

4 坐骨神経の活動電位



実習に出る前にこの実習書をよく読み「実習予習課題」(最終講義で配布)を予習しておく事。また実習書の「a.目的」に呈示されている問題に解答する事。実習中はデータの集積に努めるとともに、実習項目中に出されている問題を解決する事。尚、実習後に活動電位の伝導と活動電位発生機構について復習するので、必ず講義プリントを持参する事。

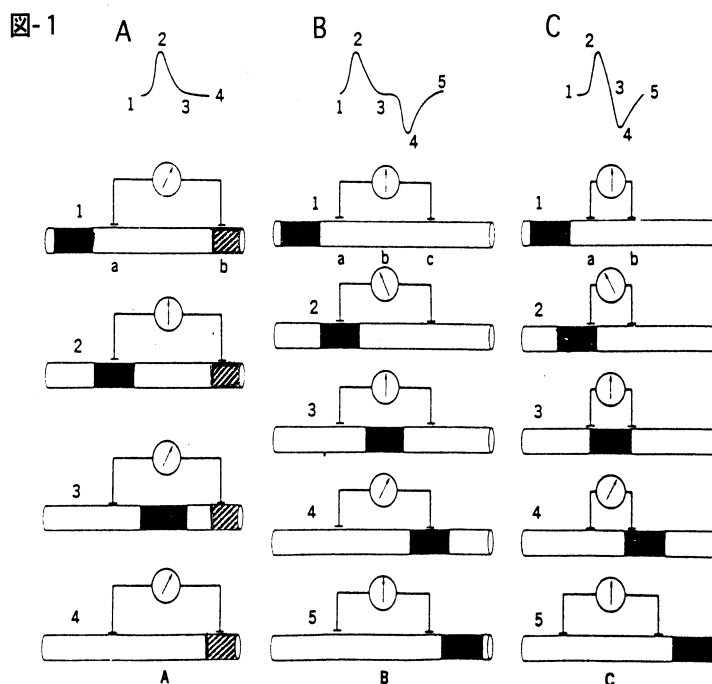
a. 目的

神経線維束である坐骨神経の電気刺激により誘発される複合活動電位を記録して、以下の事項を観察する事により神経線維束での信号伝達の機構を学習する。

1) 複合活動電位の細胞外誘導による記録。(実習項目1)

実習に使用する坐骨神経標本は単一の神経線維が集合した神経線維束であるので、記録される活動電位は個々の神経線維で生じた活動電流が加算された結果である。これを複合活動電位という。複合活動電位を細胞外で記録すると図-1のB、Cの様な二相性の活動電位 biphasic action potential が記録される。この二相性の活動電位とAの单相性の活動電位が記録される機構を講義プリント「興奮性膜・シナプス」参考にして記述せよ。(図は参考書<1> Fig.2-4,p51 より転載) 尚細胞外誘導では負の電圧を上向きで表示する。

図の  は興奮している部分を  は損傷部を示す。



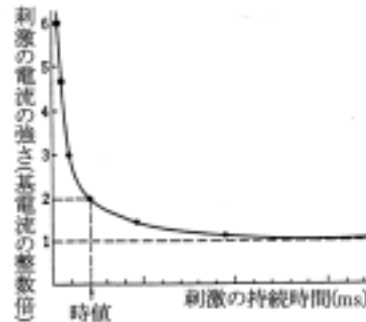
< 学生解答欄 >

2) 刺激の三要素に関する実験(実習項目2)

刺激電流で神経線維を興奮させるにはある大きさ以上の刺激強度が必要である。この強度は刺激電流値、刺激電流の持続時間 duration、刺激電流の時間変化の三要素により決まる。実習では矩形波電圧を刺激電流の発生源として使用するので、刺激電流値・刺激持続時間の関係を調べて、強さ・時間曲線を描く。弱い刺激電流で興奮を生じるためには刺激の持続時間を長くする必要はあるが、ある一定値以下の刺激電流値では刺激電流の持続時間をどれだけ長くしても興奮が生じない。この最小の刺激電流値を基電流 rheobase という。また各刺激強度における最小の持続時間を利用時 utilization time という。基電流の2倍

