

パッチクランプ法の原理と実際

岡田 泰伸・小原 正裕
(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所)

I. はじめに

パッチクランプ法は、細胞膜において単一(あるいは複数個)のイオンチャネル分子の活動を、それを通るイオン電流として記録する方法で、1976年に Neher と Sakmann¹⁾によって開発された。その後、いわゆるギガ・シール法の確立といくつかのヴァリエーションの追加開発^{2,3)}によって、1980年以降多くの細胞系に適用されるようになった³⁻⁵⁾。その結果、この方法は細胞や分子レベルでの生理学研究に革命を引き起こし、ひいては遺伝子クローニング法とあいまって生命科学研究に大きな革新をもたらした。この貢献によって Neher と Sakmann は 1991年にノーベル賞を受けた(図1)。

本稿ではパッチクランプ法の原理と実際について詳しく解説し、さらに最近の展開についても簡単に紹介する。

II. パッチクランプとは

1. パッチクランプの原理

細胞膜にガラス管微小ピペット(“パッチ電極”または“パッチピペット”)をギガ・オーム($G\Omega$)以上の高抵抗で密着(“ギガ・シール”)させ、その先端開口部の微小膜領域(“パッチ膜”)を電気的に他の領域と隔離した上で電位固定し、そこに含まれるイオンチャネルを通るイオン電流(pA オーダー)を計測する方法がパッチクランプ法である(図2)。

OP アンプで構成される I-V コンバーター(パッチクランプアンプのヘッドステージ)がこの計測回路の基本である(図2)。OP アンプの+と-の入力端子は等電位となり、+入力端子にコマンド電位(V_{CMD})を加えるとパー

チャル・ショートによって一端子も、従ってパッチ膜も、同電位にクランプできる。

パッチ電極先端と膜とのあいだに $10 G\Omega$ ($10^{10}\Omega$)以上のシールができると、その間のシャント電流は極小となり、パッチ膜を横切る電流(I)の100%をパッチ電極からの記録電流(I_p)として計測できることになる(図2)。

2. パッチクランプモードのバリエーション

図3にはパッチクランプ法の種々のモードが模式的に書かれている。単一チャネル記録(single channel recording)法としては cell-attached modeがはじめに開発され¹⁾、その後 inside-out および outside-out modeが加えられた²⁾。さらに最近、open cell-attached inside-out mode⁶⁾と perforated vesicle outside-out mode⁷⁾が開発された。全細胞記録(whole-cell recording)法には conventionalなもの²⁾に、perforated patch mode⁸⁾が加わった。

a) cell-attached mode(on-cell mode)

パッチ電極を細胞上に装着したままで単一チャネル電流を記録するのがこのモードである。これには細胞内環境を正常に保ったままでチャネル活動の観察が可能であるという利点がある。しかし、細胞内条件を直接人為的にコントロールすることはできないし、細胞内電位を正確には知り得ないのでパッチ膜にかかる実効電位が不明であるという欠点がある。また、バス液中に刺激物質を加えてもパッチ電極内液に面したパッチ膜の細胞外面には届かないという欠点もある。逆に、バス液に添加した刺激物質はパッチ膜チャネルが応答すればその刺激物質は何らかの細胞内セカンドメッセンジャーを介して間接的に効くと結論できるという利点にも

、島根県産物販売促進センター「スーパーストア」



It was a great experience to receive messages from all around the globe, which unanimously expressed joy and approval. Many stated, that the decision of the Nobel Assembly will be beneficial to all research on ion channels. I would like to add, that it was the use of the patch clamp technique in so many laboratories which ultimately caused this decision.

Thank You,

E. Neher

*With the very best wishes for a
Happy 1992!*

図1. Neher 博士がノーベル賞授賞の後に各国の友人からのお祝いに対して送った礼状。

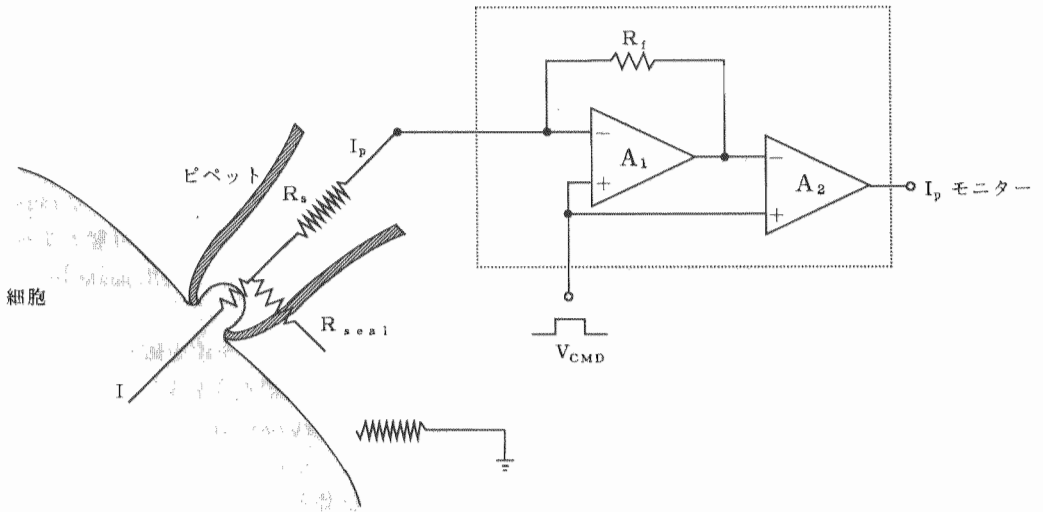


図2. パッチクランプ法の原理図.

R_s はパッチ膜抵抗に直列に入る series resistance (または access resistance), R_{seal} はシール抵抗である. R_s は通常 $1-5M\Omega$ で, R_{seal} が $10G\Omega$ 以上となれば, $I_p/I = R_{seal}/(R_s + R_{seal}) \sim 1$ となる. この I_p を I-V コンバータ (点線) 内の高抵抗 feedback resistor (R_f) における電圧降下として検出する. 実際にはこの OP アンプ (A_1) の出力には, 膜電位成分も加わるので, これを次段の OP アンプ (A_2) で差し引く.

