

17. 神経伝導速度(カエル坐骨神経)

1. 目的

神経軸索を活動電位が伝導する際の電圧変化を記録し、神経線維の電気的な性質、活動電位の伝導の仕組みについて理解する。

2. 準備

動物材料: ウシガエル

器具など: ハサミ(大、眼科用小)、ピンセット(大、小)、木綿糸(#40)、柄付針、シャーレ、リンゲル液、三角コルベン、ピペット、トレー、神経標本刺激記録箱、刺激電極用ケーブル。記録電極用ケーブル、半田ごて、Power lab、パソコン、記録表(教卓にあるので足りなくなったら取りに来ること)

リンゲル液の組成(事前に教員が調整する。)

NaCl: 6.50g/ℓ (111.23mM), KCl: 0.14g/ℓ (1.88mM), CaCl₂: 0.12g/ℓ (1.08mM),
NaHCO₃: 0.20g/ℓ (2.387mM)

3. 標本の作製

別冊のカエルの神経筋標本の作成方法を参照。教員の作成方法のデモンストレーションを良く見ること。



図17-1. コネクタの名称。左からバナナコネクタ、ミノムシクリップ、BNC-バナナ変換アダプタ、DIN8P コネクタ

4. 配線と操作:

- 1) グループ内で標本作製に関わらない者が、以下の配線を含めた設定を行う。
- 2) PowerLab.本体とパソコンをUSBコードでつなぎ、PowerLabの電源の入っていることを確認して、デスクトップの設定ファイル「カエル坐骨神経刺激」をダブルクリックしてアプリケーションを立ち上げる。