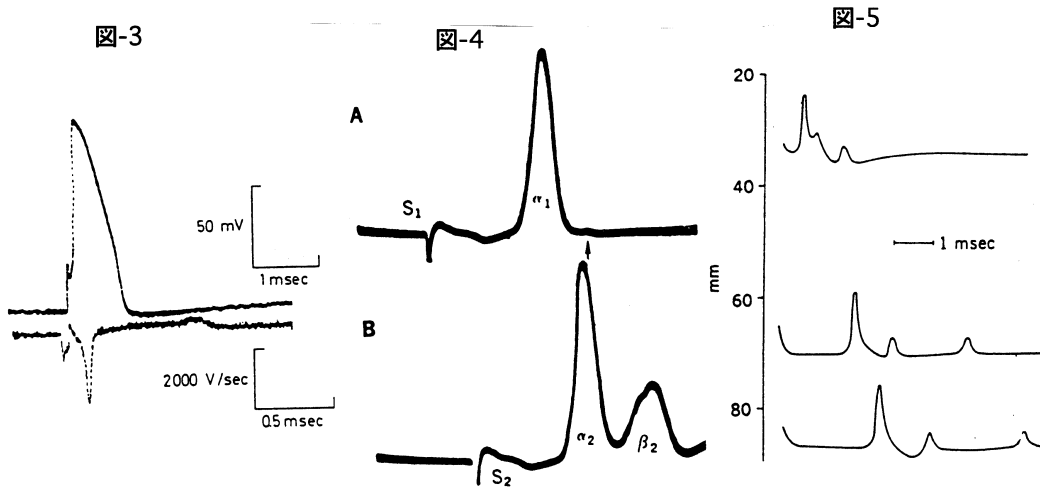
の刺激強度における利用時を時値 chronaxie という。これらの関係は $I = a + b/t$ (Weiss の式)で表される(I : 刺激電流強度、 t : 利用時)、この関係を図示すると図-2 の強さ・時間曲線となる。(図は参考書< 2 > , 図 II-3, p41 より転載)

図-2



3) 複合活動電位の成分。(実習項目3)

蛙の単一神経線維からは図-3 の様な活動電位が記録される (agar bridge 法)。(下段の記録は活動電位の微分値。図は参考書< 3 > , Fig. 5, p8 より転載) 複合活動電位は個々の神経線維においてこの様な活動電位を生じる電流が総和された結果を細胞外から電位として記録したものである。坐骨神経線維束は種々の閾値の神経線維の集合であるので、刺激強度を上げていくとまず閾値の低い神経線維から興奮する。刺激強度があがるにつれて閾値の高い神経線維も興奮するので、活動電位を発生する神経線維の数がふえ、細胞外へ流れる活動電流が増すので複合活動電位は大きくなる。単一の神経線維では活動電位の発生は「全か無の法則」に従うが、神経線維束で記録される複合活動電位は「全か無の法則」には従わない。細胞外から刺激した場合の神経線維の閾値は太い神経線維ほど低いので、刺激を与えると太い神経から興奮し、刺激強度を上げるにつれて細い神経線維が興奮する事になる。また神経線維の伝導速度は太い神経線維ほど速いので、刺激強度を上げるにつれて潜時の遅い活動電位が記録される。(図-4. A; 刺激強度が低い場合、1種類の複合活動電位の記録、B; 刺激強度をあげると別の成分 2 が生じる。)(図4 は参考書< 1 > , Fig.2-31, p79 から転載) また記録する坐骨神経の長さを長くすると図5 のように活動電位の複数の成分の分離が著明になる (活動電位の峰分かれ、図5 の縦軸は伝導距離を示す)。(図5 は参考書< 1 > , Fig.2-30, p78 より転載)



太い神経ほど活動電位の伝導速度が速い理由・太い神経ほど細胞外から刺激した場合閾値が低い理由を記述せよ。坐骨神経での伝導距離が長いほど、活動電位の峰分かれが著明になる理由を考えて記述せよ。

