

「微小終板電位頻度の自動計測装置」

川崎医科大学 生理学教室 I

成 田 和 彦

(昭和58年12月15日受付)

A Device for Measuring Miniature End-Plate Potential Frequency

Kazuhiko Narita

Department of Physiology
Kawasaki Medical School

(Accepted on Dec. 15, 1983)

伝達物質の素量的放出の電氣的表現である微小終板電位 (MEPP) の頻度を自動計測するカウンタを製作した。細胞内電極で記録した MEPP は、神経インパルスに比べてその時間経過が長く、またその大きさが一定でない。さらに不応期がないため、いくつかの MEPP が加重して波形が複雑になる。したがって通常のスパイクカウンタでは、正確な MEPP 頻度の測定は困難である。そこで次のような特徴を持つカウンタを考案した。

(1) 微分回路によって MEPP よりも時間経過の遅い電位変化を除去し、かつ個々の MEPP の電位変化を急峻にする。これによって、MEPP 計数の際妨害となる種々のノイズをかなり除くことができる。(2) 種々の振幅の MEPP や加重した個々の MEPP を確実に計数するために、コンパレータを4個並列に連結し、種々のレベルの電位変化を検出する。(3) 各コンパレータ出力の立ち上がり及び立ち下がりエッジによってフリップ・フロップ回路の出力を on 及び off にし、1個の MEPP を1組の on・off 出力に対応させる。(4) この出力をカウンタ回路で計数する。以上の回路構成により、少ない誤差で約100/秒までの MEPP 頻度を測定することができ、本装置が MEPP 頻度を対象にした広範囲の実験に有用であることが明らかになった。

A device for counting miniature end-plate potentials (MEPPs) automatically was designed. The MEPP represents quantal transmitter release at the neuromuscular junction. The amplitude of MEPPs is not uniform and more than two MEPPs often summate to produce a larger potential change with the corresponding notches. Therefore, it is difficult to count MEPPs accurately with an ordinary spike counter. The device described here has the following features: (1) A differential amplifier is included to eliminate potential changes slower than MEPPs that interfere with the detection of the MEPPs. (2) Four comparators connected in parallel that can be triggered at different potential levels are used to detect MEPPs with different amplitudes. (3) There is a flip-flop circuit which is edge-triggered by the comparators such that a pair of on and off output signals of the circuit corresponds to an MEPP. With this counter, the MEPP frequency

can be measured accurately up to nearly 100/sec suggesting that the device is applicable to a wide range of experiments dealing with the MEPP frequency.

Key Words ① Miniature end-plate potential frequency ② Counter

はじめに

微小終板電位 (Miniature end-plate potential, MEPP) は、化学シナプスにおける素量の伝達物質放出に対するシナプス後部膜の電気的反応であり、その振幅や頻度の測定結果に基づいて伝達物質の放出機構に関する考察がなされてきた¹⁾。

MEPP の頻度を測定する場合、Fig. 1a のように比較的低頻度の時は、記録した MEPP を数えて単位秒当たりの値を得ることが容易であるが、b, c のように高頻度の時は、たとえば、MEPP を一旦データレコーダに記録し、後にそれを緩速度で再生する。トノサマガエルの坐骨神経—縫工筋試料を、2~3時間 Ca^{2+} を含まない生理的塩類溶液に浸した後に記録し

た MEPP の頻度は、通常 0.1~1/秒であるが (Fig. 1a)、神経に 50Hz の最大上刺激を与えると、その頻度は上昇し (b)、実験条件によっては 100/秒以上に達する (c)。細胞外液に Co^{2+} や Ni^{2+} を含む場合、この高頻度の状態が数時間持続することもある。このような時各回の MEPP を肉眼で数えることは繁雑で誤差も多く、自動計測システムの開発が必要となる。

MEPP の発現に規則性がないこと、条件によって MEPP の記録に種々の電気的雑音が入ること、特に高頻度の場合、2つ以上の MEPP が加重して複雑な波形になることなどのために、市販の計測器を MEPP の計数に使用することはできない。そこで、MEPP を自動計測できる、安価で製作が容易なカウンタを試作し、その測定精度を検討した。

