



エイコム情報

No. 17

2012年3月改訂版

マイクロダイアリシスプローブについて

エイコム情報 発行と改版の履歴

No.1～No.14 廃版のため省略

- 1993.8 ※ 改訂No.15 アセチルコリン(ACh)、コリン(Ch)の分析 組織中ACh分析 2004.2 改訂
- 1994.9 No.18 バイオセンサーニュースNo.1 バイオセンサーによるグルタメートの測定 2007.5 廃版
- 1994.9 No.19 バイオセンサーニュースNo.2 バイオセンサーによるグルコースの測定 2007.5 廃版
- 1995.5 改訂No.16 モノアミンおよびそれらの代謝物の分析 1997.9 改訂 2002.9 廃版 No.25 に移行
- 1995.9 ※ 改訂No.17 マイクロダイアリシスプローブについて 2004.6 改訂 2012.3 全面改訂
- 1995.10 No.20 酸化窒素分析システム ENO-10 シリーズ 2004.2 廃版
- 1998.4 ※ No.21 酸化窒素分析システム ENO-200 シリーズ
- 1999.3 ※ No.22 金電極を用いたグルタチオン(GSH)の分析 グルタチオン、システイン、アスコルビン酸の同時分析
- 1999.10 ※ No.23 マイクロダイアリシス・HPLC によるアセチルコリン分析 ラット脳におけるアセチルコリンエステラーゼ
インヒビターを使用しない条件
- 2000.8 ※ No.24 ヒドロキシラジカルのサリチル酸トラップ法による測定
- 2001.4 ※ No.25 モノアミンおよびそれら代謝物の分析 2 EICOMPAK SC-50DS(φ3mm)カラムによる脳ホモジネートサン
プルの分析
- 2001.9 ※ 改訂No.26 マイクロダイアリシス分析システムによる神経伝達物質の測定 ドーパミン(DA)、セロトニン(5-HT)、ノ
ルエピネフリン(NE)、アセチルコリン(ACh)、アミノ酸の測定 2004.7 改訂
- 2001.9 ※ No.27 HTEC-500 分析システムによるマイクロダイアリシス試料中ドーパミン(DA)、セロトニン(5-HT)の高感度、5
分間測定
- 2005.9 ※ No.28 分離カラム GU-GEL および固定化酵素カラム E-ENZYPK による生体試料中グルタミン酸の測定
- 2007.12 ※ 改定No.29 HTEC-500 分析システムによる脳マイクロダイアリシス試料中ノルエピネフリン、ドーパミンおよびセロ
トニンの同時測定 (2007.4 初版より改定)

※印のエイコム情報が現在発行されているものです(2012.3 現在)

目次

	頁
はじめに	1
1. A-I 型プローブシステム	2
1-1 A-I-X-Y 型プローブ	2
1-1-1 A-I-X-Y 型プローブの内部容量	3
1-2 A-I-X-Y(M)型プローブ	4
1-3 MI-A-I-X-Y 型プローブ	4
1-4 E-A-I-X-Y 型プローブ	5
1-5 AZ-X-Y 型プローブ	5
2. CX-I 型プローブシステム	6
2-1 CX-I-X-Y 型プローブ	6
2-1-1 CX-I-X-Y 型プローブの内部容量	7
3. C-I(IB)型イナート仕様プローブ	8
4. D-I 型プローブ	9
5. OP 型プローブ	10
6. TP 型プローブ	10
7. LP 型プローブ	11
8. プローブホルダー	11
9. マイクロインジェクションカニューレ	12
9-1 AMI 型マイクロインジェクションカニューレ	12
9-1 CXMI 型マイクロインジェクションカニューレ	12
10. 透析膜と回収率について	13
10-1 <i>In vitro</i> 回収率	13
10-2 <i>In vitro</i> 回収率と温度の関係	13
10-3 <i>In vivo</i> 回収率	14
11. 施術方法	14
11-1 プローブチェック	14
11-2 脳への固定	15
12. 特注プローブについて	16
13. プローブ、ガイドカニューレおよびダミーカニューレの滅菌について	16

はじめに

マイクロダイアリシス(微小透析)法は、生体中に存在する分子の連続サンプリング法として確立され、生命科学研究分野で幅広く応用されています。本法は歴史的には脳神経科学分野において発展してきましたが、現在ではその応用範囲は末梢臓器・組織、皮膚、血液などのほか細胞培養液など多岐にわたります。

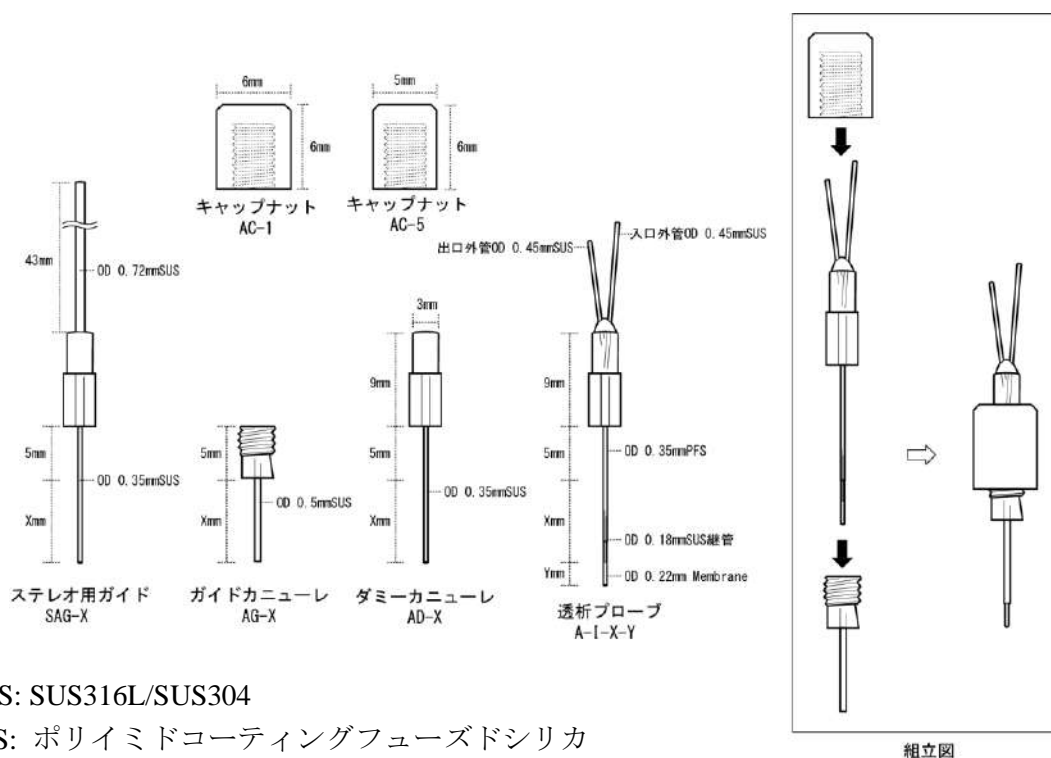
株式会社エイコムでは、1980年代より各種マイクロダイアリシス用プローブの製造・販売を行い、日本のマイクロダイアリシスの歴史と共に歩んでまいりました。弊社がご提供するプローブも研究者の皆様方のニーズの変化とともに様々に発展・進化を続けております。