< 学生解答欄 >

伝導速度

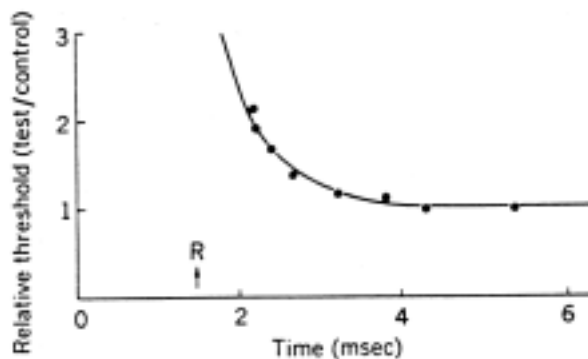
閾値

活動電位の峰分かれ

4) 活動電位の不応期に関する実験(実習項目4)

活動電位は電位依存性の Na チャンネルと K チャンネルの活性化により生じる。Na チャンネルは activation, inactivation, deactivation の 3 過程の電位依存性を示して活動電位の発生に参与する。即ち膜電位が閾膜電位 threshold depolarization を越えると activate されチャンネルは開く。この時の Na 透過性の上昇により膜電位は急速に Na の平衡電位へ上昇する。この膜電位の脱分極化の過程で Na チャンネルは inactivation の状態になり、この状態ではいかなる強い刺激を与えても Na チャンネルはイオン透過性を示さない。この Na チャンネルの activation に遅れて K チャンネルが開き膜電位は再分極する(repolarization)。活動電位の再分極相ではこの Na チャンネルの inactivation (Hodgkin-Huxley model の h 項が"0"に近づく)のため、どれだけ刺激を上げても、Na チャンネルが開かず活動電位が発生しない。この期間を絶対不応期という。この絶対不応期に続いて相対不応期があるが、相対不応期では刺激強度を上げれば活動電位は発生する。単一神経線維や神経細胞での活動電位の場合は test stimulus と conditioning stimulus の刺激間隔と test stimulus での threshold と conditioning stimulus での threshold の比をプロットして不応期を調べる(図6;図の R は絶対不応期の終了を示す)。(図6は参考書<1>, Fig.2-20, p69 より転載)この実習では神経線維束を最大上 supramaximal の刺激で興奮させ、test stimulus と conditioning stimulus の間隔を接近させていくと活動電位の振幅が低下する事を観察する事により不応期を理解する。

図 6



Na チャンネルの不活化の機構を調べる実験法と Na チャンネルの活性化と不活化の電位依存性を記述せよ。Test stimulus を複合活動電位の遅い成分も誘発する程度より強い刺激強度に、conditioning stimulus を遅い成分は誘発できない程度の弱い刺激強度にする。Test stimulus と conditioning stimulus の間隔を次第に短くしていくと、test stimulus による活動電位の波形はどうなるか? 推測される実験結果とその結果から考えられる事を記述しなさい。

< 学生解答欄 >

不活化機構を調べる実験法

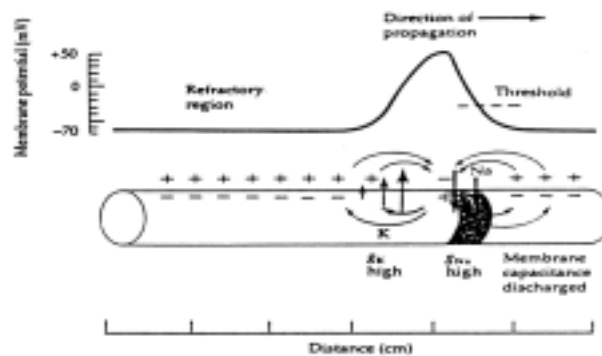
Na チャネルの活性化・不活化の電位依存性

推測される実験結果とそれからわかる事

5) 活動電位の伝導速度 (実習項目 5)