記録方法

MEPP はトノサマガエル (*Rana temporaria*) の坐骨神経—縫工筋試料から記録した。試料は、Ca を含まず 1 mM EGTA を含む生理的塩類溶液 (無 Ca 溶液) に浸し、2~3時間冷蔵庫に静置してから実験を開始した。生理的塩類溶液を満した容量約 5 ml のアクリルアミド製液槽に、筋を長軸方向に約 120% に引き伸ばして、細いピンで固定した。液槽に隣接した銀—塩化銀刺激電極の上に神経を載せ、ワセリンと流動パラフィンの混合物で被って乾燥を防いだ。

試料摘出に使用した生理的塩類溶液の組成 (mM) は、

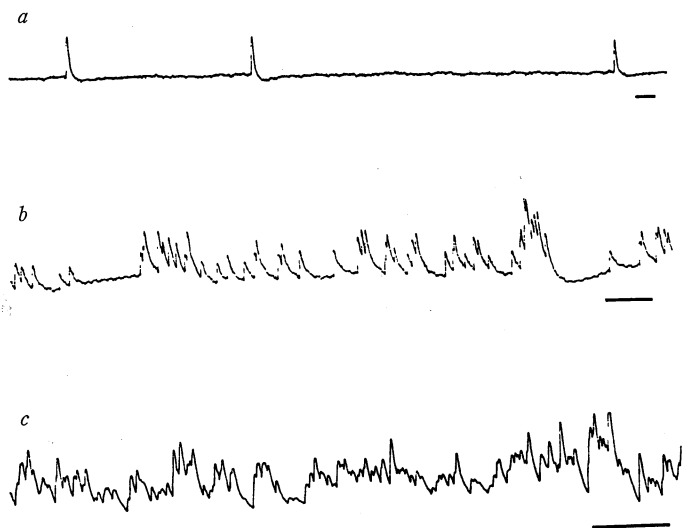


Fig. 1. Sample records of MEPPs appearing at low (a), medium (b) and high (c) frequencies recorded intracellularly at the frog neuromuscular junction. a was obtained after soaking the preparation in refrigerated Ca^{2+} -free saline solution for about 2 hrs. d, immediately after the end of tetanic stimulation of the motor nerve in the above solution. c, immediately after the end of nerve stimulation in Mn^{2+} -saline solution. All records were obtained at 19-23°C. Calibrations: vertical, 1mV; horizontal, 0.1 sec.

NaCl 100, KCl 2, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 3, Tris 8 (ph=7.4)である. MEPP の記録に用いた溶液は, 無 Ca 溶液と, CaCl₂ の代わりに 2.5mM MgCl₂ を含む溶液 (Mn 溶液) で, いずれも MEPP の振幅と時間経過を大きくするために, neostigmine bromide (10⁻⁶g/ml) が加えられた. これらの溶液中では, Ca²⁺ が存在しないので, 神経刺激によって終板電位 (End-plate potential, EPP) は発生しない.

正常リンガー液中のみでなく, Mn 溶液や無 Ca 溶液中でも, 運動神経の頻回刺激によって, MEPP 頻度は可逆的に上昇することが知られている^{2,3)}. そこで, 高頻度の MEPP を得るため, 無 Ca 及び Mn 溶液中で, 刺激装置 (日本光電, SEN-3201) から, 50Hz の矩形波 (持続時間 0.2 秒, supramaximal) を 2~3 分間運動神経に与えた.

MEPP は 3M-KCl を充填した ガラス微小電極 (直流抵抗 10~30 MΩ) を用いて細胞内から導出し, ブラウン管オシロスコープ (日本光電, VC-10) 及びペン書きオシログラフ (日本光電, レクテコーダ) によって観察, 記録した後, 単位時間当たりの放電数を計数した. 同時に本カウンタによって MEPP 頻度を計測し, 記録された MEPP を数えた結果と比較した. また高頻度の MEPP はカセットデータレコーダ (TEAC, R-80) に一旦記録し, 実験終了後緩速度でペン書きオシログラフに再生し, これから MEPP 頻度を算出した.

MEPP 用カウンタに用いられた部品のうち, 大部分のデジタル IC は MOTOROLA 社製, FET 入力及び汎用オペアンプは FAIR CHILD 社製, カウンタ用 IC は沖電気

製, カウンタ回路における基準時間発生のための時間用 IC は NEC 製である. 抵抗は 1/4~1/8W 型の炭素皮膜型, コンデンサは電源バイパス用に用いたタンタル型を除くと大部分はマイラ型もしくはセラミック型である.

