

pCLAMP による DOS/V 機へのデータ取り込み

小 原 正 裕

(生理学研究所・機能協関部門)

I. はじめに

電気生理実験において、実験データを安定且つ安全にコンピュータに取り込むことは、後のデータ加工を考えると重要な項目の一つである。

パッチクランプアンプをはじめ、一般的な電気生理の実験で得られる電気信号(電流、電圧信号)はすべてアナログ信号である。これらのアナログ信号をコンピュータに取り込むには、アナログ信号をデジタル信号に変換(A/D変換)する必要がある。ここでは、はじめにデータ取り込みのパラメータ設定時に必要となるA/D変換と連続信号のサンプリングなどに関する基本事項を示した後、パッチクランプアンプ AXOPATCH 200 B (Axon Instruments 社)と、同社のソフトウェア pCLAMP を使用し、コンピュータとして PC/AT 互換機(以下 DOS/V 機)を用いたシステムをモデルとして、アナログデータのコンピュータへの取り込み方法について解説する。

II. アナログデータとデジタルデータ

アナログ量は連続した物理量で、いくらでも細かい値をとることができる。長さ、質量、温度などはすべてアナログ量である。これに対しデジタル量はとびとびの値しかとることができない量で、物の個数などは典型的なデジタル量である。一方、我々が日常的に興味を持つ量にはアナログ量が多いので、アナログ量のある一定の約束でデジタル量に対応できれば便利である。この対応づけを行うことを A/D 変換といい、その作業をするものを A/D コンバータと呼ぶ。

III. アナログデータをデジタル化する利点と欠点

アナログ信号をデジタル信号に変換するとどのような利点や欠点があるのか。最初に、デジタル化の利点として次のようなことが考えられる。

(1) 信号の安定した記録・再生・検索ができる

アナログ信号のままでも磁気テープなどに記録はできるが、内容を劣化させることなく長期間保存するためには細心の注意が必要で、アナログ信号のまま記録・再生を繰り返すとどんどん記録内容が劣化していく。しかし、デジタル信号として記録すると、記録・再生を繰り返しても劣化がほとんどないようにすることができ、高速に検索して必要な信号を即座に出力することも容易になる。CD や LD, DVD はこの利点を大いに活かしたものと見える。

(2) 汎用のパソコンが利用できる

デジタル化された信号は、コンピュータ処理が可能となることが大きな利点である。最近では CPU やデジタル信号処理用 LSI の高速・高性能化と低価格化によって、音声認識や図形認識、雑音除去、歪補正、周波数分析、統計解析などの処理が実現しやすくなり、しかも多くの周辺ハードウェア、ソフトウェアを利用できる汎用パソコンで処理ができるようになった。

一方、デジタル信号に変換する場合の欠点は、以下のことが挙げられる。

(1) 決められた範囲の周波数信号しか処理できない

予め設定した A/D, D/A ボード、量子化による分解能以上の精度は期待できない。

(2) 高い周波数成分が失われる可能性がある
A/D 変換の前にローパス・フィルタを通さなくてはならないが、フィルタのカットオフ周波数以上の波形成分が失われてしまう可能性がある。

IV. アナログ信号の性質

電流や電圧のようなアナログ信号には、我々の観察したい信号の他に必ず雑音成分が含まれている。この雑音の大部分は電気回路(実験機器)の外部から飛び込んでくる蛍光灯やモニター、モーターを使用した機器等からの外来雑音である。この種類は数限りなくその進入経路も一様ではない。このような外来雑音の進入を防ぐために、微小な電気信号を取り扱う電気生理実験ではシールドケージで実験システムを覆うという操作が必要になる。また、雑音進入経路のうち見過ごされやすいものに商用電源(100 V, 50または 60 Hz)の電源ラインがあるが、一般的な雑音はより高周波側に多く含まれている。

このような雑音を含んだ任意の周期信号は、いろいろな周波数の三角関数の無限の和として表すことができる。これがフランスの有名な数学者 Fourier (1768~1830) が考えたフーリエ級数展開である。これは、「周期 T 秒で繰り返される信号を $x(t)$ とすると、信号 $x(t)$ は T 秒で 1 周期、即ち周波数 $1/T$ (Hz) の成分と、その整数倍の周波数成分 [周波数が $1/T, 2/T, 3/T, \dots$ (Hz)] の無限の和として表される。」という、フーリエの定理に基づいている。これを数式で表すと

$$\begin{aligned} x(t) &= a_0 + a_1 \cos \frac{2\pi t}{T} + a_2 \cos \frac{4\pi t}{T} + a_3 \cos \frac{6\pi t}{T} + \dots \\ &\dots + a_m \cos \frac{2\pi mt}{T} + \dots + b_1 \sin \frac{2\pi t}{T} + b_2 \sin \frac{4\pi t}{T} \\ &\dots + b_3 \sin \frac{6\pi t}{T} + \dots + b_m \sin \frac{2\pi mt}{T} + \dots \\ &= a_0 + \sum_{m=1}^{\infty} a_m \cos \frac{2\pi mt}{T} + \sum_{m=1}^{\infty} b_m \sin \frac{2\pi mt}{T} \end{aligned}$$

となる。上式において、 a_0 は信号 $x(t)$ における直流成分の大きさを表し、 $\cos 2\pi t/T$,

$\sin 2\pi t/T$ を基本波成分と呼ぶ。これは、周期 T (秒)、即ち周波数 $1/T$ (Hz) の \cos 波(余弦波)、 \sin 波(正弦波)成分である。 $\cos 2\pi mt/T$, $\sin 2\pi mt/T$ は高調波成分と呼ばれ、周期が T/m (秒)、言い換えれば周波数が m/T (Hz) の \cos 波、 \sin 波成分である。係数 a_m , b_m はフーリエ係数と呼ばれ、それぞれ \cos , \sin 波成分の振幅を表す。

以上のように、フーリエ変換を行うと \sin と \cos を用いた数式で表すことができ、その信号にどの周波数成分が含まれているかという周波数スペクトラム解析が可能となる。フーリエ変換はアナログ信号だけでなく、物理学における基礎法則、物理現象、法則を解析することが可能である。