神経線維を活動電位が伝導する速度は伝達距離と刺激開始から活動電位が生じるまでの時間 (潜時 latency) とから計算される。実習では 2 本の電極間に電流を流して神経線維を刺激しているのので、この 2 本の電極のどちらで刺激効果が生じているかを把握しておかなければならない。一般に細胞外刺激を行った場合は陰極 (-) で刺激効果が生じる。(-) 極で刺激効果が生じる理由を記述せよ。また閾値下の刺激を行った時神経線維膜にはどのような反応が生じるか、講義プリント < 興奮性膜・シナプス > を参考にして記述せよ。活動電位が神経線維を伝導するためには興奮部を sink, 非興奮部を source とする local circuit が形成されなければならない (図 7 ; 興奮部では Na チャネルが開き内向き流がながれて、sink となりその隣接部で外向き流が流れて source となり、sink-source 間で local circuit が形成される。)(図 7 は参考書 < 4 > , Fig. 4, p134 より転載) この図を参考にして、神経線維では活動電位は両方向性伝導をするが、神経の信号として活動電位が伝導してきた場合には伝導方向へのみ伝導し、逆向きには伝導しない理由を記述せよ。

図 - 7



< 学生解答欄 >

陰極刺激

閾値下電気緊張性電位

伝導方向

b.用品

蛙神経標本、記録用チャンバー、Ringer 液、メモリオシロスコープ、刺激装置（アイソレーター付き）X-Y レコーダー、接続用コード、方眼紙・物差し・卓上計算機（この3点は各グループで用意すること）。

c.実験法

i)標本

蛙神経筋標本作成法を参考にして、蛙の坐骨神経をできるだけ長く、即ち第9、第10脊髄神経として脊柱を出たところから、足底部の15cmの長さのところまで取り出す。「活動電位の誘導方式図」のように、銀線電極数本を設置した記録用チャンバーの電極の上にとりだした神経線維束を電極の上に電極と十分に接触させて載せる。乾燥を防ぐために記録用チャンバーの底に Ringer 液を少量入れ、蓋をする。また実験の過程で神経線維が乾燥するのを防ぐため、神経線維束を時々 Ringer 液に浸す。

ii)刺激

記録用チャンバーの端子2本とアイソレータの出力端子を接続する。実習項目5で刺激の極性の実験を行う時以外は原則として記録電極に近い側の刺激電極が(-)極になるようにセットする。この時アイソレータからの出力の極性に注意すること。「活動電位の誘導方式図」に示すように刺激・記録に使用する機器と生体はアースで結合しているので、刺激装置から直接刺激電流を取り出して生体に流すと刺激電極部位と不関電極の間に電流が流れる事になり、限局的な刺激ができない。これを防ぐため、刺激電流はアースから浮いた状態にあるアイソレータから取り出す必要がある。

刺激強度を変えるときはアイソレータのダイヤルは一定値（5mA）に設定しておき、刺激装置本体の出力ダイヤルで刺激強度をかえる。この場合の刺激強度は $5\text{mA} \times (\text{刺激装置本体の出力ダイヤルの読み}) / 1000$ となる。

iii)記録

導出用の電極は刺激電極からかなり離れた電極を選ぶ。2本の電極を導出電極として刺激電極に近い電極端子（模式図の g, h）を増幅器（メモリオシロスコープに付随する）の入力箱の(-)端子と、刺激電極に遠い電極端子（図の h）を入力箱の(+)端子と接続する。誘発された活動電位はメモリオシロスコープを

メモリーモードで使用して管面上で波形を停止させて観察する。刺激電流が生体に流れた事を示す速い小さなビームの振れ（アーチファクト）に引き続いて活動電位が記録される。

オシロスコープの掃引速度 sweep speed（オシロスコープのビームが管面上を左から右へ移動する速さ。観察する現象の時間経過、潜時により設定する）、増幅度の設定を行う。掃引速度はオシロスコープの掃引速度のダイヤルで設定するが、例えば 5ms/div は、オシロスコープの管面のスケールの大きな区画1つが 5ms であることを示す（管面の左端から右端へビームは 50ms で移動する）。増幅度はオシロスコープの増幅器の増幅度ダイヤルで設定する。管面上で十分に現象が観察される増幅度を選択する。増幅器は入力信号との接続方式により、RC-coupling（AC 結合）、direct-coupling（DC 結合）がある。この実習では AC 結合を使用するが、この方式では信号と増幅器の間に入る、抵抗と容量の時定数により信号波形が変化する事、信号の DC 成分はキャンセルされる事に注意しなければならない。