カウンタの諸回路を駆動した電源は, 三端子電圧レギュレタ (MC 7815, MC 7915, MC 7805, MOTOROLA 社) からの安定化された ±15V 及び 5V⁴⁾ である.

回路及び結果

Fig. 2 は種々の MEPP 記録と本装置によるそれらの頻度測定の結果である. 図中の点は個々の MEPP を示す. **a** は基線の動揺が大きい場合で, 実験中電極抵抗が変化する時にしばしば遭遇する例である. 市販のスパイク・カウンタでは, カウントするためのパルスをトリガする際の電圧レベルを, 基線の動揺と MEPP とを識別できるように設定することは困難であ

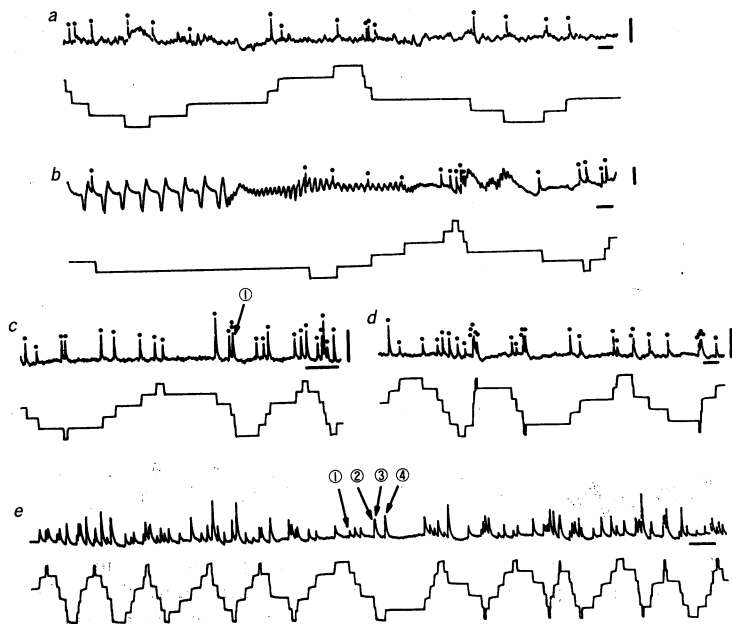


Fig. 2. Sample records of MEPPs, counting which is difficult with ordinary spike counters. The lower traces show transitions triggered by corresponding MEPPs which enable us to count the MEPPs easily. In a-d, each dot represents an MEPP. Further explanation in the text. Calibrations: vertical, 1mV; horizontal, 0.1 sec.

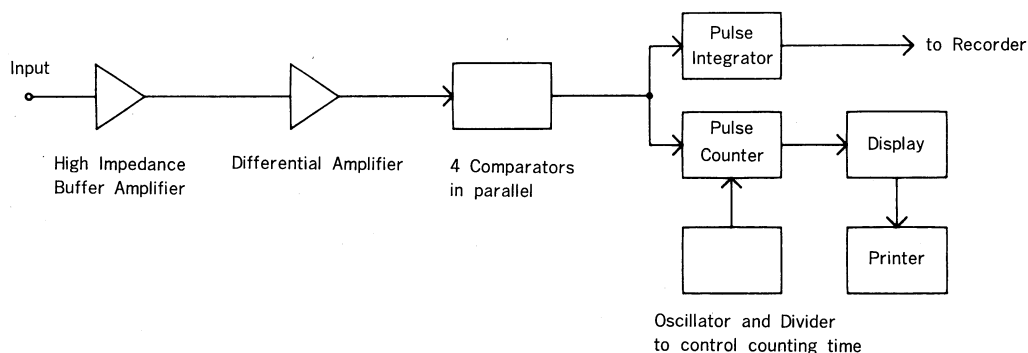


Fig. 3. Block diagram showing the main elements of the device. For the comparators see Fig. 4.