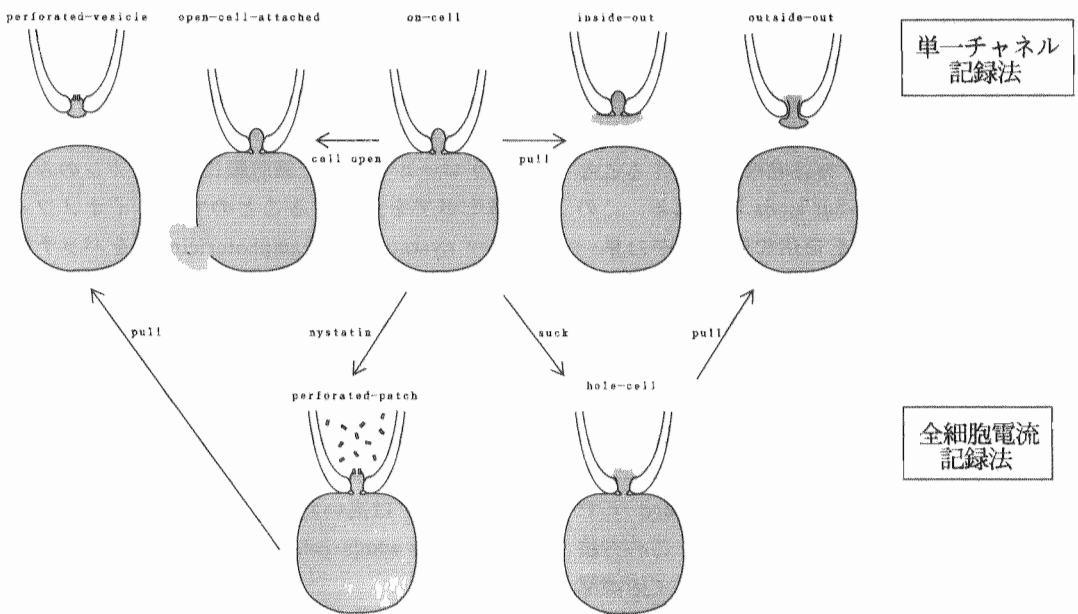


図3. パッチクランプ法のモード.

なる。

b) inside-out mode

On-cell mode からギガシールしたパッチ電極を引き上げると、細胞からパッチ膜が切り取られて (excised patch membrane が得られて) inside-out mode が形成される。このモードでは、細胞内液条件をバス液を介して自由に自由にコントロールしつつ、細胞活動とは独立した形で単一チャンネル活動を観察しうる。但し、細胞質は washout されているので、そこに何らかのチャンネル制御因子が存在していたならば、それを欠落させたままでの実験になることに注意しなければならない。この washout 問題を、細胞質におけるチャンネル制御因子の存在を予想するために逆利用することが可能である。Cell-attached mode でよく観察されていた (またはあまり観察されていなかった) チャンネル活動が excision 後に徐々に失われていく (または活発化する) という run-down (または run-up) 現象が見られれば、細胞内のチャンネル維持・活性化因子 (または抑制因子) があったことが示唆されるからである。

c) outside-out mode

後で述べる whole-cell mode からパッチ電極を引き上げて得られる excised patch membrane は、細胞内側がパッチ電極内液側に面することになるので、outside-out mode 呼ばれる。このモードでは細胞外液を自由に換えながら単一チャンネル活動の記録が可能となる。この場合でも細胞質因子は欠落させている可能性を忘れてはならない。

d) open cell-attached inside-out mode

On-cell の状態でパッチ膜以外の細胞膜の一部を機械的に破壊して、その破壊孔から細胞内液をコントロールしつつ cell-attached 下で inside-out 単一チャンネル記録を行う。この方法では細胞のサイズが大きいほど、そして破壊部位がパッチ膜から遠いほど、そして破壊孔が小さいほど細胞質因子の流出は遅くなる。

e) perforated vesicle outside-out mode

後述の perforated patch mode からパッチ電

極を引き上げて、その先端に (inside-out パッチ膜断端がシールした) vesicle を形成させる。条件がよければこの vesicle 内には細胞質因子のみならずミトコンドリアなどの細胞内小器官も存在するので、比較的正常に近い細胞内のシグナル伝達条件や代謝条件のもとで outside-out mode の単一チャンネル記録が可能となる。

f) conventional whole-cell mode (hole-cell mode)

on-cell mode でパッチ膜を破って穴をあけ、パッチ膜以外の全細胞膜を流れるイオン電流を記録するのが whole-cell mode であり、最近ではその前に conventional を付すか、hole-cell mode と呼び替え⁹⁾ ことによって、あとで述べる perforated patch mode と区別する。この穴を通して細胞内をパッチ電極内液で透析することになるので、細胞内環境をコントロールできる。しかし細胞内の可動小分子がパッチ電極内液へと漏出 (washout) するという欠点がある。このモードでは current clamp 下で細胞内電位の測定も可能である。

g) perforated patch mode (slow whole-cell mode)

Conventional whole-cell mode の washout 問題を克服するために Horn と Marty⁸⁾ は、コレステロールを含んだ細胞膜に一価イオンのみを通すポアを形成することのできるイオノフォア nystatin (又は amphotericin B) をパッチ電極から与えて、パッチ膜に多数の導電性ポアを作成して、それを介して全細胞膜電流を記録するところの perforated-patch mode (nystatin-patch mode) を開発した。このモードでは washout の進行は極めて遅く、conventional whole-cell mode よりも series resistance (R_s : 図2参照) は高いためにクランプの速度も遅いので slow whole-cell mode とも呼ばれる。

3. パッチクランプの利点と欠点

パッチクランプの第一の長所は、ギガ・シールの結果リークが極めて少なく、電位固定を正確に行い得る点にある。しかし、ギガシールを

達成する際に、陰圧によってパッチ電極内に膜を吸い込み、いわゆる Ω 形状膜形成による機械的膜刺激という欠点がある。

ギガシールによる第二の長所は、バックグラウンドノイズレベルが極めて低くなることである。それは、熱ノイズ（ジョンソンノイズ）によるゆれの標準偏差は抵抗の1/2乗に比例するので、ギガ・シール下では極めて小さくなることによる。また、パッチクランプアンプのヘッドステージのOPアンプは電圧雑音の小さいものが使われているが、それでも全く無視することはできず、パッチ電極装着時の抵抗性電流雑音はシール抵抗 (R_{seal}) に反比例するので、これもギガ・シールにより激減することになる（詳細は文献³⁾を参照）。

