マルチ計測超高倍率顕微鏡の開発 ——膜形状・膜電流・膜容量の同時計測——

曾我部 正 博*

1. はじめに

ここ10年の間に電気生理学は細密化の方向に進み現在パッチクランプは生理学教室の標準的手法として定着している。増幅器メーカーはヘッドステージの改良を続けており、最近ではフィードバック回路にコンデンサを挿入した積分型のモデルを発表し、(例えば Dagan, model 3900; Axon, model IHS-1) バンド幅100KHz, rms ノイズ0.2pA (10KHz) を実現している。これらは単一イオンチャネル分子の高速開閉機構や薬物の作用機序を詳細に解析する上で強力な武器になる。一方電位感受性色素を応用した光学測定やPETにより、一時に多数の神経活動をモニターできるマクロな技術も急速に進歩している。さらに遺伝子工学や生化学の技術がイオンチャネルに応用され、チャネル分子の一次構造をもとにして、セカンドメッセンジャーや蛋白キナーゼとの関わりが分子レベルで明らかになってきた。また蛍光分光技術の応用により、従来電氣的にしか可能でなかった高速イオン流の測定¹⁾、あるいはイオンの二次元分布の測定²⁾が可能になってきた。これら諸技術のおかげで細胞の電気活動の裏には複雑な物理的、化学的、生物的事象が絡み合っていることが明らかになりつつある。今や電極のみに頼る電気生理学の時代は終わろうとしている。我々は、細胞内事象を電気信号のみならず、他の信号を含めてできるだけまるごと同時に観測する方法を開発する必要に迫られている。

とはいえ、パッチクランプや脂質平面膜法が最も高速で感度の高い電気信号測定手段であることに変わりはない。いわば電気生理学における還元論的手法のチャンピオンであり、これを捨てる手はない。むしろ、この特長を生かしつつ複雑な事象に迫る新たなアプローチが必要と思われる。本稿で紹介する

マルチ計測顕微鏡の開発はその一例である³⁾。すなわち電気信号を測定しながら、同時に画像や膜容量などの諸パラメータを計測する技術である。筆者は機械受容チャネルの研究を進める過程でそのような同時計測システムを開発する必要に迫られた。これから紹介する内容は一つのケーススタディとして、筆者のここ2年間の経験を綴る形で書き進んでみたい。

2. SA チャネル研究の隘路

1) SA チャネルとは何か マルチ計測顕微鏡システムは本来SAチャネルの研究と密接に関連しているので、本題に入る前にSAチャネルについて簡単に紹介しておく。SA (Stretch Activated) チャネルとは機械受容チャネル (Mechano-transducing channel) のモダンな名称で、機械受容チャネルが本来は機械刺激に伴う膜伸展、すなわち膜張力の増加によって活性化されるのではないかとこの考えに基づいて提唱された術語である^{4), 7)}。従来から有毛細胞、筋紡錘、伸張受容器、あるいは皮膚や種々の臓器に分布する機械受容器には機械刺激を膜電位に変換する機械受容チャネルの存在が、確認または推定されてきた。ところが、Guharay & Sachs (1984)⁴⁾ や Brehm ら (1984)⁵⁾ をはじめ Methfessel ら (1986)⁶⁾ が相ついで筋肉や未受精卵の細胞膜上に、パッチ電極内圧に応じて開閉するイオンチャネルを発見した。その後バクテリア、イースト、高等植物細胞、上皮細胞、神経細胞、グリア細胞、赤血球、骨芽細胞など種々臓器を問わず、ありとあらゆる細胞に同様なイオンチャネル(但しコンダクタンスやイオン選択性、圧感受性は多様)がみつかった(総説⁷⁾⁻⁹⁾を参照)。SAチャネルは機械受容器のみではなく、あらゆる細胞に分布してその生命維持に重要な役割を

*Masahiro SOKABE, 名古屋大学医学部生理学第2講座(〒466 名古屋市昭和区鶴舞町65)

$$T = \frac{P \cdot D}{4}$$

$$K = \Delta T \cdot \frac{A_0}{\Delta A}$$

図1 パッチ膜における張力発生モデル パッチ膜を直径Dの球の一部とすれば、膜内外の圧力差をPとして張力Tは枠内に示すLaplaceの式により求められる。パッチ膜面積を A_0 とし、張力が ΔT だけ増加したときの面積変化分を ΔA とすれば、パッチ膜の弾性係数(K)は枠内下段の式(Hookの法則)により求められる⁴⁾。

