

原 著

Tungsten 微細電極による marking techniqueの改良 ; ネコの大脳皮質 SIII area で検出された歯髄性応答 neuron の局在証明への応用

鈴木 隆 松本 範雄 平 孝 清
高松 隆 常 林 謙 一 郎

岩手医科大学歯学部 口腔生理学講座* (主任: 鈴木隆教授)

[受付: 1977年9月14日]

抄録: 従来の電気凝固法による marking techniqueに改良を加え, spot size と電気量との相関を系統的に調査した。細胞外液と等価と考えられる模擬回路を用い tungsten 微細電極に生ずる分極効果を調べたところ, 直流方式の分極効果は甚だ大きく電流は僅かに10秒しか流れなかった。そこで, 持続時間0.5秒, 1 Hz の矩形波電流を用い分極を可及的に除去した。ネコの大脳皮質に微細電極を刺入し, 種々の条件で通電を行い, それにより生ずる electrolytic lesion の大きさを指標に電気量(電流×通電時間/2)と spot 面積の関係を計測した。一定の電流の範囲内では, 電気量と spot 面積は正比例した。この spot diameter-coulomb curve から marking に最適な電気量を求めたところ $12 \times 10^{-6} \sim 15 \times 10^{-6}$ coulomb であった。体性感覚野 SIII にある歯髄電気刺激に応ずる単1 neuron を電気生理学的に検出してのち, この方法を適用し, その細胞の局在部位を調べたところ, その細胞は前 suprasylvian 回の中部の第3層深部に位置していることが判明した。

緒 言

微細電極を用いて, 中枢神経系の細胞の性質や神経結合などを研究する際, 電極尖端の位置の確認が重要な意義を持っている。記録部位の確認法には金属電極による電気凝固法⁽¹⁾, stainless-steel^(2,3) や elgiloy 電極⁽⁴⁾ の鉄を遊離させ prussian blue spot を作る方法, またガラス電極に種々の色素 (fast green FCF^(5,6), Niagara sky blue 6B⁽⁷⁾, procion yellow^(8,9,10) など) を

封入して電気泳動的, または圧力により色素を注入する方法などがある。ガラス電極を用いた色素注入法には詳細な報告があり良い結果をもたらしている。しかし鉄遊離による prussian blue 法や電気凝固法に関しては定量的な観察報告がない。

我々はネコで歯髄刺激に応答する大脳皮質体性感覚野 SIII の細胞の特性を tungsten 微細電極を用いて検索しているが^(11,12,13,14), 今回, 電気凝固による marking 法に改良を加えその方

Improvement of a marking technique utilizing the tungsten microelectrode: an electrolytic method and its application for identification of histological location of the pulpal afferent neuron in cerebral cortex (SIII area) of the cat. Takashi A. SUZUKI, Norio MATSUMOTO, Kosei TAIRA, Takatsune TAKAMATSU and Kenichiro HAYASHI (Department of Oral physiology, Iwate Medical University School of Dentistry, Morioka 020)

*岩手県盛岡市中央通一丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ., 2 : 136-144, 1977.

法を定量的に吟味した。これにより希望する大きさの spot をより簡単に確実に作る事ができるようになり、皮質単1細胞の記録部位を容易に確認することができたのでその方法と結果の詳細を報告する。

実験方法

Tungsten 微細電極 : tungsten wire (ϕ ; 130 μm , 長さ; 2 cm)を steel 管 (内径; 180 μm , 外径; 340 μm , 長さ; 8.5cm) に固着し、飽和亜硝酸ナトリウム NaNO_2 溶液で電解研磨して尖端直径を 1~6 μm とした。それをプーラー (成茂 PD-5) で引いた尖端直径 1-6 μm のガラス管 (内径; 0.7mm, 外径; 1.09mm, 長さ; 8 cm) に尖端が 1~3 μm 出るように入れ、他端を接着剤, aron alpha 及び Hi-super エポキシ系で固定し, tungsten 微細電極を作製した。

電極尖端直径と抵抗値の測定 : 上記のようにして作られた電極24本につき光学顕微鏡 ($\times 400$) のマイクロメーターと微小電極抵抗計 (成茂 OH-1) を用い、それぞれ尖端直径と抵抗値を計測した。

直流と矩形波電流の分極効果の比較 : 図1のように 0.9%生理的食塩水溶液槽を通じ、尖端直径 2~4 μm の電極を流れる電流量と分極効果を計測した。この回路に直流と矩形波電流 (duration 0.5sec., 1Hz) を流しその成績を比