オシロスコープの MEMORY 部の "start" と "read out" スイッチをおすと、波形が現れてから次の sweep が開始される迄の間現象が固定され、次の sweep が入るとメモリーは消える。"stop" スイッチをおした状態で、現象を観察しながら "read out" をおすと、現象は管面上で固定され、次の sweep が開始されても消えない。この状態で MODE のダイヤルを X-Y レコーダに設定して MEMORY 部の "start" スイッチをおすと、メモリーオシロスコープの管面に静止した波形を X-Y レコーダの記録紙に描く事ができる。記録紙上での描記が終了したら、必ず MEMORY 部の "stop" スイッチをおして MODE のダイヤルを CRO に戻すこと。記録紙にはオシロスコープの増幅度・掃引速度、X-Y レコーダの X-gain, Y-gain を必ず記載する事。波形の潜時・振幅はオシロスコープの管面上でスケールから読みとること。

この測定系では、それぞれの器機への trigger pulse を同期させている。 刺激装置から生体への刺激と、オシロスコープの掃引が同期している。従って刺激によって生体に生じる現象を必ずオシロスコープの管面上でとらえることができる。

- 1, trigger pulse (実習では pulse generator から取り出したパルスを使用する)によりオシロスコープの掃引 (オシロスコープの管面上を電子線が左から右へ等速度で移動する事)をかける。
- 2, オシロスコープの掃引の開始に一致してオシロスコープから出力される鋸歯状波で刺激装置に trigger をかける。この trigger によって刺激装置は刺激電流を出力する合図を受けることになる。刺激装置への trigger が矩形波でなく鋸歯状波でかけられているので、オシロスコープの掃引速度を変えてもオシロスコープの管面の一定の位置に刺激のアーチファクトを観察できる。

d. 実験

1) 実習項目 1 - 複合活動電位の細胞外誘導

- (1) 刺激電極 a, b とアイソレータの出力端子を接続する。
- (2) 刺激装置本体の持続時間を 100 μ s, train を 1、出力パルスの極性を(+)に設定する。アイソレータの出力ダイヤルを 5mA x 1 に設定する。アイソレータの出力パルスの極性を記録電極の近い側の刺激電極が(-)になるように設定する。
- (3) 刺激装置本体の出力ダイヤルを回して、刺激電流を流す。ダイヤルを回して刺激強度を上げて、次の sweep までは反応がオシロスコープに現れないので、刺激強度を上げた後の反応を確認してから、次の強度の刺激を与えるようにする。刺激が閾値に達するとアーチファクトに続いて2相性の活動電位が記録される。閾値を記載する。更に刺激強度を上げ典型的な2相性活動電位を記録紙に描記する。

閾値 _____ mA

- (4) 記録電極 g-h 間の神経線維束を糸で結び(2)と同様の記録を行い、2相性の活動電位が単相性の活動電位に変わることを確認する。図 1-A を参考にして単相性活動電位が記録される機序を記述せよ。(この実験は実習の最後に行なうのでこの観察はとばして実験 2)を行なう事)

単相性活動電位が記録される機序

2) 実習項目 2 - 強さ・時間曲線

(1) 閾値上の刺激電流で活動電位を誘発して、その振幅を記録して基準の値とする。

(基準の値とする活動電位の振幅はオシロスコープの管面上の大きなスケールの整数倍にしておくとしやすいく)

活動電位振幅 _____ mV

(2) 刺激装置の持続時間の設定を変えると誘発される活動電位の振幅が変化する事を確認する。刺激電流の強度を変えて、誘発される活動電位の振幅が基準の値になるようにする(刺激電流持続時間を長くすると活動電位の振幅は大きくなる。このとき刺激電流の強度を落として活動電位の振幅が基準の振幅値になるようにする)。この時の刺激電流の持続時間と電流値を記載する。

