

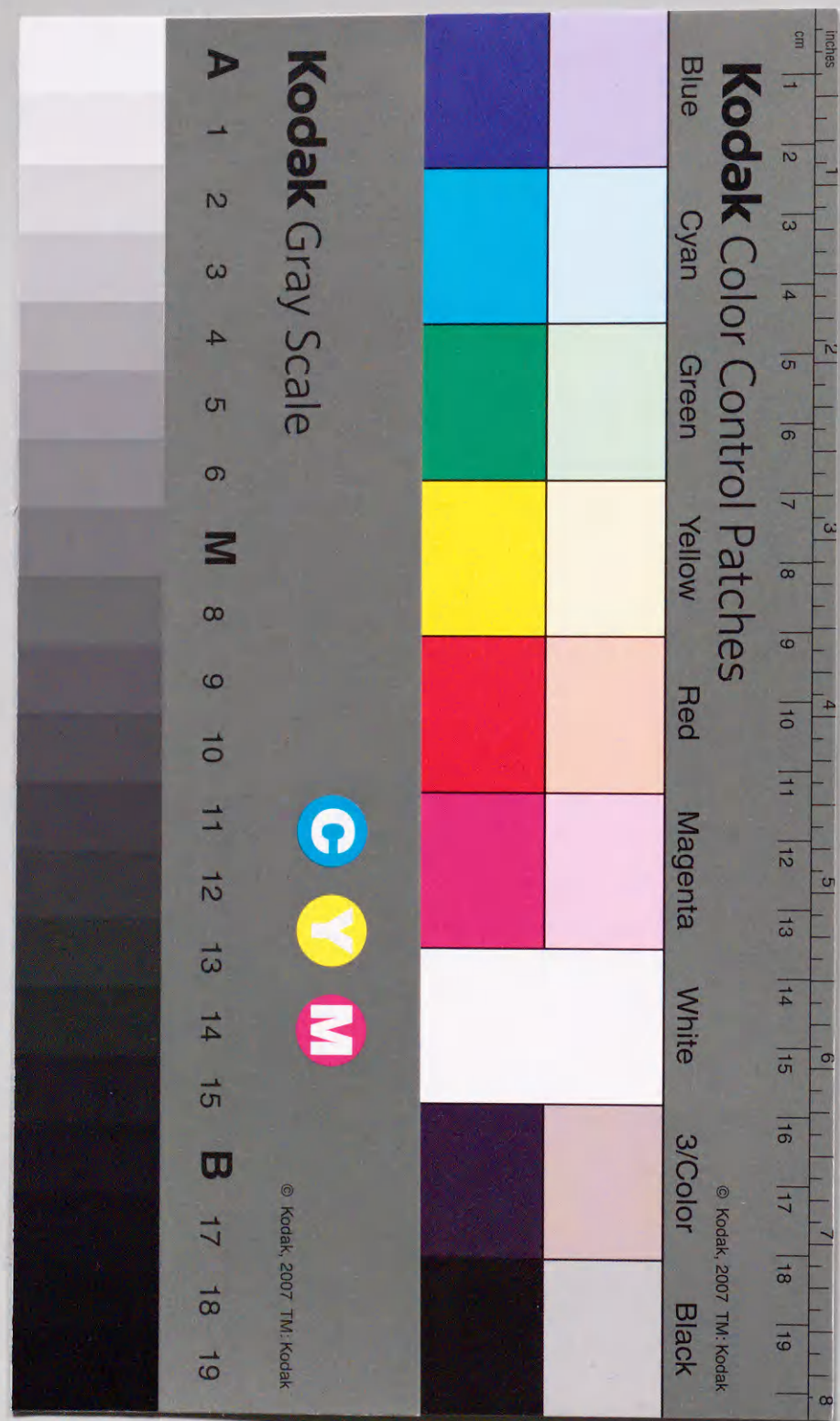
生体組織における膜電位の
光学的多波長同時計測
に関する研究

1992年3月

博士(工学)

佐藤智夫

豊橋技術科学大学



①

中
5

生 体 組 織 に お け る 膜 電 位 の
光 学 的 多 波 長 同 時 計 測
に 関 す る 研 究

1 9 9 2 年 3 月

博 士 (工 学)

佐 藤 智 夫

豊 橋 技 術 科 学 大 学

生体組織における膜電位の
光学的多波長同時計測に関する研究

要 旨

膜電位感受性色素を用いた光学的膜電位計測は、無侵襲に多数ヶ所の膜電位計測が可能であり、神経回路における情報処理機構や心臓の興奮伝搬の解明に有効な手法である。しかし、intactな状態の大脳皮質や心臓の計測では、計測領域の位置的な変動により生じる motion artifactと呼ばれる光散乱が問題となる。本論文では、レーザ光源を用いた膜電位計測装置を試作し、ラット大脳皮質、コイ心室における活動電位の蛍光計測を行うとともに、膜電位を反映しない反射光を同時に記録することにより motion artifactの検出、除去を実験的に検討した。

膜電位感受性色素として、Nile Blue A及びWW781を用いた。光源にHe-Neレーザ（632.8nm）を用い、光ファイバ、セルフォックレンズ、音響光学光変調器、分光器及び光電子増倍管により構成される、小型で汎用性の高い光学的膜電位計測装置を試作した。

座骨神経刺激による誘発活動電位をラット大脳皮質において計測した。ネンブタール麻酔下で、大脳皮質計測領域上の頭蓋骨、硬膜を切除し、0.02mg/mlのNile Blue A溶液で1時間染色した。He-Neレーザで励起した場合、蛍光放射は680nmで極大となった。大脳皮質上の計測領域と

対側の座骨神経を電氣的に刺激すると、蛍光放射は1-2%増加した。このとき、反射光強度の増加はなく、潜時は200msec程度であった。

摘出したコイの心室の自発的な興奮を、Nile Blue A及びWW781の蛍光放射を用いて光學的に計測した。心室の収縮によるmotion artifactの検出のために、分光器内にフォトダイオードを増設し、反射光を受光した。膜電位に依存する蛍光放射と依存しない反射光の時間変化波形を比較し、その差分を取ることでよりmotion artifactの除去を行った。Nile Blue A溶液で心室を染色すると、680nmで蛍光極大となり、活動電位に応じて蛍光放射は4%増加した。この蛍光放射強度変化は波長に依存していなかった。WW781を用いた場合、濃度0.1mg/mlの色素溶液で30分の染色が必要であった。蛍光放射は655nmで極大となり、活動電位に対して3%増加した。

He-Neレーザー光を音響光学偏向器で1次元にビーム走査し、コイ心室活動電位を4点より計測し、ガラス微小電極による計測と比較した。染色後の心室表面にレーザー光を照射し、WW781より生じる蛍光放射強度を1.0msec毎に計測した。心室表面上のビームスポット間隔は1.0mmであった。蛍光の受光はフォトダイオードで行い、励起光の反射と蛍光の分離はシャープカットフィルタで行った。活動電位の立ち上がりにおいて、蛍光放射強度は5%程増加した。最も離れた2点間で、蛍光放射の増加開始時刻には4msecの差があった。この時間差はガラス微小電極による計測結果と同程度であった。

A study of multi-wavelength optical measurement of membrane potential in biological cell

Abstract

An optical measurement of the membrane potential with voltage sensitive dyes, is a powerful and noninvasive method for simultaneous recording of electrical activity from multi sites of the central nerves and the heart. Motion artifact which is a light scattering arisen from movement of the measuring area and independent of the membrane potential is an important problem for the optical measurement of the membrane potential in intact cerebral cortex and heart. In this study, an optical measurement system using laser light was developed, the action potential of the intact cerebral cortex of the rat and the ventricle of the carp were measured, and the optical discrimination and removal of motion artifact were performed by comparison of two different wavelength optical intensity changes.

Nile Blue A and WW781 were used as voltage-sensitive dye. Fluorescence emission from the dyes are dependent on the membrane potential. The measurement system is composed of a He-Ne laser, optical fiber, SELFOC micro-lens, Acousto-Optical(A/O) modulator, monochromator, and PhotoMultiplier Tube(P. M. T.). A He-Ne laser was guided into the measuring area by an optical fiber. The laser spot on the measuring area has a diameter of 0.5 mm and an intensity of 0.5 mW. The fluorescence emission from the measuring area are condensed and transmitted to the monochromator by an optical pick up which consists of SELFOC micro-lens and optical fiber. This system is small, simple design and easy to use.

The evoked potential of the cerebral cortex of the rat was recorded. Rat was anaesthetized by petobarbital sodium. A 4-mm-diameter craniotomy was done over the measuring area and dura mater was removed. The cerebral cortex was stained with a solution of Nile Blue A (0.02 mg/ml in Tyrode's solution) for an hour. When the stained cerebral cortex was excited by He-Ne laser, wavelength of the fluorescence maximum was 680 nm. The fluorescence emission

intensity was increased 1-2% by electrical stimulation of opposite side sciatic nerve. The reflected light intensity did not change. The fluorescence emission was increased with a delay of 200 msec. following the stimulation.

The action potential of the isolated ventricle of the carp was monitored by fluorescence emission intensity of Nile Blue A or WW781. The heart of carp was quickly removed and bathing in Ringer's solution. The arterial bulb and the atrium were removed from the heart. The ventricle was stained for 10 min. with a solution of Nile Blue A (0.02 mg/ml in Ringer's solution) or was stained for 30 min with a solution of WW781 (0.1 mg/ml in Ringer's solution). The wavelength of the maximum fluorescence intensity from the ventricle stained with Nile Blue A and WW781 is 680 nm and 655 nm, respectively. In the case of staining with WW781, the fluorescence emission from the ventricles which were stained during short periods is weak and the staining period of 30 min is necessary to obtain a large fluorescence emission. The reflected light is detected by a photodiode mounted in the monochromator and the fluorescence emission is detected by the P.M.T. at the same time. As the fluorescence emission from voltage sensitive dye is dependent on the membrane potential and both fluorescence emission and reflected light intensities are distorted by motion artifact, the subtraction of fluorescence intensity from reflected light intensity is only dependent on the membrane potential and motion artifact from contraction of ventricle can be removed. The fluorescence emission from Nile Blue A and WW781 is increased 4% and 3%, respectively, by the action potential.

A prototype laser scanning system for the optical measurement of the membrane potential was made, and the action potentials from four measuring sites on the ventricle of the carp were measured by the scanning system. The scanning system is composed of a He-Ne laser (1.0 mW), A/O deflectors, a sharp cut color filter, a photodiode and a computer which controls A/O deflectors and stores the signals from 12 bits A/D converter every millisecond. WW781 was selected as the voltage-sensitive dye. Fluorescence emission from WW781 is sensitive

to the membrane potential. One dimensional scanning was performed and fluorescence emission intensities from four measuring sites were monitored. The beam was focused on the surface of the ventricle at one millimeter intervals. The fluorescence emission intensities increased about 5 % during rapid depolarization phase and temporal change of the fluorescence intensities were similar. The 4 msec delay between the most separated sites was recorded with the scanning method, and the delay agrees with the electrical measurement recorded with internal electrodes.

目 次

1. 序 論

1.1 はじめに	1
1.2 光学的膜電位計測	2
1.3 本論文の目的と各章の構成	8

2. 細胞膜電位の光学的計測

2.1 はじめに	10
2.2 細胞膜電位の光学的計測の現象論	10
2.3 物質の光の吸収とスペクトル	17
2.4 光の吸収と電子遷移	21
2.5 まとめ	22

3. 細胞の生理学的電位特性

3.1 はじめに	24
3.2 細胞の膜電位	24
3.3 膜の等価回路	24
3.4 細胞外電位	27
3.5 まとめ	31

4. 光ファイバ型光細胞プロービングシステム

4.1 はじめに	32
4.2 集積型光細胞プロービングシステムの構想	32
4.2.1 求められる性能	32

4.2.2	光学的手法を用いた生体組織活動電位計測装置の構想	34
4.3	膜電位感受性色素の分光特性	38
4.3.1	測定方法	38
4.3.2	オキサジン系膜電位感受性色素	39
4.3.3	オキソノール系膜電位感受性色素	42
4.4	光ファイバ型光細胞プロービングシステム	46
4.5	多波長同時計測における光学特性	50
4.6	2波長同時計測装置	53
4.7	まとめ	58
5.	大脳皮質活動電位の光プロービング	
5.1	はじめに	60
5.2	大脳皮質の生理特性	61
5.2.1	大脳皮質の構造	61
5.2.2	大脳皮質における機能局在	61
5.2.3	感覚野	63
5.2.4	体性感覚野	65
5.2.5	大脳皮質の円柱構造(機能的円柱)	65
5.3	実験及び染色方法	67
5.3.1	実験方法	67
5.3.2	染色実験	69
5.4	体感性誘発活動電位の計測	71
5.5	まとめ	76
6.	心筋活動電位の光プロービング	

6.1	はじめに	77
6.2	心臓の電気生理特性	78
6.2.1	心筋の種類	78
6.2.2	興奮伝導	80
6.2.3	心筋活動電位	80
6.2.4	興奮収縮連関	82
6.2.5	コイ心臓の活動電位	83
6.3	染色過程の検討	87
6.4	心室活動電位の2波長同時計測	96
6.4.1	Nile Blue Aを用いた計測	96
6.4.2	WW781を用いた計測	104
6.5	蛍光放射強度の膜電位依存性	106
6.6	レーザ走査による多点計測	110
6.6.1	レーザ走査型膜電位計測装置	110
6.6.2	コイ心室活動電位の多点光計測	113
6.6.3	ガラス微小電極による計測との比較	116
6.7	まとめ	117
7.	膜電位感受性色素の膜電位感受機構	
7.1	はじめに	120
7.2	外部電界による電子スペクトルの移動	121
7.3	膜電位感受性色素の大きさ	123
7.4	測定条件とスペクトル	126
7.4.1	測定方法	126
7.4.2	吸収スペクトルの濃度依存性	127

7.4.3 溶媒効果の検討	128
7.4.4 各イオンの影響	129
7.5 まとめ	130
8. 総括	134
謝辞	139
参考文献	140
研究発表	150

1. 序論

1.1 はじめに

光による生体観察は古くより行われてきた一般的な手法であり、組織の形状、色などにより生理学上、医学上の基礎的な知見が得られてきた。特に顕微鏡、各種染色方法の発達により細胞の形態が明らかになったことは重要である。近年、種々の生体機能情報が光計測され、医師の診断を支援したり、生理学の発展に貢献している[1]-[6]。例えば、血流速[7]-[10]、表面温度[11]、遺伝子配列[12]、 Ca^{2+} 濃度[13]-[23]、光細胞操作[24]-[26]、眼底検査[27]、膜電位の光計測[28]-[32]などに関する研究が活発に行われている。光計測が注目されている背景には、光通信、光計測、情報処理などの技術的発達もあげられるが、光計測以外に有効な計測法がないこと、または光計測を行うことによって、より詳細な計測が可能となることが少なくないことがあげられる。光計測の特徴は、光が照射できる状態となっていれば無侵襲な計測手法であり、微小な組織、脆弱な組織より計測が可能であること、また多数ヶ所からの計測が可能であり、機能情報に位置情報が伴うことがあげられる。さらに癌組織の光化学治療[33]-[37]のように、光を用いて癌組織と正常組織の診断が可能であるばかりか、その治療が同時に可能であることは注目すべきことであり、各種レーザ治療が行われている[38]-[43]。多数ヶ所の活動電位を同時に計測可能な光学的膜電位計測は、中枢神経系の情報処理メカニズム解明のための強力な手法であり、ここ数年、国内でも積極的な研究が進められている[44]-[52]。これらの研究で得られた高度な生体内での情報処理機構や、巧妙な生体維持機構に関する特性は、生理学上重要であるばかりではなく、工学的にもバイオコンピュータ、ニューロコンピュータの基礎を与えるために重要である[53][54]。さらに極微細ビームによるイオンチャネルの解明が可能であると考えられ、ニューロ素子、ニ

ューロ回路[55][56]や分子機能素子開発のための主要技術であると言える。

光学的膜電位計測による中枢神経系[57]-[67]、心臓[68]-[72]の興奮伝搬の解明は報告されているが、これらの報告は生理学的実験の報告が中心であり、in vivoな状態の大脳皮質[73]-[78]や心臓[79]-[80]などにおける計測のような臨床医学にすぐ結び付く報告は少ない。本論文は、レーザ光源の光ファイバ型計測装置、in vivoな状態のラット大脳皮質における座骨神経刺激の一次応答及びコイ心室活動電位の光計測に関して、研究した結果をまとめたものである。

1.2 光学的膜電位計測

膜電位と光学的変化を対応づける研究は、イカ巨大軸索において活動電位にともなう光散乱、複屈折、蛍光放射変化が測定されたことにより始められた[81][82]。膜電位変化により得られる細胞膜自体の光学特性変化は、膜を染色した場合に得られる光学特性の変化に比べて小さい。このため細胞膜を色素で染色し、その細胞を透過する光量や蛍光放射を測定し、膜電位と対応づけることが光学的膜電位計測の主流をなしている。研究の初期においては、数1000種を越す色素で、実際にイカ巨大軸索を染色し、活動電位にともなう光学的変化が調べられ[83]、現在、主に用いられているNK2761[62][67][71]、WW781[79]-[80]、RH155[45][48]-[49][64][66]、RH414[46][75][77]などの膜電位感受性色素が選出された。ガラス微小電極による従来からの計測法を補う手法として、特に、100ヶ所を越す多数ヶ所の膜電位を高空間分解能で得る方法として光学的膜電位計測は注目されている。

多数ヶ所の膜電位を同時に計測する方法は2つの手法に大別される。ひとつは、光学顕微鏡の実像面にフォトダイオードアレイなどの複数の受光素子を固定する方法であり、他のひとつは光源を走査させる方式である。フォトダイオ

ードアレイを用いる方式により $10 \times 10 = 100$ 点程度の膜電位を同時に計測可能となり、カエル視蓋[74]、ラット海馬[48][59]、カエル心房[71]などの種々の動物種、組織種の興奮伝搬が計測された。光源の走査による方式は、3次元形状を持つ対象に対して有効であるとされ[80]、哺乳類の心表面の興奮伝搬が計測されている[79][80]。

膜電位感受性色素の膜電位感受性機構については、いくつかのモデル[85][86]が示されているが、詳細は明らかにされていないと言える。これらのモデルでは経験的事実に基づき定性的な検討はなされているが、色素分子のエネルギー準位との関係は述べられていない。色素分子のエネルギー準位を検討した報告もあるが[88]、単一分子について述べられたものであり、色素分子と周囲の環境の関係や、多分子系のふるまいまでは述べられておらず、今後、さらに詳細な量子化学的検討が待たれる。

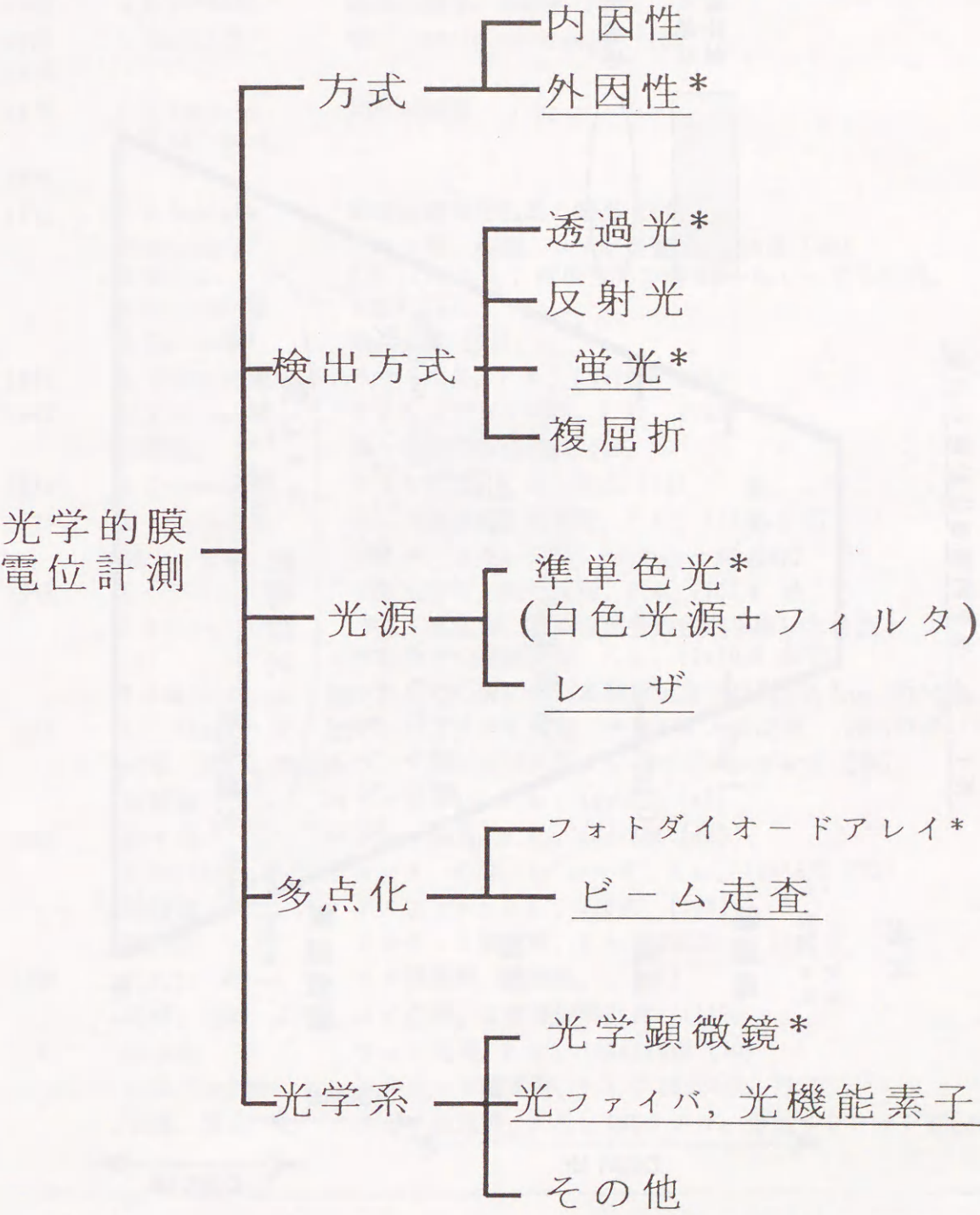
近年の動向として、“高解像度化”と“無染色での計測”があげられる。高解像度化のために、専用のフォトダイオードアレイが開発されたり、民生用のビデオカメラが用いられたりしている。フォトダイオードアレイの高解像度化はフォトダイオードの素子数を 10×10 [58]-[59][71]→ 12×12 [60]-[66][73][75]→ 24×24 [45]→700[48]と増やすことで実現され、 $128 \times 128 = 16,384$ 点の同時計測が1msec毎に可能な素子が開発されている[50]。この素子数は一般のCCD TVカメラの素子数の1/16程度にあたる。専用フォトダイオードアレイ開発による高解像度化は国内において積極的に行われている[45][48][50]。一方のビデオカメラを用いた計測[49][76][77]では、解像度は満足するものの、毎秒30コマの撮影しかできず時間分解能の不足が問題となる。これに対して低温で計測を行い生体の応答を遅らせた計測[23]や、刺激を時刻の基準とした等価サンプリングによる計測[49]が行われている。“無染色での計測”[89][90]は、染色を行っていない大脳皮質に光を照射し、その反射光を測定することにより大脳

皮質の活動を計測しようとするものである。膜電位感受性色素を用いた計測で得られる応答はmsecオーダーであるのに対して、この計測で得られる応答は秒オーダーのものであり、脳組織の代謝を反映したものであるとされている[89]。この計測法は、染色が必要ない無侵襲な計測法として注目されている。

光学的膜電位計測の分類を表1.1に示す。外因性の計測を（膜電位感受性色素を用い）、ハロゲンタングステンランプなどの白色光源と光学的帯域通過フィルタの組合せによる準単色光を光源とし、光学顕微鏡を用い、12×12程度のフォトダイオードアレイを用いて、透過光または蛍光を計測し、多数ヶ所の膜電位を同時に得る方式が、一般的である[44]-[48][50][59]-[66][69][71][73]-[75]。この方式の計測装置は、空間分解能が40~300μm、100~256点の同時計測ができ、全体として0.5~3mm四方の領域を計測できる。この方式の光源は、フィルタを交換することにより中心波長を任意に選択できるが、10nm程の半値幅を持つことになり蛍光計測の時には、蛍光波長への励起光の回り込みが問題となる。一方、レーザ光源は強力な単色光源ではあるが、発振波長を任意に選択できないこと、膜電位感受性色素の分光特性が詳細に検討されていなかったため、光源として用いられることは少なかった[57][58][70][72][78]-[81]。

神経系、心臓における光学的手法による膜電位の多点計測が行われた計測対象例を表1.2、表1.3にまとめる。従来の方式では光学顕微鏡を用いたため、顕微鏡のステージに載せることが出来ないような大型の動物や組織の計測例は少なく[75][76]、実験方法としては、計測対象である神経系を生体外に摘出し培養したり[57]-[66]、カエル心房を摘出後、心房を開きシート状[71][79]にしたりして計測するin vitroな計測が主として行われた。これに対して、計測対象が生体外へ摘出されてはいるが、スライス等の処理はされておらず生体内での形態を保っているintactな状態での計測や、計測対象が生体内にある状態でのin vivoな計測例は少なかった。

表 1. 1 光学的膜電位計測の分類



*従来の光学的膜電位計測
——本論文の手法

表 1. 2 光学的膜電位計測の対象

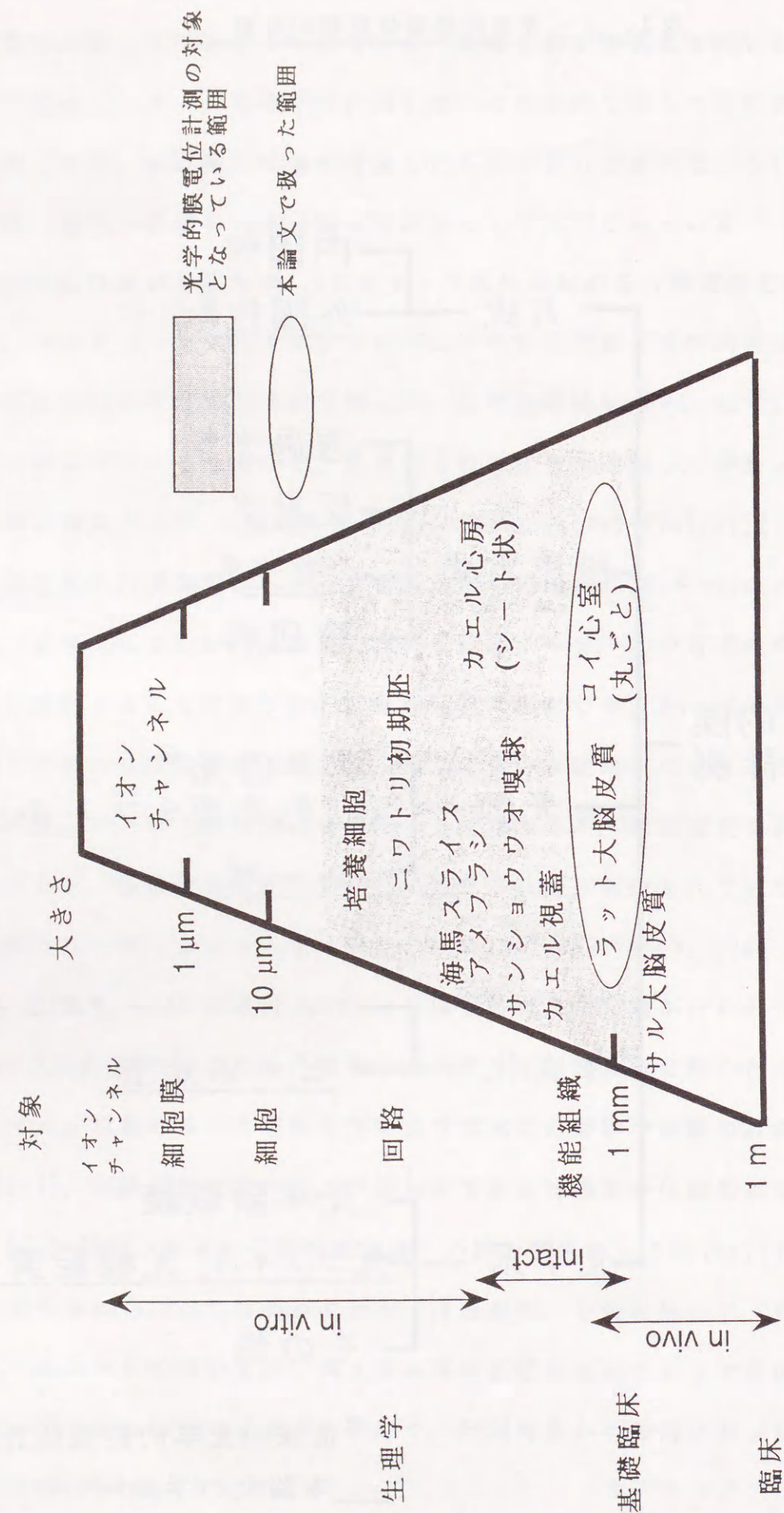


表 1. 3 光学的膜電位計測の歴史

年代	研究者	[参考文献]
1968	L. B. Cohen他	透過光強度, 複屈折 [82]
1969	I. Tasaki他	蛍光 (Acridine Orange) [83]
1970		
1978	L. B. Cohen & B. M. Salzberg	初期の総説 [28]
1980		
1981	R. K. Gupta他	膜電位感受性色素の調査 [84]
	S. Dillon & M. Morad	ネコ・蛙, 心臓, レーザ走査式, 128点 [79]
	A. Grinvald他	N1E-115, P. A., 準単色光の他にHe-Neレーザも使用, 9x9点 [59]
	K. Kamino他	鶏, 心臓 [69]
1982	A. Grinvald他	ラット海馬, P. A., 10x10点 [59]
1983	H. S. Orbach他	サンショウウオ嗅球, P. A., 124点 [73]
	神野他	鶏, 初期胚の心機能 [69]
1984	A. Grinvald他	カエル視蓋, P. A., 96点 [74]
1985	H. S. Orbach他	ラット視覚野, 感覚野, P. A., 124点 [75]
	金山, 宮崎, 外山	カエル・コイ, 心筋, He-Neレーザ [81]
1986	G. G. Blasdel他	サル視覚野, 慢性実験, P. A. [76]
	A. Grinvald他	ラット視覚野, 膜電位感受性色素を用いた計測と無染色での計測比較, P. A., 10x10点 [89]
	K. Kamino他	カエルの心房における興奮伝搬の計測, P. A., 10x10点, [71]
1988	J. S. Kauer	サンショウウオ嗅球, テレビカメラ使用, 128x128点 [77]
	佐藤, 宮崎, 口脇	ラット大脳皮質, 光ファイバプロービング [78]
	塩野他	アメフラシ, P. A., 10x10点 [45]
1989	松本他	ラット海馬, P. A., 16x16点 [48]
	W. Muller他	ラット, 心筋, Ar ⁺ レーザ, P. A., 16x16点 [72]
	塩野他	アメフラシ, P. A., 448点, [129]
	福西他	モルモット聴覚野, P. A., 2x2点 [46]
1990	D. Y. Ts'o他	サル視覚野, 無染色, [90]
	佐藤, 宮崎, 口脇	コイ心室, 2波長同時計測 [117]
1991	松本他	ラット海馬, P. A., 128x128点 [50]
	Hukunishi他	モルモット聴覚野, P. A., 12x12点, [130]
	谷藤, 外山	ラット視覚野, P. A., CCDカメラ, 等価サンプリング[49]

P. A. : Photodiode Array

1.3 本論文の目的と各章の構成

本論文では、光ファイバセンサ型膜電位計測装置開発の基礎を与えることを目的とし、レーザ光源、セルフォックレンズ、光ファイバ、光変調器などの光通信技術を応用した光学系を試作し、またビーム走査法による多数ヶ所の同時測定の基礎的検討を行った。また、脳外科、心臓外科手術中の異常興奮部位の検出などの臨床応用のための基礎的特性を得ることを目的とし、無摘出なラット大脳皮質や、摘出はしているもののコイ体内と同じ形態をしているコイ心室の活動電位の光計測を行った。特に、生体の動きによる光信号の消失 (motion artifact) には多波長同時計測を試みた。

本論文は8章からなる。各章の目的と概要は次の通りである。

第1章では、本研究の背景となる光学的膜電位計測の研究の状況を述べ、本研究の位置づけを示した。

第2章では、光学的膜電位計測の実際についてより詳細に述べるとともに、そのメカニズムについてメロシアニン540のモデルを用いて述べる。また、物質の光吸収と吸収スペクトル、反射スペクトルについて述べる。さらに吸収、発光スペクトルとエネルギー準位について述べ、光学的膜電位計測の基礎を与える。

第3章では、生体電気現象を概説し、興奮により細胞外に生じる電位分布についての理論的検討の基礎を与える。

第4章では、光集積型膜電位計測装置の構想を述べ、構想に基づいて試作した光ファイバ型膜電位計測装置について述べる。また、本研究で用いた膜電位感受性色素の分光特性について述べ、反映される生体情報が、波長により異なることに注目した多波長同時計測について、その光学特性を示す。さらに、反射光と蛍光放射の2波長の光強度を同時計測可能な装置について、その試作ならびにその基本性能について述べる。

第5章では、大脳皮質の生理学的特性を述べたのちに、座骨神経刺激時に大脳皮質に生じる誘発活動電位の光計測について述べる。

第6章では、心臓の電気生理学的特性を述べたのちに、コイ心室活動電位の2波長同時計測について述べる。さらに、光機能素子のひとつである音響光学効果による光偏向器を用いた、心室活動電位の多点計測について述べる。

第7章では、膜電位感受性色素のメカニズムの基礎的検討を、実験的、理論的に行う。

第8章において、本論文を総括する。

第2章 細胞膜電位の光学的計測

2.1 はじめに

本章では、光学的膜電位計測について、その現象論として計測の実際と特徴について、またレーザ光源を用いた場合の利点について述べる。次に物質の光の吸収とスペクトルについて述べる。また光の吸収にともなう電子遷移について、7章において色素の膜電位感受機構を検討する際の基礎を与える。

2.2 細胞膜電位の光学的計測の現象論

光学的膜電位計測は細胞の膜電位を光学的な変化として捕らえようとするものである。すでに第1章で、神経線維などの興奮性細胞膜の活動電位にともなう光学的変化は、細胞膜自体の光学変化に由来する内因性のものと、膜を特殊な色素で染色した場合に生じる外因性のものの2種類に分類されることを述べた。内因性の変化は膜の光散乱、複屈折に由来するものである。また外因性の変化は蛍光、吸光の変化として現れる。図2.1はその概念を示している。最近の研究では細胞膜自体の吸光特性の変化と膜電位を結び付ける内因性の報告[57]よりは、膜電位感受性色素あるいはVoltage-sensitive dyeと呼ばれる特殊な色素を用いる外因に基づいた計測が主流をなしている[57]-[66][68][69][72][73]-[75]。

膜電位感受性色素は、神経の興奮のような一過性の速い応答の計測に向く“fast response dye”と赤血球の膜電位のような懸濁系の遅い応答の計測に向く“slow response dye”に大別される。現在用いられている主要な膜電位感受性色素[91]を図2.2に示す。これらの色素は、1000種類を越す色素の中から、膜電位変化に対して光学的変化が大きく、毒性及び薬理効果が少ないものとして選出されたものであり[84]、いずれも“fast response dye”に属している。

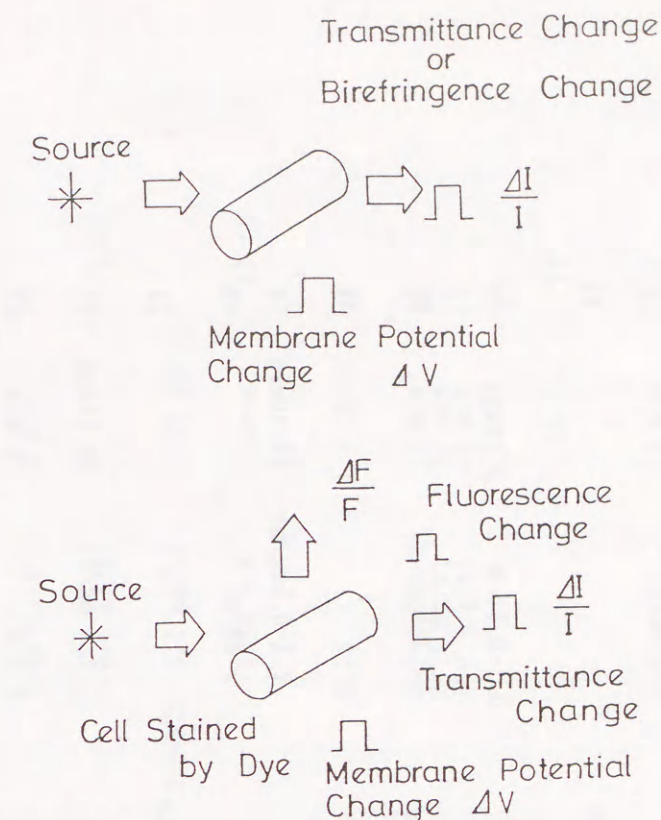


図2.1 光学的膜電位計測の概念

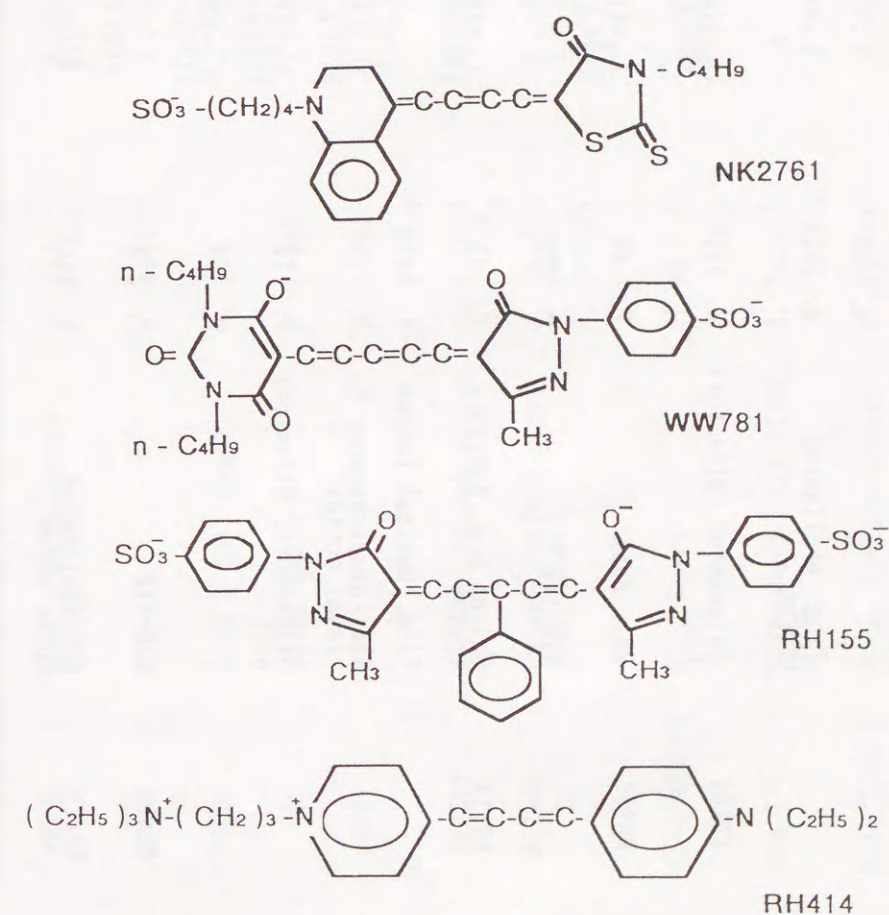


図2.2 代表的な膜電位感受性色素

表 2. 1 代表的な色素とその光強度変化の大きさ

Dye	Preparation	Signal Size	Wavelength(nm)	Staining conditions Concentration	Period	References
RH155	Aplysia	A, 5×10^{-4}	$\lambda_t = 710$	0.3 mg/ml	10 min	45,
		A, 10^{-3}	$\lambda_t = 700 \pm 25$	0.1-0.3mg/ml	10 min	64
		A, 2×10^{-4}	$\lambda_t = 705 \pm 25$	1 mg/ml		63
RH160	Salamander, Olfactory bulb	F, 5×10^{-2}	$\lambda_s = 510$ or 540 $570 < \lambda_m$			73
RH237	Rat, Heart	F, 4%	$\lambda_s = 514.5^{1)}$ $550 < \lambda_m$	0.1-0.5 μ M	8-12min	70
		F, 12%		1 μ M		61
RH414	Guinea pig, Auditory cortex	F, 10^{-3}	$\lambda_s = 420-490$ $580 < \lambda_m$,			46
	Frog, Optical tectum	F, 5×10^{-3}		0.1-0.5mg/ml	20-30min	74
	Rat, Somatosensory & visual cortex	F, 10^{-3}	$\lambda_s = 520 \pm 45$ $570 < \lambda_m$	2 mg/ml		75
	Salamander, Olfactory bulb	F, 10^{-2}	$\lambda_s = 510$ or 540 $570 < \lambda_m$			73
	F,		$\lambda_s = 530$ $610 < \lambda_m$	1.5 mg/ml	20-25min	77
RH421	N1E-115	F, 21%	$580 < \lambda_m$	5 μ M	5 min	61
RH461	Rat, myelinated optic nerve	A, 5×10^{-4}	$\lambda_t = 546$	100 μ M	micro-injection	66
RH795	Rat, somatosensory cortex	F, 3×10^{-4}	$\lambda_s = 530 \pm 70$ $610 < \lambda_m$	0.1 mg/ml	90 min	89

表 2. 1 代表的な色素とその光強度変化の大きさ (続き)

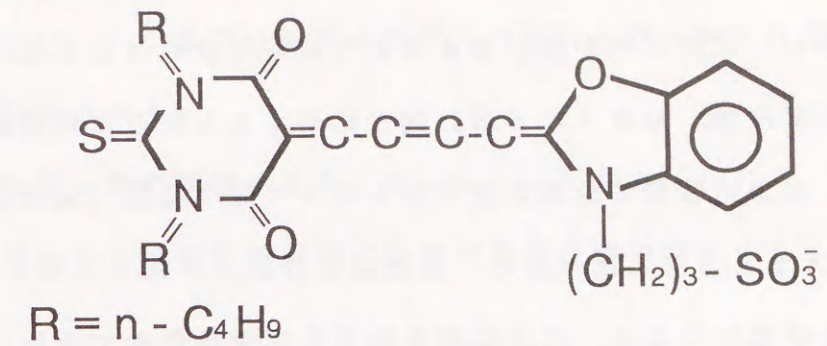
Dye	Preparation	Signal Size	Wavelength(nm)	Staining conditions Concentration	Period	References
RH795	Rat, somatosensory cortex	F, 3×10^{-4}	$\lambda_s = 530 \pm 70$ $610 < \lambda_m$	0.1 mg/ml	90 min	89
WW401	N1E-115	A, 5×10^{-4}	$\lambda_t = 690 \pm 15$	0.04-4 μ M	5 min	60
WW781	Frog & cat, Heart	F, 10%	$\lambda_s = 632.8^{2)}$ $645 < \lambda_m$	0.1 mg/ml		79, 80
			$\lambda_s = 632.8^{2)}$, $\lambda_m = 670$	0.1 mg/ml	30 min	
WW802	N1E-115	F, 1-5%	$\lambda_s = 632.8^{2)}$ $665 < \lambda_m$	5-30 μ M	5min	58, 60
NK2367	Monkey, Visual cortex	A(?), 10^{-3}	$\lambda_r = 720 \pm 25$	0.1%	0.5-1hour	76
NK2761	Chick, Brain & heart frog, Heart	A, 10^{-3} A, 10^{-3} A, $\sim 0.3\%$	$\lambda_t = 702 \pm 13$ $\lambda_t = 700 \pm 11$ $\lambda_t = 700 \pm 70$	0.1-2.0mg/ml 0.15 mg/ml 100 μ g/ml	15 min 30 min 25 min	65 71 62
di-4-ANEPPS	Rat, Heart	F, 9%	$\lambda_s = 514^{1)}$ $630 < \lambda_m$		10 min	72
Dye XVII	Salamander, Olfactory bulb	A, 5×10^{-3}	$\lambda_t = 750$	0.5 mg/ml	10 min	73
Nile Blue A	Frog, Semitendinous muscle	F, 1%	$\lambda_s = 625$ $665 < \lambda_m$	0.001mg/ml	10 min	103
			$\lambda_s = 632.8$, $\lambda_m = 680$	0.02 mg/ml	10 min	81, 117

A: 透過光式. λ_t : 透過光波長. λ_r : 反射光波長. F: 蛍光式. λ_s : 励起波長. λ_m : 蛍光計測波長.

