

## 2 自発発火パルスの分岐現象

### 2.1 はじめに

ヤリイカ第三次巨大軸索は生物の中でも特に大きな神経細胞であり、実験の容易さなどの理由から活動電位の伝播の研究で利用されてきた。このヤリイカに関する研究によって、軸索内での能動的なシグナル伝播がイオンを選択的に透過させる電位依存性の  $\text{Na}, \text{K}$  イオンチャネルによって主に形成されることが知られているが、この仕組みは他の大半の動物のニューロンでも基本的には同様な方法で興奮現象が伝播していると考えられている。

ヤリイカの一般的な生育環境における外部からの周期的電気刺激による発火パターン解析については、過去に多くの詳細な研究がされており [14, 15, 16] 刺激の頻度と強度によってカオスへの分岐が起こることが知られている。一方、このような発火パターンの変化は特定の温度、外部イオン環境に密接に関係があることが示され、そしてこのような電気生理的所見に対して、細胞膜骨格構造の相変化が寄与している可能性があることが、電子顕微鏡による観察などによって明らかになってきた [17, 24, 25, 26]。

この章では、解析がされていなかった自励発振の領域の周辺でおこる非線形現象について明らかにすることが主な目的である。

### 軸索の温度と $\text{Ca}$ イオンに関する相転移

神経軸索の置かれている外液イオン組成が変化したとき、その軸索膜の電気的性質もこれに伴って変化する。外液  $\text{Ca}$  イオン濃度に注目して軸索膜の電気的特性を調べると、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低くなると活動電位が容易に発生するようになり、逆に細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を高くすると活動電位発生の閾値は上昇し膜抵抗も上昇する (Stabilizing effect)。また  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を低くした場合には、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  は電気的にも化学的にも細胞外側表面に結合する。 $\text{Ca}^{2+}$  が膜表面に結合すると実効負電荷密度が低下 (screening

effect) することによって膜自体の感じる電位が上昇するため、活動電位の発生が容易になると考えられている。軸索膜内外のイオン濃度は、通常の生育環境ではそれぞれ図3のような組成になっているが、上記のような理由により外液のCaイオン濃度の減少とともに静止電位は不安定化する [27]。本実験では、このようにして静止電位を不安定化させた時におこる周期的あるいは非周期的発火パターンの相転移の過程でおこる現象について詳しく調べる。羽生らは、ヤリイカ巨大軸索の *in vitro* での実験によって、軸索膜の状態は温度、外液 Caイオン濃度をパラメータとしておよそ典型的な四つの相に分け、このようにして分けた各相の領域での電気的性質を明らかにした [17]。この二つのパラメータによって分けられる4つの領域を  $R_H$  (高  $[Ca^{2+}]$ 、高温)、 $R_L$  (高  $[Ca^{2+}]$ 、低温)、 $O_H$  (低  $[Ca^{2+}]$ 、高温)、 $O_L$  (低  $[Ca^{2+}]$ 、低温) とする。この4つの領域はそれぞれ以下のような傾向を持つ。

$R_H$  (高  $[Ca^{2+}]$ 、高温) では電気刺激を加えた場合に連続発火がおこる。

$R_L$  (高  $[Ca^{2+}]$ 、低温) では電気刺激を加えた場合に発火がおこり発火は間欠的である。

$O_H$  (低  $[Ca^{2+}]$ 、高温) では自発的に連続発火がおこる。

$O_L$  (低  $[Ca^{2+}]$ 、低温) では自発的に発火がおこり発火は間欠的である。

この状態変化は 図6のような相図によって示されている。このような温度、 $Ca^{2+}$  濃度によって電気的な発火特性が変化する具体的なメカニズムにはそれ以下のような寄与によるものと考えられている。詳しくは9.1.3節で述べるが、温度による特性変化は、軸索の電気的空間的相同性の温度に伴う変化によるものである可能性が示されている。

## カオスとしての神経興奮現象

カオスとは決定論的な非線形力学系の解が初期値に鋭敏に依存するために予測が不可能な振る舞いを示す現象であり、生体の神経細胞の非線形現象の中にも数多く見出されている [2, 20, 28]。系のカオス的振る舞いは一般的には、時系列、パワースペ

クトル、相関関数、リアプノフ指数などで特徴づけられるが、生体の作り出す電気信号の時系列パターンについていくつかの特有な解析法も行なわれている。その一つには、実験によってある非線形系の運動状態を調べるときこの運動を多次元の相空間内における軌道として表現し、この軌道の断面を調べることによって少数次元の離散力学系における運動として解析する(ポアンカレセクション)方法がよく行われる。神経細胞の発火パターンを解析する場合、一般に活動電位の発火間隔を時系列データとすると良好な結果を得ることができることが経験的に知られており、本稿の中でもこの方法を用いている。このようにして得られた時系列データ( $x_0, x_1, x_2, \dots, x_n$ )に対して、 $x_{k+1} = F(x_k)$  の形であらわせる第一次再帰写像関数  $F$  の存在が認められる時、この時系列が決定論的な性質を持った系であると理解できる。写像関数の概形は、横軸に  $x_n$  を、縦軸に  $x_{n+1}$  をとるリターンマップによってあらわされる。この写像関数  $F$  が、直線  $x_{n+1} = x_n$  を横切り、山形をした関数であれば、この写像関数は引き伸ばしと折り畳みの構造を持つ。このような写像関数は初期値によって、周期解、安定点、カオス、などの状態を作り出す可能性を持つことがわかる。

ヤリイカ巨大軸索においては、ポアンカレセクションを用いる上記の方法をによって外部からの周期的電気刺激に対する応答の分岐現象が詳細に調べられている[15, 16]。このとき刺激電流強度と軸索の発火間隔の二つのパラメータによって分岐が制御され、カオス応答を引き起こす領域の存在が知られている[16]。また、軸索膜の状態を温度、軸索外  $Ca$  イオン濃度の二つをパラメータとして調べることにより、軸索の自発的発火が起こる領域とその自励発振状態の温度変化による発火パターンの状態変化が現在までに明らかにされている(図6)[17]。

ここでは、自励発振状態のヤリイカ巨大軸索を用いて温度変化に伴って起こる分岐現象について調べ、周期的電気刺激を加えた場合に刺激の周期変化とその強度に伴っておこる分岐現象[16]と比較する。そして自励発振の実験で得られた分岐現象と周期的電気刺激を加えた場合とを比較することにより、分岐現象にどのような要因が関係しているかについて考察する。

## 2.2 実験

実験データは、試料としてヤリイカ巨大軸索を用い[29, 30, 31]、これについて温度、軸索外  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度依存性に関して実験(図7)[17]した結果を用いた。軸索外  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度を 15mM として固定し、温度をおよそ 9.3°C から 8.2°C の間で変化させたとき、すなわち  $O_H$  と  $O_L$  間で相変化するとき、活動電位の自励発振パターンの分岐がおこる様子を解析した。温度の下降速度は、実験では厳密な温度管理が極めて困難なので正確には計測されていないが、およそ 0.1°C/sec 程度である。実験データはテープレコーダーによって記録されており、このデータを A/D 変換した後、計算機に入力し解析した(図8)。軸索の長軸方向は電気的に非空間固定である。

## 2.3 解析と考察

### 2.3.1 インパルスの時系列解析

温度の低下に伴って変化する活動電位の時系列データをプロットしたものを図9 (a)-(e) に示す。さらにこの図 9 に対応する時間間隔 (Interval) を時系列データとしてプロットしたものを 図 10 に示す。この図では活動電位の時間間隔を縦軸に、おおよその温度を横軸に取っており、図中に挿入されている (a)-(e) の記号は、それぞれ活動電位の時系列データ 図 9 (a)-(e) に対応している。図 9 (a) は高温側(9.0°C付近)であり、(b), (c), (d), (e) の順に次第に低温側へと移行する。図 9 (a) ではリミットサイクルとよばれる極めて周期的な発振が見られるが、低温側へと変化するに従い周期振動にわずかなゆらぎが見られる(図 9 (b))。さらに低温では周期を失って間欠的バースト発火へと変化していく [19] 図 9 (c)。一方、Interval を表わす図 10 からは、ほぼ一定値をとる安定状態と、ばらつきの起こる不安定状態が交互に現れることがわかり、温度をパラメータとしてこれらの交替は突然起きていることがわかる。

次に、この周期振動の崩壊から間欠バースト振動へと向かう現象についてリターンマップを用いて調べる。図 9 (a)-(d) に対応するリミットサイクル発振時のリターン

マップ(一回写像関数)を図11(a)-(d)に示す。図11(a)の状態では、発火間隔は一定でおよそ30ms程度である。このためマップではほぼ一点であらわされており、相空間では極めて固い周期軌道(アトラクタ)上を動いていると考えることができる。次に図9(b)に対応する状態でのマップ(図11(b))を見ると、先ほどまで存在していた安定固定点が僅かにゆらいでいることがわかる。このことは、安定固定点が消滅し、アトラクタの吸引力が弱まっていることを示していると考えられる。次の図9(c)におけるリターンマップは、以前の安定固定点である30ms付近において振動的に滞在する状態と、70ms付近までバーストする状態とが繰り返し起こっていることを意味している(図11(c))。このマップは、層流状態とバースト発火とを繰り返すことから、間欠カオスに典型的に見られる現象であると考えられる。

間欠性カオスであれば、そのバーストが始まる分岐点の性質を調べることによっていくつかのタイプに分類することができる。そこで、この間欠カオスの分類について調べる。図9(c)付近での分岐が始まる部分を図10の時系列のような形式で拡大して調べると、すべてのデータでIntervalが一回おきに拡大して行く分数調波部分と、一回おきに減少して行く基本調波部分の存在する間欠的なバーストが起こっている(図12)。これはPomeauとMannevilleによって分類されたType-III間欠カオスのふるまいとして典型的な現象であると考えられる。

ここで、ある分岐開始時点のデータを基準とした二回写像を作り、さらにこれに対して間欠カオスにおけるType-IIIの分岐を導く式[18, 32]

$$I_{n+2} = (1 + 2\epsilon)I_n + \beta I_n^3 \quad (\epsilon: \text{分岐パラメータ}, \beta: \text{定数}) \quad (1)$$

を最小自乗法によってFitさせる(図13)と、理論式と実験データが良く適合していることが確かめられた。この(1)式は理論的には分岐パラメータ $\epsilon$ の値が $|\epsilon| \ll 1$ すなわちゼロに近い小さな正数であることが必要であるが(9.2.3節参照)、実際 $\epsilon = 0.079$ ,  $\beta = 0.1006$ となって条件を満たす。以上のことから、本実験の図9(c)部分ではTYPE-IIIの間欠パルスが観測されたと結論することができる。