これまでの電位固定下での細胞膜電流記録法では、細胞内に二本の電極を入れるか、蔗糖やワセリンを用いた二重ギャップ法で細胞外から記録するかしかなかく、いずれにせよ極めて大きな細胞にしか適用できなかった。これに対して、パッチクランプ法によれば通常の小細胞においても電位固定下での膜電流記録が可能であるという大きな利点がある。

パッチクランプによれば直接細胞内環境をコントロールすることができるという利点もある。しかし逆に、比較的小さな細胞質可動分子が washout されるという欠点がある。

Ⅲ. パッチクランプの実際

1. パッチ電極の作製

a) pulling

パッチ電極はガラス管キャピラリーをプラーで引いて作る。whole-cell 記録には軟質ソーダガラス（普通ヘマトクリット管をそのまま使う）で充分だが、単一チャンネル記録には誘電率が低くてノイズの少ない硬質の borosilicate 性ガラス (Pyrex) や、更に硬質の alminosilicate 性ガラスの使用が望ましい。

パッチ電極は刺入するものではないので、先端形状は鋭利でないほうがよい。そしてなるべく先端近くまで太くて（即ちテーパーが短くて）

R_s が小さいものがよい（理由は後述）。そのようなものは一段引きよりは二段（または数段）引きによる電極作製の方が得られ易い（図4）。通常は、先端直径 1-5 μ m でリング液充填時の電極抵抗が 1-5M Ω のものを使用する。

パッチ電極はほこりやごみを嫌うので、先端付近を触ってはいけなしいし、直前に作製して当日中に使用するのが望ましい。

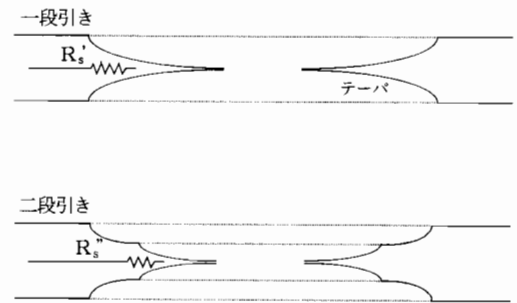


図4. 一段引きと二段引き作製によるパッチ電極の形状の違い。（形状から $R_{s'}$ 、 $R_{s''}$ は明らか。）

b) Sylgard coating

極めて短い時間のうちに高周波開閉現象を示す単一チャンネルの小電流記録において、バックグラウンドノイズとして問題となるのは、熱ノイズやシール抵抗性ノイズよりも、溶液に浸ったパッチ電極より発生する浮遊容量 (stray capacitance, C_s) 性ノイズである²⁾。この C_s ノイズを減少させる方法は、電極の shank 部分の外表面に疎水性・非導電性（低誘電率性）物質をコートすることである。これには通常 Sylgard (Dow Corning 184) が用いられる。Sylgard を電極のごく先端を除いた部分に塗り、コイル状のニクロム線ヒーターの中を通すなどによって乾燥・固化させる。これによって、溶液に浸ったパッチ電極の表面を疎水性にして、その外面に水皮膜ができて容量が上昇することを防ぐとともに、ガラス壁からなる容量に極めて小さいコート容量を直列に加えることになり、その結果全体の容量が激減することになる（図5）。

c) heat polish

電極先端を顕微鏡下で（電流を通して熱した白金線などの）熱源に近づけて heat polish す

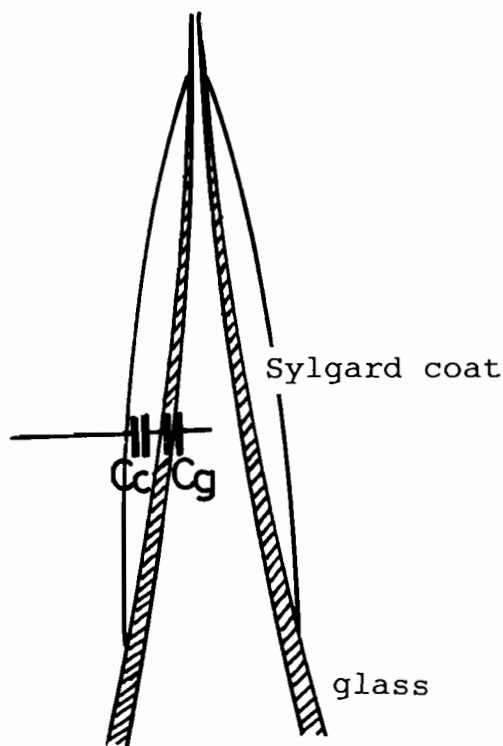


図5. シルガードコートによる浮遊容量減少効果。
 $C_s = C_c C_g / (C_c + C_g)$ であり、もし $C_g \gg C_c$ ならば $C_s \sim C_c$ となる。

るとギガ・シール達成率が上昇する。これは、heat polish によってガラス電極先端面はより広くかつよりなめらかになるからである¹⁰⁾。シルガードコートした場合にはどうしても Sylgard の溶剤が先端部分に達してギガ・シールを阻むので、これを熱によって飛ばすためにも heat polish が必要となる。

d) solution filling

パッチ電極内につめる液はミリポアフィルターを通して、ギガ・シールの障害となる塵を取り除く。通常は注射筒にディスパーザブルのシリンジフィルター (0.2 μ m) をつけて使用する。

この液を充填する方法にはいろいろある。先端が太い場合には、カテラン注射針やポリエチレン細管を用いて電極尾部より back-fill するだけでよい。先端が比較的細い場合には、さきに先端をこの液に浸して毛管現象によって(あ

るいは注射筒で引いて陰圧をかけて)先端部分にのみ液を満たし、その後に back-fill する(気泡が残っていれば tapping で取り除く)とよい。

液は入れすぎるとホルダーに装着する際に電極からあふれてホルダー内部を濡らしてしまい、種々のトラブルの原因となるので注意を要する。

2. ギガ・シール形成

まずパッチクランプアンプの記録モードを“SEARCH”モード(積分回路を含むフィードバック回路により常にゆっくりと平均パッチピペット電流をゼロに調節)に切り替える。(アンプ操作つまみの呼び方は最も広く用いられてきたリスト社の EPC-7 アンプに従うが、他社製でも若干の違いはあるがほぼ同様である)。シール前(低抵抗時)はごく僅かの電圧変化でも大きな電流変化がもたらされるので、VOLTAGE CLAMP(“VC”)モードではオシロスコープのモニター面からビームがオフスケールしてしまう可能性があるからである。但し、アンプのゲインは低め(例えば 1 mV/pA)にセットしておく。

