

## 毛管作用に基づく超微小ガラスキャピラリーセンサーの開発と哺乳類脳内のグルタミン酸濃度測定への応用

平野 愛弓, 菅原 正雄

### 1 はじめに

微小電極を用いるイオン、分子のその場検出法は、細胞内や細胞外の局所領域における情報伝達物質の濃度やその時間変化を追跡するための重要な方法の一つである。特にL-グルタミン酸は、脳の発達や記憶・学習形成にかかわる神経伝達物質と考えられているため、その濃度のモニタリングは重要である。グルタミン酸自身は電気不活性であり、また測定は高選択性を必要とすることから、今までにグルタミン酸オキシダーゼやグルタミン酸デヒドロゲナーゼを微小電極上に修飾した酵素センサーが多数報告され、real timeでの測定に利用されてきた<sup>1)</sup>。一方、マイクロダイアリシスによるサンプリングと酵素電極とを組み合わせたon-lineセンサーも報告されている。例えば、ダイアリシスプローブ中に酵素電極を組み込んだダイアリシス電極は、実際にin vivo測定に用いられている<sup>2)</sup>。マイクロダイアリシス法と組み合わせるアプローチの利点は、生体試料中に共存する電気化学活性種(L-アスコルビン酸等)や吸着性物質の妨害を除去しやすい点にある。

神経活動に伴うL-グルタミン酸の放出は、神経系の局所領域に限られている。そのため、神経活動とともに変化するL-グルタミン酸の濃度を“正しく”，かつ連続的にモニターするためには、センサーの空間分解能の向上が重要である。一般に電気化学センサーは、そのセンサーが接する最近傍溶液中におけるアナライトの平均濃度(活量)に応答する。センサーが大きくなれば接する領域は大きくなり、領域内で局所的に異なる濃度のグルタミン酸が放出されたとしても、その差を検出することはできない。上述のマイクロダイアリシス電極では、プローブサイズが大きく(通常200~500 μm)、さらに還流を必要とするためにサンプリング体積(数~数10 μl/分)が大きくなる。ちなみに、還流の速度が、最も遅い場合の1 μl/分と仮定しても、1分間当たり1 mm<sup>3</sup>もの大きな体積の細胞外溶液をサンプリングしていることになる。一方、微小電極(数~数10 μm)では、そのサイズが小さくなると空間分解能は高くなるが、それとともに電極表面積が小さくなる。そのため、観測される電流値が小さくなり検出下限の劣化を起す。したがって、いかにして検出下限を劣化させずに空間分解能を高めるかが課題となる。さらに、いずれの場合も、大きなセンサーを生きた脳組織に挿入することによって生ずる組織のダメージをできる限り少なくすることも課題の一つである。

サンプリング部と検出部とを組み合わせるアプローチでは、センサーのサイズに対して比較的大きな電極表面積を用いることができるため、サンプリングプローブの微小化ができれば、

高い空間分解能と測定系への摂動がより少ない高感度センサーを構築できる可能性をもつ。ガラスキャピラリーは、その先端径をサブμmから数十μmの広範な範囲で自在にコントロールできることや、キャピラリーそれ自身が毛管作用によるサンプリング能をもつため、微小サンプリングプローブとして魅力的な素材である。本稿では、ガラスキャピラリーによる毛管作用をサンプリングに利用した微小L-グルタミン酸センサーの開発について、筆者らの最近のアプローチを述べる。センサーの原理、感度、選択性などの応答特性<sup>3)4)</sup>、及び脳スライス中のL-グルタミン酸の検出<sup>5)</sup>に応用した例について示す。

### 2 キャピラリーセンサーの応答特性

毛管作用を用いるキャピラリーセンサーの構造を図1に示す。先端径約10 μmのキャピラリー内にグルタミン酸オキシダーゼ(GluOx)とアスコルビン酸オキシダーゼを含む内部溶液を入れて、センサー先端を試料溶液に浸すと、アナライトのL-グルタミン酸は毛管作用により試料溶液ごとセンサー内部へ導入される。内部溶液中でL-グルタミン酸は、GluOxの酵素反応によりH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成する。西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)-オスミウム錯体高分子膜を修飾したメディエーター型下地電極を用いることにより、0 mV(vs. Ag/AgCl)においてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の還元電流に基づく電流応答が得られる。

