総 説**微小透析法による脳内神経ペプチドの解析**

徳島大学医学部第一内科

齋 藤 史 郎, 高 橋 秀 夫

Analysis of Neuropeptide Release by Brain Microdialysis**Shiro SAITO and Hideo TAKAHASHI**

First Department of Internal Medicine, School of Medicine, The University of Tokushima

The application of the microdialysis technique for the analysis of neuropeptide release was described. The recoveries of neuropeptides are affected by the nature of the dialysis membrane, the sort of perfusion method, the internal diameter and length of the outlet tube, and the flow rate of the perfusate. The studies on the mechanism of neuropeptide release using brain microdialysis were summarized. Brain microdialysis technique allows the direct and dynamic analysis of neuropeptide release and provides a useful tool for studying the mechanism of the central regulation of the release of neuropeptides.

Keywords: Brain microdialysis, Neuropeptide, Hypothalamic hormone**はじめに**

視床下部ホルモンなどの神経ペプチドの分泌動態を解明するために、これまで下垂体門脈血の採取や push-pull perfusion 法などが用いられてきたが、これらの方法は無麻酔・無拘束動物を用いる解析が困難であること、灌流液の pressured stream により組織に与えるダメージが大きいことなどが問題とされてきた。1982年, Ungerstedt ら¹⁾は、これらの欠点を克服する方法として微小透析法を報告した。本法は透析膜で先端を覆ったカニューレを用いて微小透析を行うもので、主としてモノアミン, その代謝物, アセチルコリンなどの低分子物質の解析に利用された。その後, サンプリング方法や測定方法の進歩に伴い, cholecystokinin, substance P, neurotensin などの神経ペプチドの分泌動態の解析にも応用されるようになった。そこで本稿では, 微小透析法による神経ペプチドの分泌動態の解析について, 基礎的条件ならびにその応用に関する最近の知見を述べる。

灌流システムの基本構造

プロープには形の異なる幾つかのタイプ(直管型, U字型, 直線型)がある。直管型は fused silica の中に inlet 用と outlet 用の2本の管を通し, エポキシ樹脂で接着した後, 先端に透析膜を装着したもので, この膜を通して微小透析を行い, 目的とするペプチドを細胞間液より回収する(図1-a)。U字型(図1-b)は, ステンレスパイプを二つ折にし先端に透析膜を付けたもので, 直線型(図1-c)はステンレスパイプの中間に透析膜を付けたものである。灌流には無脈流のポンプを使用し, push法またはpush-pull式で行う(図2)。

図1 微小透析用プローブの基本構造
a) 直管型, b) U字型, c) 直線型

図2 灌流方法
a) Push式, b) push-pull式

微小透析法の基礎的条件

1) 回収率

細胞から細胞間隙へ放出された物質は透析膜を介してプローブの中に取り込まれる。この細胞間隙中からの物質の回収率は、プローブ内と細胞外液との濃度勾配に依存するが、濃度勾配はプローブ内を灌流液が灌流し続けることにより生じる。一方、灌流液中の物質濃度が高い場合には細胞外液中へその物質が放出される。微小透析用プローブの透析能力は個々の物質の回収率によって表され、透析液中に回収された物質の濃度と外液溶液の濃度とを比較することによって算出される。すなわち、

$$\text{相対回収率 (\%)} = \frac{\text{灌流液中の物質濃度}}{\text{細胞外液中の物質濃度}} \times 100$$

したがって、流速が遅くなるほど相対回収率は高くなり、流速が増加するにつれ回収率は低下する。

絶対回収率とは一定時間内にプローブ内に回収された物質の絶対量を言う。

2) 回収率に影響を及ぼす因子

透析される物質の回収率は、(1) 透析膜の種類、長さおよび直径、(2) 灌流速度、(3) 温度、(4) 透析される物質の分子量、分子構造および分子の荷電状態、(5) 灌流液、(6) 回路に用いるチューブ、などによって影響を受ける。