本書では、弊社が製造販売する各種マイクロダイアリシスプローブについて解説致します。

1. A-I 型プローブシステム

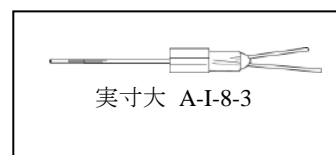
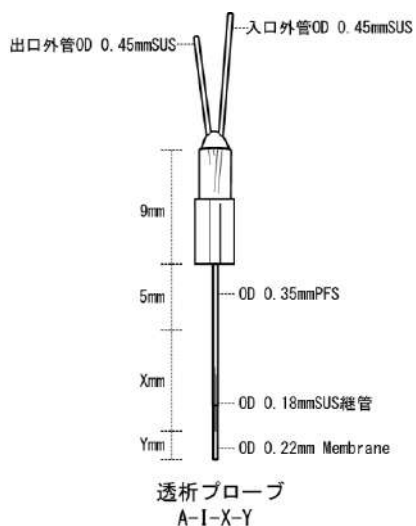
予めガイドカニューレの埋め込み処置を施した動物にプローブを挿入してネジ式のキャップナットで固定するシステムです。透析膜とシャフトの接続に特殊な極細管を用いることにより、外径 0.35mm という細さを実現しています。サンプリング中にプローブが抜け難いので、無麻酔・無拘束下での長時間のサンプリングに適しています。

プローブの有効埋込み長さ(Xmm)および膜長(Ymm)をご指定下さい。

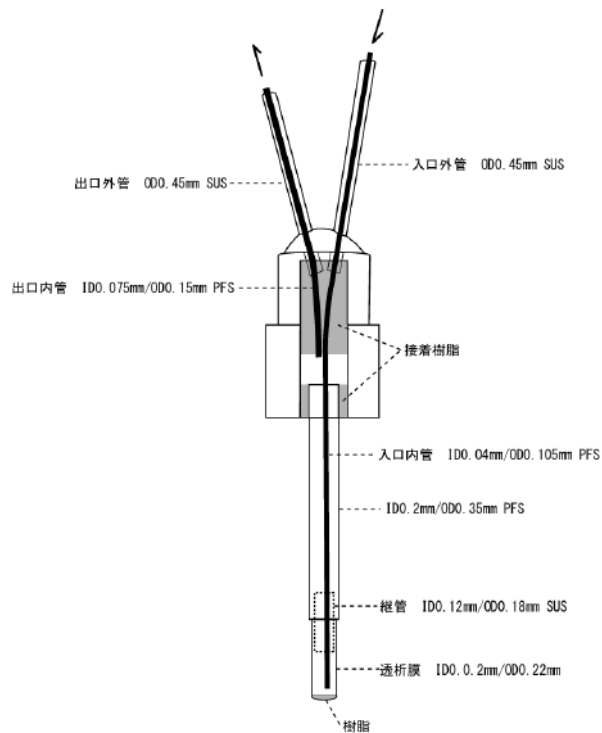


1-1 A-I-X-Y 型プローブ

再生セルロース製透析膜を採用した標準型プローブです。



プローブ	A-I-X-Y
ガイドカニューレ	AG-X
ダミーカニューレ	AD-X
キャップナット	AC-1/AC-5
ステレオ用ガイド	SAG-X



A-I-X-Y 型プローブの内部構造模式図

1-1-1 A-I-X-Y 型プローブの内部容量

A-I 型透析プローブの内部容量(デッドボリューム)の目安

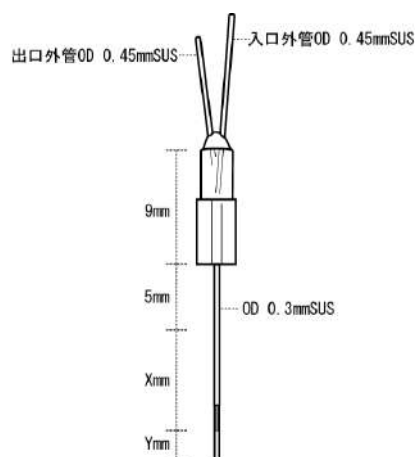
プローブ	X mm	Y mm	入口側容量 (μL)*	出口側容量 (μL)*
A-I	4	1	0.036	0.331
		2	0.038	0.354
		3	0.039	0.377
		4	0.040	0.400
	6	1	0.039	0.377
		2	0.040	0.400
		3	0.041	0.422
		4	0.043	0.445
	8	1	0.041	0.422
		2	0.043	0.445
		3	0.044	0.468
		4	0.045	0.491
	12	1	0.046	0.513
		2	0.048	0.536
		3	0.049	0.559
		4	0.050	0.582