実際のデータ取り込みでは、観察したいアナログ信号の周波数帯域はどの範囲なのか、信号が高速に変化する時の周波数はどの程度かを把握しておき、それ以上は不要な信号(周波数成分)としてローパス・フィルタで除去するという操作が必要である。パッチクランプ実験においては、アンプの性能や観察したいチャンネルの性質などからこの周波数の値を決めることができるであろう。ここで、ローパス・フィルタとは設定した周波数より高い周波数成分を減衰させる性質を持った電気回路のことである。

アナログ信号上の雑音(Noise)の大きさを表す最もポピュラーな方法として S/N (SN 比)がある。アンプなどのカタログでよく見かける表記法である。これは、ある信号ラインに目的の信号電圧とノイズ電圧があり、目的の信号電圧をノイズ電圧で割ったものが S/N である。例えば信号電圧 1 V, ノイズ電圧 1 mV だとすると $1 \text{ V} / 1 \text{ mV} = 1000$ となる。これを通常は常用対数を用いて表し、 $S/N = 60 \text{ dB}$ (デシベル)となる。つまり、この数値が大きいほどノイズが少ないきれいな信号波形ということになる。前述のローパス・フィルタによってこの S/N が大きくなり、目的の信号をよりクリアに取り込むことが可能となる。また、ローパス・フィルタの遮断周波数は A/D 変換時のサンプリン

グ周波数を決定する上での重要なキーとなる。

V. A/D コンバータとは？

アナログ信号をデジタル信号に変換する A/D コンバータとはどんなものなのか。

我々がアナログ信号を観測するかわりにコンピュータに観測させることを考える。コンピュータ内部では、デジタル値しか処理したり記憶したりできないので、3.1415926……という量でも3.14とか3.15といった決まった(量子化された)値に変換することになる。これを A/D 変換といい、そのための機能を持ったハードウェアを A/D コンバータという。

また、コンピュータは時間的にも連続には観察できず、一定の時間間隔(1秒毎など)でデータを得ることとなる。

VI. サンプルング(時間軸の量子化)

図1において、実線で描かれた曲線をもとのアナログ信号(例えば電流信号など)とする。この中で一定時間の間隔をおいたとびとびの時間 t_1, t_2, t_3, \dots の信号値に着目する。つまり、このアナログ信号は t_1 のときに a_1 , t_2 のときに a_2 , ……という値を取るとすると、 a_1, a_2, \dots の値の組と元の信号とを対応づけることができる。この対応づけの操作をサンプルング(標本化)と呼ぶ。

サンプルングは、とびとびの時刻で信号値を

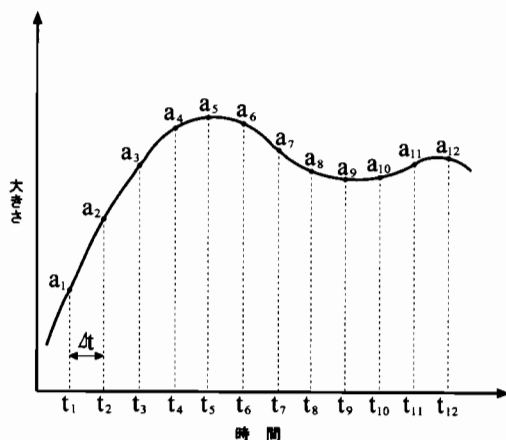


図1 アナログ信号のデジタル化

測定するものである。たとえば t_1 と t_2 の間の時刻では信号は a_1 や a_2 とは異なった値を取るかもしれないが、それらは測定対象としていない。このことから、サンプルングを行うと元の信号の持つ情報の一部が欠落するように思われる。しかし、サンプルング周波数(図1の $1/\Delta t$)を適当に選んでやれば、理論的にはサンプルングによって情報量が失われることはない。換言すれば、サンプルング値 a_1, a_2, a_3, \dots だけの情報からもとの信号を正確に復元することができる。

このように、アナログ波形の横軸(時間軸)の量子化がサンプルングであるが、サンプルングではサンプルング点における縦軸値(サンプルング値)の系列、すなわちサンプルング値を高さとしたパルス列に、どの程度もとのアナログ波形情報が乗っているかが問題になる。サンプルング間隔が短かければそれだけ量子化が細かく行われ、アナログ波形情報は忠実に取り出されるが、それだけ A/D 変換を高速に行う必要があり、また記録されたデータ量も膨大になる。できるだけサンプルング点数を減らし、且つもとのアナログ波形情報が失われないようにしたいと考えるのは当然である。この要求を満たすための基本的なルールが、ナイキストのサンプルング定理(Nyquist's sampling theorem)として知られているものである。では、このサンプルング定理とはどのような定理なのか。

どのような波形データでも、高周波成分は時々刻々の変化に即応しており、過去の値の影響は受けないが、高周波成分を順次カットして低周波成分が支配的になればなるほど、波形のある点の値は過去の影響をますます強く受けるようになる。慣性の大きいものほど動きが鈍く、それは過去の状態を引きずって動いているからであると考えるとわかりやすい。サンプルング定理の中で時系列データのサンプルングに適用できる「時間領域のサンプルング定理」は、「もし波形データが f_c (Hz) 以上の高周波成分を含まないとするならば、 $\Delta t \leq 1/(2f_c)$ の間隔でサンプルングされた値には、もとの波形中の情

報はすべて乗っている。」

と表現される。この証明は離散的フーリエ変換を使って簡単にできるが、ここでは図を用いて定性的に説明する。

あらゆるアナログ波形は、フーリエ変換を用いると一定の周期性を持った正弦波の和として表されることが知られている。「フーリエの定理」は、一般の波形を各正弦波の和に分割して、それぞれの成分の持つ周波数を周波数成分と呼ぶ。また、その正弦波の振幅をその周波数に対してグラフ化したものを周波数分布(スペクトル)と呼ぶ。

上記 f_c を用いると、図2はアナログ波形 $x(t)$ が Δt 間隔でサンプリングされたとき(a)、もとの波形の振幅スペクトルがどのような形に変わるかを示したものである。同図(b)~(c)のように、 f 軸上ではサンプリング周波数を f_s とすると、 $f_s = 1/\Delta t$ の周期でスペクトルが繰り返し現れるようになる。