持続時間 _____ μ s 刺激電流値 _____ mA

持続時間 _____ μ s 刺激電流値 _____ mA

持続時間 _____ μ s 刺激電流値 _____ mA

持続時間 _____ μ s 刺激電流値 _____ mA

持続時間 _____ μ s 刺激電流値 _____ mA

持続時間 _____ μ s 刺激電流値 _____ mA

持続時間 _____ μ s 刺激電流値 _____ mA

(3) (2)の結果をグラフ上にプロットして、強さ・時間曲線を描き、基電流・時値を求めよ。(実習中は(2)の測定と平行して大まかなプロットを作る。レポートには各人が正確にプロットした結果を提出すること)

基電流 mA 時値 ms

3) 実習項目 3 - 複合活動電位の成分に関する実験

(1) 刺激電流の持続時間を 100μ s として刺激電流を上げていき、各刺激電流値によって誘発される活動電位の最も潜時の短い成分(第 1 番目の成分の活動電位)の振幅を記録する。またこの時活動電位の振幅が変化する理由を記述せよ。

刺激電流 _____ mA 振幅 _____ mV

刺激電流 _____ mA 振幅 _____ mV

刺激電流 _____ mA 振幅 _____ mV

刺激電流 _____ mA 振幅 _____ mV

振幅が変化する理由

(2) 刺激強度を更にあげてより遅い成分の活動電位を記録して、これらの遅い成分の閾値を記載する。(刺激電流の持続時間は 100μ s を使用するが、遅い成分の活動電位を誘発できない場合は刺激電流の持続時間を長くする。また遅い成分は増幅度を上げて観察する事)

第 1 の成分の閾値 電流値 _____ mA 持続時間 _____ μ s

第 2 の成分の閾値 電流値 _____ mA 持続時間 _____ μ s

第 3 の成分の閾値 電流値 _____ mA 持続時間 _____ μ s

- (3) 記録電極の位置はそのままにして、刺激電極の位置を変えて伝導距離を変化させて、複合活動電位の成分の峰分けの状態の変化を観察し、描記する。

4) 実習項目 4 - 不応期の実験

- (1) 刺激電流の持続時間を $100\ \mu\text{s}$ として刺激電流を複合活動電位の第 1 の成分を誘発する最大上 supramaximal のレベルに設定する。
- (2) 刺激装置本体の設定を train 2 にする。この状態で刺激電流を流すと、2 発の刺激に誘発される活動電位が記録される。先行する刺激が conditioning stimulus, 後の刺激が test stimulus となる。
- (3) 刺激装置本体の interval を変えて(最初は 8ms にする)、test stimulus によって誘発される活動電位の振幅の変化を記載し、誘発される活動電位の波形を描記する。

interval _____ ms 振幅 _____ mV

interval _____ ms 振幅 _____ mV

interval _____ ms 振幅 _____ mV

interval _____ ms 振幅 _____ mV

interval _____ ms 振幅 _____ mV

interval _____ ms 振幅 _____ mV

この結果をグラフにしてそのグラフ上に相対不応期、絶対不応期をマークせよ。

5) 実習項目 5 - 伝導速度

- (1) 刺激電極を記録電極に近い側が(-)になるように接続する。刺激電流持続時間を $100\ \mu\text{s}$ で刺激して第 1 の成分、第 2 の成分の複合活動電位を誘発して、それぞれの潜時を測定する。(第 1 の成分の潜時はオシロスコープの掃引速度(sweep 速度)をできるだけ速くして、活動電位の立ち上がりのみが管面上に現れるようにして測定する。また増幅度も上げて可能な限り正確に測定する事)

