

## 薬物刺激用圧力制御装置

伊藤嘉邦\*・倉橋 隆\*・金子章道\*・×

(\*生理学研究所, 情報記憶部門・×慶応義塾大学, 医学部, 生理)

### I. はじめに

最近, 単一ニューロンのトランスミッタに対する感受性などを調べる目的で, パッチクランプ記録下の単離細胞に薬物刺激を行う実験が多く用いられるようになってきている. これらの実験には微小ピペットを用いた圧力添加法, 電気泳動法や灌流法などの様々な方法が実験用途に応じて使い分けられている. その中でも圧力添加法は, 灌流法に比べると圧倒的に速い時間分解能で薬物刺激を行うことができ, 電気泳動法を用いる場合の様に薬物をイオン化する必要がないので, 広く一般的に用いられている. これまで, 刺激ピペットの圧力を制御する装置として, ピコポンプなどが代用されてきたが, 従来のピコポンプでは圧力を定量的にコントロールする機能を持っていない. 生理実験を行う場合, 刺激圧力は刺激濃度を決定する重要なファクターになるので慎重に定量化する必要があるが, 従来のダイヤル式の圧力制御ニードル・バルブを用いた装置では, 一度設定圧力を変えた後に再びもとの値に再設定する程度の実験すら困難である. そこで, 我々の研究室ではCKD社の電子レギュレータを使用し, 電圧信号によって刺激ピペットの圧力を自在にコントロールすることができる薬物刺激用圧力制御装置を製作し, 再現性に優れ, パソコンで制御できるシステムとして良好な結果が得られたのでここに報告する.

### II. 装置の概要

本装置は, D/A コンバータ (2チャンネル) とデジタル信号出力 (TTL, 3 Bit) を持ったコンピュータから制御することができる. パッチクランプの実験では, 近年ほとんどの研究室でコンピュータを使用して, 膜電位の制御やデー

タの取り込みをしているので, 既存のプログラムに修正を加え, 実験過程で本装置を制御するのが最も望ましい.

電子レギュレータ自身はパルス刺激を行うほどの高速な時間分解能を持っていない (特に, 0 から圧力を与える場合には非常に遅く, 約3秒程度の遅延が生ずる) ので, 本装置ではあらかじめレギュレータで設定した圧力にたいして最終段の電磁弁で刺激タイミングを制御してパルス刺激を行う方式を使用している. 以下に, 各構成部分について説明する (図1, 2参照).

入力電磁バルブは, 装置全体の圧力源の開閉機能を持っていて, Pressure source 信号 (TTL) によって動作する. 信号が High の時バルブは開き, Low の時バルブは閉じる. 無信号時は, バルブは閉じている. また, バルブを閉じる際に装置全体の排気を行うので排気側のノズルは開けておく必要がある.

圧力スイッチは, 圧力が十分に供給されていない時に電子レギュレータに電源および制御電圧が印可されないように働く安全スイッチであり, 電子レギュレータに供給されている空気圧を常にデジタル表示して空気圧源のモニタとしても機能している. ここでは圧力スイッチの設定を ON:  $3.0 \text{ kg/cm}^2$ , OFF:  $2.5 \text{ kg/cm}^2$  としてヒステリシス特性を持たせている. これによって供給圧力変動時にスイッチの動作が不安定になることを防いでいる. また, この圧力スイッチに対する電源供給は, 電源スイッチに非連動にしてあり, 電源コンセントを接続してある限り設定値を保持するようにしてある (図2). また, 電源遮断時にも内部メモリーによって設定値は約10日間保持される.

