微小光プローブシステムを用いた細胞膜活動電位計測 におけるレーザー光の集束特性

丸山 邦彦 宮崎 保光

豊橋技術科学大学 情報工学系

Convergence properties of laser light for membrane potential
measurement using micro optical probe system

Kunihiko MARUYAMA Yasumitsu MIYAZAKI

Toyohashi University of Technology
Department of Information and Computer Science

Abstract

The purpose of this investigation is to develop a micro optical probe system for membrane potential measurement. This system has high resolution for monitoring interaction between cells. This system is available for the analysis of functions and structures of the ion-channel. Therefore, we measured the size of the beamwaist of the laser light and the spectral properties of the voltage sensitive dye: NK-2612. In result, the beamwaist of the laser light is $1.5\mu\text{m}$. The absorption maximum is 763nm and 767nm when solvents of the dye are ethanol and Ringer's solution respectively. The fluorescence emission spectrum, the fluorescent maximum of 843 nm, could be measured in ethanol, but it could not be measured in Ringer's solution. Enough staining period of the carp's cardiac muscle to measure the fluorescence emission spectrum is 20 minutes. The fluorescence emission spectrum is monitored from the stained carp's cardiac muscle using micro optical probe system. We confirmed this system is available for the fluorescence emission spectrum.

1 はじめに

膜電位感受性色素により染色された細胞における蛍光放射および吸光の変化が、細胞膜活動電位に依存することが示されて以来¹⁾、光学的膜電位計測は電気生理学的計測と共に生体・生理機能の有効な計測方法として広く

用いられている。

光学的膜電位計測は光が照射可能な状態であれば非侵襲な計測方法であり、微小な組織、あるいは脆弱な組織、そしてこれら計測対象より多数箇所からの同時計測が可能である。レーザー光を用いた光学的膜電位計測は、レー

ザ光の単色性からS/Nの向上、また高いコヒーレント性による高空間分解能が期待されている。われわれは、細胞間にて行われている情報処理を司るとされているイオンチャネルの機能・機構を解明する手段として、サブミクロンオーダーの高空間分解能を有する微小光プローブシステムの開発に着手した。

本報告は、微小光プローブシステムのレーザー光集束特性、膜電位感受性色素 NK-2612²⁾の溶液中での吸収・蛍光放射スペクトル、生体溶媒中での蛍光放射スペクトルについて述べる。

2 微小光プローブシステム

微小光プローブのシステム構成を Fig. 1 に示す。光源のレーザーダイオード（波長:780 nm）からのレーザー光はビームスプリッタ、コリメートレンズを経て対物レンズに入射される。レーザー光は対物レンズにより集光され試料へと照射される。膜電位に応じた蛍光および励起用レーザー光の反射光はビームスプリッタにより光路を直角方向へと変更され、円筒

Fig.1 Components of micro optical probe system

レンズから光ファイバへと挿入される。反射光と蛍光の分光は分光器にて行う。そして、分光された蛍光のみを検出する。

3 レーザ光の集束特性

Fig. 2 に焦点におけるビームスポット強度分布を示す。このとき、ビームスポット径は $1.5\mu\text{m}$ であった。このことはレーザー光が焦点においてスポット径 $1.5\mu\text{m}$ に集束していることを示す。ただし、ビームスポット径は半値幅にて定義した。微小領域下における計測方法としてパッチクランプ法が広く知られている。この方法は内径 $1\mu\text{m}$ のガラス管電極を用いて計測を行っている。本システムもこれと同程度であることから微小領域下での光計測が十分に行えると考えている。

Fig.2 Image of beam waist

4 実験方法

【膜電位感受性色素】 ここではシアニン系膜電位感受性色素³⁾ NK-2612（日本感光色素研究所）を用いた。この膜電位感受性色素は吸収極大波長を780nm 付近にもち、励起用光源であるレーザーダイオードの発振波長とよく一致する。

【計測対象と染色方法】 コイより摘出した心臓を生理食塩水に5分程度浸し、摘出後の環境に慣らす。このときコイ心臓はシート状ではなく、体内にある形態を維持している。

NK-2612を0.5mg/mlの割合で含むエタノール溶液を生理食塩水により20%に希釈したもの

を染色液とし、これを溶液A と呼ぶことにする。この溶液の濃度は0.1 mg/ml である。また、濃度0.1 mg/ml のエタノール溶液を溶液B と呼ぶことにする。

