B3 システム応答のシミュレーション解析 Ver. 3.1

実験必携品: 実験テキスト(本書)、実験専用ノート、筆記用具、USBメモリ(実験データ持ち帰り用)

1. 実験目的

アナログ回路を利用して、システム応答をリアルタイムでシミュレーション、及び解析することを目的とする。本実習では解析の対象システムとして細胞の等価回路モデルを用い、細胞に電流を注入した際の電気的応答をシミュレーションする。

2. 細胞の等価回路モデル

2.1. 細胞の構成と等価回路

細胞は細胞膜と呼ばれる脂質の膜で覆われている(図 1A、B)。 この脂質膜は絶縁体であり、また細胞の内外を満たすイオン溶液は導体であるため、細胞膜はキャパシタとしてモデル化できる。細胞膜は本質的には絶縁体であるが、細胞膜にはイオンを通すタンパク質でできた穴(イオンチャネル)が存在するため、イオンチャネルが開けば膜を超えて電流を流すこともできる。イオンチャネルは一定の抵抗値を持った抵抗としてモデル化できる。以上から細胞膜はキャパシタと抵抗の並列回路として表わされる(図 1 C)。

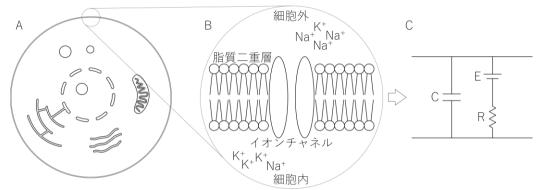


図 1. (A) 細胞の模式図。細胞内には様々な細胞小器官及び細胞質基質が含まれており、細胞膜によって外部と隔たれている。(B) 細胞膜の拡大図。脂質二重層により構成され、イオンチャネルが組み込まれている。細胞内外はそれぞれ異なるイオン組成を持つ液体で満たされており、イオンチャネル等においてイオンの移動が行われる。(C) 細胞膜の等価回路。イオンを通さない脂質二重層はキャパシタ C、イオンを通すイオンチャネルは抵抗 R。静止膜電位(後述)は直流電源 E として表現されている。

2.2. 平衡電位

細胞内外の電解質溶液はそのイオン組成が異なっている。このため特定のイオンのみを通すイオンチャネルが開口すると、細胞膜を横切ってイオン電流が流れ、膜電位が変化する。原理的には、イオン電流が見かけ上 0 になる(イオンの濃度勾配と電荷による電位勾配が釣り合う)まで膜電位は変化する。イオン電流が見かけ上 0 になる膜電位のことを、そのイオンに対する平衡電位と呼ぶ。この平衡電位は細胞膜内外のイオン濃度から算出可能である(6.1. 平衡電位)。

2.3. 静止膜電位

通常の細胞は、静止時(活動していない時)に K イオンを透過するチャネルが開いているため、静止時の 膜電位は K イオンの平衡電位に近く、およそ $-80\sim-60~\text{mV}$ に保たれている。この電位を静止膜電位と呼ぶ。 細胞膜の等価回路(図 1C)において、細胞膜を流れる電流の総量(膜電流) I と膜電位 V の関係は以下の微

分方程式で表現できる。

$$I(t) = C\frac{dV(t)}{dt} + \frac{V(t) - E}{R}$$
 (1)

但し、C、R、E はそれぞれ細胞膜のキャパシタ、イオンチャネルの抵抗、静止膜電位を表す。式(1)において右辺第1項は細胞膜のキャパシタに流れる電流、右辺第2項はイオンチャネルに流れる電流を意味する。

本実験では細胞の静止膜電位を模倣するアナログ回路を用いてシミュレーションを行うが、実際の細胞には活動電位と呼ばれる特徴も存在する(6.2. 活動電位)。

3. アナログ回路によるシステム解析

一般に微分方程式は、ある特定の形式の場合を除いて、解析解が(容易には)求まらないことが多い。そこで本実験では、システム解析の手法を用いて、細胞をシステムと捉えた応答特性のシミュレーションを行う。 一例として、キャパシタに電流を流した際の電圧応答を考える。キャパシタに流れる電流と電圧の関係は以下の微分方程式で表わされる。

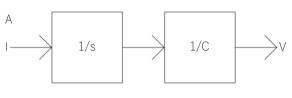
$$I(t) = C \frac{dV(t)}{dt}$$
 (2)

