光学的多波長プロービングによる活動電位分布計測

佐藤 智夫, 宮崎 保光, 口脇 博治*

豊橋技術科学大学情報工学系, *名古屋大学医学部

Multi-Wavelength optical probing of action potential distribution

Tomoo SATO, Yasumitsu MIYAZAKI and Hiroji KUCHIWAKI*

Dept. of Information and Computer Sciences, Toyohashi Univ. of Tech.

*Dept. of Neurosurgery, School of Medicine, Nagoya Univ.

Abstract

This paper investigates the staining process of multi-functional optical probing by using probe dyes at the same time. We measure the fluorescence spectra from the carp's ventricle stained with voltage-sensitive fluorescence dyes (Nile Blue A and WW781 respectively).

The experiment was done as following. First, a ventricle was removed from a carp and stained with a solution of Nile Blue A(0.02 mg/ml) for 10 min., and then it was perfused in Ringer's solution for 2 min. to wash out unbounded Nile Blue A. Second, staining with WW781(0.1 mg/ml) was done to the ventricle for 30 min. and unbounded WW781 was washed out. The fluorescence emission spectra, which were pumped by an He-Ne laser from the ventricle, were measured in each staining and washing processes. After the first staining and washing, the fluorescence maximum was 678nm and after the second, it was 672nm. The fluorescence emission spectrum in the double stained ventricle consists of the fluorescence emission by both dyes.

1. はじめに

電位感受性色素を用いた膜電位の光学的計測は^{1), 2)}, 100箇所以上の多数点の活動電位を同時計測可能な手法として, 中枢神経の情報処理機構の解明³⁻⁵⁾や心臓の興奮伝搬の解明⁶⁾に用いられている。我々は, 心臓⁷⁾や無摘出状態のラット大脳皮質⁸⁾の活動電位の膜電位感受性色素を用いた光学計測を検討してきた。表面が平

坦でなく, 計測部位の位置的変動及び形状変形により光散乱(motion artifact)が生じる心臓などの計測では, 多点測定的方式として信号光の発生した空間的位置を把握しやすく, 2波長同時計測^{9, 10)}が容易に用いられるビーム走査方式^{11, 12)}が優れている。しかし, 測定点数が増加するのに従って, 1回の走査に要する時間が増加し測定点数は制限されてしまう。この問題

に対しては複数の光学特性が異なる膜電位感受性色素を用い、複数のビームを同時に走査する方式が有効である(図1)。また、機能の異なるプローブ色素を同時に用いることにより、膜電位と Ca^{2+} 濃度など異なる生体情報を同時に得ることが可能となる。ここでは、複数の膜電位感受性色素を用いた計測における、分光特性について検討する。

図1 複数のビームの走査による光学的
多点膜電位計測法

2. 複数のプローブ色素による光生体機能計

図2は複数の色素を用いた光プロービングの際に膜電位感受性色素などのプローブ色素に求められる分光特性を示している。(a)は2つのプローブ色素の吸収帯に重なりがなく、それぞれの色素を異なる光源で励起する場合である。吸収帯が短波長側にある”Dye-1”の蛍光放射が”Dye-2”に吸収されないようにプローブ色素を選択しなければならない。プローブ色素の例として、”Dye-1”として Ca^{2+} インジケータFura2(2波長励起340nm, 380nm, 蛍光510nm)や膜電位感

受性色素RH414(励起450nm, 蛍光580nm), ”Dye-2”として膜電位感受性色素WW781(励起632.8nm, 蛍光655nm)の組合せがあげられる。(b)は2つのプローブ色素の吸収帯に重なりがある場合であり、2つのプローブ色素を単一の光源で同時に励起する。一般に蛍光放射スペクトルは、吸収スペクトルと鏡像関係にあることが多く¹³⁾、2つのプローブ色素からの蛍光放射スペクトルも吸収スペクトル同様に重なりを持つことになる。このため2つの蛍光放射の強度差が顕著な場合、一方のプローブ色素からの生体情報が消失する可能性がある。膜電位感受性色素Nile Blue Aとメロシヤニン540(ともに励起625nm)の組合せが報告されている¹⁴⁾。

(a) Using 2 Light Sources

(b) Using Single Light Source

図2 プローブ色素の分光特性の検討

3. 異なる膜電位感受性色素による2重染色

膜電位感受性色素Nile Blue A^{7,9,14)}とWW781^{10,11,12)}を用いてコイ心室を2重染色し、試料より生じる蛍光放射スペクトルを計測し、2重染色過程を検討した。

