

No.3

大脳皮質神経細胞賦活時における代謝活動測定
のための連続精密計測システムの開発研究

エイブル株式会社 研究所秋田分室

報 告 要 旨

研究委託の名称	大脳皮質神経細胞賦活時における代謝活動測定のための連続精密計測システムの開発研究
企業名	エイブル株式会社
研究委託の目標	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 大脳皮質脳切片を一週間以上生かす脳組織灌流維持装置を開発する。 2. 栄養物質および代謝物質を完全な管理下で脳組織の呼吸・代謝を計測する。 3. 培養組織の酸素分圧を実時間で計測する酸素電極を開発する。 	
実施項目	
脳組織灌流維持装置の開発	切片状に切りだした脳組織の解析研究を行う際のネックとなっている「脳組織を長期間安定に維持できない」という問題点を解決する為に、脳組織に無菌状態で培地を灌流させることにより安定維持を可能ならしめる装置を設計、製作した。
脳組織代謝活性と神経活動の維持	従来困難とされてきた成熟脳の組織培養を試みた。成熟ラットの大脳皮質の一部を切片状に摘出した上、培養液を摘出組織に灌流し続けることでその生存維持をはかった。同時に電気生理学的手法を用い神経活動の有無を確認した。
微小酸素電極の開発	本開発では、外部からの刺激に対する大脳皮質の神経細胞の働きを解明するため、大脳皮質における酸素濃度の変化を捕捉する為の2種類の微小酸素電極(分離型、一体型)の設計・製作・試験を試みた。
結 果	
脳組織灌流維持装置の開発	脳組織を無菌状態で安定に維持させる為に培地調整槽、コントローラおよび脳組織維持チャンバーからなる脳組織灌流維持装置を1基製作した。無菌状態を維持する為にマグネットカップリング攪拌機構、テフロン多孔チューブによる通気機構およびチューブポンプによる液搬送等の技術の盛り込んだものとなっている。

<p>脳組織代謝活性と神経活動の維持</p>	<p>従来の培養液を静止する方法では、酸素分圧の如何(5.95%)によらず4時間以内に神経細胞の萎縮変性をおこすが、毎分1.2ml以上の速度の培養液灌流により萎縮は防止され神経活動も正常で、この方法による培養可能性が明らかとなった。</p>
<p>微小酸素電極の開発</p>	<p>実施を試みた2種類の微小酸素電極(分離型、一体型)のうち、分離型酸素電極の開発は成功したが、実際の大脳皮質内の酸素濃度の計測や一体型酸素電極の開発は成功には至らなかった。</p>
<p>取得物件の利用計画</p>	
<p>未定</p>	

1. 新技術の概要

1.1 研究委託の内容

大脳皮質脳切片を一週間以上生かす脳組織灌流維持装置を開発する。
 栄養物質および代謝物質を完全な管理下で脳細胞の呼吸・代謝を計測する。
 培養組織の酸素分圧を実時間で測定する酸素電極を開発する。

1.2 工業所有権

期間中に依頼した工業所有権はありません。

2. 実施期間

平成 8 年 1 月 16 日～平成 8 年 10 月 31 日

3. 実施場所

エイブル株式会社 研究所 秋田分室
 所在地：秋田県秋田市広面字土手下 12 - 1
 I . H . ハウス 1 A 号室
 エイブル株式会社 東京本社
 所在地：東京都新宿区東五軒町 4 - 15

4 実施経過

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
設備関係発注・ 据付	—————										
設備関係試験			—————								
脳組織灌流維 持装置の思索 および試験				—————							
動物脳組織を 用いた全体装 置の試験と問題 点の検討											
各部改良及び 高時間分解能 酸素電極の試 計測試験及び まとめ							—————				

..... 計 画 ————— 実 行

5. 研究委託の結果

5.1 実施項目

大脳皮質脳切片を一週間以上生かす脳組織灌流維持装置を開発する。
 栄養物質および代謝物質を完全な管理下で脳細胞の呼吸・代謝を計測する。
 培養組織の酸素分圧を実時間で測定する酸素電極を開発する。

5.2 実施結果

目次（本文は次項より）

5.2.1 脳組織灌流維持装置の開発

5.2.1.1 諸言

5.2.1.2 培地調整槽およびコントローラ

- 5.2.1.3 脳組織維持部
- 5.2.1.4 結言
- 5.2.2 脳組織代謝活性と神経活動の維持
 - 5.2.2.1 諸言
 - 5.2.2.2 従来の手法の問題点
 - 5.2.2.3 脳組織灌流による培養法の開発
 - 5.2.2.4 結言
- 5.2.3 微小酸素電極の開発
 - 5.2.3.1 諸言
 - 5.2.3.2 微小酸素電極の設計
 - 5.2.3.3 分離型酸素電極の製作方法
 - 5.2.3.4 一体型酸素電極の製作方法
 - 5.2.3.5 製作した微小酸素電極の試験
 - 5.2.3.6 結言

5.2 実施結果

5.2.1 脳組織灌流維持装置の開発

5.2.1.1 諸言

脳組織の神経細胞の研究を行うために脳組織を切片状に、これに電極を挿入し電気刺激を与えた時のレスポンスを計測・解析する手法が用いられている。この手法で脳組織の解析を行うためには長時間にわたって脳組織を健全な状況に維持することが必要になる。

これまでは、大人の脳組織を長期に渉り安定維持することは出来なかったが培地を流すことによりその可能性があることが解った。しかし、この方法でもオープン系では雑菌が入り長期維持は困難であった。

そこで、無菌状態で培地を管理し、これを脳組織に供給し組織灌流後フィルターによって雑菌を濾過しもとの培地槽に戻すような装置を試作することとした。

本装置は培地調整槽(コントローラ付)と脳組織維持部を備える必要がある。

5.2.1.2 培地調整槽及びコントローラ

培地調整槽

材質はオートクレーブ可能なよう耐熱ガラスとした。脳組織切片を 3 × 1.5 mm t とすると 2 ml/min 程度の培地灌流が必要であることから培地調整槽サイズは 1000ml とし、マグネットカップリングによる下部攪拌とした。

制御項目及び制御範囲

脳組織の維持を行うためには従来から Table 1 に示す各項目をコントロールした培地を連続的に供給することが必要であるとされている。制御範囲については通気制御を除いて通常の動物培養装置におけるものと同等とした。制御装置としてはパックコントローラ(エイブル製)を使用している。攪拌についてはノイズ発生を抑えるために速度の連続可変機構なしとした。回転数は 117rpm とした。速度を変えるにはギヤヘッドを交換する必

要がある。

Table 1 培地調整槽の制御項目、範囲及び制御方法

制御項目	制 御 範 囲	制 御 方 法
温 度	室温 + 5 ~ 45	ハンドヒーター方式 A C 100 V P I D 制 御
攪 拌	固定 (117rpm)	
p H	2 ~ 12	電磁弁による C O ₂ 供給及びチューブポンプによるアルカリ添加
通 気	O ₂ 0 ~ 500ml/min Air 0 ~ 100ml/min C O ₂ 0 ~ 10ml/min	マスフローによる制御 C O ₂ は p H を下げる時以外は一定流量。 O ₂ と Air は O ₂ 流量 + Air 流量 = 一定の条件下で D O 値が設定より低い時は O ₂ が増し、逆の時はしぼることにより制御する
液面制御		基準液面より下がったら設定時間 (任意に設定できる) だけ新しい培地が別槽から補充される。