式(2)をラプラス変換(6.3. ラプラス変換)すると式(3)が得られる。

$$I(s) = CsV(s)$$
 (3)

式(3)を V について解くと式(4)が得られる。

$$V(s) = \frac{1}{s} \frac{1}{C} I(s) \qquad (4)$$



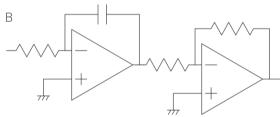


図 2. キャパシタに電流を流した際の電圧応答のアナログ回路シミュレーション。(A)ブロック線図。入力 I に対して積分(1/s)及び定数倍(1/C)が計算され、出力 V が得られる。(B)Op アンプを用いた回路。1/s 及び 1/C はそれぞれ積分器、反転増幅器に置き換えられる。

4. アナログ回路実装及び測定

Op アンプを用いた回路をブレッドボード(図 5A、B)上に実装し、実装した回路にファンクションジェネレータを用いて任意信号を入力し、その特性をオシロスコープを用いて評価・測定する。

- (1) ブレッドボード上に反転増幅器の回路を実装し、ファンクションジェネレータを用いて矩形波を 入力した際の、入出力関係をオシロスコープを用いて観察する。また、2つ以上の特性を比較する。
- (2) (1)の回路に正弦波を入力して同様の観察・比較を行う(周波数ごとのゲイン、位相)。
- (3) 積分器、微分器も実装し、同様の観察・比較を行う。

(4) 図2Bの回路を実装し、同様の観察・比較を行う。

5. 膜電位のアナログ回路によるシミュレーション

微小ガラス管電極を用いた細胞内への電流注入 を想定して、注入電流に対する膜電位変化を計測 する実験をシミュレートする。

- (1) 式(1)の微分方程式をラプラス変換し、 ブロック線図及び Op アンプを用いた 回路図を作成する。
- (2) (1) の回路をブレッドボード上に実装し、矩形波・正弦波を入力した際の入出力関係の観察、及び異なる特性での比較を行う。
- (3) 班員の実装した回路の特性を計測し、 実装された部品の特性を推定する。

6. Appendix

6.1 平衡電位

イオンチャネルが開口した際に、イオン電流が見かけ上0になる膜電位のことを、そのイオンに対する平衡電位と呼ぶ。この平衡電位は、膜内外のイオン濃度から算出でき、この式は Nernst の式と呼ばれている(この式の導出はここでは示さないが、半導体中のキャリアの移動と電界の関係と同様の方法で導出される)。

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[ion]_o}{[ion]_i}$$
 (5)

但し、 E_{ion} は平衡電位、Rは気体定数、Tは絶対温度、Zはイオンの価数、Eはファラデー定数を表す。[ion]。、[ion]。はそれぞれ細胞外及び細胞内のイオン濃度を表す。

6.2. 活動電位

本実験では、入力電流に対して受動的に変化する膜電位のアナログ回路によるシミュレーションを行った。しかし実際には、多くの細胞がイオンチャネルの開閉を通じて膜電位を大きく変化させ、活動電位と呼ばれるパルス状の信号を発生することが知られている(図 3A)。この活動電位の発生のメカニズムには静止膜電位を形成していたイオンチャネル(図 1)に加えて、膜電位に依存して開閉する 2 つのイオンチャネル(電位依存性 Na イオンチャネル,電位依存性 K イオンチャネル)が関わっている。まず電流流入によって膜電位がある程度まで上昇すると、低い閾値・短い時定数を持つ電位依存性 Na イオンチャネルが開く。その結果、濃度勾配に従って細胞外に多く存在していた Na イオンが細胞内に雪崩れ込み、急激に膜電位が上昇する(図 3B)。

