

## マイクロダイアリシス法

### Microdialysis

杉本あゆみ, 會川義寛, 黒澤美枝子

Ayumi SUGIMOTO, Yoshihiro AIKAWA and Mieko KUROSAWA

(お茶の水女子大学ライフサイエンス, 国際医療福祉大学)

#### 1. はじめに

私達の身体は細胞から構成されており, 細胞内の分子生物学的変化が私達の生命活動のもととなっている. 細胞は血液から栄養素(グルコースなど)や酸素を供給されて種々の生命活動を行うが, それらの物質は直接血液から供給されるのではなく, 細胞外空間と呼ばれる細胞と細胞の間の隙間(空間)を介して供給される(図1). 同様に細胞から出る代謝産物も, 一度細胞外空間に出てから血管内に入る. また神経終末からの伝達物質も, 一度細胞外空間(シナプス間隙)に放出され, それが細胞に作用するのである. このように, 私達の身体の中では細胞外空間を通った物質のやりとりがなされており, その動態を知ることは身体内部の状態を知る上で大変重要である.

細胞外空間での物質のやりとりを知るために, 初めは push-pull 法と呼ばれる灌流法が用いられた(Gaddum, 1961). Push-pull 法は, 組織局所に2本のチューブを刺入し, 一方のチューブから圧をかけて灌流液を流入させ(push), 他方のチューブに陰圧をかけて灌流液を流出させる(pull)ものである. 灌流法は灌流液を直接組織に流す方法であるため, 組織にダメージを与えてしまうという欠点があった. 1966年に, Bitoらは透析膜を使った袋状の'dialysis sac'をイヌの脳や皮下に埋め込み, 一定期間後にその'sac'内のアミノ酸を測定した. この方法では経時変化を追えないものの, 透析の原理を利用したものであったため, 生体外からの液体が直接組織に接しないので, 組織

損傷が少ないというメリットがあった.

1970年代になると Delgadoらは'dialysis sac'を改変し, 2本のチューブの先端に透析膜を管状に装着した'dialytrode'を作成した. そしてdialytrodeをサル(ラット)の脳に刺入してその中に液を流し, 流出液中の物質量を経時的に測定し始めた. しかしながらそのdialytrodeは太く(直径1~3 mm), ラットなどの小動物の脳では用いられないものであった. その後 Ungerstedtらはdialytrodeを小型化し, 直径0.24~0.5 mmの'microdialysis probe'という小型のプロープによるマイクロダイアリシス法(微小透析法)を確立した. プロープの小型化により, ラットなどの小動物にも使用可能になった. 以後マイクロダイアリシス法は, 高速液体クロマトグラフィーとも組み合わせて使えるように

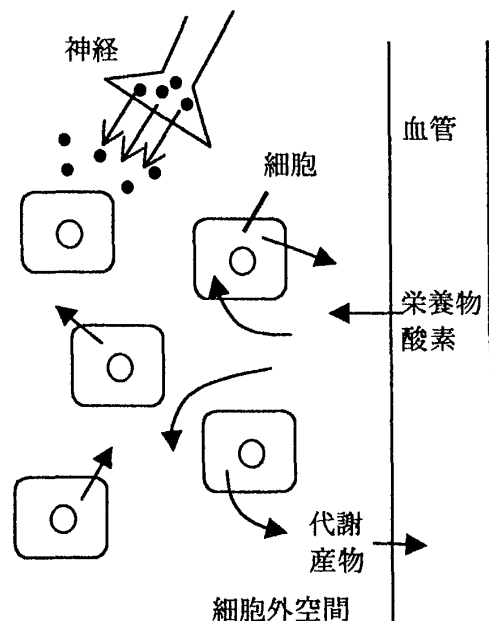


図1 細胞外空間の模式図

なって実験応用性が広がった。更に 1990 年代になるとヒトでも使用されるようになり、臨床応用の可能性が追求されている。本稿では、生体内の物質を回収するために開発された比較的新しい透析法であるマイクロダイアリシス法について解説する。