波形中に含まれるもっとも高い周波数成分は f_c の周波数をもつが、 $f_c < 1/(2\Delta t)$ のときには、繰返しスペクトルのそれぞれは同図(b)に示すよう十分に離れており、適当な低域フィルタを用いることで、もとのスペクトルのみを取り出

すことは容易である。ここでサンプリング間隔 Δt をつぎつぎに広げていくとどうなるであろうか。 $f_c = 1/(2\Delta t)$ となった状態が同図(c)である。図のように f_c で鋭いカットオフをもつ低域フィルタ(たとえば矩形の周波数特性をもつ理想フィルタ)によって、何とかもとのスペクトルを拾い上げることができる。実はこの状態を言葉で表現したのが前述のサンプリング定理である。さらに Δt が大きくなると(d)のようになり、どのような手段を用いてももとのスペクトルは正確に取り出すことはできない。すなわち、アナログ波形の正確な復元は不可能となる。

以上の図と説明からわかることは、サンプリングされた波形のもつスペクトルは $f_r = 1/(2\Delta t)$ の整数倍の周波数のところで折り返すことによって、一つに重ねることができるといいう性質である。 f_r はナイキスト(Nyquist)の折返し周波数とも呼ばれ、サンプリング周波数 $f_s = 1/\Delta t$ のちょうど半分である。 $f_c > 1/(2\Delta t)$ となったときの図(d)の折り返しを考えると、もとのアナログ波形の高周波側の一部が低周波側に折り返されることになり、この成分が誤差要因になるのは明らかである。この誤差は“エ

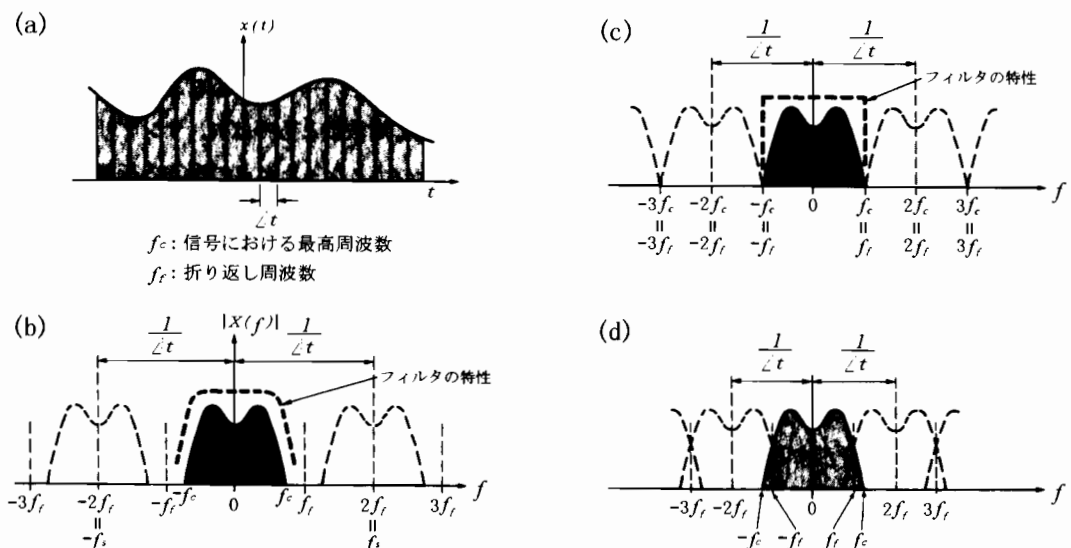


図2 サンプリング波形とその振幅の周波数スペクトル

リアシング(aliasing)誤差”といわれるが、単にスペクトルの高周波側がカットされるのではないため、もとの信号波形の形を大きく変えてしまうことがあるという点を心得ておかななくてはならない。

図3は周波数の異なる二つの正弦波の重なった信号に対して、エリアシング誤差の現れ方を実際に示した例である。もとの波形とはまったく異なる波形が生じることに注目したい。

サンプリング定理によって決まるサンプリング間隔以下でサンプリングすることをオーバ・サンプリング、またそれ以上の間隔でサンプリングすることをアンダ・サンプリングといい、エリアシング誤差は後者の場合に生じる。

エリアシング誤差についてもう一つ注意しなければならないことは、信号に乗ってくる不規則雑音の影響である。雑音のパワー・スペクトルは信号よりも広い領域を占めるのが一般であり、信号分だけに注目していると雑音成分によるエリアシング誤差を忘れがちとなる。雑音軽

減のための処理をコンピュータで行うにしても、予めローパス・フィルタで高域雑音を遮断し、その遮断周波数 f_c からサンプリング間隔を決定する。このようなフィルタをアンチ・エリアシング・フィルタと呼んでいる。いずれにしてもサンプリング定理は理想の場合の最低サンプリング点数を規定したものであり、実際には最高周波数成分をローパス・フィルタのカットオフ周波数と考えると、3倍以上の周波数でサンプリングを行わないともとの波形を復元することは難しいため、ある程度オーバ・サンプリング状態にするのが無難である。

一方、D/A コンバータによりデジタル→アナログ変換する場合には、A/D コンバータとは逆の現象が起こる。例えば、44.1 kHz のサンプリング周波数 f_c で、1 kHz のサイン波形を D/A コンバータにより発生させた場合、