1) Ar⁺レーザ. 2) He-Neレーザ.

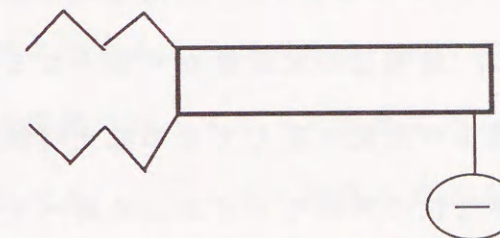
表2.1にそれぞれの色素を用いた計測例と信号の大きさを示す。

膜電位感受性色素のメカニズムについてはその詳細が明らかにされていない。少なくとも，“fast response dye”と“slow response dye”では，その膜電位感受機構は異なっていると考えられる。ここでは，“fast response dye”の代表的なメカニズムとして，メロシアニン540（Merocyanine540）（以下，M-540と略す。）の膜電位感受機構[85]について述べる。M-540の分子構造を図2.3に示す。M-540はメオバルビタール酸にアルキルが付いた疎水性部分（X）と硫酸基（SO₃⁻）を末端とする親水性部分（Y）がメチン鎖（=C-C=C-）で結合された構造となっている。細胞膜をM-540で染色した場合，親水性の硫酸基が細胞膜の外に残りアンカー（錨）の役目を果たす。また残りの部分は疎水性部分より細胞膜内に取り込まれて行く。膜が静止状態にある時，細胞膜に取り込まれた部分は膜面に対して平行になる。この時，色素分子は，モノマ（monomer：単量体）と2つの色素分子が結合したダイマ（dimer：2量体）が混じりあった状態にある（図2.4Ⅰ）。膜が脱分極（興奮）すると，ダイマ状態にある色素分子の結合が解け（図2.4Ⅱ），さらにモノマ状態の色素分子はアンカーを中心にピポットターン（軸回転）し膜面に垂直になろうとする（図2.4Ⅲ）。光学的にはM-540の光学特性はモノマとダイマで異なる。すなわち，モノマ状態では極大吸収波長はλ_{max}=570nmであり，蛍光は生じ易い。これに対して，ダイマ状態ではλ_{max}=520nmであり，蛍光は生じ難い。このため波長570nmの光の透過強度を用いて膜電位を計測すると，脱分極により透過光強度は減少し，逆に波長520nmの透過光強度を使って計測した場合，透過光強度は増加することになり，脱分極による透過光強度変化の波長依存性が説明できることになる。しかし，fast response dyeにおいても，RH414のようにアンカーとなる疎水性部分がないものもあり，このメカニズムは全ての膜電位感受性色素に当てはまるわけではない。



(a) Molecular Structure

(b) X = C-C=C-C = Y



(c) Structure model

図2.3 メロシアニン540

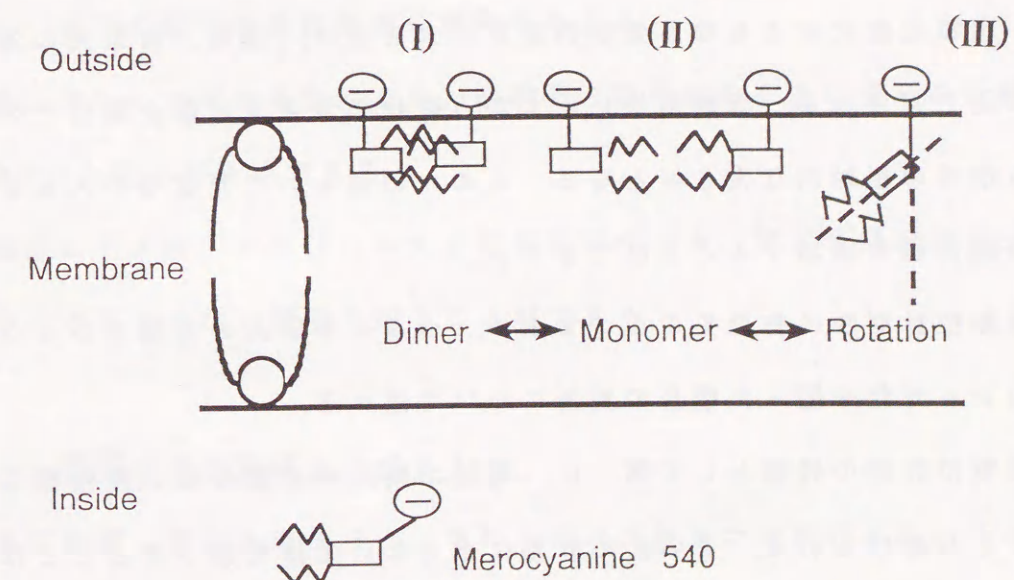


図2.4 メロシアニン540の膜電位感受機構

実際に光学的膜電位計測を行うためには、試料を生体から摘出したり、試料上の組織を切除し、試料に光が照射できるようにしなければならない。このため脳波、体表面電位図、MRIなどの計測と比較すると完全に無侵襲な計測とは言えないが、従来の膜電位計測方法であるガラス微小電極（先端径 $0.5\sim 1\mu\text{m}$ ）を試料に刺入する方法と比べると、無侵襲な計測法であると言える。試料に光が照射できる状態になると、次に試料を膜電位感受性色素で染色しなければならない。生理食塩水中に膜電位感受性色素を溶解し、染色液とする。in vitroな計測であれば試料の周囲に染色液を満たし（試料を染色液に浸し）、試料を染色する。しかし、in vivoな計測の場合、染色は工夫を要する。染色のために10分～1時間程度必要である。染色後、S/N向上のために細胞膜に取り込まれなかった色素を洗い流し、膜電位の光計測が可能となる。

染色された細胞膜は膜電位の変化に応じてその吸光特性、蛍光特性を変化させる。この時膜電位と光学特性の関係をあらかじめ調べておけば、細胞内に電極を刺入することなく膜電位を計測できることになる。膜電位の変化は膜電位感受性色素に光化学的变化を生じさせ、膜電位感受性色素の光学的特性を変化させる。そして我々はこの光学的特性の変化を測定し膜電位と対応付けていると言える。膜電位変化にともなう光学的变化の大きさは、通常、背景光に対する変化分の比で表される。活動電位にともなう変化の大きさは静止電位での強度に対する信号の相対的な大きさとなる。このため得られた光信号の大きさから膜電位の絶対値を議論することはできない。

光学的膜電位計測法の特徴をここでまとめ、つぎに本研究の主題のひとつである光源のレーザ化を図った場合の長所について述べる。

光学的膜電位計測の特徴として第一に、電極の刺入の必要のない無侵襲な測定であることがあげられる。このため計測にともない生体を傷つけることはない。

第二に、ガラス微小電極が刺入できない微小細胞における測定が可能であることがあげられ、今日までの電気生理学では研究されなかった分野についての研究成果が期待される。

第三に、多数ヶ所の同時測定が可能になることがあげられる。シナプスにおける学習の研究などの脳機能組織や心臓の興奮伝搬の解明のための強力な手法である。

本研究では膜電位感受性色素を励起する光源としてレーザ光を用いるが、前述の三つの特徴に次の四つの特徴を付け加えられる。その第一は白色光に比べレーザ光は指向性に優れていることである。これにより計測部位に選択的なレーザ照射を行い背景雑音を低減させるばかりではなく、レーザ光照射による生体のダメージを最小限に留めることができる。また複数の神経線維が存在する測定対象中で特定神経線維に沿ってビーム走査することにより、その神経線維の活動電位のみを抽出でき、ビーム径を変化させることにより同一装置で単一細胞の膜電位の計測から機能円柱などの機構組織の活動までを計測可能である。

第二は光ファイバや光機能素子[92]-[97]を容易に使用できることである。このことは計測システムの小型化に役立ち、さらに将来実現するであろう光コンピュータでの信号の直接処理の期待を与える。

第三にレーザ光の単色性より、励起光と信号成分を含む蛍光の分離が容易にできS/Nの向上が期待できる。

第四にナノ秒・ピコ秒パルスをお容易に形成でき、定常光励起蛍光分光法では得ることのできない情報を得ることができる。

2.3 物質の光の吸収とスペクトル

ある物質に光が入射すると、その一部は反射または吸収され、その残りが透過する過程を繰り返す。光の吸収はBeer-Lambertの法則で定量的に記述される。

単色光に対しては

$$\log \frac{I_0}{I_t} = \epsilon l c = E_t \quad (2.1)$$

で与えられる。ここで I_0 は入射光強度、 I_t は透過光強度である。濃度 c を mol/l で、光路長 l を cm で与えたとき、 ϵ を分子吸光係数と呼ぶ。分子吸光係数は、ある分子がある波長の単色光をどれだけ吸収するかを示すものである。

ϵ は波長により異なるので、 ϵ の波長による変化を示す曲線 $\epsilon(\lambda)$ 、あるいは ϵ の相対値としての $E(\lambda)$ を吸収スペクトルと呼ぶ。本論文では吸光度の波長変化 $E(\lambda)$ を吸収スペクトルと呼ぶことにする。

この時、発光現象がみられるならば、発光の強さを波長に対して示したものが、蛍光、燐光スペクトルである。物質が光により励起されたとき、そのエネルギーを光として放出したものが蛍光及び燐光である。寿命の短い 1 重項状態からの発光が蛍光であり、寿命の長い 3 重項状態からの発光が燐光である。蛍光物質に光を照射したときに発する蛍光強度の波長分布を示したのが蛍光放射スペクトルで、励起光に対する蛍光の吸率を励起光の波長に対してプロットしたものが蛍光励起スペクトルである。一般に蛍光帯は吸収帯に比べ、分子構造の変化やまわりの環境の影響を受けやすい。このため蛍光帯の位置（極大波長）及びその大きさが大きく変化する。

直接測定される物理量と調べたい物理量は必ずしも同一ではなく、直接測定はできても、間接的に測定する方が容易であったり、正確であったりすることがある。光の計測でも 2 つの形式の計測が行われる。蛍光であればその光束（F）が直接計測される。しかし、吸収の測定では物質に吸収されなかった残りとしての透過光を測定し、吸収の強さを求めている。ここで透明体に入射光 I_0 が、平行光束で垂直に入射したときを考える。このとき単位面積、単位時間あたり I_{abs} だけエネルギーが吸収され、 I_t が透過したとすると、

$$I_0 = I_{abs} + I_t \quad (2.2)$$

が成り立つ。 I_0 と I_t を測定すれば I_{abs} を求めることができる。

さらに、図 2.5 のような色素溶液（不透明な物質）に光が入射した場合を考える。色素溶液を透過して来る光は、色素分子の光吸収と溶媒分子の光吸収に依存し減衰する。溶媒分子が水やアルコールの様に透明である場合、可視光領域を考えるのであれば、透過光強度は色素分子の吸収に大きく依存している。ところで、色素分子に光が照射されると、色素分子で光吸収が生じるとともに、入射光は色素分子で反射される。この反射光も色素分子の光吸収に依存し、その強度を変える。このため色素溶液には“色”が付いて見え、反射スペクトルを測定することにより物質の光吸収を知ることができる。

図 2.6 はエタノール中の WW781 の吸収スペクトルを、透過光及び反射光より求めたものである。透過光より求めた吸収スペクトル E_t は式 (2.1) で与えられる。反射法 [97] によるスペクトル E_r は、次のようにして求めた。得られた反射光を I_r とすると、反射率 R は

$$R = \frac{I_r}{I_0} \quad (2.3)$$

で与えられ、 R を減光単位に直し、 E_r を

$$E_r = -\log(R) = \log \frac{I_0}{I_r} \quad (2.4)$$

で定義する。測定精度を考慮すると、吸収極大（ λ_{max} ）、吸収スペクトルの形状は、一致していると言える。このように、物質の光吸収が増大すると、透過光、反射光ともに減衰し、式 (2.5) を満足することがわかる。

$$I_0 = I_r + I_{abs} + I_t \quad (2.5)$$

吸収スペクトルを考えるときには透過光、反射光のいずれか、物理的に測定しやすいものを測ればよいことがわかる。

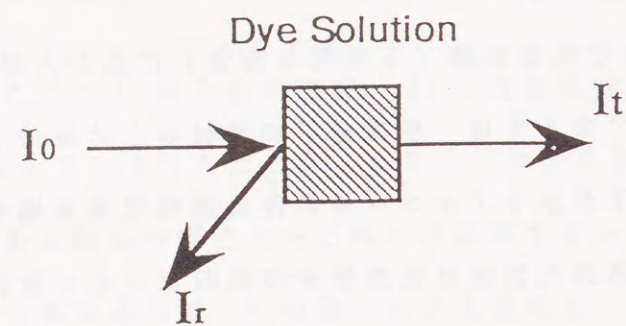
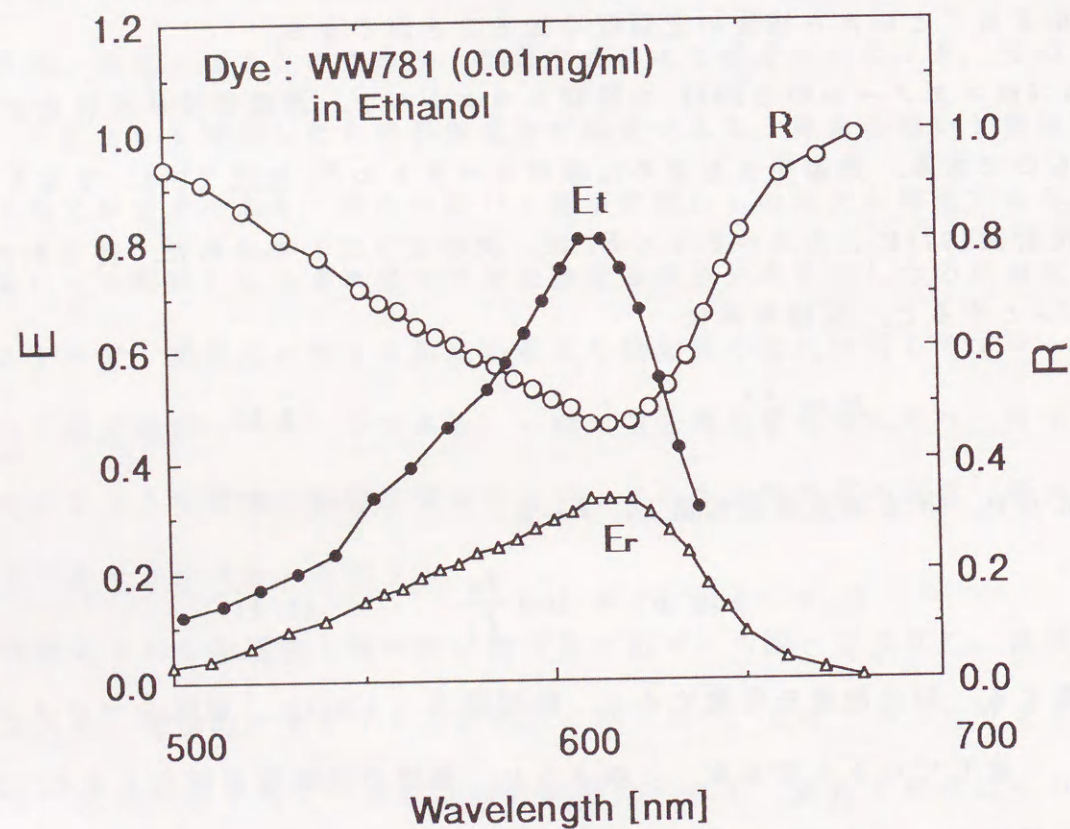


図 2. 5 不透明な物質への光の入射



$$E_t = \log(I_0/I_t) \quad E_r = \log(I_0/I_r) \quad R = I_r/I_0$$

図 2. 6 WW781 の吸収スペクトル

2.4 光の吸収と電子遷移

溶液中の色素分子のエネルギー準位は図2.7の様に模式的にかける[98][99].

図2.7は”Jablonski図”と呼ばれており、エネルギー準位間の遷移を表している。各エネルギー準位を簡略に述べる。

基底状態（G）にある分子は共鳴する光の照射を受けると、 10^{-15} sec程の過程で遷移する。この時、各原子の位置はFranck-Condon法則により変わらない。また、原則的に光の吸収により分子のスピンの状態は変化せず、よって基底1重項から基底3重項への電子遷移は通常観測されない。

光吸収直後の励起分子は普通過剰なエネルギーを持っており、他の分子と衝突により振動エネルギーを失いながら準安定状態の低い振動エネルギーへ落ちて行く。この過程は $10^{-9} \sim 10^{-12}$ secで起きる。

高エネルギー準位の S_2 、 T_2 は S_1 、 T_1 に比べ寿命が短い。 S_2 、 T_2 の振動準位と S_1 、 T_1 が重なった点で2つの状態は同じポテンシャルエネルギーを持ち、原子配置も等しい。この点を経て S_2 より S_1 、 T_2 より T_1 へ変換する過程を内部遷移と呼ぶ。この過程は $10^{-13} \sim 10^{-14}$ secで起きる。

スピンの異なる励起状態間の内部変換を系間交差と言い、 10^{-6} secほど要する。一般に $S_1 \rightarrow T_1$ で起こることが多いが、 $S_2 \rightarrow T_2$ でも起こりうるし、またエネルギーの状態によっては $S_2 \rightarrow T_1$ や $S_1 \rightarrow T_1$ でも起こりうる。

発光現象としては $S_1 \rightarrow G$ 発光の蛍光（ $10^{-6} \sim 10^{-9}$ sec）、 $T_1 \rightarrow G$ 発光の燐光（ $10^{-1} \sim 1$ sec）がある。また最低励起状態より輻射を伴わないで基底状態へ戻る無輻射失活もある。

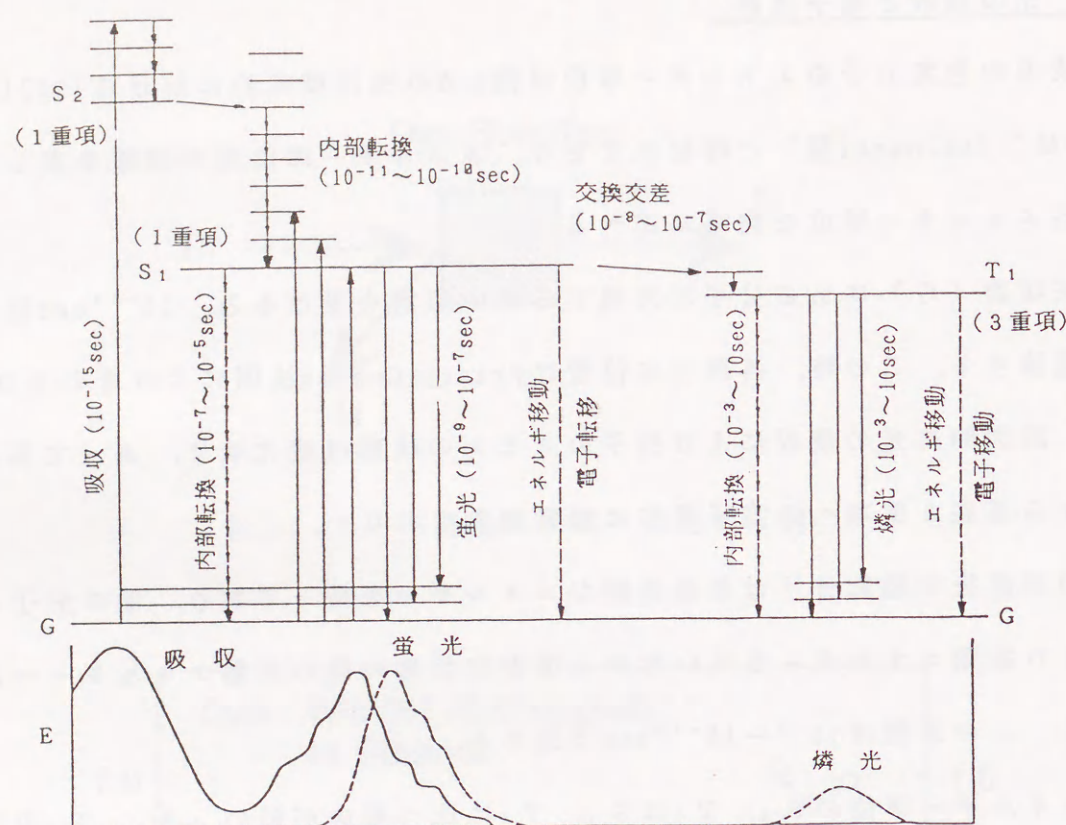


図 2. 7 分子の光吸収と蛍光・燐光の諸過程

2.5 まとめ

膜電位感受性色素を用いた（外因性の）光学的膜電位計測を現象論的に説明するために、代表的な”fast response dye”の分子構造を示すとともに、実際の計測の手順を述べた。さらに、”fast response dye”の膜電位感受機構の一例として、メロシアニン540（Merocyanine540）の”monomer \rightleftharpoons dimer”モデルについて定性的に述べた。また、光学的膜電位計測の特徴について述べ、さらにレーザ光源を用いた場合に生じる長所について述べた。

次に物質における光の吸収、発光現象とそのスペクトルについて述べた。特に、吸収スペクトルの測定例として、透過法及び反射法で測定した膜電位感受

性色素WW781の吸収スペクトルを示し、測定される物理量と吸収スペクトルの関係を明らかにした。さらに光吸収によって生じる電子の状態遷移について”Jablonski図”を用いて定性的に述べ、電子の遷移とスペクトルの関係を明らかにした。

3 章 細胞の生理学的電位特性

3.1 はじめに

この章では、本研究を進める上で必要な電気生理学的知見について述べる。大脳皮質や、心臓及び心筋の電気生理学的特徴については、それぞれ5章、6章で述べるとして、ここでは神経細胞、筋細胞などの興奮性細胞の特徴である細胞膜の興奮現象について述べる。また神経細胞、筋細胞の形状を円筒形とし、細胞外の電位分布の理論的な検討を行い、細胞の興奮時に膜電位感受性色素に加わる電界を検討する際の基礎を与える。

3.2 細胞の膜電位

細胞は特定イオンのみを選択的に透過する特殊な膜により外界と隔てられており、細胞内の各イオン濃度は外液のそれと異なる。そこで細胞の内外にはNernstの式に従う電位差が生じる。細胞の膜電位は Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- などにより生じる電位差の総和である。ところで濃度が異なる溶液が隣接すれば、高濃度側より低濃度側へ拡散が生じる。細胞内外のイオン濃度は図3.1のように外液の Na^+ 濃度が内部に比べ高く、細胞内の K^+ 濃度は低い。そこで Na^+ は細胞内に流入しようと、 K^+ は逆に流出しようとする。細胞膜には細胞内に流入した Na^+ をくみ出し、細胞外より K^+ を取り込むある種のポンプが存在する。これをナトリウムポンプと呼ぶ。一般に細胞内のイオン濃度はナトリウムポンプにより一定に保たれている。

3.3 膜の等価回路

神経線維などの興奮性膜ではインパルスあるいは活動電位と呼ばれる電位差の逆転現象が起こる。この現象は細胞内外のイオン濃度が逆転するために起こ

る。細胞が興奮していない状態にある時は図3.2のよに細胞の電位は陰性を示す。これを静止電位と呼ぶ。この細胞膜にある一定値（閾値）以上の刺激電流を加えると以下の現象が起きる。

(1) 細胞膜における Na^+ 透過性が一次的に増加し、 Na^+ が細胞内に流入する。

Na^+ の流入により細胞内は陽性になり、脱分極（オーバーシュート）が生じる。

(2) Na^+ 透過性は元に戻る。

(3) K^+ 透過性が増加するために K^+ が細胞外に流出し膜電位は静止状態に戻る。

(4) ナトリウムポンプにより Na^+ は排出され、 K^+ は細胞内に取り込まれて静止状態に戻る。

インパルスの発生は閾値以上の刺激が加わると、刺激の大きさに関係なく一様な大きさの興奮が起こる。このことを全か無かの法則と呼ぶ。インパルス発生メカニズムはHodgkinとHuxleyにより図3.3のよにモデル（H-Hモデル）化されている。H-Hモデルではイオンゲートが開閉することにより変化する Na^+ 、 K^+ 透過性の変化を、各イオン電流に対するコンダクタンスの変化として記述している。

カエルの筋			ヤリイカの軸索		
外部	内部		外部	内部	
Na^+ 120	Na^+	9.2	Na^+ 460	Na^+	50
K^+ 2.5	K^+	140	K^+ 10	K^+	400
Cl^- 120	Cl^-	(3-4) (A^-)	Cl^- 540	Cl^-	40-100
				イセチオン酸塩 $^-$	270
				アスパルキソ酸塩 $^-$	75
		-90mV			-60mV

図3.1 細胞膜内外の電解質濃度 (mM/ℓ) [101]

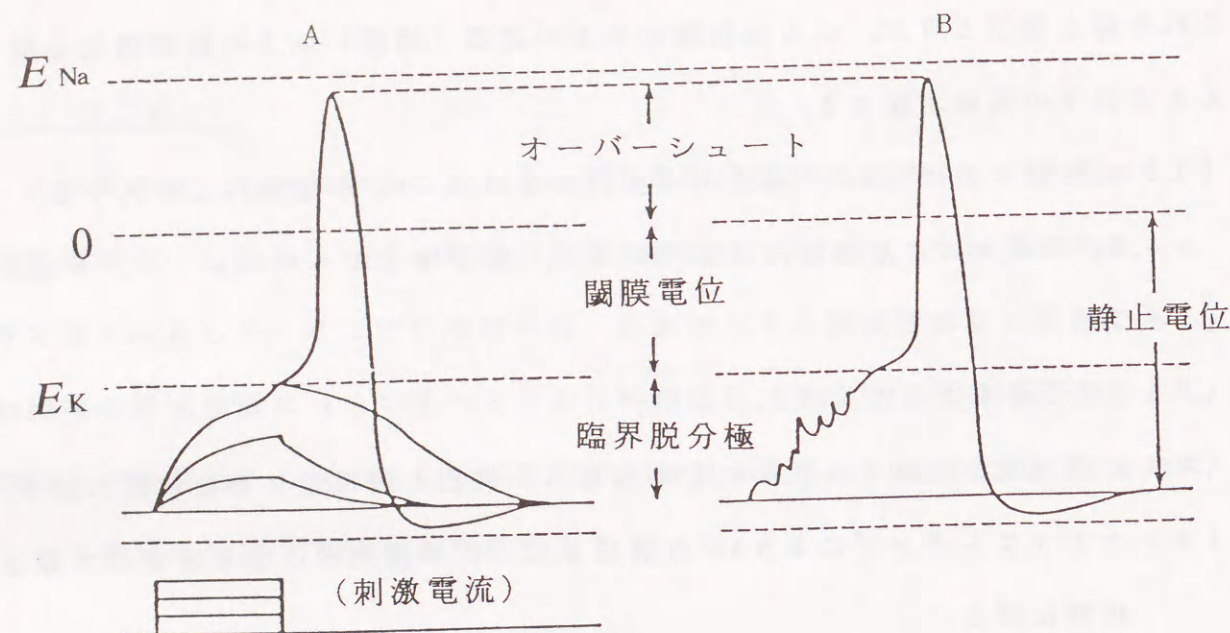


図 3. 2 活動電位の発生 [101]

A : 活動電位が電極からの刺激により発生した場合
B : シナプス電位の総和が閾値に達して発生した場合

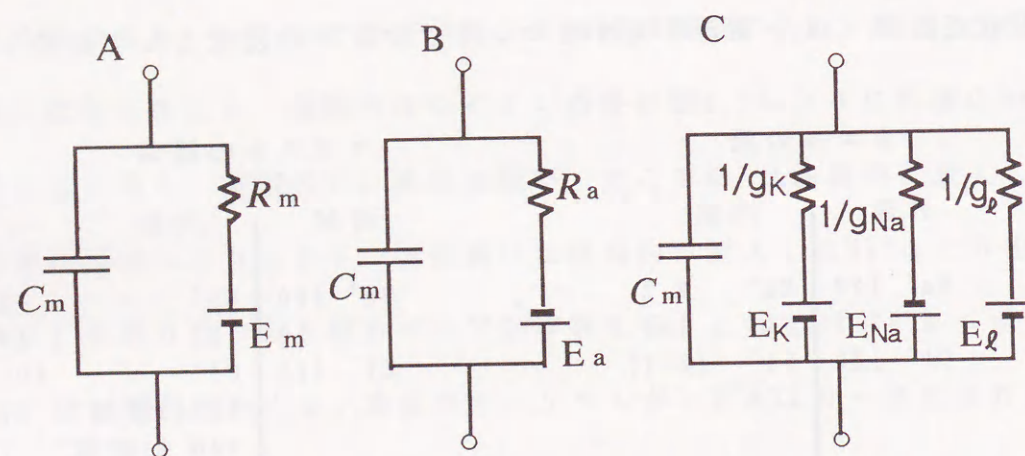


図 3. 3 興奮性膜の等価回路

A : 静止膜. B : 興奮膜. C : Hodgkin-Huxleyモデル. C_m : 膜容量. R_m : 静止膜の電気抵抗. R_a : 興奮膜の電気抵抗. E_r : 静止膜の起電力. E_a : 興奮膜の起電力. g_K, g_{Na}, g_L : カリウム, ナトリウム, その他イオンに対するコンダクタンス. E_K, E_{Na}, E_L : それぞれの起電力.

3.4 細胞外電位

筋線維, 神経線維の形状を図3.4の様な半径 a の円筒形であるとして, 筋または神経線維の興奮により生じる外部電位を求める [101][102].

ラプラスの方程式 $\nabla\Phi=0$ の円柱座標系の解は,

$$\Phi(\rho, \theta, z) = \sum_{m=0}^{\infty} \cos m\theta \cdot \int_{-\infty}^{\infty} \{A_m(k) I_m(|k|\rho) + B_m(k) K_m(|k|\rho)\} e^{-jkz} dz \quad (3.1)$$

で与えられる. ここで I_m, K_m はそれぞれ m 階第1種変形ベッセル関数および m 階の第2種変形ベッセル関数である. 図3.4のモデルでは角度 θ に関しては電位 Φ は一様なので, 電位 $\Phi(\rho, z)$ は次式で表現できる.

$$\Phi(\rho, z) = \int_{-\infty}^{\infty} \{A(k) I_0(|k|\rho) + B(k) K_0(|k|\rho)\} e^{-jkz} dz \quad (3.2)$$

ここで $I_0(k), K_0(k)$ の $k=0$ 及び $k=\infty$ での挙動を考慮すると, 神経線維の外部電位は,

$$\Phi^o(\rho, z) = \int_{-\infty}^{\infty} B(k) K_0(|k|\rho) e^{-jkz} dz \quad \rho \geq a \quad (3.3)$$

で与えられる. また, 内部電位は,

$$\Phi^i(\rho, z) = \int_{-\infty}^{\infty} A(k) I_0(|k|\rho) e^{-jkz} dz \quad \rho < a \quad (3.4)$$

で与えられる.

