきわめて低く、基礎値の検出が困難なため、TTX 感受性とカルシウム依存性について詳し

いことは調べられていない。

マイクロダイアリシスは生理的条件下で測定できると言われている。しかし、Ungerstedt のグループはしばらくの間麻酔下で実験していた。その理由の一つは、動物が行動することにより薬理学的評価が複雑化すると考えたからである。例えば、フリームービング(無麻酔無拘束)下では動物の起立などの行動変化によってアセチルコリンが増加する。その主な要因はもちろん脳内アセチルコリン神経の活性化である。しかし、その他の要因として、ラットが立ち上がった際、脳そのものが振動し、頭蓋に固定されているプローブが揺れ、その結果アセチルコリンの増加につながった可能性もある。また、ストレスや痙攣発作に伴い、血液脳関門が開放して、グルタミン酸が血管から細部外液に漏出する可

能性もある[12]。グルタメートの血液濃度は細胞外濃度の50～100倍も高い。したがって、漏出が例え僅かでも細胞外液濃度を大きく変えることにつながる。フリームービング下のマイクロダイアリシスでは、これらのアーチファクト要因に細心の注意を払う必要がある。

V. お わ り に

マイクロダイアリシスが初めて登場したのは今から25年前のことになる。しかしながら、一般に普及するようになったのは、モノアミンの高感度微量分析技術(HPLC法)が簡便に使えるようになった1985年以降のことである(図18)。その意味において、マイクロダイアリシスは比較的最近になって標準化された神経化学的手技の一つと言ってよい。

マイクロダイアリシスの初期の研究は薬理学的な急性実験が主であったが、近年は覚醒動物を使った行動神経化学的研究も増えている。たとえば、カタレプシー、痙攣、常同行動などの薬物誘発性行動、サーカディアン行動、性行動、母性行動、摂食および飲水などの動機づけ行動、自己刺激行動、欲求性および嫌悪性学習行動、ストレス行動などのさまざまな行動事態における神経伝達物質の測定にマイクロダイアリシスが利用されている。加えて、生理学の分野では脳波や誘発電位を同時記録するなどの新しいタイプのマイクロダイアリシスの利用も始まっている。また、最近になってスウエーデン

を中心とする諸外国では積極的に臨床場面への応用が試みられている。文献的には、昨年までにすでに約200件の臨床応用例が報告されている。その中味は、糖尿病患者のグルコース量のモニタリング、透析患者の窒素量の測定、頭部外傷患者や移植組織における乳酸値のモニタリング、および肥満患者の脂肪代謝マーカーとしてのグリセリロールの測定などである。本邦でも、血中グルコースのモニタリングの臨床応用が始まっている。将来的には、さらに他の臨床科での応用が広まり、標準的な臨床検査の一つに加わる可能性もあろう。

マイクロダイアリシスの弱点は、すでに多くの識者の指摘するところであるが、時間分解能と空間分解能に劣る点と長期間のモニタリングに不向きな点にある。時間分解能と空間分解能の問題点は、部分的には、代替法のインピボ・ボルタンメトリーによって解決できる。しかしながら、この方法は測定対象物質が電気化学的に活性な物質(モノアミン)に限られるという難点があるので、アミノ酸には適用できない。ファーストメッセンジャーであるグルタメートやGABAのシナプス事象の変化はモノアミンよりも迅速におこると予想される。また、すでに述べてきたように、透析液のグルタメートとGABAにはシナプス伝達に直接関わる成分と代謝によって生じる成分が共に含まれており、それが神経活動由来成分の検出を困難にしている。したがって、よりシナプス間隙に近いところでより早い事象を検出し得るインピボ・ボルタンメトリー電極(7～30 μmの径)様の微小プローブがアミノ酸の測定には必須になる。アミノ酸の脳機能における役割の大きさを考えると、この種のプローブの早急な開発が望まれる。長時間のモニタリングについては、最近になって生体適合性のよい透析膜が開発されつつあるので、近いうちにその道が開かれるであろう。これらを実現すれば、マイクロダイアリシスの利用価値はますます高まるに違いない。

なお、マイクロダイアリシスのもう一つの欠点は、一部といえども、脳および末梢組織に損

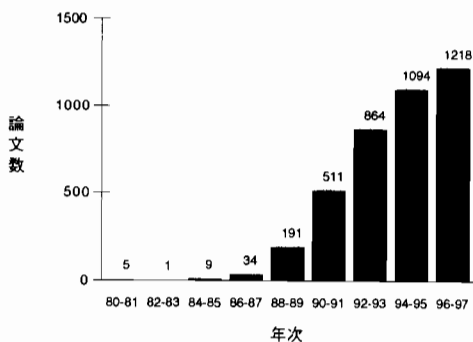


図18. マイクロダイアリシス関連論文数
(メドラインによる)

傷を与えることである。最近、無侵襲の神経活動モニタリングとして PET, fMRI, 脳磁図法などが多く用いられている、しかし、これらの無侵襲のモニタリングでは、神経伝達物質などを(半)定量的には測定できず、今後はマイクロダイアリシスとの併用が益々進むものと思われる。

(図の作製に御協力頂いた浜松医科大学教務職員中村直人氏に感謝致します。)

Ⅴ. 引用文献

- 1) Ungerstedt U & Pycock C: Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften, **127**: 44-55, 1974
- 2) Gaddum JH: Journal of Physiology (London), **155**: 1, 1961
- 3) Delgado JMR, DeFeudis FV, Roth RH, Ryugo DK & Mitruka BK: Archives Internationales de Pharmacodynamie, **198**: 9-21, 1972
- 4) Liu JK & Kato T: Brain Research, **735**: 30-35: 1996
- 5) Nakahara D, Ozaki N & Nagatsu T: In: Methods in Neurotransmitters and Neuropeptide Research, Ed. Parvez SH, Naoi M, Nagatsu T, Parvez S, Elsevier, Amsterdam, pp 219-248, 1993
- 6) Kato T, Liu JK, Yamamoto K, Osborne, PG & Niwa O: Journal of Chromatography B, **682**: 162-166, 1996
- 7) Sakurai T, Kato T, Mori K, Takano E, Watanabe S & Nabeshima T: Neuroscience Letters, **246**: 69-72, 1998
- 8) Westerink BHC & De Vries JB: Journal of Neurochemistry, **51**: 683-687, 1988
- 9) Fonnum F: Journal of Neurochemistry, **42**: 1-11, 1984
- 10) Obrenovitch TP, Sarna GS, Millan MH, Lok SY, Kawauchi M, Ueda Y & Symon L: In: Pharmacology of Cerebral Ischemia 1990, Ed. Kriegstein J, Oberpichler H, Wiss-Verlag, Stuttgart, pp 23-31, 1990
- 11) Takita M, Kaneko H, Suzuki SS & Akamatsu M: Neuroreport, **8**: 567-570, 1997
- 12) Belova TI & Jonsson G: Acta Physiologica acta Scandinavica, **116**: 21-29, 1982