液流路の構成

脳組織灌流維持装置のフロー図を Fig.1 に示す。

この装置には 6 つの系が組み込まれている。

- ・ 脳組織維持部に培地循環ポンプ (p 2) によって培地を供給する系。
- ・ 脳組織維持部を灌流した培地をフィルターポンプ (p 3) によってフィルターに送り込む系。
- ・ 脳組織維持部を灌流した培地をドレインポンプ (p 6) によってドレインボトルに回収する系。
- ・ 冷蔵している新しい培地を培地供給ポンプ (p 5) によって培地調整槽に送り込む系。
- ・ 培地調整槽内の p H が下がった時にアルカリポンプ (p 4) によってアルカリを添加するための系。
- ・ 薬液ポットに培地を入れ、薬液を添加後その液を薬液ポンプ (p 1) によって脳組織維持部に送り込むための系。

フィルター部には 2 個のフィルターが設けられておりピンチ弁によって切り換えることができる。

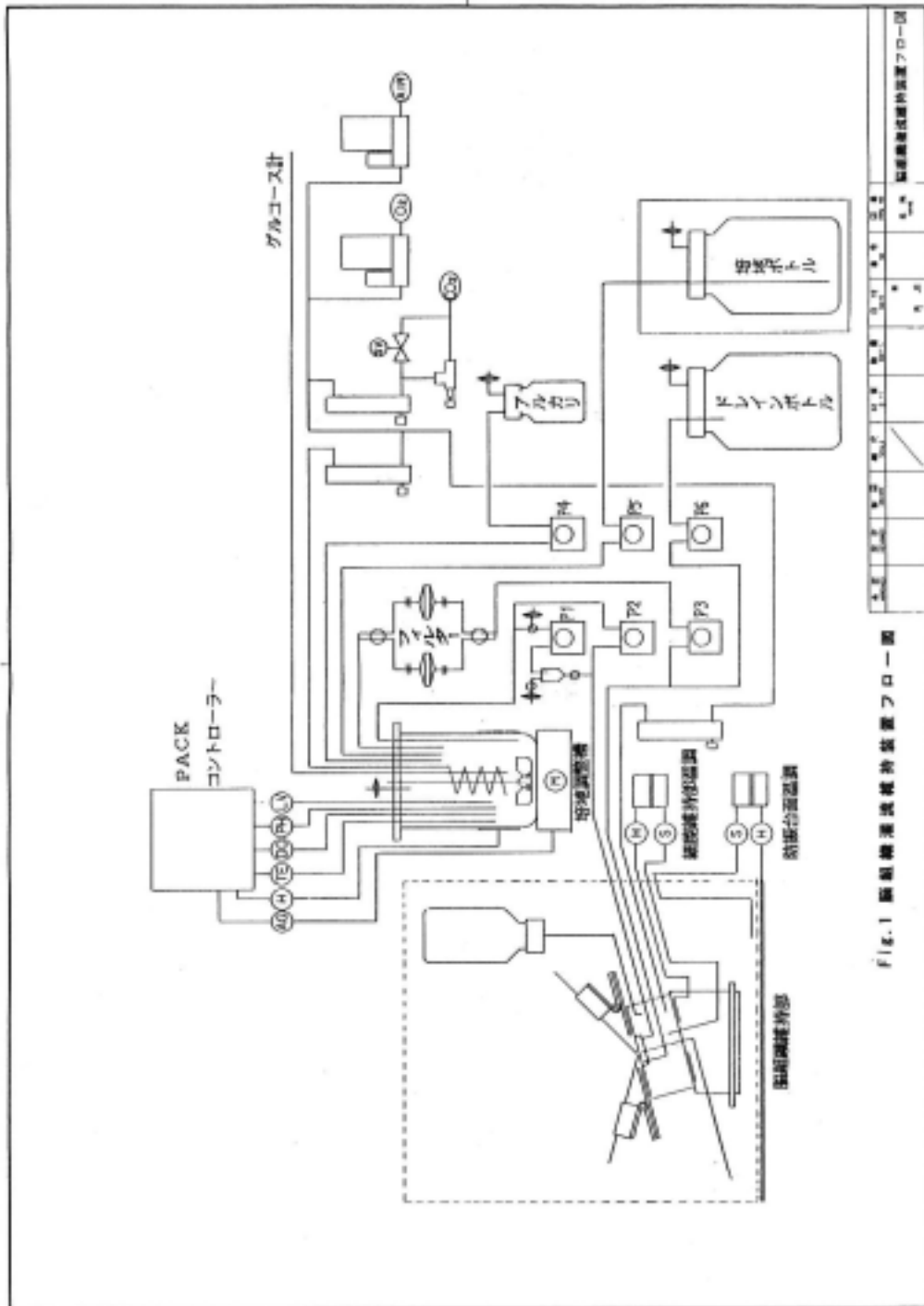
ノイズ対策

脳組織に微弱電気刺激を与えた時のレスポンスを計測する際、計測系にノイズが混入しないようにするために、次のような方策を施した。

- ・ 培地調整槽の液面制御は通常電極式が用いられる。この方法では下限液面より液量が多い時は 2 電極用に微弱ではあるが電流が流れてしまう。こ

の現象をさけるために本装置においては光による液面センシングを採用した。培地調整槽のガラス容器の所望液面の高さに発光部と受光部とを向かい合わせ液面が下がった時に受光し、液面が上がった時には光が水中に入る時に屈折するために受光しなくなることによりセンシングするものである。

- ・ 攪拌機構には通常速度コントロール機構を付与するが、この機構をつけることにより高周波のノイズが発生する。これを避けるために本装置においてはギヤボックスによる減速だけとした。このため回転速度を変更するにはギヤボックスを交換する必要がある。



・マスフローコントローラを使用するには 24V 及び $\pm 15V$ の直流を供給する必要がある。市販のマスフローコントローラに付属してくる直流電源はいわゆるスイッチング電源であるため、強い高周波ノイズが発生する。今回は、トランスによる降圧とダイオードスタックによる整流及び三端子レギュレータによる調圧による電源を製作しノイズ発生を抑えた。

完成した装置

完成した培地調整槽及びコントローラを Fig.2 に示す。正面パネル面の左上にコントローラが、手前にガラス製の培地調整槽が、その前のパネル面にガス流量計及び温度調整器が配置されている。



Fig.2 培地調整槽及びコントローラ

5.2.1.3 脳組織維持部

脳組織維持部は脳組織を灌流維持する部分、その脳組織を観察するため顕微鏡、及びこれらを取り囲み無菌性を維持するためのチャンバーとから構成されている。

脳組織維持部の構造

Fig.3 に脳組織維持部とマニピュレータの部分を示す。

脳組織は厚さ 1.5 mm 前後で 3 程度の円筒状に切り取られた状態で灌流維持される。親水性を有する多孔質円板 (20 × 2 mm t) の中央に 2 の孔をあけ、そこに脳組織を入れて多孔質円板の上方断面から培地を供給し、下方断面から脳細胞を通過した培地を回収する。