電子レギュレータは, 半導体圧力センサーと電子回路によるフィードバック制御方式を採用しており, 制御信号によって空気圧を連続的に

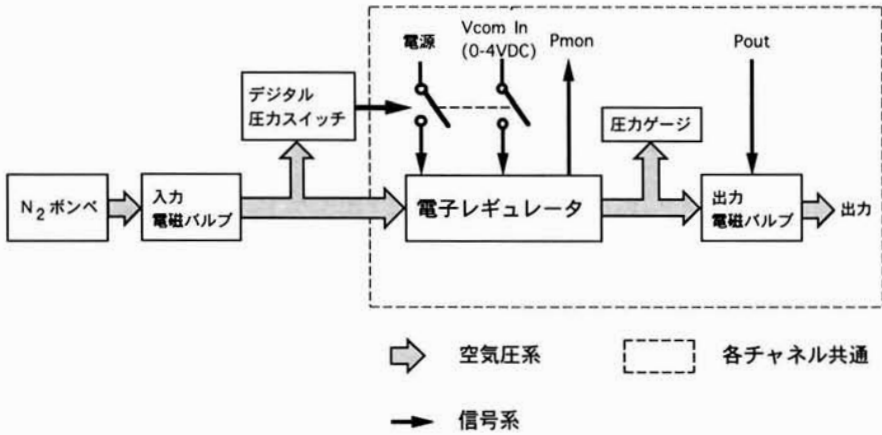


図1. 圧力刺激装置 ブロック図  
電子レギュレータを保護するため、デジタル圧力スイッチでリレーを制御している。

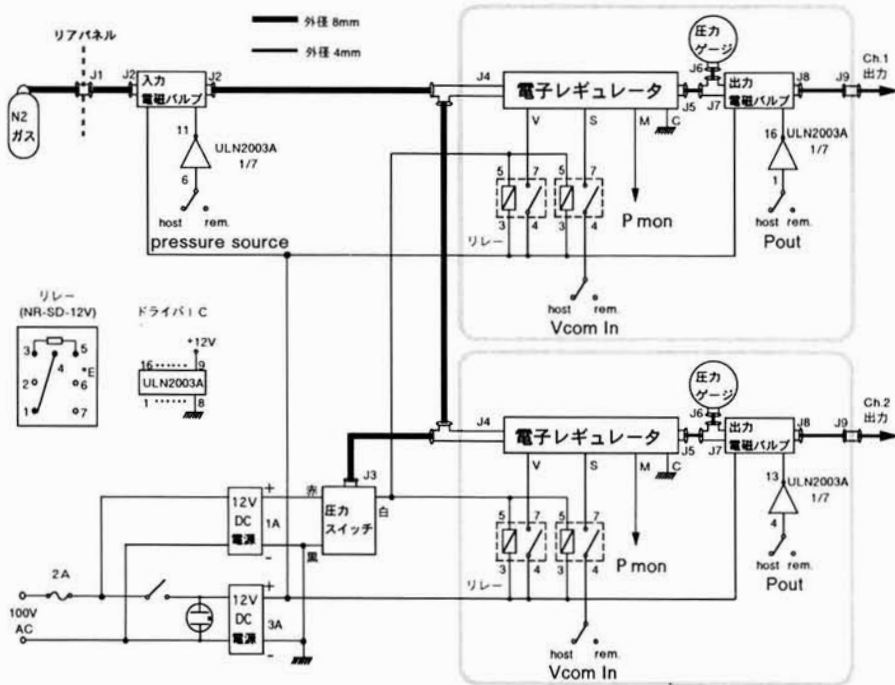


図2. 圧力刺激装置 回路図  
図1のブロック図をそのまま回路図に書き直したもの。デジタル圧力スイッチの設定値保持のため、電源スイッチに非連動の電源を主電源の他に持つ。

高精度にコントロールできるもので、本装置の心臓部である。制御用に内蔵している半導体圧力センサーより制御圧力モニター信号が出力されており、電氣的に制御圧力のモニターを行うことができる。ただし、この圧力モニター信号は製品間でのバラツキがあるため、正確に制御圧力を読みとるにはキャリブレーションを取る必要がある。この電子レギュレータには3種類のサブタイプがあり、各々は異なる圧力範囲(0~1, 1~5, 1~8 kgf/cm<sup>2</sup>)を制御することができる。本装置では、通常生理実験に使用する圧力範囲を考慮して1~5 kgf/cm<sup>2</sup>の製品を使用している。また、それぞれの製品について3種類の制御電圧範囲(0~10 VDC, 0~5 VDC, 4~20 mADC)のものがあるが、制御側のコンピュータのD/Aコンバータの出力電圧から0~10 VDCのものを使用している。使用する上で、入力信号を加えた状態で一次圧力を“設定二次圧力 +0.5 kgf/cm<sup>2</sup>”以下にしたり、特に一次圧力が大気圧の時に電源および入力信号を長時間(10時間以上)加えた場合、正常な圧力制御ができなくなるので注意が必要である。