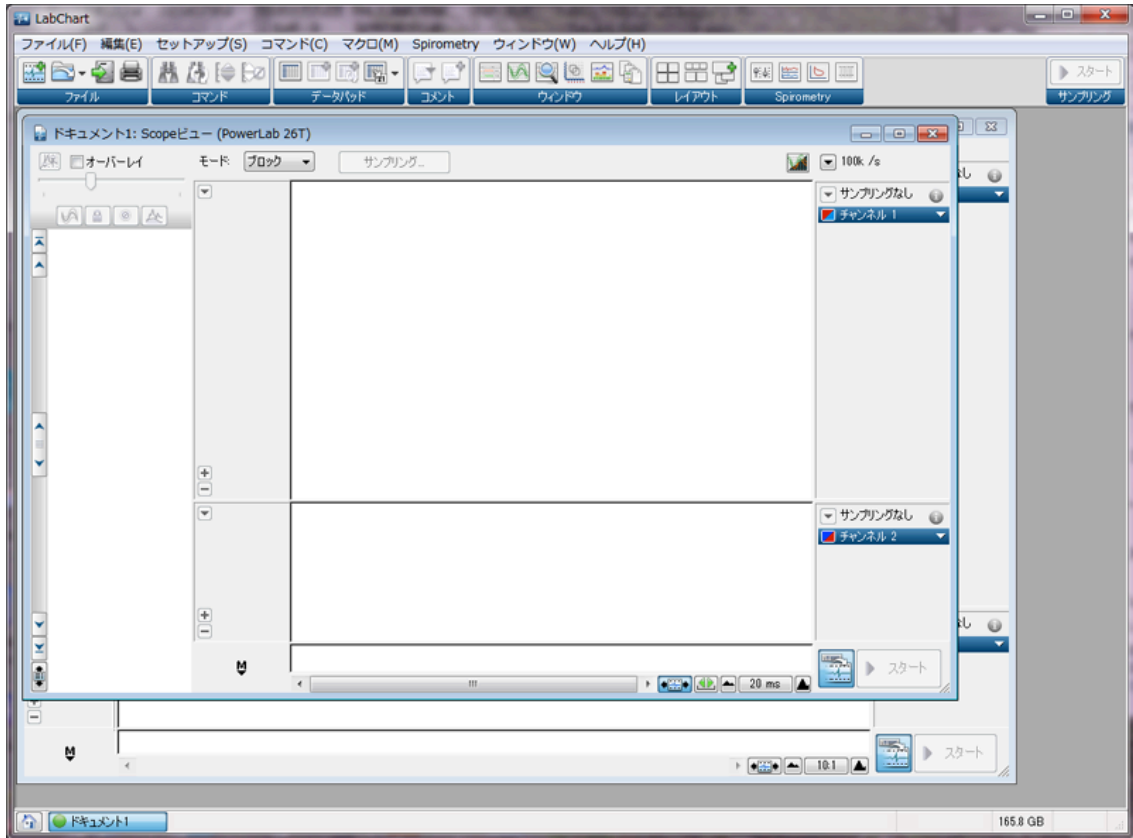


図17-2. 起動画面

メニューのウィンドウから Scope ビューを開く。

メニューのセットアップからスティムレータを開く。名前の欄は「ユーザ坐骨神経刺激」を選択し、このウィンドウを閉じる。

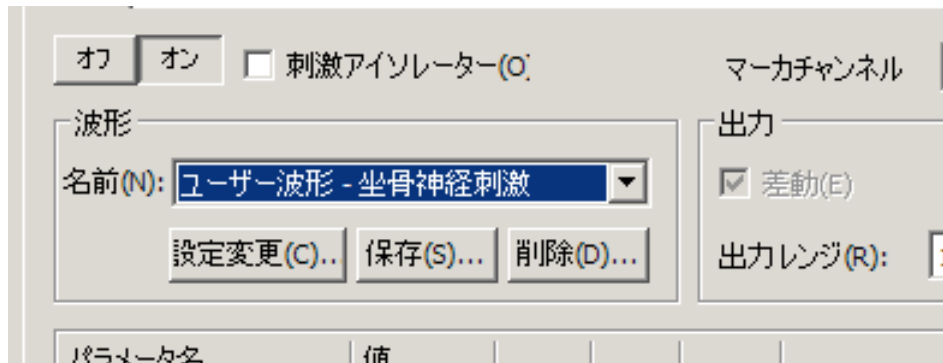


図17-3. スティムレータ ウィンドウ

メニューのセットアップからスティムレータ・パネルを開く。

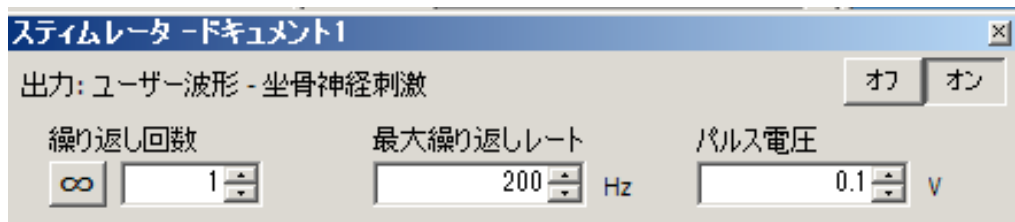


図17-4. スティムレータ ウィンドウ

スティムレータ・ドキュメントのウィンドウで刺激のパラメータ(繰り返し回数、最大繰り返しレート、パルス電圧)を設定する。このウィンドウは閉じることなく常に表示しておく。右側へ寄せておく。

- 繰り返し回数: 刺激パルスの数。初期値は1
 - 最大繰り返しレート: 刺激パルス数が2以上の場合、そのパルスの頻度。初期値 200 Hz(パルス間隔が 5 ms)。頻度と間隔は逆数の関係にあることに注意。すなわち 200 Hz と設定したらパルスの間隔は 5 ms になる
 - パルス電圧: 刺激電圧のこと。初期値 0.1V。最大 5V。0.01V ステップで変更できる(最大の5Vで刺激しても最大反応にならない場合教員に連絡する)。
- 刺激パルスの幅は 0.2 ms(200 μ 秒)に固定されている。