*入口から膜先端までが入口側容量、膜先端から出口までが出口側容量となります。

上記の内部容量は設計上の計算値であり、厳密には実際の内容量と異なる可能性があります。あくまでも目安とお考え下さい。

1-2 A-I-X-Y(M)型プローブ(A-I型メタルシャフトプローブ)

プローブシャフトが金属(SUS)製で再生セルロース製透析膜を採用した標準型プローブです。シャフトの物理的強度が高く取り扱いやすいプローブです。



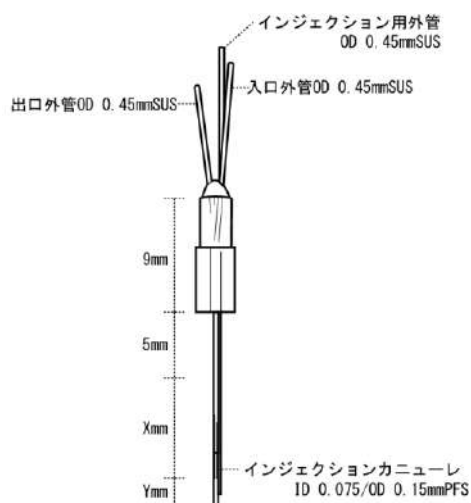
A-I型メタルシャフトプローブ
A-I-X-Y(M)

プローブ	A-I-X-Y(M)
ガイドカニューレ	AG-X
ダミーカニューレ	AD-X
キャップナット	AC-1/AC-5
ステレオ用ガイド	SAG-X

注意 A-I-X-Y(M)型プローブの X(有効埋込み長さ)は、4 / 8 / 12 mm から選択して下さい。

1-3 MI-A-I-X-Y 型プローブ(マイクロインジェクションニードル付プローブ)

標準型 A-I-X-Y プローブに内径 0.075mm のインジェクションニードルを追加したものです。マイクロダイアリシスと同時に薬液を投与する場合に使用します。ガイドカニューレおよびダミーカニューレは MI-A-I 型専用サイズとなります。キャップナットは標準 A-I 型と共通です。インジェクションニードルの先端位置は標準では膜中央部ですが、先端位置をご指定頂く事も可能です。

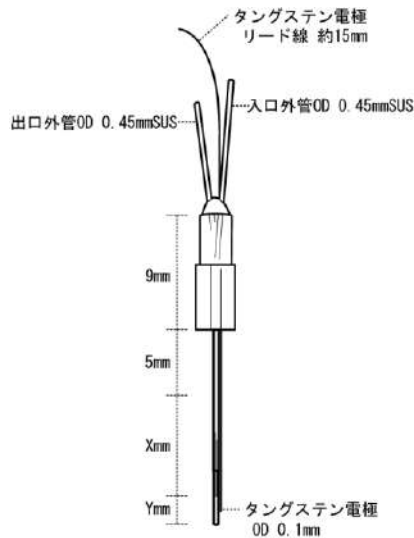


マイクロインジェクションニードル付プローブ
MI-A-I-X-Y

プローブ	MI-A-I-X-Y
ガイドカニューレ	MI-AG-X
ダミーカニューレ	MI-AD-X
キャップナット	AC-1/AC-5
ステレオ用ガイド	MI-SAG-X

1-4 E-A-I-X-Y 型プローブ(刺激電極付プローブ)

標準型 A-I-X-Y プローブに被覆タングステン電極を追加したものです。マイクロダイアリシスと同時に電気刺激を行う時に使用します。電極は 2 本まで追加する事が可能で、電極が 1 本の場合はガイドカニューレ、ダミーカニューレは MI-A-I-X-Y と共通です。電極先端は標準では膜中央部ですが、先端位置をご指定頂く事も可能です。



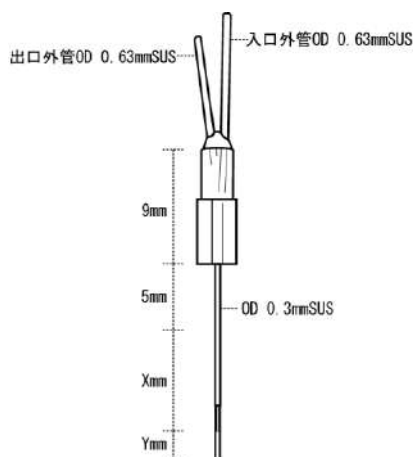
刺激電極付プローブ
E-A-I-X-Y

プローブ(電極 1 本)	E-A-I-X-Y
ガイドカニューレ	MI-AG-X
ダミーカニューレ	MI-AD-X
キャップナット	AC-1/AC-5
ステレオ用ガイド	MI-SAG-X

プローブ(電極 2 本)	WE-A-I-X-Y
ガイドカニューレ	NG-X
ダミーカニューレ	ND-X
キャップナット	AC-1/AC-5
ステレオ用ガイド	SNG-X