本装置では、上述したように圧力スイッチを設けることによって供給圧力低下時には、電子レギュレータに対する供給電源及び制御信号電圧を自動的に遮断することによって装置を保護している。

圧力ゲージは、電子レギュレータの出力圧力を目でモニターするためのものである。プログラムによる圧力制御が正常に働いていることを確認することができる。ここでは、0~2 kgf/cm<sup>2</sup>の圧力を計ることができる圧力ゲージを用いており、このため圧力制御装置の最大設定圧力は、この圧力ゲージの最大入力である2 kgf/cm<sup>2</sup>となっている。

出力電磁バルブは、電子レギュレータによって設定された圧力の出力を行うもので、Pout信号(TTL)によって開閉動作する。Pout信号によって、出力タイミングおよび刺激時間を定量的に制御することができる。信号がHighの

表1. 主要部品表

総ての部品代を合わせて25万円程で装置は製作できた。

## 【圧力関係部品】

部品名	メーカー	型番	使用数
電子レギュレータ	CKD	ER350-008-B	2
圧力スイッチ	CKD	P1S-P10K-6P	1
入力電磁バルブ	CKD	3PA210-GS8C2S-4	1
出力電磁バルブ	CKD	M5136NP-M5-DC12V	2
圧力ゲージ	CKD	G590-8-PK02	2
J1: ニュージョイント	CKD	GSS8-0-X	1
J2: ニュージョイント	CKD	GSS8-6	3
J3: ニュージョイント	CKD	GSY88-0	2
J4: ニュージョイント	CKD	GSL8-8	2
J5: ニュージョイント	CKD	GSS4-8	2
J6: ニュージョイント	CKD	GSS-4-8-M	2
J7: ニュージョイント	CKD	GST4-M5	2
J8: ニュージョイント	CKD	GSL4-M5	2
ソフトナイロンチューブ(8mm)	CKD	F-1508 20m	1
ソフトナイロンチューブ(4mm)	CKD	F-1504 20m	1

## 【電気関係部品】

部品名	メーカー	型番	使用数
D C電源 (12V5A)	COSEL	K50A12V	1
D C電源 (12V1A)	COSEL	K10A12V	1
ケース	リード	CR200	1
ドライバIC	SPRAGUE	ULN2003A	1
リレー	松下	NR-SD-12V	4

注意: ニュージョイントの販売は、10 [個/箱] 単位です。

時バルブは開き、Lowの時バルブは閉じる。

## Ⅲ. 装置製作の実際と費用

電子レギュレータの完成度が高いこともあって、回路や配線は非常にシンプルになっているので装置そのものを製作する事は、さほど大きな負担にはならない。筆者らの研究室でも、はんだごてを初めて使う修士の院生が2週間ほどで完成させてしまった。また、総費用は25万円程度であり、これは市販のピコポンプの半額程度の値段である。表1に、主な部品一覧がまとめてあるので参照されたい。また、製作の参考までに試作品の写真を図3~5に示す。