脳組織維持部の下は水が入れてあり温度調節されている。

培地はこの温調水中に通したチューブを通る間に所温度になる。またこの水中に酸素を主成分とし炭酸ガスを含むガスを吹き込むことにより充分湿度をもった混合ガスが維持中の脳組織の表面に送り込まれる。

マニピュレータ及び電極取付部

マニピュレータは X, Y, Z 方向に微動調節ができ、かつ刺す方向には粗動調節もできる構造とした。

さらにマニピュレータ取付部はセンサーにある脳組織を中心として角度を変えられるような構造とした。(Fig.4)

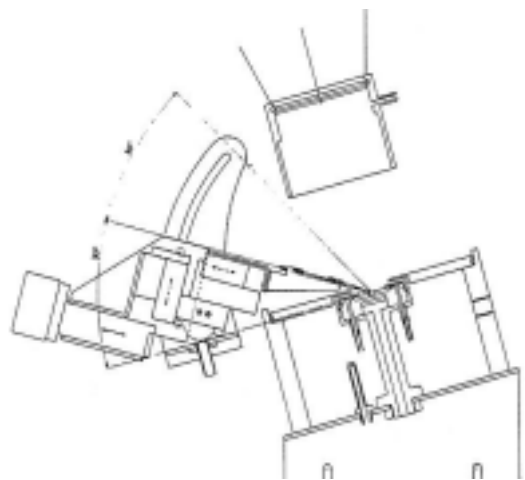


Fig.3 マニピュレータ及び電極取付部

顕微鏡部

灌流維持部の脳組織を観察するための顕微鏡は脳組織を所定の位置にセッティングする時には後方に傾いて作業がやりやすい構造とした。

チャンバー部

灌流維持中の脳組織を無菌状態に保つために ~ の部分を気密性のチャンバー内に収納した。

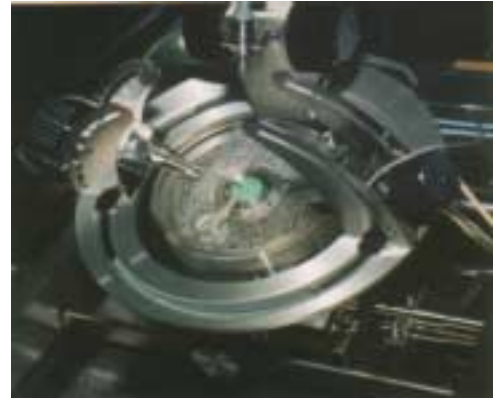


Fig.4 脳組織維持部及びマニピュレータ部

脳組織に電極を刺し電極間に電気刺激を与えた時のレスポンスを計測する

場合、計測対象となる電圧は μV オーダーである。このためチャンバー内には静電気あるいは電磁波によるノイズが入らないようにするための工夫が必要である。

今回は特殊な機能を有する透明塩ビの二重構造とすることで保温性とノイズ耐性とを持たせることとした。内側は帯電防止能をもつ制電プレート（ND7：タキロン製）の厚さ3mmとし10mmのスペーサーをはさみ、外側は電磁ノイズ防止と帯電防止の両法を兼ね備えた制電エミカ（TEND：タキロン製）を使用した。ステンレス製枠体に上記の二重構造を持つパネルをステンレスビスでとめることによりノイズ耐性の高いチャンバーを製作した。

チャンバー部前面には手入窓があり、ここから脳組織維持部周辺に配置した機器を操作することができる。

チャンバー内にある脳組織維持部への配管、マニピュレータの配管、温度センサーリード線等を外部に引き出すためにチャンバーの側面にシール性を確保できる構造を有する貫通部を設けた。

また実験開始前に内部の滅菌をするための紫外線ランプ及びHEPAフィルター付ブローアを設けてある。

ノイズ対策

ノイズ低減のため次のような方策を施した。

- ・ 脳組織維持部の温度を調節するために組織維持部の下部にラバーヒーターが設けられている。このヒーターの電源には直流を用いている。さらに制御のためのON/OFFノイズをさけるために連続出力制御方式を採用した。
- ・ チャンバー全体の温度調節のためにチャンバー底部のステンレス板の下にラバーヒーターを入れた。

温度調節のための出力制御は通常のPID制御によることとしたが、ゼロクロス素子を用いることにより制御時のノイズ発生を抑えた。

完成した装置

完成した脳組織維持チャンバーの内部を Fig.5 に示す。中央に顕微鏡がありその下に脳組織維持部が見える。

中央に脳組織を灌流維持する多孔板があり左右にマニピュレータ取付台が配置されている。このマニピュレータ取付台は脳組織維持部周辺に設けられた平面リング上の自由な位置に移動させることができる。さらにこのマニピュレータ取付台は平面リング上を移動できる円弧状の切り欠きにそって位置を変えることにより脳組織に対するマニピュレータの角度を変えることができる。



Fig.5 脳組織維持チャンバー

5.2.1.4 結言

脳組織に無菌状態で成分調整した培地を連続供給することにより、長時間安定に維持するための脳組織灌流維持装置を設計、製作した。電気刺激の伝達計測及び各部での酸素濃度計測等を行う際のノイズ雰囲気チェック及び低減、脳組織及び電極のセッティング部周辺の改良等が今後の課題である。

5.2.2 脳組織代謝活性と神経活動の維持

5.2.2.1 緒言

生体の仕組みを科学的に明らかにしていくに際して、生体内部の複雑な相互作用を比較的単純で再現性のある個々の仕組みに分解することで解析がより容易になる場合がある。この意味で人や動物の組織を生体外に取り出すことは極めて強力な手法である。実際ミクロレベルの解析の殆どはこのような方法によってもたらされてきたといってもよいだろう。

脳の研究についてもこのことはあてはまり、生きた動物を用いることで行動学的な目に見える現象あるいは比較的大きな機能単位の特定は可能だが、神経細胞レベルの詳細な解析を行うことは極めて難しい。そこで脳組織を動物の死後取り出し固定した上で、細胞の微細構造や相互連絡を観察するという手法によって膨大な解剖学的知見が蓄積されてきた。

しかし一方で、死滅し代謝活性を失った状態の組織から得られる情報には大きな限界があることも事実で、特に複雑な脳の機能に踏み込む際には脳の正常な代謝が維持され、神経活動を伴った状態で取り出し研究したいという要求には極めて切実なものがある。われわれはこのような問題に対して新しい角度からアプローチし、ある程度の結果を得つつあるので報告する。

5.2.2.2 従来の手法の問題点

これまで脳の組織代謝活動を維持しつつ生体外に取り出すという目的で行われてきた方法を振り返ってみると、大きく二つの方法にわけられる。その一つは急性実験とよばれるもので、取り出した組織の代謝をなるべく落とすことで細胞死への時間を延長し、その数時間ほどのうちに必要な実験を行うというものである¹⁾。