そして陽圧(ポンプで積極的に、あるいは電極内液とバス液面の差による静水圧によって自然にかける)を与えつつパッチ電極をバス液に浸す。これはバス液の気液界面に集積している塵や溶液中の粒子がパッチ電極先端に付着してギガ・シールを妨げないように吹き飛ばしながら、細胞にアクセスするためである。

次に“RESET”ボタン(“SEARCH”モード機能をスピードアップして検出電流をすばやくゼロにする)を押しながら、“V_p-OFFSET”つまみで銀・塩化銀電極の分極電位やピペット内液-バス液間の拡散電位などの総和であるピペット電圧(V_p)をゼロに補正する。(これが不可能なほど V_p が大きい時は、パッチ電極または参照電極内の銀・塩化銀のメッキをやり直す。それでも不可能な場合は電極ホルダー内のどこかが濡れている可能性があるので乾燥させる。)

1 mV (通常“STIM.SCALING”を 0.001 にし

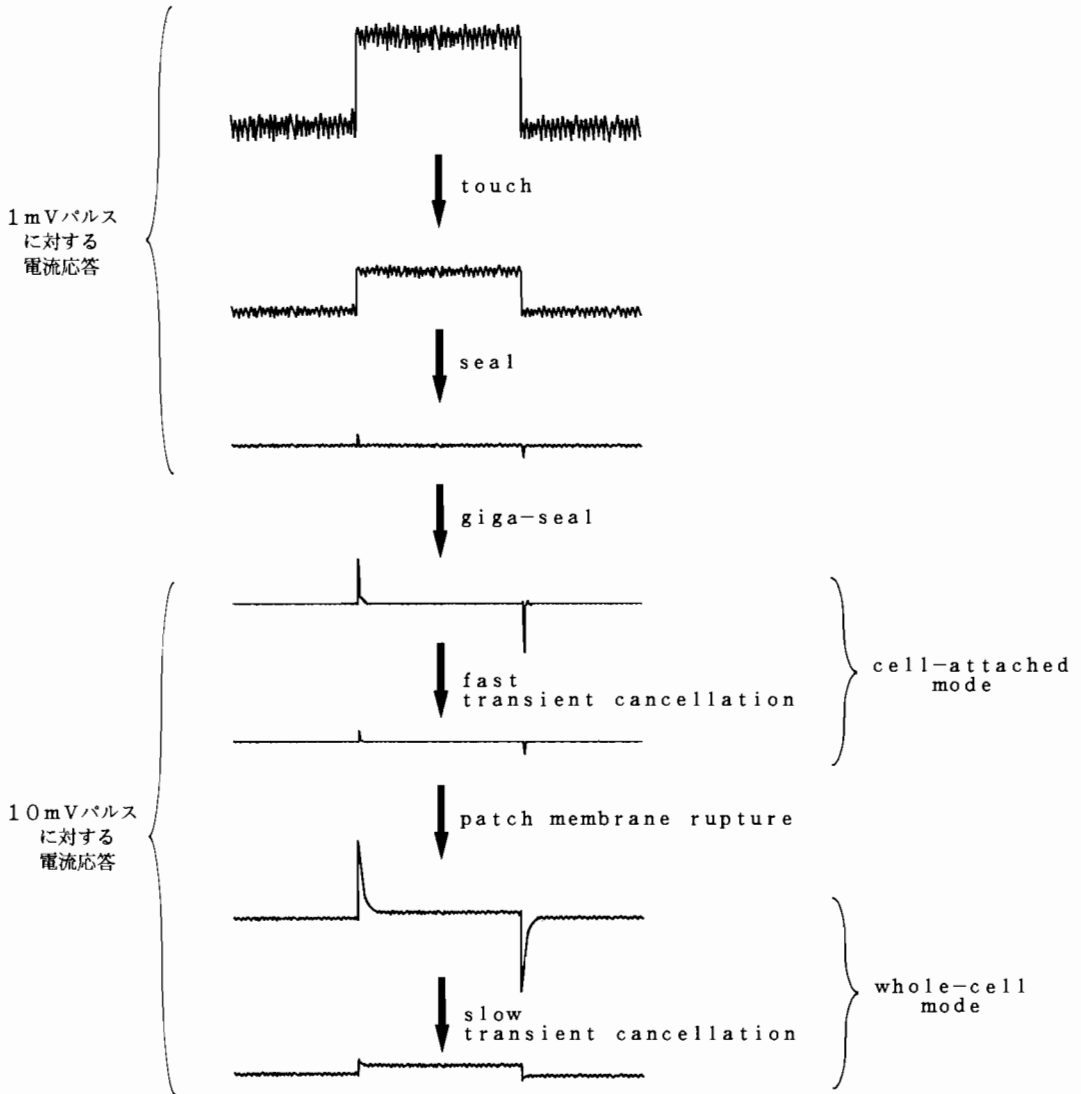


図6. 電極抵抗, シール度およびトランジェント補償のオシロスコープ上でのモニター.

て1Vを入力), 10-50 ms の矩形波パルスを与え, それに対する電流応答からはじめの電極抵抗の大きさ (例えば電流のふれが 0.2 nA であれば 5 MΩ) 及びその後の操作によるその変化をモニターする (図6). 電極先端を細胞表面に軽くタッチさせて, そのときに電流応答が小さくなるのを確認する. このとき積極的に陽圧を加えていた場合にはそれを止める. それだけでギガシールとなることもあるが, そうでない

場合にはポンプか注射筒か口吸いによってパッチピペットに陰圧 (10-30 cm · H₂O) を加えて行き, 突然電流応答がゼロになり, 電流ノイズも小さくなる, 即ちシールするのを待つ. 次に, (通常 "STIM. SCALING" を 0.01 に切り替える方法で) 抵抗モニター用パルスを 10 mV に上げて電流応答がほぼゼロである状態となるまで待つ. こうしてギガ・シールが得られれば陰圧をリリースする. しばらく待ってもギガ・