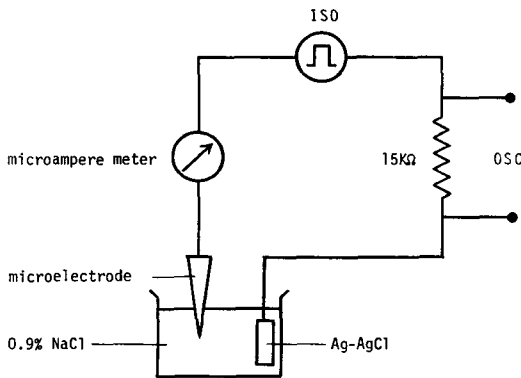


図1 微細電極用分極測定装置の模擬回路, ISO の定電流装置から直流または矩形波電流を供給し, 電極尖端を流れる電流を15K Ω の抵抗を介してOSCで読んだ。ISO; isolator, OSC; oscilloscope

較した。流す直流及び矩形波電流は電気刺激装置 (日本光電 S E N-1101) およびアイソレーター (日本光電 S S-101) から供給され、その強さは微細電極を陰極、不関電極 (Ag-Ag Cl 板) を陽極とし、15K Ω (微細電極の抵抗に対し negligible small な値) の抵抗を介してその両端に生ずる電位差から測定した。観測・記録は strage oscilloscope (TEKTRONIX Type -13D) を用いて写真撮影した。

ネコ大脳皮質での通電電流量と spot 面積との関係 : ネコ 4 匹 (予備実験 2 匹, 本実験 2 匹) を用いて大脳皮質に微細電極を刺入し、深さ 500 μm ごとに通電電流量を変え marking spot を作成した。極性は模擬回路での実験と同様にそれぞれ微細電極を陰極、頭皮に置いた銀・塩化銀の不関電極を陽極とした。電流量はオシロスコープの電位化変を目安にアイソレーターで 3 μA の定電流におさえ、通電時間を 8~30 秒と変えて通電電流量 ($12 \times 10^{-6} \sim 45 \times 10^{-6}$ coulomb) を調節した。また、それによって大脳皮質に生じた spot の直径は連続切片を作り組織学的に計測し、電流量と spot size の関係を観察した。

単1細胞放電を記録した unit の marking : ネコの大脳皮質体性感覚野 SIII で歯髄刺激に応答する単1細胞の放電を記録し、その後、上記実験の成績で得たデータをもとに、導出した細胞の周辺を直径約 100 μm の spot を得られるよう marking した。

ネコでの実験法は著者等の誘発電位の記録法⁽¹⁵⁾に順じるが、今回はクローズド・チャンバー法 closed chamber method を活用した。それは歯科用エンジンで直径約 12mm の craniotomy を行ったのち DAVIS 型 chamber を頭蓋骨に resin で固定し、硬膜を切開して後、流動パラフィンで chamber 内を満たした。単1細胞放電は高入力インピーダンス前置増幅器 (自作) および増幅器 (日本光電 AVH-2) で増幅し、MIC (Medical input converter; level slicer の 1 種) を介してから統計処理用小型電子計算機 (800CUSC; 東芝, Type EDS-34801M)

で post-stimulus time histogram (PSTH) として計測され, tape puncher (川崎エレクトロニカ TMA-801) に出力してのち, 東北大学大型計算機センター時間分割システムで作図処理を行った。⁽¹⁴⁾

実験終了後, 脳を10%ホルマリンで心臓灌流固定してから取出し, 更に10%ホルマリンで一昼夜以上固定し, 凍結切片法を用いて $50\mu\text{m}$ の前額断連続切片標本とし, marking area を組織学的に検査した。染色は cresyl violet により Nissl 染色した。

実験成績

1. Tungsten 微細電極先端直径と抵抗値の関係: 先端直径 $1\sim 6\mu\text{m}$, 長さ $1\sim 3\mu\text{m}$ の電極24本を作製し, 先端直径と抵抗値の関係を見た。図2はその結果を示し, 横軸は電極先端直径 (μm) を, 縦軸は抵抗値 (Meg-ohm) を表わしている。図より抵抗値は先端直径に反比例するようだが, 先端直径 $2\sim 4\mu\text{m}$ の電極では $2\sim 5\text{M}\Omega$ とある程度分散した抵抗値を示している。これは同じ先端直径であっても, micropipette より露出する先端の長さの不同にもとづく, 電極の実効表面積の相違によるものであろう。電極先端の露出部分を円錐形とみなし,

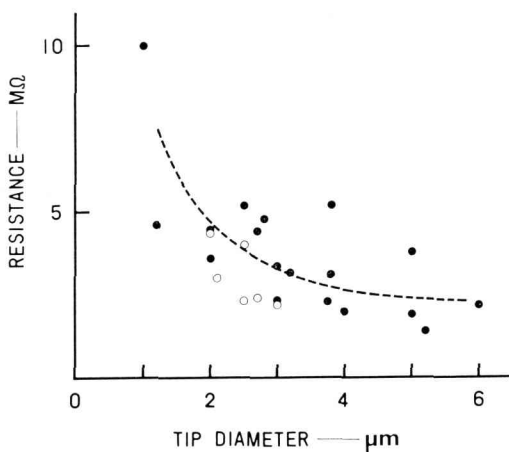


図2 電極先端直径と抵抗値の関係, 縦軸: 抵抗値(megohm), 横軸: 電極先端直径 (μm), 白丸の電極は実際に大脳皮質で marking spot の作成に使用されたもの。