表1 神経ペプチドの各種透析膜による回収率²⁾

神経ペプチド	Carnegie Medicin ^a 20 kDa (0.5 mm o.d.) Membrane length			Amicon ^b 50 kDa (0.3 mm o.d.) Membrane length		Cellulose ^c 5 kDa (0.25 mm o.d.) Membrane length	
	5 mm	2 mm	1 mm	5 mm	2 mm	5 mm	2 mm
Angiotensin	19.0	9.4	5.4	3.6	1.7	1.9	0.9
AVP	18.3	9.1	5.1	3.9	1.9	1.1	0.6
β-Endorphin *	3.0	1.4	0.9	0.2	0.1	< 0.1	< 0.1
Bombesin	16.6	8.1	4.5	3.3	1.5	1.2	0.6
CCK-8	12.7	6.4	3.7	1.3	0.8	0.7	0.3
CRF	3.1	1.6	0.9	0.2	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Dynorphin 1-17	6.5	3.3	1.9	1.1	0.6	0.2	0.1
LHRH	15.6	8.0	4.6	3.9	1.9	1.0	0.5
[Leu]enkephalin	20.9	10.5	5.9	6.0	3.1	5.8	3.0
[Met]enkephalin	24.8	13.0	7.1	6.5	3.3	6.4	3.2
Neurotensin *	12.0	6.3	3.5	2.6	1.3	0.6	0.3
NPY *	1.5	0.7	0.4	0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Oxytocin	16.4	8.6	5.0	4.0	2.0	0.9	0.5
Substance K	18.0	9.1	5.2	4.0	2.0	1.2	0.5
Substance P	15.5	7.5	4.5	3.4	1.6	0.8	0.4
TRH	19.4	11.8	6.7	4.5	2.3	3.8	1.9

^a Carnegie Medicin, Stockholm, Sweden.

^b Amicon Corp. Danvers MA 01923, U.S.A.: Model 3x50 Vitafiber filtration cartridge.

^c Medicell Int. London, U.K.

(1) 透析膜

微小透析に用いられている膜には、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、ビタファイバー、エチレンビニルアルコール膜などがある。Kendrichら²⁾によると、各種神経ペプチドのin vitroにおける回収率は表1のとおりである。90%以上透析されない物質の分子量をカットオフ値としているが、カットオフ値が20,000Daのポリカーボネイト膜を用いた場合に実際に回収できる物質の分子量は約5,000Daまでである²⁾。

(2) 灌流液

理想的な灌流液は、できるだけ透析部位の細胞外液の組成に近いものが良く、リンゲル液や人工髄液などを用いることが多い。神経ペプチドの多くは回路に用いられているポリマーに吸着する性質があるため、この非特異的吸着を防ぐためウシアルブミン (BSA) などの蛋白質や界面活性剤を灌流液中加入することが多い。必ずしもこれらの加えなくとも神経ペプチドを測定できる場合もあるが、逆に蛋白質の濃度が高すぎると回収率が低下する可能性があるので注意を要する。ペプチダーゼ阻害剤添加の必要性については見解は一定していない。Maidmentら³⁾はcholecystokininやneurotensinの測定にペプチダーゼ阻害剤を用いていないが、Ungerstedtら⁴⁾はペプチダーゼ阻害剤を用いてsubstance Pを測定している。しかし、in vivoの実験には生理的な条件に近づけるために阻害剤を使用しない方が良いと思われる。最近、Pichらは、抗CRH抗体を灌流液中加入することによってcorticotropin-releasing hormone (CRH) の回収率を向上させる方法を報告している⁵⁾。

(3) 灌流速度

プローブのサイズによって異なるが、通常、1-2 μ l/minで灌流を行うことが多い。これ以上の速度では限外濾過圧の影響により絶対回収率が低下する可能性がある。したがって、ペプチドが測定可能なレベルまで回収されるための最適条件を検討する必要がある。

(4) チューブ

outlet tubeは内径の太さが太く、長さが短いほど回収率が良い。somatostatinについての我々の検討では、outlet側チューブの太さと長さが限外濾過圧に大きく影響することが見出された⁶⁾。

(5) その他

チューブや膜の素材に対する生体物質の吸着の問題も常に考慮に入れる必要がある。ペプチドやアミンのような物質はシリコン、ポリエチレンなどのチューブに吸着し回収率の低下をきたす。これを防ぐためにチューブをテフロン製にしたり、灌流液中にBSAを添加する方法が行われている。

微小透析法の組織への影響

微小透析法 (主としてプローブ) による組織損傷とそれによって生じた傷害の経時的変化については種々の検討が行われている。Benvenisteら⁷⁾は脳血管への障害は極めて少なく脳血流が損なわれていない部位と比較して組織外液中のアミノ酸の組成に差がないとしている。また、Westerinkらはドーパミンの経時変化を調べているが、貫通型プローブの場合、挿入2時間後早くもテロドトキシンの灌流によるドーパミンの放出がみられることから、テロドトキシンはプローブ挿入時の組織の機能的障害を調べるのに用いることができるという⁸⁾。