毛管作用をセンサー応答の原理として用いるためには、毛管作用による溶液のサンプリングに定量性があることが必要である。そのため、筆者らはまずサンプリングの定量性について検

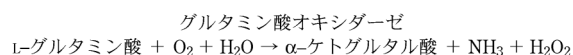
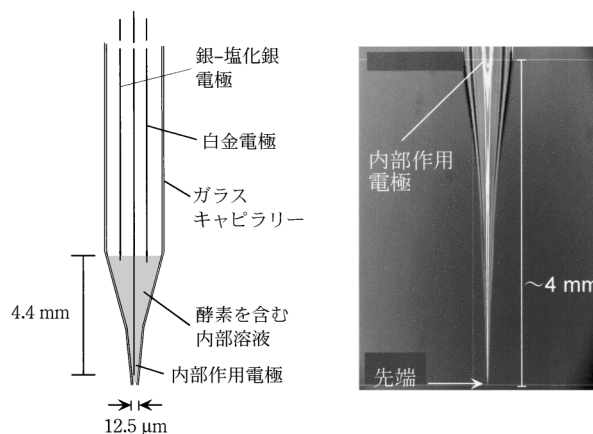


図1 ガラスキャピラリー電極の構造と先端部の写真

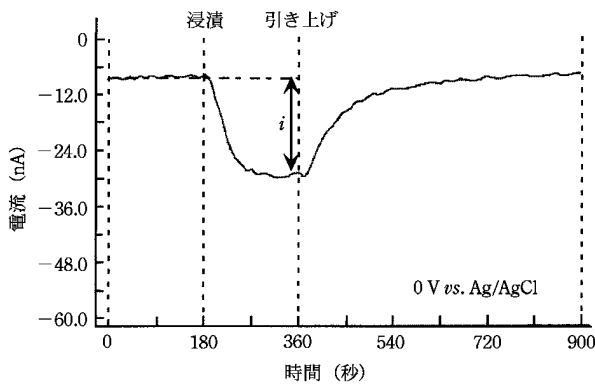


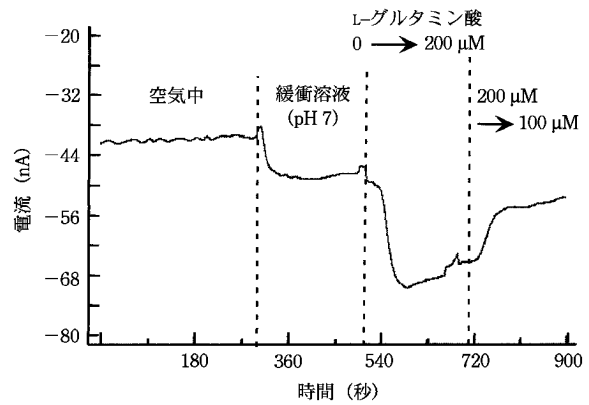
図2 ガラスキャピラリー電極の200 μM グルタミン酸に対する応答

討した<sup>4)</sup>。その結果、(i) 一定時間内にガラスキャピラリー中にサンプリングされる試料体積は、先端径5~15 μmの範囲で先端径が大きくなると直線的に増加する、(ii) 先端径を一定にした場合は試料溶液への浸漬時間<sup>しんじくじかん</sup>に比例してサンプリング体積が増加し、先端径10 μmのキャピラリーでは、1分間当たり約200 nlの溶液が導入されることが分かった。この体積は、一辺が約580 μmの立方体の体積に相当するが、上述のマイクロダイアリシスや、キャピラリーを使った吸引ポンプによるサンプリング体積に比べてかなり小さい。それによって、脳組織に適応した場合、細胞外液をサンプリングすることに伴って起こる摂動が、より小さくなると期待される。また、通常の微小電極の拡散層の広がり数が数十から数百 μmのオーダーであることを考慮すると、本センサーの空間分解能は微小電極と同程度であると言える。

キャピラリーセンサーのL-グルタミン酸に対する応答の例を図2に示す。L-グルタミン酸溶液にセンサーの先端を浸けると、約90秒後に定常電流に達する。毛管作用による試料の導入が継続して起きているにもかかわらず定常電流が得られるのは、センサー内部溶液の体積が微小のため、キャピラリー内にサンプリングされたL-グルタミン酸が酵素反応を介して生成するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>量と、電極反応によって消費されるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>量とが釣り合いの状態になるからである。センサーを溶液から引き上げると、電流値は直ちに減少して初期の値に戻るため、このL-グルタミン酸センサーは繰り返し使用できる。