この場合、脳組織は塩類とグルコース、酸素のみが与えられ、アミノ酸、脂

質、ビタミン、ホルモン類といった通常の代謝活動の維持に必須な物質は与えられない。また代謝を少しでも抑制するために通常よりも低温下に維持されるので、神経の自発活動もほとんどみられない。非常に簡便に実験が行えるので広く利用されているが、脳組織は不可逆的に状態が悪化し、10 数時間後には完全に死滅する。

もう一つの方法は組織培養法とよばれるもので、うすく切片状に取り出した脳をさまざまな物質を添加した培養液に浸すことで代謝活動を維持する。この場合、通常数ヶ月の間自発的な神経活動が保たれ、更に取り出された状態でも神経は成長し、正常に類似した神経結合の能力も維持される²⁾など注目すべき特徴を備えている。

しかし従来の組織培養法には大きな制約があった。それは培養可能な組織が胎児あるいは幼弱動物の脳組織に限られているということである。成熟動物の脳組織を取り出して培養液にひたすとただちに浮腫がおこり、もし代謝を落とさずに活動を持続させれば 2-3 時間のうちに大部分の神経細胞の萎縮変性を来す。

5.2.2.3 脳組織灌流による培養法の開発

(1) 予備実験の結果

われわれは上記組織培養法の問題点を克服するための第一歩として、成熟ラットの大脳皮質を従来行われてきたよりもはるかに薄く (100-150 μ) 切り出し、通常の培養液で培養してみた。その結果、約 1 週間にわたって一部神経細胞の生存維持が可能であることがわかった³⁾⁴⁾。このことは同じ切片のある一部を薄く、一部を厚く調製して同じ容器中で培養した場合にも薄い組織の部分のみが神経細胞の形態を保っていたので組織の厚さが決定的な要因であることが確実と思われた。

組織を薄くするとどうして神経細胞が維持されるのだろうか。我々はそれを酸素や培養液の浸透が組織内部まで十分になされること、および組織代謝産物がすみやかに外部へ拡散することで細胞に与えるダメージが最小限で済むことの二つの理由によるものと考えた。もしそうであるならば培養液と酸素の浸透ならびに代謝産物の除去を保証することによってより大きな神経ネットワークを内在した厚い組織であっても維持できる可能性がある。更に将来的には、大人の脳全体を生体外に取り出して長期にわたり生存させるという方向性も原理的には射程に入ってくる。そこで次の段階として、より厚い切片の培養可能性を探るため、以下の二つの方向で実験を行った。

(2) 培養雰囲気中酸素分圧のコントロール

通常、培養雰囲気中の酸素分圧は、空気中の酸素分圧にあたる 21% が用いられている。ここでもし脳切片を通常よりも高酸素分圧下に置けば組織のより深い部分まで高い組織内酸素分圧が維持され、従来より厚い組織でも培養できる可能性が考えられた。そこで、 $N_2 - O_2 - CO_2$ 3 成分インキュベーター (タバイ BNP-110M) を用いて 5-90% の各酸素分圧下で培養を行った。Fig.6 左は 90% 酸素分圧下で 400 μ 厚のラット大脳皮質切片を 4 時間

培養した後、パラホルムアルデヒドで固定しニッスル染色を行ったものである。強拡大の図をみると神経細胞に著しい萎縮変性が見られることが明らかである。8 例行い全例について同様の結果を得た。つまり酸素分圧を90%まで上昇させてもわずか4時間以内に大半の神経細胞に細胞死のおきることが明らかとなった。酸素分圧を空气中と同じ 21% O₂にした場合も11 例行ったが同様の結果であった(Fig.6 右)。

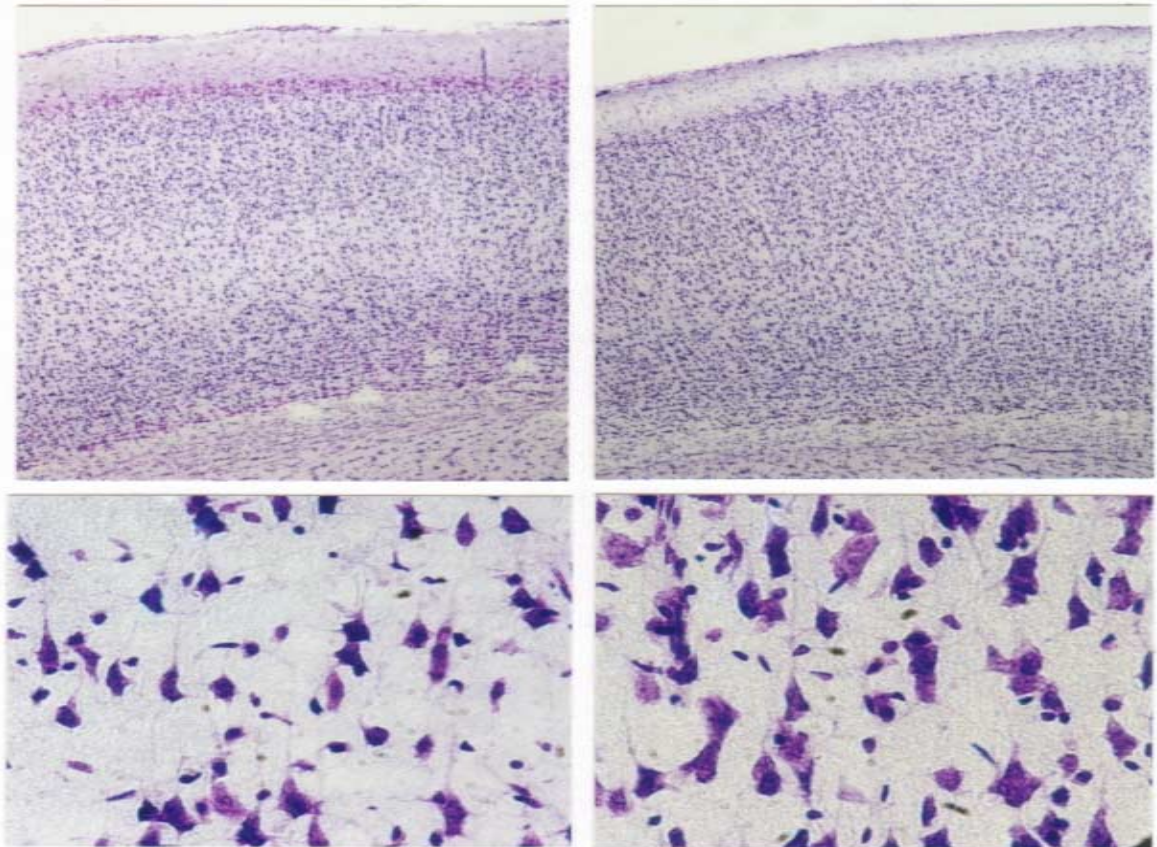


Fig.6 90% O₂ならびに 21% O₂分圧下で培養した 400 μ 厚大脳皮質
左上：90% O₂分圧下 4 時間培養後、左下：同 V 層付近の強拡大像
右上：21% O₂分圧下 4 時間培養後、右下：同 V 層付近の強拡大像

ちなみに酸素分圧を上げた場合細胞毒性も考えられたので逆にごく低濃度の 5% O₂も試したが萎縮に対する改善はみられなかった(2 例、データ省略)