果している可能性がある。ではその生理的役割は何か？機械受容器のSAチャンネルは中枢への刺激情報伝達に寄与することは疑いないが、非感覚細胞のSAチャンネルは情報を自らの細胞内に伝えて何らかの細胞応答を引き起こす引き金になっているに違いない。最も可能性が高いのは浸透圧変化に対する細胞容積の調節である。つまり低張溶液中での容積増大に続く膜張力の増加による K^+ や Cl^- 透過性のSAチャンネルの活性化、あるいはカチオン選択性のSAチャンネルによる脱分極が電位依存性のKチャンネルや Cl チャンネルを活性化して容積を元に戻すのではないかという仮説である^{10), 11)}。多くのSAチャンネルは Ca^{2+} 透過能を有するので、これを介してより複雑な応答、例えば細胞成長や分裂の制御に関わるという考えもあるが¹²⁾、すべては今後の課題である。

2) 圧力が張力か？ これら非感覚細胞のSAチャンネルはパッチクランプ法により研究されてきた。もともとSAチャンネルはパッチクランプのギガシール形成過程での陰圧印加中に偶然発見されたのである

が、今でもこれに優る有効な刺激法はない。したがってSAチャンネルの刺激は現在でも電極内部に与えられる陰・陽圧であり、果してチャンネルを活性化する真の刺激が圧力なのか、その結果生じる膜張力なのかは不明のままである。通常のSAチャンネルは陰陽両方の圧刺激によって活性化されることなどから、真の刺激は膜張力であろうと推定されてきたにすぎない^{4), 7)}。実際には同じSAチャンネルでもパッチ毎に、同じパッチ内チャンネルでも時間によって圧力に対する感度が大きくばらつくので、圧力がSAチャンネルの直接刺激とはいいがたいが、さりとて張力がそうであるという証明もされてこなかった。それはパッチ膜の張力測定が極めて困難だったからである。

Laplaceの法則に基けばパッチ膜の張力Tは、膜内外の圧力差Pと膜の曲率D(膜を円弧とみたときのその直径)を用いて以下の様に求められる(図1)。

$$T = \frac{P \cdot D}{4}$$

つまり張力を推定するには圧力以外に膜曲率を測定

ディジタル化するとすれば一画素が精度の限界なので50nm/画素が必要な倍率の目安になる。14インチモニター上では約0.5mm/画素なので、求める倍率は $5 \times 10^{-4} / 5 \times 10^{-8} = 10^4$ 、つまり約1万倍ということになる。使用できる対物レンズはせいぜい100倍が限度であるが、2/3インチ CCD カメラと14インチモニター間の倍率は約30倍なので、投影レンズ(6.7倍)と CCD 面の距離を調節することにより総合倍率を5万倍程度に上げることは難しくない。しかし光学的分解能は200nm 程度なので、やたら倍率を上げて精度が上がるわけではない。重要なのはまず顕微鏡レベルで光学的限界に近い条件を設定することである。顕微鏡は、コストパフォーマンスの良いオリンパス IMT-II 倒立顕微鏡を採用し、無染色標本で高い分解能が得られる微分干渉系(DIC)を用いた。対物レンズは分解能を上げる為に開口数の大きい(NA=1.40)オリンパス Plan Apo (×100)油浸レンズを採用した(実際にはSPlanでも顕著な差は認められなかった)。倍率を上げるためにTV カップラーレンズ(×0.3)をはずし、6.7倍の投影レンズを介して CCD 面に像を導いた。また CCD カメラと TV カップラーの間にベローズを挿入し、距離を調節することで倍率を可変にした。しかし1万倍を越す条件下では当然、標準付属のハロゲン球(50W)では光量が足りず、これを高圧水銀灯(100W)で置き換え、散乱板、緑フィルター、吸熱フィルター、UV フィルターを介して光路に導いた。ところが標準付属の DIC コンデンサー(NA=0.55)では集光率が悪く全く膜を把えることはできなかった。色々なコンデンサーを試した結果、正立用の DIC コンデンサー(油浸)をひっくり返してレンズ面を直接標本の水相につけることで初めて膜を見ることができた(ここのまで約3ヶ月)。しかしどうも暗く霧のかかったような像しか得られない。光源輝度を上げたり、光ファイバーを試したがはかばかしくない、残るはコンデンサーの改良しかないと感じていた時に、最良の分解能を得るにはコンデンサーの開口数が対物レンズのそれと同様でなければならないという記述を思い出した¹³⁾。しかし作動距離(WD)0.13mm の油浸レンズを使うわけにもいかず、色々搜しているうちにライツ(Leitz)のカatalogに WD=0.67mm, NA=1.0, 50倍の水浸対物レンズを発見した。早速このレンズに DIC 用の wallstone プリズムと偏光板を組み合わせて DIC 用コンデンサーをつくり試したところ、今までにないシャープな像