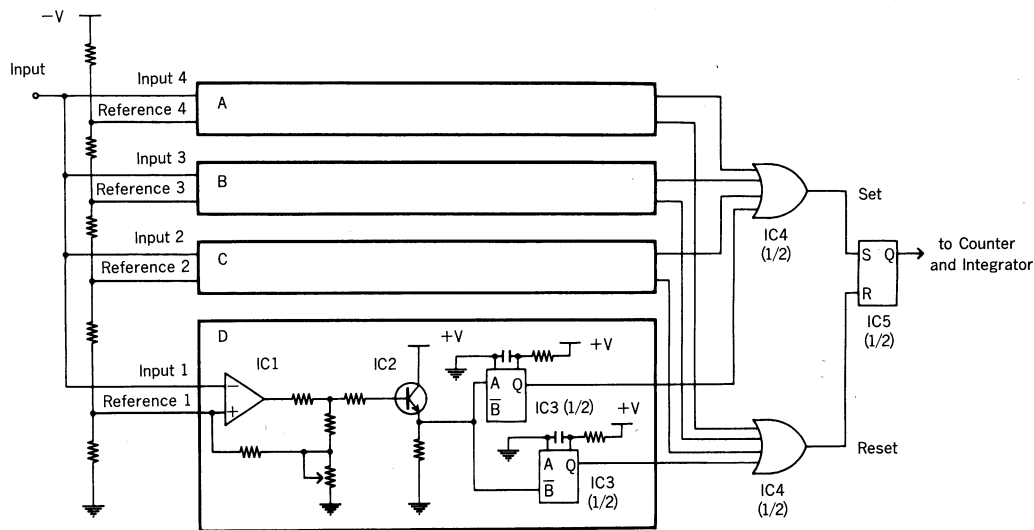
る。b は微小電極を刺入している筋線維の周辺の筋線維が自発的に収縮して、その動きが基線の動揺として現われた例である。これは低 Ca^{2+} 溶液の場合にしばしば出現するが、従来のスパイクカウンタでは a の時と同様頻度測定が困難である。c, d, e は 2 個以上の MEPP が短い間隔で加重した場合⁵⁾ を含む記録である。この場合、加重した 2 つ以上の MEPP を 1 個として数えてしまうことのないようにしなければならない。

Fig. 3 は、通常のスパイクカウンタでは困難な MEPP の計数を正確に行うための回路の概略図である。初段のバッファ・アンプは高入力インピーダンスを有し、本カウンタ回路を接続しても MEPP の記録回路の作動状態が変化しないようにしている。これには FET 入力をもつオペアンプ 740 を使い、ボルテージ・フォロワー回路⁶⁾ を採用した。次段の微分増幅回路には汎用オペアンプ 741⁷⁾ を用いた。これは MEPP より変化の遅い基線の変動を除外するための回路で、Fig. 2a, b の場合有効である。微分特性を持たせるためのコンデンサー(C)と抵抗(R)の値はそれぞれ $0.1\ \mu\text{F}$ と $150\ \text{k}\Omega$ であった。ただ Fig. 2b のような収縮による電位変動の場合は、その時間経過が MEPP にかなり近いため、C と R の値を変える必要がある。この場合、 $C=0.01\sim 0.47\ \mu\text{F}$, $R=100\sim 500\ \text{k}\Omega$ の範囲であった。

Fig. 3 のコンパレータ回路は、2 個以上加重

した MEPP の各々を計数するための回路で、Fig. 4 にその詳細を、Fig. 5 にタイミング・チャートを示す。市販の多くのスパイク・カウンタは、ウィンドウ型を除いて、コンパレータ⁸⁾ のパルスをトリガするための閾は 1 段である。そのため、加重した 2 個以上の MEPP は 1 個に数えられてしまう。たとえば、Fig. 2e の ①と③を共に検出して、2 つのパルスをトリガすることはできない。コンパレータの閾が 1 段でも、微分回路を通せば電位変動はより急峻になるので、ある程度の頻度までは少ない誤差で MEPP を計数できる。しかし、その上限は、現在の実験で観察される MEPP 頻度の範囲に比べると、きわめて低い。

そこで、パルスをトリガする閾値の異なるコンパレータを数個並列に連結して、加重した個々の MEPP を検出できるようにした。たとえば、Fig. 2e の ①と③でそれぞれパルスをトリガできるように 2 つの閾値を設定すれば、①, ②, ③の MEPP を検出することができる。Fig. 4 に示すように、IC1 のコンパレータを 4 個並列に接続し、それぞれの閾値を下(低電位)から順次高くなるように設定する。それぞれのコンパレータの出力は、IC2 のインターフェイスを通過後、Monostable multivibrator⁹⁾ のデジタル IC3 によってその立ち上がりエッジを検出され、その結果発生したパルスがカウンタ回路¹⁰⁾ で計数される。しかしこの出力をそのままカウントしたのでは、Fig. 2e の④のよ



IC1 is 741; IC2, 2SC 372; IC3, MC14528; IC4, MC14072 and IC5, MC14027.