## II. プロープの概観

マイクロダイアリシス法は侵襲法ではあるが、組織へのダメージは少なく、連続抽出ができ、定量分析が可能である。マイクロダイアリシスプロープの概観は図 2 に示すとおりである。マイクロダイアリシスプロープは、透析液を流入させるための管 (inlet 管) と流出させる管 (outlet 管) と透析膜とで構成されている。透析膜は inlet 管と outlet 管のつなぎ目に配置される。プロープの形状も inlet 管と outlet 管接続の仕方により同心円型 (inlet 管と outlet 管が同心円上に並んだもの、図 3)、U 字型 (inlet 管と outlet 管が 2 本平行に並び、それらを接続する透析膜が U 字型に配置されたもの)、直線型 (inlet 管と outlet 管が 1 本の直線上に並び、その間を透析膜が直線型に接続するもの) などがある。使用対象に即したプロープを用いることが望ましい。

## III. 原理

マイクロダイアリシス法は、毛細血管と同様、透析の原理で細胞外空間との間で物質をやりとりする方法である。すなわち、細胞外空間と透析液中における物質の濃度

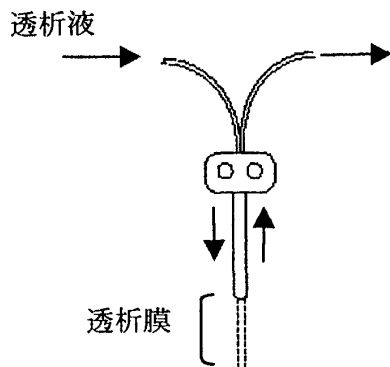


図 2 マイクロダイアリシスプロープの概観

勾配に従い、プロープの透析膜 (高分子量の物質は通過しないが、低分子量の物質は通過させる性質を持った膜) を介して、細胞外空間からプロープ内透析液へ (あるいは透析液から細胞外空間へ) 低分子量物質が回収 (あるいは放出) されるのである。例えば図 3 に示すように、透析液中には低分子量の物質 A が存在せず (または濃度が低く)、生体中に多量に存在すれば、拡散により物質 A は透析膜を通過し、透析液の中に入ってくる。出てきた液を単位時間ごとに連続的に回収し、濃度を測定することで、生体内の物質濃度の変化を定量的に測定できる。しかも透析によって得たサンプル液には生体内に多く含まれる蛋白質などの高分子物質が含まれないため、測定上も好都合 (例えば、除蛋白操作などが不要) である。マイクロダイアリシス法は一般に、マイクロシリンジポンプから透析液を一定速度で流す (図 4)。透析液はプロープ内を通り、透析膜を介して生体内の物質を回収するので、出てきた液を測定することで、生体内物質の濃度の経時変化などを知ることができる。