このようにプローブ挿入直後から数時間にわたり神経伝達物質の基礎値は高値を示すが、これは組織損傷に基づく細胞内からの神経伝達物質の過剰な細胞外放出、グルコース代謝亢進あるいは血流の低下などが関係していると考えられる。プローブの近傍には組織障害により非生理的な環境が生じるが、サイズの小さい貫通型のプローブであれば組織の損傷は比較的小さく、プローブ挿入後数時間たてば比較的安定した

基礎値が記録できる。完全な回復を持つためには24時間後に実験を開始することが望ましく、U型のプロープを使用する場合は特にこの点に留意する必要がある。次に、どのくらいの期間一定の回収率が維持できるかが問題となるが、これにもプロープのタイプ、実験動物の種類、測定部位、実験手技、灌流液の組成、測定物質の種類などが関係している。最も大きな要因は挿入したプロープの周囲の組織学的ならびに生化学的な環境の変化である。Benveisteらは組織学的にプロープ挿入後3日目以降からプロープ周囲にgliosisの形成などの変化が生じることを確認している⁹⁾。したがって、脳損傷の影響を最小限に抑え、かつ信頼性のあるデータを得るためには、術後24時間から数日間の間に実験を行うと良いと考えられる。

神経ペプチド測定への応用

微小透析法の神経ペプチド測定への応用は、初めに回収率の良いcholecystokinin, luteinizing hormone-releasing hormone, oxytocinなどの低分子物質で試みられた。その後、高分子透析膜の使用や、灌流液に抗体を加えるなどの工夫によって、insulin-like growth factor I, CRH, somatostatinなどの測定が行われるようになっていく。

表2 微小透析法による種々の神経ペプチドの分泌動態の解析

神経ペプチド	透析膜	Cut off 値 (kDa)	測定部位	灌流速度 (μl/min)	基礎値 (mean±SE)	血清ウシアルブミン 濃度	報告者 (年)
TRH	polycarbonate	20	rat septum rat nucleus accumbens rat preotic area	2	10-15 f mol/100μl 1-3 f mol/100μl 10-13 f mol/100μl	—	Okuda C, et al. (1990)
LHRH	polycarbonate	20	rat pituitary	2.5	0.48±0.06 pg/10min	—	Meredith JM, et al. (1992)
CRH	polycarbonate	20	rat mediobasal hypothalamus	3.3	0.75±0.07 fmol/50μl	1%	Pich EM, et al. (1993)
somatostatin	polycarbonate	20	rat pituitary	2	44.7±4.1 pg/ml	0.1%	Takahashi H, et al. (1994)
vasopressin	U-shaped dialysis fiber	6	rat supraoptic nuclei rat paraventricular nuclei	3	0.67±0.22 pg/30min 0.80±0.24 pg/30min	—	Landgraf R, et al. (1991)
oxytocin	vitefiber tube	50	sheep substantia nigra sheep olfactory bulb	3	1070.6±8.0 pg/ml 917.6±126.2 pg/ml	0.5%	Kendrick KM, et al. (1988)
CCK	polyacrylonitrile	20	rat nucleus accumbens caudate	2.7	0.3 f mol/20-30min	0.025%	Maidment NT, et al. (1991)
	cuprophane	5	rat striatum	1.25	not detected	0.3%	Butcher PS, et al. (1991)
	cellulose	70	rat prefrontal cortex	7	7-12 pg/30min	—	Takita M, et al. (1989)
substance P	polycarbonate	20	cat spinal cord	3.5	0.1 f mol/20-30min	0.2%	Brodin E, et al. (1987)
	acryl polymer	50	rabbit nucleus tractus solitarius	13	1 f mol/20-30min	0.2%	Morilak DA, et al. (1988)
IGF-I	ethylene vinyl alcohol	100	rat hippocampus	2	235±25.4 pg/100μl	—	Yamaguchi F, et al. (1991)

注. — は含有せず

1) thyrotropin-releasing hormone (TRH)

TRHは、室傍核腹内側部で合成され、アドレナリンの α_2 受容体を介する刺激や寒冷暴露により分泌が刺激され、体温、呼吸および循環の調節を行うことが知られている。Okudaら¹⁰⁾は中隔、側坐核、視索前野において微小透析を行い、循環血漿量の減少により中隔におけるTRH分泌が増加することを報告している。

2) luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)