Fig. 4. Schematic diagram of 4 comparators connected in parallel for detecting summated MEPPs with different trigger levels. A, B and C are the same as D.

うな大きな振幅の MEPP は4段の閾のいくつかを横切るので、その時作動したコンパレータの数だけの出力パルス (Fig. 5a の Set) を MEPP の個数としてカウントしてしまう。そこで、各列のコンパレータ出力の立ち上がりエッジによりトリガされるパルスと、立ち下がりエッジによるパルスとによって駆動されるフリップ・フロップ回路 (IC5) を接続し、この IC5 の出力 (Fig. 5 の Q)

をカウントすればこの問題は解決される。すなわち、いずれかのコンパレータ出力の立ち上がりエッジによるパルスは、IC4 の OR-gate を通過後 (Fig. 5 Set) IC5 をセットして、この出力 (Fig. 5 の Q) を “on” にするが、以後別の列のコンパレータの立ち上がりエッジによるパルスでは IC5 の出力は変化せず、“on” のままである。そして、いずれかのコンパレータ出力の立ち下がりエッジによりトリガされたパル

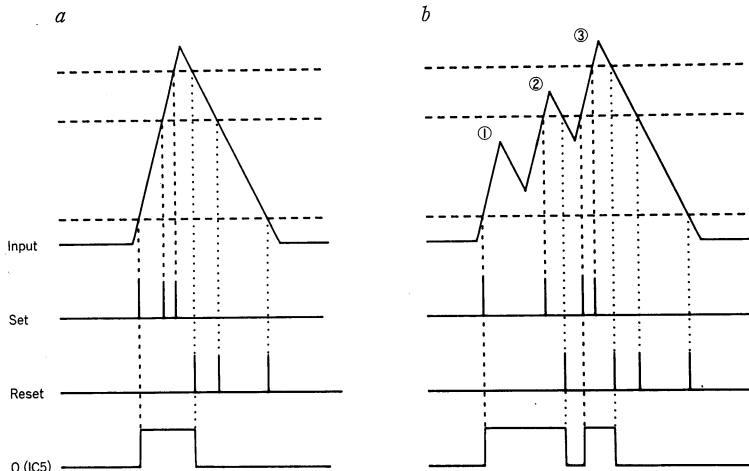


Fig. 5. Timing chart of the input, set (S) and reset (R) for IC5 and the output from Q of IC5 in Fig. 4.

スが、OR-gate を通って (Fig. 5 の Reset) IC5 をリセットし、IC5 の出力が “off” になって初めて1個の出力パルスとなり、カウンタ回路によって計数される (Fig. 5a)。こうして、Fig. 2e の④も①も1個の MEPP として数えられる。また②と③のように2個の MEPP が加重した場合でも、②の下降相の間にいずれかのコンパレータの閾が存在すれば、②と③は区別され、2個の MEPP として計

数される (Fig. 5b の②と③). Fig. 2c の①のように、加重している MEPP の間に下降相が見られない場合でも、微分回路を通すことによって原波形はその間に下降相をもつ波形に変形されて、2個の MEPP の区別が可能になる。しかし、Fig. 5b の①のように、下降相に閾が存在しなければ、①と②の区別はできず、1個の MEPP として計数される。したがって、加重した複数個の MEPP を個々の MEPP として識別できる理論上の MEPP 間隔の最小値は、微分回路を通した後の MEPP の下降相の振幅と、コンパレータの閾値の間隔との関係で決定され、閾値間隔が小さいほど、短い時間間隔で発生した複数個の MEPP を区別できる。しかし、閾値間隔はノイズの振幅より大きくする必要がある。

以上が MEPP 計数回路の主要部の説明であるが、本装置はさらに IC5 から出力されたパルスをカウントするパルス・カウンタ回路、カウントするゲート・タイムを規定するための発振器及び分周回路、カウントされた結果をラッチしながら表示・プリントする出力部等で構成されている。