## Ⅳ. 動作順序

動作順序や圧力制御、圧力出力のタイミングは、外部コンピュータ側で制御を行う(以下の説明は、図6を参照のこと)。

(1) Pressure source 信号端子を High にして、

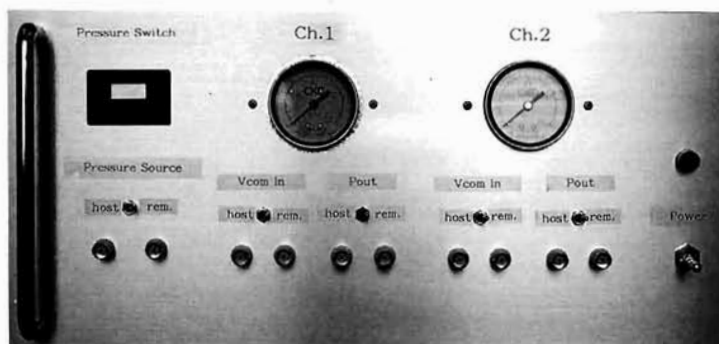


図3. 圧力刺激装置 フロントパネル

上側にデジタル圧力スイッチと出力圧力ゲージが並び、その下にホストとリモートの切り替えスイッチ、一番下に入力信号端子が並んでいる。

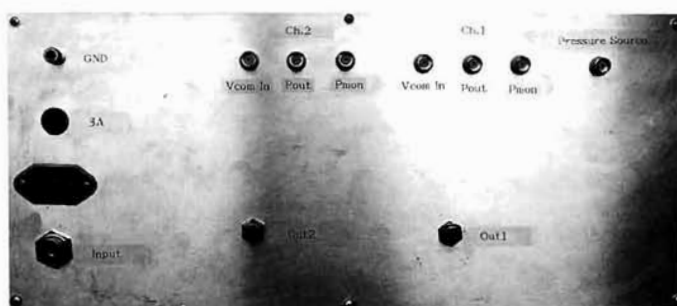


図4. 圧力刺激装置 リアパネル

圧力の入出力コネクタと Pmon 端子(出力圧力モニタ信号端子)がある。

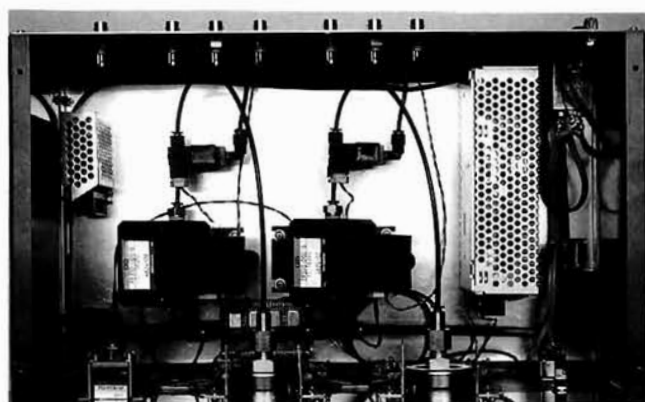


図5. 圧力刺激装置 内部レイアウト

中央に2個の電子レギュレータが並び、上側に2個の出力電磁バルブ、写真下側のフロントパネル側に、リレー基板と電磁バルブのドライバー基板があり、圧力パイプと電気配線が通っている。

入力電磁バルブを開く。圧力スイッチと電子レギュレータに対する圧力供給が行われる。供給圧力が  $3.0 \text{ kg/cm}^2$  に達すると圧力スイッチが ON となりリレーが働き、電子レギュレータの電源と制御信号のラインが導通状態となる。

(2) Vcom In 端子に、出力圧力を設定する制御電圧を加える。

(3) 制御圧力モニター端子の信号電圧が設定値に達し定常状態になったことを確認して(制御信号入力から数秒後)、Pout 信号端子に信号を入力して出力電磁バルブを開閉する。

(4) 以上の実験操作の後、Pressure source 信号端子を Low にして、入力電磁バルブを閉じる。

このとき、内部圧縮空気が瞬間的にリリース

されるのに伴う空気音が聞こえる。

制御時の注意点として、次のことを考慮する必要がある。

本装置は、電子レギュレータにおける制御動作時のリーク、および入力電磁バルブを閉める際に起こる内部圧力のリリース時に比較的大量の空気を消費する。そのため、圧力供給に窒素ボンベを使用する際には、大容量のタンク(7000ℓ)を使用することが望まれる。本装置におけるリーク量を最小限に抑えるためには、(1)～(4)の動作をなるべく迅速に行い、また、実験終了時に内部圧力をリリースするのに伴って窒素ガスが消費されるので、実験上定量的刺激を必要としない場合は頻繁に入力電磁バルブを開閉することはさけるようにする。

また、薬液の射出量は、圧力の他に、ピペットの先端径、薬液の粘性、射出部位の流体抵抗などによって影響を受けることが考えられる。装置を使用する際には、実験条件をできるだけ一定に保つようにする必要がある。