### 2.3.2 FFT による周波数解析

高速フーリエ変換(以下 FFT)を利用して時系列のパワースペクトルを求めることができるが、これによって系の振る舞いの状態が周期的であるのか、準周期なのかあるいは非周期的なのか判断することができる。またカオス状態は非周期的な現象であるため、この状態になると周波数成分は広帯域化するため、これを一つの指標とすることができます。このような特長から、FFT はカオス現象の判定の一手段として用いられてきた。系がカオス運動へと分岐する場合には、周波数成分を調べることによって分岐の型が明らかになる場合がある。そのような例として周期倍分岐を繰り返すことでカオスとなる現象、あるいは準周期運動崩壊からカオスへ至る現象などがある。

実験で得られた発火パターンに対して FFT を行い、パワースペクトルを得た結果について示す。計算は CRAY C90 OS version UNICOS 8.0 上で行った。データ数は 16384 ポイント、サンプリング間隔  $\Delta t = 7.5 \times 10^{-5}$  second、よって FFT による周波数分解能はおよそ  $\Delta f = 0.81$  Hz である。FFT に用いたデータを、図 14,15,16,17 に示し、計算で得たパワースペクトルを図 18,19,20,21 に示す。温度条件はそれぞれ 8.9 °C 8.7 °C 8.5 °C 8.3 °C、Ca イオン濃度は 15Ca-ASW である。リミットサイクル発振状態にある 8.9 °C (図 14) に対応するパワースペクトル (図 18) は、基本周波数 25Hz とその高調波が際だって見られ、他の周波数成分はほとんど見られない。これは、きわめて安定な周期的発振であることを意味する。

間欠的なバーストが起こる 8.7 °C になると、パワースペクトルの基本周波数の Intensity はリミットサイクル時の  $\frac{1}{2}$  近くに減少する(図 19)。また、リミットサイクル時にはきわめて鋭敏な山として見られたパワースペクトルの基本周波数成分が広がりを持った形になっている。これは基本周波数がゆらぎ成分を持つようになったことを示している。一方、基本周波とその高調波以外の周波数成分が顕著に増加している。しかし基本周波と高調波の成分は他の周波数成分に対してある程度高い Intensity を持ち続けるため、これは弱いカオスの状態であると考えることができる。間欠カオス

は層流状態とバースト状態を持つ不安定発振であるので、カオスの現象としては比較的穏やかな現象であることと対応すると考えられる。

次に 8.5 °C における間欠的発振の状態では、時系列上では活動電位が近接して二つ連続におこり、その後しばらく静止電位に戻るという状態が周期的に起こっているようにみられる。しかしパワースペクトルでは特定の周期にピークが見られない。この相での詳細な解析は自己相関関数によって再度詳しく述べるが、複数の周波数の合成による準周期運動であることが考えられる。

8.3 °C では、パワースペクトルは活動電位の周期である 10Hz 付近と、その高調波成分が見られる。ここではリミットサイクルの  $\frac{2}{5}$  程度の周期の遅い安定的な発振状態であることがわかる。

### 2.3.3 自己相関の解析

2.3.2 節のパワースペクトルのデータに対してフーリエ逆変換をかけて得られる自己相関関数について調べた結果について説明する。計算は同様に CRAY C90 OS version UNICOS 8.0 上で行った。

自己相関関数  $C(m)$  は、 $m$  ステップ離れた反復が時間とともにどのように関連しあっているかの目安を与える量であり、自己の周期性について関連を調べることができる。これは、時系列データ  $x_n$  に対して次式で定義される。

$$C(m) = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} x_n x_{n+m} - \bar{x}^2 \quad (2)$$

また、自己相関関数はフーリエ変換によるパワースペクトルを逆フーリエ変換して得られるという性質がある。このためパワースペクトルが広帯域化すると、自己相関関数は逆に小さくなっているという関係にある。すなわち、カオスになると 2.3.2 節と同様な理由によって自己相関は急速に失われる方向へ働く。このように、自己相関関数はカオスの一つの指標となっている。

計算で得た自己相関関数を、図 22,23,24,25 に示す。これはそれぞれ前節の FFT で用いた四つの状態にそれぞれ対応している。

8.9 °C では、およそ 0.04 秒間隔で極めて高い値をとることがわかる(図 22)。この周期性は、活動電位の発火周期に対応するものであると考えられる。また、およそ 0.1 秒程度の時間的に近接したデータ間では周期的に極めて相関性の高い状態が見られる。この状態は 0.4 秒程度まで時間的に離れると Internsity は  $\frac{1}{2}$  程度に落ちるが、周期的な相関性は極めてよく保たれていることがわかる。また、この周期的ピークの間にあるなだらかな山形のピークは、膜電位揺らぎに対応するものである。

間欠的発火状態 (8.7 °C) では、Internsity の最大ピークである横軸 0.04 秒付近でも、リミットサイクル状態における Internsity の最大ピークの  $\frac{1}{2}$  程度になっている(図 23)。また周期的に起こる相関のピークは 0.1 秒程度の時間的に離れたデータ間までは保たれているが、それ以上離れると相関の周期性が減少していく。これらことは、この状態においてパワースペクトルが広帯域化していることと対応しており、カオスとしての性質を持つことを示していると考えられる。

さらに温度を低下させ 8.5 °C 付近では、パワースペクトルでは把握しづらい周期構造が明瞭に理解される(図 24)。強い相関のピークは横軸の 0.04 秒に存在しているが、これは主に二つの異なる周期振動  $f_1, f_2$  が存在する準周期運動の状態であると考えられる。ここでの相関の Internsity の最大ピークは 0.2 秒程度のところにあり、この Internsity はリミットサイクル状態でのそれのおよそ 85% と極めて高いレベルにある。また、この最大ピークの両脇にある 1.5 秒と 2.4 秒付近にあるピークは、 $f_1$  と  $f_2$  との合成である  $f_2 - f_1, f_2 + f_1$  に対応すると考えられる。

8.3 °C では、発火周期の 10Hz 付近に対応する 0.1 秒付近とその倍数秒後においてピークが見られ、系が周期的な安定状態であることがわかる(図 25)。

この温度でのシングルパルス状態では、実験条件の微妙な違いによって安定する

場合と不安定な場合がある。

### 2.3.4 Wavelet 変換による時間周波数解析

間欠的バーストを繰り返す温度である 8.7 °C における自励発振の層流状態において、その周波数成分がどのように変化をしているかを解析する一つの試みとして Wavelet 変換を用いた。計算は CRAY C90 OS version UNICOS 8.0 上で行った。

Wavelet 変換は、ある信号  $f(x)$  を時間と周波数の両面からとらえる時間周波数解析ができるという特徴を持つ。この変換は連続 Wavelet 変換と離散 Wavelet 変換とに大別され、離散 Wavelet 変換は、連続 Wavelet 変換に対して信号の効率的な時間周波数解析ができるなどの特徴があるが、本研究では間欠カオスの層流状態の時間変化をとらえることを主な目的とするため、連続 Wavelet 変換を用いる。

連続 Wavelet 変換  $W(a, b)$  は次の式によって定義される。

$$W(a, b) = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{a}} g_{a,b}(t) f(t) dt \quad (3)$$

$$g_{a,b}(t) = a^{-\frac{1}{2}} g\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad (4)$$

ここで  $g(t)$  はマザーウエーブレットあるいはアライジングウエーブレットと呼ばれ、ふつう次のような条件式を用いる。

$$\int_{-\infty}^{\infty} g(t) dt = 0$$

マザーウエーブレットはこのような条件を満たす関数であればよい。実際の応用では解析する信号に応じて時間周波数解析に都合のよい関数を選ぶことができる。

本研究で解析の対象となる信号は針状の活動電位の列であり、これを解析するためのマザーウエーブレットとして Gabor 関数の実部を取り出しその  $\cos$  成分を奇数乗した以下のような関数を用いた。

$$g(t) = \cos^{2u+1}(t) e^{\frac{-t^2}{v}} \quad (5)$$

( $u, v$  は正整数) この式の概形を 図 26 に示す。

間欠的発火サイクルにおいて連続的に発火している部分、すなわち間欠カオスの層流状態に対応すると思われる部分ではゆらぎが少しづつ増大していることがリターンマップによってわかつってきたが、ここではこのゆらぎ成分を周波数領域によって調べる。

この Wavelet 解析を間欠性のバースト発火の層流状態の部分について行った結果を三次元 Surface 表示したものを図 27 に示す。またこの図に対して、Intensity の成分の最大値 5% と最小値 5% を黒色とした白黒二次元像を図 28 に示す。ここではマザーウエーブレットとして (5) 式の関数を用いており、ここで用いた定数は  $u = 5, v = 32$  である。

時系列データは、層流状態に対応する連続発火から間欠的発火に至るまでのほぼ一秒程度の間のものである。この周波数成分は、はじめの 0 秒から 0.5 秒まではおよそ 33Hz 程度と安定しているが、その後間欠状態に至るまでに徐々に周波数成分が広がってゆくのが明確にわかる。このように、間欠的発火状態に対して時間周波数解析を行った結果からも間欠カオスとしての性質をもつことがわかる。

ところで、マザーウエーブレットとして用いた (5) 式で  $u = 5, v = 32$  としたスパイク状の関数は、活動電位の周波数解析として有用である。実際、マザーウエーブレットの (5) 式において  $\cos$  の乗数  $u = 1$  とした局所的  $\cos$  関数を用いて従来の FFT とほぼ同様の周波数解析を行うと、変換結果は図 30 のように周波数分解能が (5) 式による結果と比較して大きく劣化してしまう。このことから (5) 式の関数が、分岐が起こる際のわずかな周波数の拡がりを調べるのに有効であることがわかる。

## 2.4 まとめ

### 実験結果全体の考察

外液 Ca イオン濃度が低く自励発振する領域 (図 6 の  $O_H$  領域) からより低温の  $O_H$  (低  $[Ca^{2+}]$  濃度、低温) 領域への遷移では、僅かな温度低下に伴って、安定したりミットサイクルから次の安定状態へ移る過程で Type-III 分岐による間欠カオスが起こることが、今回初めてこの分岐現象がリターンマップによって良好に説明できることが確かめられた。