第 1 の成分の潜時 _____ ms

第 2 の成分の潜時 _____ ms

- (2) 刺激電極を記録電極に接近させる。(1)と同様の測定を行う。

第 1 の成分の潜時 _____ ms

第 2 の成分の潜時 _____ ms

- (3) (1), (2)それぞれの場合において、刺激電流が神経線維に興奮を引き起こす電極<(-)極>を確定する。確定した刺激部位間の距離を測定する。この刺激部位間の距離と(1),(2)で測定された潜時の差より第 1 の成分・第 2 の成分の伝導速度を計算せよ。またその結果よりこれらの成分の活動電位が伝導する神経線維の種類を記述せよ。

第 1 の成分の伝導速度

第 2 の成分の伝導速度

- (4) 刺激電極のうち。記録電極に近い方が b が(-)になるようにして第 1 の成分の活動電位を誘発してその潜時を測定する。次に刺激電極のうち。記録電極に遠い方が(-)になるようにして第 1 の成分の活動電位を誘発してその潜時を測定して比較する。

(-)が近い場合 _____ ms

(-)が遠い場合 _____ ms

a.目的 5)の予習問題 <陰極刺激> <閾値下電気緊張電位性電位>の解答を参考にして、刺激電極のうち記録電極に遠い方が(-)の場合に誘発される活動電位の潜時が長くなる理由を記述せよ。

(5)(4)の結果を踏まえて、伝導速度を算出するために、(3)のような方法をとらなければならない理由を記述せよ。

e. 資料

Table 1. Electrical characteristics of a frog's myelinated fiber

| | |
|---|--|
| Fiber diameter | 14 μm |
| Thickness of myelin | 2 μm |
| Distance between nodes | 2 mm |
| Area of nodal membrane (assumed) | 22 μm^2 |
| Resistance per unit length of axis cylinder | 140 $\text{M}\Omega/\text{cm}$ |
| Specific resistance of axoplasm | 110 $\Omega \text{ cm}$ |
| Capacity per unit length of myelin sheath | 10-16 pF/cm |
| Capacity per unit area of myelin sheath | 0.0025-0.005 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ |
| Dielectric constant of myelin sheath | 5-10 |
| Resistance X unit area of myelin sheath | 0.1-0.16 $\text{M}\Omega \text{ cm}^2$ |
| Specific resistance of myelin sheath | 500-800 $\text{M}\Omega \text{ cm}$ |
| Capacity of node | 0.6-1.5 pF |
| Capacity per unit area of nodal membrane | 3-7 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ |
| Resistance of resting node | 40-80 $\text{M}\Omega$ |
| Resistance of unit area of nodal membrane | 10-20 $\Omega \text{ cm}^2$ |
| Action potential | 116 mV |
| Resting potential | 71 mV |
| Peak inward current density | 20 mA/cm^2 |
| Conduction velocity | 23 m/s |

From Table 4 of HODGKIN (1964) after data assembled by STÄMPFLI (1952) and TABAKI (1955).

5) 蛙神経線維の伝導速度と太さ

(参考書<5>TABLE LXXIV, p1075より転載)

TABLE LXXIV
Classification of Frog Fibres According to Fibre Diameter and Conduction Velocity.

| | Elevation | Fibre Diameter | Velocity |
|--|-----------|----------------|-----------------|
| A $\left\{ \begin{array}{l} \alpha \\ \beta \\ \gamma \end{array} \right.$ | | 18.5 μ | 42 m./sec. |
| | | 14.0 μ | 25 m./sec. |
| | | 11.0 μ | 17 m./sec. |
| B | | — | 4.2 m./sec. |
| C | | 2.5 μ | 0.4-0.5 m./sec. |

f. 参考書

- < 1 > "Medical Physiology" vol. 1. edited by V. B. Mountcastle 1980 (14th edition), Mosby
- < 2 > 「現代の生理学」古河太郎、本田良行編 1982 金原出版
- < 3 > "Frog Neurobiology" edited by R. Llinas & W. Precht, Springer-Verlag
- < 4 > "From Neuron to Brain" by J. G. Nicholls, A. R. Martin and B. G. Wallace 1992 (3rd edition), Sinauer
- < 5 > "A textbook of General Physiology" vol. 2. edited by H. Davson, 1979 (4th edition), J. & A. Churchill

活動電位の誘導方式図