を得ることができるようになった。

2) 極細電極と薄型チャンバー ところが、水浸レンズの作動距離が小さく、かつレンズハウジングが大きすぎるためにチャンバーとコンデンサーの間にほとんど隙間がなく、容易にはパッチ電極を入れることができない。そこでレンズハウジングのエッジを恐る恐る施盤で削ってクリアランスをつくるとともに、プログラマブル電極ブラー(Sutter, model PC-84)を用いてシャンクの細長い(4 cm 長)電極を作製した。電極は更に水浸レンズ頭頂部の手前で約7°曲げて先端3-4 mm の部分がほぼ水平に、レンズとチャンバーの間に入り込める様に工夫する必要がある(図3 a)。このことは結果的にパッチ膜をほぼ真横から視ることになり、鮮明なパッチ膜像を得る上で大きな効果をもたらした。

しかし水浸レンズの小さなWDは、単に電極のみならず、細胞保持用の特殊なチャンバーを新たに開発する必要を迫った。可能な限り薄くて、細胞が載っているカバーガラスを迅速かつ安定に保持出来るようなチャンバーが必要になった。最初は金メッキした真鍮製の薄い皿(約3 mm 厚)の中央に穴をあけ、穴の裏側から速乾性の手術用接着剤を用いて素早くカバーガラスをはりつけていた。ところが細胞の調子が今一つで、せっかく良い像が見えていても良いチャンネルが記録できない状態が長く続いていた。結局接着剤から微量の酢酸が水相中に溶け出て、水相を酸性にしていたのに気がついた時には、この研究を始めて既に6ヶ月が経過していた。その後スクリューで機械的にカバーガラスを保持できる薄型のチャンバーを作ることでその問題は解決した(図3 b)。ところがそれでも、通常のシャーレ中に比べて細胞の持ちが悪い。チャンバーのスクリューキャップと水浸レンズのハウジングから漏れる微量金属が原因であることが分かり、ハウジングをシルガードでコートし、キャップを超硬質プラスチック(レキサン)で作り直すことにより、初めて細胞を長時間保持できるようになった。

3) ドリフトフリーマニピュレーター 上記の改良ではほぼ満足できるパッチ像とチャンネル電流の同時測定が可能になった(図4)。しかし通常のパッチクランプ法のように、細胞の厚い部分に上から電極をアプローチすると、背景の細胞像がパッチ膜像と重なり、しばしば像が不鮮明になってしまう。そこでどうしても細胞の側壁から電極をアプローチする必要が生じた。培養細胞(例えば我々が使用したトリ

a

b

図3 コンデンサーレンズと電極の配置(a)および薄型チャンバー(b) チャンバーには細胞が付着している直径25mmのカバーガラスが保持されている。

図4 超高倍率ビデオマイクロスコープで捉えた cell attach でのパッチ膜像 14インチモニター上で約2万倍の倍率。右下隅のトレースは上からSAチャネル電流(i), パッチ膜容量(c), 電極内圧(p), および保持電位(v)である。トレースの半ばで圧力を0から-2 cmHgに序々に上昇させている。膜容量(c)の増加, およびトレース終盤でSAチャネルの活性化(i)がみられる。画像はトレースの先頭と対応している。トレースの掃引速度は画面/5秒。