ところで、 $R_H$  (高 Ca 濃度、高温)、 $O_H$  (低  $[Ca^{2+}]$  濃度、高温) 双方の領域で自励発振状態に周期的電気刺激を与えて起こるカオスへの分岐はリミットサイクル発振と周期的外力(電気刺激)との非線形相互作用による結果であると考えられていた[16]。今回の結果は、これらのルートの一つである Type-III による間欠カオスが電気刺激を与えない状況下において見られた。この周期的外力のない状態でも Type-III 分岐が起こるということは従来の見方では説明することができない。後の章で明らかにして行くが、この非線形現象に関する一つの説明として、閾値下振動成分が周期的外力に代わってこの間欠発火現象を引き起こしていると考えられる。

### まとめ

本章では、ヤリイカ軸索における温度と外部イオン環境に関する挙動を非線形システムとしてとらえて解析した。この際、温度をパラメータとしたときの発火パターンの分岐現象において間欠カオス Type-III を観測した。またこの現象は周期的電気刺激を与えたときにおこる分岐の一つと同型のものであることを指摘し、このような分岐現象が従来考えられていたのとは異なる非線形相互作用による可能性を示した。

神経細胞の発火パルスが情報伝達の重要な担い手であるとすれば、本研究に見られるような相変化に伴う複雑な発火パターンは、情報になんらかの関係を持つ重要な

形態の一つであることも考えられる。以下の章において、これらの実験結果がどのような生物物理的な背景から成り立つかについて明らかにすることを試みる。

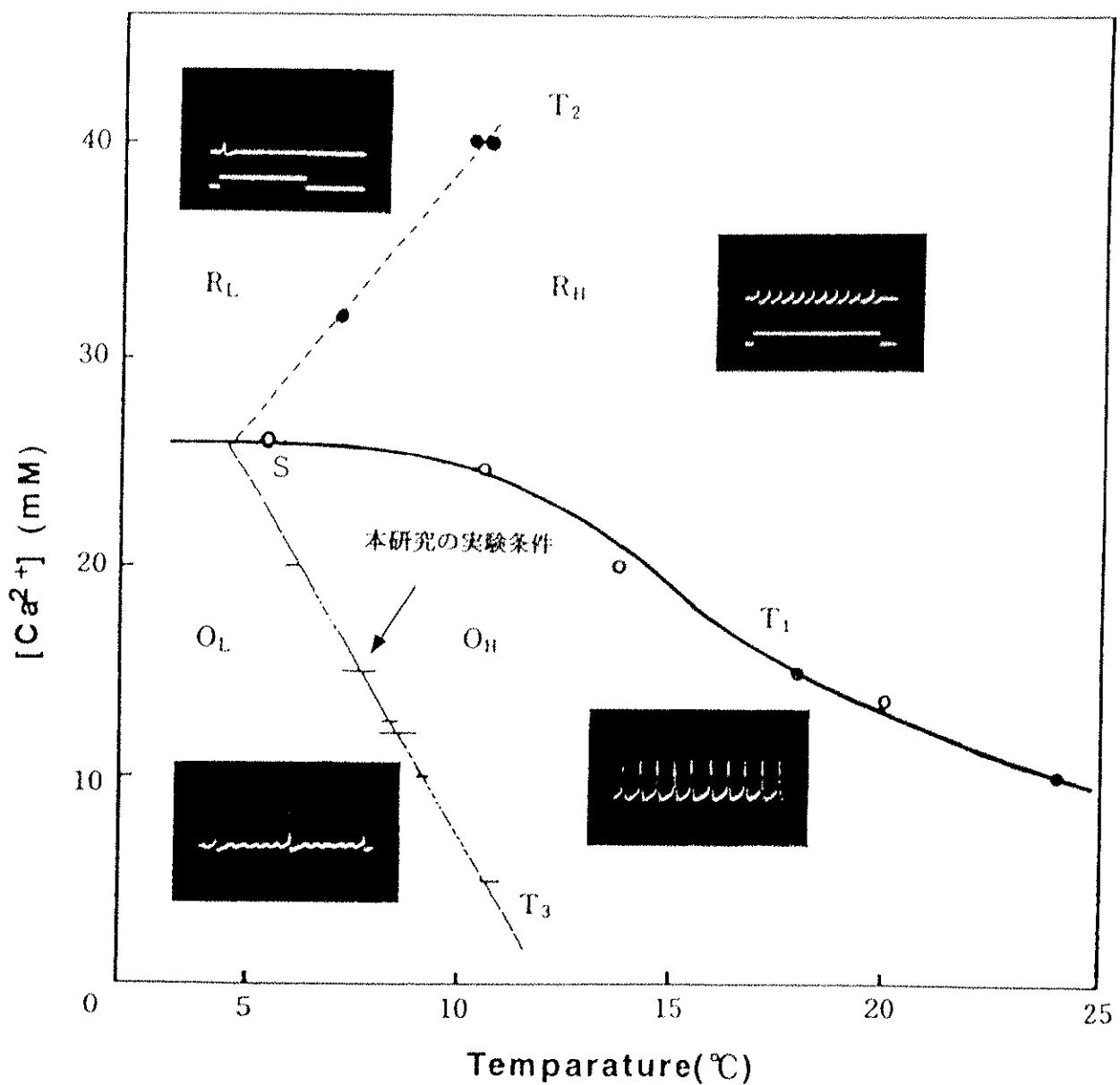


図 6: 外液 Ca イオン濃度と温度をパラメータとしたときの軸索の状態図

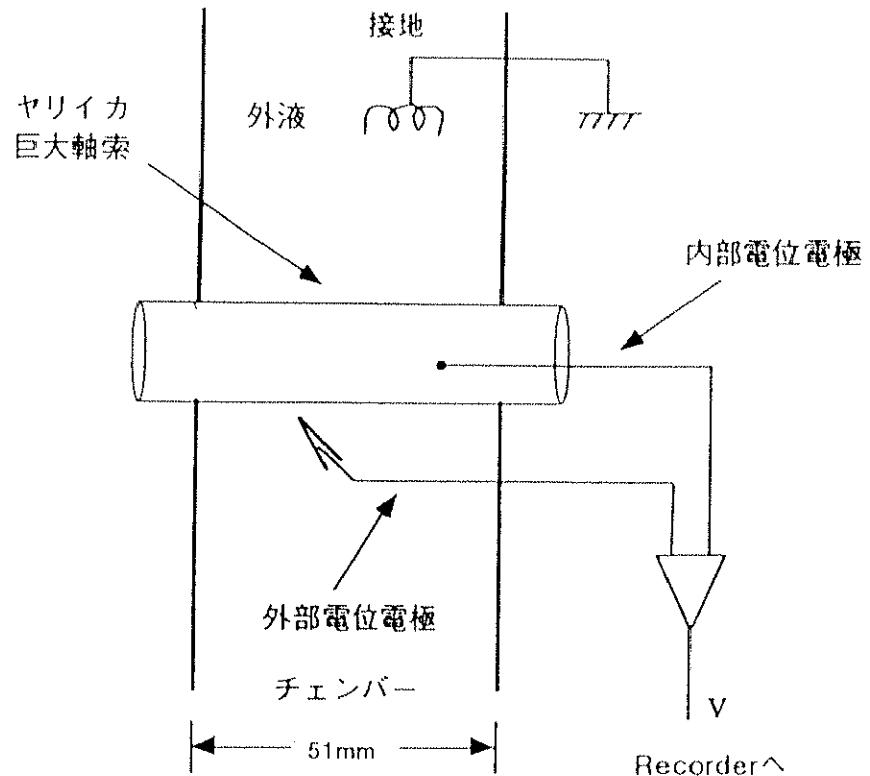


図 7: 実験装置