試みに全例につきその実効表面積と電極抵抗の関係計測したところ相変わらず分散があった。従って, この分散の原因としては, 更に電極と micropipette の間に介在する空隙要素, つまりその空隙に侵入する電解質の量などについて考慮する必要がある。従って以後の実験では可及的に1定で正確な成績を得るため直径 $2\sim 3\mu\text{m}$, 長さ $1\sim 3\mu\text{m}$, 実効表面積 $10\sim 25\mu\text{m}^2$ で, 電極と pipette の空隙の少ない電極を使用することにした。

2. 直流と矩形波電流の分極効果: 図1のような模擬回路を用い, 直流と矩形波電流により tungsten 微細電極に生じる分極効果を観察した。図3 Aは直流で, Bは矩形波電流で得られた電圧変化と分極過程を示す。この図から知られるように, 従来の直流方式では分極効果が大き

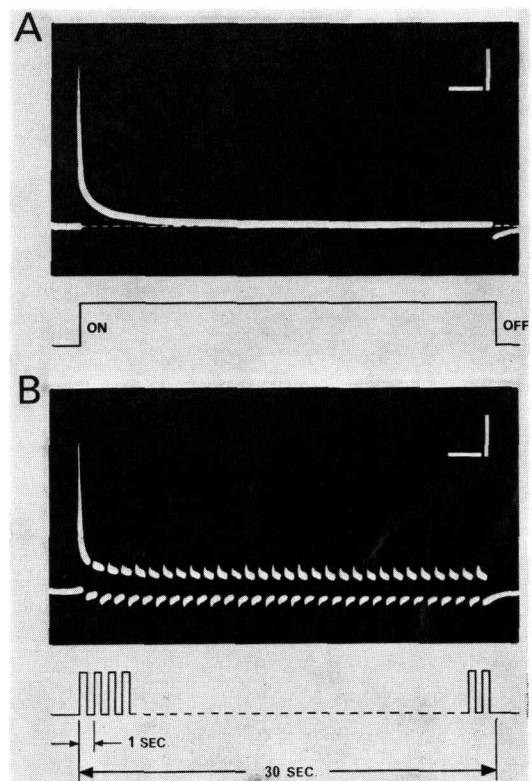


図3 Tungsten 微細電極の直流と矩形波電流に対する分極効果, A: 直流。B: 矩形波電流, A・B, それぞれの写真の下端は通電時間を表わす。用いた電極の抵抗値は $2.4\text{M}\Omega$ (A) と $2.0\text{M}\Omega$ (B) である。較正電圧: 20mV , 時標: 2sec 。