このセンサーのL-グルタミン酸に対する応答下限は、3 μM (S/N=3) である。本センサーは、電気化学活性な神経伝達物質のドーパミンやセロトニン、L-グルタミンに対して応答は見られず、またキャピラリー内部溶液にアスコルビン酸オキシダーゼが添加されているため、1 mMのアスコルビン酸に対しても全く応答が見られない。この選択性は、脳スライス中での測定に十分と考えられる。

次に筆者らは、このセンサーを連続測定に使用できるかどうかについてモデル系を用いて検討した<sup>5)</sup>。その結果、バッチ系を用いてL-グルタミン酸の濃度をステップ的に増減させた場合(図3)も、フロー系を用いて直線的な濃度変化を与えた場合も、応答にわずかな時間的遅れがあるが、ともにL-グルタミン酸の濃度変化に追従した電流値の増加及び減少が観測された。これらの結果は、本センサーがL-グルタミン酸濃度の変



0 mV vs. Ag-AgClでのアンペロメトリック応答

図3 L-グルタミン酸濃度をステップ変化させたときのガラスキャピラリー電極の応答

化に対応して、センサー内部溶液のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度が速やかに新しい状態に達し、事実上real timeでグルタミン酸濃度を連続測定できることを示している。

### 3 海馬スライスにおける連続測定への応用

虚血刺激によって放出されるL-グルタミン酸の濃度を海馬スライス内の領野ごとに連続的に測定、定量することを試みた。虚血とは、無グルコース低酸素状態のことで、虚血に曝された脳の海馬内では、L-グルタミン酸濃度の著しい上昇が見られ、それが引き金となってその後に大量の神経細胞死が起こることから、脳疾患のモデルとして注目されている。また、その神経細胞死の程度が、海馬内でも領域(領野)ごとに大きく異なることから、虚血海馬中でのL-グルタミン酸濃度を領野ごとに定量することが、細胞死の分子機構を知る上で重要と考えられている。

マウス脳より海馬スライスを作製し、海馬中のCA1, CA3, DG領野にセンサーを置き、虚血刺激を与えた。その結果、すべての領域において、刺激後数分からL-グルタミン酸の応答が観測され、その後も増加を続けた。しかし、その放出パターンは領野によって異なり、また虚血刺激後8分におけるL-グルタミン酸の濃度は、CA3>CA1>DGの序列であった<sup>5)</sup>。この序列は、以前筆者らがGluOx-HRP酵素膜によるイメージング法<sup>6)</sup>によって得た虚血海馬スライス中のL-グルタミン酸フラックスの序列(CA3≈CA1>DG)とほぼ一致した。両方法の序列が一致することは、方法論の観点から重要である。

イメージング法は、時間とともに変化するアナライトの空間分布を多点で、かつ同時に視覚的に与えるが、濃度の定量的情報を得ることは容易でない。検出試薬を系に加えることによる化学的摂動も無視できない。系にできる限り摂動を加えない多点計測法として、マルチチャンネルアレイ電極を利用した電気化学イメージング法も検討<sup>7)</sup>されている。センサーを用いるアプローチは、濃度に関する定量的情報を直接与える。両方法は相補的に用いることによって、脳内のグルタミン酸の挙動に関して、より多くの情報が得られることになる。

## 4 おわりに

本稿では、試料サンプリングの原理として毛管作用を利用することにより、高感度、かつ高い空間分解能をもつL-グルタミン酸センサーを作製できること、そしてこのセンサーが脳内L-グルタミン酸の検出に有用であることを示した。これまでに報告されているL-グルタミン酸の測定の場合には、筆者らのも含めて、過度の刺激によるL-グルタミン酸の放出を検出している。一方、生理条件に適合する適度の刺激で放出されるL-グルタミン酸を検出した例は極めて少ない<sup>2)</sup>。生理条件下でのL-グルタミン酸濃度に対応できる感度を達成することが今後の課題である。筆者らがすでに報告した生体膜を感応膜とするアラキドン酸センサー<sup>8)~10)</sup>も、また局所領域での物質検出を志向したものである。脳内で物質の濃度を正しく測定するための様々な方法をそろえて行くことが、脳機能の理解のために分析化学者が寄与できることの一つであろう。