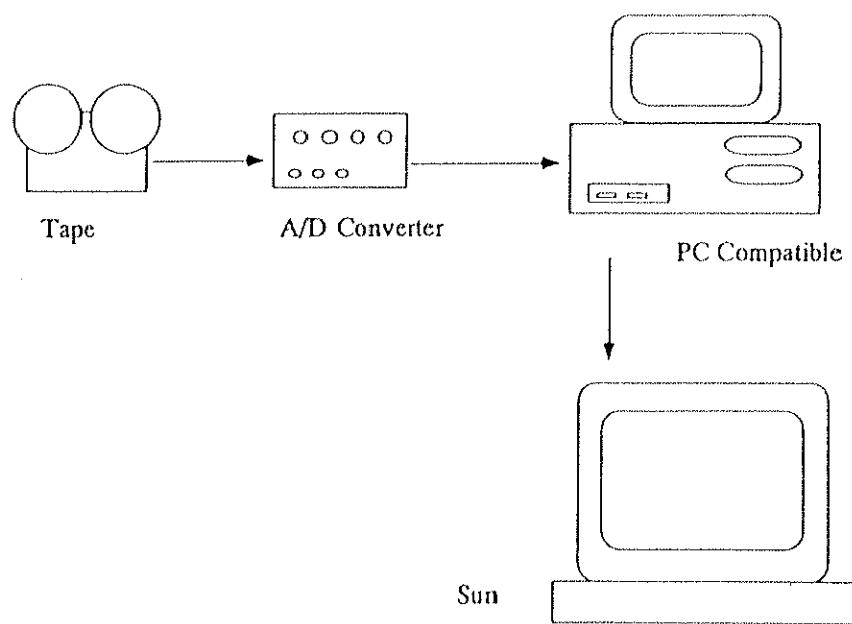


図 8: データの解析システム

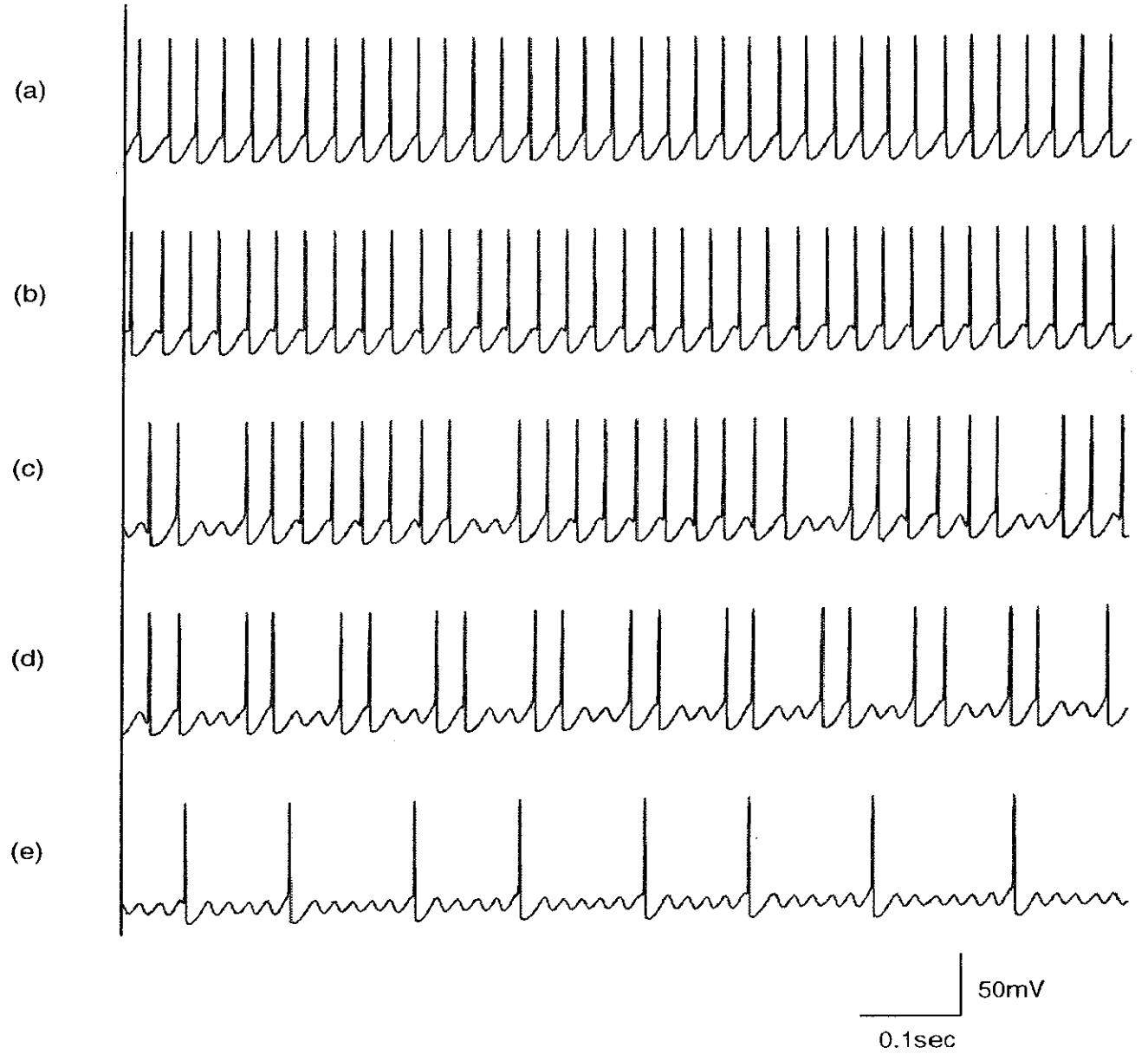


図 9: ヤリイカ活動電位の時系列データ

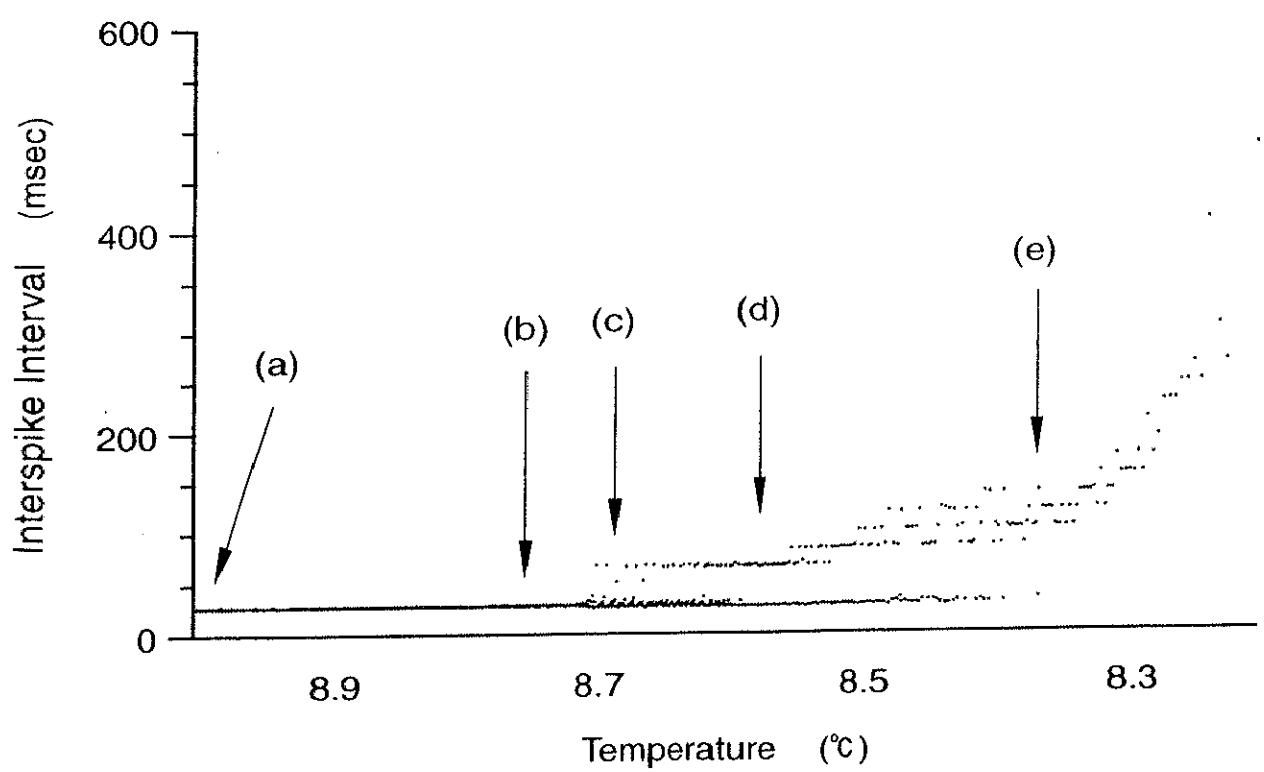


図 10: 温度低下に伴う発火時間間隔の変化

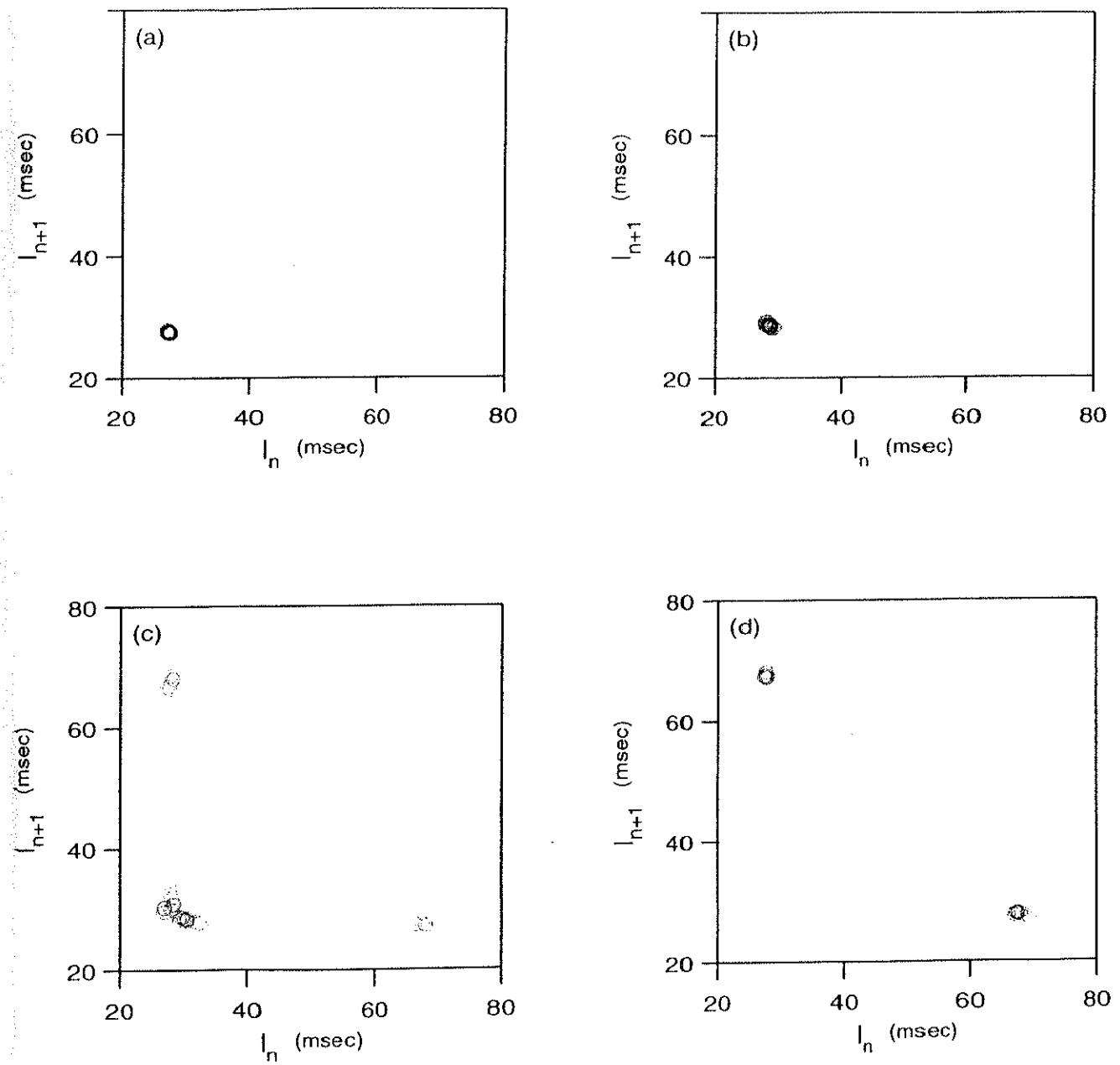


図 11: 時系列データに対応するリターンマップ

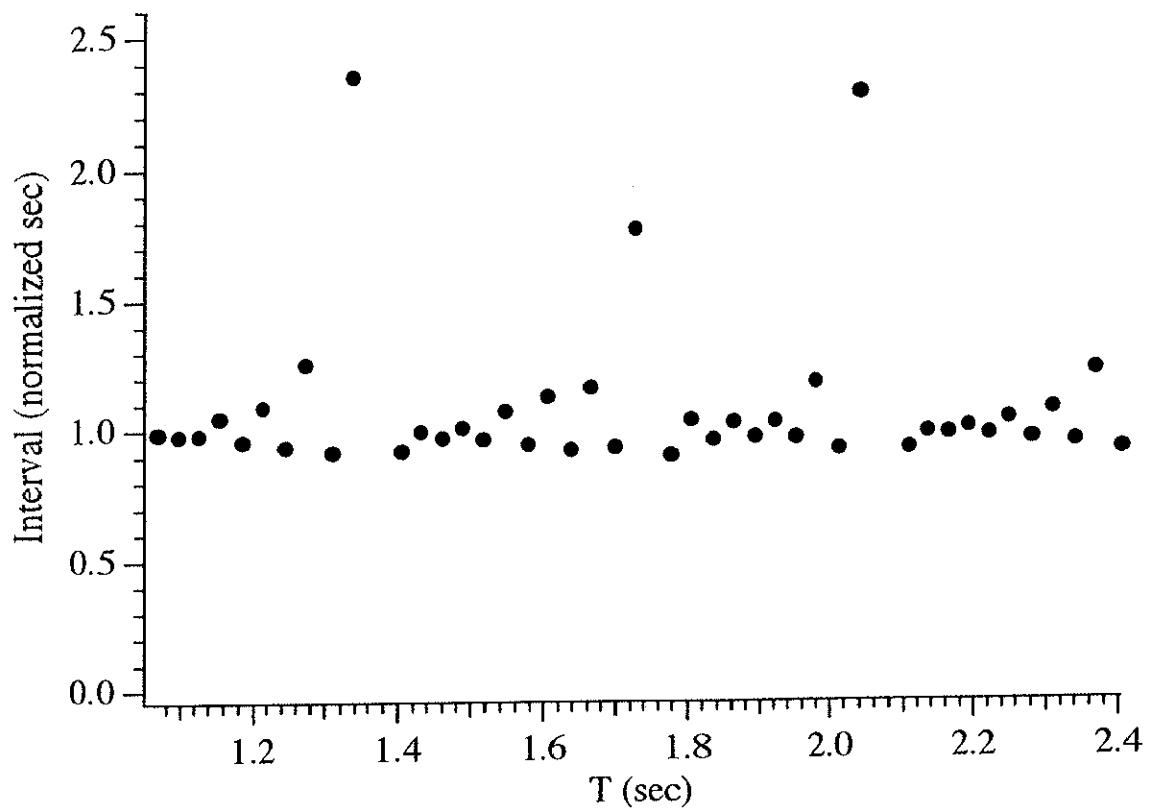


図 12: 時間間隔変化の部分拡大

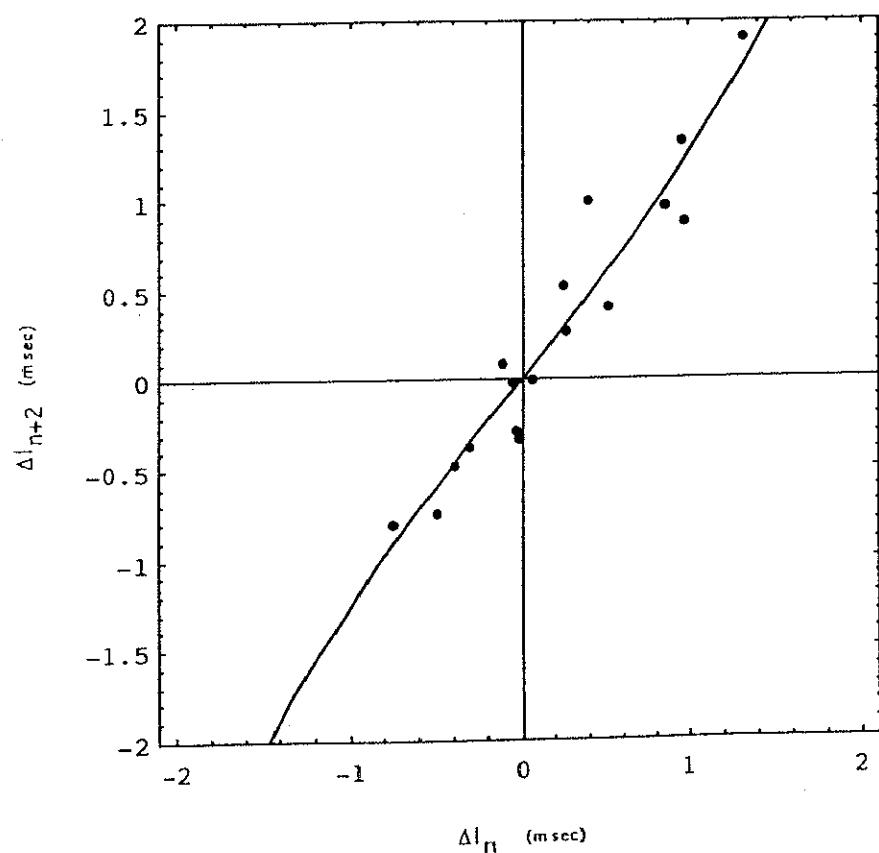


図 13: 二回写像と Type-III 分岐の理論式

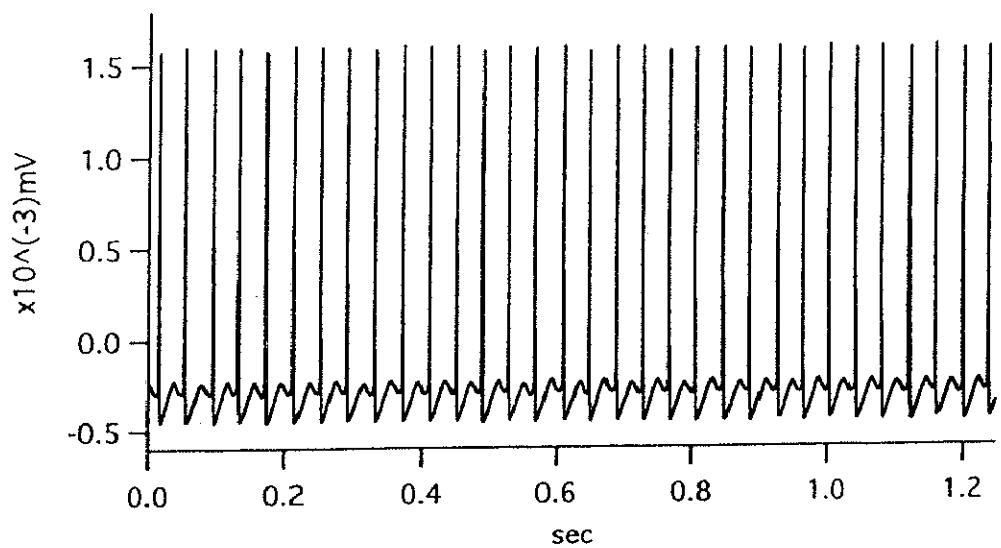