つまり単に酸素分圧を上下するだけでは組織の変性は避けられないことが明らかとなった。ちなみにこれらの例で組織表面に存在する神経も同様に細胞死をおこしていることは注目すべきことである。例えば 21% O₂下で薄い組織の場合には表面で細胞の維持ができているわけであるから、組織が厚くなり内部にある細胞の維持ができなくなると、それが表面の健全な細胞にも何らかの方法で伝搬して致命的影響を及ぼすことを意味している。

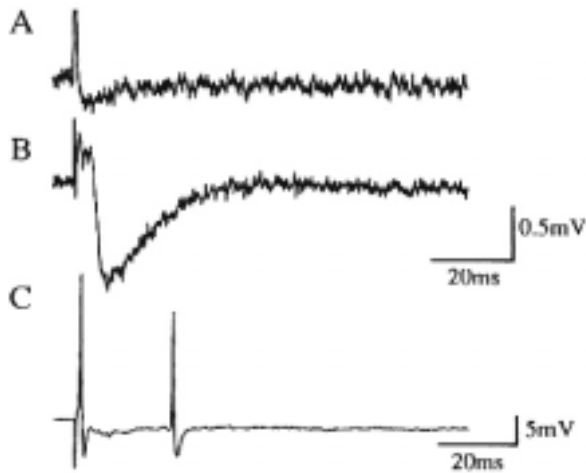


Fig.9 培養液静止時ならびに灌流時の神経活動
A:培養液静止 4 時間後の反応.第 V 層細胞外記録
90%O₂ 下.B:培養液灌流 4 時間後の反応.C:灌流 7 時
間後の細胞内記録.正常活動電位が発生している.

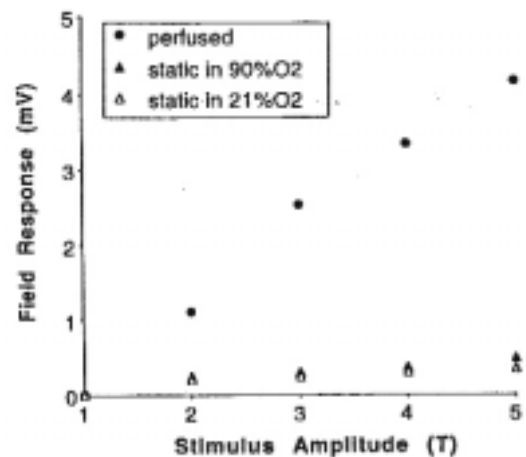


Fig.10 培養液灌流時と静止時の刺激強度-反応関係.
は灌流時. は 90%O₂ 下静止時. は 21%O₂ 下静
止時.横軸は反応を生じる限界電流を T とした時の
相対刺激強度.縦軸は第 V 層細胞外反応強度.

培養開始後 4 時間において培養液静止時と灌流時とで比較した結果を Fig.9 に示す。すなわち培養液が静止時には十分な強度で刺激しても殆ど反応がないのに、培養液を毎分 1.2ml で灌流した場合には大きな反応が生じている。C は灌流 7 時間後に細胞内記録を行ったものである。活動電位の解析から神経活動が正常であることもわかる。この組織ではその後も 18 時間にわたって神経活動を記録できた。同様の結果は 6 例行い全例について確認された⁵⁾。

比較のために Fig.10 に培養液を灌流した場合と 90%および 21%酸素分圧下で静置培養した場合のそれぞれについて、刺激強度と細胞外反応強度との関係を示した。記録は培養開始 4 時間後に行った。Fig.11 には培養液灌流を行った組織のニッスル染色像を示す。神経細胞の形態は正常で萎縮は見られない。

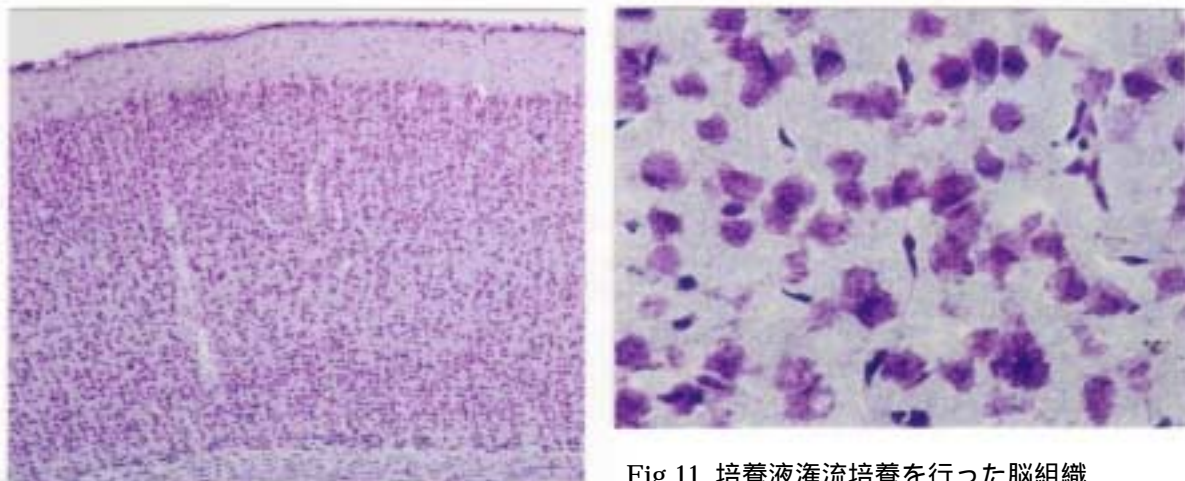


Fig.11 培養液灌流培養を行った脳組織
左:全体像. 右:V 層付近の強拡大図

(3) 培養液灌流による効果

さて正常は成熟脳が幼弱脳に比べて圧倒的に異なるところは血管支配の程度である。すなわち成熟脳組織の代謝活性を維持するためには、網の目のように張り巡らされた毛細血管血流による絶え間ない物質の供給と除去が不可欠なものとなっている。このことを上記の高酸素分圧下における培養の結果と考えあわせるとき、成熟脳の培養においては、培養液の交換頻度を幼弱脳の場合よりも圧倒的に高める必要があるのではないかと考えられた。

通常幼弱脳の培養においては培養液を週に2回ほど交換する。もしこれを数時間おき、あるいはもっと高頻度で交換するとなると長期の培養は次第に非現実的なものとなる。つまり組織の維持に最適な灌流速度を調べるためには、どうしても常時連続的に培養液を灌流する必要性がでてきた。

当面、完全に無菌下閉鎖系でこれを行いつつ電気生理学的記録をとって神経活動を調べる為の方法がなかったため、まずオープン系(Fig.7)でこれを行った。

Fig.8 には培養液灌流中の脳組織を示す。ラット大脳皮質視覚野を用い、組織の神経活動をモニターするために白質を電気刺激して興奮部位において細胞外および細胞内記録を行った。

ちなみに毎分 0.3ml の灌流速度をもちたい場合には直ちに電気生理学的反応の不可逆的減弱がおこった。一方この灌流速度下であっても栄養物質を含まない塩類とグルコースのみの溶液中に切片を置いた場合には、組織が数時間維持できることがこれまでの研究からわかっている。従って十分な栄養が与えられ正常に近い代謝活性下に置かれた成熟脳組織の維持には、ある程度以上の灌流速度を維持して速やかな物質交換を行っていくことが不可欠であることが示唆された。