神経線維外表面の電位を $\Phi_{so}(z)$ とすれば, 神経線維の半径は a であるので,

$$\Phi_{so}(z) = \Phi^o(a, z) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} B(k) K_0(|k|a) e^{-jkz} dz \quad (3.5)$$

なる関係が成り立つ. $\Phi_{so}(z)$ を Fourier 変換し, $B(k)$ について,

$$F_m = \int_{-\infty}^{\infty} V_m(z) e^{jkz} dz$$

$$\Phi(\rho, z) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{F_m(k) K_0(|k|\rho)}{\alpha(|k|a) K_0(|k|a)} e^{-jkz} dz$$

$$\alpha(|k|) = - \left(\frac{\sigma_o K_1(|k|a) I_0(|k|a)}{\sigma_i K_0(|k|a) I_1(|k|a)} + 1 \right)$$

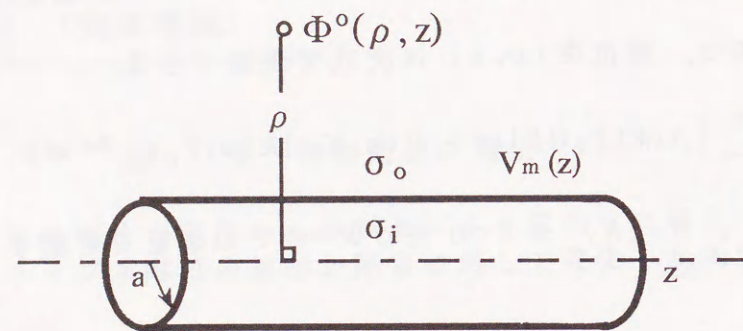


図 3. 4 神経・筋線維の形状を円筒形に近似した外部電位検討のためのモデル

$$F^o(k) = \int_{-\infty}^{\infty} \Phi_{so}(z) e^{jkz} dz \quad (3.6)$$

$$= B(k) K_0(|k|a) \quad (3.7)$$

$$B(k) = \frac{F^o(k)}{K_0(|k|a)} \quad (3.8)$$

を得る。よって、もとめる外部電位は神経外表面電位分布 $\Phi_{so}(z)$ を用いて

$$\Phi(\rho, z) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{F^o(k) K_0(|k|\rho)}{K_0(|k|a)} e^{-jkz} dz \quad (3.9)$$

$$F^o(k) = \int_{-\infty}^{\infty} \Phi_{so}(z) e^{jkz} dz \quad (3.10)$$

と書ける。

$$\Phi^i(a^-, \theta, z) \equiv \Phi_{si} \equiv V^i \quad (3.11)$$

$$\Phi^o(a^+, \theta, z) \equiv \Phi_{so} \equiv V^o \quad (3.12)$$

として、 $\Phi_{si}(z)$ の Fourier 変換を、

$$F^i(k) = \int_{-\infty}^{\infty} \Phi_{si}(z) e^{jkz} dz \quad (3.13)$$

とする。神経線維外の z 軸方向の全電流 I_i^o および神経線維内 z 軸方向の全電流 I_i^i はそれぞれ式 (3.14), (3.15) で与えられる。

$$I_i^o = -\sigma_o \int_a^{\infty} 2\pi\rho \left(\frac{\partial \Phi^o}{\partial z} \right) d\rho \quad (3.14)$$

$$I_i^i = -\sigma_i \int_0^a 2\pi\rho \left(\frac{\partial \Phi^i}{\partial z} \right) d\rho \quad (3.15)$$

式 (3.9), (3.14) より、

$$I_i^o = -\sigma_o \int_a^{\infty} 2\pi\rho \left(\frac{\partial \Phi^o}{\partial z} \right) d\rho \quad (3.14)$$

$$= -\sigma_o \int_a^{\infty} 2\pi\rho \frac{\partial}{\partial z} \left\{ \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{F^o(k) K_0(|k|\rho)}{K_0(|k|a)} e^{-jkz} dz \right\} d\rho \quad (3.16)$$

$$= j\sigma_o \int_{-\infty}^{\infty} \frac{k F^o(k)}{K_0(|k|a)} e^{-jkz} \left\{ \int_a^{\infty} \rho K_0(|k|\rho) d\rho \right\} dk \quad (3.17)$$

を得る。単位長あたりに細胞外から細胞内へ流入する電流 i_m^o は、

$$i_m^o = \frac{\partial I_i^o}{\partial z} = \sigma_o a \int_{-\infty}^{\infty} |k| F^o(k) \frac{K_1(|k|a)}{K_0(|k|a)} e^{-jkz} dk \quad (3.18)$$

で与えられる。同様に式 (3.13), (3.15) より細胞内より細胞外へ流出する

電流 i_m^i は、

$$i_m^i = \sigma_i a \int_{-\infty}^{\infty} |k| F^i(k) \frac{I_1(|k|a)}{I_0(|k|a)} e^{-jkz} dk \quad (3.19)$$

で与えられる。 $i_m^o = -i_m^i$ より、

$$-\sigma_o F^o(k) \frac{K_1(|k|a)}{K_0(|k|a)} = \sigma_i F^i(k) \frac{I_1(|k|a)}{I_0(|k|a)} \quad (3.20)$$

が成り立つ。膜電位 $V_m(z)$ は、

$$V_m(z) = \Phi^i(z) - \Phi^o(z) \quad (3.21)$$

$$= \int_{-\infty}^{\infty} \{F^i(k) - F^o(k)\} e^{-ikz} dk \quad (3.22)$$

$$= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \alpha(|k|a) F^o(k) e^{-ikz} dk \quad (3.23)$$

で与えられる。ただし、

$$\alpha(|k|a) = - \left[\frac{\sigma_o K_1(|k|a) I_0(|k|a)}{\sigma_i K_0(|k|a) I_1(|k|a)} + 1 \right] \quad (3.24)$$

と定義する。

$$F_m(k) = \int_{-\infty}^{\infty} V_m(z) e^{ikz} dz \quad (3.25)$$

$$= F^o(k) \alpha(|k|a) \quad (3.26)$$

とすれば、式 (3.23), (3.26) より外部電位は、

$$\Phi^o(\rho, z) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{F_m(k) K_0(|k|\rho)}{\alpha(|k|a) K_0(|k|a)} e^{-ikz} dk \quad (3.27)$$

と書ける。

よって膜電位分布より、外部電位分布は、

$$F_m(k) = \int_{-\infty}^{\infty} V_m(z) e^{ikz} dz \quad (3.25)$$

$$\Phi^o(\rho, z) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{F_m(k) K_0(|k|\rho)}{\alpha(|k|a) K_0(|k|a)} e^{-ikz} dk \quad (3.27)$$

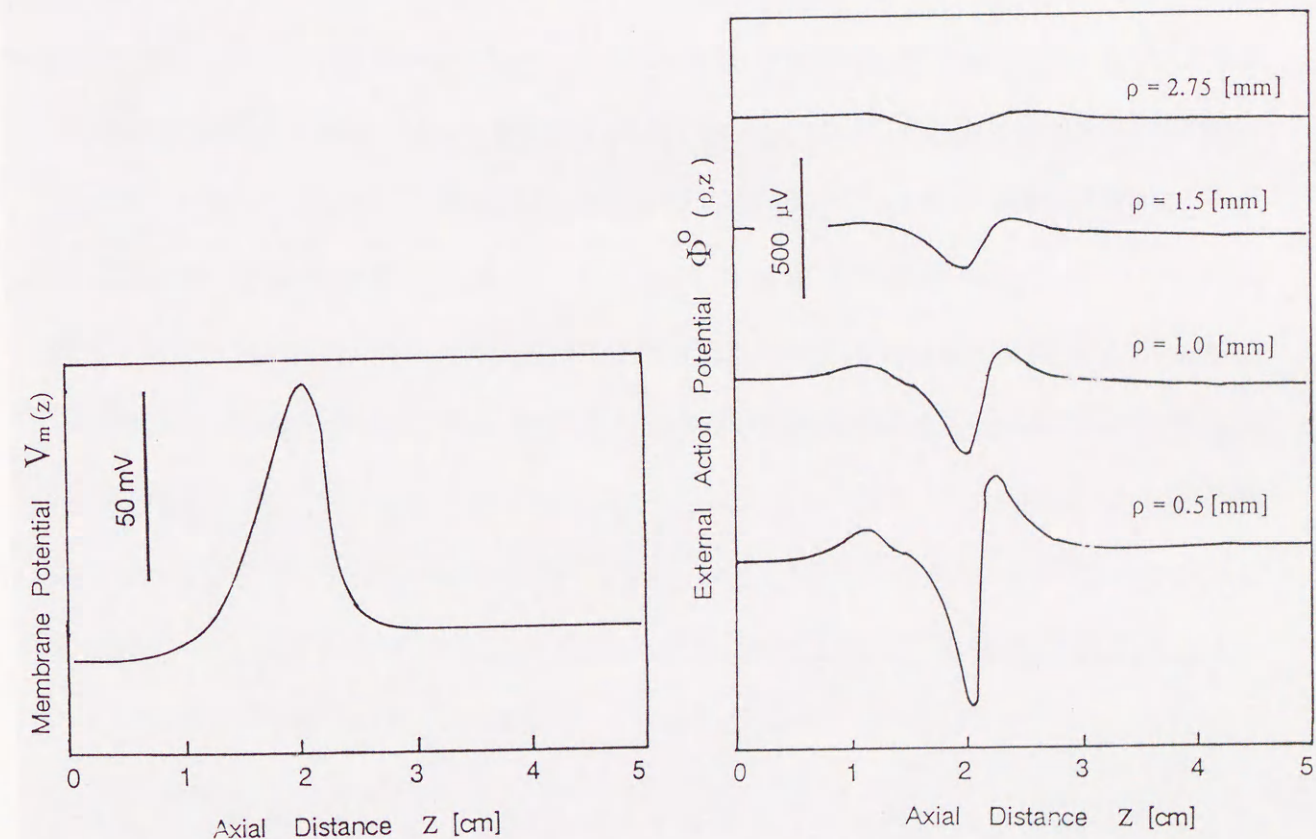
$$\alpha(|k|a) = - \left[\frac{\sigma_o K_1(|k|a) I_0(|k|a)}{\sigma_i K_0(|k|a) I_1(|k|a)} + 1 \right] \quad (3.24)$$

で与えられる。

イカの巨大軸索をモデルとした計算例を図3.5に示す。膜電位分布 $V_m(z)$ を図3.5(a)において与え、 $a = 238 \mu m$, $\sigma_o / \sigma_i = 1$ のとき、 $\rho = 0.5, 1.0, 1.5, 2.75 \text{ mm}$ における外部電位分布 $\Phi^o(\rho, z)$ を、それぞれ求めた。

3.5 まとめ

電気生理学的な基礎的事項として、膜電位及び活動電位発生について述べた。本研究で計測対象とした、大脳皮質、心筋における固有の特徴については5.2及び6.2において改めて述べる。また、神経及び筋線維の形状を円筒形とし、それぞれの線維の活動電位分布より、外部電位分布を求める式について検討した。



(a) 膜電位分布: $V_m(z)$

(b) 外部電位分布: $\Phi^o(\rho, z)$

図3.5 細胞外電位分布特性: $a = 238 \mu m$, $\sigma_o / \sigma_i = 1$.

4 章 光ファイバ型光細胞プロービングシステム

4.1 はじめに

光学的膜電位計測では単一細胞の活動電位の計測より、多数の神経の活動が反映される大脳皮質の計測まで同一装置で計測可能である。しかし、それぞれの計測で必要とされる空間分解能、サンプリング周波数は大きく異なる。

本章では、まず計測対象を明らかにするとともに、計測装置に求められる性能を検討する。次に我々が構想しているレーザ光源の特徴を活かした光学的膜電位計測のための集積型光細胞プロービングシステムの構想について述べ、その構想に基づいて開発した光ファイバ型細胞プロービングについて述べる。また、光学的膜電位計測のカギとなる膜電位感受性色素について、オキサジン系及びオキソノール系色素の分光特性を述べる。さらに、波長によりその強度に反映される生体情報が異なることに着目した多波長同時計測について述べ、膜電位感受性色素と生体表面からの励起光の反射強度変化を同時計測可能な計測システムの開発について述べる。

4.2 集積型光細胞プロービングシステムの構想

4.2.1 求められる性能

ここでは電気生理学的に生体組織の機能を解明する際に測定機器に要求される性能について検討する。

生体組織の機能解明には5つのレベルがあると考えられる。すなわち、

1) イオンゲートの開閉を研究するためのゲートレベル、

2) 細胞内のイオン分布などを解明するための細胞内レベル、

3) 細胞間の興奮伝搬などを測定するための細胞レベル、

4) 複数の細胞が集まり構成される機能組織を対象とする機能組織レベル、

5) 複数の機能組織の活動を反映する脳波などに対応する信号を得るためのマクロレベル、

である。電極を用いた電気生理学的方式ではセンサである電極を交換することによりこの5つのレベルの計測を行うが、光学的膜電位計測ではビーム径や光学系の倍率を変化させることにより5つのレベルを同一装置で計測できる。

ゲートレベルの解明では、 $1\mu\text{m}^2$ に数十から数百個あるイオンゲートの解明を目的とする。このためサブミクロンオーダの空間分解能、数 $10\mu\text{m}$ 四方を一度に計測できること、および数 μsec のサンプリング周期が要求される。

細胞内レベルの計測では、対象となる細胞の大きさにより求められる空間分解能は異なる。しかし、単一のラット動脈平滑筋の大きさが $20\times 40\mu\text{m}$ 位であり、心室筋で $100\times 10\mu\text{m}$ 前後であり、また神経線維の太さが有髄で $3\sim 20\mu\text{m}$ であるので、数ミクロンの空間分解能、数 $100\mu\text{m}$ の計測領域が求められる。

細胞レベルの計測では、単一の神経線維や筋細胞の活動電位計測を行えるだけの能力が必要である。神経線維に発生する活動電位は $1\sim$ 数 msec の電位の逆転現象である。これを捕らえるためには $10\mu\text{sec}$ の分解能は必要である。空間分解能は海馬などの細胞を対象とした時、 $10\mu\text{m}$ 程度は必要である。また心筋を対象とした場合でも、興奮伝搬速度を 1m/sec とすれば、空間分解 $10\mu\text{m}$ は $10\mu\text{sec}$ で伝搬することになり、サンプリング周期は数 μsec 必要である。計測点数は連続した100点程度の計測が可能であることが望ましい。

機能組織レベルでは、大脳皮質の機能円柱を単位として脳機能や、心表面の興奮伝搬を解明しようとするものである。そこで要求される空間分解能は機能円柱の直径程度である。機能円柱の直径は 0.5mm 程とされている。また、げっ歯

類体性感覚野における樽は機能円柱の一例であるが、その大きさは小さなものでも $100 \times 50 \mu\text{m}$ 程度であり、空間分解能として $100 \mu\text{m}$ 程度が要求される。ヒトの心臓の大きさはこぶし大とされており、最大長さで 10cm ほどであり、 1mm ほどの分解能があれば十分である。大脳皮質において、その表面と垂直な方向についての計測は、電極を用いた計測であれば、電極をどの程度の深さまで刺入するかに関係し、光学測定では光の到達しなければならない深さに関連する。大脳皮質は6層構造からなる。樽ではこの内IV層が顕著に発達しており、IV層の細胞が樽構造に密接な関係があるものと考えられる。また他の領域においてもIV層までに細胞が密集した領域が存在している。そこでIV層までを表面からの探査の対象とする。ラットのIV層は皮質表面より約 1mm の所にある。機能円柱の応答は一次応答に代表される比較的低速なものであり、その応答は約 100msec にわたり持続する。このことより時間領域の分解能は 1msec 程度は必要である。最後に測定点数について考察する。ラットの体性感覚野には顔面片側の180本あまりのヒゲの情報が投射されており、連続した100個程度の領域の計測が要求され、数 cm 四方の同時計測が求められる。

マクロレベルは、機能組織レベルより大きな数 mm の空間分解能、数 10cm の計測領域を考えている。この計測は脳波、体表面電位図に対応する信号を光学的に計測しようとするものである。脳波に対応するものを対象とするならばサンプリング周波数は 1kHz 程度必要である。

4.2.2 光学的手法を用いた生体組織活動電位計測装置の構想

ここでは光化学的計測を用いた脳機能計測装置の構想を述べる。我々が構想している計測装置の特徴は大脳皮質や心表面などの生体組織表面の活動電位を2次元のマッピングを同一装置で実現する点にある。その臨床的な運用方法を図4.1、図4.2に示す。

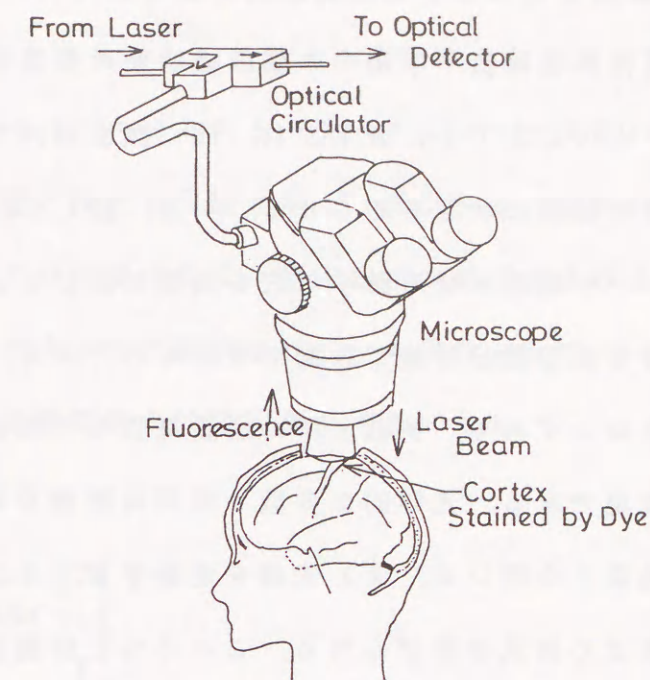


図4.1 脳機能組織光プロービングシステムの構想

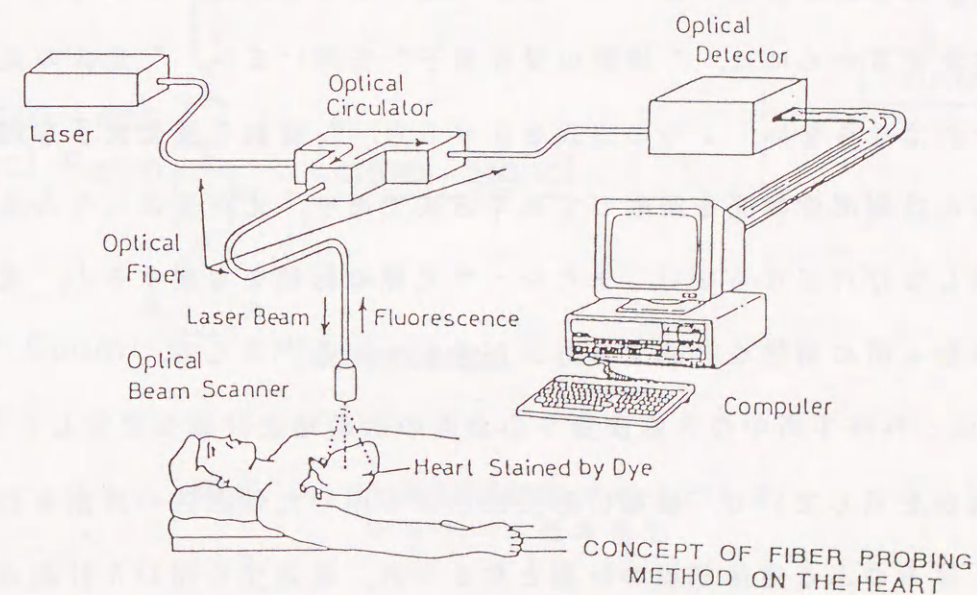


図4.2 心機能診断装置の構想

図4.1は脳外科手術に用いられる手術用顕微鏡に組み込んだ例であり、脳外科手術で開頭した際に異常部位検出や手術中の脳組織活動の監視に用いられる。計測結果はコンピュータのCRT上に表示され、他に顕微鏡内で実際の視野に重ねて表示され、術者に組織の状態を知らせる。一方、図4.2は心機能検査用である。検査時にファイバを通過させる微小な穴を胸部に開ける必要はあるが、心表面を伝搬する興奮を高空間分解能で計測できるものである。

このような臨床応用はいずれも、多数ヶ所の活動電位を同時に計測できることにより、はじめて実現できる。光学的に多数ヶ所同時計測を実現する方法として、1) 複数の受光素子を用いる、2) 光源を走査する、3) 計測部位を機械的に移動させる、などの形式が挙げられる。このうち”計測部位を移動する方式”は機械的な要素が測定装置にはいるために位置決め精度や、移動速度の面で実現は難しく、活動電位計測のようにmsec単位の現象の計測には不向きである。しかし、この方式は他の2つの方式に比べ計測位置の移動距離を大きくでき、”複数の受光素子(フォトダイオードアレイ)を用いる方法”と併用し、広範囲の計測を高分解能で行いたいときに用いられる[65]。活動電位の多数点計測を実現するためには、”複数の受光素子”を用いるか、”光源の走査”を用いなければならない。2つの方式を比べると、”複数の受光素子を用いる方式”は常に計測部位に光を照射しておく方式であり、光が生体に与えるダメージを考慮しなければならない。またレーザ光源の特色を考慮すると、光源を走査し、多数ヶ所の電位を計測する方式が適していると言える。

図4.3は、外科手術中の大脳皮質や心表面の活動電位計測を想定したシステムの基本構成を示している。膜電位感受性色素を用いた外因性の計測を行うものとして、厚みのある生体組織の計測となるため、透過光を用いた計測は不可能であり、物理量として色素からの蛍光放射強度を計測する。光源として単色性、指向性に優れたレーザ光を用いる。レーザ光は光変調器で数100kHzの矩形波に

変調される。これは室内照明の影響やレーザ自身のゆらぎなどを狭帯域アンプで除去しS/Nを向上させるためである。変調されたレーザ光は光サーキュレータを通して光ファイバに入射される。サーキュレータを用いることにより同一の光ファイバで励起と受光が可能となる。光ファイバを用いることにより任意の場所への光ガイドが容易になり、臨床応用の範囲が広がる。先端部はマイクロレンズとビームスキャナで構成されビーム径数 μm でビーム走査が可能となり、高分解能で多数点膜電位の同時計測が可能になる。

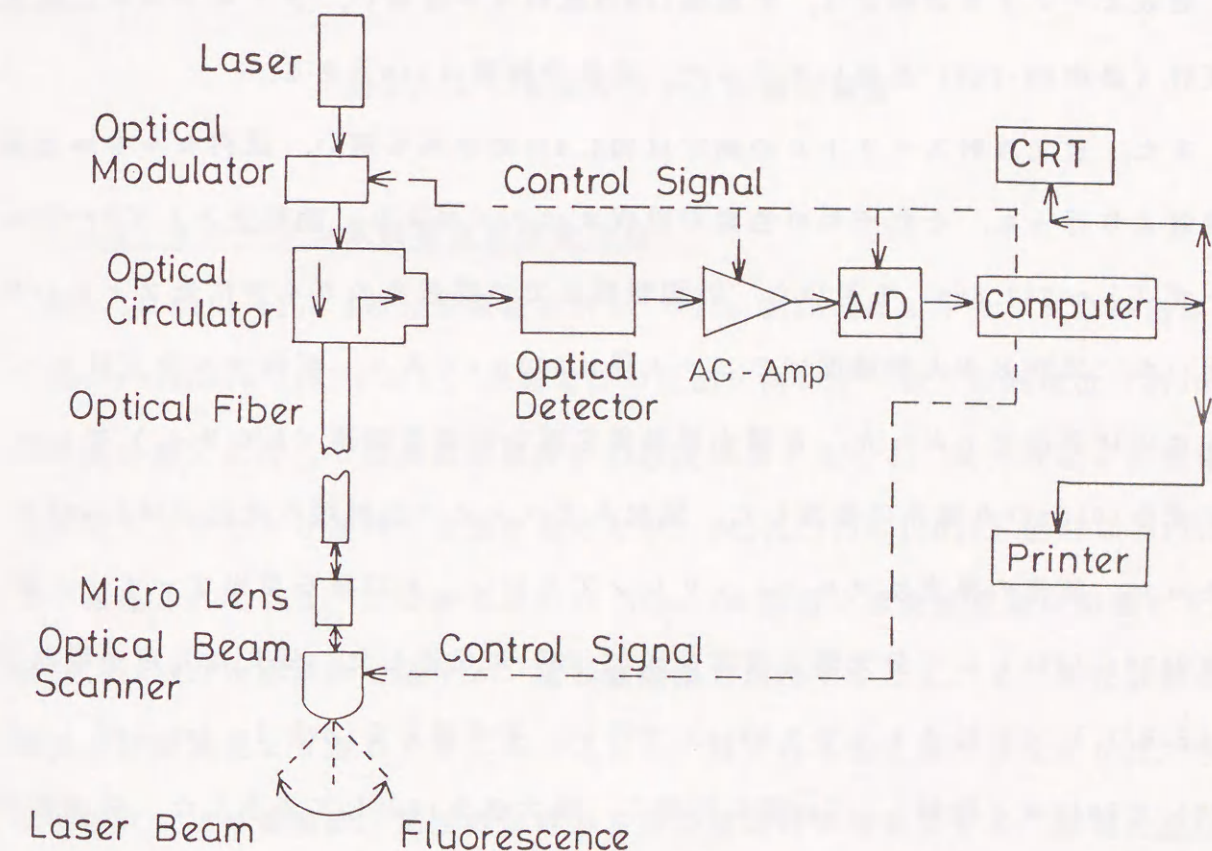


図4.3 光集積型細胞プロービングシステムの基本構想

4.3 膜電位感受性色素の分光特性

本論文では、膜電位変化を蛍光強度に変換する膜電位感受性色素として、Nile Blue A（オキサジン系）及びWW781（オキソノール系）を用いた。以下に、その分光特性を述べる。レーザ光源は単色性が高い反面、発振波長を任意に選ぶことができないため、色素分子の吸収帯の位置、蛍光放射の位置を知ることが重要である。

4.3.1 測定方法

吸収スペクトルの測定は、光路長1cmの試料セルを用い、ダブルビーム式吸光度計（島津UV-140）を用いて行った。波長分解能は5nmである。

また、蛍光放射スペクトルの測定は図4.4の測定系を用い、試料セル中の色素溶液より行った。それぞれの色素の吸収スペクトルより、励起光としてHe-Neレーザ（ $\lambda_e=632.8\text{nm}$ ）を用いた。計測領域までの励起光のガイドに光ファイバを用いた。試料セル入射端面でのビーム径は $500\mu\text{m}$ であり、試料セル中ではビームはほぼ平行光であった。音響光学効果を用いた光変調器（A/O Mod.）でレーザ光を10kHzの点滅光に変調した。励起系光ファイバ出射端の光出力は0.5mWであった。蛍光の集光はセルフフォーカスレンズで行い、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Lock-in Amp（NF LI-570）で60dBほど増幅し、5nm毎に記録し、極大値を10として表示した。分光器の分解能は30nmであり、実際に膜電位を光学的に計測する際と同じ程度とした。得られたスペクトルの校正は特に行っていない。このためスペクトルは、光電子増倍管や光ファイバなどの波長特性に依存したものになり、本測定装置光学系固有のものになる。しかし、膜電位を光計測する際も、蛍光の分光に同一の装置を用いているので問題とはならない。

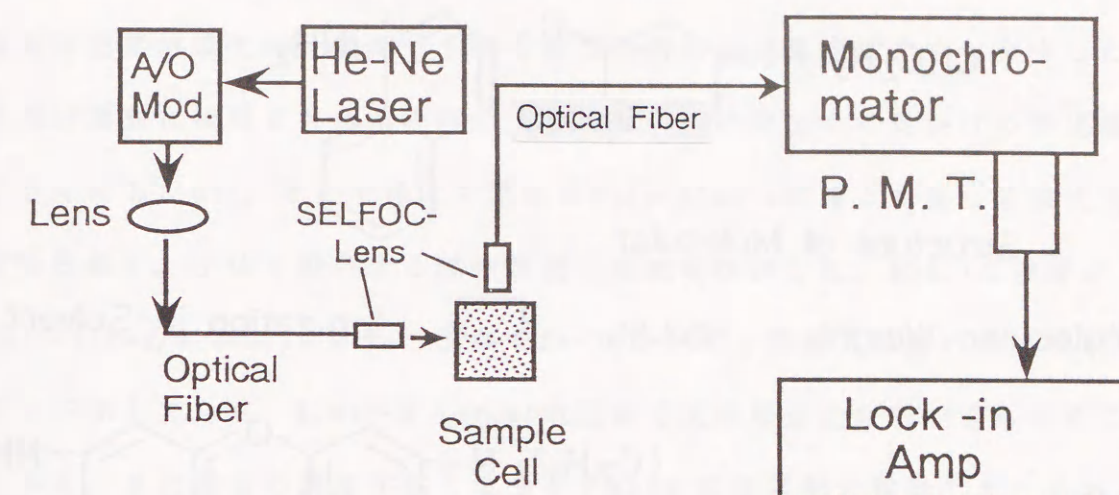


図4.4 蛍光スペクトル測定装置

4.3.2 オキサジン系膜電位感受性色素

図4.5にNile Blue Aの分子構造を示す。Nile Blue Aはオキサジン系の色素で、“fast-response dye”であり、活動電位の計測に向いている。活動電位（約100mVの脱分極）に対して蛍光放射強度が3%程度増加すること、蛍光放射が活動電位の立ち上がりより遅れて増加することが、Bezanillaら[103]、金山ら[81]により報告されている。この遅れはNile Blue Aの膜電位感受性機構に関連する。Nile Blue Aが水溶液中で陽イオン化し細胞膜を透過すること、また蛍光放射の増加が活動電位より遅れて生じることより、得られる蛍光放射強度変化は、膜電位変化により直接的、間接的に生じる細胞膜近傍の現象よりも、膜電位変化により間接的に生じる細胞内（例えば筋小胞体など）の現象を反映していると考えられている[81][103]。Nile Blue Aの分光特性を計測した。吸収スペクトル及びHe-Neレーザ励起の蛍光放射スペクトルを図4.6に示す。吸収帯が550-650nmにかけてあり、 $\lambda_e=632.8\text{nm}$ のHe-Neレーザで効率よい励起が可能である。またHe-Neレーザ励起の蛍光放射スペクトルは $F_{\text{max}}=680\text{nm}$ 付近で極大となり

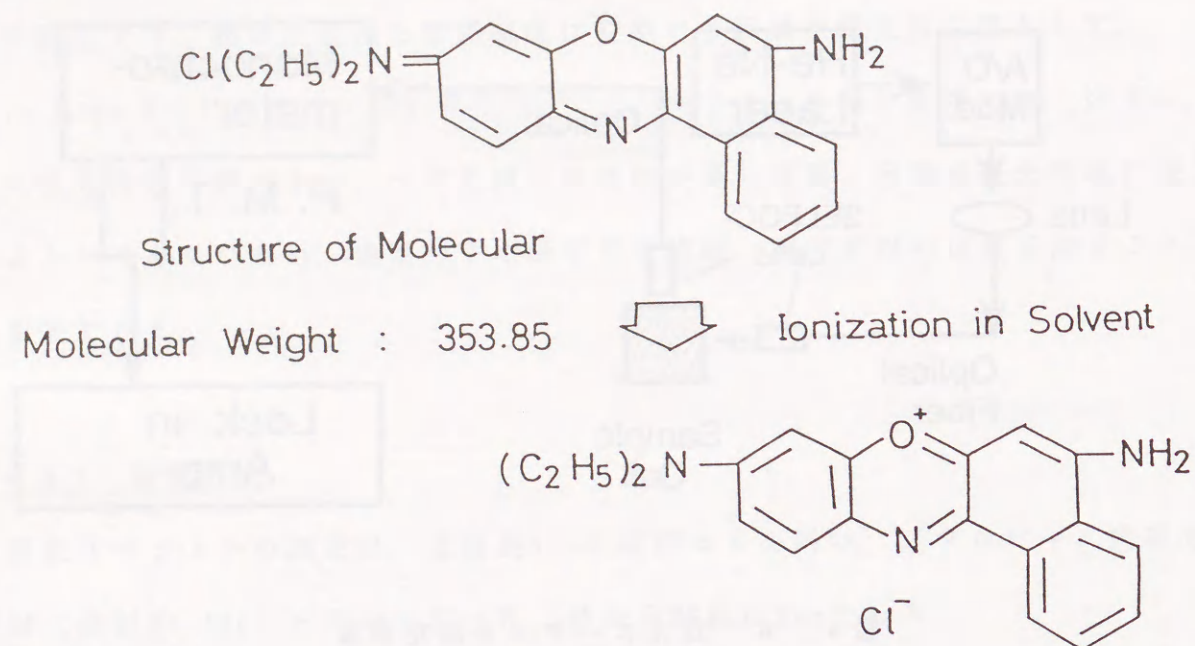


図 4. 5 Nile Blue A の分子構造

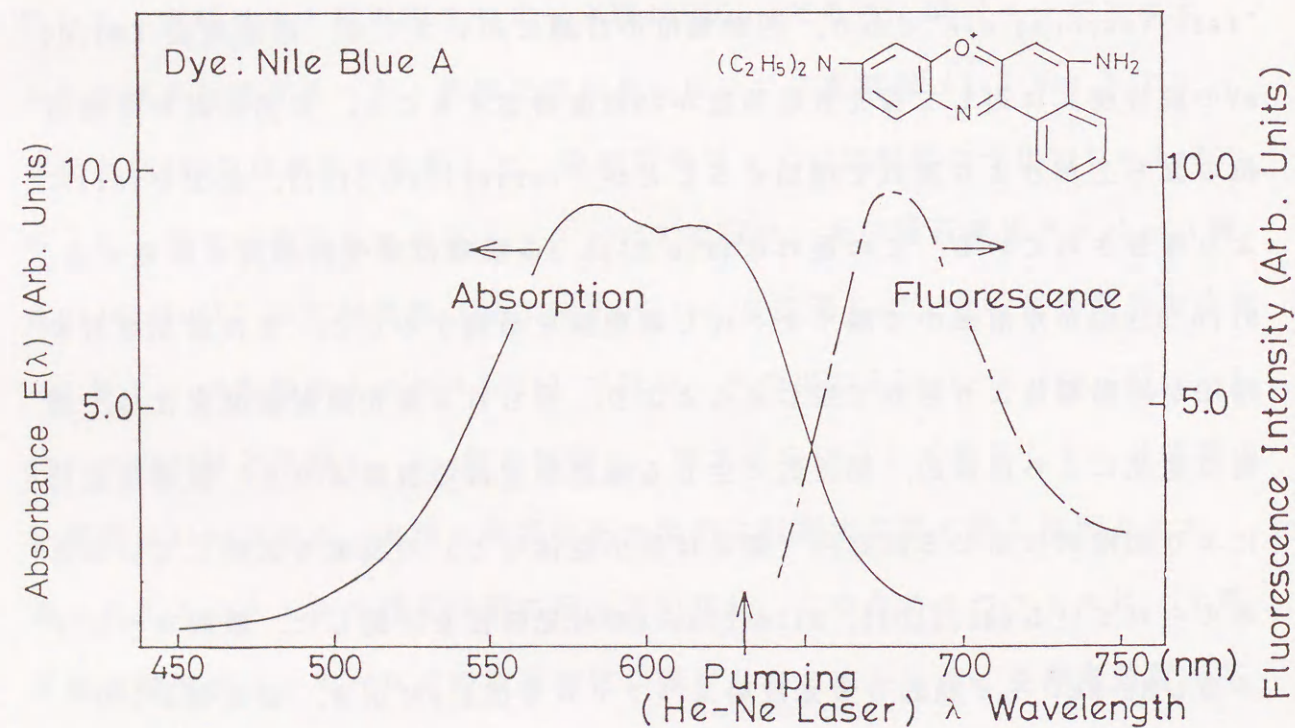


図 4. 6 Nile Blue A の分光特性

(蛍光極大[104]), 励起光と蛍光放射の分離が十分可能であることがわかる。
 高濃度な色素溶液では, 蛍光分子間の相互作用による濃度消光や, 発生した蛍
 光が再び溶質に吸収される再吸収が生じ, このため発生する見かけの蛍光放射
 は小さくなる[105]. そこで種々の濃度の Nile Blue A 溶液より生じる蛍光放射
 強度を比較し, 生体を染色する際の最適な濃度を検討した. 図 4.7 は濃度が
 0.001~1.0mg/ml の Nile Blue A 溶液を He-Ne レーザで励起した際の蛍光放射ス
 ペクトルを示している. 0.01~0.1mg/ml の溶液で大きな蛍光放射が得られるこ
 とがわかる. また溶液の濃度が高くなると F_{\max} は長波長側に移動した. これより
 染色溶液の濃度を 0.02mg/ml とした.

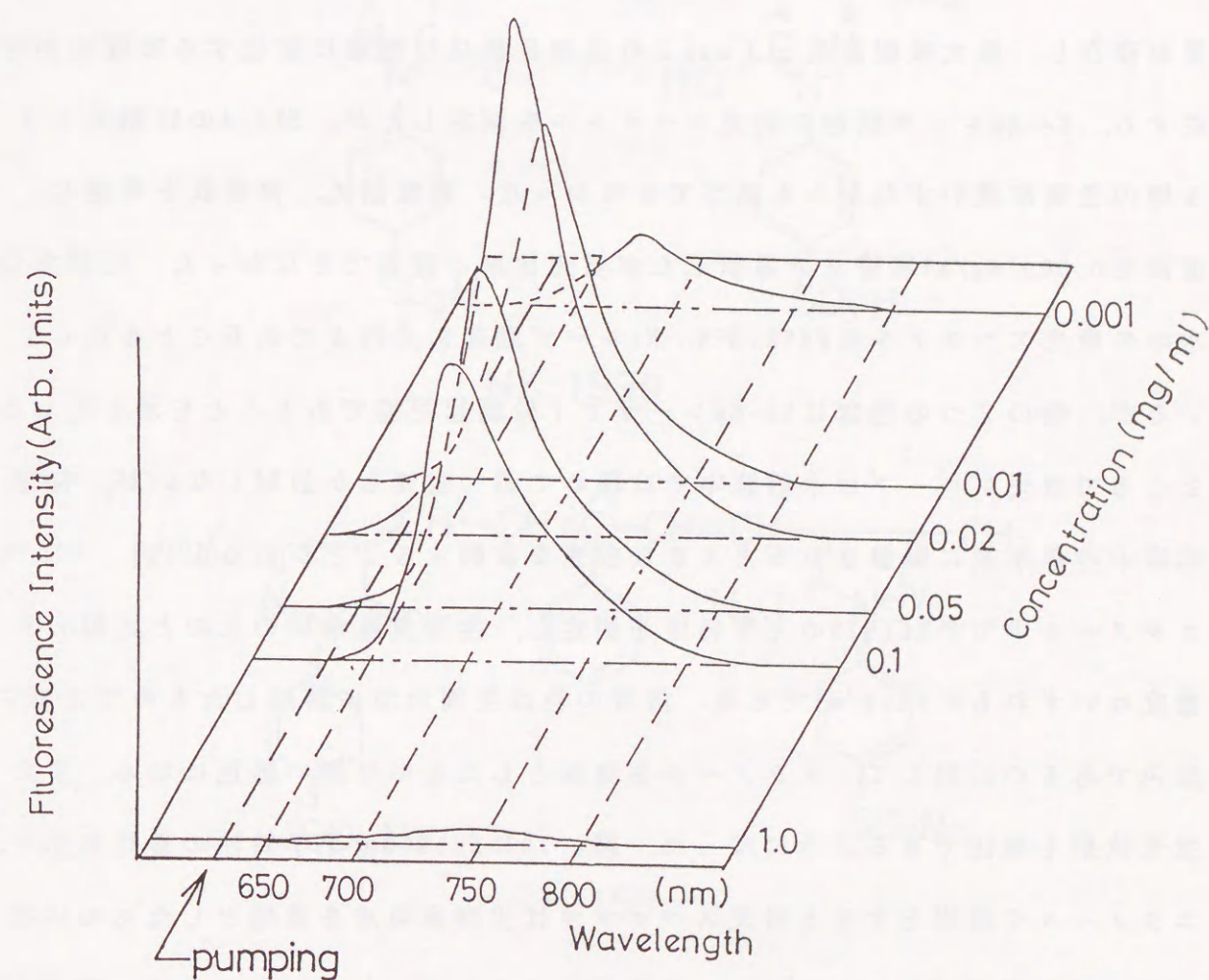


図 4. 7 Nile Blue A 蛍光放射の溶液濃度依存性

4.3.3 オキソノール系膜電位感受性色素

WW781(NK2935), RH155(NK3034), NK1939(日本感光色素)の3種類のオキソノール系膜電位感受性色素の光学特性を測定し, He-Neレーザ励起の適性を検討した. ここで用いたオキソノール系膜電位プローブは細胞膜に対して非透過性であり, 膜電位に応じて透過光強度及び蛍光放射強度を変化させる[84][91]. 分子構造を図4.8に示す.