シールが得られない場合は、新しいパッチピペットに取り替えてやり直す。一度細胞に触ったピペットは二度とは使えない。

細胞によっては表面を予め蛋白分解酵素で軽く処理しておかないとギガ・シールが得られないこともある。

3. 単一チャンネル記録

ギガ・シールが得られたらアンプの記録モードを“SEARCH MODE”から“VC MODE”に切り替える。矩形波パルスのON, OFF時に見られる surge current は fast transient と呼ばれ、電極の浮遊容量によって発生する。これはパッチクランプアンプの“C-FAST”と“ τ -FAST”つまみで補償（後述）して電子回路的に消去する（図6）。なお、この浮遊容量はバス液に浸っているパッチピペットの表面積に比例するので、できるだけ浸っている部分を短くしておく方がよい。

このまま単一チャンネル電流記録を行うのが、cell-attached または on-cell 記録法である。このときアンプを高ゲイン（50-200 mV/pA）に切り替える。ピペット電位を V_p にクランプすると、パッチ膜にかかる電位 (V_m) は細胞内電位 (V_i) マイナス V_p となる。細胞外を高 K^+ 濃度溶液とすると細胞内電位はほぼゼロになり、近似的に $V_p = -V_m$ とみなしうる。

Cell-attached mode からパッチ電極をもちあげてパッチ膜を excise すると inside-out 記録ができる。このときパッチ膜の細胞内面がバス液に露出するので直接これをコントロールできる。このときはもちろん $V_p = -V_m$ となる。whole-cell mode からパッチ電極をもちあげて得られる excised patch membrane では outside-out 記録ができる。このときは $V_m = V_p$ である。

しかしこの方法でサブピコシーメンズのチャンネルや、チャンネルに比し極めてイオン透過効率の低いキャリアやポンプの単位活動の電流を検出・記録することは不可能である。但し、巨大パッチ膜¹¹⁾や全細胞膜（本シリーズの木村の分担を参照）においてその活動の総和を記録す

ることは可能である。

4. 全細胞記録

Cell-attached の状態で suction (-30 ~ -200 cm · H₂O) をかけてパッチ膜を破るか、大電流 (20 nA 以下) を与えてパッチ膜に高電圧をかけて電氣的膜離断をもたらす (zapping する) と、conventional whole-cell mode が得られる。このときあらかじめアンプのゲインは低く (例えば 10 mV/pA に) しておく。cell-attached の状態でパッチ電極から nystatin などのポア形成性イオノフォアールを与えてパッチ膜の電気伝導性を著しく高めると perforated patch mode が得られる。いずれにせよこれらの mode では細胞膜容量が加わるので、新たな容量性 surge current (slow transient) が見られるはずである。

このままパッチクランプアンプの記録モードを“CC”モードに切り替えると current clamp 下での細胞内電位記録ができる。“CC + COMM”モードにすると電気刺激も可能となり、活動電位などを誘発・記録することができる。

“V-HOLD”つまみで保持電位 (holding potential) を適当に設定し、“VC”モードに切り替えると膜電位固定下での全細胞膜電流が記録できる。このときにはもちろん $V_p = V_m$ である。但し、非定常電流応答を正確に観察するためには、あらかじめ slow transient を“C-SLOW”と“G-SERIES”（アンプ種によっては“ τ -SLOW”）つまみで補償（後述）してできるだけ消去しておく必要がある（図6）。このとき“C-SLOW”目盛から膜容量の、そして“G-SERIES”目盛から R_s の、おおよその値を知ることができる。また、膜電流が大きいために R_s を介しての電圧降下が無視できないほど大きくなり、実際に膜にかかる電圧に有意の誤差を与えるような場合には、“%-COMP”つまみを回して R_s による電圧降下をある程度打ち消さねばならない (series resistance compensation : 後述)。但し、この場合には再度“C-SLOW”と“G-SERIES”の微調整を行う。

このモードにおいては細胞外液は自由に変えることができるが、細胞内液の交換には特殊な工夫（細胞内灌流：文献^{10,12}および堀江の本シリーズの分担を参照）を要する。

単一チャネル伝導度が非常に小さい（pS 以下のオーダー）場合は on-cell patch や excised patch では single channel event が観察され得ない（例えば文献¹³）。この場合には whole-cell current をノイズ解析して単一チャネル伝導度を求める（本シリーズの大森の分担を参照）。チャネル密度が非常に小さく（従って、パッチ膜にチャネルが入る確率が極めて低く）て、しかも単一チャネル伝導度が非常に大きい場合には全細胞記録下でこそ single channel event の観察が可能である（例えば文献¹⁴）。

5. ナイスタチン穿孔パッチクランプ法

Slow whole-cell recording 法は、conventional whole-cell 法における washout 問題を克服する画期的な方法である。しかし、これにはいくつかの技術上の困難性がある。Nystatin は DMSO で高濃度（50 mg/ml 位）に溶かして保存するが、-20℃でも数日しかもたない。実験に供する直前に電極内液に溶かして最終濃度 50-100 μg/ml とするが、sonication しても完全には溶解せず、残った粒子がギガ・シールを阻む。しかも、一旦水溶液に溶かすと 1-2 時間しかもたない。また、高濃度の DMSO が膜に傷害を与えることもある。そこで Horn と Marty⁸⁾ は、ギガ・シールしたあとでポリエチレン細管によってパッチ電極内を灌流して nystatin 液を与えることでこれらの問題を解決した。しかし、ピペット内灌流はそう容易なことではなく、その上 nystatin がパッチ膜に到達するにはかなり時間がかかる。それゆえ通常は、先端部のみは nystatin を含まない液で満たし、nystatin 液は back-fill するという方法が取られる。しかし、nystatin 到達時間のコントロールは困難であるし、いずれ高濃度 DMSO にパッチ膜がさらされるという問題点は解決しないままである。これに対して八尾ら

¹⁵⁾ は、nystatin をモル比 1:10 で fluorescein-Na と共にメタノールに溶かすと、遮光していれば低温で長期間保存がきくこと、そして使用直前に窒素ガスでメタノールを飛ばしてから電極内液に溶かせば、両親媒性の fluorescein の助けを借りて nystatin の溶解度が著しく増すことを最近見いだしている（詳しくは本シリーズの八尾の分担を参照）。