【吸収スペクトル】 溶液中の NK-2612の吸収スペクトルは光路長1 cmの試料セルを用い、ダブルビーム吸光度計（島津UV-140）により計測した。

Fig. 3 Experimental set-up

【染色後のコイ心臓の蛍光放射スペクトル】

微小光プローブによる、蛍光計測の有効性を確認するため染色後のコイ心臓に励起光を照射し蛍光放射スペクトルを計測した。蛍光は先に示した光路をたどり円筒レンズから光ファイバへと挿入され、分光器へと伝送される。このとき、レンズと光ファイバの結合損失は 6.9dBであった。

5 NK-2612の分光特性

Fig. 4に溶液中の吸収スペクトルおよびレーザダイオード励起の蛍光放射スペクトルを示す。溶液A の吸収スペクトルは 763nmに吸収極大波長をもち、吸光度は 1.9であった。また吸収帯は728～788nmにあった。溶液B の吸収スペクトルは 767nm に吸収極大波長をもち、吸光度は 1.2であった。また吸収帯は 721～798 nmにあった。レーザダイオードに

より励起した場合、溶液BのNK-2612から 843 nmに蛍光極大波長をもつ蛍光放射スペクトルが得られた。しかし、溶液A からは明らかな蛍光放射スペクトルは得られなかった。これらのことは NK-2612の吸収および蛍光発光過程が色素分子の置かれた環境に依存していることを示している。

Fig. 4 Absorption and fluorescence emission spectra of NK-2612

6 染色による蛍光特性

染色時間の設定は第一に生体への負荷の減少、第二に計測に十分な信号強度を確保する上で重要である。染色後のコイ心臓からの蛍光強度の染色時間依存性をFig. 5 に示す。10分間の染色を施すと NK-2612の蛍光極大波長がある 820-840nm付近に変化があらわれる。生体信号計測に必要な蛍光放射強度を得るためには染色時間に20分程度必要なことがわかる。Fig. 6に染色後のコイ心臓の蛍光放射スペクトルの染色液溶媒依存性を示す。染色は20分間行った。溶液A により染色したコイ心臓からは蛍光放射スペクトルを得たが心臓の拍動は停止していた。一方、生理食塩水を溶媒とする染色液により染色したコイ心臓は拍動は継続しているが、明らかな蛍光放射スペクトルは得られず、生理食塩水を溶媒とする

染色液は、計測に十分な信号強度を確保する上で染色には適していないことが示された。

Fig. 5 Fluorescence emission spectra obtained from several staining periods

Fig. 6 Fluorescence emission spectra obtained from solvents of dye

7 考 察

Fig. 6より生理食塩水を溶媒とした染色液では十分な蛍光放射強度を確保することが困難である。一方、従来の染色液では生体組織への負担が少なくない。よって、生体信号計測への適用には適切な染色方法が必要である。しかし、本システムによる蛍光計測が可能であることが示され、イオンチャネル機能の光計測に対する有効な測定装置となり得る。

8 ま と め

本研究ではシアニン系膜電位感受性色素NK-2612の分光特性を示し、レーザダイオード（波長 780nm）を用いて、微小光プローブ

システムにおける蛍光計測の有効性について検討した。以下にその成果をまとめる。

- 1) 微小光プローブによりビームスポット径 $1.5 \mu\text{m}$ が得られた。
- 2) 生理食塩水中および、生理食塩水を溶媒とする染色液による染色時のコイ心臓からは蛍光放射は得られなかった。しかし、エタノール中およびエタノールと生理食塩水を溶媒とするものからは蛍光極大波 843 nm をもつ蛍光放射が得られた。
- 3) 本システムによる蛍光計測が可能であることを示した。

今後は生体組織に対する負担の少ない膜電位感受性色素の染色方法を検討し、蛍光放射強度の時間変化波形の計測を行う。

参 考 文 献

- 1) L. B. Cohen: Changes in Neuron Structure during Action Potential Propagation and synaptic Transmission, *Physiol. Rev.*, **53**, 374/418 (1973)
- 2) W. N. Ross, B. M. Salzberg, L. B. Cohen, A. Grinvald, H. V. Darila, A. S. Waggoner & C. H. Wang: Changes in Absorption, Fluorescence, Dichroism, and Birefringence in Stained Giant Axons: Optical Measurement of Membrane Potential, *J. Membrane Biol.*, **33**, 141/183 (1977)
- 3) 木下一彦, 御橋廣真: 蛍光測定-生体科学の応用, 176/177, 学会出版センター, 東京, (1983)