高濃度な色素溶液中では濃度消光が起き光学特性が変化する. この点に注意して吸光スペクトル及びHe-Neレーザ励起の蛍光スペクトルを測定した. 生理食塩水中を溶媒とした時の吸光スペクトルを図4.9に示す. 3種類ともほぼ同様なスペクトルが得られた. すなわち, 極大吸収波長より短波長側ではbroadな吸収帯が存在し, 極大吸収波長: λ_{\max} より長波長側には急峻に変化する吸収帯が存在する. He-Neレーザ励起の蛍光スペクトルを測定したが, 図4.4の計測系では3種の色素溶液いずれからも測定できなかった. 濃度消光, 再吸収を考慮し, 溶液を0.0001mg/ml程度まで希釈したが蛍光放射は確認できなかった. 生理食塩水中の吸光スペクトルはWW781がHe-Neレーザ励起に不向きであることを示しているが, 他の2つの色素はHe-Neレーザで十分励起可能であることを示している. ところで蛍光プローブは水溶液中では極めて弱い蛍光しか放射しないが, 有機溶媒中の疎水域に吸着されると大きな蛍光を放射することがある[106]. そこでエタノール中でのNK1939の光学特性を測定し, 生理食塩水中のものと比較した. 濃度はいずれも0.02mg/mlである. 溶液の色は生理食塩に溶解したものでは暗い紫色であるのに対して, エタノールを溶媒としたものは深い緑色になる. また蛍光放射も確認できるようになった. 図4.10にNK1939の光学特性の変化を示す. エタノールを溶媒とすると吸光スペクトルは生理食塩水を溶媒としたものに比べ20nmほど長波長側にシフトし, 深色化することがわかる. ところで, WW781は

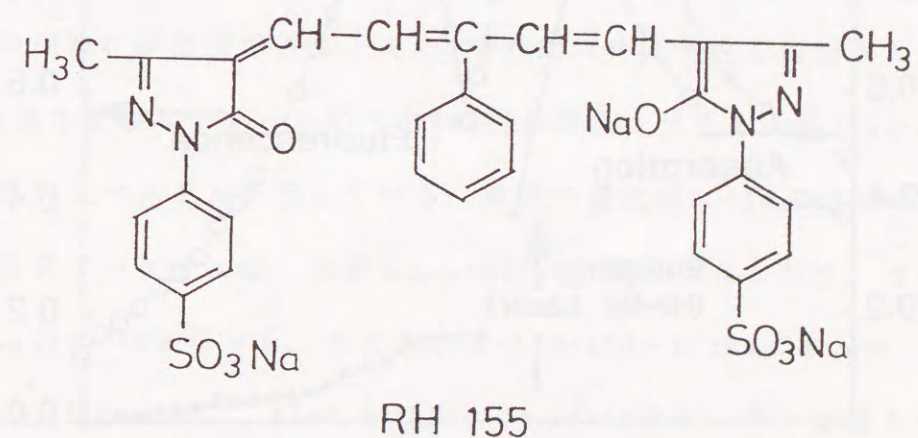
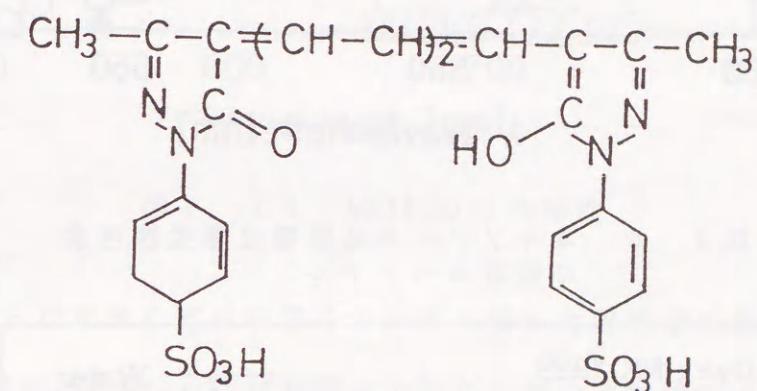
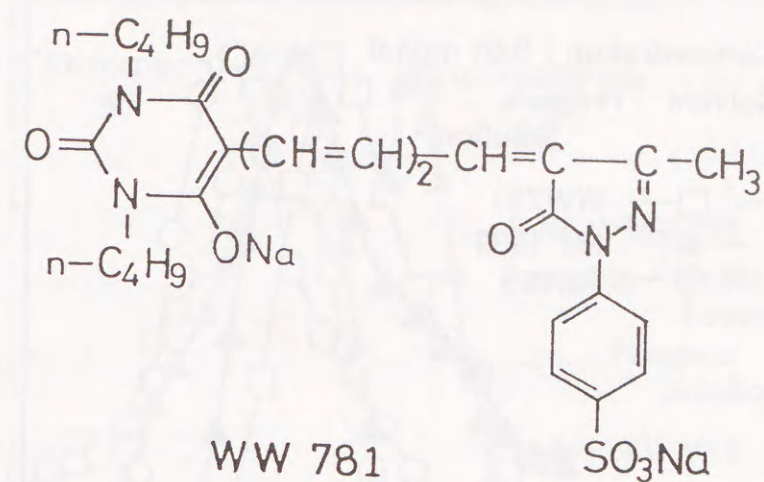


図4.8 オキソノール系膜電位感受性色素の分子構造

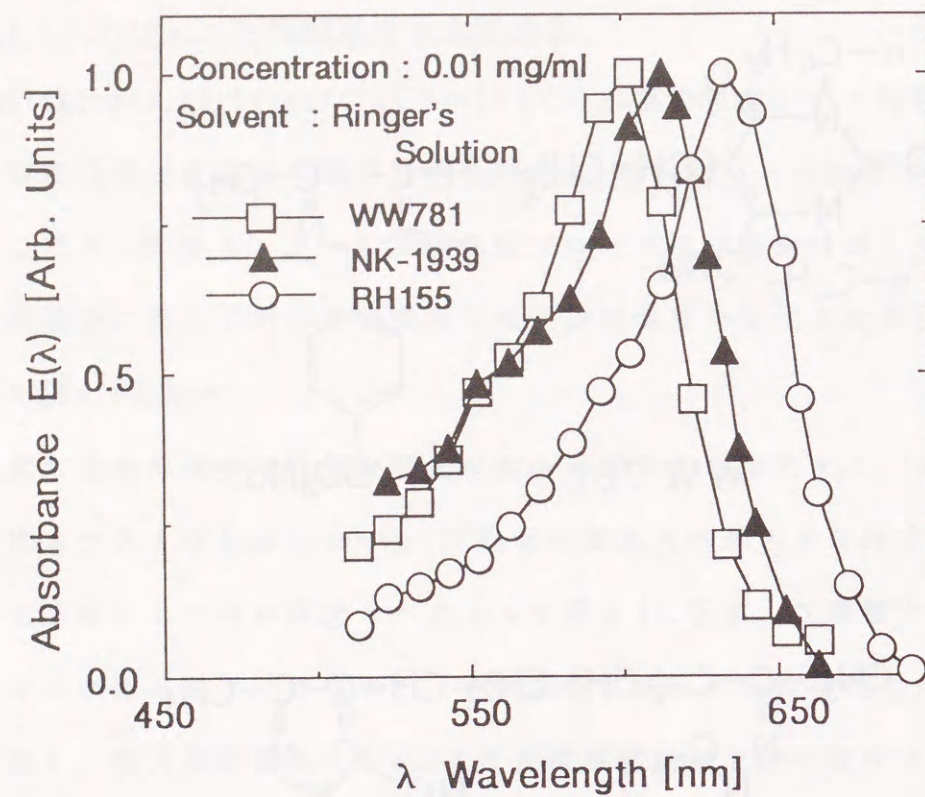


図 4. 9 オキソノール系膜電位感受性色素の吸収スペクトル

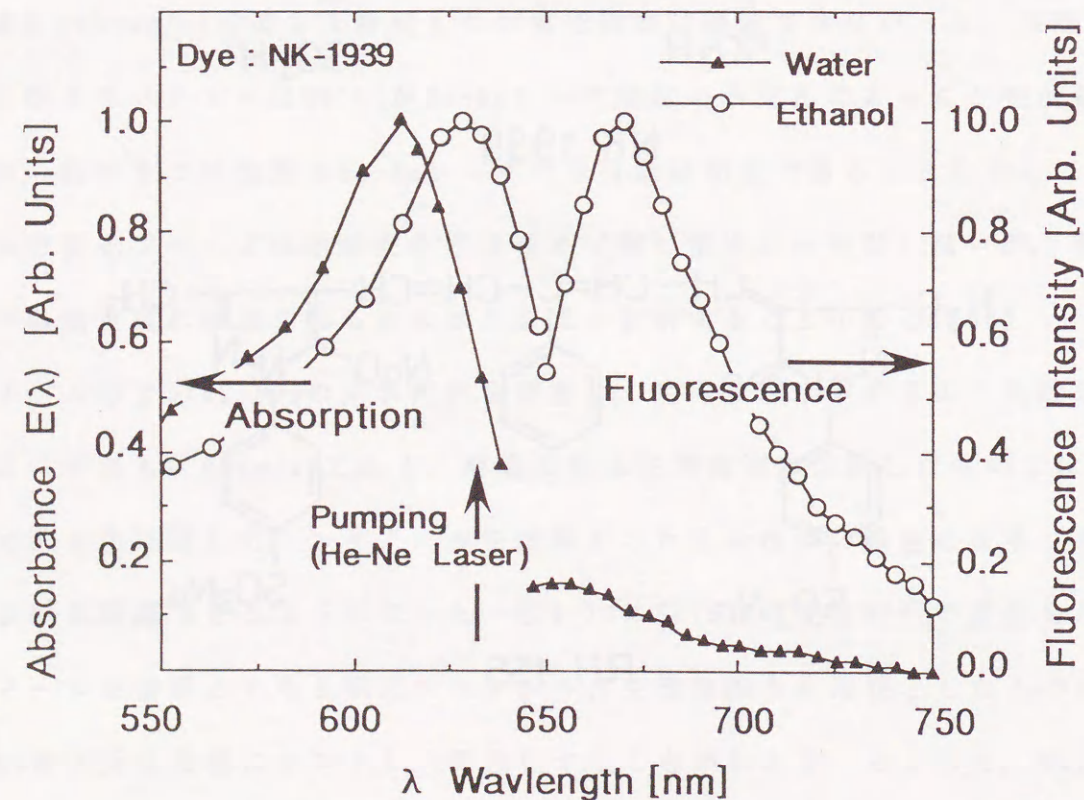


図 4. 1 0 NK1939の分光特性

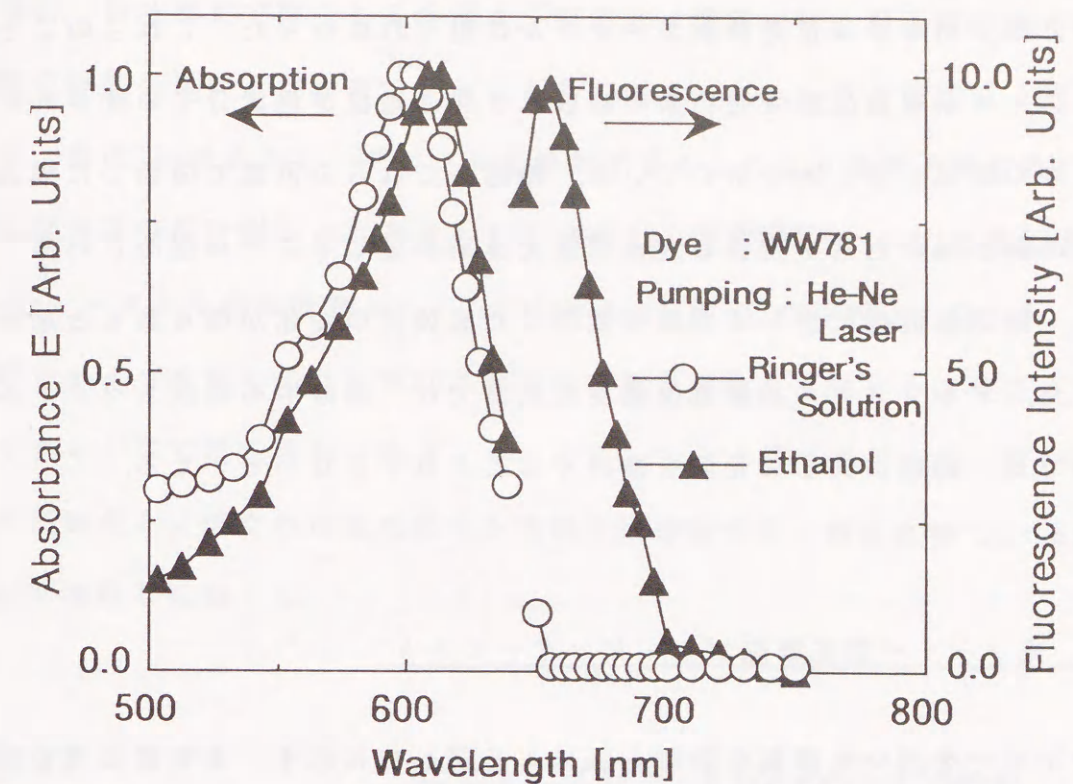


図 4. 1 1 WW781の分光特性

DillonとMoradらが家兎心室活動電位の計測に用いた膜電位感受性色素である。このとき、励起にはHe-Neレーザを用いており、蛍光放射強度の変化は5-10%であることが報告されている[79][80]。しかし、図4.9の吸収スペクトルを見る限りでは、励起光源としてHe-Neレーザが適しているとは言い難いが、NK1939同様に吸収帯の深色化が期待できる。そこでWW781の分光特性を再測定した。図4.11は生理食塩水及びエタノール中でのWW781の吸収スペクトル及びHe-Neレーザ励起の蛍光放射スペクトルを示している。溶液の濃度は0.01mg/mlである。生理食塩水中の吸収スペクトルは、波長 $\lambda_{max}=680\text{nm}$ で吸収極大となり、そのとき吸光度は $E(\lambda_{max})=0.59$ となった。また吸収帯は $AB=550\sim 625\text{nm}$ にあった。エタノール中では $\lambda_{max}=612\text{nm}$, $E(\lambda_{max})=0.80$, $AB=560\sim 635\text{nm}$ であった。溶媒が生理食塩水よりエタノールに変わることにより、吸収帯は10nmほど深色化 (red shift) し、顕著な溶媒効果が見られた。He-Neレーザで励起した場合、エタノール中のWW781からは655nmで極大となる蛍光放射が得られた。しかし溶媒を生理食塩水とし

た場合には、明らかな蛍光放射スペクトルは得られなかった。これらのことはオキソノール系膜電位感受性色素の吸収及び発光過程が色素分子の置かれた環境に大きく依存することを示している。細胞をこれらの色素で染色した場合、細胞膜の疎水域に色素が吸着し大きな蛍光放射が生じることが期待される。このとき、細胞膜近傍に生じる現象に依存した光強度の変化が得られると思われる。また、オキソノール系膜電位感受性色素では、溶液中の吸収スペクトルからだけでは、励起に適した光源を検討することはできないといえる。

4.4 光ファイバ型光細胞プロービングシステム

光ファイバを用いた膜電位計測システムを図4.12に示す。本装置は現在計測されている脳波に対応する信号をラット大脳皮質において光計測することを目的として開発された。しかし、光ファイバを励起系、受光系に用いており、高い汎用性があり、コイ心筋活動電位の計測も可能である。

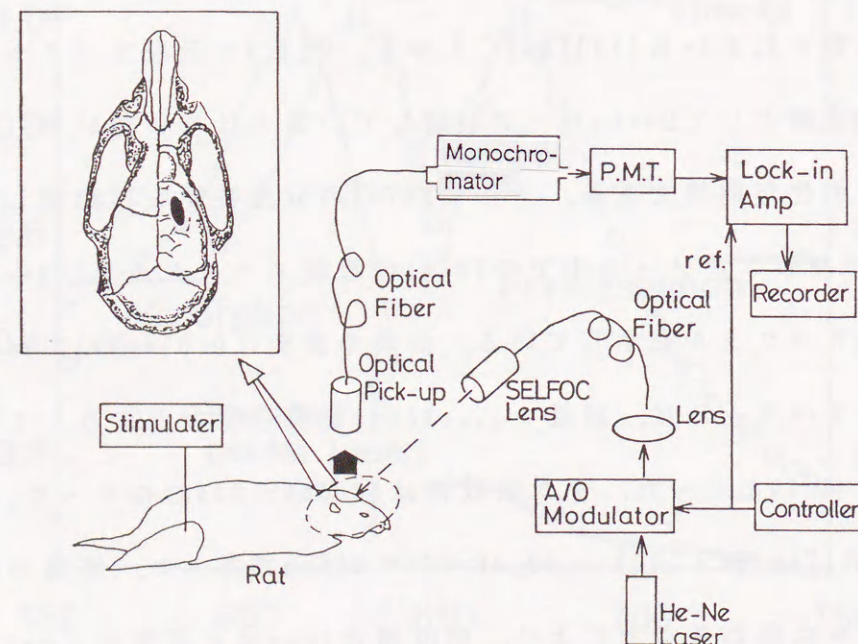


図4.12 光ファイバ型プロービングシステム

現在、脳波測定で得られる信号は、頭皮上に配置された電極下の多くの神経活動の総和を反映したものであるとされている。本システムは脳の一部を露出させ、直径1mm前後のレーザビームを照射することにより頭皮上の電極に対応した低周波信号を計測しようとするものである。光変調器で10kHzに変調されたHe-Neレーザ光を励起光源とし、Lock-in Ampを用いS/Nの向上を図った。励起光を光ファイバを用いて計測部位に導いた。測定部位から生じる信号光はセルフオックレンズで集光され、光ファイバによって分光器に送られる。分光器において反射光と分離された蛍光信号を光電子増倍管で光-電圧変換し、Lock-in Ampで増幅し記録した。

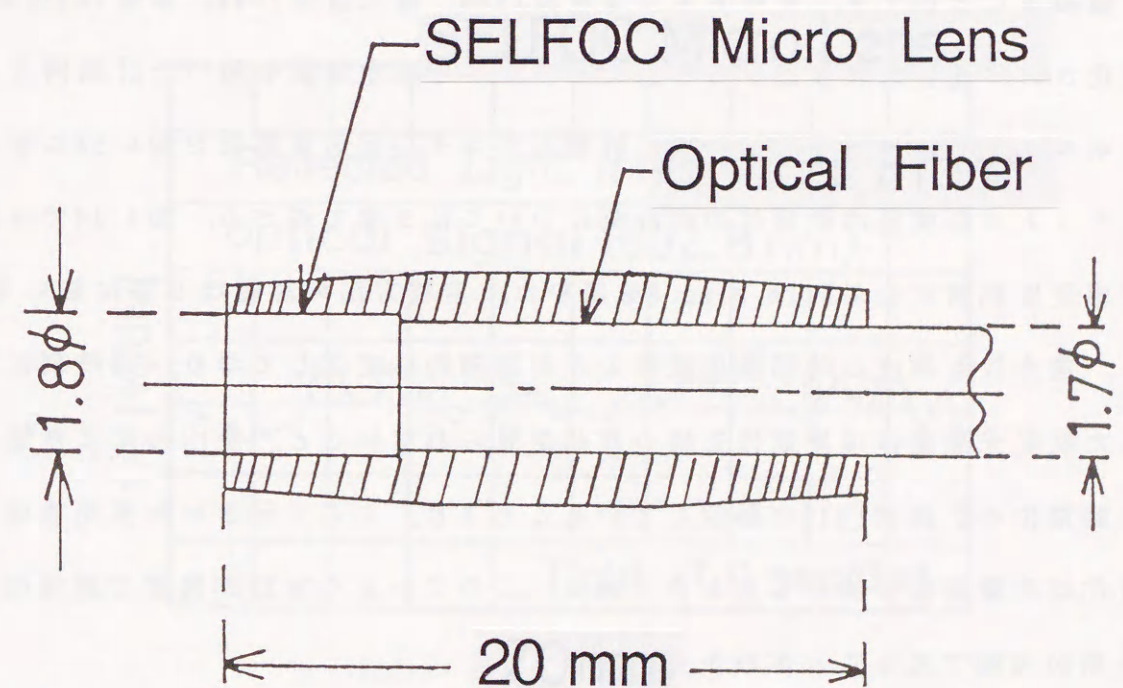


図4.13 光Pick-up

次に微小光検出のための光ファイバセンサ部について述べる。センサを計測部位になるべく近付けることにより、計測部位より生じる信号成分を含む蛍光を効率よく集光する。このためセンサ部は小型かつ軽量に作らなければならない。そこで集光用レンズとして焦点距離の短いセルフロックマイクロレンズを用いた。またレンズと光ファイバの結合損失を最小に抑え、ファイバの伝達ロス減らすために大口径石英光ファイバを使用した。センサ部を図4.13に示す。

これまでに実用化されたシステムは顕微鏡の光学系を利用した物であり、その取り扱いには防振上などの注意を要した。また光学的には多数のレンズを信号光が通過してくるために損失や、色収差は避けられなかった。しかし、試作した光ファイバセンサでは、レンズ系は一個まで減り、レンズによる損失は最小に留めることができ、その大きさも全長20mm、最大直径10mm、重量10g程度に小型化され、光学的取り扱いも容易になった。本測定装置を用いた計測例として、ホルダを用いて筋収縮を抑制し計測したコイ心室活動電位を図4.14に示す。またラット大脳皮質活動電位の光計測については5章で述べる。図4.14では膜電位感受性色素としてNile Blue Aを用いた。実験方法の詳細は6章において述べる。蛍光放射強度の時間変化波形のみが周期的に変化しており、同時刻に計測した反射光強度には周期性を持つ変化が見られないこと、金山らによる蛙心室活動電位の計測例[81]に類似していることより、ここで示された蛍光放射強度変化は活動電位に依存したものである。このことより本計測装置で膜電位の光計測が可能であることがわかる。

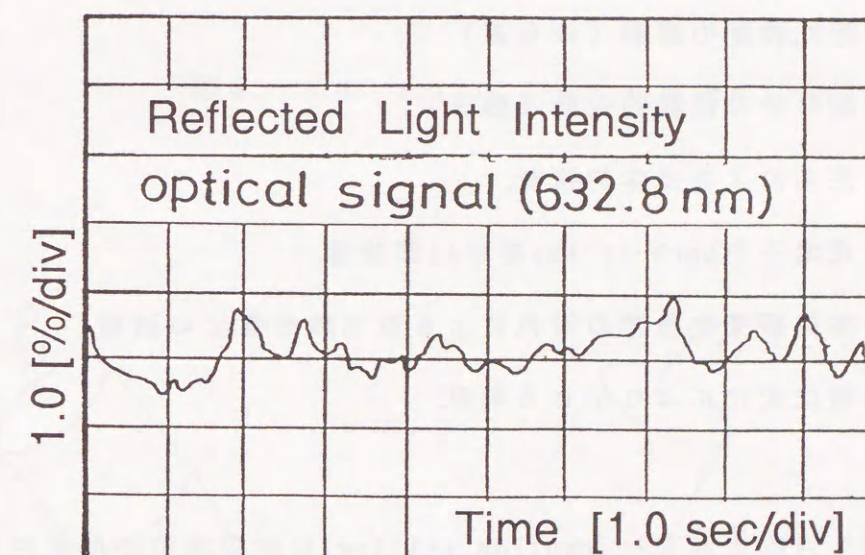
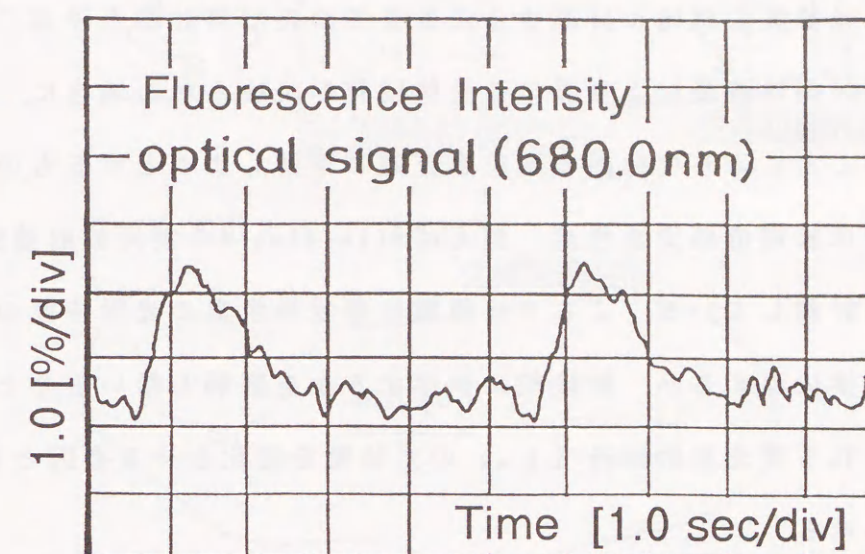


図4. 1 4 コイ心筋活動電位の計測例
(Nile Blue Aを使用)

4.5 多波長同時計測における光学特性

2波長以上の光強度を同時に計測することを多波長同時計測と呼ぶことにする。多波長同時計測は波長により異なる生体情報が反映される場合に、その情報を同時に得ることにより生体内の現象を正確に理解しようとするものである。

我々の計測では膜電位感受性色素、例えばNile Blue Aの蛍光放射強度として細胞の膜電位を計測している。ここでは膜電位感受性色素の光学特性の変化が、膜電位変化に直接依存するか、間接的に依存するかを区別しないものとする。このとき計測される蛍光放射波長(λ_m)の光強度を変化させる要因として以下の現象が考えられる。

- (1) 励起光強度の変動(ゆらぎ)。
- (2) 計測対象の位置的変動(動き)。
- (3) 外来光による光学的雑音。
- (4) 受光素子やLock-in Amp等の内部雑音。
- (5) 膜電位感受性色素の退色による蛍光放射強度の減衰。
- (6) 膜電位変化により生じる現象。

その光学的検出を目的としているmotion artifactは計測部位の位置的な変動により、光源-計測部位-受光系の位置的な関係が変化することにより生じる光散乱である。motion artifactの発生要因は計測領域の変形と計測領域の移動に大別される(図4.15)。

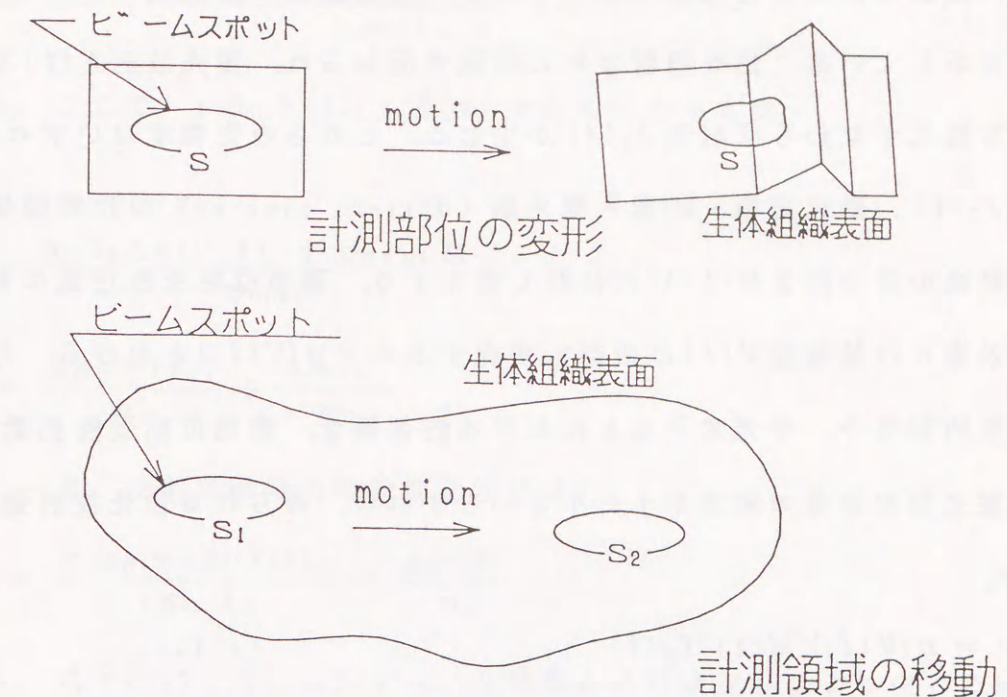


図4.15 Motion Artifactの発生

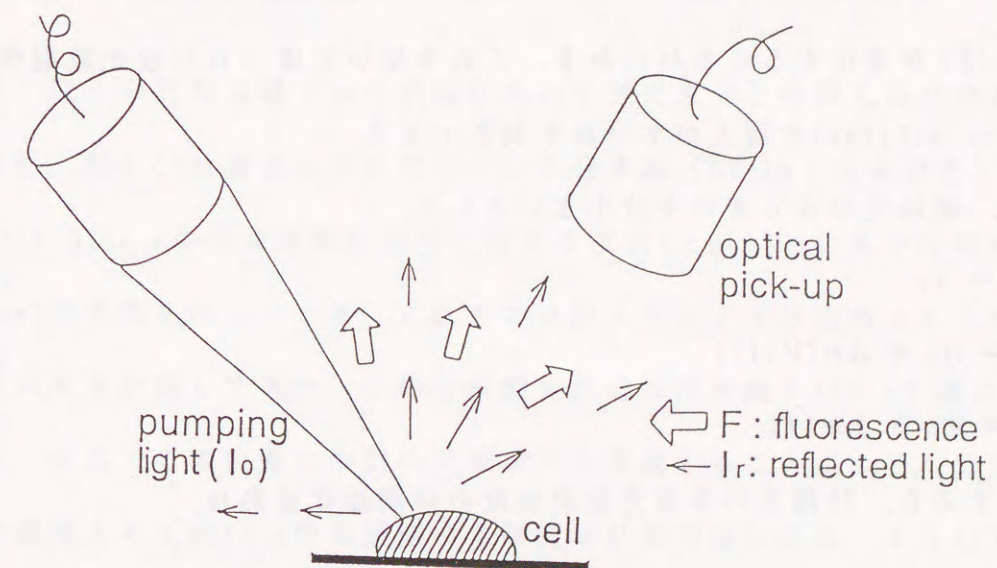


図4.16 2波長同時計測の概念

図4.16は膜電位感受性色素で染色した単一生体組織に励起光 $I_0(t)$ を照射した様子を示している。光を照射された組織表面からは、蛍光放射 $F(t)$ 及び励起光の後方散乱すなわち反射光 $I_r(t)$ が生じる。これらの光強度はいずれも励起光強度 $I_0(t)$ 、励起光源－組織－受光系 (Optical pick-up) の位置関係の変化 (生体組織の持つ動き $M(t)$) に依存し変化する。膜電位感受性色素における蛍光発生効率 η は膜電位 $V(t)$ に依存し変化するので $\eta(V(t))$ とかける。外来光による光学的雑音や、受光素子などにおける内部雑音、膜電位感受性色素の退色による蛍光放射強度の減衰が十分小さいとすれば、得られる蛍光放射強度 $F(t)$ は、

$$F(t) = \eta(V(t)) M(t) I_0(t) \quad (4.1)$$

とかける。また生体組織表面における励起光の反射率を r とすると、反射光強度 $I_r(t)$ は、

$$I_r(t) = r M(t) I_0(t) \quad (4.2)$$

とかける。式(4.1)、(4.2)より、膜電位 $V(t)$ の変化により蛍光放射強度 $F(t)$ のみが変わり、motion artifact $M(t)$ の発生により蛍光放射強度 $F(t)$ 及び反射光強度 $I_r(t)$ が変化することがわかる。これを用いて得られた蛍光放射強度変化にmotion artifactの混入がないかを判断できる。

さらに、励起光のゆらぎが十分小さいとして、

$$I_0(t) = i_0 \quad (4.3)$$

$$\eta(t) = \eta_0 + \Delta\eta(V(t)) \quad (4.4)$$

$$M(t) = m_0 + \Delta m(t) \quad (4.5)$$

と、定義すると、計測される蛍光放射強度の時間変化波形は、

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{\{(\eta_0 + \Delta\eta(V(t))) \cdot (m_0 + \Delta m(t)) \cdot i_0\} - \{\eta_0 m_0 i_0\}}{\eta_0 m_0 i_0} \quad (4.6)$$

$$= \frac{m_0 i_0 \Delta\eta(V(t)) + i_0 \{\eta_0 + \Delta\eta(V(t))\} \Delta m(t)}{\eta_0 m_0 i_0} \quad (4.7)$$

とかける。ここで、 $|\eta_0(V(t))| \ll \eta_0$ であることを考慮し、

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{m_0 i_0 \Delta\eta(V(t)) + \eta_0 i_0 \Delta m(t)}{\eta_0 m_0 i_0} \quad (4.8)$$

$$= \frac{\Delta\eta_0(V(t))}{\eta_0} + \frac{\Delta m(t)}{m_0} \quad (4.9)$$

を得る。一方、反射光強度の時間変化波形は、

$$\frac{\Delta I_r}{I_r} = \frac{r(m_0 + \Delta m(t)) i_0}{r m_0 i_0} = \frac{\Delta m(t)}{m_0} \quad (4.10)$$

とかける。式(4.9)、(4.10)より、計測部位の形状変形により生じたmotion artifactは、蛍光放射強度と反射光強度の時間変化波形を比較することにより、除去可能であることがわかる。

4.6 2波長同時計測装置

従来、我々の計測装置では分光器において蛍光成分と反射光成分の分離を行ってきた。図4.17は著者らが使用している分光器 (CT-10: 日本分光) の内部構造とNile Blue Aの蛍光放射計測時における蛍光 ($\lambda_m=680\text{nm}$) 及び反射光 ($\lambda_e=632.8\text{nm}$) の光路を示している。これまでは後スリットより出射される蛍光成分の強度のみを計測してきた。この時反射光成分は球面鏡1 (SM1) の横に集光されている。そこでこの位置に小型の受光素子を増設することにより、分光器が指示した波長よりも約50nm短波長側の光強度が計測可能になる。すなわち分光器本来の光路 (主光路) に高感度な光電子増倍管 (P.M.T.) を主受光素子として配置し微弱なNile Blue Aよりの蛍光放射を捉え、分光器内にフォトダイオード

(P.D.)を副受光素子として増設することにより励起光であるHe-Neレーザの反射光を受光する。これにより2波長同時測定を行う。

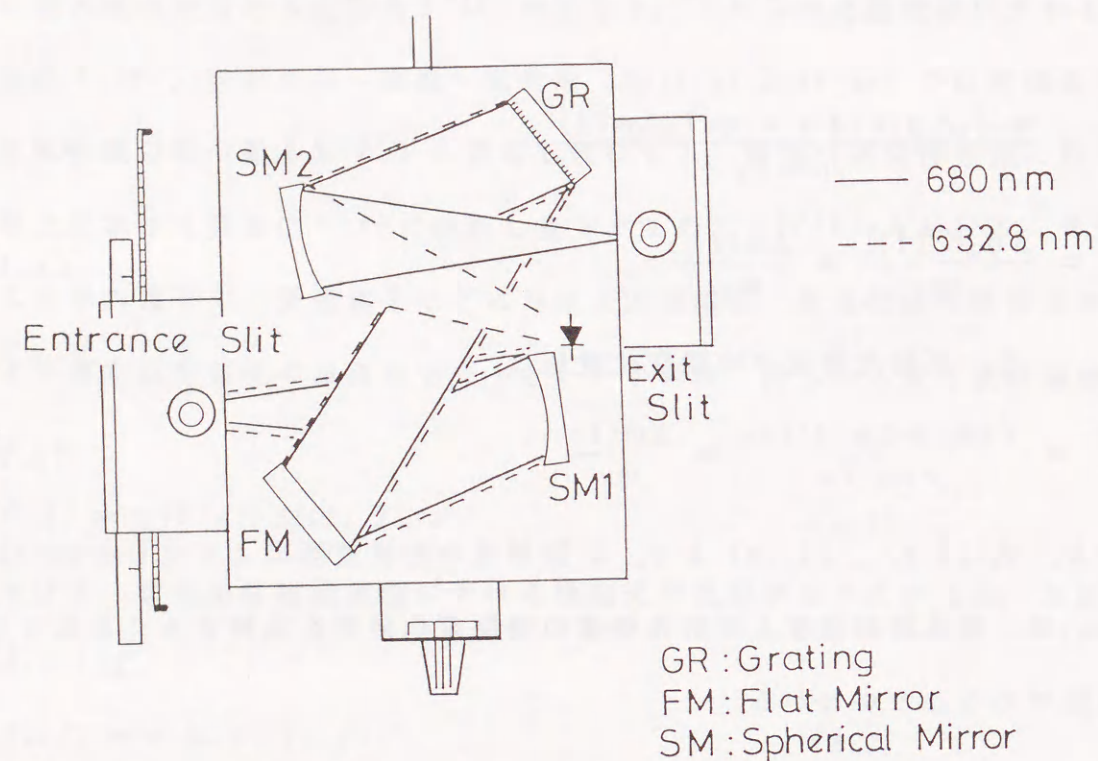


図4. 17 分光器の内部構造

副受光素子としてフォトダイオード (S137-1010BQ: 浜松ホトニクス) を分光器の上蓋より所定の位置に固定した。図4.18に分光器内に増設した副受光素子を外観を示す。副受光素子の挿入による主光路の性能の低下は図4.19に示すごとく低分解能 (後スリット全開) 時において真の計測波長より長波長側の光出力に若干の低下が見られた。これは副受光素子が主光路上に若干の影を作るためであるが、主光路の分解能 (半値幅) 自体には影響はなかった。

副受光素子であるフォトダイオードの出力電流はOp-Ampを用いた電流-電圧変換回路により電圧に変換される。通常の計測では副受光素子の出力電圧は1.0-10.0 (mV_{p-p})であった。図4.20は副受光素子で行ったHe-Neレーザ光

($\lambda_e = 632.8\text{nm}$) 分光特性を示している。そのピークは設計通り真の波長より約50nm長波長側に移動した。副受光素子の有効受光面 (10×10mm) が予定より大きかったために分解能は80nm程度となった。このことより図4.17に示す状態においても主光路の上の光の一部が副受光素子に入射していることがわかる。しかし、分光器に入射する反射光と蛍光の強度は図4.21に示すように反射光の方が蛍光よりも2ケタ程度大きく、副受光素子の出力は反射光強度を表していると言える。図4.22にシステム構成を示す。

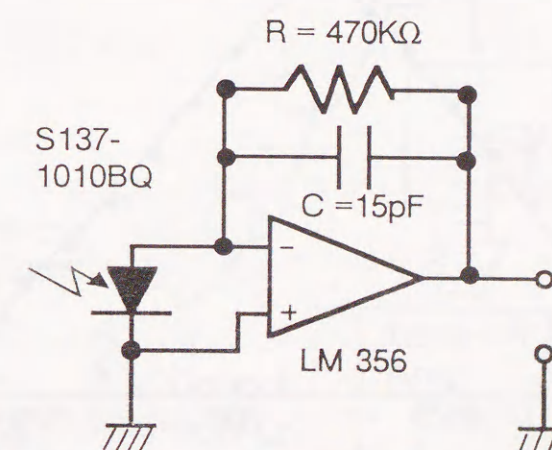
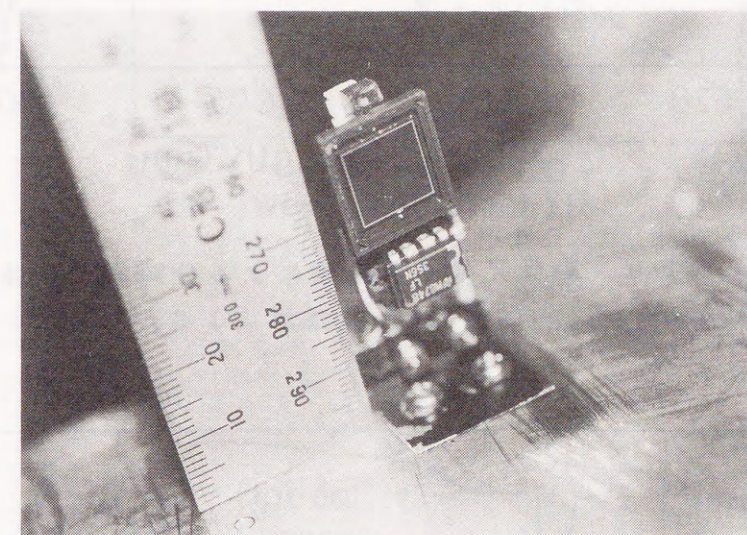