Perforated patch が成立したあとで excise すると、遊離膜片がうまく融合した場合には電極内液側のみに nystatin ポアをもつところのヴェシクル(perforated vesicle)が得られ、これによって細胞質内の代謝系や信号系が完全なまま outside-out mode での単一チャネル記録が可能となる⁷⁾。

6. 膜容量測定法

a) capacitive surge measurement

Whole-cell patch clamp（等価回路は図7左）下に矩形波パルス V_0 を与えると、その電流応答は図7右下の式で表される。この式の右辺の第二項が capacitive surge current（図7右上）であり、これを積分してもとめた全チャージ量 q は $V_0 C_m$ に等しい。従って、surge 面積から評価した q 値から C_m 値が求められる。もし $R_m \gg R_s$ という特殊条件がいつも成立する場合には、パッチ電極から傾斜上昇ランプ波電圧 ($V = \beta t$) を与えると、 $I = (V/R_m) + C_m(dV/dt) = (\beta t/R_m) + C_m \beta$ となり、電流応答はいつも $C_m \beta$ だけ上乗せされた形となる。それ故、この電流ジャンプ値から C_m を評価することができる。しかし、 R_s が R_m に比し無視できない通常条件ではそう単純にはいかない¹⁶⁾。

b) phase-sensitive detection method

$R_m \gg R_s$ ならば、高周波交流を印加することにより抵抗性電流と容量性電流は90度の位相のずれによってロックインアンプを用いて分離計測が可能である。Neher と Marty¹⁷⁾ はこの原理を conventional whole-cell mode に適用し、エキソサイトーシス過程における膜表面積の増加（およそ $1 \mu F/cm^2$ の定数で比例する）を膜容量

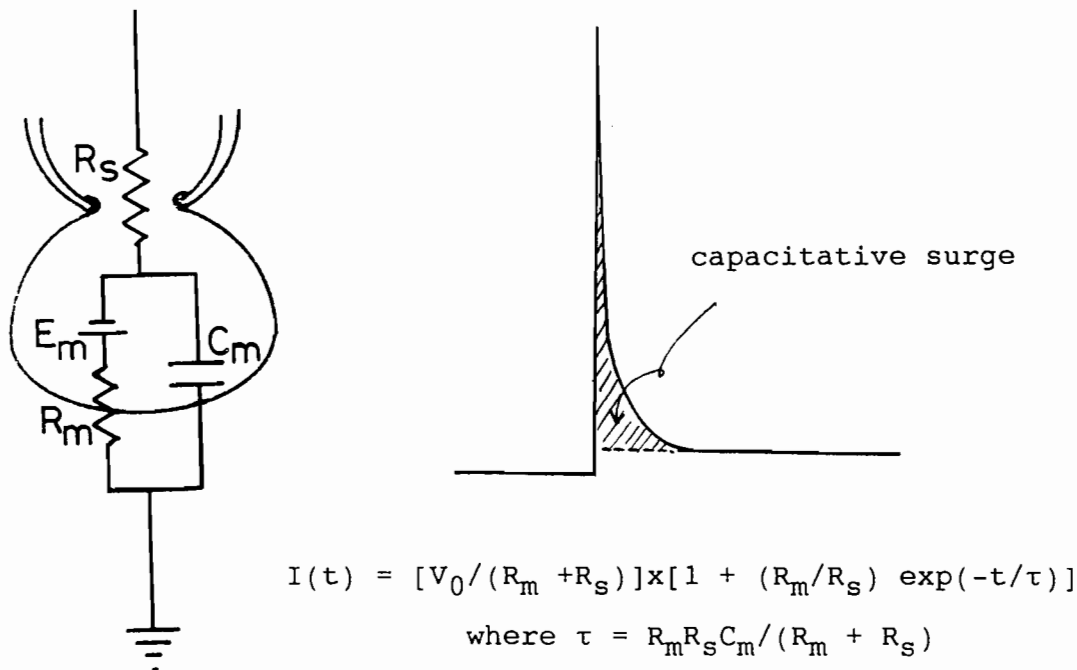


図7. 全細胞記録の等価回路とこれに矩形波電圧を与えた時の capacitive surge current.

の増加によって計測する phase-sensitive detection (PSD)法を開発した(詳しくは本シリーズの丸山の分担を参照). 実際には, 膜抵抗に直列に R_s が加わるので上記のような単純な直交成分分離法は適用できない. そこで彼らは, 抵抗の微小変化が計測「容量性」電流に影響を与えず, 容量の微小変化が「抵抗性」電流に影響を与えないような位相のずれ ϕ を絶えず手動的に求めつつ, 測定するという方法をとった. 最近では, R_s を人工的・周期的に変化させることによって, この ϕ をコンピューター計算で経時的にもとめるという方法も取られている¹⁸⁾.

ところで PSD 法では 0 度電流, 90 度電流および入力抵抗が測定可能であり, もし E_m がわかれば, 残る未知パラメーターの C_m と R_m と R_s も計算で求めることができるはずである(図7左参照). Lindau と Neher¹⁹⁾ は, E_m が一定という特殊な場合にこれらを連続的にコンピューター計算するという方法を取った. しかし, イオンチャネルの活性化が伴われる(従って膜抵抗や膜電位が大きく変化する)ようなエ

キソサイトーシスの場合にはこの方法は使えない. そこで挟間は, 高周波サイン波に低周波矩形波を重畳印加して $E_m = E_{rev}$ をも含めてすべてのパラメーターを経時的・定量的に求めることのできるシステムを開発した²⁰⁾. 私達は, これを用いていくつかのエキソサイトーシスの初記録に成功している^{20,21)}.

