

ラットの坐骨神経と下肢骨格筋を用いた容積導体と神経—骨格筋間の信号伝達機構を学ぶ実習

東京女子医科大学医学部第二生理学教室 末廣 勇司, 榎 建二郎, 吉名佐和子,
堀 沙耶香, 出嶋 克史, 岩田 悟, 三谷 昌平

I 目 的

これまで神経生理学実習として、ウシガエルの坐骨神経を摘出し、神経幹表面で活動電位を細胞外記録する実習[1]がよく行われて来た。しかし、近年ではウシガエルの入手が難しくなっていることや、医学部の学生を対象とした実習として、心電図や筋電図などの医療現場で実際に利用されている電気生理学的検査について理解を深められるように、容積導体を介した活動電位の記録により重点を置いた実習を行いたいと考え、ラットを用いた新規実習を開発した。

具体的には医学部の学部1年生を対象に、ラットの坐骨神経を電気刺激して神経—骨格筋間の信号伝達の結果生じた筋活動電位を、ラットの体組織、および電解液という容積導体を介して体表や体外で記録させる実験項目を考案した。これにより、筋細胞外に発生した電位分布が広がっていく様子を実際に観察させ、容積導体を介した電位記録手法の理解を促した。加えて、筋弛緩薬を注射しその効果を体感させる実験項目を加えることで、薬の作用機序をもとに神経—骨格筋間の信号伝達機構についても学習を促した。

II 準 備

6週齢の雄ラット(Wistar-Imamichi系統)の腹腔内に100mg/Kgディブリン注射液(アストラゼネカ)を注射して深麻酔の状態におく。この注射は教員が行うことにしている。ただし、本方法による麻酔効果には個体差があり、ラットの状態に応じておよそ1.5倍の追加投与が必要な場合が

あった。麻酔の鎮痛効果については、以後の実験で実際に切開処理を行う脚部に対して機械刺激を与え、足の屈曲や動きを伴う応答が消失するのを確認した。この際呼吸抑制は見られなかった。麻酔効果の確認されたラットを腹臥位で寝かせて右大腿部の皮膚と筋を切開し[2]、坐骨神経を露出させた。神経の走行がはっきり確認できたら、坐骨神経の周囲にある結合組織をピンセットで剥離し、先端が鉤状になった刺激電極を坐骨神経の下にくぐらせるように通して固定した(図1A)。以上の手技は、ラットを初めて扱う学生でも15-20分ほどで完了することができた。また、初めに腰部に近い部位を切開することで、もし学生が誤って坐骨神経を切断しても末梢側を再切開することで代替が効き、それでも失敗した場合には左下肢を使用することもできるため、ラットの使用数を最小限にすることができる。なお、露出させた神経が乾かないようにするため、および後述の容積導体の実験用に(III-B, C)、ラットリンガー液(135mM NaCl, 5.4mM KCl, 1mM MgCl₂, 1.8mM CaCl₂, 5mM HEPES)を使用した[3]。

神経を露出させたラットは、木製の台の上に腹臥位で静置し、坐骨神経に刺激電極を触れさせたまま、記録電極の位置を変えて以後のデータを収集した(図1B)。神経への電気刺激の印加、および電氣的活動の記録にはPowerLab 26T(ADInstruments)とノートPCを用いた。刺激・記録いずれも先端がワニ口クリップになったケーブルを用いており、刺激電極側のクリップには先端を鉤針状に折り曲げた針電極を挟んで、上述のように神経

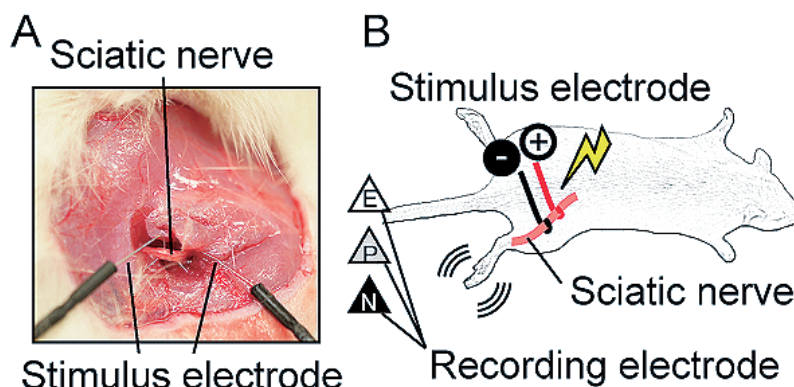


図1. (A) ラットの坐骨神経刺激部位の拡大図. (B) 記録電極の (+) 端を, (−) 端を N, グラウンド用の電極を E とする.