図4. 18 副受光素子及びI-V変換回路

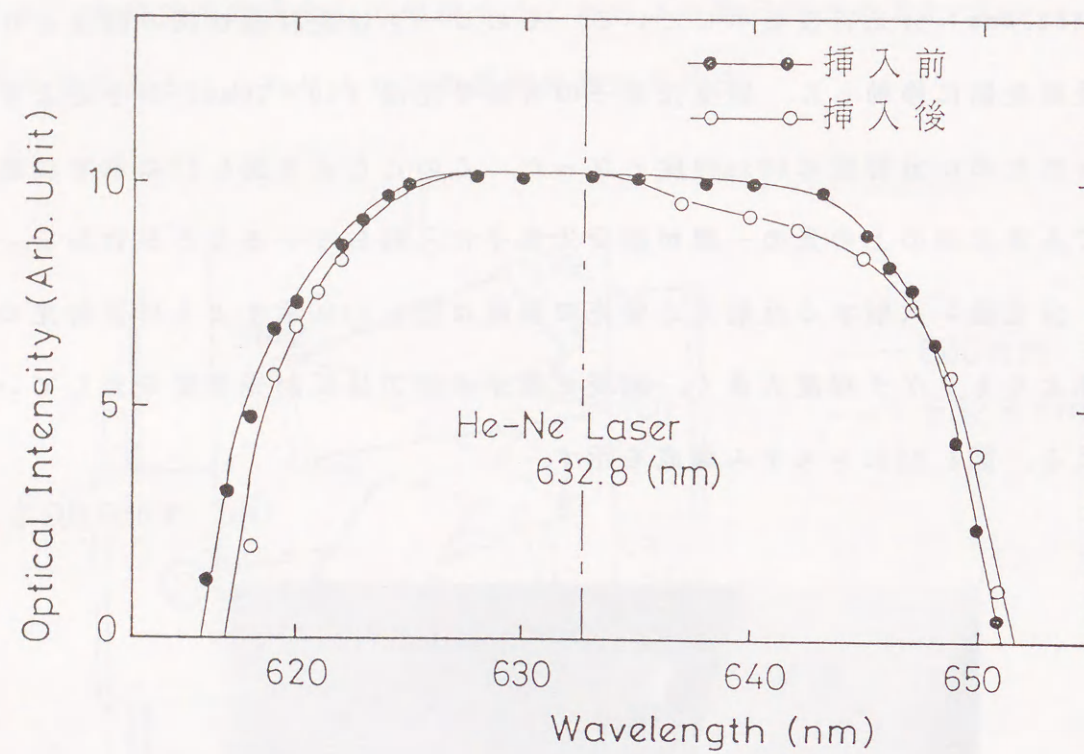


図 4. 1 9 副受光素子の増設による分解能の変化

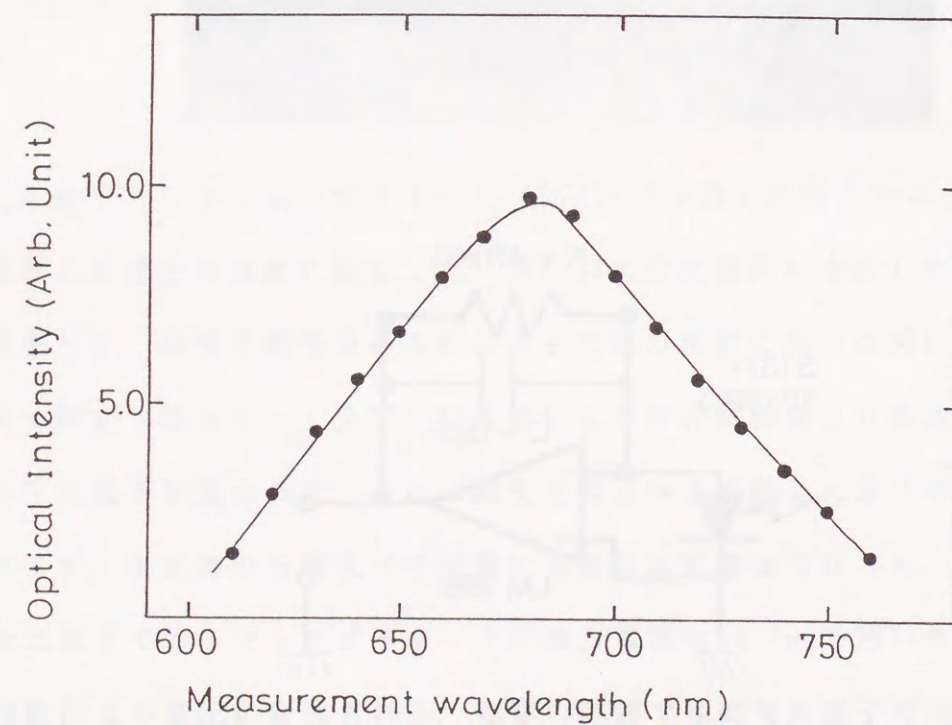


図 4. 2 0 副受光素子によるHe-Neレーザ光の分光

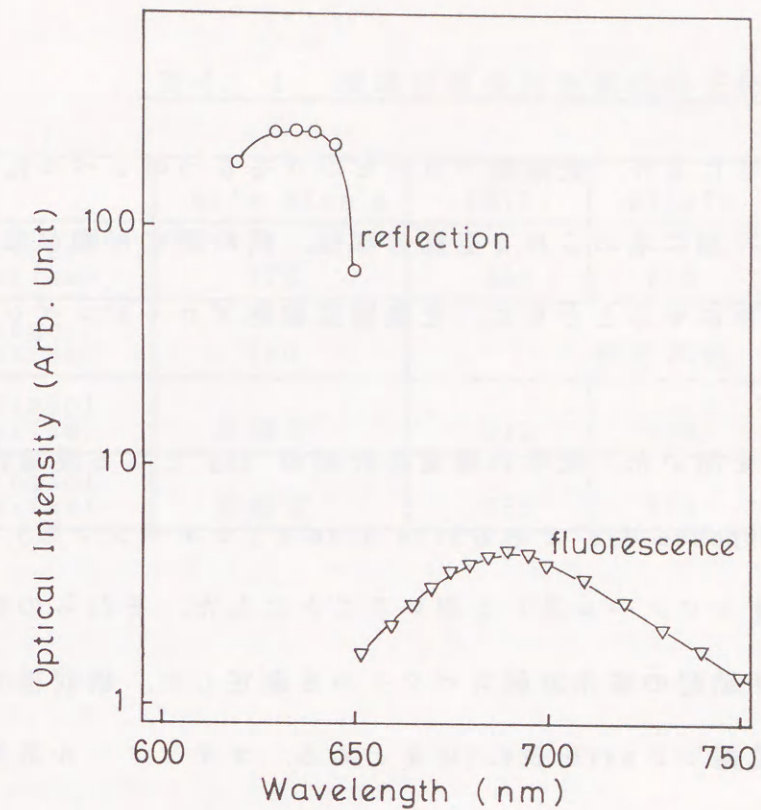


図 4. 2 1 反射光とNile Blue Aの蛍光放射

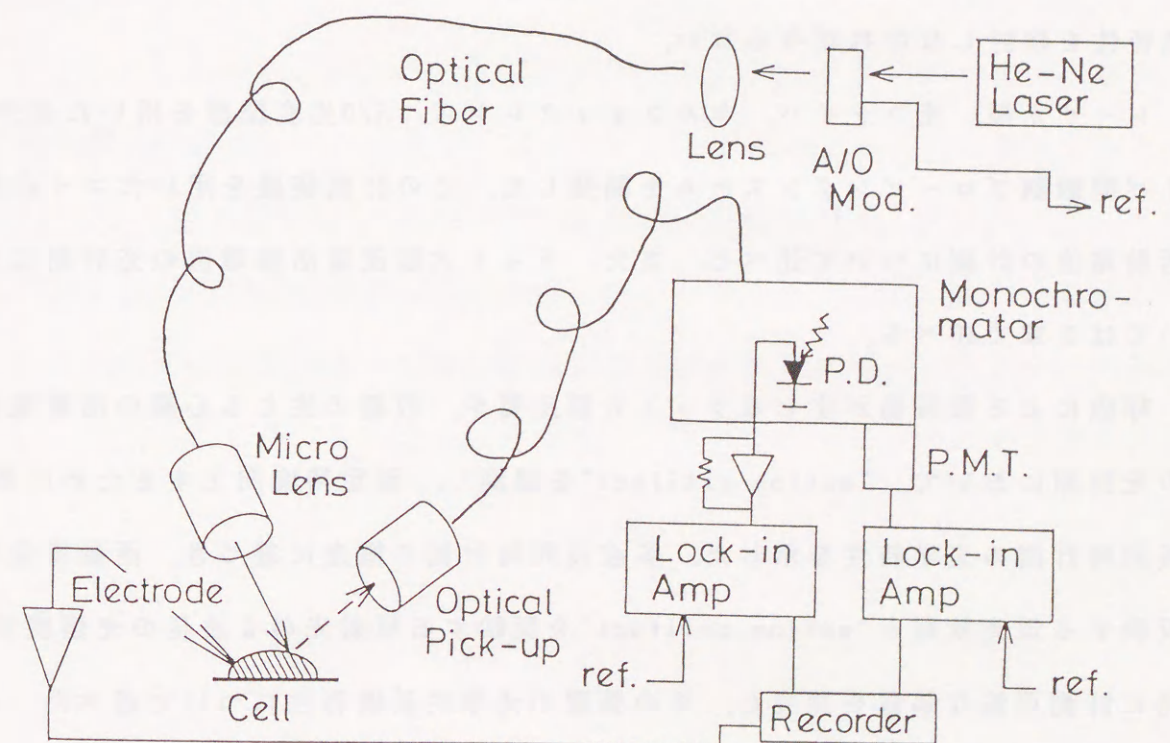


図 4. 2 2 2 波長同時計測システム

4.7 まとめ

計測対象の大きさにより，光細胞プロービングを5つのレベルに分類し，それぞれのレベルの計測に求められる空間分解能，同時測定可能な領域の大きさ，時間分解能を明らかにするとともに，光集積型細胞プロービングシステムの構想について述べた。

外因性の（色素を用いた）光学的膜電位計測の“key”となる膜電位感受性色素として，“fast response dye”であるNile Blue A（オキサジン系）及びWW781，RH155，NK1939（オキソノール系）を用いることにした。それらの吸収スペクトル及びHe-Neレーザ励起の蛍光放射スペクトルを測定した。吸収極大の位置： λ_{\max} ，蛍光極大の位置： F_{\max} を表4.1にまとめる。オキソノール系膜電位感受性色素を用いた場合，吸収過程，発光過程ともに溶媒効果が顕著であり，溶液中の分光特性だけからでは，He-Neレーザを光源とした光学的膜電位計測に適しているか議論することはできない。実際に計測対象である生体組織を染色し，分光特性を検討しなければならない。

レーザ光源，光ファイバ，セルフロックレンズ，A/O光変調器を用いた光ファイバ型細胞プロービングシステムを開発した。この計測装置を用いたコイ心室活動電位の計測について述べた。また，ラット大脳皮質活動電位の光計測については5章で述べる。

呼吸による微振動が生じるラット大脳皮質や，収縮の生じる心臓の活動電位の光計測において，“motion artifact”を識別し，測定精度向上するために多波長同時計測の光学特性を示した。多波長同時計測の概念に基づき，活動電位を反映する蛍光放射と“motion artifact”を反映する反射光の2波長の光強度が同時に計測可能な装置を開発し，その装置の光学的基礎特性について述べた。この計測装置を用いたコイ心室活動の計測については6章で述べる。

表4. 1 膜電位感受性色素の分光特性

	Nile Blue A	WW781	NK1939	RH155
Ringer $\lambda_{\max}(\text{nm})$	620	600	610	620
Ringer $F_{\max}(\text{nm})$	680	測定不能		
Ethanol $\lambda_{\max}(\text{nm})$	未測定	612	625	未測定
Ethanol $F_{\max}(\text{nm})$	未測定	655	670	未測定

5 章 大脳皮質活動電位の 光プロービング

5.1 はじめに

本章では脳組織の活動電位の光計測について述べる。中枢神経系（脳）では多数箇所の活動電位を同時に計測し、解析する必要があるが、光学的手法の応用が試みられている。このような試みは計測対象となる生体組織を体外に摘出して行う方法と、生体内に残したまま intact な状態で行う方法に大別される。生体外へ組織を摘出し計測を行うものとしては、ラット海馬における学習メカニズムの解明があげられる。海馬における学習の解明では神経回路網を伝搬する活動電位の計測も重要であるが、長期持続性増強に Ca^{2+} が関連しており Ca^{2+} インジケータ fura-2 などを用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度計測も行われている [16]。intact な大脳皮質での計測はラット及びサル大脳皮質で行われており、視覚野、体性感覚野及び聴覚野が 2 次元的に計測されている [75][76][129]。

ここではネンブタール及びケタラル麻酔下におけるラット大脳皮質の光計測について述べる。膜電位感受性色素として Nile Blue A を用いた。ここではまず計測に必要な大脳皮質の生理について述べ、次に膜電位感受性色素を用いた計測ではその確立が必要不可欠な染色法について述べる。最後に座骨神経刺激時の大脳皮質活動電位の光プロービングについて述べる。

5.2 大脳皮質の生理特性

大脳皮質の構造や機能を実験対象であるラットの大脳皮質の特徴をまじえて述べる。

5.2.1 大脳皮質の構造

ここでは大脳皮質の解剖学的な構造について述べる。大脳皮質は図 5.1 に示すように 6 層から構成され、そこに存在する神経細胞の種類により表 5.1 のような特徴的な名前が付けられている [107]。これら各層のうちで境界が明確なのは IV b 層と V 層間の境界のみである。またその 6 層構造も前頭葉では判然としない。ラットの大脳皮質は約 2mm の厚さで、IV b 層と V 層の境界は皮質表面より約 1mm の深さにある。

5.2.2 大脳皮質における機能局在

大脳皮質は脳の中で最高次の中枢とされ、ヒトにおいては他の動物に比べて著しく発達している。その機能はヒトが人間である根本をなすものであり、言語や運動などの複雑な処理をしているものと考えられる。大脳皮質は図 5.2 のように、表面上の小さな領域を単位として主な機能が異なっており、このことは機能の局在と呼ばれている [107]。しかし、異なる領域間に密接な関係があったり、また特定の領域においても”主な機能”の他に色々な働きが混在しているのが普通である。そこで機能を大別し、運動をつかさどる運動野、感覚情報と密接な関係にある感覚野、そしてそのいずれにも属さない連合野に分類されている。

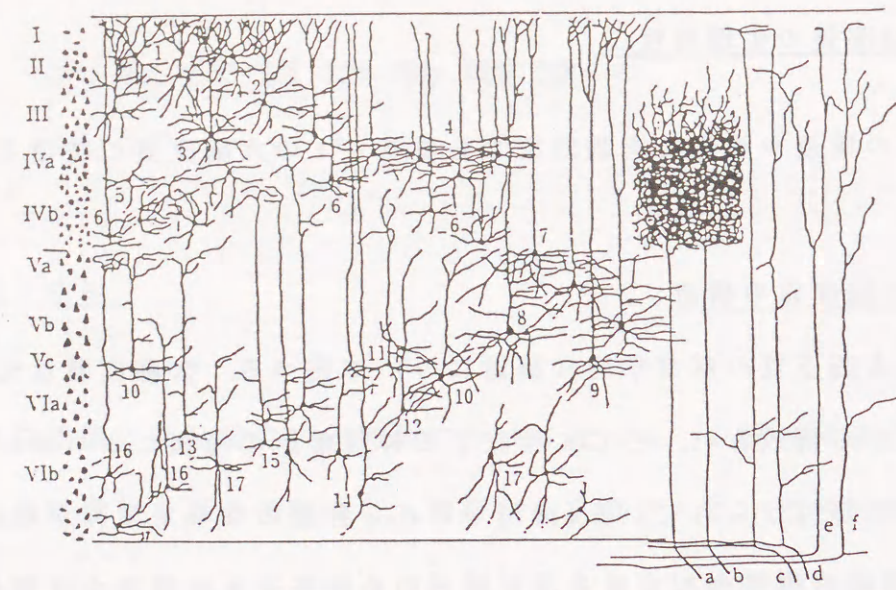


図 5. 1 大脳皮質の構造 [107]

表 5. 1 大脳を構成する細胞の種類 [107]

I : 分子層 (molecular or plexiform layer)
II : 外顆粒層 (external granular layer) (小錐体細胞層 small pyramids)
III : 錐体細胞層 (pyramidal cell layer) (中錐体細胞層 medium sized pyramids)
IV : 内顆粒層 (internal granular layer) IV a : 星状錐体細胞層 (star pyramidal cell layer) IV b : 星状細胞層 (star cell layer)
V : 大錐体細胞層 (giant pyramidal layer) (深大錐体細胞層 large deep pyramids)
VI : 紡錘細胞層 (fusiform or spindle cell layer)

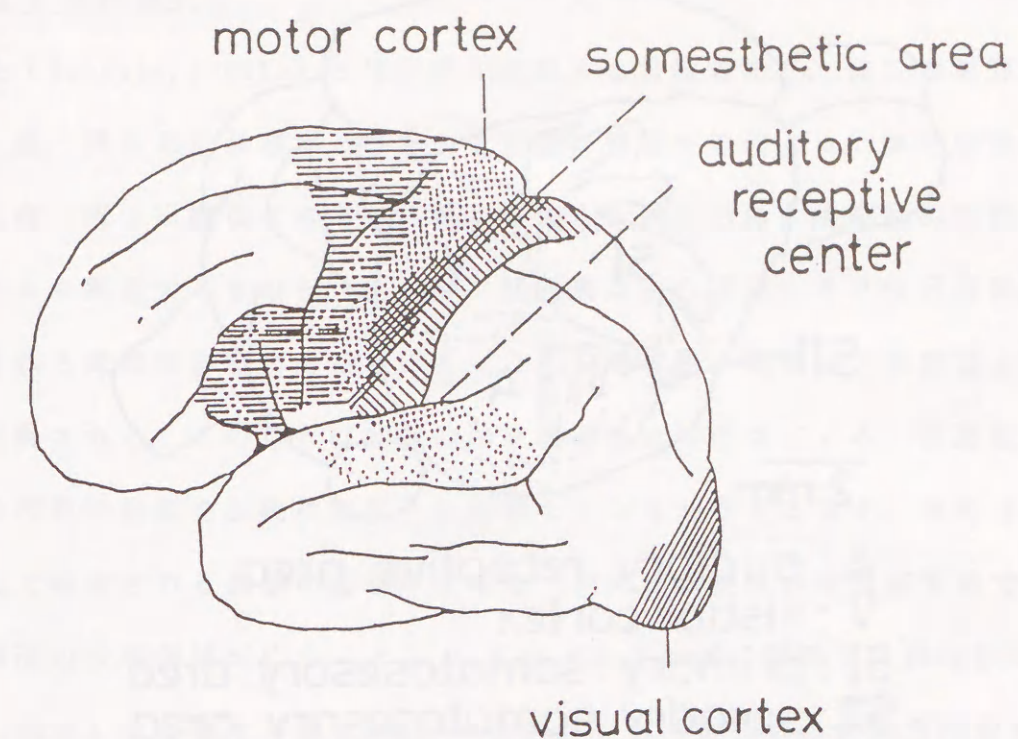
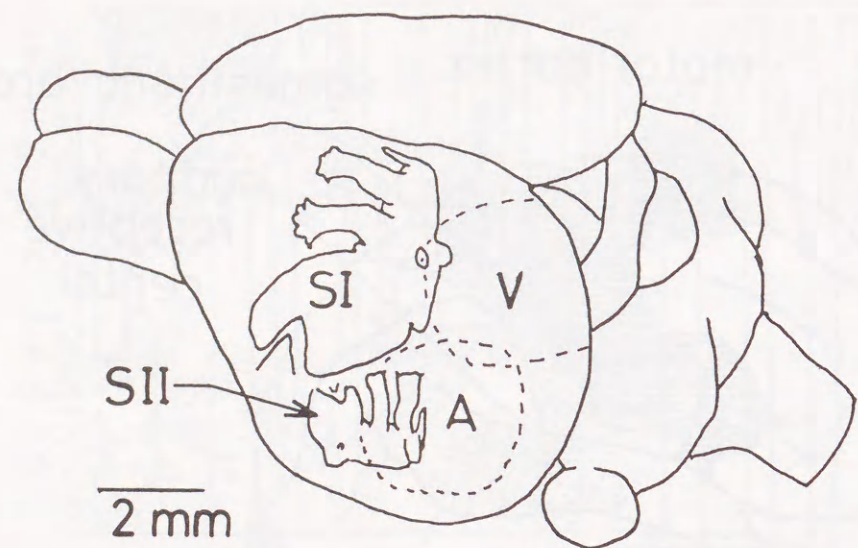


図 5. 2 ヒト大脳皮質における機能局在 [107]

5.2.3 感覚野

感覚野は眼を通して入ってくる視覚情報を処理する視覚野，耳より入る情報処理を受け持つ聴覚野，そして皮膚，皮下組織などに外界より加えられた機械的変形，温度変化などの情報を処理する体性感覚野に分類される．図 5.3 に我々が実験対象としているラットの感覚野の局在を示す [108]．

大脳皮質に各種刺激により誘発される電位は，単一神経線維などの活動電位と比べ特徴的なものである．すなわち，刺激が与えられてから興奮が生じるまでに潜時が 10～30msec あり，興奮は約 100msec 持続する．これを一次応答と呼び，これより後に起きる応答を二次応答と呼ぶ．図 5.4 に一次応答の概念を示す．また一次応答が見られる領域を一次感覚野，二次応答が見られる領域を二次感覚野と呼ぶ．



A: auditory receptive area
V: visual cortex
SI: primary somatosensory area
SII: secondary somatosensory area

図 5. 3 ラット大脳皮質における機能局在 [108]

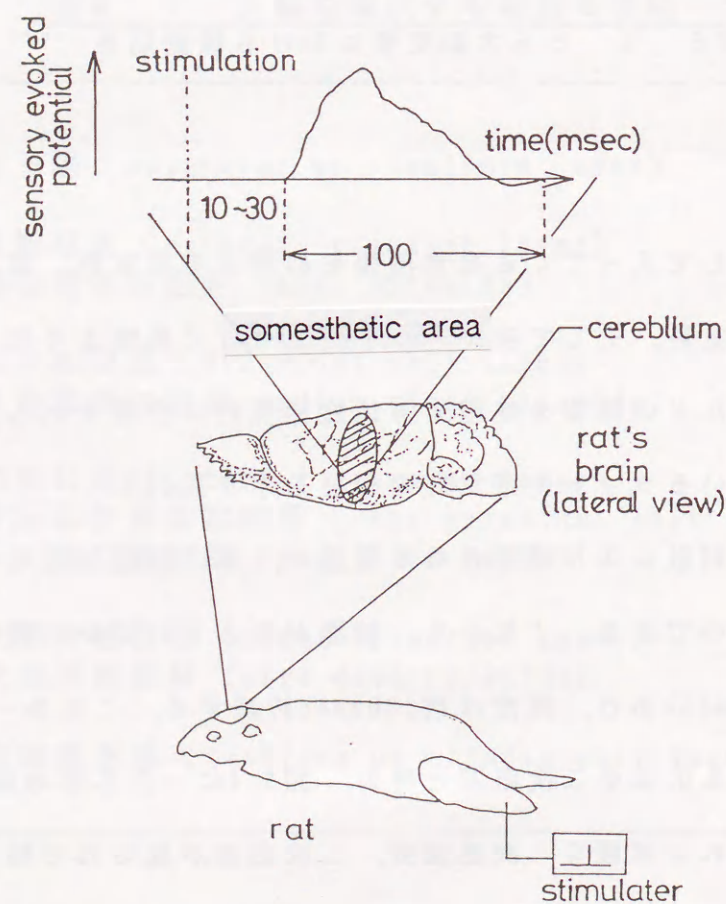


図 5. 4 一次応答

5.2.4 体性感覚野

体性 (Somatic, Somato) とは身体を意味する言葉であり、体性感覚野は皮膚、粘膜、筋、腱などに存在する種々の受容器の情報を処理する。体性感覚受容器は、皮膚、皮下組織などにあり外部から加えられた力による機械的変形、温度変化により興奮するものと、筋、腱、関節囊などの深部にあり自己運動により刺激される深部受容器に分けられる。これら受容器の情報は脳皮質上に局在的に再現される。このことは体部位局在的再現と呼ばれている。体部位的局在は体の各部の情報を正確に皮質上に再現しているわけではなく、情報の重要性に応じて投射される領域の面積が異なる。例えば霊長類の体性感覚野では手指及び顔面の投射領域が広く、ネズミ、ウサギなどのげっ歯類では顔面領域、特にヒゲ (洞毛) に対応する領域が広い [109]。これは動物が体性感覚情報をどのように入手しているかに関係している。すなわち霊長類の探索器官は手指であり、ヒトの顔面領域は言語活動のために重要であるためである。また、げっ歯類の探索器官は手指ではなく、口の周囲に生えている長いヒゲであるためである。ところで、げっ歯類の皮質では一本一本のヒゲが投射される領域がきれいな配列で再現されている (図 5.5) [110]。この領域はそれぞれのヒゲに対応する神経細胞が密になった部分であり、皮質表面に水平にスライスすると円輪状の樽のように見えるので Barrl と呼ばれている。樽は IV 層にのみ存在し、大きさは大きなもので $380 \times 170 \mu m$ 、小さな樽で $100 \times 50 \mu m$ 、高さは IV 層の厚さ $100 \sim 120 \mu m$ ほどである。

5.2.5 大脳皮質の円柱構造 (機能的円柱)

大脳皮質における機能の局在や、体性感覚野における樽構造の存在について前述した。ここでは皮質内の深さ方向の結合について機能面より考える。皮質の機能単位として図 5.6 のような円柱構造が提唱されている [111]。その要点は (1) 脳表面に垂直な直径 $0.5 mm$ ほどの円柱が想定できる。 (2) 同一円柱内の

神経細胞は同一刺激に反応し、潜時が等しい。(3)隣接する円柱とは画然と区別ができる。直径の0.5mmとは大型の錐体細胞の樹状突起の水平方向の広がり一致する。このような円柱構造の例として体性感覚野の樽があげられる。その他に円柱は視覚野では方向軸、左右眼の優位性で分けられ、聴覚野においては音の周波数により区別される。大脳皮質を機能面より研究しようとするとき、この機能円柱の解明が重要である。

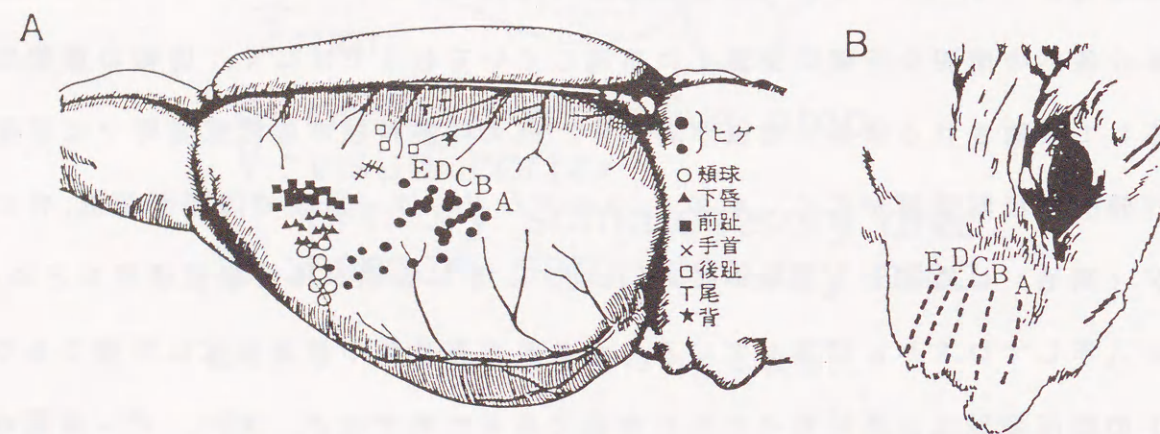


図5. 5 ラット大脳皮質における体部位再現 [109], [110]

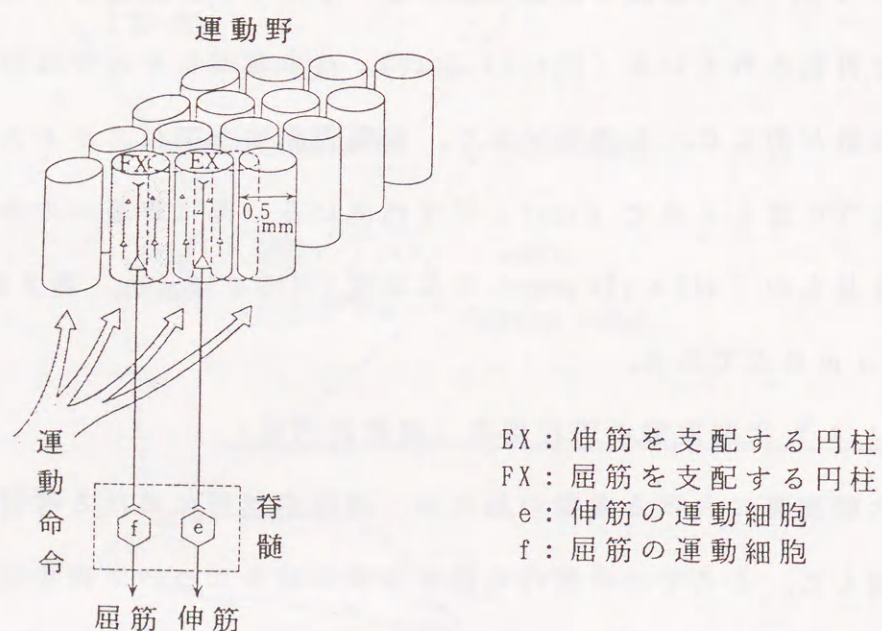


図5. 6 大脳皮質の円柱構造 [111]

5.3 実験及び染色方法

5.3.1 実験方法

ヒトの脳機能構造に類似しており臨床応用が容易である哺乳類を実験対象とした。入手の容易さ、手術等の扱い易さより、性格のおとなしいWister系のラットを用いた。ラットは静岡県実験動物農業共同組合(浜松市)より哺乳(2週齢)で購入した。ラットが実験に耐えられる体重(約150g)になるのを待ち実験を行った。個体差、性差があるが約7~8週間でこの体重に成長する。

本研究ではintactな状態にある大脳皮質の活動電位を計測しようとしており、実験時には切頭し計測部位を露出しレーザー光が照射できるようにしなければならない。計測の流れを図5.7に示す。各過程について次に述べる。

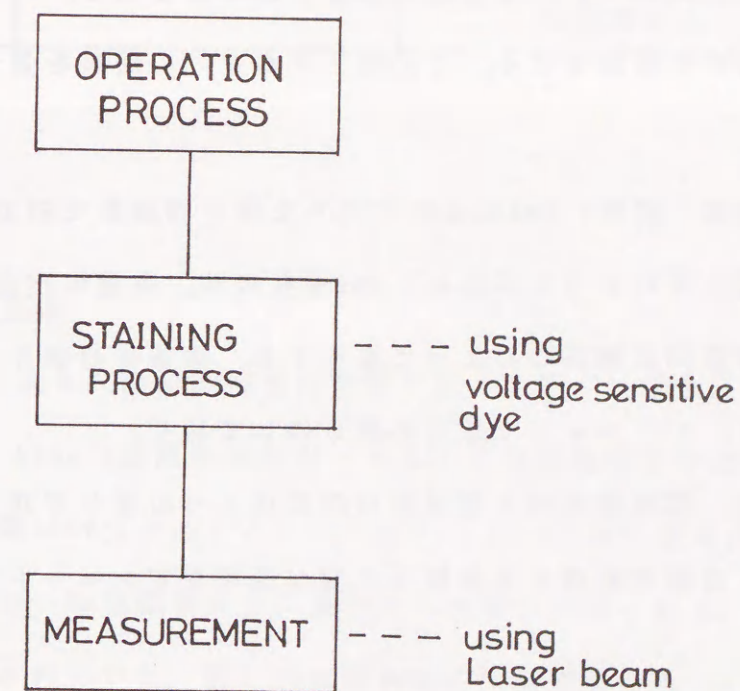


図5. 7 計測の流れ図

〔手術過程〕 手術過程は外科的手術を行い計測部位を露出させるまでの医学的過程のことである。

1) ラットに麻酔を施す。麻酔剤の投与量を決めるためにラットの体重を計る。計測は5g単位で行った。麻酔剤としてネンブタール（ペントバルビタールナトリウム）及びケタラルを用いた。どちらの麻酔剤も液体の全身麻酔剤であり、生理学の実験によく用いられる。その特徴を表5.2に示す。ネンブタールは強アルカリ性の注射液であり必ず腹腔内に注射する。投与時には一度注射器のプランジャを引き、血液、尿が入り込まないこと（血管等でないこと）を確認の上、静かに注射する。

2) ハサミ、カミソリを使い手術部位の体毛を剃り落とす。洞毛（ヒゲ）も光計測の障害にならないように根本で切り落とす。

3) 頭蓋骨の露出。頭部ホルダで頭を固定する。頭頂の皮膚をハサミで切除する。（出血は殆どない。）メスを使い頭蓋骨上の膜を切り、メスの柄で膜を完全に除去し頭蓋骨を露出させる。この時メスがアゴの筋肉を傷つけないように注意する。

4) 頭蓋骨の除去。直径1.0mmほどのドリルを使い頭蓋骨を削る。この時ドリルが頭蓋骨を貫通しないように刃先は1.0mm程度にし、多量の出血を起こしやすい正中（縦走）静脈洞に触れないように注意する。頭蓋骨の破片はピンセットで取り除き、鉗子、ピンセットで骨を外側に碎いて行く。

5) 硬膜の除去。脳組織表面と頭蓋骨の間には3つの膜が存在する。このうち硬く不透明で、血管が存在する硬膜を先端が鋭利なピンセットで取り除く。

〔染色過程〕 摘出された組織の染色過程は、膜電位プローブ溶液中に組織を浸すことにより行われる。in vivoな状態ではこれは不可能なので、膜電位プローブを染み込ませたガーゼ、脱脂綿を露出された脳組織表面上に置くことによ

り行った。

〔計測過程〕 染色後の大脳皮質を用いて種々の目的に応じて計測を行った。

表 5. 2 麻酔剤の特徴

	ネンブタール	ケタミン
投与法	腹腔内注射	筋肉注射
投与量	50mg/kg b. w.	200mg/kg b. w.
効果が現れるまでの時間	遅い	早い（10分以内に後肢の動きが止まる。）
麻酔の深さ	深い 呼吸の維持に注意	浅い よく首を振る
薬効	中枢神経全般の抑制	皮質、皮質下領域における抑制
その他		気管支粘膜分泌抑制剤を併用する

5.3.2 染色実験

Nile Blue Aによる大脳組織染色の結果を以下に示す。染色方法は前述した通りであり、Nile Blue A溶液を含むガーゼあるいは脱脂綿を計測領域上に置き染色した。染色時間は60分をめぐとした。図5.8, 5.9は染色後の大脳皮質の様子を示す写真である。脳組織表面上に染色された領域が見られる。また、1mm程度の深さまで染色されていた。図5.10は染色後の大脳皮質のHe-Neレーザ励起の蛍光放射強度スペクトルを示す。ピークは $F_{max}=680\text{nm}$ 付近に生じ、生理食塩水中より得られた蛍光放射スペクトルにほぼ一致した。

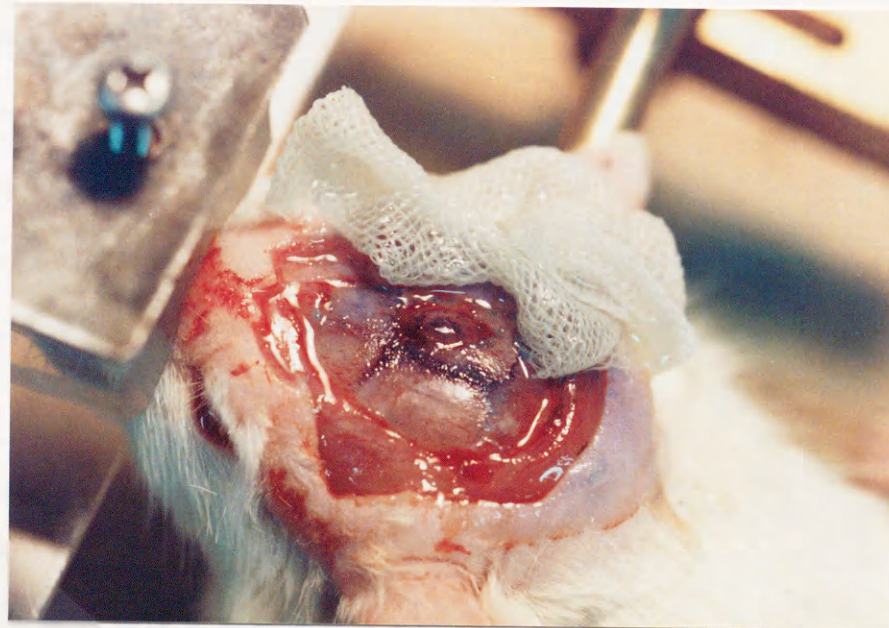


図 5. 8 染色後の大脳皮質及びラット頭部



図 5. 9 染色後の大脳皮質

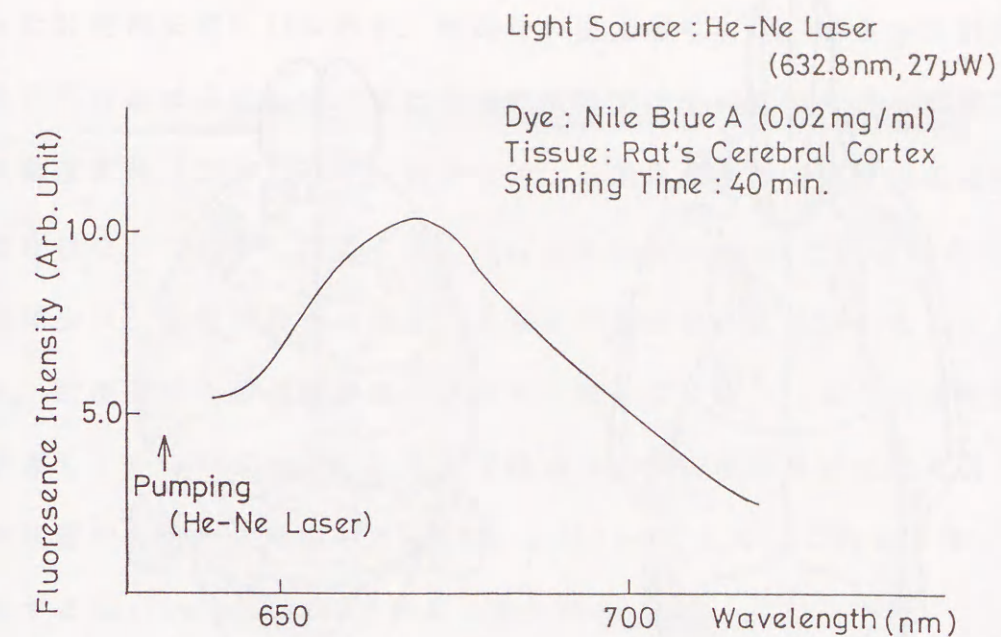


図 5. 10 Nile Blue A染色後のラット大脳皮質からの蛍光放射スペクトル

5.4 体感性誘発活動電位の計測

座骨神経刺激により対側の大脳皮質に誘発される体性感覚誘発電位の光計測を行った。座骨神経の刺激は2本の直径0.5mmの銀線で構成された双極電極で行った。後肢を切開し、大腿直筋中に白糸状にみえる座骨神経に双極電極を取り付けた。印加電圧は刺激により緩やかに後肢が収縮する程度とし、約2Vとした。計測領域の位置確認は冠状縫合と矢状縫合の交点：ブレグマ（前項）を基準として行った。次に述べる計測例に対する計測領域を図5.11に示す。計測領域Aは図5.12の計測に、計測領域Bは図5.13の計測に対応する。計測領域の頭蓋骨及び硬膜除去後、膜電位感受性色素:Nile Blue A (0.02mg/ml) で60分染色した。染色後、大脳皮質表面に付着している色素を生理食塩水を用いて洗浄した。