図5 異なる圧力におけるパッチ膜形状と圧パルスに対する形状応答 a. -2 cmHg. b. 0 cmHg. トレースの前半で圧力を $0 \rightarrow -2$ cmHg (a) および $-2 \rightarrow 0$ cmHg (b) にステップ状に変化させた後の定常状態を示している。圧変化(3本目のトレース)に対し、容量が約1秒の遅れで応答している様子がわかる。c. 圧パルス($0 \rightarrow -2$ cmHg, 5秒間)に対する形状変化の連続像。2コマと3コマの間でパルスがオン, 7コマと8コマの間でオフになっている(1コマ/秒)。

骨格筋)の縁の厚さはせいぜい数 μ mなので、カバーガラス面すれすれに電極を操作しなければならない。当初ハックスレー型の手動マニピュレータを使っていたが、手の振動が伝わり、電極がガラス面に接触

する場合がままあった。成茂製の油圧マニピュレータはドリフトが大きく使用できなかった(最近成茂科学器械は、水圧マニピュレータを開発した。我々のテスト(曾我部, 成茂, 未発表)では、水の蒸発に

よるわずかな経時的ドリフトはあるものの、油圧式でみられたような温度によるドリフトは大巾に改善されているようだった。) そこでレーザー光学用のモーター駆動式マニピュレータ(Newport 860A, 425 OMA)のコントロール回路(860 SC)を修正して、 $0.1\mu\text{m}$ 以下の精度で滑らかに制御できるマニピュレータを製作した。しかしまだ大きな問題があった。数万倍の倍率だとわずかの温度のゆらぎがピペットの大きなゆれやドリフトとして見えてくる。例えば私がマニピュレータに手を近づけるだけでピペットの先端が大きくゆれてしまうのである。このゆれは主としてアンプのヘッドステージを保持するロッドの熱膨張によることが判明し、これを水晶ガラスのロッドに換えることにより通常の実験室条件下で、 $0.1\mu\text{m}/5\text{min}$ 以下のゆれに押さえることができ、後の画像処理に耐え得る超安定なシステムが完成した。

4) 圧力クランプ装置 パッチ膜に対する圧刺激は従来注射筒を使い、水銀柱で圧力をモニターしながら空気を介して与えていた。私達はSAチャンネルの動的応答を調べる目的で圧力を電氣的に制御する圧力クランプ装置を開発した。即ち駆動部には、マグネットとボイスコイルを取りかえてパワーアップしたスピーカーを用い、流路に圧センサーを組み込んでこの出力をフィードバックして、任意の圧力を電氣的に発生できる様にした。しかし空気を介した圧力制御では不安定でかつ速度がとれないので、圧力流路にシリコンオイル(Dow Corning, 200, 10 CS)を満たして電極内の電解質液面と直接接触させるエアフリーの油圧式を採用し、ダイナミックレンジ $\pm 200\text{mmHg}$ 、立上がり速度 3msec の性能が発揮できるようになった。同種の装置は米国Instrutech社が商品化中であると聞いている。

4. チャンネル電流と膜容量の同時測定

ここまでやるとつい欲がでて、もう少し別の量を同時測定できないかと考えた。図5 a, bを比較すると明かなように電極内圧を変えると膜の曲率は予想以上に大きく変化し、パッチ膜面積も変化しているようにみえる。もしパッチ膜に連なる細胞膜が電極ガラス内壁と強く接着しているとすれば、パッチ膜面積の増加はパッチ膜厚の減少をもたらすはずである。このことは膜張力の見積り、ひいてはSAチャンネル活性化機構を考える上での1つの重要な情報になりうる。膜厚の変化は単位面積当りの電気容

量から推定できるので、これを測りたい。膜面積の変化は画像から計算できるので、要はパッチ膜容量の変化を測ればよいわけである。Neher & Marty (1982)はwhole cell clamp下で2相ロックインアンプを用いた膜容量の測定手法を報告している¹⁰⁾。容量測定で1つ問題になるのは、抵抗変化による位相ずれの補償であるが、我々の測定は主として、cell attached patchかexcised patchを用いて行なうので、シール抵抗は非常に高く、かつチャンネル開閉による抵抗変化に伴う電流も容量性電流に比較して無視できるほど小さいために補償はほとんど必要なく、測定はむしろ容易である。しかし、容量測定時には正弦波の電圧を常時印加するので、容量性電流とチャンネル電流が重畳してくる。同時測定を行なうにはこの2つの電流を分離する必要がある、それには以下の3つの手法が考えられる。

