理論/実験 技術

無脊椎動物における 非拘束条件下での生体信号の記録： 光テレメトリシステム

北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻

濱 徳行, 高畑雅一

北海道大学電子科学研究所

土田義和

1. はじめに

動物の行動は単純に感覚情報にもとづく反射運動ではなく、動物がどのような行動を遂行しているのか、または遂行しようとしているのか、といった行動文脈に依存して修飾される¹⁾⁻⁵⁾。我々はこれまで、ザリガニの姿勢制御運動に着目し、おもにガラス管微小電極を用いた細胞内記録法によって、この神経機構における行動文脈依存的な修飾機序の解析を行ってきた^{6), 7)}。しかしながら、細胞内記録法を用いると、動物を何らかの形で固定する必要がある、自然条件下で見られるような多様な行動はほとんど見られなくなるため、より自然な状態における神経活動の記録を行う必要がある。

自由行動下における神経活動などを記録・解析するためには、無線記録法が広く用いられている⁸⁾⁻¹¹⁾。無線記録では、送信器側で生体信号をなんらかの手法により電波や超音波などに乗せ(変調)、受信器側でそれを復調する。電波を用いた無線記録では周波数変調(FM変調)が広く用いられている。FM変調は生体信号を電圧制御発振器の制御電圧として加えることによって得られる。電圧制御発振器の入手が比較的小さいため、広く用いられている。しかしながら、電波は水中、特に伝導性が高い海水中では減衰が大きい¹²⁾⁻¹⁴⁾。さらに、これまで開発されてきた送信器は多くが筋肉の活動電位(筋電図)や脳波などの遅い信号の記録を目的としており^{10), 11), 15)}、神経の活動電位のような速い信号の記録はほとんどなされていなかった。

今回我々は、光を用いた無線記録システムを開発し

た。光も電波と同様、水中で減衰するが、水の光吸収係数は比較的低いため¹⁶⁾、淡水中だけでなく海水中でも安定した記録が可能である。加えて、このシステムはすべて市販の電子部品で構成されているため導入が容易である。本システムの回路図の詳細についてはオンライン版に添付した supplemental figures を参照されたい。

2. 光テレメトリシステムの概要

本光テレメトリシステムで用いられている変調方式は、信号の振幅をパルスの間隔に変換するための pulse duration modulation (PDM) / pulse interval modulation (PIM) 法を若干修正したものである。各チャンネルの信号は、PDM変調された後、PIM信号に変換され、赤外発光ダイオード(IRLED)を駆動する(Fig. 1)。PIM信号を用いることで、発光ダイオード(IRLED)の駆動時間を短縮し、消費電力を節約している。赤外光パルスとして無線発信された信号をPINフォトダイオードで受信した後、逆の手順を経てアナログ信号へと復調する(Fig. 1)。

PDM変調は矩形波を発生する単安定マルチバイブレータ(以下モノマルチ)の出力パルス幅を設定する外付CR充電回路に信号電圧を加重して、出力パルス幅を変化させることで実現している(Fig. 2a)。デュアルモノマルチ(TC4538, Toshiba)を用い、1つ目に奇数チャンネル、2つ目には偶数チャンネルの信号を加える。1つ目のモノマルチの反転出力を用いて次のモノマルチをトリガすると、2つ目のモノマルチは奇数チャンネルをHレベルの幅に、偶数チャンネルをLレベルの幅に乗せたPDM出力を発生する(PDM, Fig. 2a)。このPDM信号で1つ目のモノマルチをトリガして、2つのチャンネルの生体信号を交互にPDM変調する自走マルチバイブレータを構成している。さらに、2つ目のモノマルチの反転出力でJ-K型フリップフロップ(TC74HC107, Toshiba)をトリガして、多チャンネルスイッチであるアナログマルチプレクサ(TC74HC4052, Toshiba)の選択入力を切り替え、次の周期ではチャンネル3と4をPDM変調した後、再びチャンネル1と2に戻る。

各チャンネルにはオフセット電位(チャンネル1, 300 mV; チャンネル2, 3, 4, 690 mV)を付加し、PDM信号のHレベルとLレベルの持続時間を、一定の幅(チャンネル1, 21 μ sec; チャンネル2, 3, 4, 18 μ sec)を中心に信号

Recording of Biological Signals from Non-Tethered Crustaceans: Optical Telemetry System