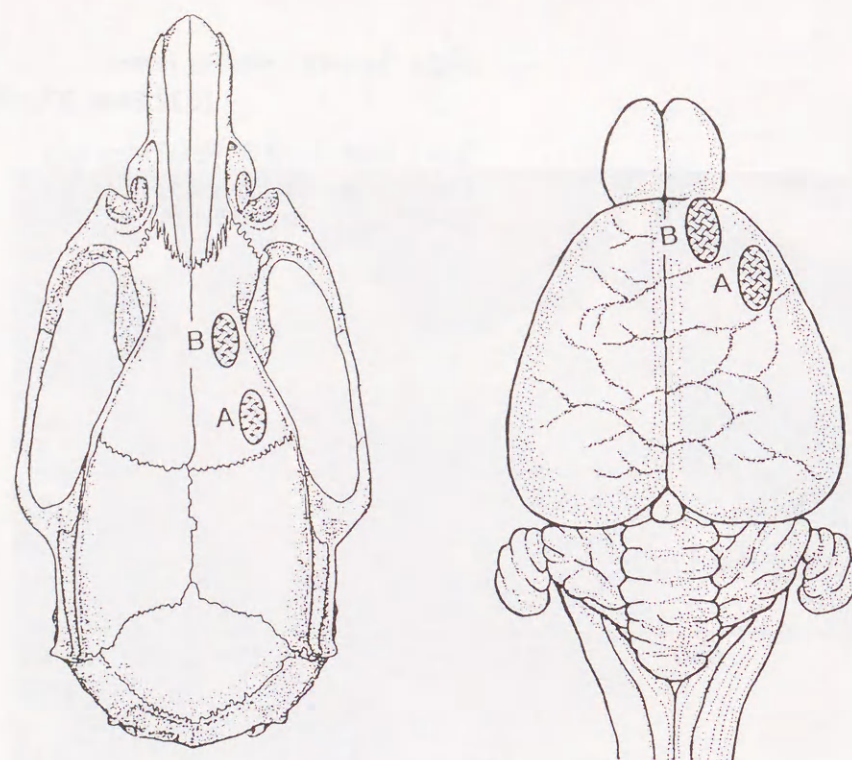


図 5. 1 1 計測領域

図5.12(a)に刺激印加時の蛍光放射強度，すなわち $\lambda_m=680\text{nm}$ における光強度の時間変化波形（以下，蛍光信号と略す．）を示す．膜電位に依存した光強度の変化が現れるとされている蛍光放射強度は，刺激の印加に応じてその強度を1-2%変化させる．その周期は印加された刺激とほぼ同一のものである．これに対して無刺激下の蛍光信号（図5.12(b)）からは周期を持った変化が消失する．このことより図5.12(a)に得られた結果には呼吸性のmotion artifactの混入がないものと考えられる．図5.12(c)，(d)は，ほぼ同時刻の励起光の反射強度（ $\lambda_e=632.8\text{nm}$ ）の時間変化波形（以下，反射光信号と略す．）を示すが，これらには図5.12(a)に見られたような周期性を持つ変化は見られない．このことより，刺激の印加による効果器の反応により誘発されたmotion artifactの存在が否定される．

次に計測領域が嗅球に近く（図5.11，計測領域B），後肢の刺激には応答しなかった計測例を図5.13に示す．刺激時の蛍光信号には，明らかに刺激と相関のある応答は認められない．また同様に反射光信号にも明らかな刺激と相関を持つ光強度変化は認められず，刺激に対する効果器である後肢の応答による光強度変化は生じていない．ところで5%以上かつ0.6msecほど持続する一過性の光強度の減少は，座骨神経への刺激，光強度の測定波長に依存することなく生じており，計測領域下の神経線維の活動を反映していない．また光強度変化が波長に依存していないことより，ここで得られた蛍光信号及び反射光信号は計測領域の位置的変動により生じたmotion artifactである．これは，ラットの呼吸に起因するmotion artifactであると思われる．

以上のことより図5.12(a)で記録された蛍光放射強度変化の中には何らかの脳皮質活動を反映した情報が含まれていると考えられる．刺激を印加してから変化が現れるまでの潜時が200msec程度あることより，聴覚領域のP300と同様な後発反応を記録したものと思われる．

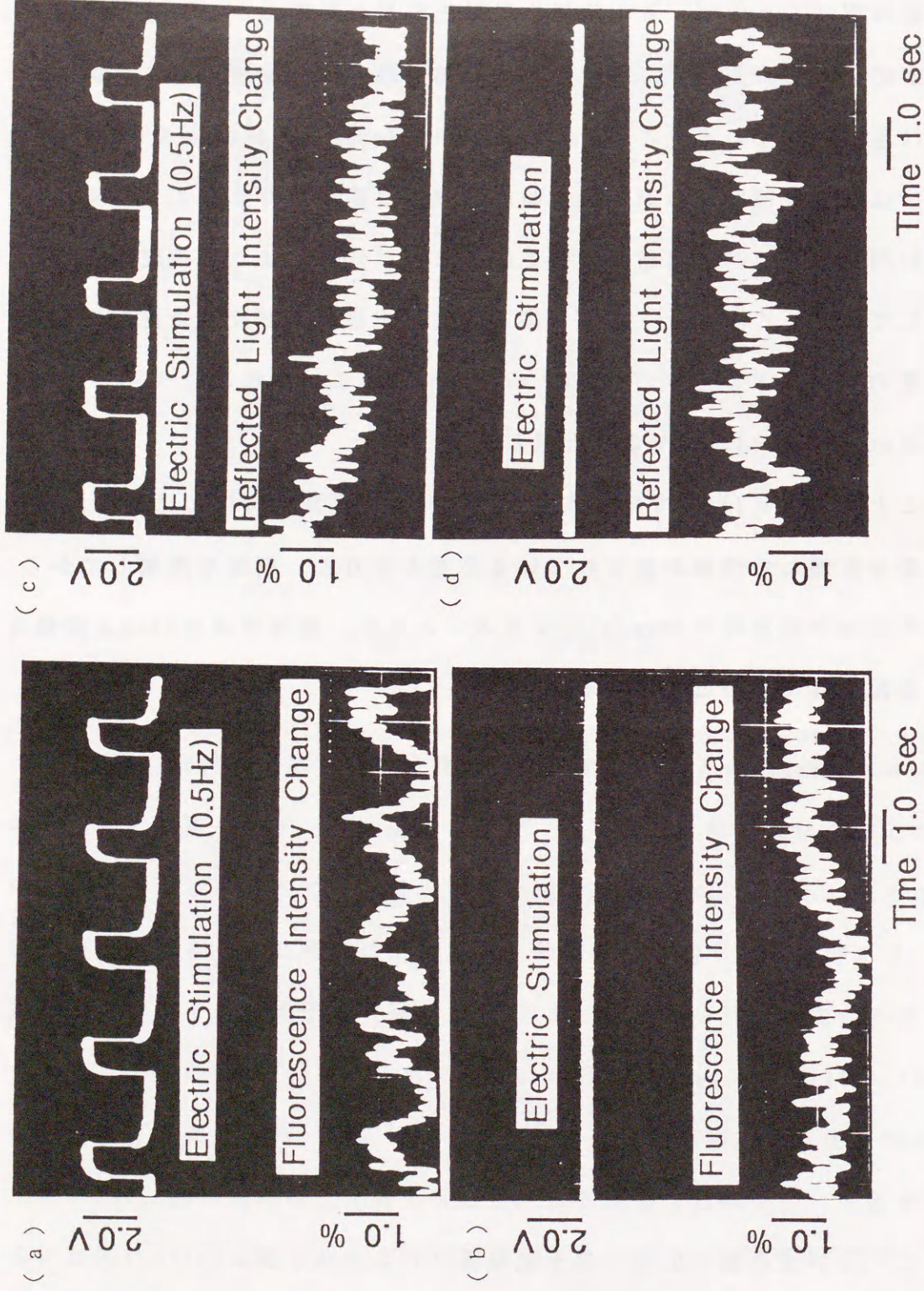


図 5. 1 2 ラット大脳皮質における座骨神経刺激による誘発活動電位の光計測（成功例）

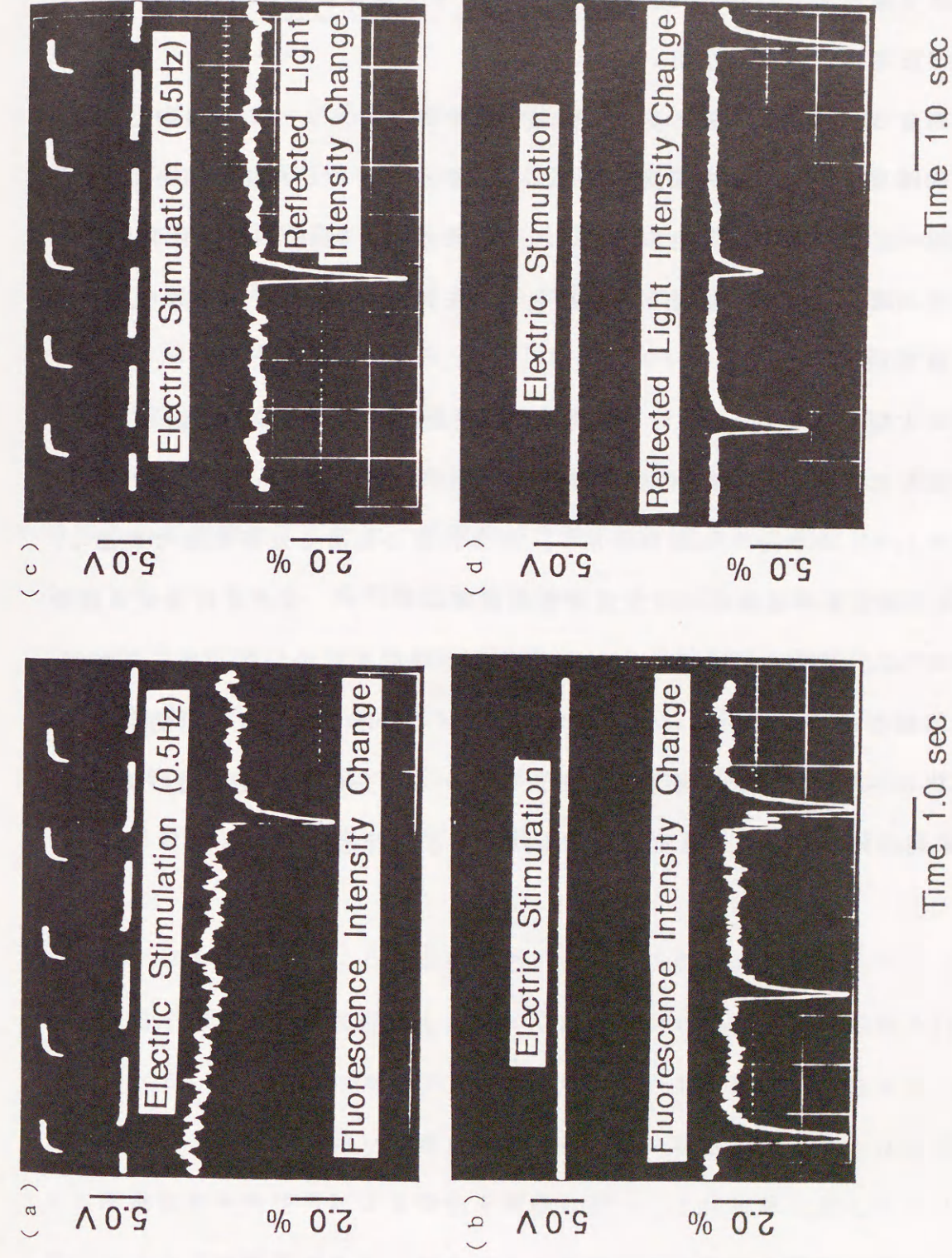


図 5. 1 3 ラット大脳皮質における座骨神経刺激による誘発活動電位の光計測（失敗例）

膜電位感受性色素：Nile Blue Aを用いたラット大脳皮質活動電位の計測を光ファイバ型膜電位計測装置を用いて行った。

計測に先立ちintactな状態のラット大脳皮質の染色方法について検討した。頭蓋骨、硬膜を除去された大脳皮質上に、色素溶液を含ませた脱脂綿あるいはガーゼを用いて大脳皮質の染色を行った。染色液濃度0.02mg/ml, 染色時間1時間で、皮質表層の染色が確認できた。染色される深さは、1mm程度であり、大脳皮質の上層だけであった。

染色後の大脳皮質よりHe-Neレーザ励起の蛍光放射スペクトルを計測し、蛍光放射を確認した。極大蛍光放射波長は $F_{max}=680\text{nm}$ であった。

ネンプタール、ケタラール麻酔併用下、座骨神経の刺激を双極電極で刺激し、Nile Blue A染色後の対側の大脳皮質体性感覚野において、蛍光放射強度の経時変化を計測した。刺激に応じた1-2%の蛍光放射の増加を記録した。ほぼ同時刻の反射光強度変化は雑音レベルの変化を示しているだけで、刺激と相関が認められる変化は生じなかった。座骨神経刺激に対する蛍光放射強度増加に関する潜時は200msecほどであり、聴覚領域でのP300などと対応付けられる。

6.1 はじめに

ここではオキサジン系膜電位感受性色素：Nile Blue A及びオキソノール系膜電位感受性色素：WW781を用いたコイ心室活動電位の2波長同時計測について述べる。すなわち膜電位に依存し変化する膜電位感受性色素からの蛍光放射と、膜電位に依存しない生体組織表面からの励起光の反射を同時に計測した。

心筋活動電位の光計測は神野ら[68][69], Moradら[80]により報告されている。心筋活動電位の光計測では計測対象である心筋が興奮により収縮し、計測部位に位置的変動及び形状の変形が生じ、膜電位に依存しない光強度の変化が生じる。この筋収縮により生じ、膜電位を反映しない光強度の変化はmotion artifactと呼ばれている。筋収縮は活動電位のスパイク相より遅れて生じる心筋内 free-Ca^{2+} の増加により生じる[112]。Komuroらの計測では生理食塩水中より Ca^{2+} を除去した Ca^{2+} -free溶液を用いて、過度の筋収縮を抑制した[71]。またDillon & Moradらの計測[79][80]ではスパイク相が筋収縮より先行して生じることに注目し、活動電位中スパイク相のみを用いて家兎心室表面の興奮伝搬を計測した。

本章ではまずはじめに心筋の解剖学的、電気生理学的特性を述べるとともに、ガラス微小電極を用いて計測したコイ心臓の電気現象を光学的計測を行う立場より述べる。既に4章においてオキソノール系色素の環境依存性を示したが、オキソノール系色素を用いる場合染色後の色素の状態を知ることは重要である。また膜電位感受性色素による染色を最適に行うことは生体に加わるダメージを最小にする上で重要である。そこで染色前後の生体組織の吸収スペクトルを計測し、染色後の色素の状態を検討するとともに、異なる時間、染色した心筋よ

り蛍光放射スペクトルを測定し、最適な染色時間の検討を行った。次に摘出後、Nile Blue AあるいはWW781により染色されたコイ心室筋にHe-Neレーザを照射し、計測部位より生じる蛍光放射と励起光の反射強度を2波長同時計測し、motion artifactの光学信号による検出を行った。また、音響光学効果によるビーム偏向器を用い、コイ心室表面上の4点より活動電位の同時計測を行った[113]。

6.2 心臓の電気生理特性

6.2.1 心筋の種類

心筋は、構造的、機能的に骨格筋より複雑であり心筋の収縮弛緩の調節機序なども骨格筋とは極めて異なる。骨格筋では、神経刺激により各細胞がほぼ一定の様式で収縮するのに対し、心筋では、常時変化している身体の変化に対応して、細胞機能を変化させるといった複雑な調整機能を持っている。心臓の主な構成要素は、横紋筋である心筋であり、この心筋は自動的な興奮の発生や、興奮の伝搬に関わる特殊心筋(specialized cardiac muscle)と収縮に関わる固有心筋に分けられる。

固有心筋は収縮に関わる心筋で、さらに心室筋と心房筋に分けられる。典型的な心室筋細胞は、長さ $100\mu\text{m}$ 、直径 $10\mu\text{m}$ で、円柱状の枝分かれもある。心房筋細胞は、長さ $100\mu\text{m}$ 、直径 $5\mu\text{m}$ の紡錘状をしている(図6.1)[114]。興奮伝導に関わる特殊心筋は、洞結節、房室結節とプルキンエ線維に分けられる。洞結節細胞と、房室結節細胞は、心房筋のように細く紡錘状であるが、長さは $20\mu\text{m}$ と短い。また、プルキンエ線維はヒス束、脚、プルキンエ線維網の構成細胞であり、長さ数 $100\mu\text{m}$ 、太さ $30\sim 100\mu\text{m}$ と太い。

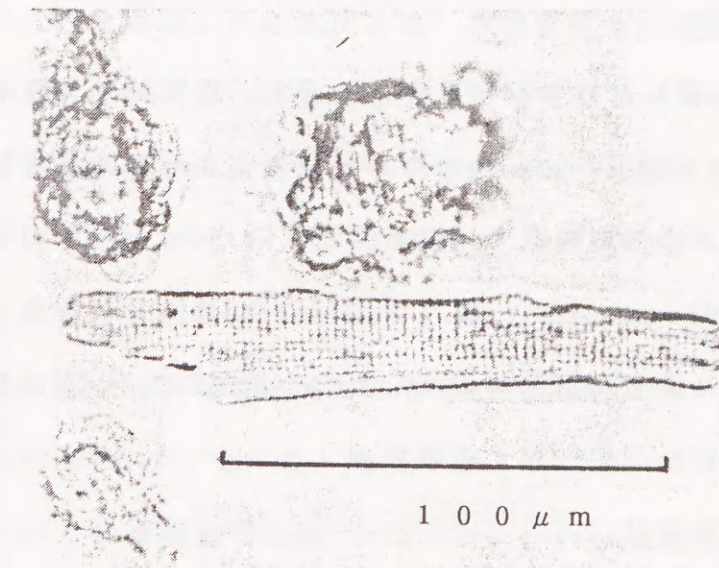


図6.1 心室筋細胞[114]

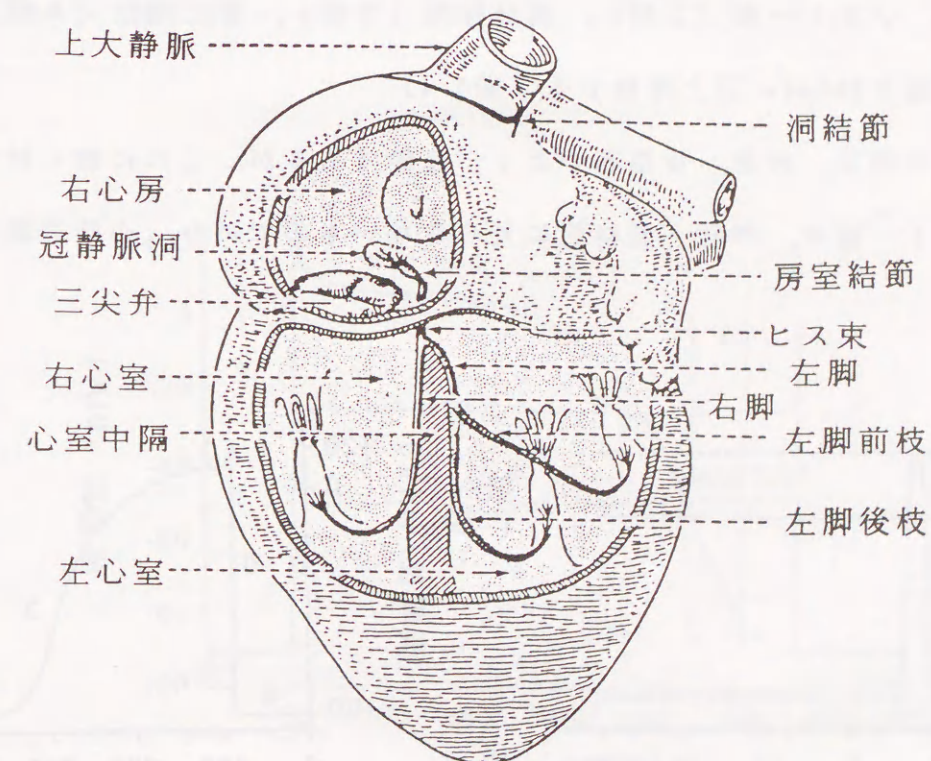


図6.2 ヒト心臓の刺激伝搬系[115]

6.2.2 興奮伝導

図6.2にヒトの心臓における刺激伝導系を示す。正常なヒトの心臓活動は、洞結節 (sino-atrial node:S-A node) のペースメーカー細胞から開始する。洞結節で発生した興奮は心房筋を経て、房室結節 (atrio-ventricular node:A-V node), ヒス束 (His bundle), 脚 (bundle branch), プルキンエ (Purkinje) 線維網からなる興奮伝導系により心室へと伝搬していく[115]。

6.2.3 心筋活動電位

骨格筋、神経の活動電位は、急峻な脱分極に続いて直ちに再分極が起こり、もとの静止電位へ戻る。そのため、活動電位は2相性を示す(図6.3)[116]-[118]。これに対し、心筋ではその活動電位は、長時間持続し数相から成っている。プルキンエ線維における活動電位は、立ち上がり相(0相), 初期再分極相(1相), プラトー相(2相), 再分極相(3相), 静止電位(4相)の5つの相から成り300msec以上持続する(図6.4)。

立ち上がり相は、神経、骨格筋のように急峻であるが、これに続く初期再分極相、プラトー相は、神経、骨格筋に見られないものであり、心筋活動電位の

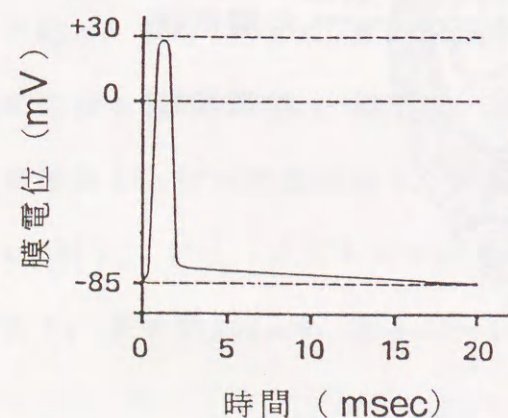


図6.3 骨格筋の活動電位^[118]

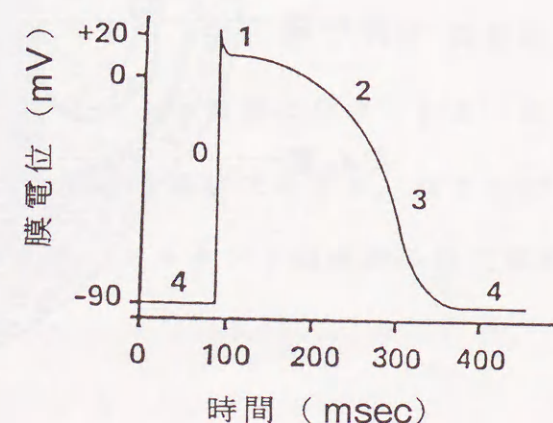


図6.4 心筋活動電位^[118]

持続時間が長いことはこの2つの相による。再分極相は、骨格筋などの再分極相に対応し、静止電位は、他の興奮性細胞と同様である。

次に心筋活動電位発生中の興奮性について述べる。心筋を活動電位発生直後に再興奮させることはできない。これを不応性 (refractoriness) といい、興奮性が低下する期間を不応期 (refractory period) という。心筋の場合、大きな刺激でも伝搬性の活動電位を発生できない有効不応期 (effective refractory period:ERP) があり、そのあと閾値刺激より大きい刺激で伝搬性活動電位を発生することのできる相対不応期 (relative refractory period:RRP) に移行する。このあと閾値以下の刺激で伝搬性活動電位を発生する過常期 (supernormal period:SNP) が続く。相対不応期や過常期に発生する活動電位は通常ゆっくりと伝搬する。脱分極開始から閾値が正常に復し、刺激が正常の伝搬性活動電位を発生するようになるまでの期間を完全回復時間 (full-recovery time:FRT) という(図6.5)。

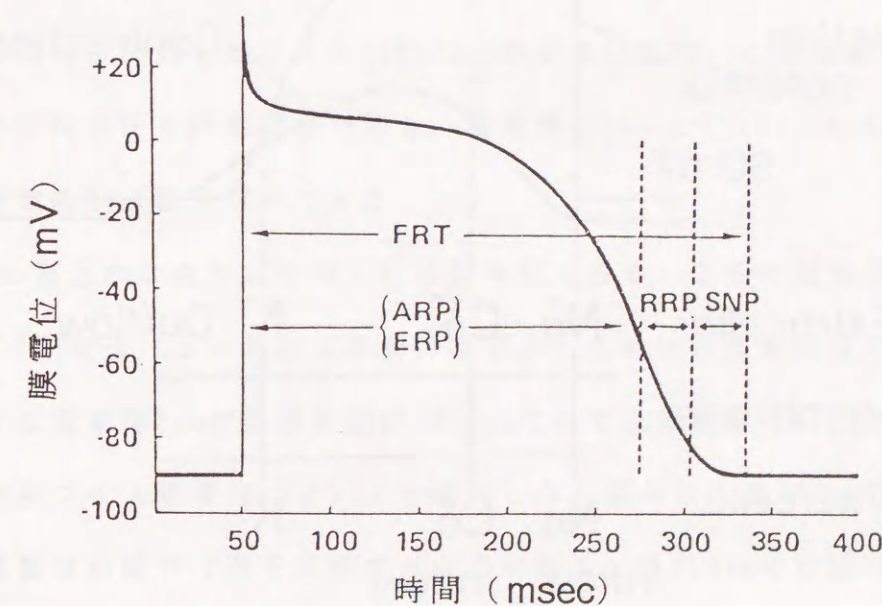


図6.5 心筋における活動電位発生中の興奮性^[116]

6.2.4 興奮収縮連関

心臓における収縮は、心筋形質の脱分極にひき続いて Ca^{2+} が収縮タンパク質トロポニンに結合して収縮の抑制がとれることにより起こる。その過程を興奮収縮連関（excitation-contraction coupling）という。図6.6に活動電位と筋収縮の時間的関係を示す。

骨格筋では、収縮力は活動電位の連続による時間的加重や、興奮する運動単位の数が増加する空間的加重によって調整される。これに対し心筋では、不応期が長いために次の活動電位の発生前に収縮は弛緩をはじめるので時間的加重も空間的加重も起こらない。心筋の収縮力の調整はもっぱら1回の興奮で発生する収縮高の増減により行なわれている。この増減は、心筋の収縮性を変化させる変力作用によるものであり、変力作用は主に細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化による。従って、興奮収縮連関においては、 Ca^{2+} が中心的役割を果たすといえる。

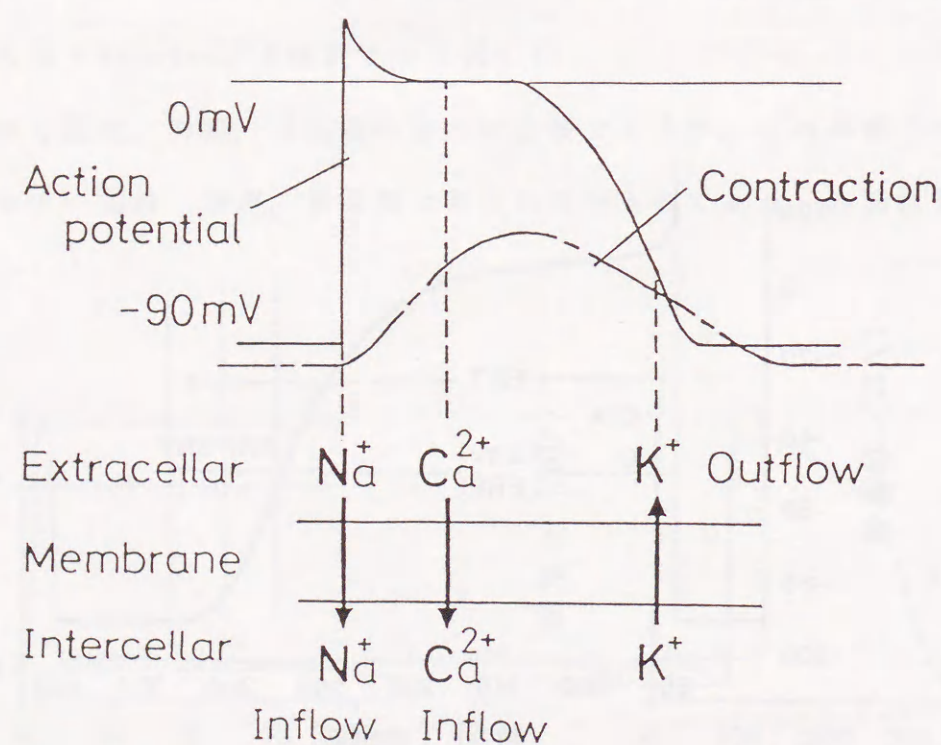


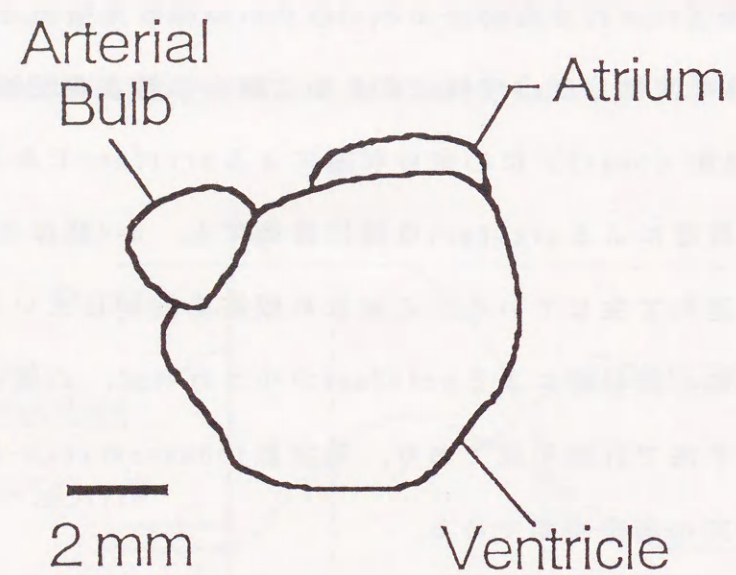
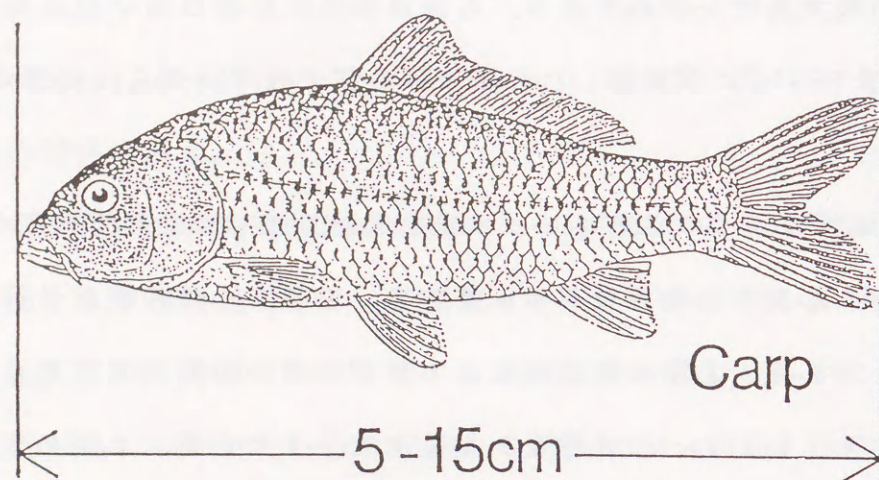
図6.6 興奮収縮連関

6.2.5 コイ心臓の活動電位

図6.7にコイ心臓の模式図を示す。体長5～15cmのコイより摘出した心臓の大きさは心室の最大長で5～7mmである。心室は赤く、心房は暗い赤に見える。また体長5cm前後のコイより摘出した心臓では心房の発達が悪く、心房と静脈洞の区別は難しい。

図6.8は無染色のコイの心室にレーザ光を照射し生じた反射光強度の時間変化波形と、心室、心房の活動電位を示している。心室、心房の収縮は抑制していない。このため心室、心房の筋収縮により計測部位の位置的な変動及び表面形状の変形が生じ、artifact（光散乱）が生じた。また心室、心房の収縮により刺入したガラス電極の状態が劣化し、活動電位の振幅が減少した。活動電位と反射光強度変化： $\Delta I_r/I_r$ を比較すると、はじめの反射光強度の増加（Peak 1）は心房の収縮に依存したartifactであり、続いて起こる反射光強度の減少（peak2）及び増加（peak3）は心室の収縮によるartifactであることがわかる。ところで心室の収縮によるartifactは摘出直後でも、 $n=4$ 個体の平均で心室の興奮に 52 ± 12 msec遅れて生じている。このため収縮を抑制していない心臓でも、心室興奮開始時に心房収縮によるartifactが小さければ、心室活動電位のスパイク相は光学的手法で計測可能であり、時定数100msecのLock-in Ampを用いても、興奮開始時刻は測定可能である。

図6.9は心室上の2点から計測した活動電位である。2本の電極間の距離は約5mmである。測定点-1における興奮は測定点-2における興奮より約20msec遅れている。伝搬距離5mmで遅延時間が20msecなので伝搬速度は0.25m/secとなる。やや大きめのコイ（体長12cm位）より摘出した心臓の最大長が7mm程であり、30msecで興奮は心臓の片面を伝搬することになる。また1mmの空間分解能を実現した場合、サンプリング周期として4msec以上必要である。



Heart of carp

図6. 7 コイ心臓の模式図

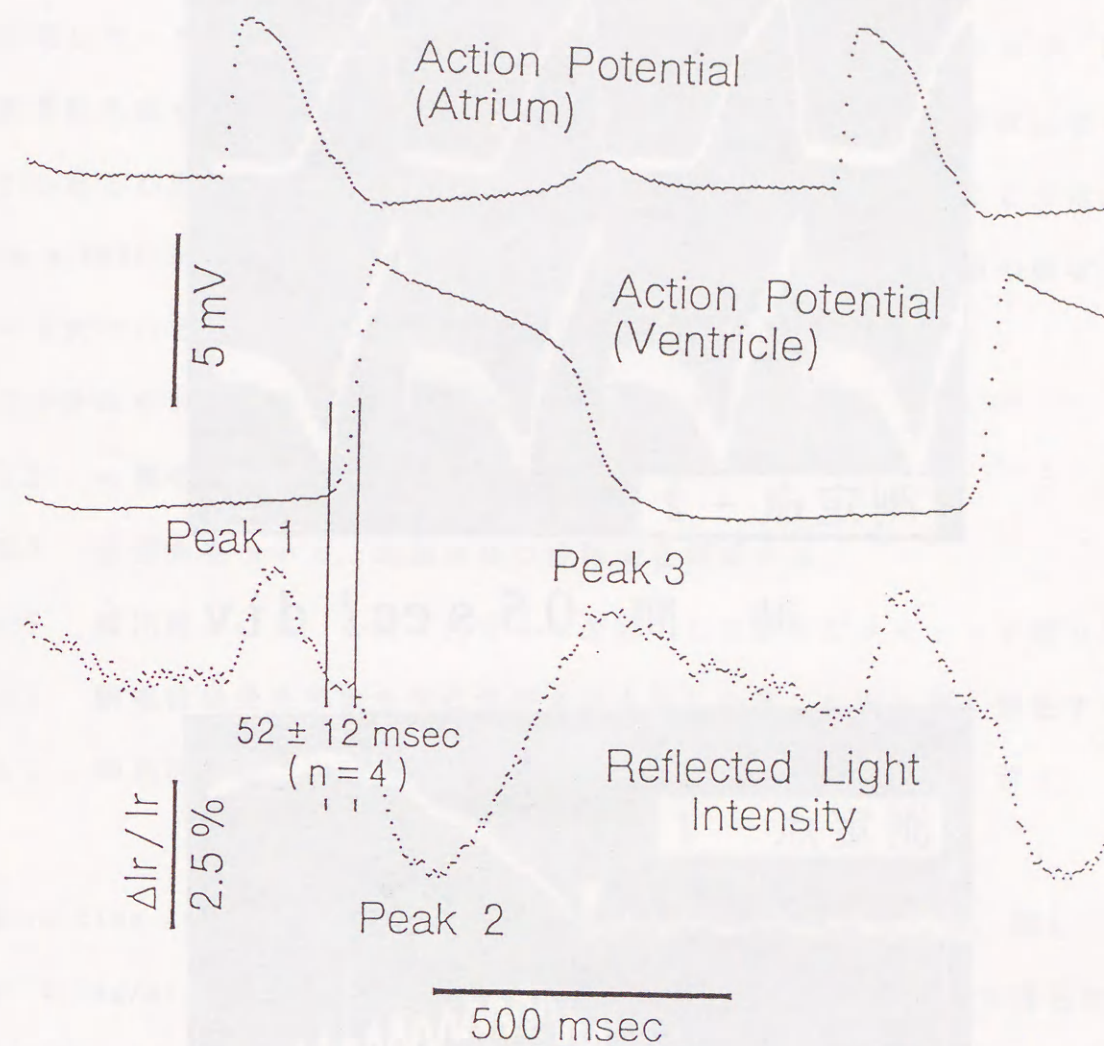
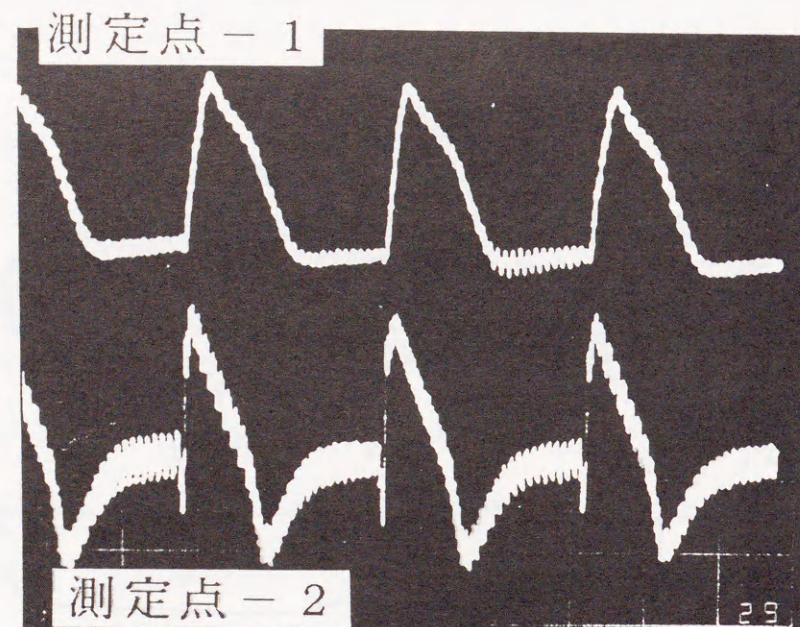
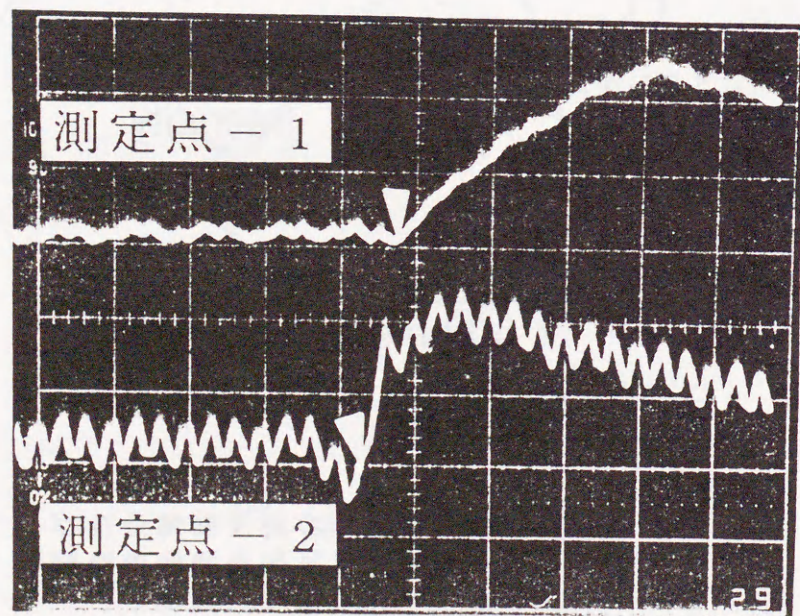