## V. 計測制御用コンピュータと制御プログラムについて

先に紹介したように、本装置を制御するには、D/A コンバータを2チャンネルと TTL レベルの 3 Bit デジタル信号出力を装備したコンピュータでプログラミングする事がもっとも適している。「IV. 動作順序」および図6に従って制御を行う場合は、さらに出力圧力をモニターするための A/D コンバータが2チャンネル必要である。

我々が、この装置を制御するにあたっては、ホストコンピュータに NEC 社の PC-9821 AP 2 を、また D/A コンバータにネオログ電子株式会社の PCN-3098 (12 bit 4 ch D/A 変換, 8 bit TTL デジタル出力, 8 bit TTL デジタル入力)、A/D コンバータにはカノーブス社の ADX-98 (12 bit 16 ch A/D 変換)を使用している。

I/O ポートを制御することができる言語であれば、プログラムによってパッチクランプ下の

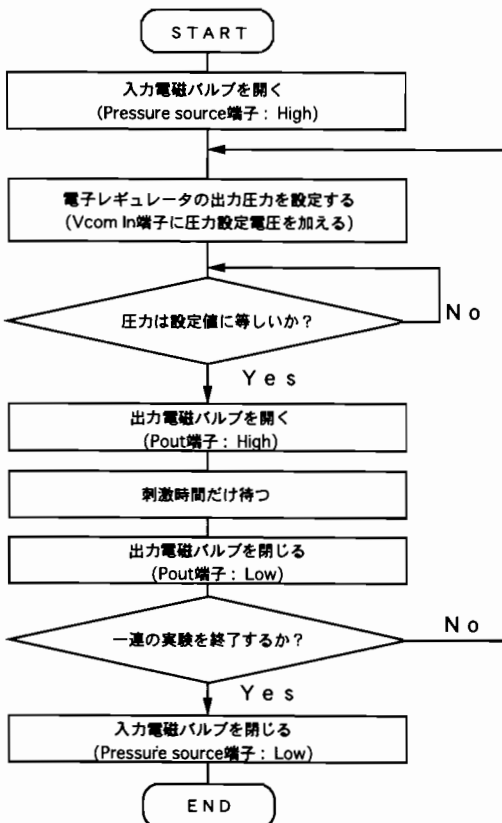


図6. 圧力刺激フローチャート

制御アルゴリズムは極めて簡単なので、実験プログラムに修正を加え、実験過程で本装置を制御するようにした。

細胞の膜電位と刺激タイミング、刺激時間、圧力を任意の値でセットすることができる。我々の研究室では、ポーランド社の TURBO Pascal とマイクロソフト社のアセンブラを用いてプログラムを制作し、パッチクランプの実験制御のプログラムとの統合環境下に、圧力刺激を自由にコントロールする事ができる様にプログラムを作製し、実際の実験にも大変重宝している。

また、生理学の実験では、実験の最中にいきなり新たな現象を見だし、実験計画の過程では予測できない実験を行う可能性がある。たとえば、複雑な膜電位制御を行うのと同時に薬物刺激を行うなどの事態に陥ったとき、既存のプログラムが対処していないために、生きのいい細胞をみすみす見逃すことが読者の方々にも経験があることだろう。本装置では、制御信号入力系を独立に2チャンネル設けて2台のコンピュータをつなぐことができるようにすることで、実験の汎用性をあげている。すなわち、一台のコンピュータはパッチクランプの実験を制

御するようにセットしておき、もう一台のコンピュータは、圧力刺激装置を独立に制御するようにセットしておく。こうすることによって、一台目でいかなる実験プログラムが走っているときにも、2台目のコンピュータで薬物刺激を行うことができる様になっている。筆者らの実験に際しても<sup>1,2)</sup>、この切り替えスイッチが有効であったことがこれまでも何度かあった。

## VI. 終わりに

従来、パッチクランプの実験は比較的实验系が複雑とされ、従って実験者もかなりの技術と知識を事前に習得する必要があった。しかし、今日では、周辺機器の技術的向上と相まって、かなり広い層の研究者がパッチクランプの実験系を取り入れるケースが目立つようになってきている。院生や電気生理を勉強し始めの研究者が短期間でパッチクランプの技術を習得し、すぐに実験を始めるケースも非常に増えてきた。特にそういった研究者にとって、薬物刺激はパッチ