Noriyuki HAMA¹, Masakazu TAKAHATA¹ and Yoshikazu TSUCHIDA²

¹Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University

²Reserch Institute for Electric Science, Hokkaido University

Fig. 1 Schematic diagram of optical telemetry system. (回路図は電子ジャーナルの電子付録参照)

の振幅の高低に応じて短縮または延長する (PDM, Fig. 2a). 約 75 μsec 毎に各チャンネルをサンプリングするため、サンプリング周波数は約 14 kHz を中心に変動する。後述するが、チャンネル 1 に対応するパルスを他のチャンネルのパルスより長くすることによって、復調時にチャンネル分離用の同期信号として用いる。2 チャンネルであれば、フリップフロップやマルチプレクサは不要となり、小型化が可能で、サンプリング周波数も約 26.7 kHz へと向上できる。

PDM 信号から PIM 信号への変換も同じデュアルモノマルチ (74HC4538) を用いている。PDM 信号の立ち上がりエッジ (L から H レベルへの切り替わり) で 4 μsec の幅の、逆に立ち下がり (H から L レベルへの切り替わり) で 2 μsec の幅のパルスを発生させる。これで長

いパルスから短いパルスまでの時間の長さが生体信号の振幅をコードする PIM 変調が実現する (PIM, Fig. 2a)。この PIM 信号が赤外発光ダイオード (880 nm; CL-1CL3, Kodenshi Corp.) を駆動し、赤外光パルスの間隔として無線送信される。送信器には変調回路用と発光ダイオード用にそれぞれ 1 個ずつリチウムボタン電池 (3V; CR2032) を用いている。電源を 2 つ用いるのは、発光ダイオード駆動時に生じる電圧低下による変調回路の誤動作を防ぐためである。

受信器は Fig. 1 に示すように、波形整形回路、PIM/PDM 復調器、PDM/アナログ復調器と各チャンネルの増幅器から構成されている。一方向に配置した複数 (4 個) の PIN (p-intrinsic-n) フォトダイオード (S6967-01, Hamamatsuphotonics) を並列にして、光パルスを受信す

Fig. 2 (a) Outline of signal modulation. (b) Comparison of electromyographic activities (top) and neuronal activities (bottom) recorded by a wire-coupled conventional amplifier (MEG-1000) and by the optical telemetry system (Telemetry system).

Table 1 Specification of optical telemetry system.

	Transmitter	
	Dual-channel	Quad-channel
Main carrier:	880 nm (infrared)	880 nm (infrared)
Sampling frequency:	26.7 ± 3.5 kHz	14 ± 2.5 kHz
Total power consumption:		
Circuit	1.98 mW	6.8 mW
LED	27 mW	36 mW
Supply voltage:		
Circuit	3 V	3 V
LED	3 V	3 V
Battery retention time:	6 hrs	4 hrs
Frequency range of input signal:	150 Hz-8.7 kHz	150 Hz-8.7 kHz
Input impedance:	1000 MΩ	1000 MΩ
Gain of input amplifier:	67.6 dB	64.8 dB (1ch), 67.4 dB (2,3,4ch)
Maximum input voltage:	± 250 μV	± 250 μV
Transmitter package (with two batteries):		
Volume	4 cm ³	10 cm ³
Weight in air	13 g	16.2 g
Weight in water	9 g	6.2 g

る。電流/電圧変換器 (LF6365, National Semiconductor) および増幅器 (LF357, National Semiconductor), 比較器 (LF311, National Semiconductor) を通して波形整形し, PIM信号を得る。このPIM信号を, デュアルD型フリップフロップ (TC4013, Toshiba) へ入力するとともに, 4 μsecのパルスを検出し, フリップフロップをリセットすることでPDM信号に復調する。PDM信号からチャンネル順に並んだランプ波の列を生成し, 各パルスの持続時間に比例した高さの信号を得る。このとき, チャンネル1に対応するPDM信号のパルス幅は, 最も持続時間が大きくなっている (Fig. 2a) ため, 最も高いランプ波としてチャンネル1の信号 (チャンネル同期信号) が検出できる。PIM信号をカウンタ (TC40163, Toshiba) のクロック信号, チャンネル同期信号をリセット信号としてチャンネル分離用のアナログデマルチプレクサ (TC4051, Toshiba) の出力を切り替える。PDM信号から生成したランプ波の頂上での振幅をこのアナログデマルチプレクサによって各チャンネルに分離する。

今回開発した光テレメトリシステムの特性は Table 1 に示すとおりで, 筋電図記録や活動電位を記録するために十分な特性をもっていると考えられる。このことをさらに検証するため, 通常の生体増幅器を用いた有線記録によって得られる波形と, 光テレメトリシステムを用いて得られる波形の比較を行った。これらの信号をDATレコーダ (RD-135T, TEAC; 周波数帯域 DC-