LHRHは、視索前野で合成され、律動的分泌を示す。その分泌はエストロゲン、ドーパミン、 β -エンドルフィンなどにより抑制され、PGE₂やc-AMPによって刺激される。Levineらは、下垂体前葉と正中隆起でLHRH濃度の律動的変化を測定し、その基礎値、振幅、および頂値が去勢や卵巣摘出により増大することを証明している¹¹⁾¹²⁾。

3) corticotropin-releasing hormone (CRH)

CRHは視床下部の室傍核腹内側部と室周囲部の小型細胞群で合成され、その分泌は日内変動を示すほか、各種ストレスやグルココルチコイドによる調節を受け、ストレスに対する防御反応に関与している。Pichら⁵⁾は、抗CRH抗体を灌流液に加えて、脳内各部位でのCRH濃度の変動を検討し、正中隆起のCRH濃度はCa²⁺存在下でK⁺刺激により増加することや、拘束ストレスや高浸透圧刺激に対して血漿ACTH濃度と平行して増加することを報告している。

4) somatostatin (SRIF)

SRIFは視床下部に最も高濃度に存在するが、大脳皮質、脳幹部、中脳などの中枢神経や膵、消化管などにも広く分布している。視床下部から分泌されるSRIFは、下垂体前葉細胞からのGH、TSHおよびPRLの放出を抑制する。我々の検討では、ラット下垂体の細胞外液中のSRIF濃度はペントバルビタール投与後減少し、ウレタン投与後、有意に増加した⁶⁾。

5) vasopressin (VP)

VPは室傍核や視索上核の大型細胞および視交叉上核の小型細胞により合成され、下垂体後葉から放出される。日内変動、高浸透圧刺激、ストレスなどに対する反応は部位による差異がみられるため、脳内微小透析法による検討が進められている。Landgrafら¹³⁾は海馬、中隔および視床下部におけるVP濃度の変動を測定し、室傍核や視索上核では高浸透圧刺激によってVP分泌が増加すること、視交叉上核でストレスによってVP分泌が増加することを報告している。

6) oxytocin (OT)

OTは室傍核と視索上核の大型細胞で産生され、下垂体後葉から放出される。Kendrickらは、分娩における子宮収縮時と哺乳時にOT分泌が増加することを証明している¹⁴⁾。

7) cholecystokinin (CCK)

CCKは、主として十二指腸で産生されるが、脳内にもCCK-8として存在する。脳内のCCK-8は内側前頭葉皮質に高濃度に存在している。また、中脳一辺縁系ではdopamineと共存していることから、精神機能との関連が注目されている。内側前頭葉皮質における灌流液中CCK-8濃度は、K⁺刺激やsulpiride投与により増加する³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。また、脛骨筋に対する低周波数の電氣的刺激で視床でのCCK-8濃度が増加するといわれている¹⁷⁾。

8) substance P (SP)

SPは中枢神経系および末梢神経系に広く分布し、neurotransmitterまたはneuromodulatorとして作用すると考えられている。Brodinら¹⁸⁾は微小透析法によりラットの尾状核でSP分泌の検出に成功している。また、ネコの孤束核¹⁹⁾、脊髓⁴⁾やウサギの孤束核²⁰⁾でも微小透析法によるSPの測定が行われており、K⁺刺激により増加することや、低酸素刺激および座骨神経への電氣的刺激に対する神経組織からのSPの分泌反応が報告されている。

9) insulin-like growth factor I (IGF-I)

IGF-Iの中枢神経における機能は現在のところ不明である。Yamaguchiらは脳内各部位で微小透析を行い、透析液中IGF-I濃度と各組織中の含量は海馬を除きよく一致することを報告している²¹⁾。海馬の細胞外のIGF-I濃度は熱凝固による組織破壊後の修復過程で上昇するが、修復の完了に伴い以前の基礎値に戻ることから、脳の組織修復にIGF-Iが重要な役割を担うと考えている。

おわりに

神経ペプチドの生理的ならびに病態生理的意義を解明するためには、その分泌動態を明らかにすることが重要である。また、視床下部ホルモンの分泌動態を知ることは、下垂体ホルモンの分泌調節機序を解析するうえで必須の条件であるが、その末梢血の血漿濃度の測定による検討では血漿濃度が低値であること、視床

下部以外の組織からも産生されていることなどから困難が多い。しかし、視床下部ホルモンや神経ペプチドが分泌される部位で微小透析を行えば分泌細胞からの分泌動態を連続的に解析することが可能となる。共存する複数のペプチドやアミンの分泌動態を同時に測定することも可能であり、微小透析法は視床下部ホルモンをはじめとする神経ペプチドの分泌調節機構を解明するうえできわめて有用な方法と考えられる。