(1) 定常状態においては、容量性電流とロックインアンプの駆動電圧は同じ周波数の正弦波になるので、これを位相ロックして減算する。しかしこの方法では容量性電流のゆれを消すことができず、SN比が高くとれない。

(2) (1)の欠点を補うためにロックインアンプからの容量出力を、パッチクランプの容量補償回路へフィードバックする、即ち容量クランプ回路を導入する。こうすれば電流出力はチャンネル電流のみとすることができ、容量変化はフィードバック量から読み取れる。この方法が原理的には一番良いのだが、実際に導入してみると、ただでさえ不安定なボルテージクランプが更に不安定となり、しばしば発振してしまい、残念ながら使用を断念した。

(3) もし駆動正弦波の周波数が、チャンネル電流の周波数成分より充分大きければ、低域フィルターを用いてチャンネル電流を分離できる。実際には駆動周波数を 10kHz (20mVrms)とし、チャンネル電流を 2kHz の8次ベッセルフィルターで容易に分離することができた。この条件では、 $1\text{fF}/200\text{mV}$ の感度で 0.1fF 以下の容量変化(時定数 30msec)を充分検出することができた。因みに半径 $0.1\mu\text{m}$ の膜小胞は約 0.3fF の膜容量を有するので、このシステムは、シナプス小胞一個のエキソサイトシスを検出できることになる。

この測定をSAチャンネルを含むパッチ膜に応用したところ、膜の単位面積当たりの容量は約 $0.7\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ¹⁵⁾と見積もられ、圧による膜面積の変化中もその値はほとんど変わらなかった。つまりその間、

図6 パッチ膜画像の定量的計測と画像の抽出手順 a. 電極内壁(w)とパッチ膜(p)を横切る方向での輝度分布。b. 電極内壁に接するラテックスビーズ($3.87\mu\text{m}\phi$)。c. 長方形のウィンドウを指定したのち、パッチ膜と電極内壁をそれぞれ円弧と2本の直線で近似した様子。d. cの近似線の周りに12画素のバンドを指定してH型の画像を抽出した様子。

膜厚はほぼ一定であるらしい。このことは、膜面積の増加が、パッチ膜に続く膜からのリピッドの供給によることを示唆している。またパッチ膜付着部が移動しないことから、おそらく膜蛋白がガラス壁に固着し、それら蛋白間をつなぐ細胞骨格の伸張がSAチャンネルの活性化に関与している可能性を示している。

5. パッチ膜画像の処理

1) 画像の取り込み パッチ膜画像は倒立顕微鏡の側鏡筒から投影レンズを通して高感度(0.1lux) CCDカメラに投影した。解像度の点では撮像管(例えばニュービコン)に劣るが、取り扱い易さと、いづれにせよデジタル化することを考慮してCCDカメラを採用した。CCDカメラの出力はSVHSレコーダを介して、フレームグラバー(Data Translation, DT2851, $512 \times 512 \times 8\text{bit}$)に取り込み、必要ならばDSPボード(DT2858)の助けを借りてオンライン画

像処理(Imagepro (Mediacybernetics社)によるフィルタ、コントラスト、擬似カラーなど)を施した後、RGBモニターで観測した。画像はビデオレートでフレームメモリ上、あるいはやや遅くはなるが拡張RAMに蓄えることができる。通常はSVHSテープに録画したものを後に再生して、必要なものをハードディスクに保存した。継時的な画像の取り込みは以下の様に行なった。市販のタイムコードジェネレータ(Fast Forward Video model F200)から生成するタイムコード(SIMPTE CODE)をSVHSのHiFiトラックに画像と同時に記録し、画像再生時にそのタイムコードを自家製のインターフェースでコンピュータのシリアルポートに送り、ソフトウェア(自家製)上でそのコードをモニターしながら任意のフレームから任意のインターバルで画像をRAM上に連続的に取り込んだ。この際メモリを節約し、取り込み速度を上げるために、原画像のパッチ膜部分にウィンドウをかけて取り込む画素数を元