MEPP の振幅は、 10^{-6} g/ml の neostigmine 存在下で約 1 mV であるが、試料や電極の状態、電極の刺入場所などによって、その振幅、上昇相および下降相の速度、基線のノイズの振幅などが異なる。したがって、実験の都度コンパレータの最適の閾レベルを決め、出力パルスが確実に MEPP に対応しているかを確認する必要がある。そこで MEPP とともに最下段 (Fig. 4 の D) のコンパレータのトリガ・レベルをモニター・オシロスコープに表示し、同時にコンパレータの出力パルスを積分¹¹⁾してペン書きオシログラフに MEPP と一緒に記録して、MEPP の出現とカウンタの作動状態を監視しながら実験を進めた。このパルス積分回路は、5個のパルスが入力されると積み重ねの向きを逆転し、これを繰り返すので、1往復すると10個のパルスを計数したことになる。突発的に多数の MEPP が出現し、記録紙上でそれらが重なり合って正確な個数の判定が困難な場

合、この回路は特に威力を発揮した。

Fig. 2 の各 MEPP 記録の下に、パルス積分回路の出力を示す。記録のレベルの段階的なずれは、MEPP がカウントされたことを示す。

本装置は、通常のパルス・カウンタでは計数困難な MEPP でも検出でき、これによって MEPP 頻度計測の自動化が可能になった。

考 察

著者が製作した MEPP 用カウンタは、オペアンプを使用した微分回路、4個並列に連結したコンパレータおよびフリップ・フロップ回路を主な構成要素とした簡単で安価な装置であり、Fig. 2 のような、従来のスパイク・カウンタでは計数しにくかった波形をも検出して、通常の実験で観察される MEPP 頻度のかなりの範囲まで自動計測することができた。

この装置の主な特徴は次の3点である。(1)微分回路によって、MEPP よりも時間経過の遅い電位変化を除き、基線を安定させる。(2)コンパレータを4個並べて、高い電位レベルで加重する MEPP も、低い電位レベルで加重するものとともに検出する。(3)フリップ・フロップ回路によって、観察された MEPP と同数のパルスを出力し、これをカウントする。

本装置の高頻度への追従性を検討するために、コンパレータが1個の場合と4個の場合とで、得られた値が実際数えた MEPP の数とどの程度一致するかを Fig. 6 に示した。横軸は MEPP を肉眼で数えて算出した頻度、縦軸は本カウンタによって得られた値である。コンパレータが1個の場合(×)は、MEPP 頻度が20/秒付近から実際の計測値と大きくずれ始めているが、4個の場合(○)は、100/秒まで実測値とよく一致している。これまでの実験で、MEPP 頻度が100/秒を越えることはそれほど多くなく、本装置によって測定可能な頻度の範囲は、通常の実験で観察される MEPP 頻度の範囲のほとんどを包含している。