なお以上の実験は酸素リッチな培養環境下(95%O₂)のオープン系で行ったため、10 数時間で激しい雑菌の混入を見ることがとなり、より長時間の記録観察は不可能であった。また各種ホルモンを含んだ高価な培養液を大量に消費する(2L/日以上)ためにいったん灌流した培養液の再利用を検討する

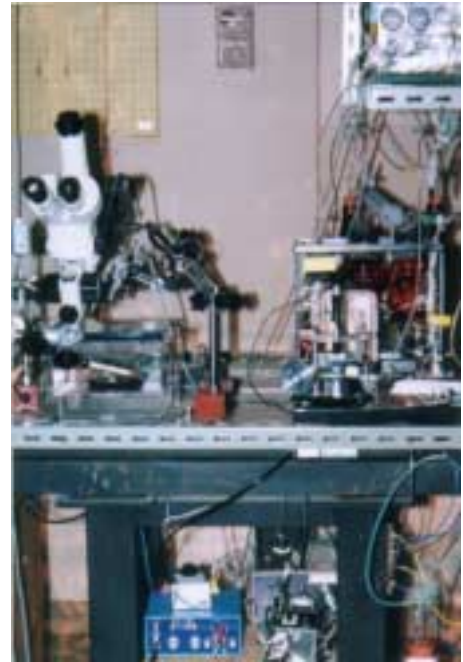


Fig.7 オープン系による灌流培養



Fig.8 培養液灌流中の脳組織

4本の金属は白質におかれた刺激電極

必要があった。

そこでエイブル社での開発研究によってこれらは無菌下で行い、培養液の溶存酸素や pH、グルコース濃度などを計測しつつ、神経活動を記録することができる脳組織灌流維持装置を開発した(5.2.1に記載)。現在本装置を利用して最適培養条件を探り、成熟脳組織培養法としての確率を目指している。

(4) 組織中の呼吸代謝活動計測の必要性

上記培養維持装置を利用する際に目安となるものの一つは、神経の電気活動であるが、もうひとつ重要なものにたとえば組織の酸素消費量などの代謝活性がある。そもそも脳は全体が一様な細胞の集まりではなく、それぞれ異なる機能を持つ細胞が高度に組織化された集団である。脳全体が一様に興奮することは正常では有り得ないことなのである。したがって代謝に関連したパラメーターを測定する際に組織を灌流してきた後の培養液中の値を調べるだけでは、脳の状態を把握できない。たとえば酸素代謝についても溶存酸素だけでなく、脳実質内部の局所酸素分圧の変化を神経活動との関連のなかでリアルタイムに測定していくことがどうしても求められていく。その為の現在もっとも有力な方法は酸素電極を用いた脳内酸素分圧の測定である。

この古典的とも言えるテーマはヘモグロビンの酸化還元状態の光学的測定という洗練された手法が現実化した今日なお極めて重要な手法として再び注目を集めつつある。それはこの方法が唯一の直接測定法であるからで、その難しさゆえに敬遠されてきたきらいがあるが最新の技術を用いて信頼性のあるデータの得られる電極の開発ができれば状況が一変する可能性を含んでいる。この試みについては5.2.3に述べる。

5.2.2.4 結言

以上の研究により、生体外に取り出した脳組織に対して培養液を連続的に灌流してやることにより神経細胞の萎縮変性が防止でき、また神経活動も維持される可能性が明らかとなってきた。今後長期にわたって組織を維持するためのもっとも適切な灌流速度や培養液組成、酸素分圧などを調べると同時に、脳細胞を積極的に興奮させたときと平常時とで代謝パラメーターにどのような違いがでるのかを明らかにしていきたい。

またより大きな脳組織を培養するための方法論についても検討する。これについて現在のところ培養液については受動的浸透を主に利用しているが、今後は血管系をなるべく保存しつつ脳を摘出し、その後圧力チェンバーにより強制的に頭蓋内圧程度の灌流圧をかけることや、あるいはまた血管内カニューレをつかった培養液の脳内灌流も試みる必要があると考えている。

ところでわれわれは成人の脳に関する様々な問題に新しい角度からアプローチするための一つの手法として本培養法を捉えているが、今回の装置をもとに基礎的研究を十分に行い実用化していくことは、たとえば透析や移植を目的とした人工臓器の開発、あるいは生体組織を用いた物質生産の分野とも共通する部分が多いのではないと思われる。

というのはこうした他分野では現在単一種類の単離細胞の集合培養が主に用いられているが、今後は異なる性質を持つ細胞の共培養や、更に組織レベルの培養が重要なテーマになる可能性がある。そのような時に培養組織を一定の方法で刺激することでより生体に近い状態を再現し、その活動の動的変化をリアルタイムに解析して機能の理解に結びつけていくことがますます求められていくものと考えられるからである。

参考文献

- 1) 山本長三郎、黒川正則：脳細胞と物質の働き V - 試験管内の脳 -、科学 40、157-166 (1970)
- 2) 山本恒彦、山田克也：脳のスライス培養を用いたニューロンネットワーク形成の研究、細胞工学 10、209-214 (1991)
- 3) K Yamada and T Ogawa, Slice cultures of 3-4 week-old rat visual cortex., The Japanese Journal of physiology, 44, suppl.1 S162 (1994)
- 4) K Yamada, T Shirokawa and T Ogawa, Organotypic slice culture of 3-4 week-old rat neocortex, 24th. Annual Meeting Society for Neuroscience, 28.20 (1994)
- 5) K Yamada and T Ogawa, Effect of partial oxygen pressure on survival of adult neocortical slice culture preparation, Neuroscience Research, Supplement 20, S268 (1996)

5.2.3 微小酸素電極の開発

5.2.3.1 緒言

大脳皮質では、外部からの刺激に対して特定部位の神経細胞が興奮し（一次信号）、引き続いてその周辺部において酸素、炭酸ガス、ブドウ糖等、代謝に関連する物質の濃度変化（二次信号）が発生する。

本開発では、その二次信号の代表例として酸素を取り上げ、大脳皮質の特定部位における秒以内の酸素濃度の変化を補足するための微小酸素電極を開発する事を目的とした。

5.2.3.2 微小酸素電極の設計

微小酸素電極の設計には、微生物や動物・植物細胞の培養分野において当社が培ってきた技術を生かし、別紙 Fig.12、Fig.13 の概念図に示すような、分離型酸素電極および一体型酸素電極の2種類の電極を設計し、最終的には Fig.13 の一体型酸素電極の完成を目標とした。

Fig.12 の分離型酸素電極では、大脳皮質の特定部位には白金単極のみが挿入され、別途電氣的に導通のある場所におかれる対極（銀/塩化銀電極）と組み合わせる事によって、白金単極先端部に露出させた白金表面上で酸素を還元し、その時流れる還元電流を計測する事で、酸素濃度の変化をとらえる事が出来る。