### 文 献

- 1) 鳥光慶一, 丹羽 修: “脳の動態をみる”, p. 79 (2001), (医学書院).
- 2) M. L. Errington, P. T. Galley, T. V. P. Bliss: *Phil. Trans. R. Soc. London, B*, **358**, 675 (2003).
- 3) 菅原正雄, 平野愛弓: *分析化学*, **51**, 1121 (2002).
- 4) K. Nakajima, T. Yamagiwa, A. Hirano, M. Sugawara: *Anal. Sci.*, **19**, 55 (2003).
- 5) 中村直人, 菅原正雄: 第65回分析化学討論会要旨集, p. 56 (2004).
- 6) A. Hirano, N. Moridera, M. Akashi, M. Saito, M. Sugawara: *Anal.*

*Chem.*, **75**, 3775 (2003).

- 7) N. Kasai, Y. Jimbo, O. Niwa, T. Matsue, K. Torimitsu: *Neurosci. Lett.*, **304**, 112 (2001).
- 8) H. Saitoh, Y. Namatame, A. Hirano, M. Sugawara: *Anal. Biochem.*, **329**, 163 (2004).
- 9) A. Hirano, Y. Namatame, E. Wakaizumi, Y. Matsuno, M. Sugawara: *Anal. Sci.*, **19**, 191 (2003).
- 10) M. Sugawara, A. Hirano: “*Planar Lipid Bilayers and Liposomes*”, Edited by H. T. Tien, A. Ottova, in press (2004), (Elsevier, Amsterdam).



平野愛弓 (Ayumi HIRANO)

National Institute for Medical Research  
(The Ridgeway, Mill Hill, London, NW7  
1AA, United Kingdom). 東京大学大学院  
理学系研究科博士課程修了。博士(理学)。  
◀現在の研究テーマ▶L-グルタミン酸セ  
ンシング法の開発と脳内測定への応用。  
E-mail: ahirano@nimr.mrc.ac.uk



菅原正雄 (Masao SUGAWARA)

日本大学文理学部化学科 (〒156-8550 東  
京都世田谷区桜上水 3-25-40)。北海道大  
学大学院理学研究科博士課程中途退学。理  
学博士。◀現在の研究テーマ▶脳内生理活  
性物質のその場検出法の開発。◀主な著  
書▶“イラストで見る化学実験の基礎知識”  
(丸善)。  
E-mail: sugawara@chs.nihon-u.ac.jp

## 新刊紹介

### 基礎分析化学演習

菅原正雄 著

本書は初学者向けの容量分析に関する演習問題を集めたものである。全106ページという手頃な分量の中に、酸塩基平衡、沈殿平衡、錯形成平衡、酸化還元平衡に1章ずつを当て、これに、溶液の濃度とその表し方(第1章)、分析データの取り扱い(第2章)、活量、イオン強度および及び活量係数(第3章)という導入の章と、最終章として滴定への応用(第8章)を配して、容量分析の基礎となる化学平衡を統一的に理解できるように工夫されている。通常分析化学の教科書で

は、酸塩基滴定、沈殿滴定、キレート滴定などと別々の章立てで表記され、その差異に重点が置かれることが多い。このため、「これらの容量分析法を別々の知識の引き出しにしまいこんでしまう学生も出て来はしないか?」という著者の憂いと、「化学平衡に基づいて統一的に理解をすれば容易に学ぶことができ、より深い理解に到達するのだ」という著者の信念がうかがえる。問題の設定に、例えば「グルタミン酸センサーを用いて脳内のグルタミン酸の放出量を求め次の値を得た。95%信頼限界を求めなさい。」のように、なぜこのような設問にしたのだろう?と学ぶものに注意を喚起するような、極めて具体的な例を用いていることも特徴である。「化学平衡こそ溶液の化学の基礎の基礎なのだ」という著者の声が学生に届くといいな、と思わせる問題集である。分析化学といわず、化学を学ぶ初学者に勧めよう。

(ISBN 4-7827-0490-9・A5判・106ページ・1,800円+税・  
2004年刊・三共出版)