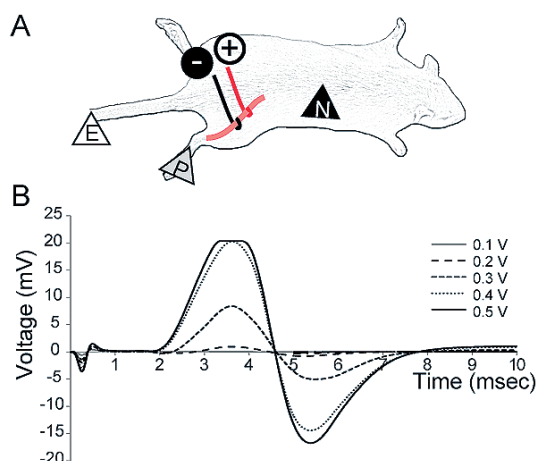


図2. (A) 実験の模式図. 記録電極の (+) 端をラット下肢踵部, (−) 端を背中に設置して電気刺激を加えた. (B) 得られた電位変化の図. 坐骨神経周辺の結合組織を除くと 0.2~0.3V の電気刺激時に明瞭な二相性波形が得られる.

線維への電圧印加に使用した. 刺激強度は 0.1~0.5V の範囲で, 0.1msec の持続時間をもつ単発の矩形パルスとして与えた.

なお本学のカリキュラム上, 学生は本実習を行う以前に一度ラットの解剖処理を行っており, 動物実験に関してすでに学習経験があることを前提としている. またその際に動物実験の必要性, および (1) 動物以外を利用する代替法の可能性 (Replacement), (2) 使用動物数を必要最小限とする

(Reduction), (3) 実験方法の洗練による動物の苦痛軽減 (Refinement) という 3R の原則に基づき, どのような姿勢で動物実験を伴う実習に取り組むべきか, といった動物倫理についても教育しており, 本実習の開始時にも同様の説明を再度行っている.

III 実験

以後の全ての実験で, グラウンド電極はラットの尾にとりつけている.

III-A 体表面での筋活動電位の記録

最初に記録電極の (−) 端を背中に, (+) 端を刺激する神経と同側の下肢踵部にクリップを挟んでとりつけた (図 2A). この状態で 0.2~0.3V の刺激を坐骨神経に印加することで, ラットの下肢が動く様子と, 筋活動電位由来の二相性の電位波形を学生に観察させることができた (図 2B). 観察される電位変化は坐骨神経の周辺に残留した結合組織が多い場合に弱くなるが, 神経が切断していなければ最大 0.4~0.5V の電圧によって, 上記の下肢の動きと電位波形を得ることができる. 私達の実習では多くの場合, 刺激電圧を 0.5V にするとバイオアンプを用いた PowerLab の記録上限である 20mV に達したので (図 2B), 通常はこれより低い電圧で刺激をすれば十分である.

III-B 容積導体中を伝導した筋活動電位の記録

次に, リンガー液で湿らせたろ紙を用意し, ろ

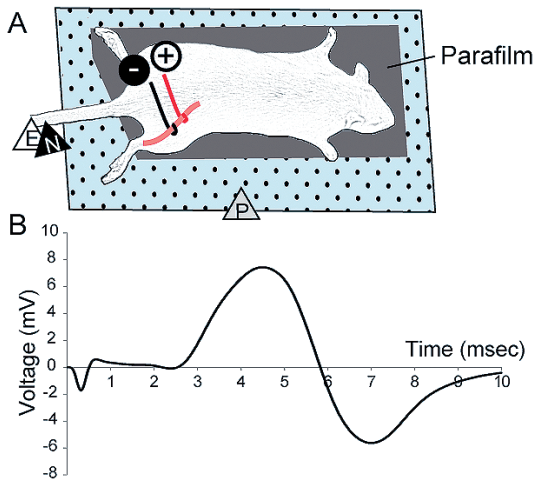


図3. (A) 実験の模式図. 記録電極の(+) 端をろ紙に、(-) 端を尾に設置して電気刺激を加えた. (B) 得られた電位変化. 図2Bで得られたのと同じ二相性波形になる.

紙の一部にパラフィルムを敷いて、その上にラットを静置させた。ろ紙の下には2.54mm 間隔のユニバーサル基板を置いて、記録電極の(+) 端クリップの先にピン端子を挟み、下肢から離れた場所でもろ紙の上から基板へ刺して、電位を記録した(図3A)。このとき、パラフィルムはラットの体とろ紙との直接接触を妨害するように置き、刺激する神経と同側の下肢のみがろ紙と接触するようにしておいた。初めは単極での記録をとるために、記録電極の(-) 端はグラウンドと同じ尾に取り付けた。その結果 III-A で計測した際の波形と同様の二相性波形が得られる(図3B)。これにより目に見えない電位分布が下肢表面からリンガー液中を広がり、ラットの身体から離れた場所でも同様に計測できることを体感させることができた。