7. パラメーター補償

a) fast capacitance compensation

ギガ・シール時の capacitive surge は, 主としてピペット容量からなる浮遊容量 (C_p) をチャージする電流によってもたらされる. この容量が大きすぎればアンプ入力 saturation が引き起こされ, それほど大きくなくてもコマンドパルス (V_{CMD}) を印加した直後の速い電流応答成分に歪みをもたらす. ピペット容量は既に述べたように, 液に浸っているガラス面積に比例するので, できるだけ液に浸る電極部分を短くすべきである. また, ピペット容量はガラスの誘電率に比例し厚さに反比例することか

ら、硬質で肉厚のガラス管を用いるのが望ましい。更に C_p は既に述べた Sylgard coat で激減させることができる。

これらの対策を講じても残る C_p は、パッチ

クランプアンプに内蔵された回路（図8）で補償する。即ち、 V_{CMD} 入力直後の積分回路（一段目）と OP アンプ A_3 の手前の積分回路（二段目）の二つで立ち上がり（立ち下がり）部分

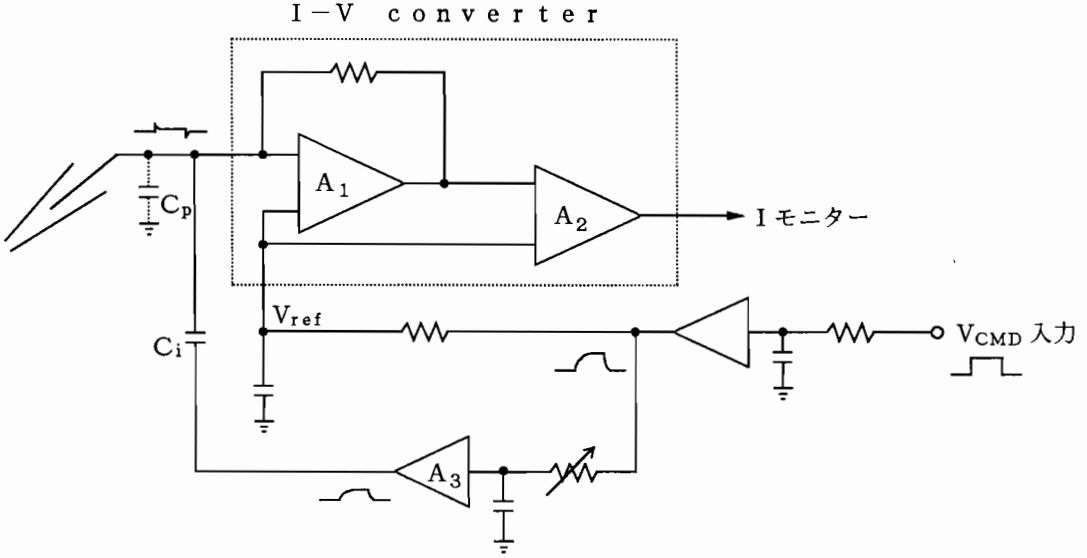


図8. Fast capacitive surgeの補償回路.

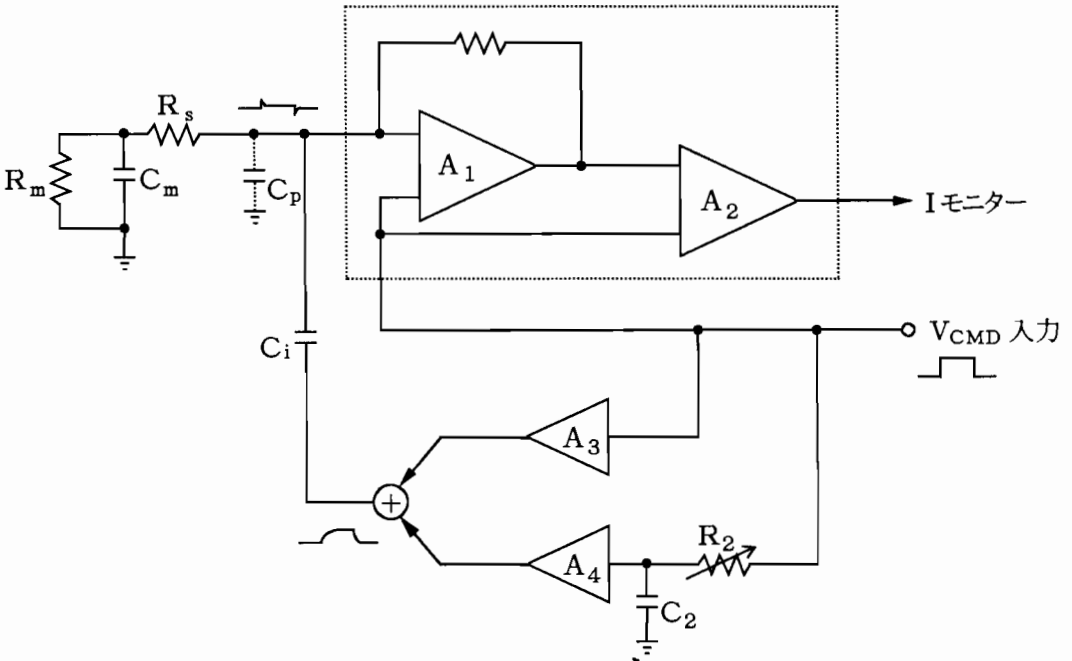


図9. Slow capacitive surgeの補償回路.

を和らげることで、上述の V_{CMD} 入力直後の速い電流成分の歪みを軽減する。この積分波形の時定数は二段目の回路の可変抵抗 (“C-FAST”つまみ) で、大きさは A_3 のゲイン (“ τ -FAST”つまみ) で調節する。そして、容量 C_i を介して波形を微分することによって capacitive surge と逆向きの電流をヘッドステージに流すことで浮遊容量 C_p を打ち消すのである³⁾。

b) slow capacitance compensation

Whole-cell 時には膜容量 C_m が series resistance (R_s) を介してチャージされるために、新たに slow capacitive surge が発生する (このとき C_m と並列に入る膜抵抗 R_m は R_s に比し極めて大きいのでその寄与は無視できる)。例えば、 $R_s = 5M\Omega$ 、 $C_m = 20pF$ の場合には、slow transient の時定数は $100\mu s$ にも達する。この slow transient もアンプに内蔵された回路 (図9) で補償する。即ち、fast capacitance compensation と同様の手段で V_{CMD} の立ち上がり (立ち下がり) 部分を和らげる。この時、 R_2 と C_2 からなる時定数は fast capacitance compensation より100倍くらい大きい値に設定しておく。積分波形の時定数は可変抵抗 R_2