$$(f_c \pm f_s), (2f_c \pm f_s), \dots, (2f_c \pm f_s)$$

というスプリアス成分を誘起する。これらのスプリアスを除去するため、D/A コンバータ出力に $(f_c/2)$ 以下を通過させ、 $(f_c/2)$ 以上を急激

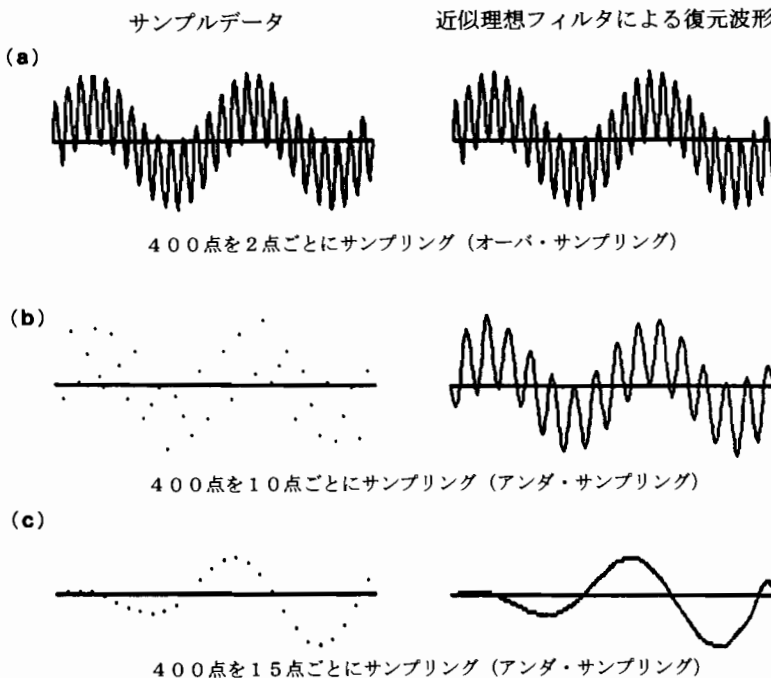


図3 2つの正弦波の重畳波形によるエリアシングの実例

に減衰させるローパス・フィルタが必要になる。

VII. 信号値(電流, 電圧)の量子化

サンプリングの結果得られた値 a_1, a_2, a_3, \dots はアナログ量である。そこで、これら縦軸の情報をデジタル量に対応づけることを量子化という。ここでは電流, 電圧値(縦軸)の量子化について述べる。時間軸(横軸)と大きさ(縦軸)の量子化が実行されてはじめてアナログ信号のデジタル化が完了する。このアナログ信号の大きさをいくつか分割して記録することを信号値の量子化といい、その分け方の細かさを分解能という。

パッチクランプ実験で測定される電流は、パッチクランプアンプの主要回路である I-V (電流-電圧)変換回路により、電気的に取り扱いきやすい電圧信号としてアンプから出力される。今回使用する A/D コンバータの分解能は 12 ビット ($2^{12} = 4096$) で、アンプである AXOPATCH 200 B の出力は ± 10 V 固定となっているので、20 V の電圧範囲を 4096 個で割った値、約 4.88 mV がこの A/D コンバータの分解能となる。この A/D コンバータでは、+5 V は 1024, +1 V は 205, -5 V は -512 という値に変換される。0 V も 2 mV も理論上は A/D コンバータの分解能未満の違いしかなく 0 という値に変換されるので、その違いはコンピュータには認識できないことになる。ここで、もし A/D コンバータの分解能が 16 ビット ($2^{16} = 65536$) だとすると、前述の ± 10 V の電圧範囲に対する分解能は、20 V/65536 で約 0.305 mV と飛躍的に向上することになり、上記の 0 V と 2 mV の値の違いも認識可能となる。このことは、観察したい電圧変化をどれくらい細部まで記録したいかということから A/D コンバータの分解能を選択しなくてはならないということの意味する。一方、もし ± 10 V の入力範囲で ± 5 V の電圧を記録したとすると、-5 V は -1024, +5 V は 1024 の値を取り、-2048 から +2047 のダイナミックレンジを有効

に使っていないことになってしまい、実質的に分解能が低下したことになる。従って、A/D コンバータを有効に活用するためには、パッチクランプアンプのゲイン調節ツマミで、出力が ± 10 V にできるだけ近くなるように設定することが重要である。

VIII. システムのセットアップ

ここで紹介するデータ取り込みでは、パッチクランプアンプ (AXOPATCH 200 B), DOS/V パソコン, A/D, D/A ボード, (Digidata 1200), データ取り込み・解析ソフト (pCLAMP 6) が一式となっているシステムを紹介する。以下にそれらのセットアップの方法を示す。

1. DOS/V パソコンの AT バスに、A/D, D/A ボード(図 4)を挿入する(図 5)。このボードは、A/D コンバータと D/A コンバータが兼用になっている。ボードの端子(金メッキの部分)は、酸化によって接触不良を起こす恐れがあるので絶対に手を触れないように注意し、IC 類は静電気によって破壊することがあるので触れないようにする。

A/D, D/A ボードを購入すると、その入出力を BNC ケーブルで取り出すためのインターフェースボックスが付属している(図 6)。図の ANALOG OUT の 0, 1 チャンネルは、D/A コンバータからの出力即ち刺激パルスを出力する端子で、パッチクランプアンプの EXT. COMMAND INPUT FRONT SWITCHED に接続する。ANALOG IN の 0 ~ 15 は、パッチクランプアンプからの出力信号を A/D コンバートするための入力端子で、同時に使用するチャンネル数が多いほど記録できる信号の最高周波数は低くなる。DIGITAL OUT の 0 ~ 5 は、トリガーなどのために使われる TTL レベルの信号出力端子である。TRIGGER IN は、外部の TTL レベル信号で、コンピュータの動作をトリガーするための端子である。今回は DIGITAL OUT, TRIGGER IN は使