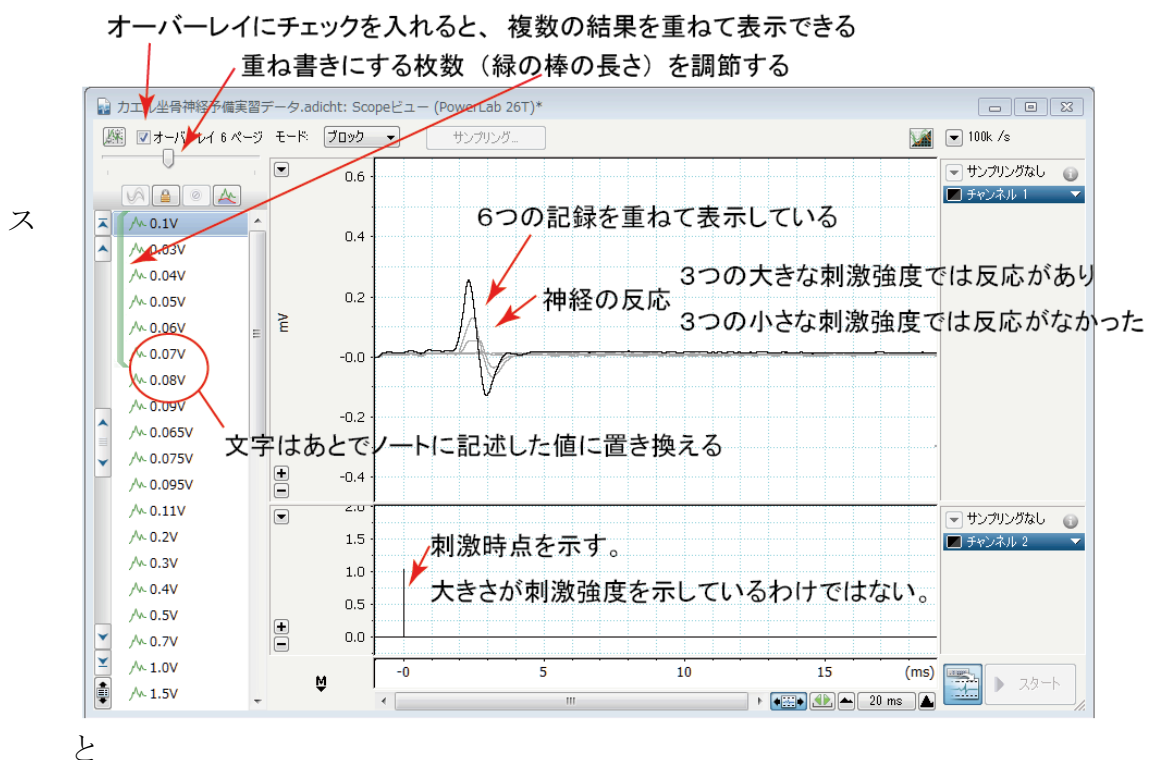


図17-5. 記録例

上のチャンネル1に反応が、下のチャンネル2では 0 ms のところにマークが出現する。このマークが刺激時点である。大きさは刺激の大きさを反映していないことに注意する。スタートをクリックするたびに左の欄にページ1、ページ2...と記録されていく。各ページの刺激のパラメータ(刺激電圧の大きさ等)を実習ノートに記録しておく。

レポートを書くときに図が必要になったら、記録ファイル複製し、複製した記録から不必要な結果を削除して、レポート用の図を作る。オリジナルのデータを削除しないようにすること。実習ノートと対応がつくように、ファイル名、ページ名をきちんと記録すること。

- 3) PowerLab 前面の Analog output connectors に BNC-バナナ変換アダプタを接続する。+ に赤いアダプタを-に黒いアダプタを接続する。赤いアダプタに赤のバナ

ナコネクタを刺す。黒いアダプタに黒バナナコネクタを刺す。反対側の赤のミノムシクリップの先端で、刺激箱の電極間隔の狭い(5 mm)方の刺激電極をくわえる。黒のミノムシクリップは記録側に近い方の銀線を挟む。神経標本ができ、刺激箱に置いたときにくわえる位置は変更するが、とりあえず配線だけを行っておく。(図17-6参照)。