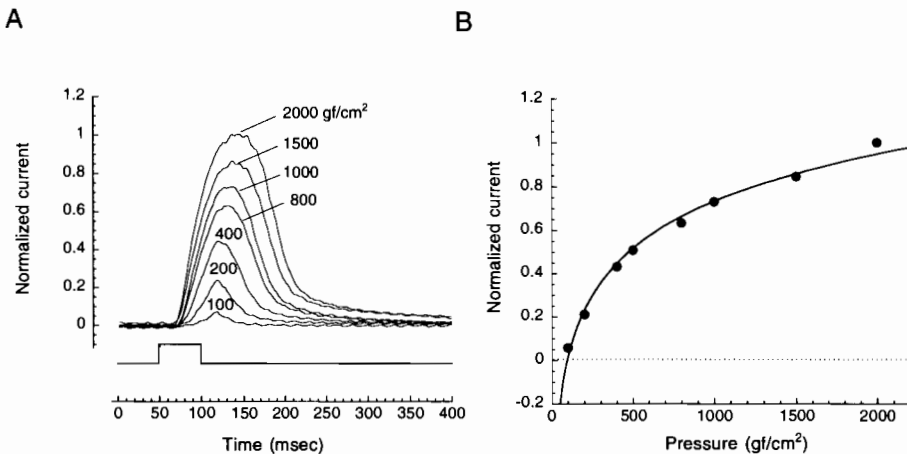


図7. 刺激装置に圧力を加えた時に噴出する刺激溶液の時間経過

A: 10倍希釈したリソゲルを充填した刺激ピペットに、50 msec の圧力刺激を与えた時にピペット先端付近に発生する Junction current を測定した。刺激開始から 20 msec 後に電流が立ち上がり始め、設定圧力に依存して電流振幅が増大する。潜時の 20 msec は、刺激装置のソレノイド・バルブによる遅れ(12 msec 程)と、刺激ピペット先端から記録ピペットまで溶液が移動する時間との合計であると考えられる。

B: 設定圧力と応答振幅との関係。近似曲線は対数関数を示す。一般に、イオンの拡散電位はイオン濃度の対数に比例する。本実験で記録した記録ピペット先端での電流応答は、おそらくこの電位変化によって生ずるものであると考えられるので、この実験結果から、濃度と圧力との関係がリニアである可能性が示唆される。

クランプ実験の中でも、重要でありながら最も頭を悩ませるものの一つであるが、本装置は非常に簡易に、それでいて比較的定量的な時間分解能と濃度分解能をもって実験を行う環境を提供する(図7)。また、本装置は、単離細胞のみならずスライス標本に対するパッチクランプ実験での局所的薬物刺激の場合にも十分な効果を発揮することが予想される。さらに、最近多くの研究室でパッチクランプの実験には実験制御プログラム pclamp が使用されているが、本装置に定電圧電源を組み合わせることで、pclamp から本装置を使用して定量的な圧力制御を行うことができる。あるいは、膜電位制御用のコマンドボルテージを切り替えスイッチで本装置の圧力設定値にする事も可能である。もちろんピコポンプと同様に細胞への薬物注入に使用することも可能であり、この場合にも注

入量をかなり高い精度でコントロールできることが予想され、様々な用途への応用が期待される。

#### 謝 辞

この装置の製作にあたって名古屋大学工学部大学院生の林 真澄さんの協力を得ました、感謝します。本装置の製作は、国際ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム推進機構(ストラスブール、フランス)による助成金で援助されました。

#### 参 考 文 献

- 1) 伊藤嘉邦, 倉橋 隆, 金子章道(1994)匂い刺激用圧力制御装置の開発. 日本味と匂学会誌, 1: 378-381
- 2) 松田十四, 羽柴基之, 馬場駿吉, 倉橋隆, 金子章道(1994)イモリ単離嗅細胞における嗅覚感度の測定. 日本味と匂学会誌, 1: 382-385