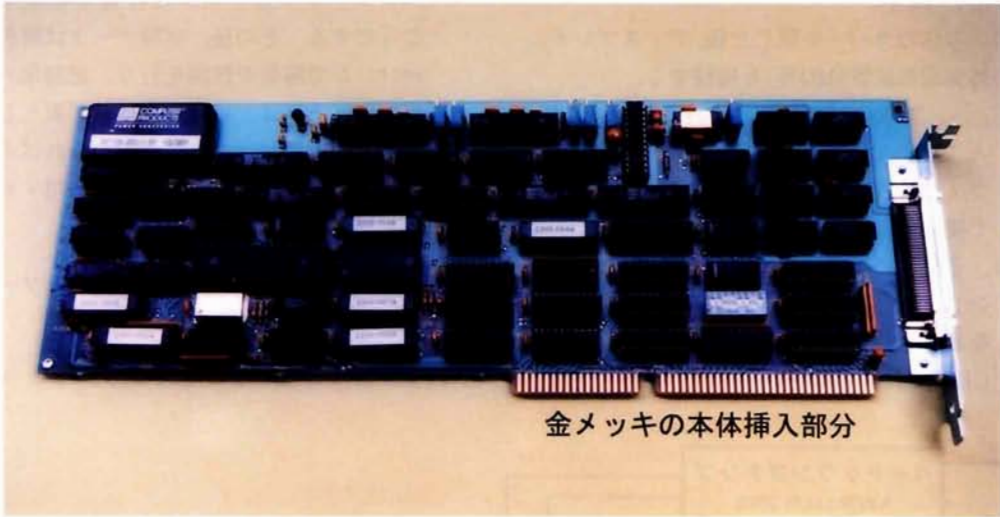


図4 A/D, D/A ボード

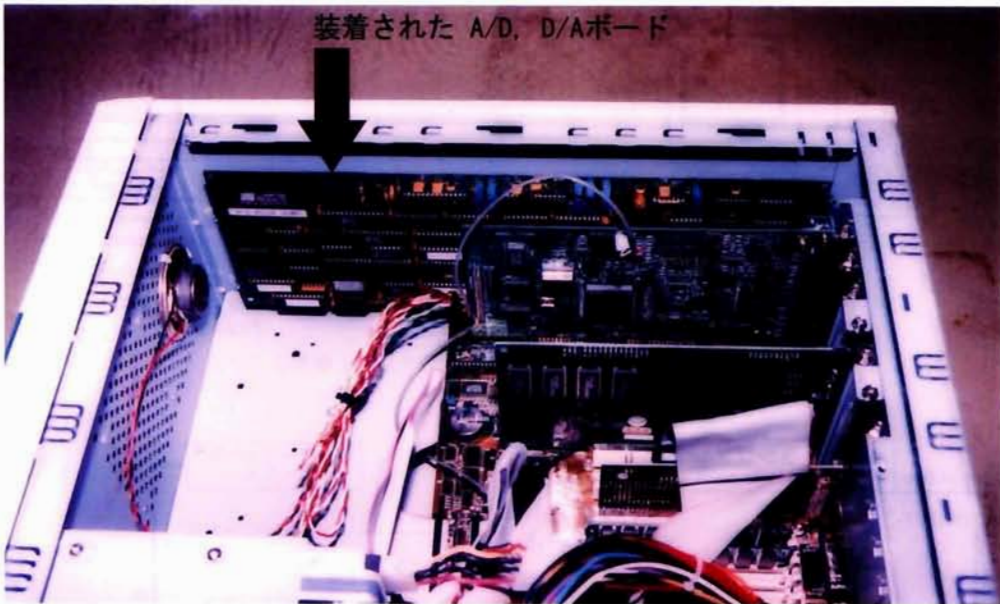


図5 ボードを本体に装着する

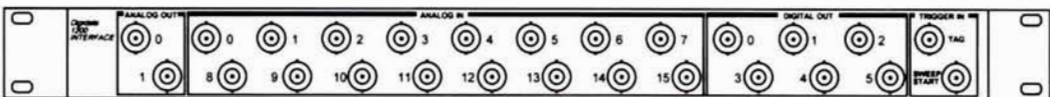


図6 A/D, D/A ボード付属のインターフェースボックス

- 用しない。
- 2. 本体のカバーを閉じた後、ディスプレイ、外部記憶装置(MO等)を接続する。
- 3. 1. で DOS/V パソコンの AT バスに挿入した A/D, D/A ボードとインターフェイスボックスを、付属の専用ケーブルで接続する。
- 4. その他の周辺機器は、パッチクランプアンプを中心として図7に示すような構成となる。記録データは、通常ハードディスク(HD)に次々記録されるので、MO などに

バックアップして HD の容量を確保するようにする。その後、実験データは解析用パソコンで解析や作図を行う。記録用パソコンにはそれほど高速なものが必要としないが、解析用パソコンは高速であればあるほど良い。勿論、一台ですべて兼用することも可能である。