10 kHz) で記録し, 実験終了後 A/D コンバータ (Power Lab, ADInstruments; 周波数帯域 DC-2 kHz) に付属のソフトウェア (Chart v4.2, ADInstruments) を用いて, コンピュータ (PowerMacintosh 7300) に取り込み, 解析した。Fig. 2b は同じソースからの信号を有線と無線記録で比較したものである。ザリガニ歩脚に一对の銀線 (直径 125 μm) で作製された電極を挿入し, その出力を生体増幅器と送信器に同時に接続している。筋電図記録では, 両者の記録間で大きな違いは見られない (Fig. 2b 上段)。一方, 神経活動の記録も同様に比較した (Fig. 2b 下段)。こちらは, 筋電図記録とは異なり, 無線記録では有線記録に比べノイズが大きい事がわかる。そのため, 有線記録では確認できる小さなスパイク (図中矢印) が無線記録では確認が困難になっている。

3. 光テレメトリシステムによる解析

ザリガニ姿勢制御運動における, 行動文脈依存的修飾やその階層的制御機構の詳細については高畑による本誌総説等を参考にされたい^{6), 17)}。これまでの研究は腹部最終神経節における運動ニューロン等を中心に行われてきた。我々のこれまでの研究では, 平衡胞感覚を出力伝達する経路を構成するニューロンの応答も運動状態によって修飾されることが明らかになっている。脳で統合処理された平衡胞感覚を体の各部に伝達する平衡胞感覚性の下行性経路は複数のニューロンによっ

Fig. 3 Four PIN-photodiodes (PINPD) were placed at each corner of the experimental aquarium (40 cm in width $\times$ 30 cm in depth $\times$ 10 cm in height) (a). Electrodes for recording from the circumesophageal commissure and leg were connected with a dual-channel transmitter which was mounted on the cephalothorax of crayfish (b). EMG activities of four walking legs at the onset of walking increased simultaneously (c). The neuronal activities recorded from the circumesophageal commissure (CC) increased during walking (d). The walking behavior was indicated by rhythmic activities of the leg muscle (Leg EMG). (カラー図は電子ジャーナル参照)

て構成されている^{7), 18)}。今回はこれらのニューロンのうち細胞外記録法によって容易に同定できる C_1 ニューロン活動の記録を行った¹⁹⁾。細胞外記録用電極は左側の咽食道縦連合に、筋電図記録用電極は第二歩脚長腕節屈筋にそれぞれ設置した。実験水槽 (奥行き 40 cm, 幅 30 cm, 高さ 15 cm) には、深さ 13 cm まで水を満たし、受信器である 4 個の PIN フォトダイオードを実験水槽の各コーナーの底から 10 cm のところに内側に向けて設置した (Fig. 3a)。この水槽中に記録電極と 2 チャネル送信器を頭胸部 (cephalothorax) に取り付けたザリガニ (Fig. 3b) を放し、自由に行動させた。

Fig. 3c は歩行運動開始時に記録された 4 本の歩脚筋電図活動である。歩行運動開始時 (点線) に 4 本の歩脚すべてで同時に活動が上昇していることが確認できる。Fig. 3d は歩行運動開始時における神経活動記録の一例である。細胞外記録 (CC) から個々のスパイク活動を抽出するには、Chart v4.2 の Spike Histogram Extension を用いている。この記録からは 5 種類のスパイク活動を抽出することができたが、ここではそのうち C_1 ニューロンを含め活動の変化がみられた 3 種の下行性介在ニューロンのスパイク活動を示してある (C_1 , Unit A, Unit B, Fig. 3d)。ここで示した下行性介在ニューロンは、いずれも歩行運動中 (図中の片ブラケット) は静止時に

比べ大きく活動が上昇していることが確認できる。しかしながらその上昇は様ではなく、歩行運動中大きく増減している。このことは、 C_1 ニューロンの活動は単純に感覚情報のみによって決定されているわけではないことを示唆する。現在はビデオ撮影による行動解析と組み合わせて、さまざまな行動下における修飾様式を解析している。