図6. 8 コイ心臓における心室、心房活動電位及び心臓の収縮により生じた反射光強度の時間変化波形（心室にレーザ光を照射する）



時間 0.5 sec/div



時間 50 msec/div

図 6. 9 ガラス微小電極を用いた心室興奮伝搬の計測

6.3 染色過程の検討

前章のラットにおける計測が脳を体外に摘出しintactな計測であったのに対して、コイ心室活動電位の光計測では心臓を摘出し計測したので、膜電位感受性色素を含む生理食塩水中に心筋を浸し染色を行った。心筋は必要に応じて心室と心房を分離したが、心室のスライスは行わなかった。ここではNile Blue A, WW781に関して染色液の濃度、染色時間、染色後の生体組織の吸収スペクトルについて述べる。

ここでそれぞれの色素に共通した染色方法を以下に述べる。

- (1) 心臓をコイより摘出する。
- (2) 生理食塩水中で、動脈球及び静脈洞を切除する。
- (3) 摘出時に心室、心房に付着した凝固した血液をピンセットで取り除く。
- (4) 膜電位感受性色素を含む生理食塩水中に心室、心房を浸し染色する。
- (5) 染色終了後、表面に付着している色素を生理食塩水で洗い流す。

Nile Blue Aの染色濃度は大きな蛍光放射強度が得られるように、図4.7より0.01-0.1mg/mlとした。試料を種々の時間だけ染色し、その試料より得られる蛍光放射スペクトルを比較し染色時間を定めた。図6.10は異なる時間Nile Blue Aで染色した試料より得られた蛍光放射スペクトルを示している[81]。得られる蛍光放射の強度は染色時間が長くなるにつれて増加するが、10分前後で飽和することがわかる。そこで染色時間をおよそ10分とした。図6.11は、Nile Blue A染色前後のカエル心室の吸収スペクトルを示している[81]。染色前の組織の吸収スペクトルは可視領域で一様であるが、染色後は550-650nmにかけて吸光度の増加が見られる。これは生理食塩水中でのNile Blue Aの吸収スペクトルに一致する。

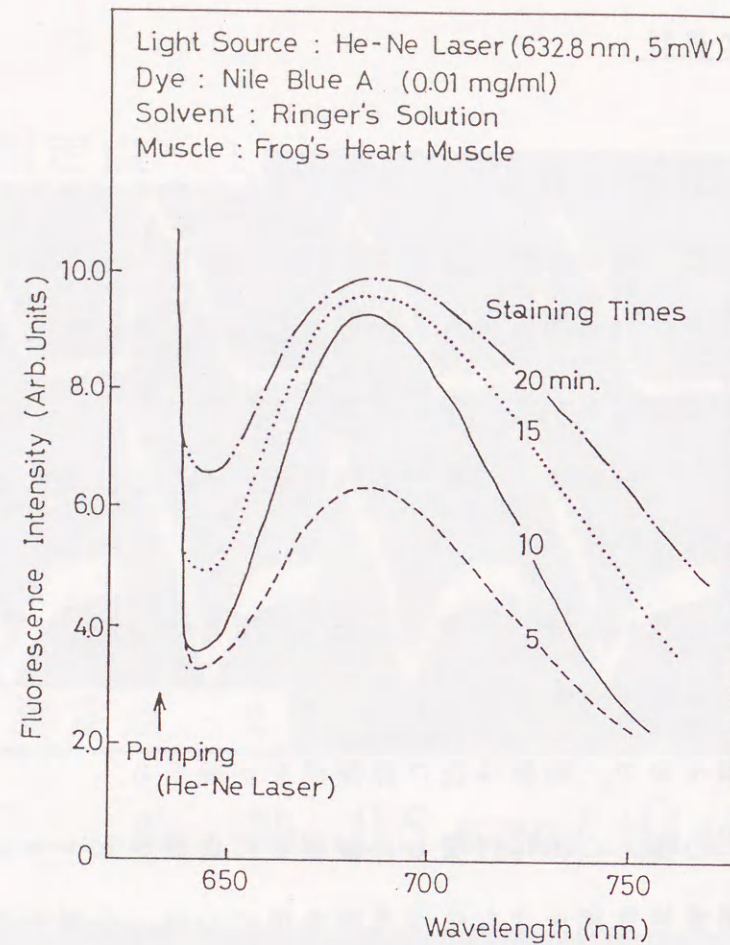


図 6. 1 0 Nile Blue A染色時の蛍光放射スペクトルの染色時間依存性^[81]

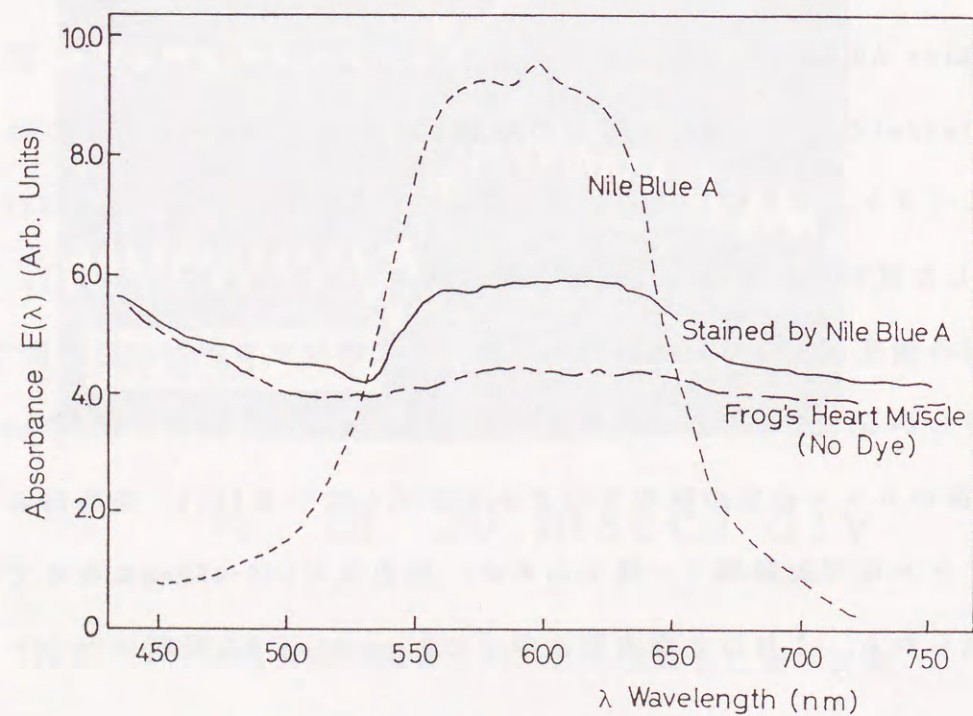


図 6. 1 1 Nile Blue A染色前後のカエル心室の吸収スペクトル^[81]

次にWW781について染色時間及び染色による環境効果の有無について述べる。
染色濃度は他のオキソノール系、メロシアニン系膜電位感受性色素の染色液濃度を参考にした[44][64]。摘出後1.5時間程度であればコイ心室筋より、拍動数が減少するものの自発的な興奮を得ることができる。また、40分程の染色を施した心室を生理食塩水中に入れると、組織表面より色素が流れる出すのが見える。これを洗浄するために10分程必要である。そこで染色時間の上限を40分とした。WW781溶液(0.1mg/ml)で種々の時間だけ心室を染色した場合の蛍光放射スペクトルを図6.12に示す。染色時間は30分前後必要であることがわかる。また2分程の短時間の染色では蛍光放射を得られず、反射光のみが記録される。このことより短時間の染色が行われ、色素が生体組織の周囲に存在している状態や色素を生体組織表面に塗布した状態では蛍光が発生しないことがわかる。

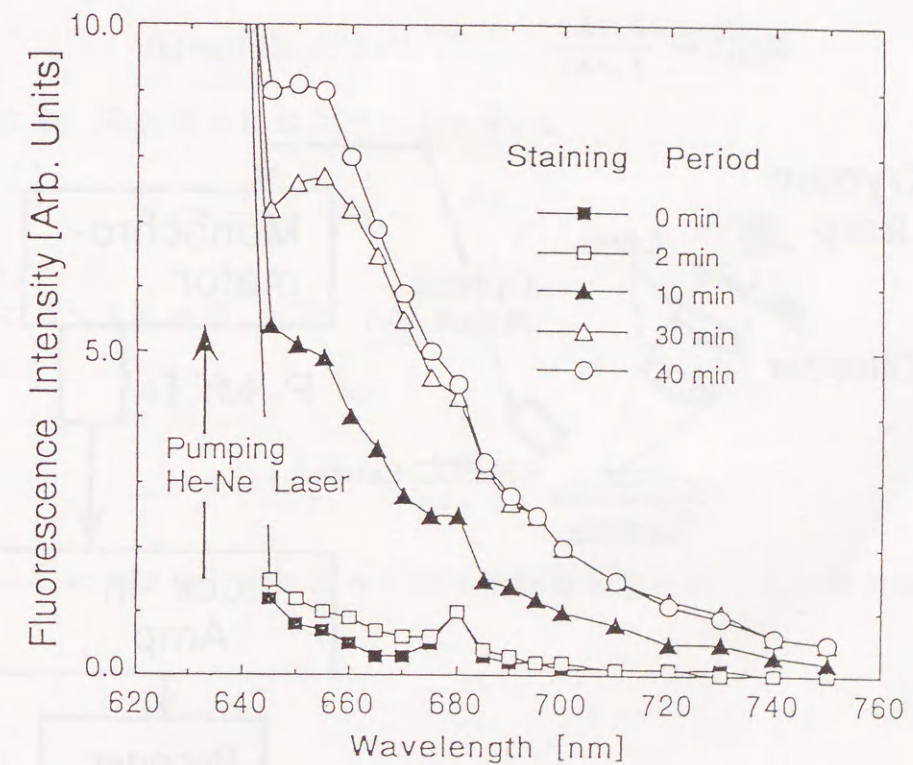


図 6. 1 2 WW781染色時の蛍光放射スペクトルの染色時間依存性

コイの心臓は赤色である。またWW781の光吸収帯は溶液中では560～630nmにあり、赤色光を吸収する。このため透過光を用いた測定では吸収スペクトルの測定は困難である。これに対して染色後の心室全体は赤色であるが、表面上の所々が緑色に染まっているのが見える。そこで反射スペクトルによる吸収帯の位置の検討を行った。

反射スペクトルの測定は図6.13に示す測定系を用いて行った。光源としてクリプトンランプ（National 4.8V, 0.5A, KR, $\lambda = 500 \sim 750\text{nm}$ ）を用い、チョッパにて変調した。試料表面でのスポット径は3mmである。試料からの反射光 $I_r(\lambda)$ は蛍光放射スペクトル計測同様に、セルフフォーカスレンズで集光し、分光器（CT-10, 分解能30nm）で分光し、光電子増倍管（R374）で受光した。入射光 $I_0(\lambda)$ の分光は、光源を白い紙に照射した際の反射光を分光し行った。試料の反射スペクトル $R(\lambda)$ は式(6.1)より求め、最大値を1とした。

$$R(\lambda) = \frac{I_r(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (6.1)$$

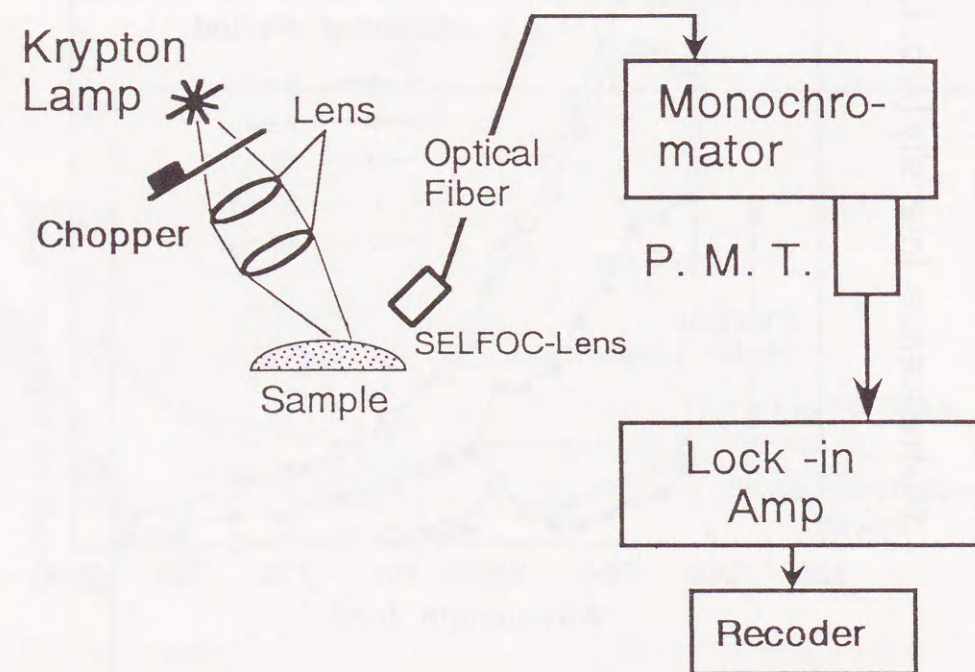


図6. 13 反射スペクトル測定装置

反射光は、反射の法則に従う表面反射（正反射）と、物質の光吸収に依存し強度が変化する内部からの散乱反射に、大別できる。表面反射光の受光を避けるために、光源－試料－受光系のなす角が直角とならないように光学系の配置に注意した。

染色前の心室で、光吸収を $I_{abs}^{(b)}$ 、反射光を $I_r^{(b)}$ 、入射光を I_0 とする。心室が厚く、透過光 I_t 及び散乱光 I_{sc} が、十分減衰するとして、

$$I_0 = I_{abs}^{(b)} + I_r^{(b)} \quad (6.2)$$

が成り立つ。染色前の反射スペクトル R_b は、

$$R_b = \frac{I_r}{I_0} = 1 - \frac{I_{abs}^{(b)}}{I_0} \quad (6.3)$$

とかける。染色後の心室においても同様に光吸収を $I_{abs}^{(a)}$ 、反射光を $I_r^{(a)}$ とすれば、

$$I_0 = I_{abs}^{(a)} + I_r^{(a)} \quad (6.4)$$

が、成り立ち、染色後の反射スペクトル R_a は

$$R_a = \frac{I_r^{(a)}}{I_0} = 1 - \frac{I_{abs}^{(a)}}{I_0} \quad (6.5)$$

となる。ここで $\Delta R = R_a - R_b$ と定義すると、

$$\Delta R = R_a - R_b \quad (6.6)$$

$$= -\left(\frac{I_{abs}^{(a)}}{I_0} - \frac{I_{abs}^{(b)}}{I_0}\right) \quad (6.7)$$

となり、 ΔR の減少は、染色後の心室で光吸収が染色前に比べ増加したことを示す。

図6.14は、染色前後の心室の反射スペクトルを示している。染色前の反射スペクトル R_b では $590\text{nm} < \lambda$ で反射が見られたが、染色後の反射スペクトル R_a では $590 < \lambda < 660\text{nm}$ での反射光が減少し、 $660\text{nm} < \lambda$ で反射が見られた。 ΔR は $600 < \lambda < 650\text{nm}$ で減少が顕著であり、染色により心室の光吸収が増加したことを示している。この心室の光吸収の増加は、染色に用いたWW781の光吸収によるものと考えられる。 $\lambda < 590\text{nm}$ では、 R_b 、 R_a ともに値が小さく、 R の値がWW781の光吸収に依存するか、心室自体の光吸収に依存するか、反射スペクトルのみでは区別できない。図6.15に ΔR 及びWW781（エタノール溶液中）の吸収スペクトル E_e 、反射スペクトル R_e を示す。WW781溶液について反射光を $I_r^{(e)}$ 、透過光を $I_t^{(e)}$ 、光吸収を $I_{abs}^{(e)}$ とすると、

$$I_0 = I_r^{(e)} + I_{abs}^{(e)} + I_t^{(e)} \quad (6.8)$$

が成り立ち、 R_e 、 E_e は

$$R_e = \frac{I_r^{(e)}}{I_0} = 1 - \frac{I_{abs}^{(e)}}{I_0} - \frac{I_t^{(e)}}{I_0} \quad (6.9)$$

$$E_e = -\log \frac{I_t^{(e)}}{I_0} = -\log \left\{ \frac{I_0 - I_{abs}^{(e)} - I_r^{(e)}}{I_0} \right\} \quad (6.10)$$

で与えられる。WW781での光吸収が増加すると $I_{abs}^{(e)}$ が増加し、 R_e は減少し、 E_e は増加する。 ΔR の減少が大きい $600 \sim 650\text{nm}$ は、 $I_{abs}^{(e)}$ における極大吸収波長の長波長側にあたる。染色の前後でWW781の吸収帯の幅が変化しないと仮定し、 ΔR と R_e の極小の位置及びスペクトル形状を比較すると、染色後の吸収帯の位置はエタノール中のそれよりも 20nm 程度深色化し、 $590 \sim 660\text{nm}$ にあると考えられる。

コイの背中の組織をWW781で染色し、染色前後の吸収スペクトルを計測した。その結果を図6.16に示す。染色前の組織は白色をしているが、染色後は 615nm 付近の赤の波長領域で吸収の増加が見られ、 618nm で吸収は極大となる。これらの

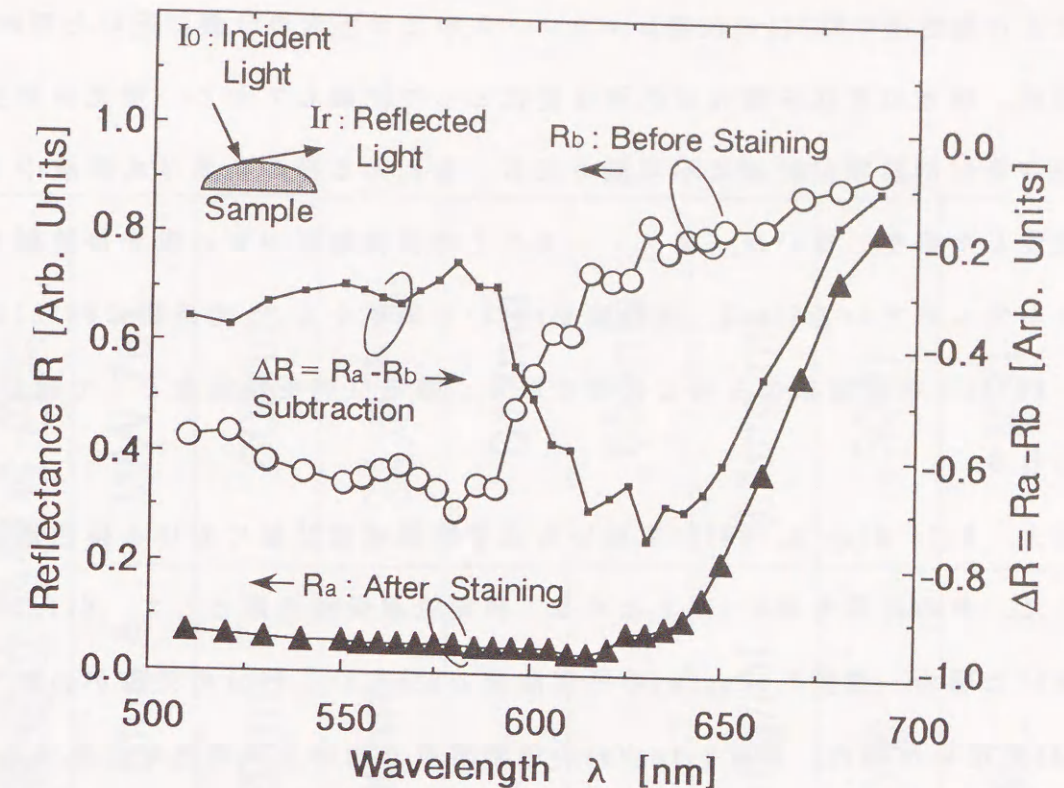


図6.14 染色前後のコイ心室反射スペクトル

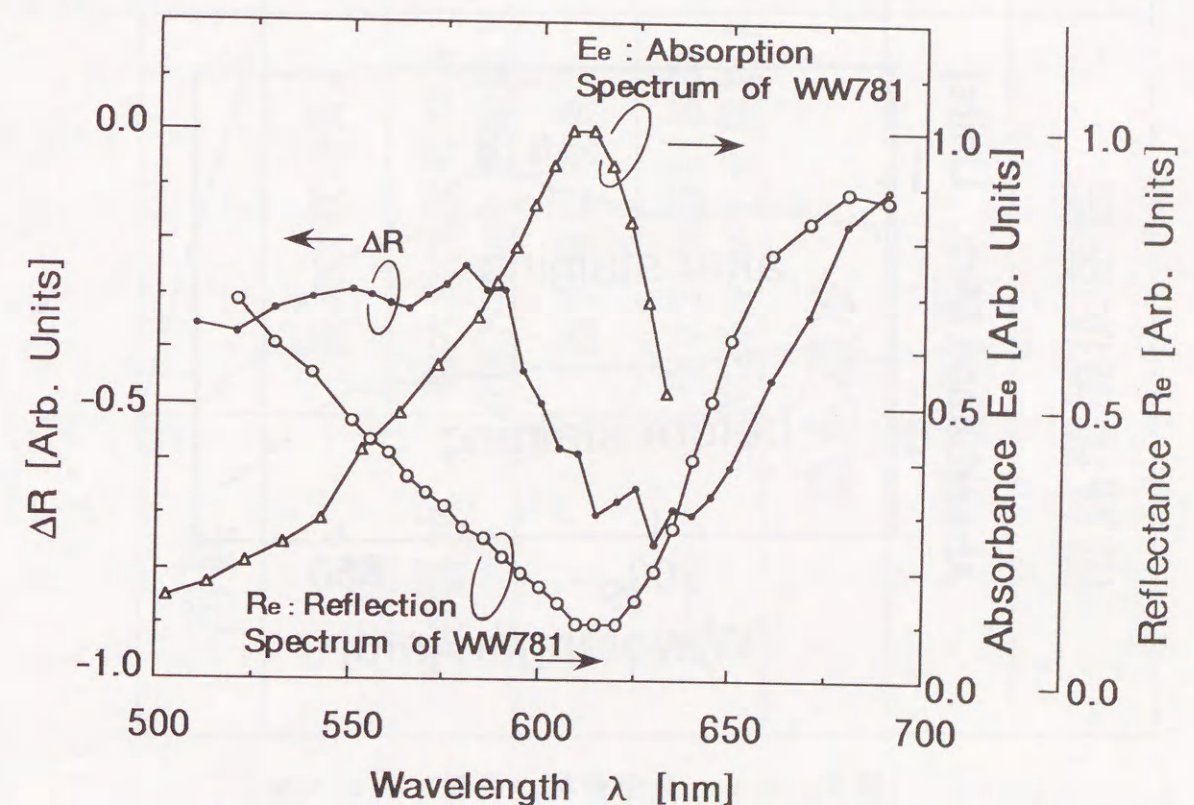


図6.15 ΔR 及びWW781のエタノール中の吸収・反射スペクトル

ことより染色後のWW781の状態はエタノール中での色素の状態に近いと思われる。

現在、膜電位変化を蛍光放射強度変化として記録しており、蛍光が発生しない場合光学的膜電位計測は不可能である。またある種の色素は水溶液中では弱い蛍光しか発生しないが、エタノールなどの有機溶媒中では蛍光が放射されることが知られている[106]。細胞膜をWW781で染色すると、細胞膜にWW781が結合し、WW781は有機溶媒中と同じ状態となり、膜電位感受性色素として機能すると思われる。

以上、Nile Blue A, WW781を用いた光学的膜電位計測における染色過程を検討した。その結果を表6.1にまとめる。膜電位感受性色素として、Nile Blue Aを用いた場合、濃度0.02mg/mlの色素溶液で5分ないし10分の染色が必要であり、WW781を用いた場合、濃度0.1mg/mlの色素溶液で約30分の染色が必要であることがわかった。

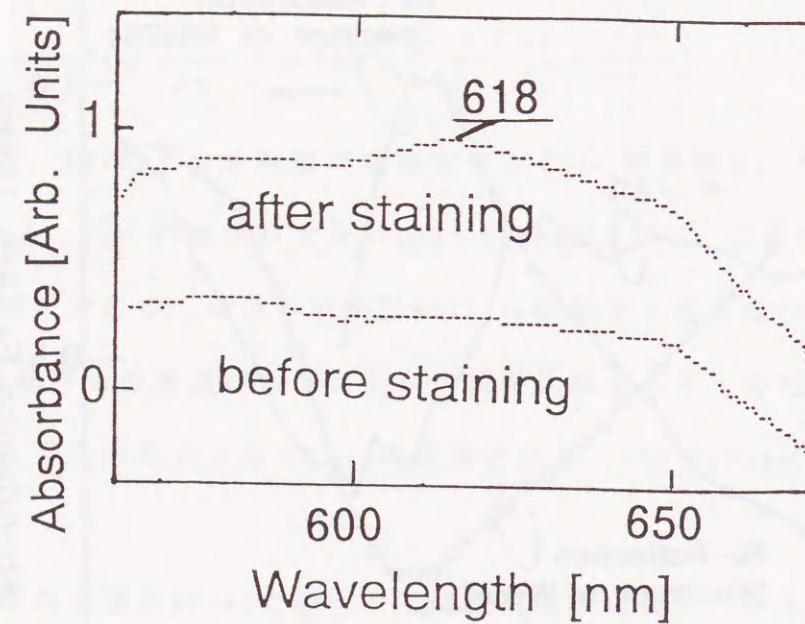


図6. 16 染色前後の吸収スペクトル
(WW781でコイの背中の組織を染色する。)

表6. 1 染色過程の検討

溶媒	膜電位感受性色素	
	Nile Blue A	WW 781
生理食塩水	極大吸収波長	600nm
	極大蛍光放射波長 (He-Neレーザー励起)	測定不能
エタノール	極大吸収波長	612nm
	極大蛍光放射波長 (He-Neレーザー励起)	655nm
染色濃度		0.1mg/ml
染色時間		30分
溶媒環境依存性		有り

6.4 心室活動電位の2波長同時計測

6.4.1 Nile Blue Aを用いた計測

興奮収縮連関により活動電位と筋収縮の関係が明らかであり、計測された信号の評価が容易な心筋（コイ）を用いて、コイ心筋活動電位の2波長同時計測を行った。

コイより心臓（心室及び心房）を摘出し、Nile Blue A溶液（0.02mg/ml）中で5-10分間染色した。その後生理食塩水中で組織表面に付着したNile Blue Aを洗浄し、計測した。この状態で心室及び心房は自発的な興奮を示していた。

図6.17の横軸は時間、縦軸は $\lambda_m=680\text{nm}$ の蛍光放射強度（ $\Delta F/F$ ）と励起光（He-Neレーザ、 $\lambda_e=632.8\text{nm}$ ）の反射強度（ $\Delta I_r/I_r$ ）をそれぞれ示しており、図6.17の結果は蛍光放射強度の時間変化波形（以下、蛍光信号と略す。）及び反射光強度の時間変化波形（以下、反射光信号と略す。）を示している。この計測結果は機械的な固定を施していない心室筋より得られたもので、計測部位の位置的变化による光散乱（motion artifact）を示している。反射光強度（ $\Delta I_r/I_r$ ）が10%以上増加しており、計測部位の位置的变化による光散乱が生じたことがわかる。式（4.1）に示したように、蛍光放射強度は膜電位のみならず、筋収縮による光散乱もあらわす。このため蛍光放射も光散乱され、その強度が10%以上増加し、その時間的経過は細胞内誘導された活動電位と著しく異なるものとなった。また、100mVの脱分極による蛍光放射強度の増加が3%程度であるのに対して、筋収縮による光散乱が10%以上生じ、さらにコイの心室筋では筋収縮が活動電位のスパイク相より50msec程度遅れて始まるため、蛍光信号中にスパイク相を反映する相があらわれなかった。興奮間の周期が10秒以上と長くなり収縮の持続時間が2秒前後になったと思われる。

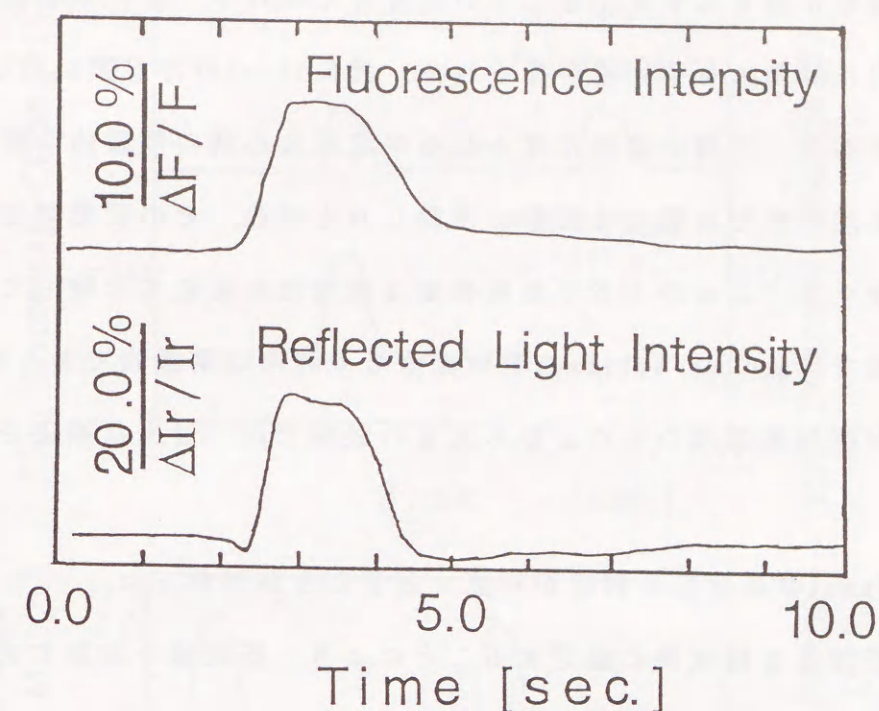


図6.17 Motion Artifact

2波長同時計測システムにおいて主光路にある光電子増倍管と副受光素子であるフォトダイオードの光電子変化の応答特性の比較を行った。図6.18にその結果を示す。この計測では、初め（図(a)）反射光強度と蛍光強度を同時に測定し、次に反射光強度を2つの異なる受光素子で計測し（図(b)）、受光素子の性能を比較し、再び反射光及び蛍光放射強度を同時測定し対照とした（図(c)）。図6.18(a)における2つの波形を比較すると立ち上がり相が等しいことや蛍光放射強度の変化量が10%程度あることによりmotion artifactの存在が認められる。ところが、反射光信号は立ち上がりと立ち下りの2相から構成されるのに比べ蛍光信号は立ち上がり—平坦相—立ち下りの3相から構成されている。また立ち上がり相におけるピークの時刻もやや蛍光信号の方が早い。この差は受光素子が異なるためであると考えられる。図6.18(b)に示すようにに反射光強度を同時に測定し比較すると2相で構成される波形が得られる。この測定中に蛍光信号波形が変化していないことは図6.18(c)より明らかであり、蛍光

放射強度自体が3相を示す変化をしていると考えられる。また平坦相における変化は、反射光信号にも平坦相が見られる。図6.18(c)の方が図6.18(a)のそれに比べ顕著である。反射光信号に見られる平坦相は心筋の位置的な変化がなく、計測部位は初期状態とは異なる状態に移動したものの、その状態で安定であったことを示唆する。この時の蛍光放射強度は膜電位の現象を示唆している。これまでの報告ではmotion artifact中の光信号の利用は消極的であったが、蛍光信号の変化が反射光信号のそれよりも大きい領域では、適当な補正を行うことにより

motion artifact中の信号の利用が可能であることがわかった。

図6.19は心房筋を機械的に固定することにより、筋収縮を抑制し光散乱の発生を防ぎ計測したものである。この時Lock-in Ampの低域通過フィルターの時定数は100msecであるものの、加算平均は用いず単一の掃引により記録したものである。底部に細胞外誘導用の2本の電極を有する深さ3mm程のアクリル製チャンバへ染色後の心房を入れ、その上部よりスライドガラスを圧着することにより、心房の収縮を機械的に固定した。反射光信号は細胞外誘導で記録した興奮の発生とは何ら関連のないノイズレベルでの変化を示しており、筋収縮による光散乱の発生は機械的な固定により抑えられた。一方、興奮の発生にともない蛍光信号が4%程度増加した。図6.19の時間軸を拡大し、各蛍光放射波長の光強度の時間変化波形を示したのが、図6.21である。図6.21を参考にすると、電気信号の立ち上がりより蛍光信号立ち上がりが約40msec遅れていることがわかる。この遅れにはNile Blue Aの膜電位感受性機構が関連していると思われ、蛍光放射強度増加までの時間的経過よりNile Blue Aの蛍光放射強度の増加は、膜電位変化に直接依存したものであるとは考え難く、膜電位変化により間接的に生じたものであると考えられる。

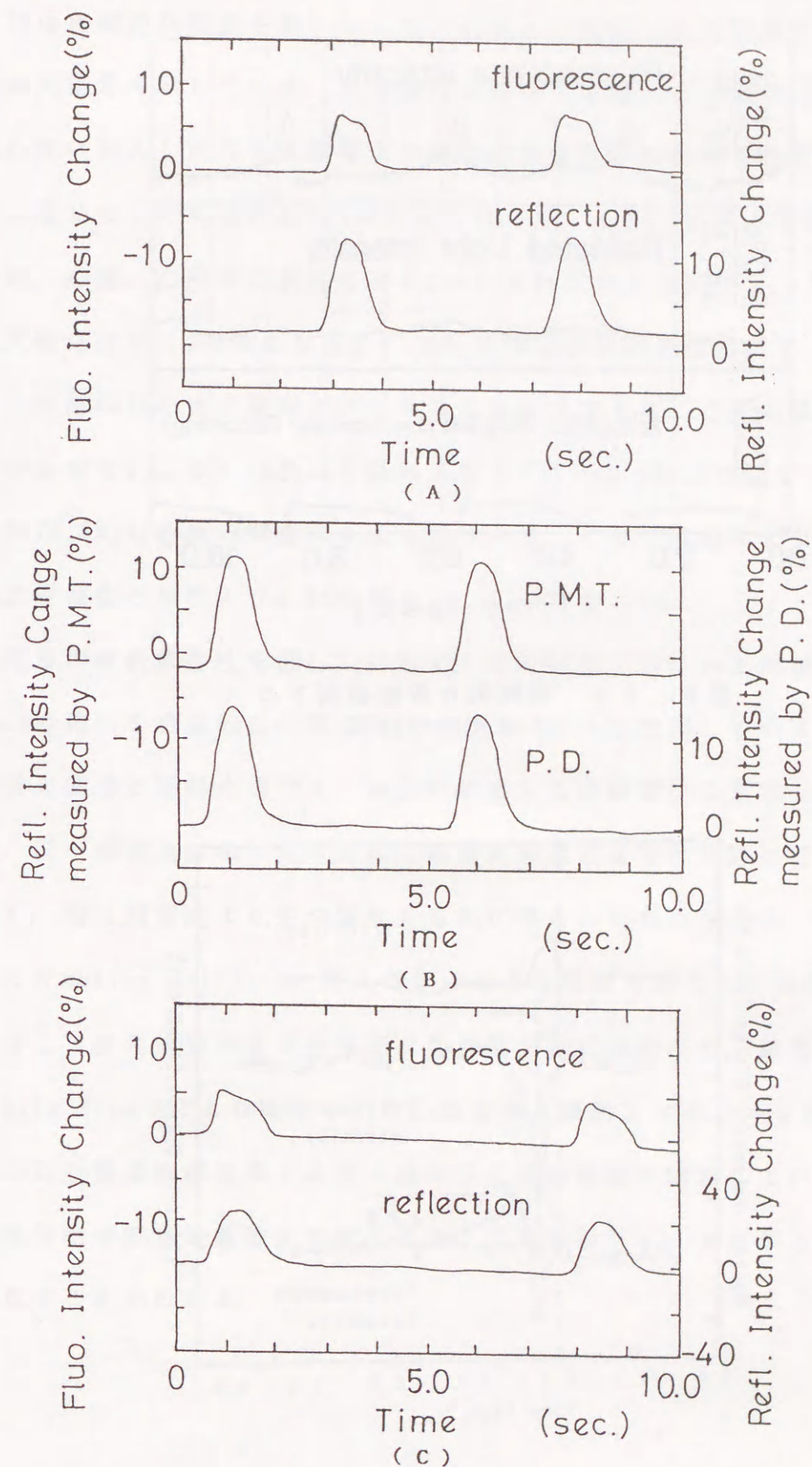


図6.18 受光素子の応答特性の比較

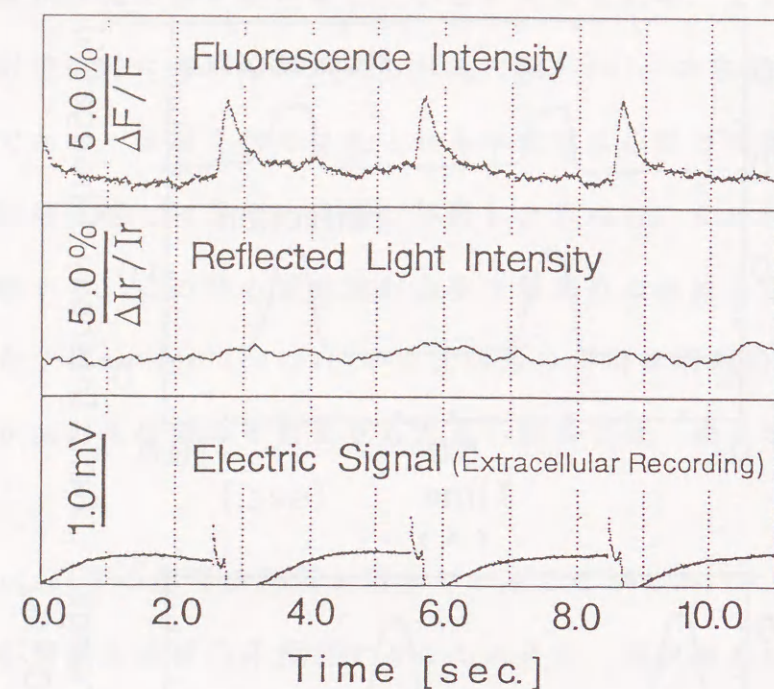


図 6. 1 9 機械的な収縮抑制下の
2 波長同時計測

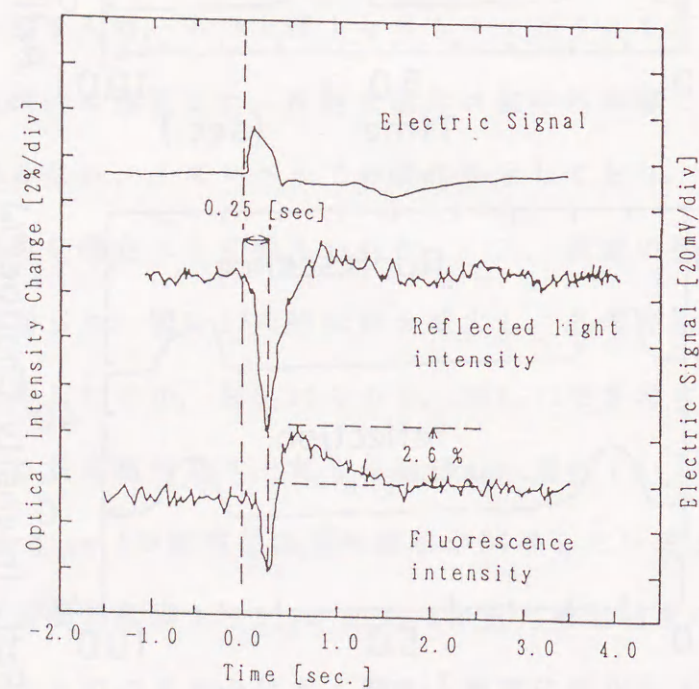


図 6. 2 0 筋収縮の抑制を行っていないコイ
心室活動電位の 2 波長同時計測

図 6. 20 は機械的な固定を施していない心臓より計測した活動電位と反射光信号及び蛍光信号を示している。光学信号は心房で記録されたものであり、活動電位は心室に刺入したガラス電極より細胞内誘導されたものである。不関電極が試料に接していたために drift が大きくなった。心室、心房の分離を行っていないため、心室、心房の筋収縮により 2 つの光散乱が生じている。このため蛍光信号、反射光信号は 2 相性になった。蛍光信号及び反射光信号に見られる光強度の 4% 以上の減少は心室の収縮により生じた光散乱であり、心室の興奮（電気信号の立ち上がり）より 0.25 秒ほど遅れて生じた。t=0.5 秒より始まる蛍光放射強度の増加 (2.6%) は心房の興奮によるものである。心房の収縮により反射光強度は蛍光放射強度の増加より 0.25 秒遅れて、1.6% 増加した。