IX. パッチクランプアンプとインターフェイスボックスとの接続

パッチクランプアンプとインターフェイス

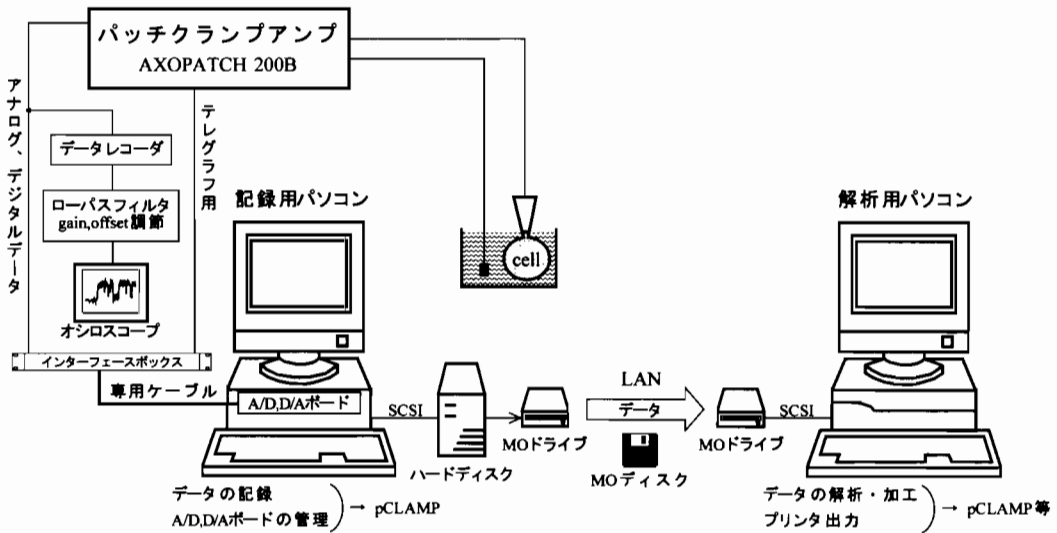


図7 DOS/V パソコンを用いたデータ取り込み・解析システム

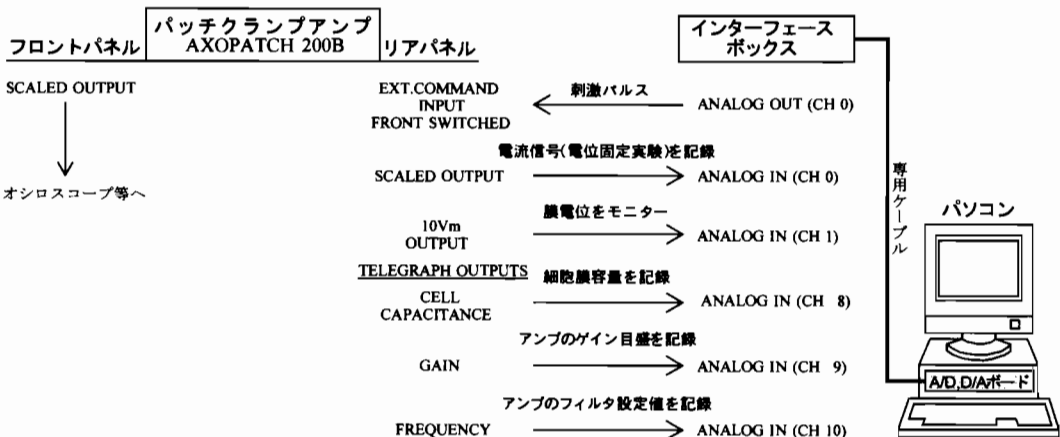


図8 パッチクランプアンプ周辺機器の実際の結線図

ボックスの各端子は図8のように BNC ケーブルで接続する。使い古したケーブルや不慣れな人が作成したケーブルは接触不良の原因になるので注意する。

パッチクランプアンプにはフロントとリアのパネルに接続用の BNC コネクターがあり、最初に接続数の多いリアパネルの BNC 端子とインターフェイスボックスの接続について説明する。

インターフェイスボックスの ANALOG OUT は 2 チャンネル分あり、ソフトウェア (pCLAMP) で設定した出力チャンネル (ここでは CH0 を設定) から設定パターンに従った刺激パルスを出力する端子で、パッチクランプアンプの "EXT. COMMAND FRONT SWITCHED" 端子に接続する。

ANALOG IN は、パッチクランプアンプからのアナログ信号用の入力端子で、0~15の16チャンネル分ある。今回はこの中の0, 1, 8, 9, 10の5チャンネルを使用し、以下のように接続する。

- 0 チャンネルは、パッチクランプアンプの "SCALED OUTPUT" に接続する。
"SCALED OUTPUT" は、電位固定モードではパッチクランプアンプで電流-電圧変換された電流を電圧として出力されている。なお、電流固定モードでは膜電位信号が出力される。
- 1 チャンネルは、パッチクランプアンプの "10 V_m OUTPUT" に接続する。
"10V_m OUTPUT" は、アンプのモニターとして膜電位が10倍に増幅されて出力されている。
- 8~10チャンネルは、"TELEGRAPH OUTPUTS" に接続する。これは、アンプの設定値をリモートでコンピュータに送るためのデータ出力用端子で、次のように接続する。8チャンネルを "CELL CAPACITANCE", 9チャンネルを "GAIN", 10チャンネルを "FREQUENCY" に接続する。これら細胞の膜容量、膜電流の利得、ローパス・フィルタのカットオフ周波数がコン

ピュータにデータとして送られる。

アンプのフロントパネルの "SCALED OUTPUT" は、リアと同様の出力が得られる端子でオシロスコープ等に接続して使用すると便利である。

X. pCLAMP のインストールと使用法

MS (PC) -DOS 上、または Windows 95 の MS-DOS モードから pCLAMP ソフトウェアをマニュアルの指示通りインストールする。pCLAMP の構成は、取り込み用として "clampex" と "fetchem", データ解析用として "clampfit", "pstat", "fetchan" の各プログラムが用意されている。現在のところ、データ取り込み (サンプリング) は MS (PC) -DOS, Windows 95 の MS-DOS モード以外ではできない。即ち、Windows 95 の MS-DOS プロンプト (全画面モードを含む) や OS/2, Windows NT 上では不可能である。解析に関しては上記すべての環境で可能である。

"clampex" はサンプリングの時間が決められている場合のデータ取り込み用で、"fetchem" はシングルチャンネルの観察のように連続してデータ取り込みを行うソフトである。ここでは取り込み用として "clampex" を使用する。"clampex" で取り込まれたデータの解析用としては、"clampfit" が使われる。殆どの Whole-cell mode の実験には "clampex" と "clampfit" が用いられる。また、"fetchem" で取り込まれたデータの基本的な解析には "fetchan" が、"pstat" はヒストグラム作成のような統計処理用に使用する。

アナログデータの取り込みを行うには、各種パラメータの設定が必要である。図9は、そのパラメータ設定画面である。

設定値を決定する際の注意事項として、予め観察したい波形の周波数帯域や波形変化の時間領域がどの程度なのかということを知り、サンプリング間隔とサンプリング時間を決定しなければいけないということである。最初の "ANALOG IN channels" で 0~15チャンネルの

| — Parameters/Acquisition — | |
|--|---|
| ANALOG IN channels: XXXXXXXXXX | Experiment type: Voltage Clamp |
| First interval (μ s): 100 | Second interval (μ s): Same as first |
| First rate per channel = 10.00 kHz | Change after (samples): Halfway |
| | Second rate = 10.00 kHz |
| Number of trials: 1 | Time between trial starts (s): Minimum |
| Runs per trial: 1 | Time between run starts (s): Minimum |
| Episodes per run: 5 | Time between episode starts (s): Minimum |
| Samples per channel: 5120 | Update 'undo' file every: |
| Episode duration = 512.00 ms | Scope trigger delay (ms): Minimum |
| Samples per episode = 5120 | |
| Samples per run = 25600 | Input trigger source: Internal |
| Interepisode writing is disabled. | Input trigger action: |
| List of ANALOG IN channels to acquire (e.g. 0..4): maximum of eight. | ‡ |