3.1 測定系 図3に蛍光放射スペクトルの計測に用いた測定系を示す。励起光源はHe-Neレーザーであり、励起系光ファイバ出射端の光出力は1.2mWであった。蛍光の集光はセルホックレンズで行い、大口径石英光ファイバ（藤倉G800/1100L）にて分光器（日本分光CT-10）に伝送した。受光は光電子増倍管（P.M.T.）（浜松ホトニクスR374）で行い、その出力を直流増幅器で60dBほど増幅し、1nm毎に記録した。分光器の分解能は30nmである。本稿における蛍光スペクトルとは、分光器の波長の読みに対して、直流増幅器の出力電圧をプロットしたものであり、受光系及び光電子増倍管が有する波長依存性の補正を行っていない、見かけのスペクトルである。

図3 蛍光放射スペクトル測定装置

3.2 染色方法 染色方法を図4に示す。細胞膜内に透過する^{7,14)}とされているNile Blue A (0.02mg/ml)で10分間染色し、その後、細胞膜外に付着しているNile Blue Aを洗浄した。これに続いて、WW781 (0.1mg/ml)で30分間染色し、その後、10分間洗浄した。染色溶液は生理食塩水に膜電位感受性色素を溶解したものであり、染色に用いた濃度、染色時間は、実験的^{9,10)}に得られた値である。各染色、洗浄終了後、蛍

光放射スペクトルを計測し、どちらか一方の膜電位感受性色素で染色した場合の蛍光放射スペクトルと比較した。

図4 染色過程

3.3 蛍光放射スペクトル 図5に各染色、洗浄過程終了後の蛍光放射スペクトルを示す。Nile Blue A染色、その直後の洗浄後のスペクトルでは、蛍光極大は678nmで一致した。WW781染色直後のスペクトルには650~680にかけ平坦相が見られる。この時、心室表面の色は深い緑色をしていた。この後、2度目の洗浄を行うと心室本来の赤色が見えるようになり、スペクトルは672nmで極大となった。

4. 検討

2重染色後の蛍光放射スペクトルに含まれるNile Blue A, WW781の蛍光放射スペクトルの割合を検討するために、それぞれ、一方の膜電位

感受性色素で染色した場合の蛍光放射スペクトルと2重染色後のスペクトルを比較した。図6に単一染色と2重染色のスペクトルを示す。比較のため極大値を1に規格化した。2重染色後のスペクトル(太線)は、Nile Blue A染色後のスペクトルに蛍光極大の位置、形状に近いが、660nm付近ではNile Blue A染色のスペクトルよりも得られる蛍光は大きく、WW781からの蛍光の寄与が示唆される。

図5 各染色，洗浄過程の蛍光放射スペクトル

図6 単一染色と2重染色スペクトルの比較

5. まとめ

複数のビームを用いた走査型光学的膜電位計測を提案するとともに、この時プローブ色素に求められる光学特性を検討した。

[参考文献]

- 1) L. B. Cohen & B. M. Salzberg: Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., **83**, 35/88(1978)
- 2) 神野耕太郎, 広田秋彦, 酒井哲朗, 小室仁: 医用電子と生体工学, **23**, 73/80(1985)
- 3) T. D. Parsons, D. Kleinfeld, F. R. Behling & B. M. Salzberg: Biophys. J., **56**, 213/221(1989)
- 4) 塩野 悟, 中島道夫, 山田 訓, 柳浦 真美子, 前田満雄: 第4回生体生理工学シンポジウム論文集, 307/310(1989)
- 5) 松本 元, 飯島敏夫, 市川道教: 病態生理, **9-11**, 882/891(1990)
- 6) H. Komuro, T. Sakai, A. Hirota & K. Kamino: Jpn. J. Physiol. **36**, 123/137(1986)
- 7) 金山省一, 宮崎保光, 外山淳治: 信学技報 MBE85-57, 85/90(1985)
- 8) 佐藤智夫, 宮崎保光, 口脇博治: 日本レーザー医学会誌, **9-3**, 519/522(1988)
- 9) 佐藤智夫, 宮崎保光, 口脇博治: 日本レーザー医学会誌, **11**, 2, 9/15(1990)
- 10) 佐藤智夫, 宮崎保光, 口脇博治: 医用電子と生体工学, **30**, 2, 103/110(1992)
- 11) S. Dillon & M. Morad: SCIENCE, **214**, 453/456(1981)
- 12) 間瀬久康, 宮崎保光: 信学技報, MBE90-82, 15/20(1990)
- 13) 御橋廣真: In: 蛍光測定, 木下一彦, 御橋廣真編, 5/6, 学会出版センター, (1983)
- 14) F. Bezanilla & J. Vergara: BIOPHYSICAL ASPECTS OF CARDIAC MUSCLE, 229/254(1978)