(256KB)の1/9に落として、3 MBの拡張RAM上に連続108画面記録できるようにした(図5 c)。

2) 画像の処理 我々が知りたいのはパッチ膜の幾何学的構造である。パッチ膜が電極の中心軸に対して回転対称なドーム状とすれば、これを真横から見た円弧の曲率とその電極内壁との交点が決められれば良いわけである。一見簡単そうであるが必ずしもそうではない。原図像はかなり鮮明とはいえず、パッチ膜は $0.1\sim 0.2\mu\text{m}$ 、電極内壁も同程度の巾をもっている。真の膜厚はせいぜい $0.01\mu\text{m}$ 、内壁面はもっと狭いわけで、ボケた像のどの位置に真の膜と内壁があるかを推定しなければならないのである。そのために適当な幾何学模型を仮定して、原画像に対して非線形フィッティングを行なう必要がある。試行錯誤の末、そのモデルとしては、内壁に添う2本の直線とパッチ膜に添う1つの円弧で充分であることが分かった。つまり各直線について傾きとY切片及び円弧の中心座標と半径の計8つのパラメータを決定すればよい。さてパッチ膜を横切る方向での画像の輝度分布をとると、ほぼガウス分布になっているので、幾何模型も同様の分布を仮定し、その最小値を真の膜の位置とした(図6 a, P)。内壁を横切る方向はガウス分布ではなく2相性の分布を示すので(図6 a, W)、模型もその様に仮定したが、その時の最小値は真の境界であるか否かは疑わしい。なぜならピベットは円筒レンズになっており、端にいくほどゆがみが生じるからである。そこでシミュレーションによりそのゆがみを推定するとおよそ5%以内に収まることがわかった。実際にこれを確認するために、十分校正されたラテックスビーズ(直径 $3.87\mu\text{m}$ 、Polyscience社)をピベット先端に押し込み(図6 b)、まずビーズの真の周境界が、最小輝度部位に一致することを確認したのち、その境界と接する点が真の内壁面であるとした。その結果、真の内壁面は最小輝度部位を3%程度ずらした位置であることが判明した。こうした手続きにより初めて信頼のおける幾何学的パラメータが得られるようになった。

しかし2次元画像のフィッティング計算は386(20 MHz)マシンでもいやになる程時間がかかる。そこでまず原画像から必要最低限の情報を抽出する必要があった。まずパッチ膜を含む長方形のウインドウを設定し、ついで膜部分を含む3点と各直線を含む4点を選んでラフなH型の近似図型を描き(図6 c)、その周りに10~15画素の巾で原画像を抽出する(図

6 d)。これにより一画面当たり256KBの情報を10 KB程度のファイルに縮小することができた。次に計算速度を上げるために、このファイルをネットワーク上でワークステーション(Sun 3)に転送してフィッティングを行ない、一画像につき、最大数分以内という実用的な処理速度を得ることができた。こうしてやっと膜曲率と膜面積が求められたが、興味深いことに膜面積は圧変化に対し10%以上も変化することがわかった。これは脂質2重膜の破壊限界(3%程度)をはかるに超える値であり、先の容量測定の結果から推定されたように、膜面積の増加はパッチ膜への新しい脂質の流入が伴うことを強く示唆している。また、SAチャネルの開確率は予想通り、圧力ではなく張力と強い相関をもつことが分かった¹⁵⁾。

3) 画像と電気信号の同期 電気信号(電流、電圧、圧力、容量など)と画像信号の同期は2つの方法で行なった。一つは電気信号を表示している多チャネルデジタルスコープの画面をTVカメラで捉え、ビデオワイパーを介してCCDカメラのパッチ膜画面と合成して同時に表示する方法である(4図右下隅のトレース)。但しこれはあくまでも実験者のモニター用である。もう一つは先に述べたタイムコードを利用する方法である。タイムコードは画面上に表示されると同時に画像記録用テープのHiFiトラックと、電気信号記録テープの1つのトラックに記録される。多チャネル電気信号はA/Dコンバーター(Labmaster)を介してコンピュータに取り込まれるが、タイムコードは前述のインターフェスを介してシリアルポートで読みとる。電気信号の解析及び圧力刺激信号の発生はPCLAMP 5.01 (AXON社)のclampexを用いて行なったが、clampexを少し書き換えて(Quick Basic 4.0)そのコメント欄に、シリアルポートから読み込んだ画像のフレーム番号を表示するようにした。同期の精度はビデオレート(30 msec)で制限されるが、パッチ膜のステップ圧刺激に対する時定数が比較的大きい(約1秒)ために、画像と電気信号の同期精度はこの程度で十分であった。