とくに高校で生物を選択した学生にとっては、電解質を含む水中を電気が伝わることは理解していても、電位の時間変化のパターンそのものが水中を伝わるイメージを持ちにくいように思われる。本実習のように、生体上でも生体外でも同じように電位波形が記録されることを実際に目にする事で、私達の身体もリンガー液同様に容積導体になっており、心臓や筋、脳内の神経で起きた

電気的興奮を体表面で計測する電気生理学的検査の原理の理解を促すと期待される。

III-C 双極誘導による筋活動電位の記録

次にろ紙上に形成された電位分布を視覚的に理解させるために、記録電極の(-) 端をろ紙上において(図4A)、(+) 端を頭部、胸部、脛部、足関節、爪先、足底、かかと、尾、反対側の脚部付近のろ紙に順にセットしていき、計9点での電位波形を測定してもらった(図4B)。このとき両電極とラットの足の位置関係は、ろ紙の下に敷いた基板のホールの数をもとにして相対的な座標位置として記録することができる。記録(+) 端が(-) 端に比べて収縮を起こす下肢に近いと III-B で見た二相の波形と同様の波形が記録されるが、記録(-) 端と近づくと振幅は小さくなっていく。逆に、(+) 端を(-) 端に比べて下肢から遠い位置におくと、III-B で見た二相の波形が反転したような形が現れる。この結果をもとに、2つの電極で記録した波形が電極間の差分であることを理解させた(図4C)。さらに、各点で測定した電位のピーク値と電極の位置から、ろ紙と足の筋の接触点周辺の電位の高低差を等電位線として紙に記載してもらうことで、電位分布を視覚化させた。

以上の結果から得られた波形と電位分布図をもとに、坐骨神経刺激時に足の骨格筋周辺で生じている電位分布が、興奮部付近で絶対値が最大となる広がりを持ち、最初に興奮が伝わって来るときには正、次いで負の電位が広がっているものであることを学生に考察させた。そして、筋の興奮—未興奮部の境界に電気双極子様の構造が発生し、その周辺に正負反転した電位分布が形成されること、およびこの電位分布が興奮部位の広がりとともに移動していくことで、最初に正、次いで負の二相性の波形が生じることを図示しながら理解させた(図4D)。これにより、神経や筋の興奮部と未興奮部を境に、細胞外で負—正の電位分布が形成され、それを順に計測することで典型的な筋電図の二相性波形が記録される原理[4]を学習させることができた。

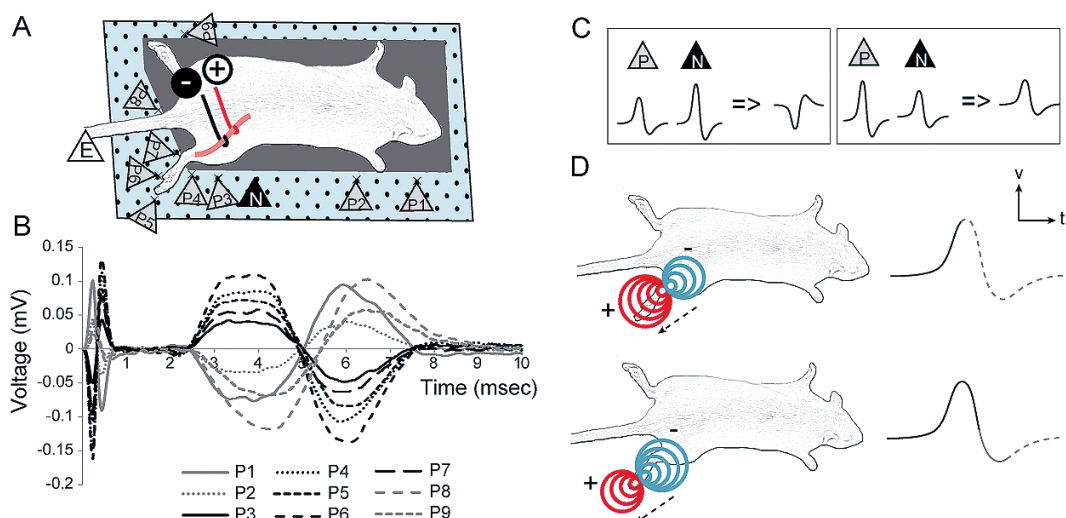


図4. (A) 実験の模式図. 記録電極の(−)端をろ紙上においた. (B) 記録電極(+)端を後述の9部位に順に設置し、それぞれの点で得られた電位変化の図. (C) 記録電極間で記録した電位差により生じる波形の模式図. (D) 筋興奮部周辺に発生する電位分布と二相性波形の関係の模式図. (+) 端は、P1: 頭部, P2: 胸部, P3: 脛部, P4: 足関節, P5: 足指, P6: 足底部, P7: 踵部, P8: 尾部, P9: 反対側の下肢付近に設置した.