## IV. 透析に影響を与える因子

### 1. 回収率

マイクロダイアリシスプロープを使用するとき、その回収率が問題となる。回収率には

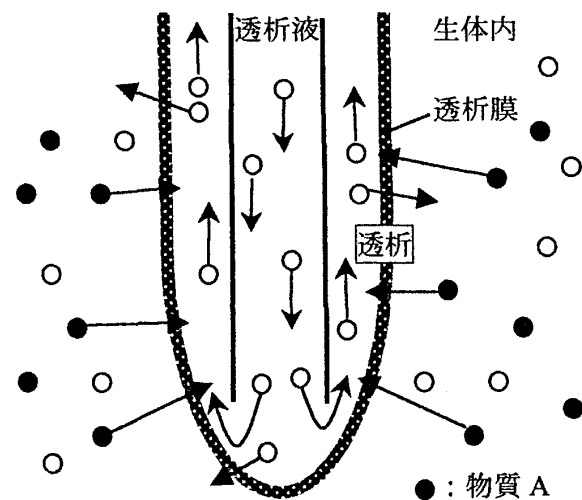


図 3 マイクロダイアリシスプロープ先端の拡大図

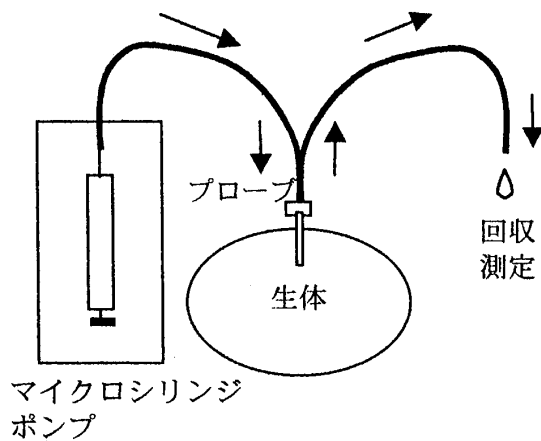


図4 生体における測定概略図

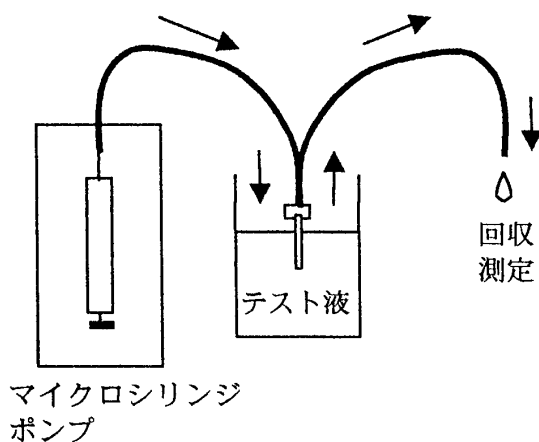


図5 テスト液における測定概略図

相対回収率と絶対回収率がある。プローブを生体内ではなく、既知濃度の溶液（テスト液）中に入れば、溶液中の物質を回収するので、回収された透析液中の物質の濃度と比較することにより相対回収率を求めることができる（図5）。

$$R = C_{p,f} / C_{e,f}$$

Rは相対回収率、 $C_{p,f}$ は透析液中の物質濃度、 $C_{e,f}$ はテスト液中の物質濃度である。

このようにして、算出される回収率は生体外（in vitro）で測定されるものなので in vitro 相対回収率と呼ぶ。in vitro 相対回収率はプローブの透析能のチェックに用いられる。

透析速度が遅くなるほどじっくりと回収できるので、透析液中の物質濃度は高くなり、相対回収率は大きくなる。

一方、絶対回収率というのは、ある一定時間内に回収される物質の総量となる。

$$A = C_e \cdot F_v \cdot R$$

Aは絶対回収率、 $C_e$ はテスト液中の物質濃度、 $F_v$ は透析速度、Rは相対回収率である。

## 2. 透析膜の種類と膜面積

透析膜には、ポリカーボネイト、ポリアクリロニトリル、セルロース、キュプロファン、ピタファイバー、エチレンビニルアルコール膜などがある。一般に、回収する物質の分子量が大きくなると、指数関数的に回収率は低下する。一方、膜面積（長ささと直径によって決まる）に比例して回収率は良くなる。また、膜の材質によって、膜を通過できる物質の分子量や膜への分子の吸着の性質は異なる。そのため、測定物質に適した膜の材質を選ぶことが重要になる。

## 3. 透析速度

透析速度が増加すると、相対回収率は指数関数的に減少する。一方、絶対回収率は2  $\mu\text{l}/\text{min}$  くらいまでは増加し、その後安定する。そのため、2~4  $\mu\text{l}/\text{min}$  で透析を行うことが多い。

## 4. 温度

温度が高くなると回収率は良くなる。そのため、マイクロダイアリシス法を用いる動物実験では、体温を一定に維持して行うことが重要である。テスト液を用いてプローブの回収率をチェックするときにも生体内と同程度の温度（37℃）で行う必要がある。

## 5. 拡散係数

測定する物質、膜の性質、物質の分子量、電荷などによって拡散係数が変わり、透析による物質の回収率も変化する（中原ら、1990）。生体内では細胞や血管などの障害物が多く、プローブに到るまでの過程が複雑となるため、テスト溶液に比べて拡散係数が小さくなる。従って、in vitro の状態で測定した回収率と生体内（in vivo の状態）での in vivo 回収率とは必ずしも一致しないことに注意を要する。In vivo での細胞外空間の物質濃度を知りたい時には、zero-net flux method という方法を用いる。これは、プローブを生体に刺入し、濃度を知りたい物質（物質 A とする）を透析液に混ぜて透析する方法である。もし生体内と透

析液中の物質 A の濃度が同じであれば、透析液と細胞外空間において物質 A の拡散は起こらず (zero-net flux), inlet 管と outlet 管の物質 A の濃度が等しくなる。