- 4) PowerLab のチャンネル1に DIN コネクタのある3芯のケーブルに接続し、3本のリード線のみの虫クリップの先端で刺激箱の電極(銀線)を加える。赤は陽極で、記録電極となる2本の電極のうち、刺激電極から遠い方に、黒は陰極で、刺激電極に近い方の電極に接続する。緑のアースとなる緑のミノムシクリップの先端で刺激電極と記録電極の間の電極をくわえる(図17-6参照)。
- 5) 以下の実験1から実験1~4を良く読み、どこを変更して記録を取るか練習してみる。

例えば実験1は、スティムレータ・ドキュメント1のウィンドウで示されている刺激パラメータのどこを変更するのか、実験4はどこを変更するのかをあらかじめ変更してみる。

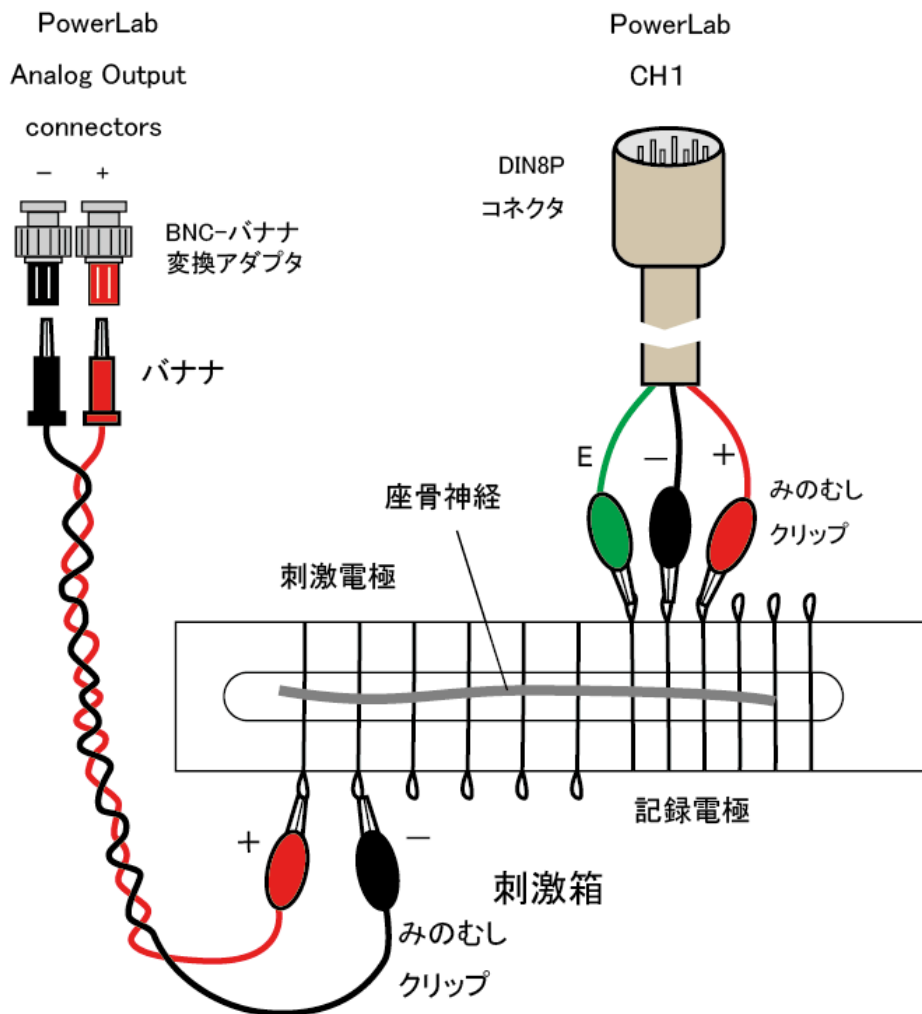


図 17-6. 配線図

5) 神経標本の配置

別紙マニュアルにしたがってウシガエルから坐骨神経をとりだす。

神経標本刺激記録箱に取り出した坐骨神経を置き、下にはリンゲル液を電極に振れない程度に注ぎ蓋をして乾燥を防ぐ。電極間隔の狭い(5 mm 間隔)方に坐骨神経の中枢端を、電極間隔の広い(10 mm)の方が末梢端になるように、置く。蓋を被せ乾燥を防ぐ。神経の配置は、刺激電極と記録電極の距離が大きいほどきれいなデータとなる(アーティファクトと反応が時間的に分離できる)。したがって、最初になるべく刺激電極と記録電極の距離は大きくする。しかし、糸で縛った部分の神経は手術の際に壊してしまった可能性があるから、強く刺激しても反応がない場合がある。通常 xx V 程度の刺激強度で反応が得られる。もし反応が出ない場合は刺激電極と記録電極の距離を小さくする。両端を結紮した糸が下の液体に振れないようにする。糸はピンセットでつまめる最低の長さに切っておくこと。

5. 実験1: 閾値と最大刺激強度