1-5 AZ-X-Y 型プローブ

標準型よりも太い IN-OUT 接続管を持つ金属シャフトプローブです。接続チューブが太い他社製のマイクロダイアリシス送液システムと接続しやすいプローブです。



AZ型プローブ
AZ-I-X-Y

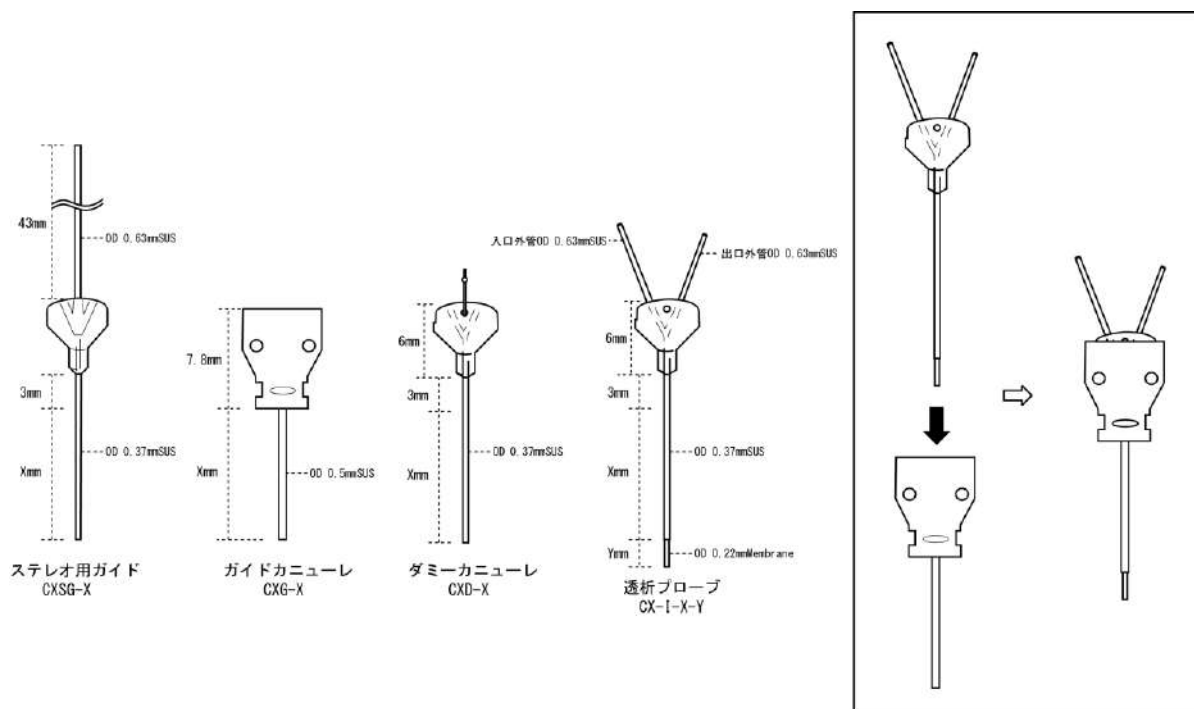
プローブ	AZ-X-Y
ガイドカニューレ	AG-X
ダミーカニューレ	AD-X
キャップナット	AC-1/AC-5
ステレオ用ガイド	SAG-X

注意 AZ-X-Y 型プローブの X(有効埋込み長さ)は、4 / 8 / 12 mm から選択して下さい。

2. CX-I 型プローブシステム

予めガイドカニューレの埋め込み処置を施した動物にプローブを挿入するシステムです。キャップナットを使用しませんので、プローブの挿入・固定が簡単かつ小型軽量です。

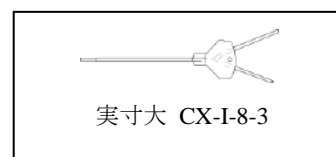
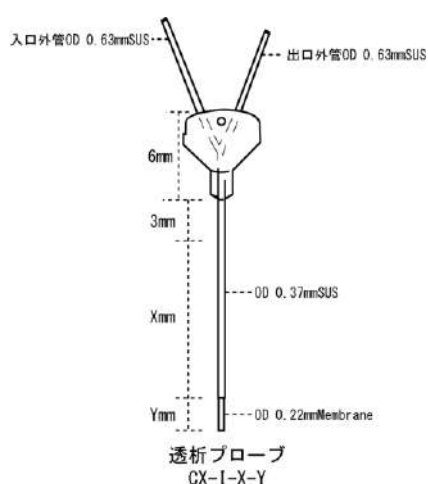
プローブの有効埋込み長さ(Xmm)および膜長(Ymm)をご指定下さい。