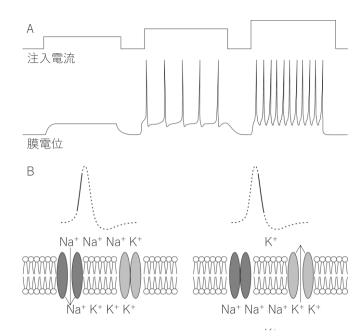


図3. 活動電位とその発生機序。(A)細胞に電流(上)を注入した際の膜電位(下)の変化の模式図。閾値下の電流では活動電位は生じず(左)、閾値を超える電流によって活動電位が生じ(中)、電流が増加すると活動電位の数が増加する(右)。Bear et al., 2015 より。(B)電位依存性イオンチャネルの働き。電流注入等によって膜電位が上昇すると、低い閾値電位を持つ電位依存性 Na イオンチャネル(濃灰)が開き、濃度勾配に従って Na イオンが細胞内に流入することで膜電位が急上昇する(左)。ある電位まで上昇すると、高い閾値電位を持つ電位依存性 K イオンチャネル(淡灰)が開き、濃度勾配に従って K イオンが細胞外へと流出することで膜電位が急降下する(右)。その結果、活動電位の"鋭い"形状が形作られる。

その後ある程度まで膜電位が上昇すると、高い閾値・長い時定数を持つ電位依存性 K イオンチャネルが開く。その結果、今度は細胞内に多く存在していた K イオンが、濃度勾配に従って細胞外に雪崩れ出て、急激に膜電位が下降する(図 3C)。この際に崩れてしまった細胞内外のイオン濃度は、イオンポンプと呼ばれる別の細胞膜タンパク質の働きによって戻される。ここでは簡単のために電位依存性 Na イオンチャネルと電位依存性 K イオンチャネルがそれぞれ 1 つずつの説明を行ったが、実際にはそれぞれ多数存在する。

この過程を説明するために広く用いられているモデルの一つが、Hodgkin & Huxley モデルである(Hodgkin and Huxley, 1952、ここでは概要のみ紹介する)。Hodgkin & Huxley モデルでは、細胞膜を図 4 に示す等価回路として表現する。この回路において、膜電流と膜電位の関係は以下の式(5)により表現される。

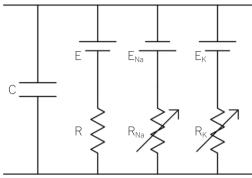


図 4. Hodgkin & Huxley モデルの簡略化された等価回路。電位感受性イオンチャネルを可変抵抗 (R_{Na}, R_{K}) と直流電源 (E_{Na}, E_{K}) で表現している。電位依存性 Na イオンチャネルでは正電荷が細胞内に流入するため、直流電源の極性を逆転している。

$$I(t) = C \frac{dV(t)}{dt} + \frac{V(t) - E}{R} + \frac{V(t) - E_{Na}}{R_{Na}} + \frac{V(t) - E_{K}}{R_{K}}$$

$$= C \frac{dV(t)}{dt} + g_{rest}(V(t) - E_{rest}) + g_{Na}(V(t) - E_{Na}) + g_{K}(V(t) - E_{K})$$
(6)

但し、 E_{Na} 、 E_{K} はそれぞれ、Na イオン、K イオンの平衡電位である。 g_{Na} 、 g_{K} はそれぞれ、Na イオン、K イオンに対して選択的なコンダクタンスであり、双方とも膜電位 V 及び時間 t の関数となる。Hodgkin & Huxley モデルでは、これらのコンダクタンスは微分方程式で表現される。

$$g_{Na}(V,t) = G_{Na} \cdot m(V,t)^{M} \cdot h(V,t)^{H}$$
 (7)

$$g_{K}(V,t) = G_{K} \cdot n(V,t)^{N}$$
 (8)

$$\frac{dx(V,t)}{dt} = \alpha_{x}(V) \cdot \left(1 - x(V,t)\right) - \beta_{x}x(V,t)$$
 (9)

$$\lim_{t \to \infty} x(V,t) = \frac{\alpha_{x}(V)}{\alpha_{x}(V) + \beta_{x}(V)}$$
 (10)

$$\tau_{x}(V) = \frac{1}{\alpha_{x}(V) + \beta_{x}(V)}$$
 (11)

但し、x は m、h、n を、 τ は α 、 β をそれぞれ表す。m、h は電位依存性 Na イオンチャネルの活性化、不活性化 (\approx 開閉)、n は電位依存性 K イオンチャネルの活性化を表現する確率関数として捉えることが出来る。 実際の活動電位の発生機序には多数の電位依存性 Na イオンチャネルと電位依存性 K イオンチャネルが関わっており、その総体としての開閉確率を m^M 、 n^M で計算している。 G_{ion} は最大コンダクタンスを表す定数であり、イオンチャネル 1 つのコンダクタンスとイオンチャネルの数の積と捉えられる。