1) 刺激電圧を 0.1 V で刺激してみる。標本がうまく出来ていれば反応が生じる。反応が生じない電圧から次第に大きくしながら活動電位の発生と波形変化を観察する。横軸である時間軸は立ち上げた設定ファイルのままでもいいかもしれないが、適宜、調節する。

2) 画面の縦軸は電圧である。上のチャンネル(CH1)に反応が、下のチャンネル(CH2)に刺激時点のマークが表示される。刺激を大きくしたとき、上のチャンネルの記録が上あるいは下にふりきれないように増幅度(画面右の操作パネルで調節できる)を設定する。左の電圧の軸(縦軸)にある+、-の四角をクリックすると表示が大きく/小さくできる。最大反応が記録できるように上のチャンネルの増幅度を設定する。一連の記録ではこの増幅度を変えない。下のチャンネルは刺激時点のマークが記録される。増幅度を変えない。このパルスの大きさは刺激の大きさではない。

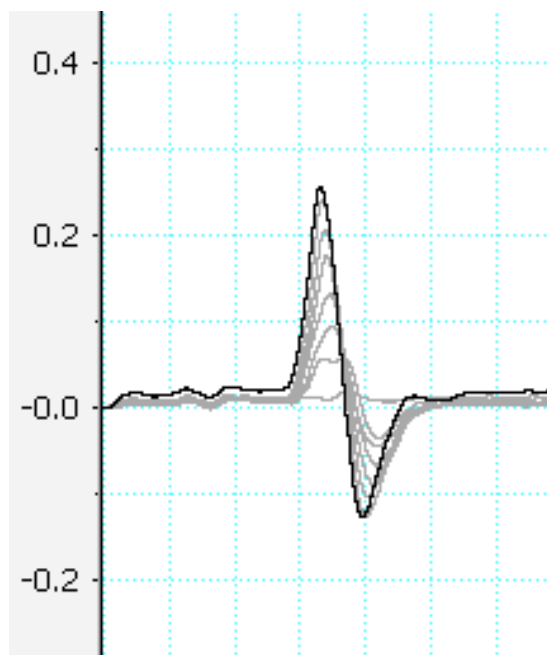


図 17-7. 刺激強度を変えた例

各ページ毎に何 V で刺激したかを、実習ノートに記録しておく。この例は

異なる刺激強度の結果を重ねて表示したものである。

3) 刺激強度を反応が出ない強度(電圧)から徐々に上げて、活動電位の発生を観察する。活動電位が発生する閾値(刺激の大きさ)を調べる。更に刺激の強さを段階的に上げていき、活動電位の変化を観察し、活動電位の大きさが変わらなくなる刺激の大きさを(最大刺激強度)を計測する。活動電位に複数のピークがある場合、

最初のピークについてのみ観察する。閾値～最大刺激強度間の3点以上刺激の大きさを変えた記録をとる。閾値以下の刺激強度の記録も3点取る。最大刺激強度以上の刺激強度の記録も3点以上記録する。つまり3+閾値+3+最大刺激強度+3=11種類以上の刺激強度が異なるときの反応の大きさを計測する。このデータを基に刺激強度-反応曲線(グラフ)を作成する。