きく、電流は通電後僅かに10秒程しか流れない。この事実は marking spot の size を任意に変えるためには、10秒以上の通電は無意味で、

最初に流す電流量の調節が大切であることを示唆する。しかし unit 放電を記録中の皮質に強電流を流すことは望ましくないことと言えよ

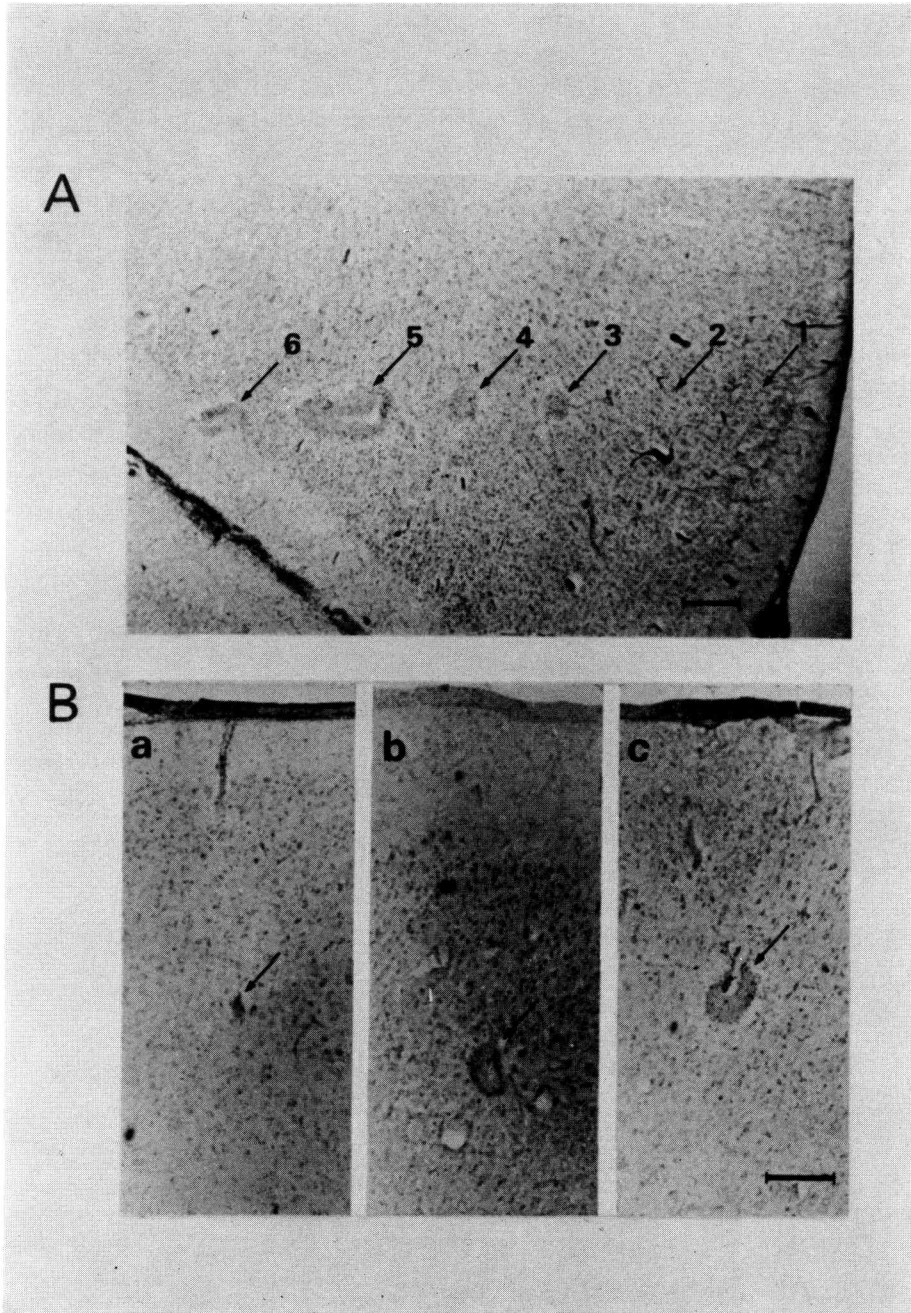


図4 大脳皮質で作成した種々の marking spot の实例。A : 一本の電極を用い、同一 track 内で500 μ m ずつ電極を進め 1 penetration 中に得られた4個の spot。通電電流量をそれぞれ約 3.5, 7.5, 12.5, 22.5, 45, 60 $\times 10^{-6}$ coulomb と変えたとき得られた marking spot を表わしている。通電電流量が少なすぎたために矢印1, 2の点では spot が無いことに注意。B : a, b, c それぞれ3 μ A で8, 10, 13秒間の通電で得られた marking spot. scale ; A. Bとも200 μ m。

う。図3 Bは持続時間 0.5sec 1Hz の矩形波電流を用いると、分極効果は減少し、そのため数 μA の一定の電流が断続的に流しやすくなることを示している。この事実は通電時間、電流の強さをともに制御でき、可及的に少ない電気量を使って spot size を調節できる利点を意味している。従って以後の実験では矩形波電流を使用することとした。

3. 通電電気量と spot 面積との関係：ネコの大脳皮質 SIII-area に tungsten 微細電極を刺入し、種々の条件下で矩形波電流を流し、色々な size の spot を作成した。それにより生ずる凝固面積と通電電気量との相関を計測したのが図5である。まず体性感覚野 SIII で作成した spot の顕微鏡写真が図4で、同図Aは同一電極を用い皮質内を $500\mu\text{m}$ ずつ進め、通電電気量を大略 $3.5, 7.5, 12.5, 22.5, 45, 60 \times 10^{-6}$ coulomb と幾段階にも分けて与えた時に得られた marking spot の大きさの変化を表わす組織像である。実際には6点脳軟膜下で通電を行っているが、最初の2点(矢印1, 2)は電気量が少なかったので spot が認められない。従って、電気量が充分であった4点について marking が成功し、唯1枚の切片標本に4つの spot がとらえられている。ここで spot の大きさは、通電電気量が増加するに従って増大し、電気量に依存して変化することが知られる。更に同図Aで第6番目の spot が小さいのは電極が通電電気量が増大するに従って電解的に消耗され、実効電流量が減少するからであると考えられる。事実、この実験終了後、抜き取った電極を検鏡してみると、その尖端は完全に消耗して、micropipette 内に嵌入していた。

上記実験から直径 $100 \sim 200\mu\text{m}$ の spot を得られるおよその電気量が分かったので、次いで通電電流の強さを $3\mu\text{A}$ におさえ、矩形波電流の通電時間を8, 10, 13秒と細かに変えたとき得られた spot size の検討を行った。図4 B, a, b と c はその組織像である。それぞれ8, 10および13秒の通電に対し短径40, 80および $120\mu\text{m}$ 、長径70, 150および $180\mu\text{m}$ の marking spot が