このモデルをアナログ回路により疑似的に模倣する方法を考える。図 3B で説明したように、電位依存性 Na イオンチャネルは活動電位の立ち上がり(低い膜電位)で開く。前者の特性をアナログ回路で置き換えると高域通過フィルタ(微分器)となる。後者の特性を言い換えると、入力に応じて倍率の変化する増幅器となり、帰還部の抵抗をトランジスタに置き換えて模倣することが可能となる(ベースもしくはゲートに膜電位の入力を与える)。閾値電位は Op アンプの非反転入力端子に与える電位によって調整する。電位依存性 K イオンチ

ャネルは活動電位の立ち下がり(高い膜電位)で開く。前者の特性は、電位依存性 Na イオンチャネルよりも遅い時間特性を持つもので、低域通過フィルタ(積分器)で置き換えられる。後者は、電位依存性 Na イオンチャネル同様、帰還部をトランジスタに置き換えた Op アンプで置き換え可能である(非反転入力端子に与える電位は電位依存性 Na イオンチャネルよりも高くする)。

6.3. ラプラス変換

フーリエ変換と極めて類似した以下の式で定義される。

$$F(s) = \int_0^\infty f(t) e^{-st} dt \qquad (12)$$

(例えば)時間領域 t の微分や積分などの演算 f(t)を、周波数 領域 s の別の演算 F(s)に置き換えることで、システム解析を容易にする常套手段の一つである。あるシステム h(t)に対しての入力 x(t)と出力 y(t)があるとき、そのシステムの伝達関数 H(s) は入力のラプラス変換 X(s)と出力のラプラス変換 Y(s)の比 $\frac{Y(s)}{X(s)}$ で定義される。実践的には対応表(表 1)を参考にして、ラプラス変換及び伝達関数を求めることが多い。

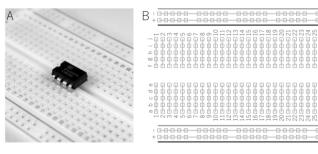
表 1. ラプラス変換対応表。この表は一部を抜粋したもので、様々な関数の例を網羅していない。

関数 f(t)、g(t) ラプラス変換 F(s)、G(s)

af(t) + bg(t)	aF(s) + bG(s)
a	$\frac{a}{s}$
t	$\frac{1}{s^2}$
$\frac{df(t)}{dt}$	sF(s) - f(0)
$\int_0^t f(\tau)d\tau$	$\frac{F(s)}{s}$

6.4. Op アンプ

本実験では DIP タイプの Op アンプ(OPA2340)を用いた(図 5A、C)。この Op アンプは 2 回路入りとなっているため、例えば図 2 の回路であれば、この Op アンプ 1 つと抵抗やキャパシタを組み合わせることで実装



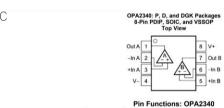
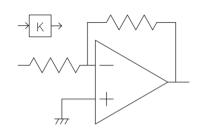
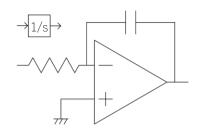


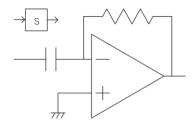
図 5. ブレッドボードと $Op \ T \times T^2$ 。(A) ブレッドボード上に実装された $Op \ T \times T^2$ 。この $Op \ T \times T^2$ のような $IC \ F \times T^2$ は通常、端子同士が導通しないようにブレッドボードの中央を跨いで配置する。(B) ブレッドボード内部の配線図例。導通している穴を淡灰線で繋 い で い る 。(C) $Op \ T \times T^2$ の $F \ T \times T^2$ が内蔵されている。電源は共通である。

可能である。このような簡単な回路を試しに作る場合にはブレッドボード(図5A、B)を使うと便利である。はんだ付けをせずに何度も簡単に部品の付け替えが可能である。

Op アンプを用いた基本的な回路を図 6 に示 す。入力部と帰還部にそれぞれ抵抗 R₁、R₂を 接続した場合、反転増幅器(比例要素 K、伝 達関数 = $-\frac{R_2}{R_1}$ 、図 6 上段左)となる。入力部 に抵抗R、帰還部にキャパシタCを接続した 場合、積分器(積分要素 1/s、伝達関数 = $-\frac{1}{CRs}$ 図6上段中)となる。この場合にも出力の極 性が反転することに注意が必要である。入力 部にキャパシタ C、帰還部に抵抗 R を接続し た場合、微分器(微分要素 s、伝達関数 = -CRs、図6上段右)となる。この場合も出力 の極性は反転する。フィードバック制御等で 2つ以上の信号を合成する場合は、Op アンプ に対して並列に入力を与える。ネガティブフ ィードバック等、極性を反転して合成する場 合は、予め他の Op アンプの反転出力等を利 用して入力を与える。