図 14: FFT に用いた 8.9 °C 時系列データ

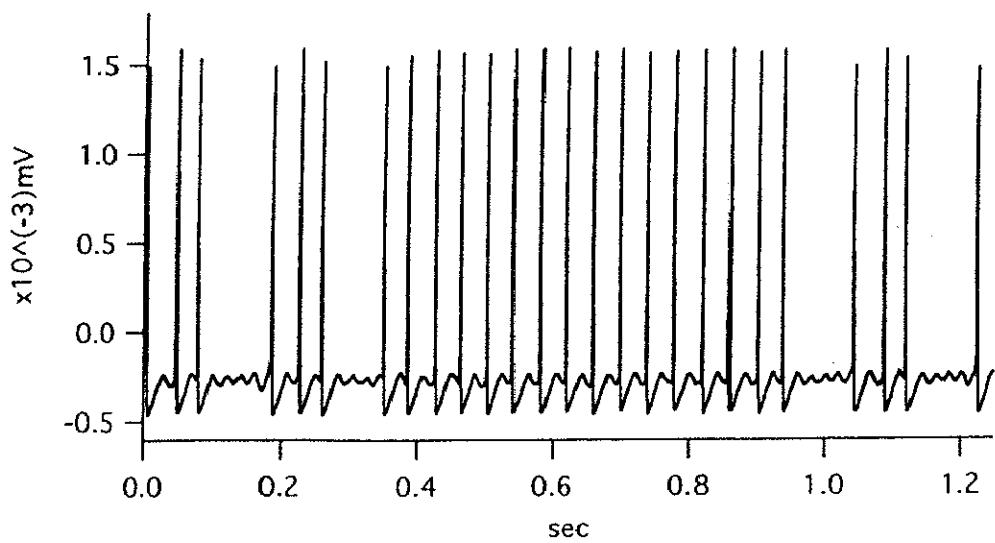


図 15: FFT に用いた 8.7 °C 時系列データ

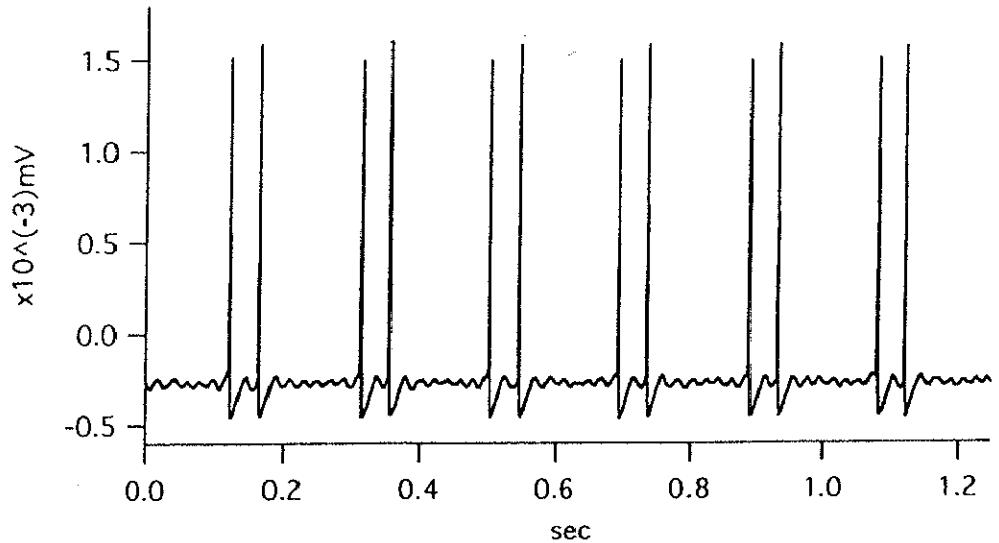


図 16: FFT に用いた 8.5 °C 時系列データ

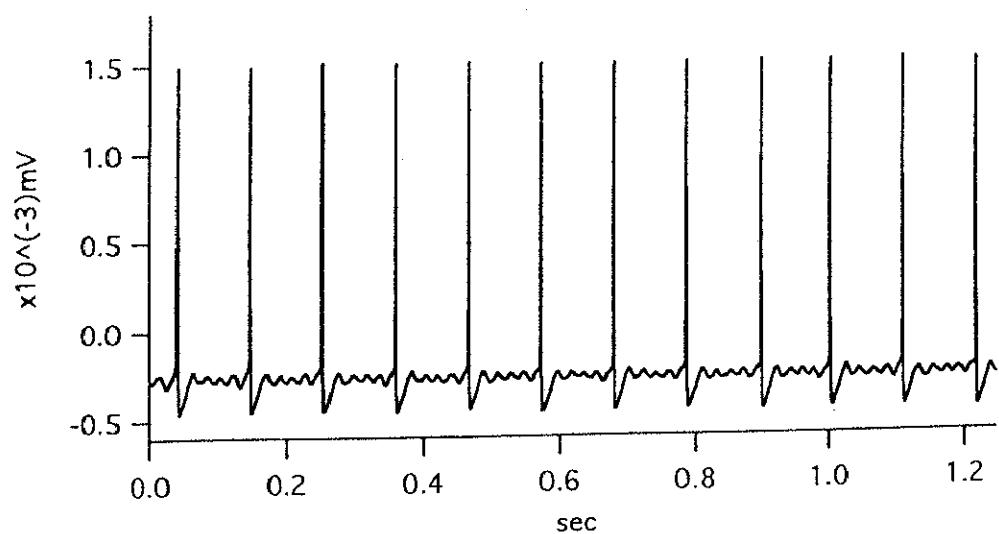


図 17: FFT に用いた 8.3 °C 時系列データ

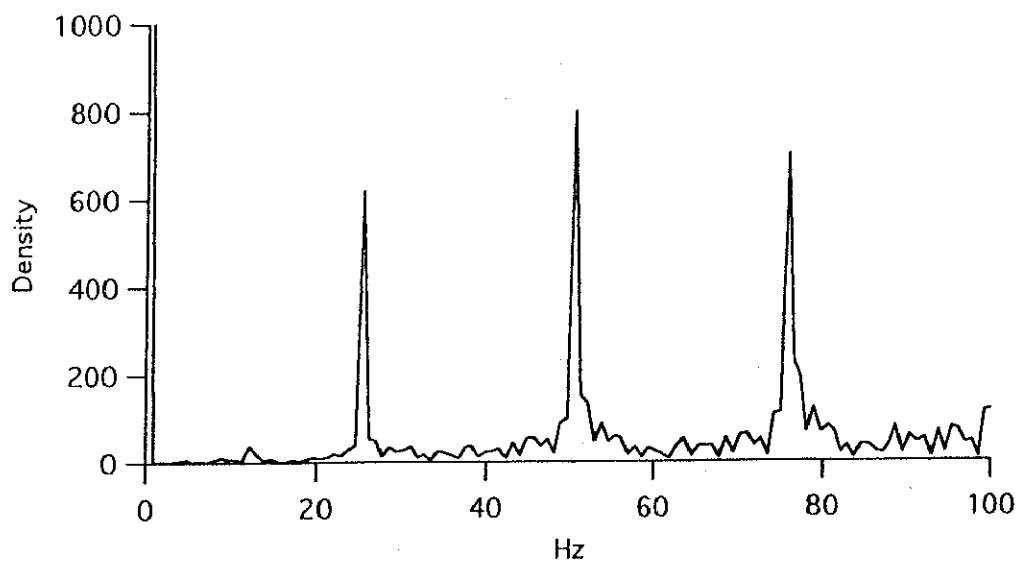


図 18: 8.9 °C におけるパワースペクトル

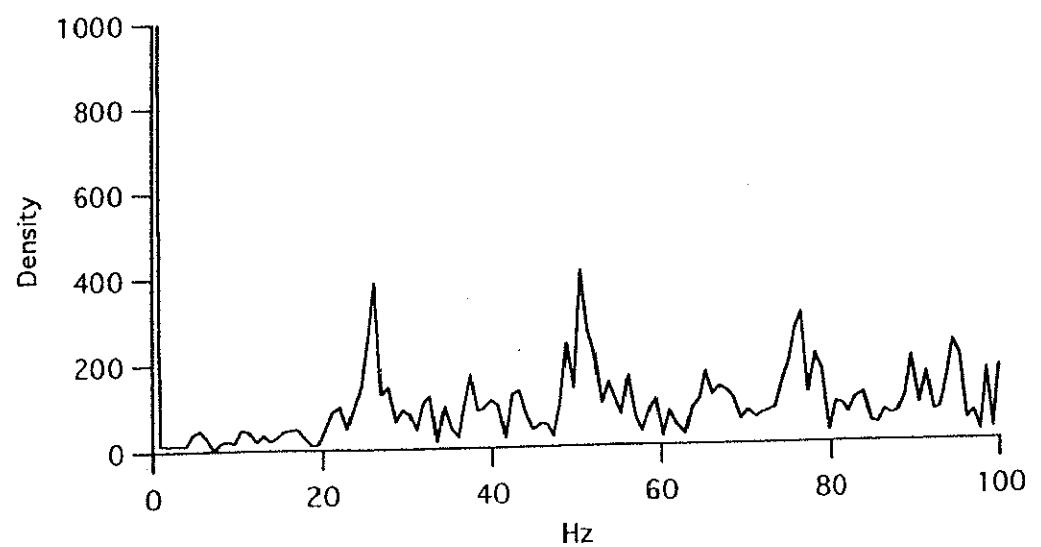


図 19: 8.7 °C におけるパワースペクトル

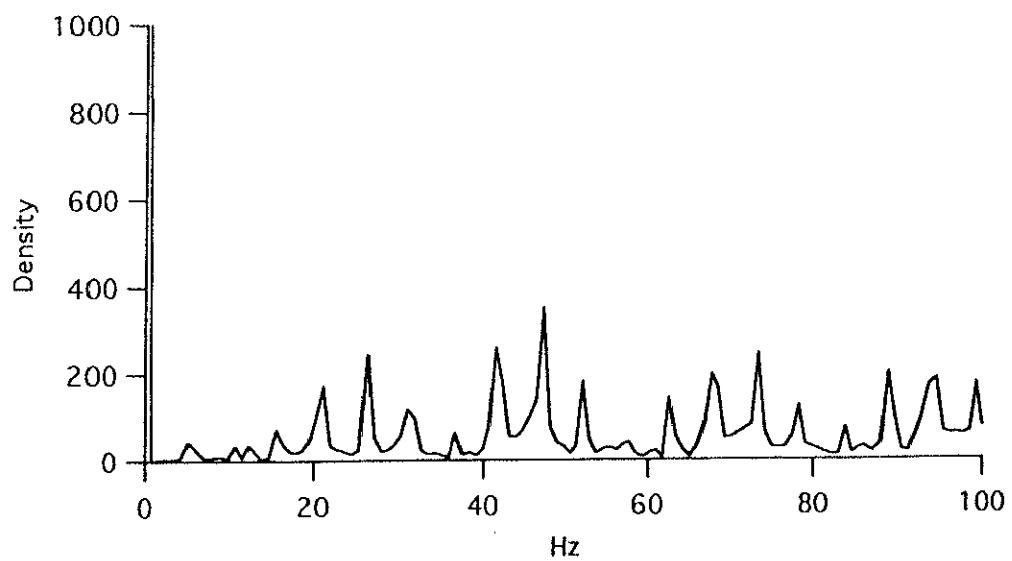