図9 パラメータ設定画面

どのチャンネルから入力するかを選択する(通常は0チャンネルを選択)。“First interval(μ s)”は、サンプリング間隔を設定するところ、画面では100 μ sとなっている。この値は、1データをサンプリングしてから次のデータをサンプリングするまでの時間間隔であり、その逆数がサンプリング周波数となる。この数値は次の“First rate per channel”に反映され、画面では100 μ sの逆数の10kHzが自動的にセットされている。このサンプリング間隔の決定には、先に述べたサンプリング定理の項が重要になる。即ち、観察したい周波数帯域よりも少し高いところにアンチ・エイリアシングフィルタ(ローパス・フィルタ)を設定し、不要な高域雑音成分を除去し、A/D変換をする際のサンプリング周波数は、この時のローパス・フィルタで設定したカットオフ周波数の理論上、最低でも2倍以上(実際には3~4倍以上)に設定しておかなければならない。例えば、0.2kHzの周波数成分を持つ事象を観察するならば、0.5kHz程度のローパス・フィルタをかけ、これを2kHz

でサンプリング(A/D変換)することになる。画面では、1回のEpisodeの長さによって決まる取り込み時間(Episode duration)が512msで、取り込み間隔(First interval)は100 μ sなので、1回のサンプリング数は5120個となる。簡単のために2kHz(0.5ms間隔)で取り込むとした場合、取り込み時間を1secとすると、1sec/0.5ms=1000となりサンプリング数は1000個となる。Episode, Run, Trialの関係を図示したのが図10である。Episodeというのは、ここでは一つの電流トレースと考えることができる。従って、図に示すように一つのトレース(Episode)がいくつか集まって一つのRunを形成し、いくつかのRunが集まって一つのTrialを形成する。一つのEpisodeの長さ(Episode duration)は、それぞれの実験の目的から決定される。今回の例では、Number of trialsとRuns per trial共に“1”、Episodes per runは刺激電圧パルスを変化させるので“5”と設定する。

図11は、D/Aコンバータから出力する刺激

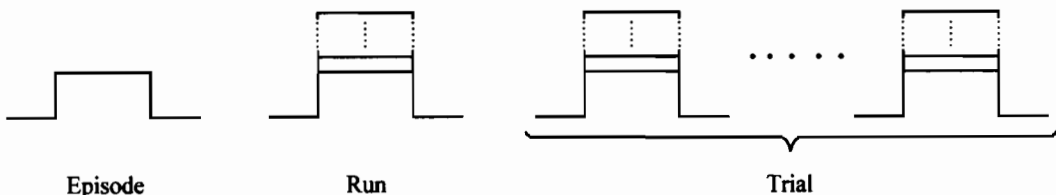


図10 Episode, Run, Trialの関係

| Parameters/Waveform | | DIGITAL OUTPUT CONTROL | | | | | | | |
|--|-------------|--|------|------|------|------|------|------|--|
| ANALOG OUTPUT CONTROL | | Bit pattern source: XXXXXXXXXX | | | | | | | |
| Waveform source: | From table | Holding bit pattern: 0000 | | | | | | | |
| OUT #0 holding (mV): | -40 | Interepisode holding: Use holding | | | | | | | |
| OUT #1 holding (mV): | 0 | 5 Episodes per run. | | | | | | | |
| Active ANALOG OUT channel: | 0 | | | | | | | | |
| Interepisode holding level: | Use holding | | | | | | | | |
| WAVEFORM SPECIFICATION | | | | | | | | | |
| Epoch | A | B | C | D | E | F | G | H | |
| Type | STEP | STEP | OFF | OFF | OFF | OFF | OFF | OFF | |
| First level (mV) | -40 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Δ level (mV) | 0 | -20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Final level (mV) | same | 60.00 | | | | | | | |
| First duration (samples) | 1000 | 3000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| First duration (ms) | 100 | 300 | | | | | | | |
| Δ duration (samples) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Δ duration (ms) | | | | | | | | | |
| Digital bit pattern | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | 0000 | |
| 1st holding = 80 , Waveform = 4000 , Final holding = 960 + 80 , Total = 5120 | | | | | | | | | |

図11 波形パラメータ設定画面

波形を設計するための、パラメータ設定画面である。ここでは、図12に示すステップパルスを設計することにする。

まず、図11の設定画面の ANALOG OUTPUT CONTROL の“Waveform source”で、WAVEFORM SPECIFICATION テーブルで設定した波形パターンを出力するように“From table”を選択する。“OUT #0 holding (mV)”は、ホールディングポテンシャルのスタート電位を決める箇所ので、今は -40 mV にしたいので“-40”とする。今回“OUT #1 holding (mV)”は使用しないので値は何でも良い。“Active ANALOG OUT channel”は、波形を出力するチャンネルなので“0”を設定する。“Interepisode holding level”は、episode と episode の間をどの電位に保持するかを決定するところで、ここでは holding 電位の -40 mV を使用するので“use holding”とする。勿論、“-40”と設定しても同じことになる。

次に、WAVEFORM SPECIFICATIONで出力波形の設計を行う。図12に示したように、刺激波形として最初に -40 mV で 100 ms ホールド後、300 ms の duration で 20 mV 間隔で -40 mV から +60 mV まで 5 段階に変化させ、再び -40 mV にホールドするという波形を設計

する。1つの Episode の時間は 512 ms とする。

“Epoch A”は、最初の holding 電位のレベルと duration 等を決める。“Type”は波形を決める項で、ステップパルスかランプパルスかを選択できる。

ここではステップパルスを作りたいので“STEP”を選ぶ。“First level (mV)”はステップパルスの最初の電位で holding 電位と同じ -40 mV なので“-40”とする。“Δ level (mV)”は電位変化量で、ここでは変化しないので“0”とする。“Final level (mV)”は1つの episode 終了時の電位を指定する箇所ので、ここでは“Δ level (mV)”が“0”で“First level (mV)”と同じなので“same”となる。“First duration (samples)”はステップパルスが立ち上がるまでの時間で、“First duration (ms)”を“100 ms”としたので、100 ms/100 μs(サンプリング間隔)で“1000”となる。パルス幅を変化させるパラメータである“Δ duration (samples)”は変化しないので“0”，従って“Δ duration (ms)”は変化しない。“Digital bit pattern”は特に設定する必要はない。