組立図

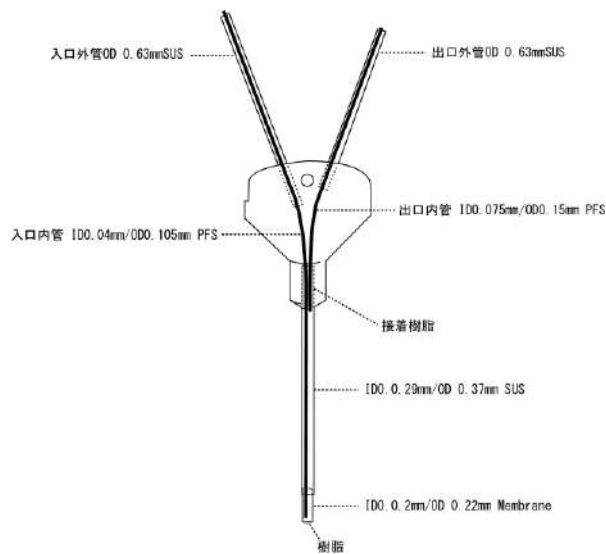
2-1 CX-I-X-Y 型プローブ

再生セルロース製透析膜を採用した標準型プローブです。プローブシャフトは金属製(SUS)です。



プローブ	CX-I-X-Y
ガイドカニューレ	CXG-X
ダミーカニューレ	CXD-X
ステレオ用ガイド	CXSG-X

注意 CX-I-X-Y 型プローブの X(有効埋込み長さ)は、2/4/6/8/10/12 mm から選択して下さい。



CX-I-X-Y 型プローブの内部構造模式図

2-1-2 CX-I-X-Y 型プローブの内部容量

CX-I 型透析プローブの内部容量(デッドボリューム)の目安

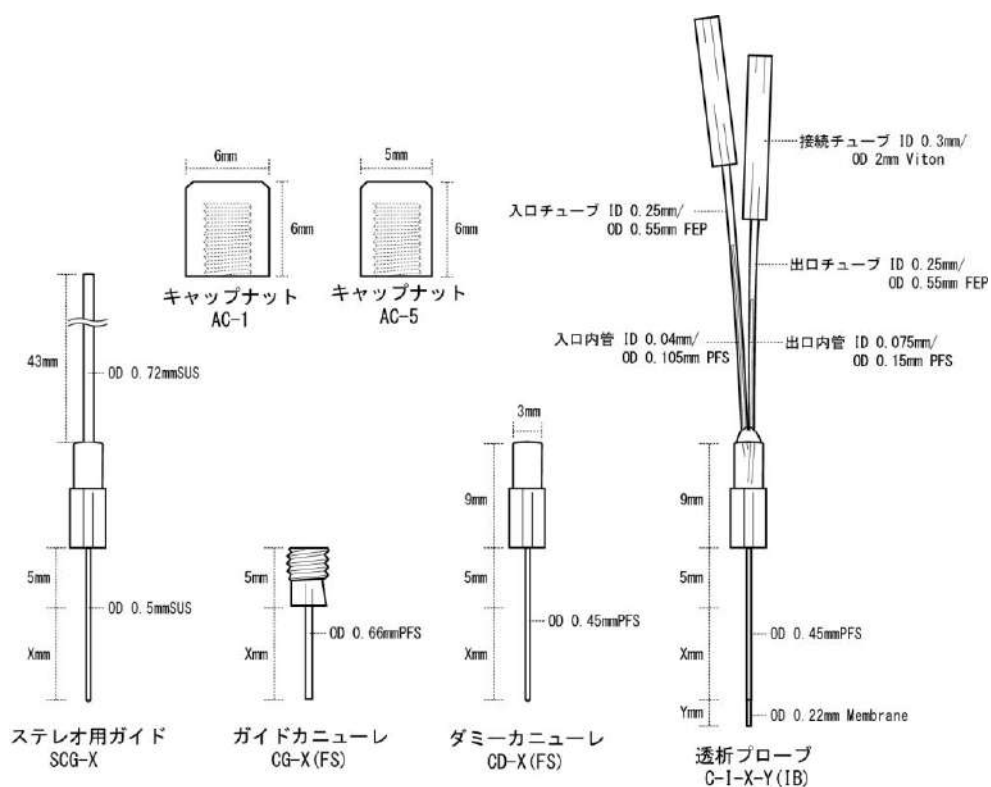
プローブ	X mm	Y mm	入口側容量 (μ L)*	出口側容量 (μ L)*
CX-I	4	1	0.028	0.482
		2	0.029	0.504
		3	0.030	0.527
		4	0.031	0.550
	6	1	0.030	0.596
		2	0.031	0.671
		3	0.033	0.642
		4	0.034	0.717
	8	1	0.033	0.711
		2	0.034	0.734
		3	0.035	0.757
		4	0.036	0.849
	12	1	0.038	0.941
		2	0.039	0.963
		3	0.040	0.986
		4	0.041	1.009

*入口から膜先端までが入口側容量、膜先端から出口までが出口側容量となります。

上記の内部容量は設計上の計算値であり、厳密には実際の内容容量と異なる可能性があります。あくまでも目安とお考え下さい。

3. C-I(IB)型イナート仕様プローブ

A-I 型と同様、キャップナットを用いて固定するタイプのプローブシステムです。流路その他に金属部品を一切使用していません。灌流液と金属の接触を完全に遮断する場合や、プローブまたはガイドカニューレを埋め込んだ動物を MRI 測定する場合などに有効です。

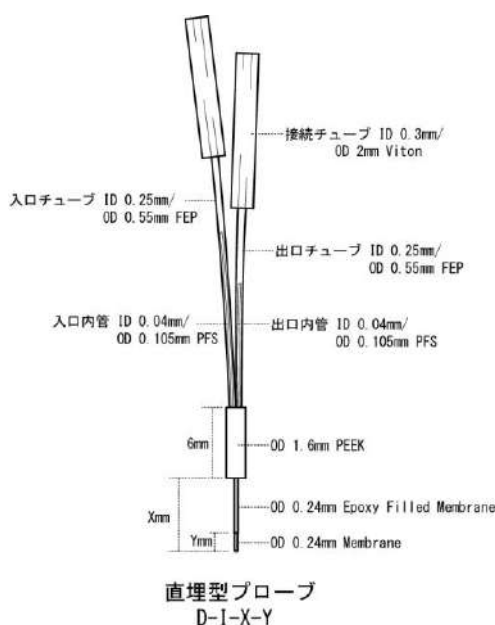


プローブ	C-I-X-Y(IB)
ガイドカニューレ	CG-X(FS)
ダミーカニューレ	CD-X(FS)
キャップナット	AC-1/AC-5
ステレオ用ガイド	SCG-X

4. D-I 型プローブ(直埋型プローブ)

ガイドカニューレを使用しない直埋型の小型軽量プローブです。A 型と比較して重量が 1/10 以下と軽量でヘッド部分も小さいため、マウスでの実験や複数プローブを同時に用いる場合に適しています。プローブホルダーを使用して脳固定器に取り付けます。プローブシャフトにはエポキシ樹脂封入した透析膜を使用しており、先端の膜部分に継ぎ目がありません。

プローブの有効埋込み長さ(Xmm)および膜長(Ymm)をご指定下さい。



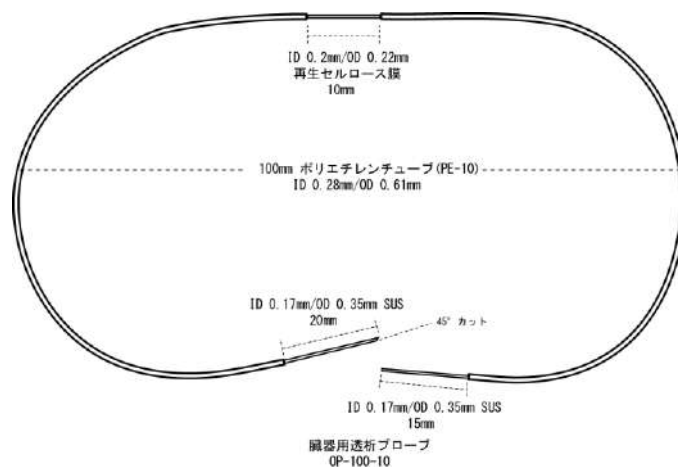
プローブ	D-I-X-Y
プローブホルダー	ATH-2

注意 D-I-X-Y 型プローブの X(有効埋込み長さ)は、透析膜を含みます。A-I 型および CX-I 型とは異なりますのでご注意ください。

5. OP 型プローブ(臓器用透析プローブ)

フレキシブルな直線型プローブです。チューブの先端に斜めカットした金属針を装着してありますので、臓器・組織の貫通が容易です。

標準品は導管長 100mm x 2、膜長 10mm ですが、種々のサイズ指定も可能です。プローブの入口および出口導管の長さ(Xmm)および膜長(Ymm)をご指定下さい。