図 20: 8.5 °C におけるパワースペクトル

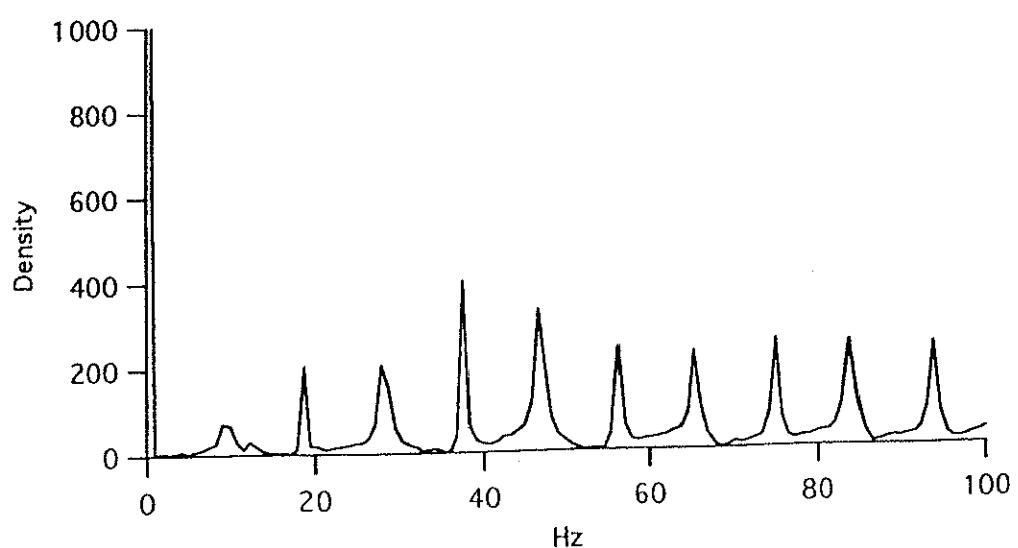


図 21: 8.3 °C におけるパワースペクトル

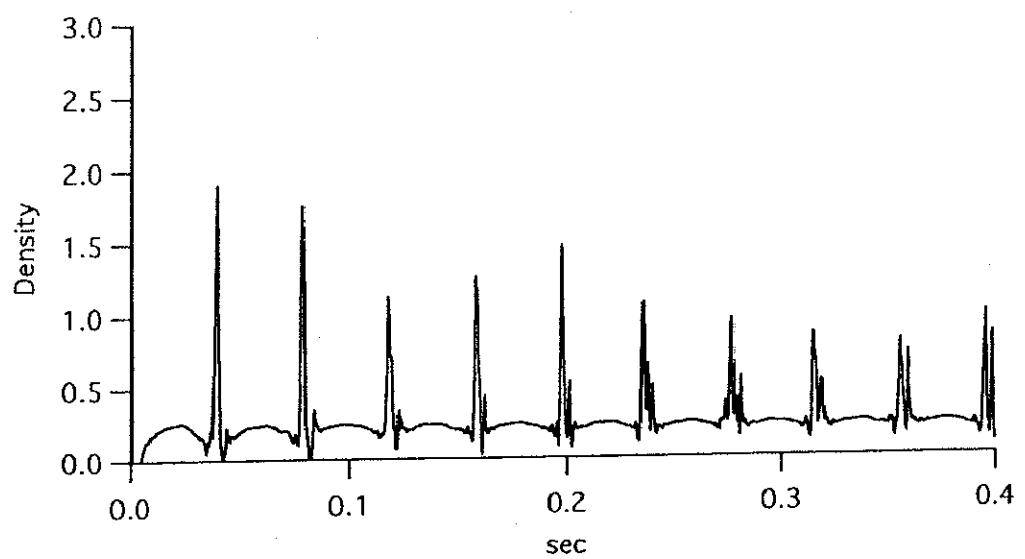


図 22: 8.9 °C における自己相関関数

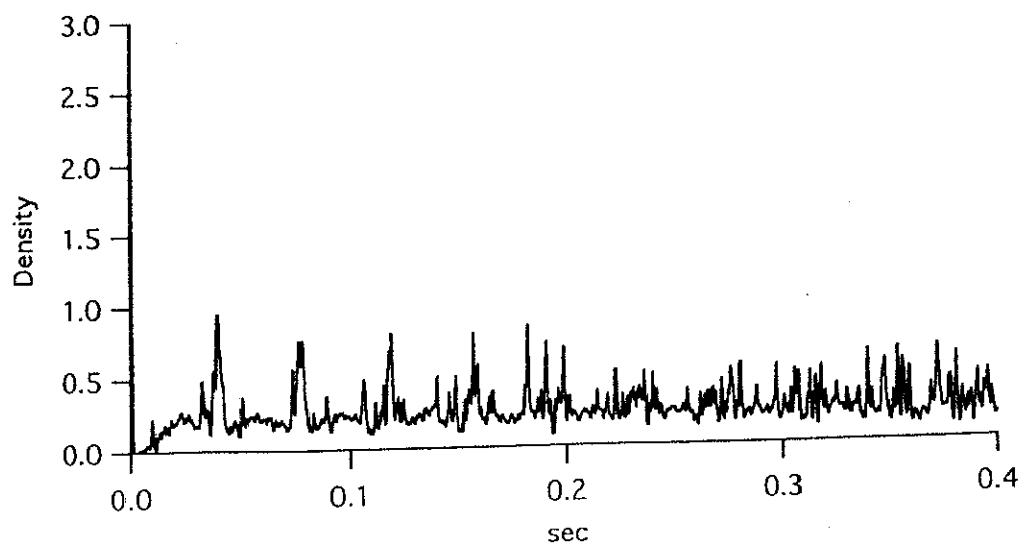


図 23: 8.7 °C における自己相関関数

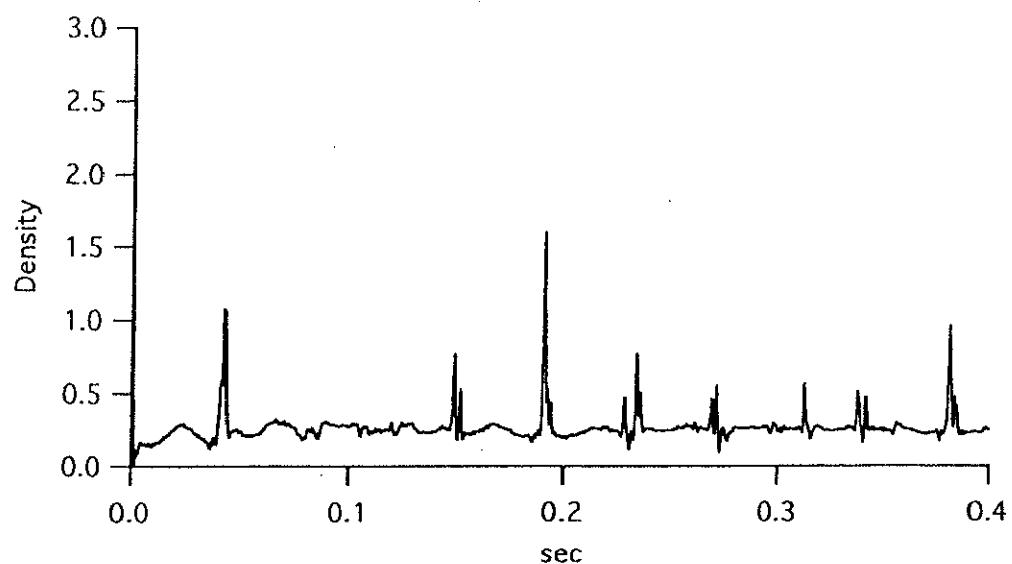


図 24: 8.5°C における自己相関関数

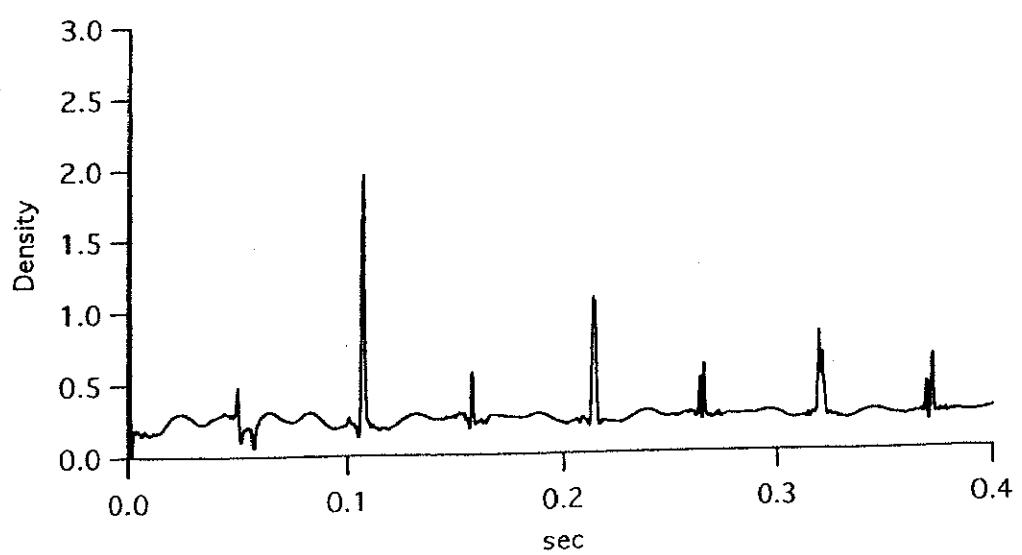
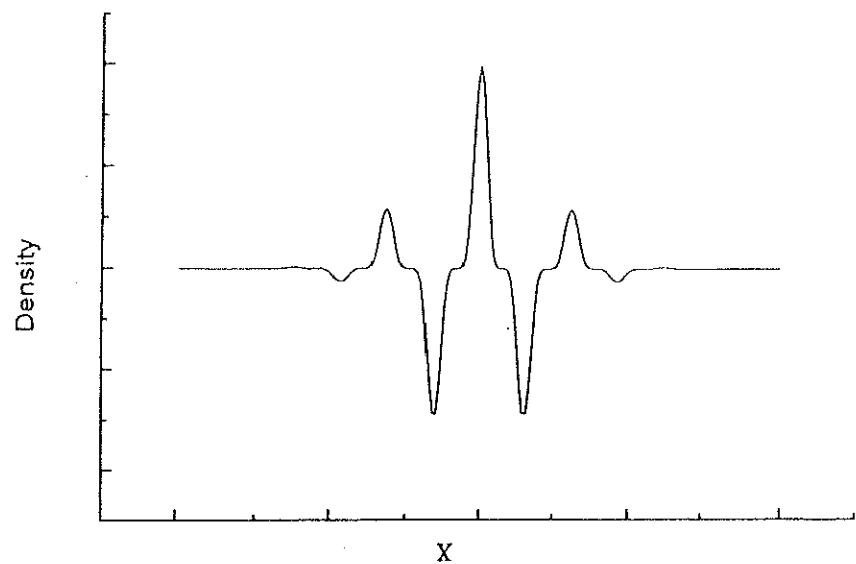
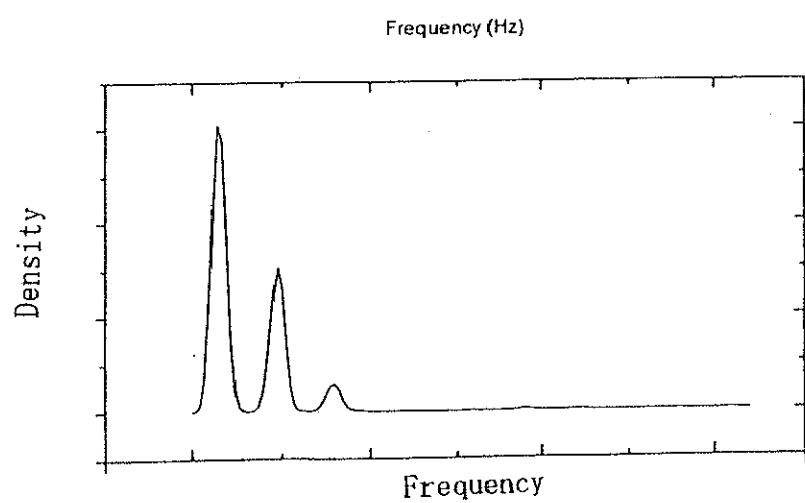