次に、“Epoch B”でステップパルスを -40 mV から +60 mV まで 20 mV おきに holding 電圧を変化させるための設定を行う。

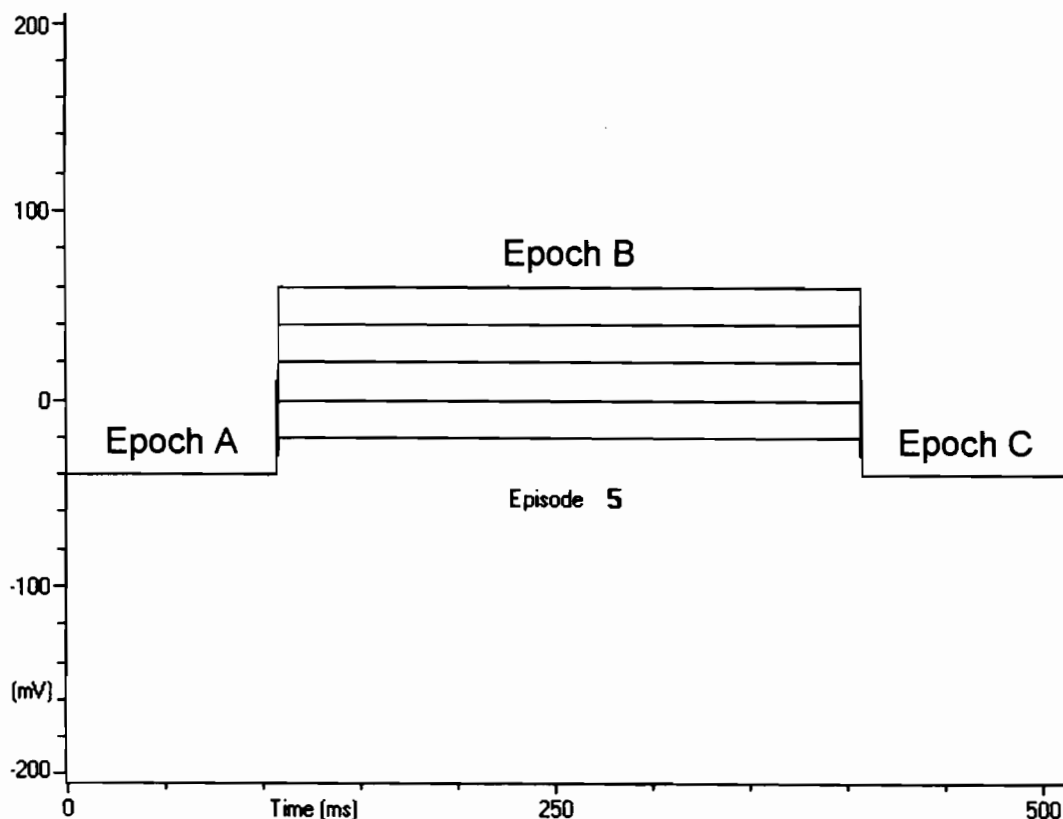


図12 設計値による刺激波形

“Type” は、“Epoch A”と同じくステップパルスの“STEP”を選ぶ。“First level (mV)”は、“Epoch A”の“First level (mV)”で -40 mV に設定されており、“Epoch B”では 20 mV ずつ変化させるので、初期値として -20 とする。“ Δ level (mV)”は電位変化量で、ここでは前述のように 20 mV ずつ変化させるので 20 とする。“Final level (mV)”は、前述のように -40 mV から 60 mV まで 20 mV おきに 5 段階にステップ電位を変化させるように既に Parameters/Aquisition (図 9) の項で設定したので (5 Episodes per Run), 最終電位は 60 と自動的に計算され表示される。“First duration (samples)”はステップパルスの継続時間で “First duration (ms)”を 300 ms としたので、 300 ms/ 100 μ s で 3000 となる。パルス幅は変化させないので “ Δ duration (samples)”は

0 とする。ここでも “Digital bit pattern” は特に設定しない。

“Epoch B”による電位変化後の波形設定を行うべき “Epoch C”以降は、設定を行わなければ Interepisode holding level が “Use holding” にすると “OUT #0 holding (mV)”で設定した -40 mV に設定されるので特に設定は行わない。

以上のような設定を行うと、自動的に図11の最下行のようなステップパルスの各部分のサンプリング数とトータルのサンプリング数が表示され、メニューから “Trial” → “Waveform Preview” と選ぶと図12に示した波形を実現することができる。

以上で刺激パルスの設定が終了する。実際の実験は “Trial” モードで行う。“View” は観察するだけでデータの記録はされない。通常は

“Record”モードでデータをハードディスク等に記録する。なお、各設定は ENTER で抜けると保存、ESC で抜けると保存されない。

XI. おわりに

今回は、パッチクランプアンプとして AXOPATCH 200B (Axon Instruments 社), ソフトウェアも同社の pCLAMP を使用し, コンピュータとして DOS/V 機を用いたシステムをモデルに限定して, アナログデータのコンピュータへの取り込み方法を解説した。説明では, できるだけ具体的な数値を用い, 図や表を使用してわかりやすく解説したつもりなので, 実際にデータ取り込みを行う際の一助になれば幸いである。なお, pCLAMP は非常に多機能なソフトなので, より複雑な刺激波形の設計や操作についての詳細は是非マニュアルを参考に

していただきたい。

最後に, この項をまとめるにあたり大変お世話になりました 生理学研究所 機能協関部門 助手 森島 繁氏に感謝いたします。

参考文献

1. 竹本 晃・稲村 浩(1988) A-D 変換を使いこなす, CQ 出版社
2. 南 茂夫(1986) 科学計測のための波形データ処理, CQ 出版社
3. 鈴木 隆(1989) トランジスタ技術 SPECIAL No. 16, 特集 A-D/D-A 変換回路技術のすべて, CQ 出版社
4. 江原義郎(1991) ユーザーズ デジタル信号処理, 東京電機大学出版局
5. pCLAMP USER'S GUIDE Version 6.0 (1993), Axon Instruments, Inc.
6. The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques (1993), Axon Instruments, Inc.