- 4) 反応の最初のピークが出現する刺激の強度からさらに刺激強度を大きくし、複数のピークが出現することを観察、記録する。複数のピークが出現する。最初のピークについては3)で閾値と最大反応強度を測定したが、ほかのピークについても閾値と最大反応を生じる刺激強度を記録する。すべてのピークが出ている記録をレポートに掲載し、それぞれのピークの閾値、最大反応刺激強度を記載する。

右の例は図17-7の例よりさらに刺激強度を大きくして記録した複数例を重ねて表示している。

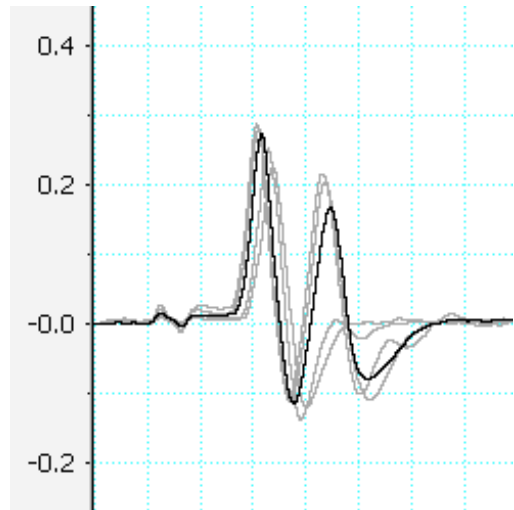


図 17-8. 刺激強度をさらに大きくした例

6. 実験2:伝導速度の測定

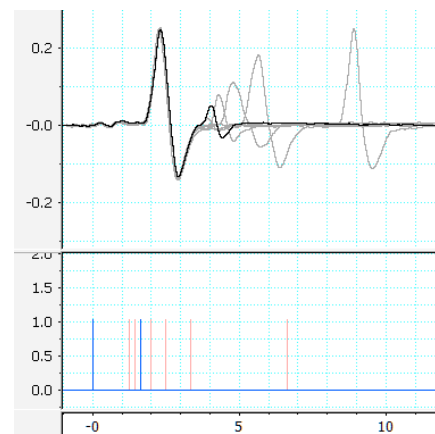
- 1) 刺激強度を最初のピークに対する最大刺激で活動電位を3回記録する。
- 2) 刺激電極の位置を記録電極側に近い位置に移動し、同じ大きさの刺激を与えて活動電位を発生させ3回記録する。あくまでも刺激電極の陽極(赤)と陰極(黒)の位置関係は陰極が記録側になるようにする。
- 3) 刺激電極の陰極と記録電極の陰極間の距離をそれぞれ測定しそれぞれの活動電位の立ち上がりの潜時の差から、神経伝導速度を算出する(前回の実習の尺骨神経の伝導速度と同じ方法である)。電極の間隔は広い方が 10 mm 狭い方が 5 mm である。
- 4) 6-3)で得られた伝導速度と、6-1)の結果で得られた反応潜時と刺激電極の陰極と記録電極間の距離から伝導速度を計算し比較する。

7. 実験3:電極の位置の反転

- 1) 刺激電極の位置を元にもどす(記録電極からもっとも離れた位置)にもどし、最初のピークの最大刺激強度で3回記録する(コントロール)。
- 2) 刺激強度を変えず、刺激電極の陽極と陰極の位置を逆転し3回記録する。
- 3) 刺激強度を変え、閾値を測定する。

8. 実験4:不応期の測定

刺激電極を元にもどす。刺激強度は最初のピークに対する最大刺激強度、繰り返し回数を2にする。刺激頻度を 100 Hz にする。100 Hz とはこの2つの刺激パルスの間隔が $1/100 = 0.01 \text{ s} = 10 \text{ ms}$ である。頻度と間隔は逆数の関係にある。2発目の刺激に対して1発目の刺激の反応と同じ程度