図 25: 8.3°C における自己相関関数



関数の概形



周波数成分

図 26: Analyzing Wavelet

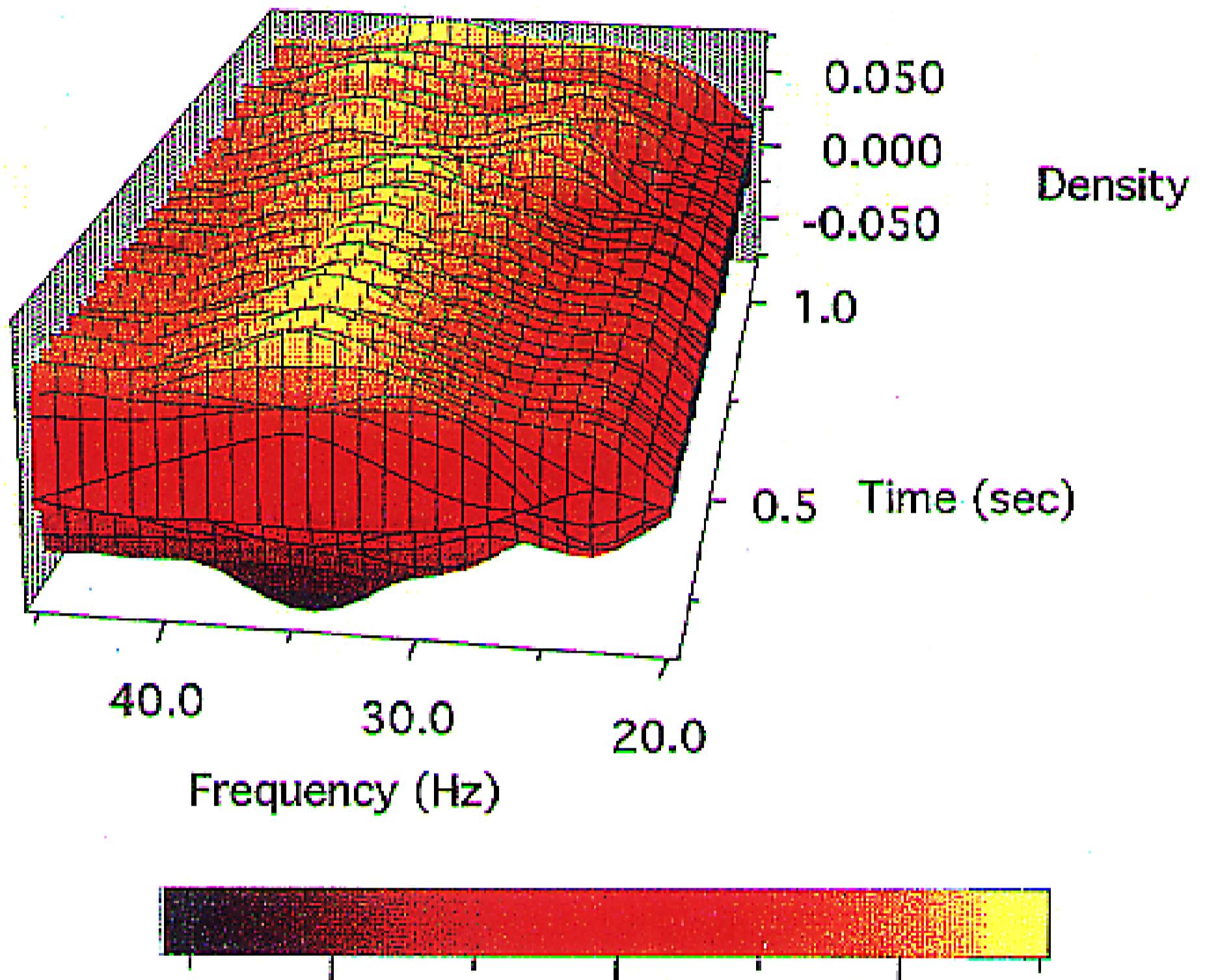


図 27: 連続ウェーブレット変換の結果(1)(三次元)

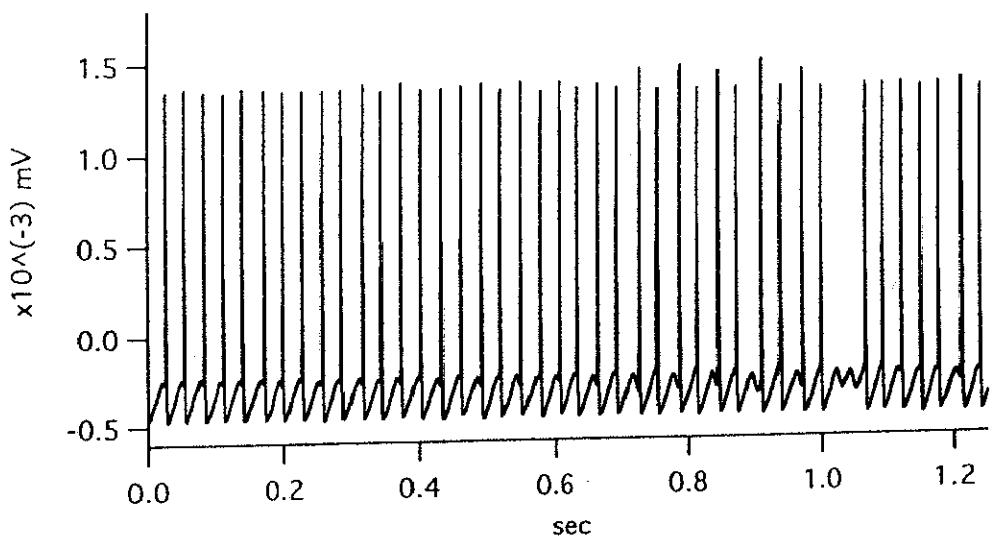


図 29: ウエーブレット変換に用いたヤリイカ時系列データ

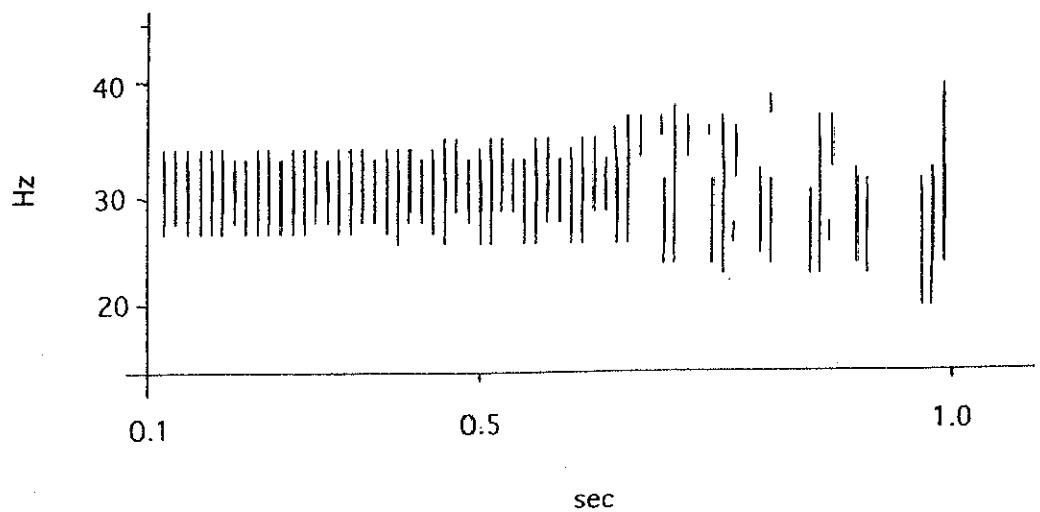


図 28: 連続ウエーブレット変換の結果(二次元)

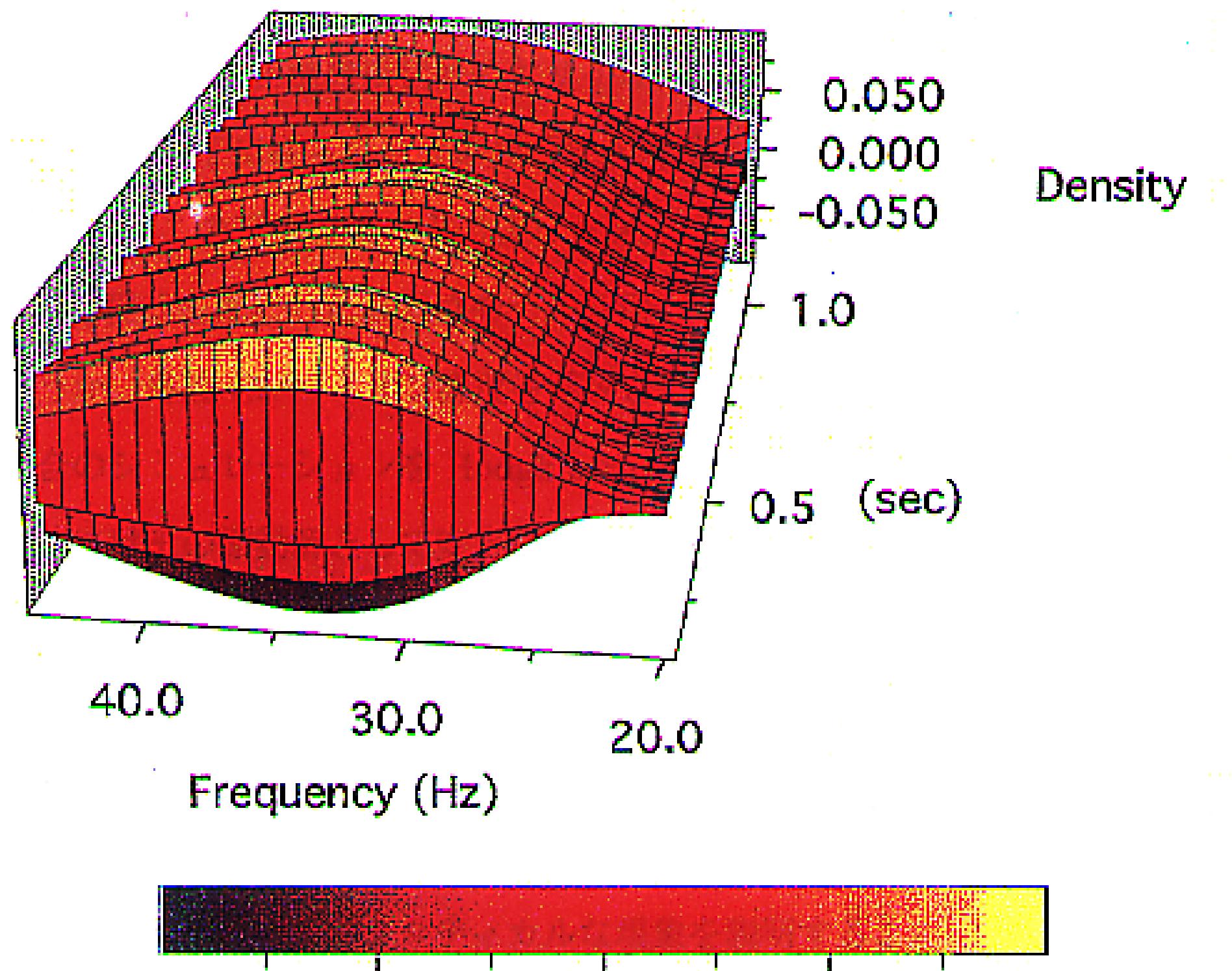


図 30: 連続ウェーブレット変換の結果(2)(三次元)