得られた。この事実は、通電時間の僅かな差が spot size に相当大きい影響を与えることを示唆する。そこで他の2匹のネコにつき、7-penetration, 17点の部位で $3\mu\text{A}$ の矩形波電流を流し、その通電時間(電気量)を系統的に規制して marking spot を作ってみた。そして、横軸に通電時間(電気量)をとり、縦軸にそれぞれの通電時間で得られた spot size (面積 μm^2) をプロットしたのが図5である。両者の関係は大略直線的で、spot 面積は通電電気量に比例していることが知られよう。しかし実用的には、通電時間(sec)と spot の直径との相関を知りたいのであるから、spot は大体正円とみなし、その面積に対応する直径を同図右側の縦軸として求めてみた。この図から、通電時間8秒から30秒までの範囲で、spot の直径は $100\mu\text{m}$ から $350\mu\text{m}$ の間で変化する。従って、組織学的に検索しやすい spot の直径は $100 \sim 150\mu\text{m}$ 程度であるから、それに要する通電時間は8~10秒(電気量 $12 \times 10^{-6} \sim 15 \times 10^{-6}$ coulomb に相当する)が最適と考えられる。また、この値は図4 Bで得られた結果ともよく一致する。

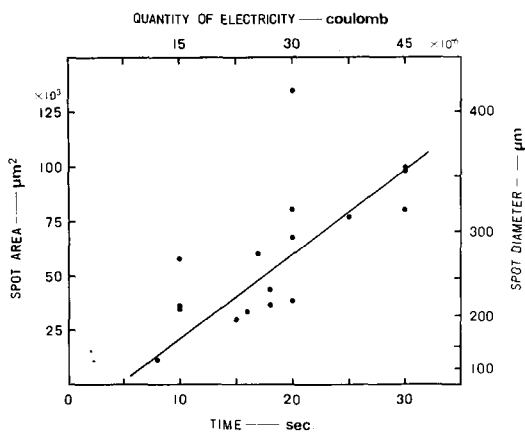
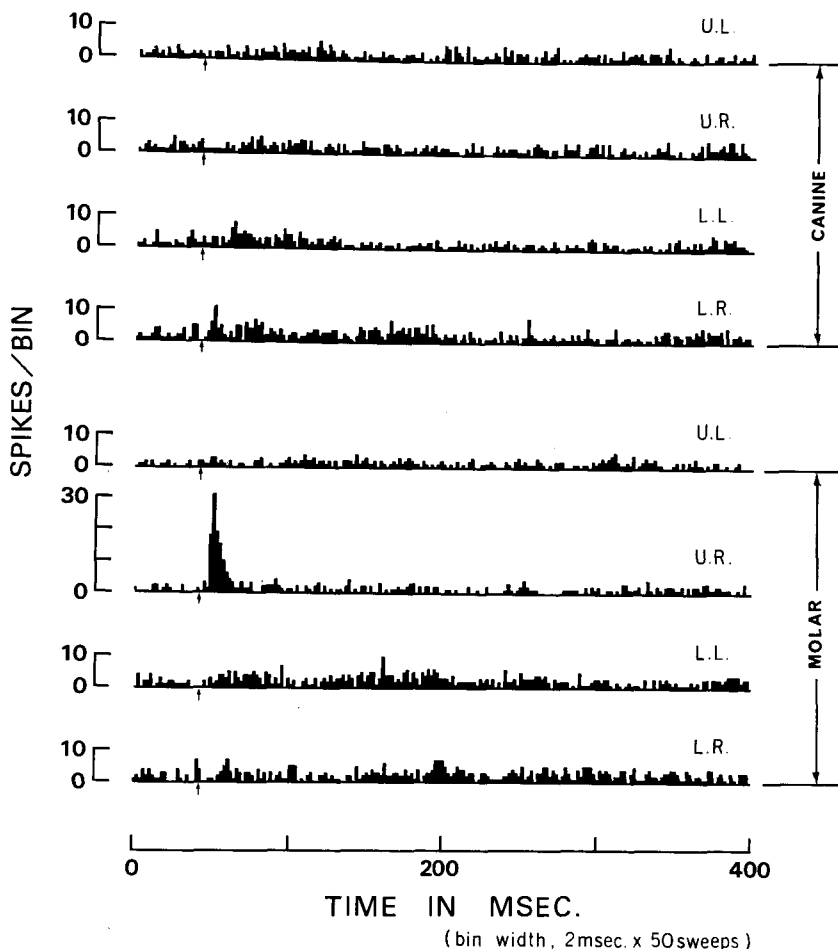