4. おわりに

本テレメータの伝達距離は、空気中であれば 1 m 以上、水中でも不安定にはなるが 50 cm 程度までは記録可能である。水の光吸収係数は波長が短くなるにしたがって劇的に減少する¹⁶⁾ ので、用いる光の波長をより短いものにするこで、伝達距離がのびる。今回我々が 880 nm の赤外光を用いたのは、甲殻類の視物質が 700 nm より長い波長の光をほとんど受容しないためである²⁰⁾。周りに設置する PIN フォトダイオードの数をさらに増やすことによっても距離の延長が可能である。

送信器の重量については、今回は水中で使用したため、それほど大きな問題とはならなかった。実際、水中での重量はザリガニの重量の約 20% であり、この程度の負荷であれば歩行の妨げにならないと考えられる。しかしながら、より小型の魚類などに使用するには、軽

量化しなければならない。その場合、もっとも簡便なのは電池の小型化である。今回我々が用いたりチウムボタン電池 (CR2032) は市販の電池の中でも大型のもので、送信器の重量の大半は電池の重量となっている。より小型の電池を用いることで、手軽に軽量化が可能である。しかし、小型の電池を用いると、より頻繁な電池の交換が必要になる。

現状では、アメリカザリガニのような中型の甲殻類などであれば本システムを用いることは容易である。しかしながら、小型の魚類や行動範囲の広い動物などに本システムを導入する場合は上記のような改善をほどこさなければならない。本システムが広範囲に用いられることを期待する。

文 献

- 1) Horak, F. B. and Macpherson, J. M. (1996) *Handbook of Physiology*, 255-292, Oxford University Press.
- 2) Deliagina, T. G., Orlovsky, G. N., Selverston, A. I. and Arshavsky, Y. I. (1999) *J. Neurophysiol.* **82**, 687-699.
- 3) Davis, W. J., Mpitso, G. J. and Pinneo, J. M. (1974) *J. Comp. Physiol.* **90**, 207-224.
- 4) Everett, R. A., Ostfeld, R. S. and Davis, W. J. (1982) *Z. Tierphyschol.* **59**, 109-126.
- 5) Deliagina, T. G., Zelein, P., Fagerstedt P., Grillner S. and Orlovsky G. N. (2000) *J. Neurophysiol.* **83**, 853-863.
- 6) Murayama, M. and Takahata, M. (1992) *J. Comp. Physiol. A* **170**, 463-477.
- 7) Hama, N. and Takahata, M. (2003) *J. Comp. Physiol. A* **189**, 877-888.
- 8) Albright, C. D., MacGarry, W. P., Ott, O. J. and Runyan, R. A. (1967) *Handbook of Telemetry and Remote Control*, 1-6 (Chapter 6), Magrew-Hill.
- 9) Mackey, R. S. (1970) *Bio-telemetry*.
- 10) Fisher, H., Kauts, H. and Kutsch, W. J. (1996) *Neurosci. Methods* **64**, 39-45.
- 11) Ando, N., Shimoyama, I. and Kanzaki, R. (2002) *J. Neurosci. Methods* **115**, 181-187.
- 12) Stasko, A. B. and Pincock D. G. (1977) *J. Fish Res. Bd. Can.* **34**, 1261-1285.
- 13) Winter, J. D., Ross, M. J. and Kuechle, V. B. (1984) *Bio-telemetry VIII*, 391-395.
- 14) Sisak, M. M. and Lotimaer, J. S. (1984) *Hydrobiologia* **374/372**, 53-59.
- 15) Kudo, Y., Satou, M., Kitamura, S., Iwata, M. and Takeuchi, Y. (1999) *Fron. Med. Biol. Eng.* **9**, 285-294.
- 16) Hale, G. M. and Querry, M. R. (1973) *Appl. Opt.* **12**, 555-563.
- 17) 高畑雅一 (2000) *生物物理* **40**, 239-243.
- 18) Nakagawa, H. and Hisada, M. (1989) *Cell Tissue Res.* **255**, 539-551.
- 19) Takahata M. and Hisada, M. (1982) *J. Comp. Physiol.* **149**, 287-300.
- 20) Goldsmith, T. H. (1972) *Handbook of Sensory Physiology VII/1*, 685-719.

濱 徳行（はま のりゆき）

北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻博士後期課程3年

連絡先：〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目

E-mail: hnori@sci.hokudai.ac.jp

高畑雅一（たかはた まさかず）

北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻教授

連絡先：〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目

E-mail: takahata@sci.hokudai.ac.jp

土田義和（つちだ よしかず）

北海道大学電子科学研究所技術部職員

連絡先：〒060-0810 札幌市北区北12条西6丁目

E-mail: tsuchida@ncp8.es.hokudai.ac.jp