6. 今後の課題

筆者は長年脂質平面膜(人工膜)を用いてチャネル電流を眺めてきたが、いつも膜のところで何が生じているのか視ることができずにもどかし思っていた。今回パッチ膜ではあるが、シール形成過程や圧力による膜変形を目の当りにして、みることの楽し

さを初めて味わうことができた。このシステムを用いて、パッチクランプの原理的問題(シール形成、維持機構など)も研究課題になり得ると感じている。今一つ感じたのは同時計測の有用さである(例えば膜容量と画像の同時計測の例)。極端に言えば同時多重計測をすればどんなデータでも何かの使い道が見つかる。しかしこのこととは裏腹に、大量のデータ処理がいかに大変かを痛感した。今回開発したシステムはかなり自動化されているとはいえ、解析には実験をはるかに上まわる時間と労力を要した。以前榎本博士(島根医大)が、データが出たあと自動的に解析してグラフも論文も書いてくれるソフトが出来ないものか、と言われていたが、そこまでではないにしろ同時多重計測は、高速でインテリジェントなハードとソフトウェア無しには発展し得ないであろうと感じている。今後このシステムを使ってシナプス小胞の融合過程の計測とか、膜蛋白を金コロイド標識してその分布や動きを見ながら同時計測するとか、蛍光分光器やSITカメラを追加して、 Ca^{++} 濃度の同時計測ができないものかなどと夢想しているが、これらが見果てぬ夢にならぬよう努力していきたい。

本研究はNY州立大学のF.Sachs博士との協同研究であり、ハード、ソフトの開発には数多くの技官やパートの学生の助けを借りた。システムの開発に一年以上費したが、これを総て日本で行なっていたら、おそらくその倍以上はかかったと思うと、改めて我国の研究体制の非効率さを感じずにはいられない。

ここで紹介した同時計測システムは現在Sachs博士と筆者の研究室に設置されているので興味ある方は御来訪頂きたい。尚本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(01570044, 01880028, 02241206)、テルモ科学技術振興財団及び日東科学財団の援助により行われた。

文 献

- 1) Kasai, M., Nunogaki, K., Tanifuji, M., & Sokabe, M.: Structure and Function of Sarcoplasmic Reticulum, (eds. Tonomura, Y. & Fleischer, S.) pp 537-559, Academic Press (1985)
- 2) 唐木英明, 工藤佳久, 栗山熙編: 細胞内カルシウム実験法, 実験医学, 7. No.6 (1989)
- 3) Sokabe, M. & Sachs, F.: J. Cell Biol. 111, 599-606 (1990)
- 4) Guharay, F., & Sachs, F.: J. Physiol. (London), 352, 685-701 (1984)
- 5) Brehm, P., Kullberg, R., & Moody-Corbett, F.: J. Physiol. (London), 350, 631-648 (1984)
- 6) Methfessel, C., Witzemann, V., Takahashi, T., Mishina, M., Numa, S., & Sackmann, B.: Pflügers Arch., 407, 557-588 (1988)
- 7) Sachs, F.: CRC Crit. Rev. Biomed. Eng., 16, 141-169 (1988)
- 8) 曾我部正博, 野村一史, 成瀬恵治, 加藤隆司, 伊藤文雄: 動物生理, 5, 168-176 (1988)
- 9) Morris, C. E.: J. Membr. Biol., 113, 93-107 (1990)
- 10) Falke, L. C. & Misler, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3919-3923 (1989)
- 11) Shultz, S. G.: NIPS, 4, 169-172 (1989)
- 12) Medina, I. R., & Bregestovski, P. D.: Proc. Roy. Soc. London B, 235, 95-102 (1988)
- 13) Inoue, S.: Videomicroscopy, Plenum Press (1986)
- 14) Neher, E. & Marty, A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6712-6716 (1982)
- 15) Sokabe, M., Sachs, F., & Jing, Z.: Biophysical J. 59: 722-728 (1991)