一方、Fig.13 の一体型酸素電極では、分離型酸素電極に置いて独立している2本の単極（白金単極、対極）を、一本のガラス管の内部に電解液とともに封入し、電極先端部にガス透過性の隔膜を設けた物であり、そのまま大脳皮質の特定部位に挿入される。

図では、一体型電極の電極先端部の径が分離型電極（白金単極）と比べて太くなっているが、これは電極構造をより明解にするために太く描いたものであり、実際に目標とした電極先端径は、分離型電極、一体型電極どちらも5 μ以下である。

更に、最終的な微小領域の計測のためには、技術的に可能であれば1 μ以下の径が望ましいと考えた。

5.2.3.3 分離型酸素電極の製作方法

分離型酸素電極の制作方法を以下に説明する。

リード線と白金線の溶接

10 μの白金線と 0.3 位の銅線リード線を使用。

溶接電極面が小さなスポット溶接機にて溶接する。

尚、テフロン被覆により絶縁した銅線を使用する場合は、電氣的に導通が必要な両端部分は、被覆を除去しておく。

白金線の電解研磨

においてリード線と溶接した白金線の先端を、マイクロフォージを使用し、飽和硝酸ナトリウム水溶液中で銀を対極に電気研磨を行い、電極先端部に露出させる白金部分の径を更に細く研磨する。

ガラスキャピラリーの製作

使用するガラス管は、予めアセトン中及び水中で超音波洗浄し乾燥させておき、キャピラリー製作用のプラーを使用して製作する。

ガラスキャピラリーの形状は、プレーで製作する際の製作条件（温度、時間、引く力等）によって決定されるため、使用するガラス管の種類及び目的とするキャピラリー形状に合わせて条件を設定する。

キャピラリー管へのリード線付白金線の挿入

白金線の先端にライトを当てながら、白金線を出せるだけキャピラリーの先端部分まで挿入する。

挿入後は、リード線の一部をガラス管に接着剤で仮固定しておく。

キャピラリー先端部のガラス封止

マイクロフォージを使用し、真空ポンプでキャピラリー内部を減圧しながら、先端部分より白金線ヒーターに近づけて、電極先端部分がまがらひよう注意しながらガラス封止する。

先端部分が封止されたら、リード線の全面を瞬間接着剤で完全にガラス管に接着する。

先端ガラス研磨

専用のベベラーを使用し、電極先端部分を研磨する。

ガラス封止までの工程の出来不出来により、先端部分の形状は様々であるので、先端形状に合わせて白金がきれいに露出するまで研磨する。

5.2.3.4 一体型酸素電極の製作方法

一体型酸素電極の製作方法を以下に説明するが、分離型酸素電極と重複する工程については説明を省略する。

尚、今回の開発期間内では、一体型酸素電極は完成には至らなかったため、一部予定していた方法を記述した部分もある。

リード線と白金線の溶接（説明省略）

白金線の電解研磨（説明省略）

白金線及びリード線の絶縁被覆

一体型酸素電極では、1本のガラス管の中に白金線及び対極を挿入するため、白金線及びリード線の方をフッ素樹脂溶液、パリレン等を用いて絶縁被覆する。

絶縁被覆後、白金線の先端部分を切断し露出させる。

ガラスキャピラリーの製作（説明省略）

キャピラリー先端部にガス透過膜を形成

キャピラリー先端部分に、シリコン、テフロン、リン脂質等のガス透過膜をディッピング、吸引、張り付け等の方法により形成させる。

キャピラリー管への電解液の注入

キャピラリー管に電解液を注入するが、まずはアルコールを注入してキャピラリー先端部分の気泡を完全に除去した後に、電解液を注入して徐々に入れ替えていく。

電解液の種類は対極の種類により、水酸化ナトリウム水溶液（対極：鉛）または塩化カリウム水溶液（対極：銀 / 塩化銀）を使用する。

キャピラリー管へのリード線付白金線の挿入（説明省略）

対極の製作

対極として鉛を使用する場合は、電解液としてホウフッ化鉛溶液を用いてステンレス線に鉛メッキを行う。

一方、対極として銀/塩化銀を使用する場合は、電解液として塩化カリウム溶液を用いて、銀線に塩化銀メッキを行う。

キャピラリー管への対極の挿入

で製作した対極をキャピラリーの中に挿入する。

どちらの対極の場合も、電解液に接触していれば良いので、余りキャピラリーの先端部分まで挿入する必要はない。

対極挿入後、リード線全面及び対極を瞬間接着剤で完全にガラス管に接着する。

5.2.3.5 製作した微小酸素電極の試験

5.2.3.4 に記述した通り、一体型酸素電極は完成に至らなかったため、分離型酸素電極の実験結果の1例を Fig.14 に示す。

これは、東北大学学際科学研究センターの安川様にご協力頂き採取した試験結果であり、下記の条件でのサイクリックボルタモグラムである。

溶 液：4 mM フェロシアン化カリウム

支持電解質：0.1M 塩化カリウム

参 照 極：銀/塩化銀電極（2極式）

掃 引 速 度：10mV/S

この結果より、0.3~0.5V に Fe の 2 価から 3 価への酸化反応の限界電流領域がきれいに見られ、製作した分離型酸素電極（白金単極）が正常に機能している事が確認できる。

また、電極先端部の白金径は、限界電流値 1.6nA より約 3 μ と推算され、最終的な議望の 1 μ 以下には達しなかったものの、当面の目標であった 5 μ 以下の条件はクリアした。

更に、大脳皮質の組織への挿入に関しては、問題なく挿入可能である事が確認されたが、実際に価値のある酸素濃度の計測データを採取するには至らなかった。

5.2.3.6 結言

今回の開発期間内においては、2種類の微小酸素電極（分離型、一体型）のうち、分離型酸素電極の開発は成功に至ったものの、実際の大脳皮質内の酸素濃度の計測や一体型酸素電極の開発は成功には至らず、今後、更なる進展のため努力したい所存であります。