図5 電気量—スポット・サイズ曲線(coulomb-spot diameter curve)。通電時間と spot の直径との相関を知るため求められたもの。通電電流： $3\mu\text{A}$ ，左縦軸；spot の面積 (μm^2)，右縦軸；それぞれの spot 面積に対応する spot の直径 (μm)，上横軸；電気量 (coulomb)，下横軸；通電時間 (sec)，通電時間と spot 面積は正比例することに注意。

4. ネコ大脳皮質における単一細胞放電記録とその記録部位の marking : ネコの歯髓(犬歯4本, 臼歯4本; 計8本)の電気刺激により, 大脳皮質体性感覚野 SIII で誘発される単一細胞放電を記録した。図6はその post-stimulus time histogram (PSTH)で, この細胞は上顎右側臼歯の刺激に潜時の短い(約8~20 msec.) initial burst で応答する specific type の細胞である。このように極めて稀な specific type 細胞の局在部位を大略同定するため, 前記実験3の成績を引用し100 μ m の spot を作る目的で3

μ A の矩形波電流を8秒間通電して見た。図7はその条件で得られた marking spot を表わし, 直径100 μ m の spot が, 深さ600 μ m の位置に限局していた。この値は電極の打ち込み距離から推定されていた recording site の位置と大体一致する。上述の事実から, 組織学的に specific type の細胞の1つは皮質第3層深部に位置していることが確かめられた。図7 Bはその強拡大である。



CAT # 74;T-7,U-378

図6 歯髓刺激で誘発された大脳皮質単一ニューロンの放電 histogram (specific type)。上4 trace は犬歯刺激で下4 trace は臼歯刺激で得られた PSTH, U.L.: 上顎左側, U.R.: 上顎右側, L.L.: 下顎左側, L.R.: 下顎右側の歯牙をそれぞれ示す。縦軸: 1 BIN当りのスパイク数, 横軸: 掃引時間 (msec.), 掃引回数: 50回, 刺激強度: 50V。