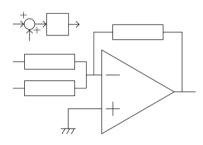


図 6. Op アンプを用いた基本的な回路。上段左から増幅器(比例要素)、積分器(積分要素)、微分器(微分要素)を示す。どの例も入力に対して出力が反転することに注意。左下は信号の合成を示す。増幅器、積分器、微分器のどの場合においても、入力を並列に加えることで加算が行われる。減算したい場合には、入力の前に符号を反転する必要がある(増幅器、積分器、微分器の出力が反転することを利用出来る場合もある)。

6.5. 実験レポート

基本的には、実験レポートは今後書くであろう論文の練習だと考えている。一般的な論文は、「序論」、「背景」、「手法」、「結果」、「考察」、「参考文献」、「謝辞」という章立てになる(但し分野次第で例外は 多数)。

序論: 本研究を取り組む目的(問題点を例示)、行った内容(手法)、結果、結論を簡潔に記述する。

背景:一般的な内容から徐々に特定の話題に焦点を当てていく"逆三角形"の構造を作る。起"転""承"結のようなイメージで、その研究に関わる一般的な内容の紹介(話題が広がり過ぎないようにキーワードで限定する)、その分野における問題点の提示、その解決のために行った手法やその結果、結果から示唆される将来性、というおおよそ4段落構成を考えると分かり易い。ここでは適宜参考文献を引用する。

手法: 実際に行った手法(計測・解析等)をそのまま記述する。もしも先行研究等を参考にした箇所があれば、その部分はそのまま記述する必要は全く無く、「~手法は先行研究を参考にした(文献情報)。ここでは短くまとめる」などの書き方で適宜省略する。図を引用しても問題無い場合あり。

結果: 得られた結果をそのまま記述する。「結果を図 1 に示す」、「~になっている(図 1)」などの書き方で適宜、図や表を参照する。その後"どうなっているのか"の説明も記述する。参考文献を引用しても問題無い図表の説明文: タイトルだけではなく、"見方"を細かく記述する(例えば、線や記号、軸は何を表しているのか?特徴的な点はどこか?etc... 図と説明文だけで研究内容を理解させる気持ちで記述する。ある程度の表現が本文の文章と同じになっても問題は無い)。

考察: 結果から発展した形での議論展開を行う。例えば「得られた結果の先行研究との一致点・相違点、その原因」、「得られた結果から明確にならず今後発展研究が必要な点」、「得られた結果を応用させた将来の可能性」などを記述する。単なる想像ではなく、根拠・論拠を明確にしながら記述する。ここでも適宜参考文献を引用する。

参考文献:本文中で引用した文献情報を列挙する(但し、ジャーナルごとにフォーマットあり)。

謝辞:著者として載るほどではないが、研究進行に重要な役割を果たした人物に感謝の意を示したり、研究費情報を載せたりする。

7. 参考文献

J. G. Nicholls, A. R. Martin, B. G. Wallace, P. A. Fuchs. "From Neuron to Brain", Sinauar Associates, Inc. (「ニューロンから脳へ」というタイトルの訳本あり)

D. Johnston, M.-S. Wu. "Foundations of Cellular Neurophysiology", The MIT Press.

A. L. Hodgkin, A. F. Huxley. "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve", Journal of Physiology 117, 500-544, 1952.

合原 一幸, 神崎 亮平. "理工学系からの脳科学入門", 東京大学出版会

宮川 博義, 井上 雅司. "ニューロンの生物物理", 丸善株式会社

Peter Dayan, L. F. Abbott. "Theoretical Neuroscience", The MIT Press

M. F. Bear, B. W. Connors, M. A. Paradiso. "Neuroscience: Exploring the Brain", Wolters Kluwer Health