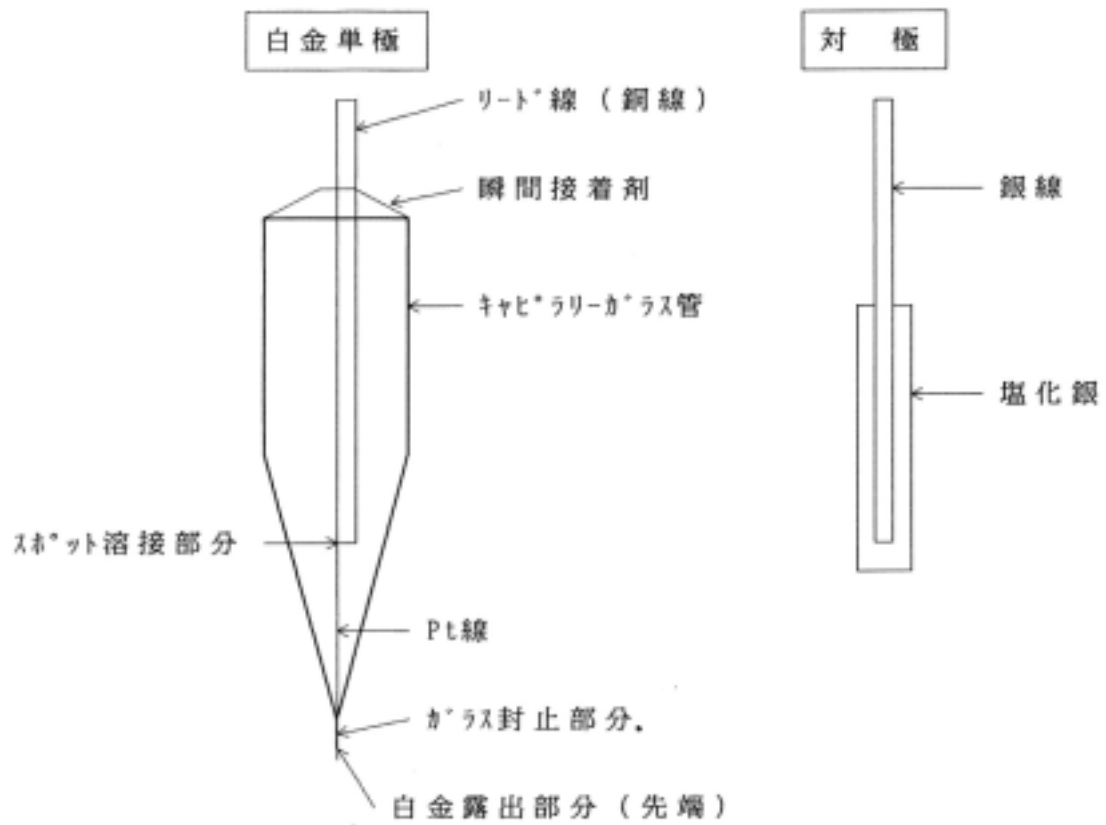


Fig.12 分離型酸素電極概念図

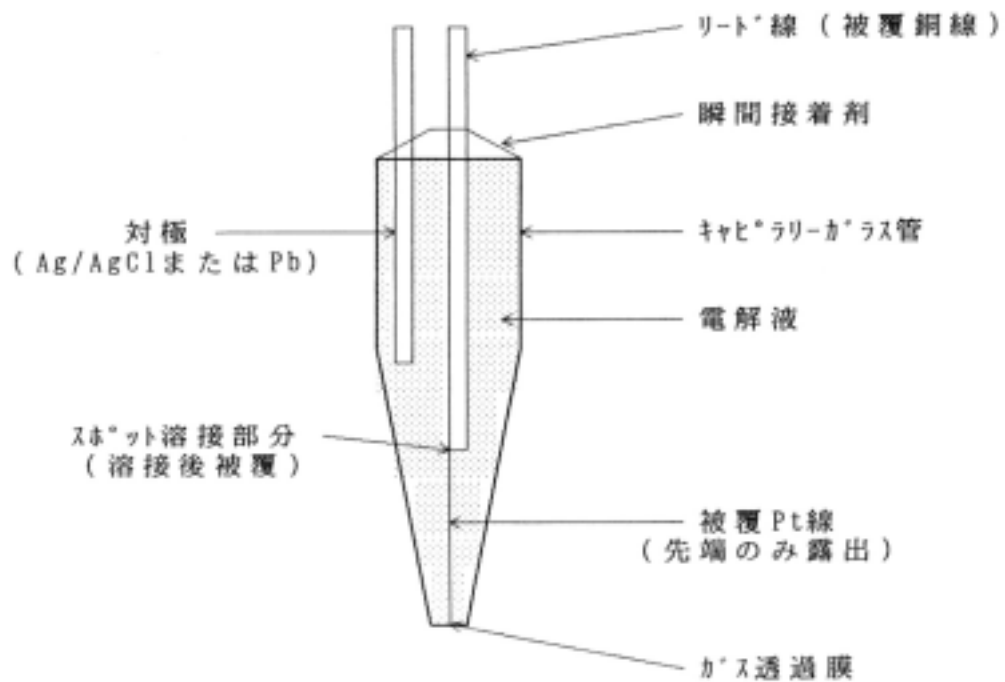
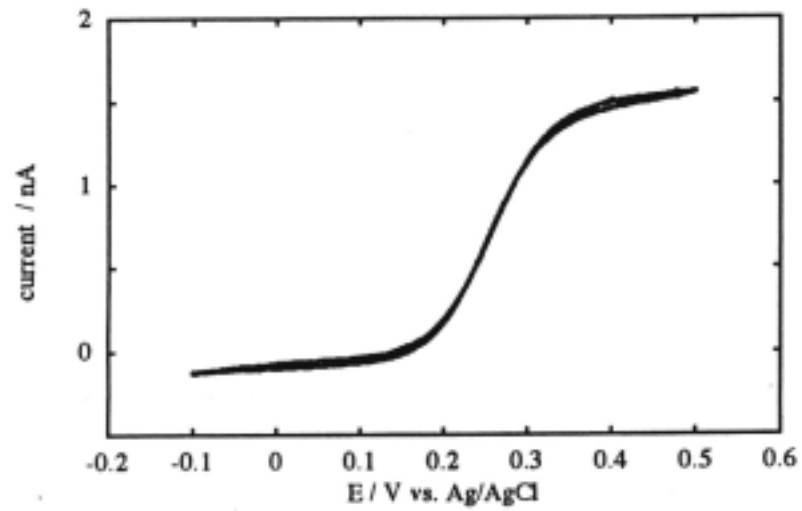
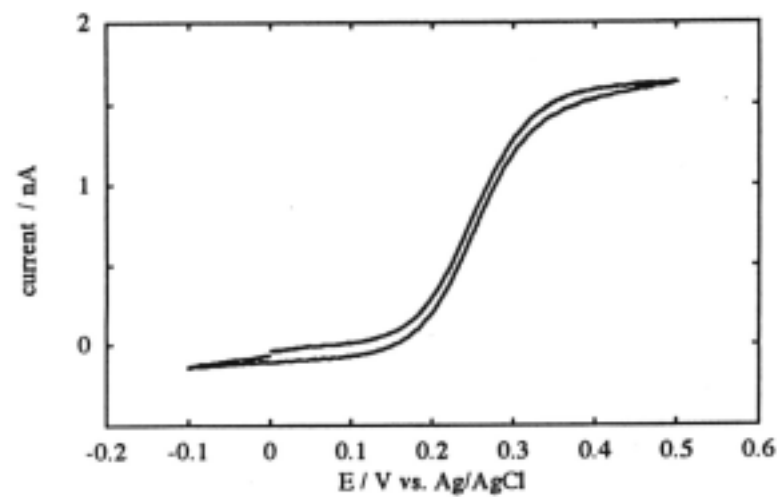


Fig.13 一体型酸素電極概念図



Cyclic voltammogram of 4mM $K_4Fe(CN)_6$
at a Pt microelectrode(NO.1) in 0.1M KCl.
Scan rate : 10mV / sec , RE : Ag/AgCl



Cyclic voltammogram of 4mM $K_4Fe(CN)_6$
at a Pt microelectrode(NO.1) in 0.1M KCl.
Scan rate : 10mV / sec , RE : Ag/AgCl

Fig.14 分離型酸素電極（白金単極）のボルタモグラム