(“G-SERIES”つまみ) と容量 C_2 の切り替え (“SLOW RANGE, pF”つまみ) で、大きさは A_4 のゲイン (“C-SLOW”つまみ) で調節し、 A_4 の出力を fast capacitance compensation 用アンプ A_3 の出力と加算し、最終的に容量 C_i を介して微分波形とし、逆向きの電流をヘッドステージに流すことでほぼ完全に slow transient を打ち消すのである³⁾。

c) series resistance compensation

Series resistance (R_s) とは計測対象たる細胞膜以外から生ずる抵抗で、主としてパッチ電極とパッチ膜破片によって形成される。この R_s は、これまでに述べたように $R_s C_m$ による slow transient 発生という問題に加え、流れる電流が大きい whole-cell 記録時にはそこでの電圧降下が大きな問題となる。例えば、 $R_s = 5M\Omega$ 、ピペット記録電流 $I_p = 2nA$ の場合には、 R_s での電圧降下によるクランプ電位誤差は $10mV$ にも達する。そこでこの電圧降下分は、電流出力の何%かを可変抵抗 (図10の R_s compensation, “%-COMP”つまみ) によって分圧し、それを補正電圧として V_{CMD} に加算してヘッドステージに返すことで series resistance を補正するのである³⁾。

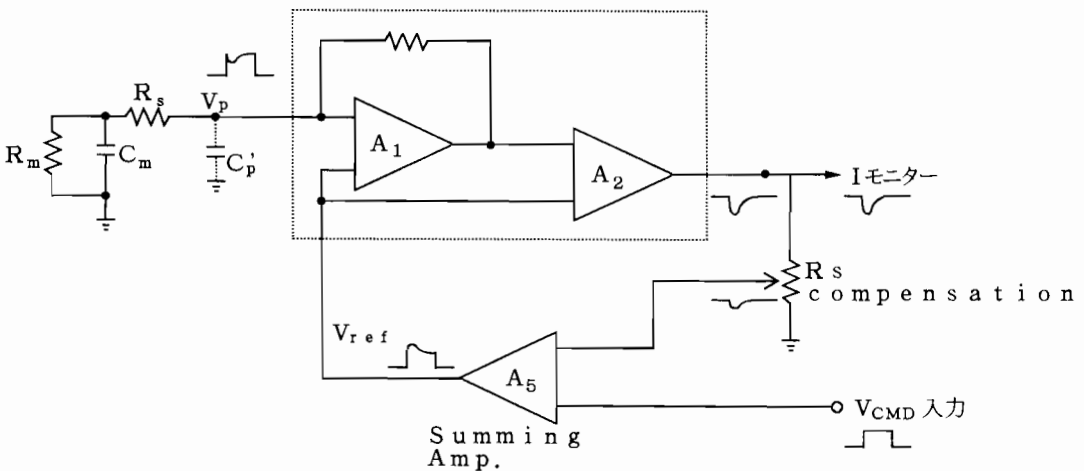


図10. Series resistanceによる電圧降下の補償回路。

Ⅳ. お わ り に

連載「パッチクランプ実験技術法講座」の入門として、本稿ではパッチクランプ法の原理と実際について解説した。初心者、入門者への手助けに少しでもなれば幸いである。さらに詳しい内容については、引き続いて連載される各専門家の方々の総説を参照していただきたい。内容の多くは文献³⁾と生理学研究所における「生理学における実験手技に関する研究会」の講義テキストに負っている。実技上の入門は、今年度から生理学研究所ではじまる「生命科学実験技術トレーニング・コース」で受けることができる。

文 献

1. Neher, E. & Sakmann, B. (1976) Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* **260**, 799-802
2. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**, 85-100
3. Sakmann, B. & Neher, E. (1983) "Single-Channel Recording". Plenum, New York
4. Neher, E. (1992) Ion channels for communication between and within cells. *Science* **256**, 498-502
5. Sakmann, B. (1992) Elementary steps in synaptic transmission revealed by current through single ion channels. *Science* **256**, 503-512
6. Kakei, M., Noma, A. & Shibasaki, T. (1985) Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol.* **363**, 441-462
7. Levitan, E. S. & Kramer, R. K. (1990) Neuropeptide modulation of single calcium and potassium channels detected with a new patch clamp configuration. *Nature* **348**, 545-547
8. Horn, R. & Marty, A. (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol.* **92**, 145-159
9. Armstrong, D. L. & White, R. E. (1992) An enzymatic mechanism for potassium channel stimulation through pertussis-toxin-sensitive G proteins. *Trends Neurosci.* **15**, 403-408, 1992
10. 小原正裕、亀山正樹、野間昭典、入沢宏 (1983) Giga-seal 吸引電極の作製と単一心筋細胞への応用. *日本生理学雑誌* **45**, 629-639
11. Hilgemann, D. W. (1989) Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflügers Arch.* **415**, 247-249
12. Soejima, M. & Noma, A. (1984) Mode of regulation of the ACh-sensitive K-channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. *Pflügers Arch.* **400**, 424-431
13. Sakai, H., Okada, Y., Morii, M. & Takeguchi, N. (1992) Arachidonic acid and prostaglandin E₂ activate small-conductance Cl⁻ channels in the basolateral membrane of rabbit parietal cells. *J. Physiol.* **448**, 293-306
14. Loirand, G., Pacaud, P., Baron, A., Mironneau, C. & Mironneau, J. (1991) Large conductance calcium-activated non-selective cation channel in smooth muscle cells isolated from rat portal vein. *J. Physiol.* **437**, 461-475
15. Yawo, H. & Chuhma, N. (1993) An improved method for perforated patch recordings using nystatin-fluorescein mixture. *Jpn. J. Physiol.* **43**, 267-273
16. 渡辺昭 (1966) 生体膜の電気現象と等価回路理論. 「膜の生物物理」京都、77-141
17. Neher, E. & Marty, A. (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6712-6716
18. Filder, M. & Fernandez, J.M. (1989) Phase tracking: an improved phase detection technique for cell membrane capacitance measurements. *Biophys. J.* **56**, 1153-1162
19. Lindau, M. & Neher, E. (1988) Patch-clamp technique for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflügers Arch.* **411**, 137-146
20. Okada, Y., Hazama, A., Hashimoto, A., Maruyama, Y. & Kubo, M. (1992) Exocytosis upon osmotic swelling in human epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1107**, 201-205
21. Hashimoto, A., Hazama, A., Kotera, T., Ueda, S. & Okada, Y. (1992) Membrane capacitance increases induced by histamine and cyclic AMP in single gastric acid-secreting cells of the guinea pig. *Pflügers Arch.* **422**, 84-86