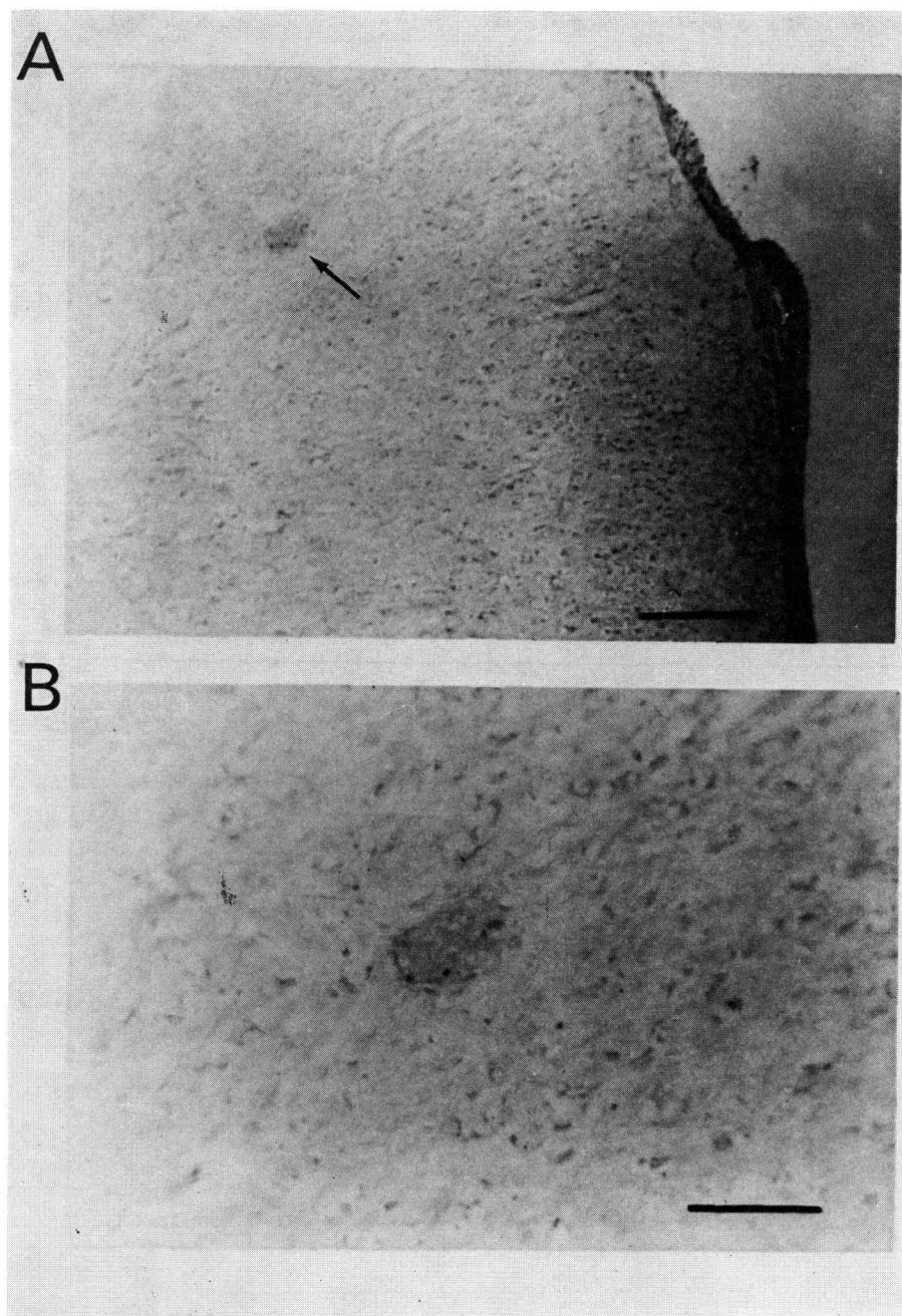


図7 specific type (図6) の細胞の marking spot.
 A : 弱拡大の組織写真, 矢印は marking spot を示す。
 scale は 200 μ m, B : Aの強拡大, scale は 100 μ m.

考 察

ネコの中樞神経系における歯髄情報処理過程を研究する際, 大脳皮質内の細胞の特性をよく

知り, その上, 微細電極尖端の位置を確認することは重要な意義を持つ。この位置同定のためには, 電極が脳軟膜表面に触れた部位を起点とし, そこから進む電極の深度を機械的に計測す

る方法が用いられてきた。これには次の欠点がある。まず、軟膜に対する電極尖端の接触点は正確に求めにくい。特に著者等のように closed chamber を用いた場合、脳脊髄液の貯留量の変化によって一層この操作は困難となる。さらに、直径1~2.5 μm 程度の電極の刺入点では皮質表面に200~500 μm の陥凹が生ずるから電極尖端の位置を正確に推定することはかなり困難が伴う。従って電位を導出した細胞の局在を正確に知るには marking 法を用いることが多い。marking 法には、大別して、電気凝固法と色素または、金属イオンを電気泳動的に注入する方法とがある。後者は、著者らが永年経験的に使用して来た tungsten 微細電極に適用することは不可能であるから、今回、Hubel⁽¹⁾以来使われている電気凝固法につき吟味した。従来の tungsten 微細電極による電気凝固法には2つの問題点があった。1つは組織の崩壊をもたらす範囲が大きく、一度 marking を行った近辺の細胞から正常の活動電位を再び導出することは不可能ということ、他は皮質の1層から7層に渡って連続的な記録や1 track 中の多点 marking の実施が困難であることである。これらの原因は直流方式では電極尖端の分極が大きくなり、その結果比較的強電流を使用することになり、spot size を任意でしかも、微細に調節することができないためと思われる。本実験のように矩形波電流を用いると、上記の問題点はある程度解決する。矩形波電流は電極尖端の分極効果を減少させ、ほぼ一定の current を流すのに都合がよい。また等しい尖端直径の電極を用いた場合、10秒の通電で、直流方式に比し、約2倍から3倍の電気量を流すことができる。従って使用する電流の強さを充分低く保つことができるから、微妙な調節もでき、任意の大きさの spot を作りやすくなる。図5より得た条件で直径100 μm ぐらいの marking spot を作成した場合、電気凝固により機能脱落を来たした細胞の分布範囲は直流方式に比し狭いから、電極の進め (electrode advance) を小さくしても、次の新しい細胞探索を行うことができる。つまり比

較的細かい step で細胞からの電位導出ができることになり、これが実験の能率向上につながる。一方、直流および矩形波方式ともに通電による電極尖端の電解的消耗はさけられないが、後者の消耗は前者のそれに比し、かなり少なく、著者等の経験では前者の場合(直流方法)同一電極で2回以上の marking を行うことは困難であった。しかし後者(矩形波方式)の同一電極で可能な marking 回数は4回に及ぶものがあつた。

本実験では marking spot の発見を容易にするため直径100 μm 以下の spot については吟味しなかつた。これは spot が比較的大きいと組織標本上で spot を探しやすいことと、通電電流の強さを3 μA 以下に保つことが難しかつたことなどによる。今後、より小さい spot を正確に作成するためには通電電流の強さを下げて通電時間を延長するか、通電電流を3 μA 以下に任意の期間 clamp する方法などが考えられよう。しかし spot size が小さいと正常組織との境界が不鮮明となり、spot 位置の発見が困難になることが経験された。

次に、本法の長短であるが、電気凝固法は細胞外導出電極の大略の尖端位置を知るためには簡易な方法であるが、50 μm 以下の小さい spot の marking には適さない。また本法では spot の部位は組織に対して damage として残ることも甚だしい欠点であろう。小 spot marking や細胞内染色のためには、色素注入法が勝れていることは論をまたない。