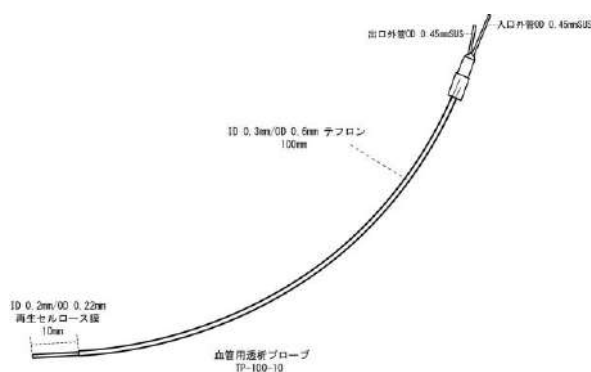


プローブ	OP-X-Y
------	--------

6. TP 型プローブ(血管用透析プローブ)

フレキシブルなプローブシャフトを持つプローブです。カテーテルのように血管に留置して使用します。

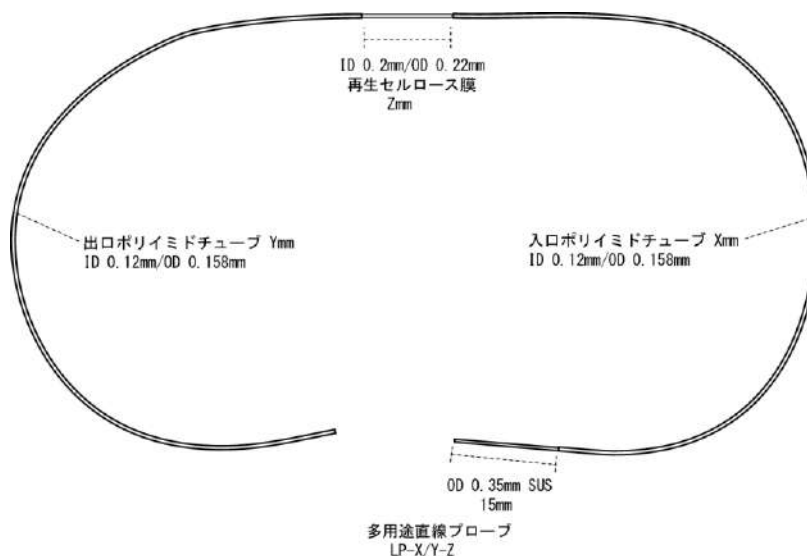
標準品は導管長 100mm、膜長 10mm ですが、種々のサイズ指定も可能です。プローブ導管の長さ(Xmm)および膜長(Ymm)をご指定下さい。



プローブ	TP-X-Y
------	--------

7. LP 型プローブ(多用途直線型プローブ)

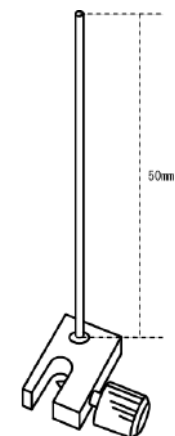
極細のポリイミドチューブを使用した直線型プローブです。皮膚のマイクロダイアリスやその他の末梢組織・臓器に適します。プローブの挿入には別途 25G 注射針を使用します。入口/出口チューブ長 Xmm/Ymm)および膜長(Zmm)をご指定下さい。ただし、X(入口)または Y (出口) が 200mm を超える場合および Z (膜長) が 30mm を超える場合は特注対応となりますのでお問合せ下さい。



プローブ	LP-X/Y-Z
------	----------

8. プローブホルダー

D-I 型(直埋型)プローブでは、脳固定器へのプローブの取り付けにプローブホルダーを使用します。A-I 型および CX-I 型プローブでは基本的にステレオ用ガイドを用いますが、D-I 型と同様にプローブホルダーを用いてプローブを脳固定器に直接取り付け直埋する事も可能です。



プローブホルダー

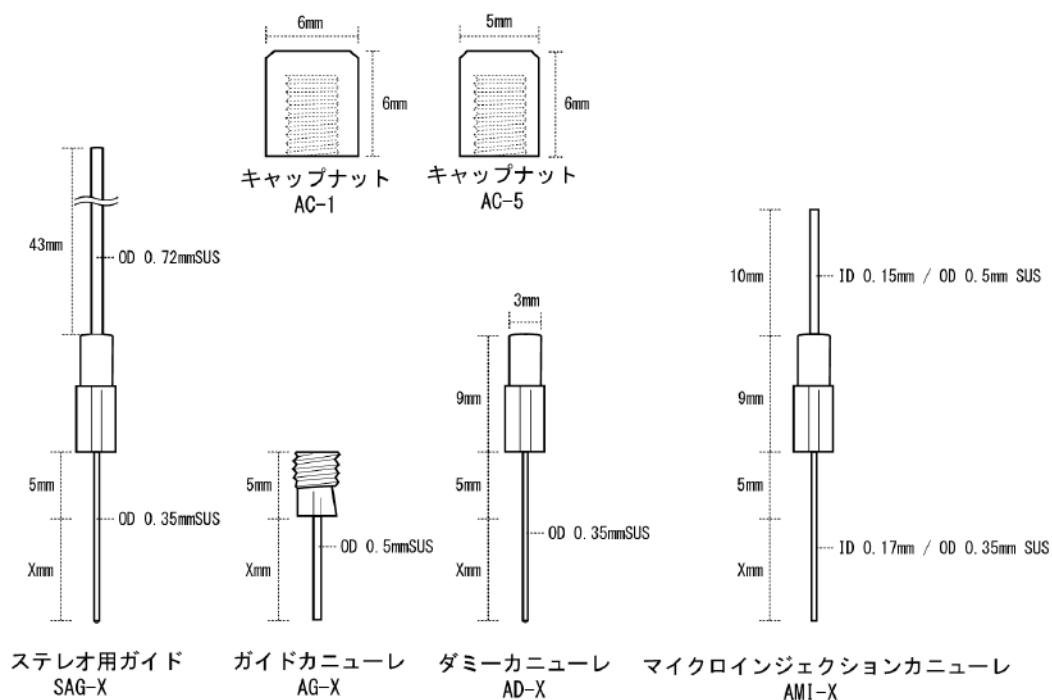
プローブ	プローブホルダー
A-I 型/C-I 型	ATH-1
D-I 型	ATH-2
CX-I 型	ATH-3