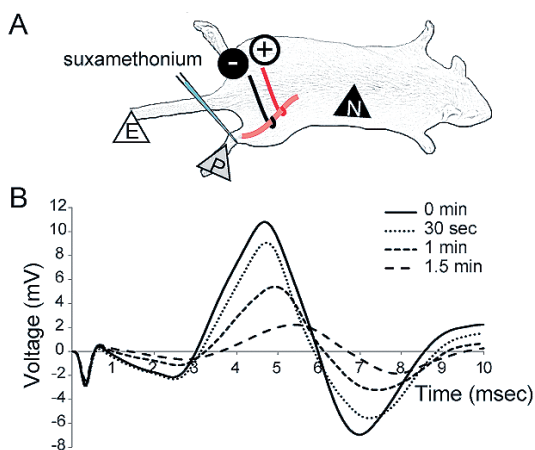


図5. (A) 実験の模式図. 図2Aと同じように電極を配し、スキサメトニウムを下肢に注射する. (B) 注射後の電位波形の変化.

III-D 臨床用医療薬を用いた骨格筋で信号伝達機構の理解

最後に、記録電極をろ紙から外して III-A と同じように記録電極の(+)端を踵部、(−)端を背に取り付けた. その後 10mg/ml スキサメトニウ

ム塩化物(丸石製薬)を 0.1ml 腓腹筋周辺に筋肉注射し(図 5A), 30 秒間隔ごとに学生に坐骨神経を刺激してもらって、電位波形と足の動きがいずれも弱まる、ないしは消失することを確認してもらった(図 5B). 次に、50mM カフェインを 0.1~0.2ml 下肢へと注射し、学生に無処理の反対側の足の筋と比較させることで、スキサメトニウムによって一度動かなくなった足の筋がカフェインによる拘縮を示すことを確認した.

この結果をもとに、まずは学生にスキサメトニウムによる神経筋遮断薬の作用機序 [5] を調べてもらい、神経—骨格筋間の情報伝達機構の理解を促した. さらに、本実習で用いたスキサメトニウムが悪性高熱症という症状を引き起こすリスクを持つこと、そしてスキサメトニウムとは異なり、骨格筋に直接作用する筋弛緩剤であるダントリウムによって悪性高熱症が治療可能であるという情報を学生に提示した. その上で、本実習でスキサメトニウムの代わりに下肢の骨格筋でダントリウムが作用した場合に足の動きと電位波形がどのようになると予想されるか、という考察を課した.

結果、学生達はダントリウムがリアノジン受容体を介した筋小胞体からの Ca^{2+} の放出に関わることを調べ [6]、ダントリウムによって電気的興奮と筋収縮が連関しなくなる可能性に思い至ることができた。同時に、カフェインがリアノジン受容体からの Ca^{2+} の放出を促すことも調べ、カフェインの注射によって一度筋弛緩剤を作用させた足の骨格筋が拘縮した理由についても納得させることができた。

IV おわりに

以上より、ラットの坐骨神経と下肢の骨格筋を用いて、体内で発生した電気的興奮がどのように体表面で計測されるのか、という容積導体の考えを理解してもらえる実習が開発できた。加えて記録電極の位置や、単極・双極誘導での測定について説明しながら実習を進めることで、筋電図や心電図、脳波といった電気生理学的な検査手法の原

理の理解を促し、得られる電位波形を正しく解釈するための下地を作ることができた。なお本実習内容は学生実習として、東京女子医科大学動物実験委員会の承認を受けて行っている。

文 献

1. 日本生理学会教育委員会：新訂・生理学実習書，2013
2. Eunice C-G：ラットの解剖図譜，1982
3. Normal Rat Ringer's Solution Cold Spring Harbor Protocols 2012
4. Rodriguez-Falces J: A novel approach to teach the generation of bioelectrical potentials from a descriptive and quantitative perspective. *Adv Physiol Educ* **37**: 327-336, 2013
5. Appiah-Ankam J & Hunter J-M: Pharmacology of neuromuscular blocking drugs. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* **4**: 2-7, 2004
6. Fruen B-R, Mickelson J-R & Louis C-F: Dantrolene inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors. *J Biol Chem* **272**: 26965-26971, 1997

「教育のページ」は学部学生，大学院生，ポスドク，教員などを対象に，生理学教育に関する取り組みや意見を紹介することを目的としています。原稿は Web（日本生理学会ホームページ）上にも掲載されます。皆様のご投稿をお待ちしています。投稿規程は http://physiology.jp/magazine/contribution_rule/ をご参照ください。