本論文では微細電極の導出部位を知るための marking technique 改良を主目的としたが、他に次のような応用の展開が期待される。それは、本法では直径50~400 μm の境界の比較的鮮明な spot が作りやすい。この spot は組織に対し損傷として残存することはすでに述べたが、逆に、この方法を活用すれば、特定の神経核または、脳皮質に micro-lesion を容易に作ることができる。これは手術的に abrasion、または異物注入などを行って人工的損傷を作る手法よりは確かな技法であり、しかも組織の表層を甚

だしく傷めることなく、その深部に lesion-focus を作る事ができる。これは解剖学領域で、順行性または逆行性変性実験の精度の向上に役立つことであろう。

つことであろう。

謝辞 ; 組織標本の製作に協力した浦田静子嬢に謝す。

Abstract : In order to control the size of marking spot in cerebral cortex, a new electrolytic method was improved and the rectangular current (1 Hz, 0.5 sec. duration) was supplied by a constant current isolator. This technique indicates that the polarizing effect occurred at the tip of tungsten microelectrode was much less than the ordinary method. Inserting the microelectrodes into the cortices, the electrolytic lesions were made by the several current flows in vivo. The relationship between the spot size (μm^2) measured histologically and quantity of electricity (coulomb) supplied through the electrode was determined systematically. Within some current range, the marking spots varied proportionally in diameter with increase in quantity of electricity and the range of optimum quantity was 12×10^{-6} to 15×10^{-6} coulomb. After the single neuron which responded to the tooth pulp stimulation was detected electro-physiologically, the rectangular current of 12×10^{-6} coulomb was supplied to make a micro-lesion for histological identification. Then the location of the neuron was pursued microscopically and the spot dyed by Nissl method showed that the identified neuron was located at the deep layer of lamina III in the middle part of anterior suprasylvian gyrus.

文 献

- 1) Hubel, D.H. : Single unit activity in striate cortex of unrestrained cats. *J. Physiol.* 147 : 226-238, 1959
- 2) Green, J.D. : A simple microelectrode for recording from the central nervous system. *Nature Lond.* 182 : 962, 1958
- 3) Green, J.D., Mancia, M. & von Baumgarten, R. : Recurrent inhibition in the olfactory bulb. I. Effects of antidromic stimulation of the lateral olfactory tract. *J. Neurophysiol.* 25 : 467-488, 1962
- 4) Suzuki, H. & Azuma, M. : A glass-insulated "elgiloy" microelectrode for recording unit activity in chronic monkey experiments. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 41 : 93-95, 1976
- 5) 岡田和彦, 日浦透, 重永凱男, 堺章 : 実験動物脳内の活動電位記録部位の確認法について— Thomas と Wilson 法の応用—, 大阪歯学誌, 18 : 132-137, 1973
- 6) Thomas, R. C. & Wilson, V. J. : Precise localization of Renshaw cells with a new marking technique. *Nature* 206 : 211-213, 1965
- 7) Tomita, T., Murakami, M., Sato, Y. & Hashimoto, Y. : Further study on the origin of the so-called cone action potential (s-potential). Its histological determination. *Jap. J. Physiol.* 9 : 63-68, 1959
- 8) 金子章道 : プロシオンイエローを用いた細胞内染色法, 生体の科学, 25 : 244-250, 1974
- 9) Kaneko, A. : Morphological identification of single cells in the fish retina by intracellular dye injection. Edited by S. B. Kater and C. Nicholson. In : *Intracellular Staining in Neurobiology*, Springer-Verlag, Berlin, pp157-179, 1973
- 10) Van Essen, D. & Kelly, J. : Correlation of cell shape and function in the visual cortex of the cat. *Nature* 241 : 403-405, 1973
- 11) 鈴木隆, 八幡文和, 平孝清, 松本範雄, 杉山ちか子 : 歯髄刺激で誘発されるネコの前頭葉皮質単一ニューロンの応答, 歯基礎誌, 17 : 493, 1975
- 12) 鈴木隆, 八幡文和, 平孝清, 松本範雄, 杉山ちか子 : 歯痛の皮質投射の研究, 日本生理誌, 38 : 145-146, 1976
- 13) 鈴木隆, 平孝清, 松本範雄 : 歯髄性痛覚の中樞情報処理過程の研究, 岩医大歯誌, 1 : 176, 1976
- 14) 鈴木隆, 平孝清, 松本範雄, 林謙一郎 : 大脳皮質単一細胞の歯髄性応答電位のデータ処理に関するプログラム化の試み, 岩医大歯誌, 2 : 9-21, 1977
- 15) 鈴木隆, 八幡文和, 平孝清, 松本範雄, 林謙一郎 : 歯髄の選択電気刺激で得られた大脳皮質誘発電位の局在性について, 岩医大歯誌, 2 : 86-97, 1977