9. マイクロインジェクションカニューレ

薬液注入用のインジェクションカニューレです。透析膜は装着されていません。

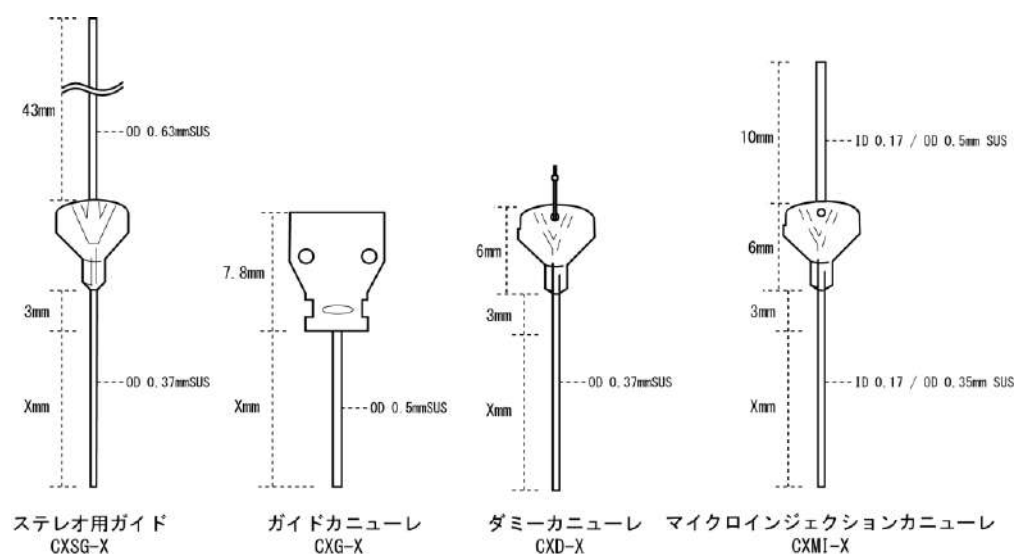
9-1 AMI型マイクロインジェクションカニューレ

標準型 A-I-X-Y プローブと共通のガイドカニューレ、ダミーカニューレおよびキャップナットを使用します。



9-2 CXMI型マイクロインジェクションカニューレ

標準型 CX-I-X-Y プローブと共通のガイドカニューレおよびダミーカニューレを使用します。



10. 透析膜と回収率について

エイコム標準の再生セルロース膜(ID 0.2mm/OD 0.22mm)(ペプチド用 AtmosLM プローブを除く)は、主に低分子の回収に適した透析膜です。公称分子量カットオフ(MWCO)は 50,000Da(50kDa)ですが、この値はある一定条件下における膜の阻止率を元に算出された値であって、実際のマイクロダイアリス実験で回収可能な分子量とは意味合いが異なります。実際の実験条件下では、一般的に分子量 1,000 程度を超えると回収率が大きく低下します。

以下に、再生セルロース膜のマイクロダイアリス実験条件下での *in vitro* 回収率を示します。

10-1 *In vitro* 回収率

【*In vitro* 回収実験条件】

膜長： 1 / 2 / 3 mm

灌流液： リンゲル液

灌流速度： 0.5 / 1 / 2 / 3 $\mu\text{L}/\text{min}$

外部液： 測定対象物のリンゲル溶液

外部液温度： 30°C または 37°C

回収率の算出：外部液中濃度を 100% としたときの灌流液中濃度を算出する。

$$\text{回収率(\%)} = \text{灌流液中濃度} / \text{外部液中濃度} \times 100$$

再生セルロース膜の *in vitro* 回収率(%) 1 (温度 30°C)

膜長(mm)	1				2				3			
	0.5	1	2	3	0.5	1	2	3	0.5	1	2	3
Acetylcholine	22.7	13.0	6.9	4.7	37.9	22.8	11.2	8.7	50.8	30.3	16.5	11.6
Choline	28.0	15.6	8.1	5.3	44.6	27.7	14.3	10.3	60.1	36.5	20.0	13.8
Norepinephrine	21.7	11.5	6.7	4.6	34.7	20.4	10.4	6.8	39.6	23.3	12.9	9.2
Dopamine	22.7	12.4	7.2	5.0	36.5	22.1	11.2	7.5	41.9	26.5	14.1	9.9
Serotonin	24.5	12.7	7.6	5.3	33.7	18.8	9.4	6.9	44.7	27.1	14.5	10.3
DOPAC	20.9	10.9	6.6	4.7	33.0	18.4	10.0	6.7	38.2	22.9	12.0	8.8
HVA	20.0	11.2	6.1	4.3	31.4	17.1	9.4	6.3	36.0	21.6	11.4	8.1
5-HIAA	22.9	10.4	7.2	5.1	35.3	19.4	10.8	7.1	41.2	24.0	13.0	9.1
3-Methoxytyramine	21.2	11.2	6.1	4.6	33.3	18.8	9.4	6.9	36.8	23.9	11.4	9.0

再生セルロース膜の *in vitro* 回収率(%) 2 (温度 37°C)

膜長(mm)	3
流速($\mu\text{L}/\text{min}$)	2
Aspartic acid	18
Glutamic acid	18
Glutamine	19
Glycine	30
Taurine	23
Alanine	23
GABA	20