の大きさの反応が出現する。刺激パルス間隔を刺激頻度を変えることによって短くし、2発目の刺激に対する反応の大きさの変化を記録する。1発目

図 17-9. 2発刺激の例

の刺激による反応と2発目の刺激による反応が重なって見にくいときは、反応の大きさをピークの大きさとする。2発の刺激パルスを与えたとき、2発目の刺激に反応しない刺激パルス間隔を求める。この間隔が絶対不応期である。不応期より少し大きな間隔だと反応は小さい。この期間を相対不応期という。2つの刺激パルス間隔を変化させて絶対不応期と相対不応期を求める。

9. 実験5: 細胞外記録による二相性活動電位の確認

- 1) 最大刺激で刺激して反応を3回記録する(コントロール)。
- 2) 2本の記録電極の刺激電極から遠い方の電極(陽極)に熱した半田ごてを1分間当てる。半田ごてを神経に接触させては行けない。半田ごてに神経がくっついてしまうからである。刺激強度を変えず、半田ごてで熱を加えたあとの反応を3回記録する。余り変化がないようだったらさらに30秒半田ごてを記録電極に接触させ、記録する。

右図のようにプラスマイナス両方にピークがあるような波形を二相性といい、プラスだけ、あるいはマイナスだけに振れるような波形を单相性という。

半田ごてを当てて熱で神経軸索のタンパク質を変性させると波形がどのような変化を示すかを記載し、その理由を考える。

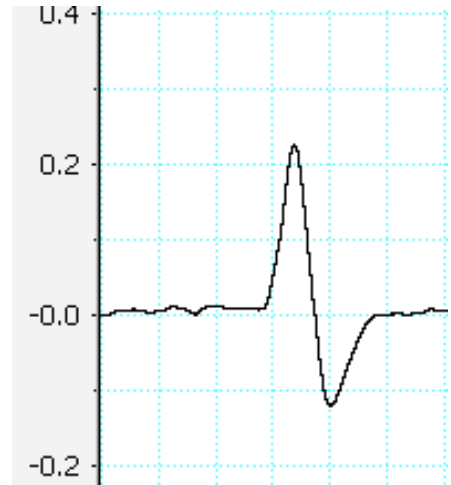


図 17-10. 二相性の波形

10. 結果

- 1) 最初のピークについて最大刺激時の反応を結果に図で示しなさい。刺激強度を横軸に反応の大きさを縦軸にした刺激強度-反応曲線(グラフ)を結果に描きなさい。閾値、最大反応がどこで生じたかも記入しなさい。
- 2) 伝導速度の計測に使った図とその計算結果を示しなさい。
- 3) 刺激電極の陽極、陰極を入れ替えたときの反応の差異を結果に図(コントロールを入れ替えた図)とともに記載しなさい。閾値に変化があったかについても記述しなさい。
- 4) 絶対不応期、相対不応期を示す図を示し、それぞれの値を明記しなさい。
- 5) 2本の記録電極の刺激電極から遠い方を熱しあと、反応が変化したと思われる、どのような変化が生じたかを結果に図(加熱前と加熱後)とともに記述しなさい。

10. 考察

- 1) 神経軸索の活動電位は All or None であると授業で習った。それなのに、今回の実験では、なぜ刺激強度を上げると活動電位の大きさが変わるか考察しなさい。
- 2) 刺激強度を変えると何故複数のピークが出現したか考察しなさい。
- 3) 前回の尺骨神経の伝導速度の計測では2カ所の刺激部位の距離の違いから伝導速度を計測した。その理由は反応として筋電図を用いたからである。尺骨神経刺激同様に2カ所の刺激の違いから得られた神経伝導速度と、1カ所の刺激から推定される伝導速度の違いがあるかどうか検討しなさい。違いの有無について考察しなさい。
- 4) 刺激電極の極性を入れ替えたときの反応に差異が出た理由を考察しなさい。
- 5) 何故不応期が見られるのか考察しなさい。
- 6) 半田ごてで1本の記録電極を加熱したあと反応が変化した理由を考察しなさい。