しかし、MEPP の検出をコンパレータによって行っているため、極端に大きくて速い筋収縮に起因する電位変動、電極を刺入した筋線維

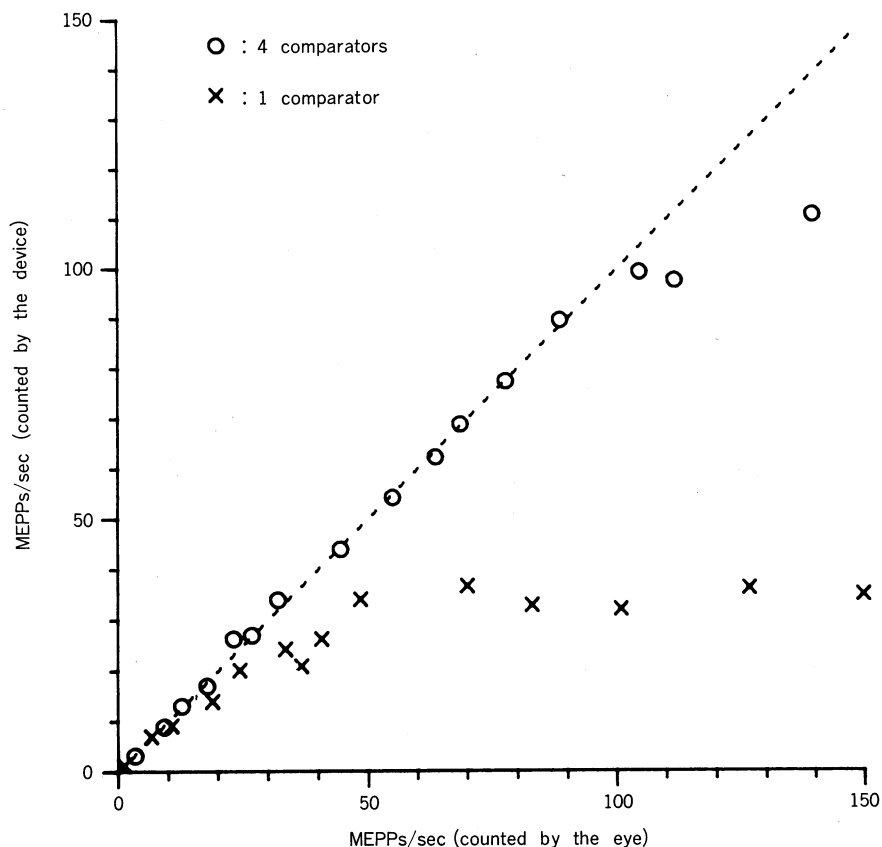


Fig. 6. Graph showing the agreement in the values of MEPP frequency obtained by the device with 1 or 4 comparators and by actual counting.

が発生した活動電位，運動神経を刺激した時の artifact 等は，時に MEPP と区別できなかつた。特に神経刺激の場合，刺激装置から出た矩形波が記録電極にとび込んで記録された波形は，実験の度に一樣でなく，結局神経の頻回刺激中の MEPP は，肉眼で数えざるを得なかつた。

基線を安定させるためには，微分回路を通して MEPP を記録することが不可欠であるが，その場合 S/N 比は低下する。記録電極が不良で時間経過の速いノイズが多い時は，微分回路の前に適当なローパス・フィルターを入れると良い結果が得られた。基線が大きく動揺しても，MEPP によって正確にパルスをトリガさせる手段として，微分回路の代わりに基線追従コンパレータ回路¹²⁾を用いる方法があるが，Fig. 2c ①の場合を考えると，やはり微分回路を使用した方が有利と思われる。

MEPP 頻度が著しく高くなると，加重によって振幅が全般的に大きくなり，4 個のコンパレータでもすべての大きさの MEPP を検出できなくなる。したがって，100/秒以上の高頻度でさらに高い測定精度が要求される場合は，コンパレータの個数を増すことによって，より良い結果が得られると思われる。

また，コンパレータとしてレベルメータ用 IC が応用できれば，電位レベル検出の段数も多くなり，簡単な回路構成でさらに高性能のカウンタが期待できる。

稿を終るにあたり，終始御指導頂き，御校閲を賜わった松村幹郎教授，ならびに直接御指導頂き，御校閲を賜わった喜多弘助教授に深謝致します。また本研究は，本学プロジェクト研究費 (57-409) によって行いました。

文 献

- 1) del Castillo, J. and Katz, B.: Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol.* 124: 560—573, 1954
- 2) Kita, H., Narita, K. and Van der Kloot, W.: Tetanic stimulation increases the frequency of miniature end-plate potentials at the frog neuromuscular junction in Mn^{2+} , Co^{2+} , and Ni^{2+} -saline solutions. *Brain Res.* 205: 111—121, 1981
- 3) Kita, H., Narita, K. and Van der Kloot, W.: The relation between tonicity and impulse-evoked transmitter release in the frog. *J. Physiol.* 325: 213—222, 1982
- 4) 久保大次郎, 一杉 勝: デジタル回路設計スタディ. 第5版. 東京, CQ 出版株式会社. 1977, p. 82
- 5) Katz, B: *Nerve, muscle, and synapse.* New York, MacGraw-Hill. 1966, pp. 129—141
- 6) 横井与次郎: IC 応用回路アイデア集, 第4版. 東京, 誠文堂新光社. 1977, p. 13
- 7) 岡村勉夫: OP アンプ回路の設計, 第7版. 東京, CQ 出版株式会社. 1976, pp. 151—161
- 8) 上野大平: リニヤ IC 活用ハンドブック, 第4版. 東京, CQ 出版株式会社. 1976, pp. 130—134
- 9) Motorola: CMOS data. 1st ed. Texas, Motorola Semiconductor Products Inc., 1978, pp. 7—452—7—456
- 10) 沖電気: OKI CMOS 形デジタル集積回路. 東京, 沖電気工業株式会社. 1978, pp. 46—48
- 11) CQ 出版株式会社: 実用電子回路ハンドブック (1), 第13版. 東京, CQ 出版株式会社. 1977, p. 359
- 12) 曾根 清: 実用電子回路ハンドブック (4), 第1版. 東京, CQ 出版株式会社. 1977, pp. 414—415