### 6. 透析液

回収率は透析液の組成にも影響を受ける。透析液は生体内の組織液と組成の近いものを用いるのが良く、一般にリンガー液 (末梢臓器) や人工髄液 (脳) などを用いる。

### V. 応用例

マイクロダイアリシス法は、脳を始めとして、脂肪組織、皮下組織、筋肉、肺、肝臓、脾臓、腎臓、脊髄、消化管、血管および眼球などの組織において幅広く用いられている (倉田ら, 1997)。測定物質もドーパミン、ノルアドレナリンなどのカテコールアミンやアセチルコリンの他、コレシストキニン、サブスタンス P などの神経ペプチド、アミノ酸、グルコース、乳酸など様々である。

例えば、ラットの大脳皮質にマイクロダイアリシスプローブを刺入してその透析液中のアセチルコリンを測定している例を図 6 に示す。この場合、後肢にブラシによる触刺激を加えると単位時間 (5 分間) あたりのアセチルコリン放出量の増加することが示されている。これは、無麻酔でマイクロダイアリシス法を用いた実験である。

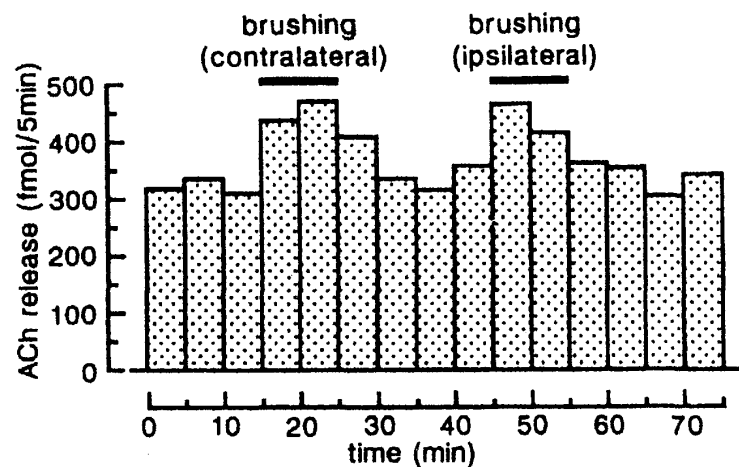
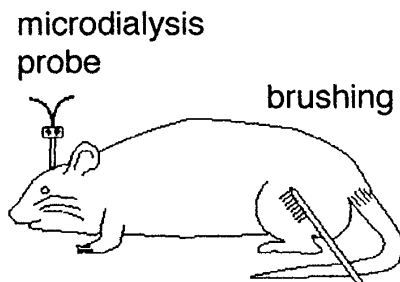


図 6 皮膚触刺激がラット大脳皮質でのアセチルコリン放出におよぼす影響

### VI. まとめ

マイクロダイアリシス法により、無麻酔、無拘束下の動物において、生体内の微小領域での物質のやりとりが連続的に長時間に渡って測定できるようになった。ただ、組織へのダメージは少ないというものの、侵襲法であることや、物質濃度のすばやい変化に対応できないなどの問題点もある。問題点をよく理解した上でその特性を活かして利用していくことが望まれる。

### VII. 参考・引用文献

- 1) Bito L, Davson H, Levin EM, Murray M, Snider N, *J Neurochem*, 13, 1057-67, 1966.
- 2) Chandra CS, *Biomed Chromatogr*, 13, 317-332, 1999.
- 3) Delgado JMR, DeFeudis FV, Roth RH, Ryugo DK, Mitruka BM, *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 198, 9-21, 1972.
- 4) Gaddum JH, *J Physiol*, 155, 1-2, 1961.
- 5) Kehr J, *J Neurosci Methods*, 48, 251-261, 1993.
- 6) 倉田知光, 安原一, *Toxicol Sci*, 22(3), 227-236, 1997.
- 7) Kurosawa M, Sakiyama Y, Sato A, Uchida S, *Biogenic Amines*, 10 (2), 151-159, 1994.
- 8) 中原大一郎, 尾崎紀夫, 永津俊治, *薬物・精神・行動*, 11, 1-16, 1991.
- 9) 斎藤史郎, 高橋秀夫, *日内分泌会誌*, 70, 907-912, 1994.
- 10) Ungerstedt U, *J Int Med*, 230, 365-373, 1991.