10-2 *In vitro* 回収率と温度の関係

In vitro 回収と温度の関係を下表に示します。温度の上昇に伴い *in vitro* 回収率は増加します。

30℃のときの回収率を 100 としたときの各温度における回収率

成分/温度	20℃	25℃	30℃	35℃	37℃
Norepinephrine	81.1	97.8	100	119	122
Dopamine	76.8	96.9	100	121	125
Serotonin	82.1	98.1	100	116	120
DOPAC	78.1	95.9	100	119	124
HVA	74.6	99.4	100	118	117
5-HIAA	75.2	94.0	100	111	110
3-Methoxytyramine	90.2	99.0	100	116	119

膜長 3mm, 灌流液流速 2 μ L/min

10-3 *In vivo* 回収率

In vitro 回収率は *in vivo* 回収率の目安として利用される事もありますが、*in vitro* と *in vivo* では環境が異なるため必ずしもこれらの値が一致するとは限りません。*In vivo* 絶対濃度の算出方法として、no-net-flux (zero-net-flux)、extrapolation to zero flow、retrodialysis loss などの手法が考案されています。

11. 施術方法

11-1 プローブチェック

エイコム製プローブは出荷前に全数について厳格な品質検査を行っておりますが、ご使用前に万が一の輸送中の破損による漏れや詰まりが無いかを確認して頂くことをおすすめします。

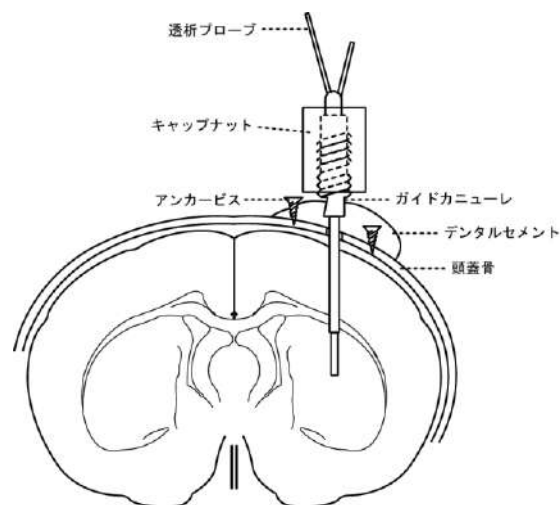
1. 2.5mL または 1mL のディスポシリンジ(ニードル付)にジョイント用バイトンチューブを接続してプローブ入口から精製水を流し入れます。若干の抵抗がありますが手で押し入れて下さい。このときは出口にはチューブを接続しないで下さい。
2. プローブ出口から精製水が流出してくることを確認して下さい。
3. もしも出口から精製水が流出しない場合は、透析膜部分を精製水に浸けてから再度入口から精製水を流して下さい。
4. プローブ先端の膜部分から精製水が大量に漏れ出さない事を確認して下さい。

注意 塩を含む灌流液をプローブに流して乾燥させるとプローブ内部が詰まる恐れがあります。また、人工脳脊髄液(aCSF)は、リン酸カルシウムの細かい結晶が析出して流路を閉塞する事がありますので、使用の際には細心の注意を払って下さい。

11-2 脳への固定(A-I-X-Y型プローブでガイドカニューレを用いる場合)

下記にラットでの手術手順の一例をご紹介します。詳しくは成書等をご参照下さい。

1. 動物に麻酔を施して定位脳固定器に固定します。
2. 頭部の被毛を除去し、皮膚を清拭消毒します。
3. 頭部皮膚を切開して頭蓋骨を露出させます。
4. ミクロスパチュラ等で露出させた頭蓋骨表面を擦って骨表面の組織や膜をきれいに取り除き、良く乾燥させておきます。このときに骨表面に瞬間接着剤を塗布しておく事があります。
5. 定位脳固定器を用いて、頭蓋骨表面に目的部位へのアプローチ点を設定します。
6. アプローチ点にドリルで直径 0.6mm 程度の孔を開けます。硬膜が確認できるまで少しずつ骨を削り、硬膜が確認できたら注射針等で硬膜を切開しておきます。
7. 孔から 5mm 程度離れた位置にアンカービスを必要に応じて 1-3 個固定しておきます。
8. ステレオ用ガイドとキャップナットを使って脳固定器に取り付けたガイドカニューレを目的の深さまで挿入します。
9. ガイドカニューレをデンタルセメントで頭蓋骨に固定します。このときに、ガイドカニューレのネジ部分にセメントが付着しないように注意して下さい。
10. セメントが十分に硬化したら、キャップナットを緩めてステレオ用ガイドを外します。
11. ガイドカニューレにダミーカニューレを挿入してキャップナットで固定します。
12. 術後の回復期間において、ダミーカニューレを取り外して透析プローブを挿入します。



施術模式図(A-I型プローブの場合)

12. 特注プローブについて

エイコムでは、お客様のご要望にあわせて各種特注プローブおよびアクセサリの作製も承ります。お気軽に弊社もしくは弊社代理店までお問合せ下さい。

13. プローブ、ガイドカニューレおよびダミーカニューレの滅菌について

プローブ類を滅菌する必要がある場合は、エチレンオキサイドガス(EOG)滅菌を行って下さい。オートクレーブおよび消毒用エタノールなどの薬液への浸漬は避けて下さい。



株式会社 **エイコム**

本社：京都市伏見区下鳥羽北円面田町113 〒612-8497
TEL 075-622-2112(代表) FAX 075-622-2114

東京営業所：東京都文京区本郷1丁目12-7甲田ビル3F 〒113-0033
TEL 03-3818-5223(代表) FAX 03-3818-4540

USA Office：7313 Carroll Road, Suite F, San Diego, California 92121 USA
TEL (858) 560-8055 FAX (858) 560-8040

Web：http://www.eicom.co.jp (日本語)
http://www.eicom-usa.com (English)

本書の内容は予告無く変更させて頂く事があります
本書の一部または全部を弊社に無断で転載することを禁じます
本書に関する技術的なお問合せは本社 開発部までお寄せ下さい