文 献

- 1) Ungerstedt U, Herrera MM and Zetterstrom T. Dopamine neurotransmission and brain function. *Prog Brain Res* 1982;55:41-49
- 2) Kendrick KM. Microdialysis measurement of in vivo neuropeptide release. *J Neurosci Methods* 1990;34:35-46
- 3) Maidment NT, Siddall BJ, Rudolph VR, Erdelyi E and Evans CJ. Dual determination of extracellular cholecystokinin and neurotensin fragments in rat forebrain: microdialysis combined with a sequential multiple antigen radioimmunoassay. *Neuroscience* 1991;45:81-93
- 4) Brodin E, Lindefors N, Gazelius B and Ungerstedt U. In vivo release of substance P in cat dorsal horn studied with microdialysis. *Neurosci Lett* 1987;76:357-362
- 5) Pich EM, Koob GF, Heilig M, Menzaghi F, Vale W and Weiss F. Corticotropin-releasing factor release from the mediobasal hypothalamus of the rat as measured by microdialysis. *Neuroscience* 1993;55:695-707
- 6) Takahashi H, Shintani Y, Okauchi Y, Ishikawa M, Bando M, Azekawa T, Morita Y and Saito S. Measurement of somatostatin release in rat brain by microdialysis. *J Neurosci Methods* 1994;52:33-38
- 7) Benveniste H, Drejer J, Schousboe A and Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984;43:1369-1374
- 8) Westerink BHC. Characterization of in vivo dopamine release as determined by brain microdialysis after acute and subchronic implantation; methodological aspects. *J Neurochem* 1988;51:683-687
- 9) Benveniste H and Diemer NH. Cellular reactions to implantation of a microdialysis tube in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol* 1987;74:234-238
- 10) Okuda C, Sawa T, Harada M and Miyazaki M. Hemorrhage-induced regional brain thyrotropin-releasing hormone release in conscious rats measured by microdialysis. *Life Sci* 1990;47:1997-2002
- 11) Levine JE and Powell KD. Microdialysis for measurement of neuroendocrine peptides. *Methods Enzymol* 1989;168:166-181
- 12) Meredith JM and Levine JE. Effects of castration on LHRH patterns in intrahypophysial microdialysis. *Brain Res* 1992;571:181-188
- 13) Landgraf R and Ludwig M. Vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of the rat brain: osmotic stimulation via microdialysis. *Brain Res* 1991;58:191-19
- 14) Kendrick KM, Keverne EB, Chapman C and Baldwin BA. Intracranial dialysis measurement of oxytocin, monoamine and uric acid release from the olfactory bulb and substantia nigra during parturition, suckling, separation from lambs and eating. *Brain Res* 1988;430:1-10
- 15) Butcher SP, Varro A, Kelly JS and Dockray GD. In vivo studies on the enhancement of cholecystokinin release in rat striatum by dopamine depletion. *Brain Res* 1989;505:119-112
- 16) Takita M, Tsuruta T, Oh-hashii Y and Kato T. In vivo release of cholecystokinin-like immunoreactivity in rat frontal cortex under freely moving conditions. *Neurosci Lett* 1989;100:249-253
- 17) Xu M, Aiuchi T, Nakaya K, Arakawa H, Maeda M, Tsuji A, Kato T, Takasige C and Nakamura Y. Effect of low-frequency electric stimulation on in vivo release of cholecystokinin-like immunoreactivity in medial thalamus of conscious rat. *Neurosci Lett* 1990;118:205-207
- 18) Brodin E, Lindefors N and Ungerstedt U. Potassium evoked in vivo release in rat caudate nucleus measured using a new technique of brain dialysis and an improved substance-P radioimmunoassay. *Acta Physiol Scand Suppl* 1983;515:17-20
- 19) Lindefors N, Yamamoto Y, Pantaleo T, Lagercrantz H, Brodin E and Ungerstedt U. In vivo release of substance P in the nucleus tractus solitarius increases during hypoxia. *Neurosci Lett* 1986;69:94-97
- 20) Morilak DA, Morris M and Chalmers J. Release of substance P in the nucleus tractus solitarius measured by in vivo microdialysis: response to stimulation of the aortic depressor nerves in rabbit. *Neurosci Lett* 1988;94:131-137
- 21) Yamaguchi F, Itano T, Miyamoto O, Janjua NA, Ohmoto T, Hosokawa K and Hatase O. Increase of extracellular insulin-like growth factor 1 (IGF-1) concentration following electrolytic lesion in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1991;128:273-276