蛍光信号の波長依存性を図 6. 21 に示す。この計測は図 6. 19 と同様に motion artifact の発生を機械的に心筋を固定することにより抑制している。各波長における蛍光信号と反射光信号を、細胞外誘導した活動電位の立ち上がりを基準として、同一画面上に示した。これら各波長の蛍光信号は同時に得られたものではなく、同じ測定点よりやや異なる時刻に得られたものである。各波長の計測にあたり motion artifact の混入がないことを反射光信号より確認した。膜電位に依存して蛍光放射強度が全蛍光放射波長で約 4% 増加した。興奮時、静止電位時の Nile Blue A により染色された心筋の蛍光放射スペクトルを図 6. 22 に示す。興奮時には全蛍光放射波長ではほぼ一様に蛍光放射強度が増加していることがわかる。絶対的な蛍光放射強度の変化量は、蛍光放射がピークとなる 680nm 付近で大きくなることがわかる。

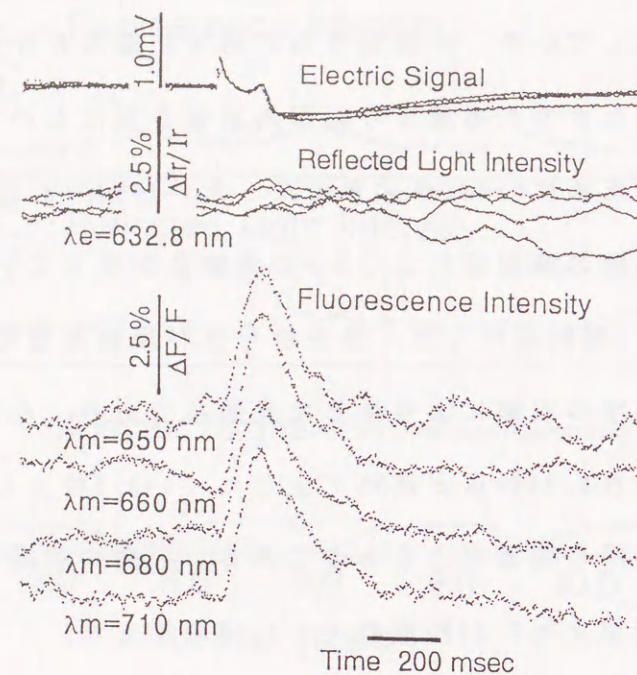


図 6. 2 1 蛍光放射強度の変化の波長依存性

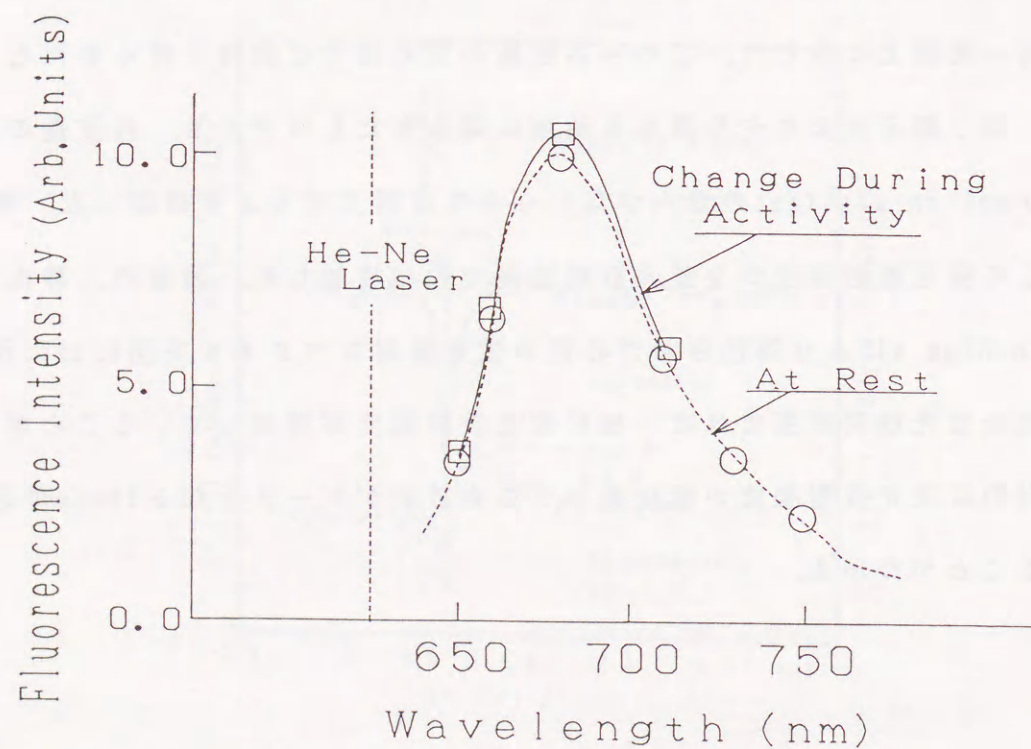


図 6. 2 2 蛍光放射スペクトルの波長依存性

図 6.23 は電気生理学的計測，光学計測のいずれも心室より記録したものである。反射光信号は 1 回の活動電位の発生あたりに 2 つの artifact が存在していることを示している。反射信号と電気生理学信号： $E(t)$ を比較すると，反射光信号の第 1 ピークは計測領域に発生した筋収縮による artifact を示し，第 2 ピークは計測領域外（例えば心房）に発生した筋収縮による artifact を示していることがわかる。ところで蛍光信号波形には反射光信号波形の第 2 ピークに相当するものしか現れていない。式 (4.1)，(4.2) によれば motion artifact により蛍光放射強度及び反射光強度が変化する。このことを考慮すると蛍光信号波形における artifact の第 1 ピークの消失は，活動電位に依存した蛍光放射強度変化と motion artifact により発生した蛍光放射強度変化が互いに打ち消し合い，見かけの変化を消失させたと考えられる。そこで 2 つの信号の差分を最下段に示した。活動電位と比較すると，差分信号の立ち上がりは緩やかなものとなっている。

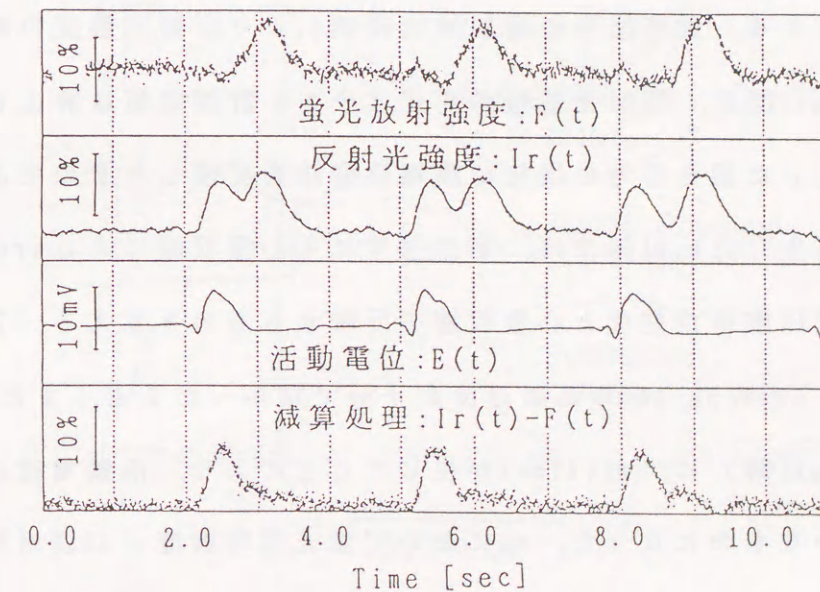


図 6. 2 3 電気生理学的計測と 2 波長同時計測

6.4.2 WW781を用いた計測

WW781染色後の心室にHe-Neレーザ ($\lambda_e=632.8 \text{ nm}$) を照射し、色素より生じる蛍光放射 ($\lambda_m=670 \pm 15 \text{ nm}$) と心室表面における励起光の反射強度 (λ_e) を同時に測定した。分光器の波長設定は、フォトダイオードに十分な反射光が入射するように、蛍光放射スペクトルが極大となる655nmより長波長側の670nmに設定した。このときフォトダイオードには $620 \pm 40 \text{ nm}$ の光が入射し、蛍光放射の一部も入射するが、蛍光放射強度は反射光強度より十分小さいので、フォトダイオードの出力は反射光強度を表すと言える。図6.24に蛍光信号と反射光信号を示す。この時心房は切除されており、心室単体についてそれぞれの光信号を測定した。反射光信号: $\Delta I_r / I_r$ は7%変化し、蛍光信号: $\Delta F / F$ は最大5%増加した。ところで、反射光の大部分は物質の光吸収に依存しない表面反射であること、光学的膜電位計測で得られる透過光強度変化は $10^{-4} \sim 10^{-3}$ である[32]ことより、膜電位に依存した反射光信号の変化は 10^{-3} 以下であると言える。これに対して、得られた反射光信号は7%とはるかに大きく、また反射光信号は図6.8におけるそれと容易に対応付けられるので、心室収縮により生じたartifactであると言える。蛍光信号の増加開始時刻 t_F より反射光強度の減少開始時刻 t_R までの75msec間は、反射光信号の変化は小さく計測領域は静止した状態にあり、この間生じた蛍光信号の増加は膜電位変化を反映したものである。反射光信号の減少が生じた t_R 以降では、蛍光信号にも心室収縮によるartifactが含まれ、蛍光信号は膜電位変化と心室収縮を反映するものと言える。蛍光信号の立ち上がりは、Lock-in Ampの応答速度が十分でなかったこと、また完全に立ち上がる以前 (t_R 以降) に、artifactが生じたことにより、活動電位のスパイク相に比べ緩やかなものになった。 t_R において蛍光信号強度が2%程増加していること、反射光信号の減少中に蛍光信号が最大5%増加していることより、活動電位を反映する蛍光信号の変化量は5~10%程度であると推定され、Dillonら[79]

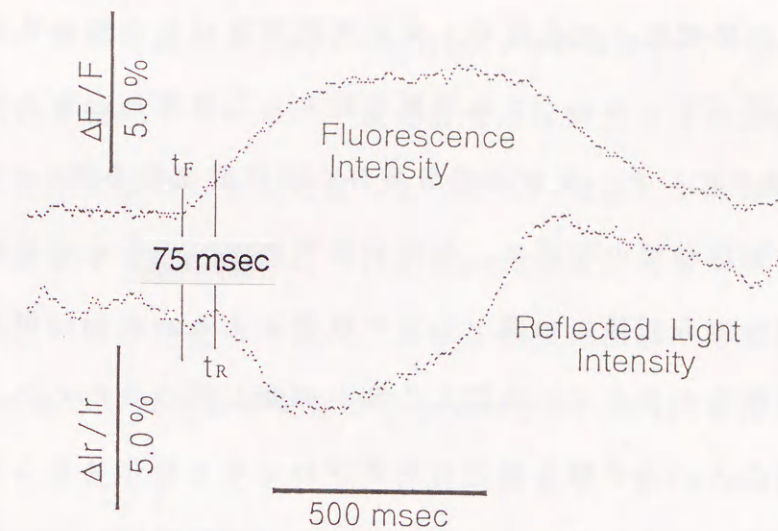


図6.24 WW781で染色したコイ心室より計測した蛍光信号及び反射光信号

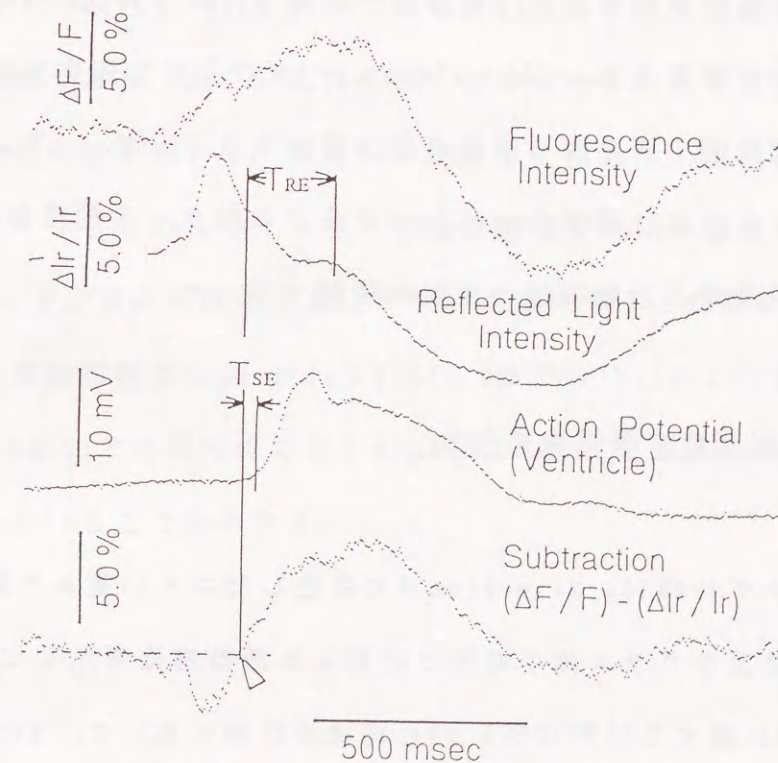


図6.25 コイ心室活動電位の光計測活動電位、蛍光信号及び反射光信号とその差分信号

の、約10%と一致した。

図6.25は心室活動電位と蛍光信号、反射光信号及びその差分を示している。心室の単離化は行っていない。また電極を刺入した位置と心室上のビームスポットは3mmほど離れていた。反射光信号及び心室活動電位を図6.8と比較すると、反射光信号の増加は心房の収縮に、反射光信号の減少は心室の収縮に関連付けられる。蛍光信号にも同様に心房、心室の収縮によるartifactが見られる。心房収縮による光散乱が生じている間に心室が興奮し始めるために、蛍光信号には心室活動電位のスパイク相と明白に対応付けられる変化は見られなかった。蛍光信号は膜電位に依存し変化するとともに、心臓の収縮により反射光信号と同様に散乱される[119][120]と考え2つの光強度の差分を取った。差分信号の立ち上がり相と持続時間は活動電位と類似した変化を示した。差分信号の変化量が負から正へ変わる時刻を差分信号の立ち上がり開始時刻(Δ)とすると、活動電位の立ち上がりに対して、差分信号の立ち上がりは $T_{SE}=60\pm 82\text{msec}$, $n=4$ だけ遅れ、反射光強度は $T_{RE}=167\pm 39\text{msec}$, $n=5$ だけ遅れて変化を始めた。しかし、興奮の持続時間、繰り返し周期の個体差が大きく、 T_{SE} 、 T_{RE} のばらつきが大きかった。さらに、過度のartifactが生じた場合、活動電位にもartifactが見られ、差分信号と活動電位の比較が困難であった。

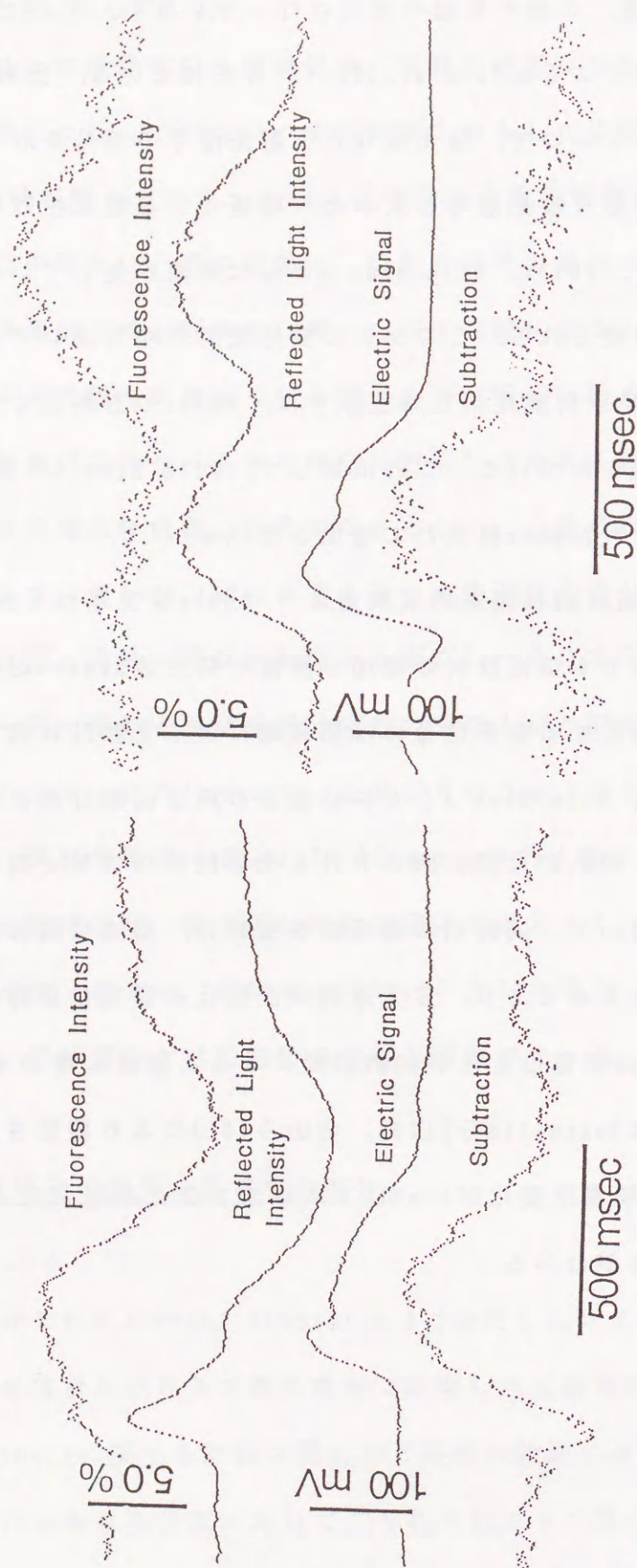
6.5 蛍光放射強度の膜電位依存性

図6.26はそれぞれWW781, Nile Blue Aで染色したコイ心室より記録した蛍光信号、反射光信号及びガラス微小電極で計測した活動電位を示している。

Nile Blue Aに関する計測は図6.23と同様の計測において、WW781に関する計測は図6.25における計測において、それぞれガラス微小電極の刺入状態が比較的良好である興奮の一周期を時間軸を拡大して示したものである。各ドットの

間隔は4msecである。心室、心房の収縮の抑制は行っていない。このため蛍光信号には心室、心房の収縮によるmotion artifactが含まれている。反射光の強度は膜電位に依存し変化しないので、蛍光信号と反射光信号の差分を取ることで、膜電位変化に依存した蛍光信号を求めた。電極による電気生理学的信号と差分信号を比較すると、WW781, Nile Blue Aともに興奮が生じている時のみに蛍光放射強度の増加が見られる。このときの蛍光放射の増加はいずれの色素でも4%程度である。蛍光放射変化の立ち上がりは、WW781の方が速く、活動電位の立ち上がりをよく捕らえている。これに対して、Nile Blue Aの蛍光放射は、活動電位の立ち上がりより20msec程遅れて増加している。

図6.8に示した通り、筋収縮は電気的な興奮より50msec程度遅れて生じる。どちらの色素を用いた計測でも蛍光放射の増加は興奮の発生後20msec以内に生じており、スパイク相に対応する蛍光信号には筋収縮による光散乱は含まれていないと思われる。WW781, Nile Blue Aともに心表面の興奮伝搬計測に有効な膜電位感受性色素である。図6.27は図6.26における光学的差分信号と電気生理学的信号の立ち上がりを用いて、同時刻の膜電位を横軸に、蛍光放射強度変化を縦軸としてプロットしたものであり、蛍光放射強度変化の膜電位依存性を示す。Nile Blue Aの蛍光放射は膜電位変化が60mV程度になると急激に増加する。この閾値を有する非線形性はBezaniら[103]、金山ら[81]により報告されている。これに対してWW781では膜電位変化が40mV以下の領域で蛍光放射強度と膜電位は線形に対応していることがわかる。



WW781を用いた計測

Nile Blue Aを用いた計測

図6. 26 蛍光放射強度変化の膜電位依存性の検討
のために用いたコイ心室活動電位の2波長同時計測結果

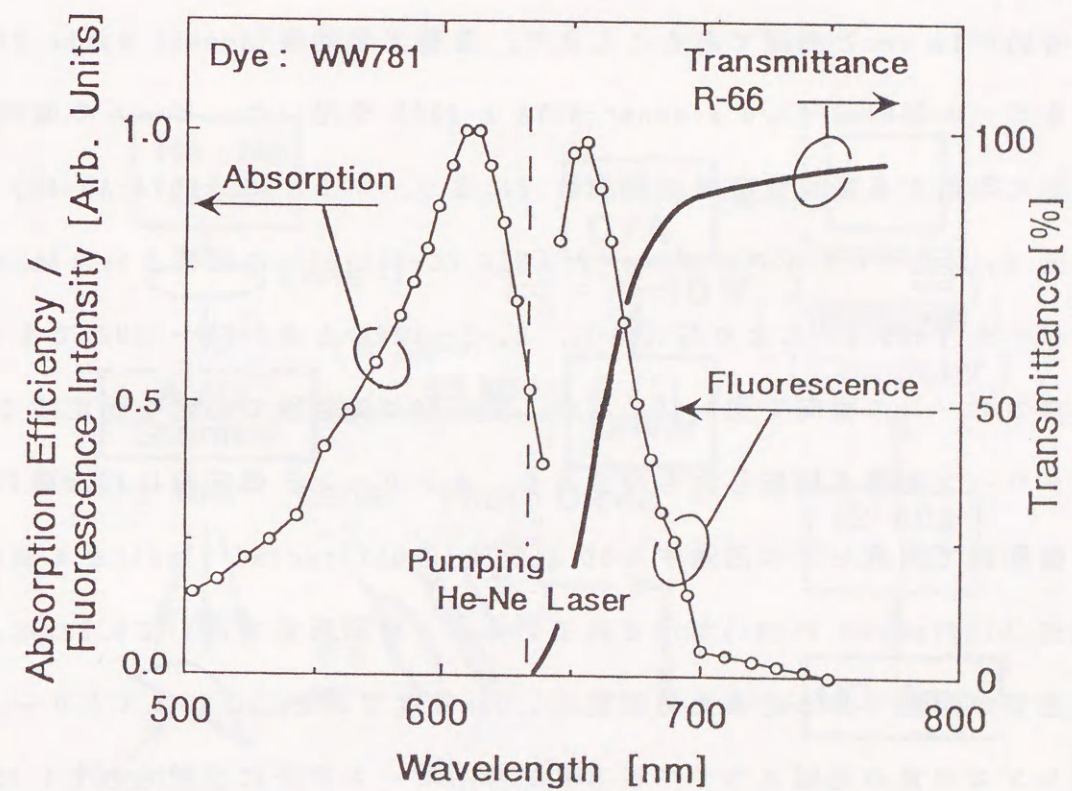


図6. 28 WW781の吸収・蛍光放射スペクトル及び
シャープカットフィルタの透過特性

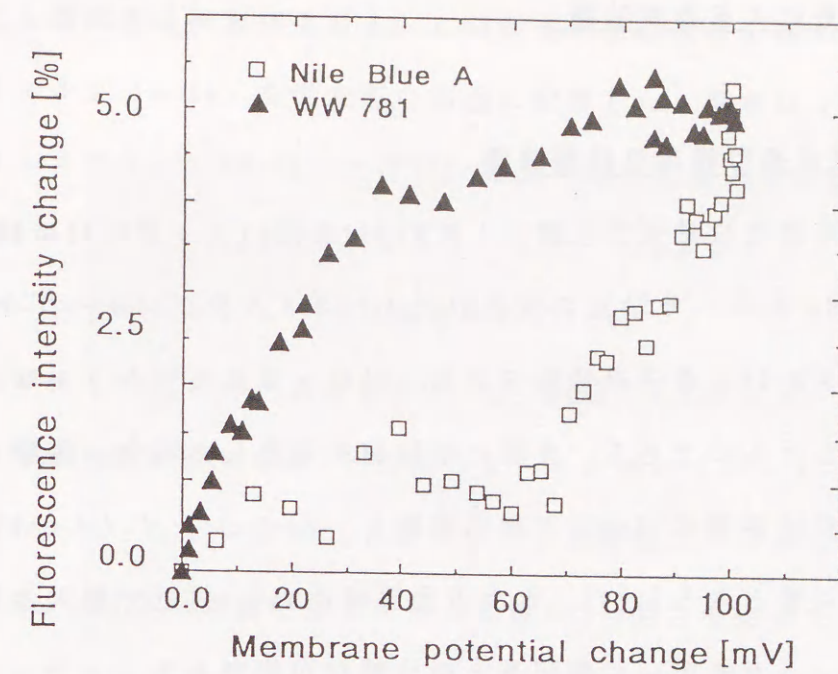


図6. 27 蛍光放射強度の膜電位依存性

6.6 レーザ走査による多点計測

6.6.1 レーザ走査型膜電位計測装置

オキソノール系膜電位感受性色素としてWW781を用いた。図6.28にWW781の吸収スペクトル、He-Neレーザ励起の蛍光放射スペクトル及びシャープカットフィルタ（東芝ガラスR-66）の透過特性を示す。吸収・蛍光スペクトルはエタノール溶媒中で計測したものである。実際に細胞膜を染色した場合、吸収スペクトルは図6.28より長波長側に10nmほど深色移動し、He-Neレーザ（ $\lambda_e=632.8\text{nm}$ ）で効率よく励起可能となる[119]。また蛍光放射は655nm付近で極大となり、シャープカットフィルタを用いて励起光との分離が可能である。

図6.29にレーザ走査型膜電位計測装置の構成を示す。光源としてWW781を励起可能なHe-Neレーザを用いた。ビーム走査はランダムアクセス可能であり、アクセス時間が $1\mu\text{sec}$ と高速であることより、音響光学効果(Acoustic Optic Effect)によるビーム偏向器(A/O scanner:HOYA A-200)を用いた。ビームの偏向角は、偏向器に印加する高周波電源の周波数: f に従う。ドライバ(HOYA:AD-40)の入力電圧: E_d はパーソナルコンピュータ(NEC PC-9801F3)に接続された8bit D/Aコンバータ(AD558)により与えられ、 $E_d=2\sim 10\text{V}$ のとき $f=60\sim 98\text{MHz}$ であった。この時のビームの偏向を図6.30に示す。図6.30は染色後の心室を固定する位置にスクリーンを置き撮影したものであり、スクリーンと偏向器は40cm離れている。偏向器で回折せずに透過する0次回折光(Undiffracted light)と4個の1次回折光(Diffracted light)が示されている。1次回折光を用いて3.6mmほどのビーム走査が可能である。また分解能は1.0mm程度である。これはスクリーンの位置がレンズの焦点距離よりやや後方にあり、ビームが十分に絞られていないためである。各スポットの光強度は約 $600\mu\text{W}$ で、光源の出力が 1mW であるため、ビーム偏向器における回折効率は60%となる。ビームスポット下の計測領域より色

素の蛍光と励起光の反射が生じる。この蛍光と反射光の分離のためにシャープカットフィルタ(R-66)を受光器の前面に配置した。受光はフォトダイオード(浜松ホトニクス:S2386-8K)で行い、電流-電圧変換の後に60~80dB増幅し、12bit A/Dコンバータ(ADC574)の入力とした。A/DコンバータとD/Aコンバータは同じパーソナルコンピュータに接続されている。

本計測では1次元のビーム走査を行い、1mm毎に4点からデータを得た。ビームの走査方法を図6.31に示す。i回目のビーム走査はスポット1から始まり、スポット1→スポット2→スポット3へビームは移動し、スポット4でi回目の走査を終わる。i回目の走査を終了すると即座にi+1回目の走査を行う。A/Dコンバータのサンプリングは $T_{AD}=0.25\text{msec}$ 毎に行い、測定点が4点あるのでビーム走査の繰り返し周期は $T_{sc}=1\text{msec}$ である。

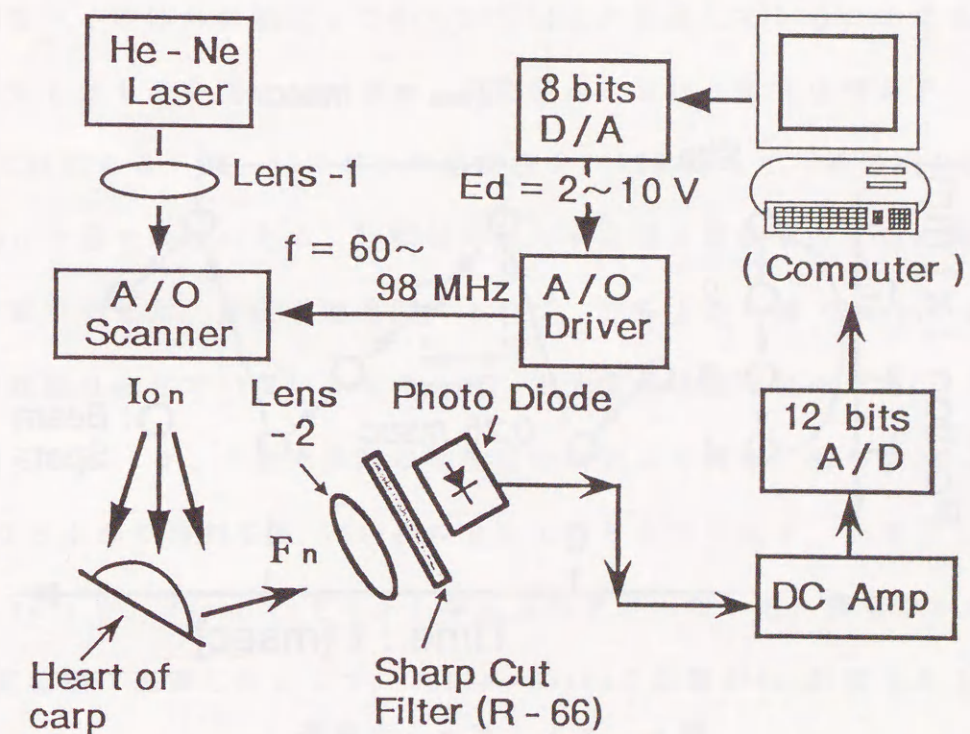


図6.29 レーザ走査型膜電位計測装置

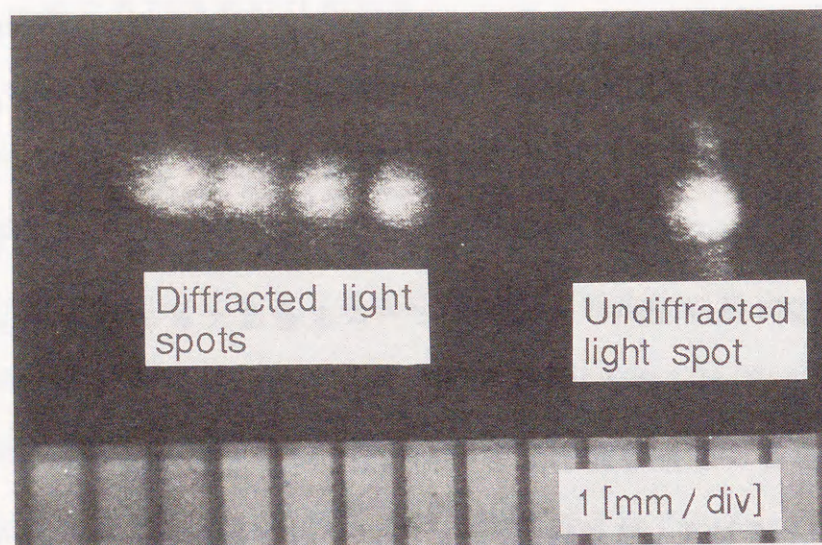


図 6. 3 0 音響光学素子によるビームの偏向

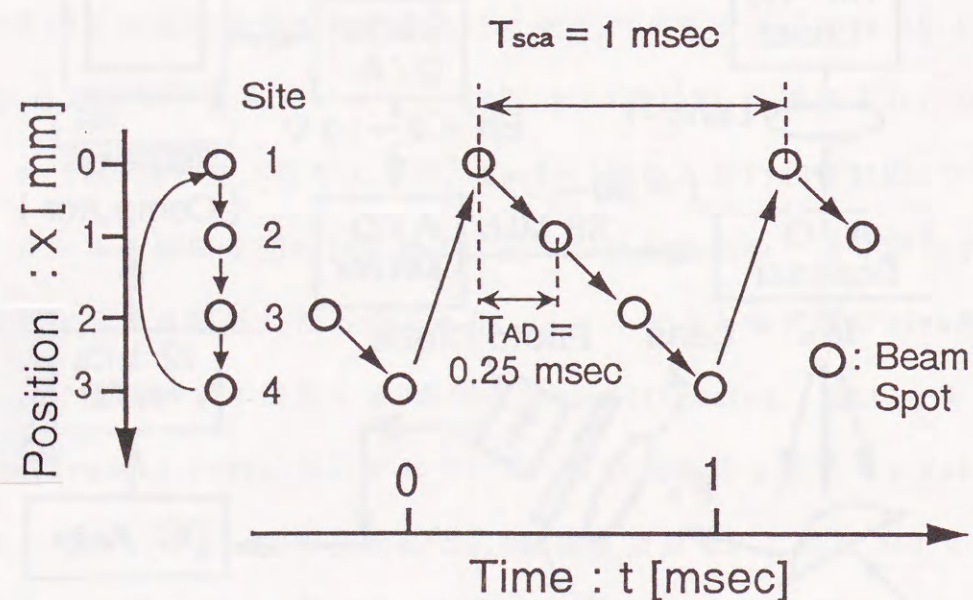


図 6. 3 1 ビーム走査法

6.6.2 コイ心室活動電位の多点光計測

図6.32にコイ心室表面上の4点を走査するビームスポットを示す。図中、左上方に動脈球 (Arterial bulb) があり、ビームスポット1の右側が心室-心房の切断面となる。スポット1が最も心房に近く、スポット2, 3と順次心房より遠ざかり、スポット4が心房より最も遠い測定点となる。

図6.33は横軸は時間、縦軸は蛍光放射強度変化を示しており、各測定点における蛍光放射強度の時間変化波形、すなわち蛍光信号を示している。蛍光放射強度の変化は各測定点で一様であり、立ち上がり相で5%ほど増加し (Peak1)、その後減少し (Peak2)、再び増加 (Peak3) している。心室活動電位と比較すると、Peak1はスパイク相に対応付けられ、Peak2及びPeak3はプラトー相が心室収縮のため光散乱されたmotion artifactであることがわかる。蛍光放射の増加は約0.4sec持続した。また繰り返し周期は2secであり、標準よりやや長い。これは心室をコイの体外に摘出してから20分以上が経過しているためである。時間軸を拡大したものを図6.34に示す。各測定点における蛍光信号のドット間隔は4msecに対応する。図6.33において信号成分 $S=5\%$ に対して、雑音成分 $N=0.7\%$ で、 $S/N=17\text{dB}$ と十分ではないため、時間軸を拡大する際に連続する4つの時刻のデータを加算平均した。興奮収縮連関によれば、立ち上がり相 (Peak1) においては心室の収縮は生じていないと考えられ、蛍光信号は膜電位のみを反映していると考えられる。そこで蛍光放射の増加開始時刻より興奮伝搬を検討した。Site1の立ち上がり時刻を▲、Site4の立ち上がり時刻を▽で示す。心房側の測定点の方 (Site1) が、4msec (1ドット) 早く立ち上がっている。興奮がSite1よりSite4へ直線的に伝搬したとして、Site1-Site4の距離が3mm程度であるので、興奮の伝搬速度は75cm/secとなり、図6.9において電極により測定した興奮伝搬速度25cm/secと同程度である。

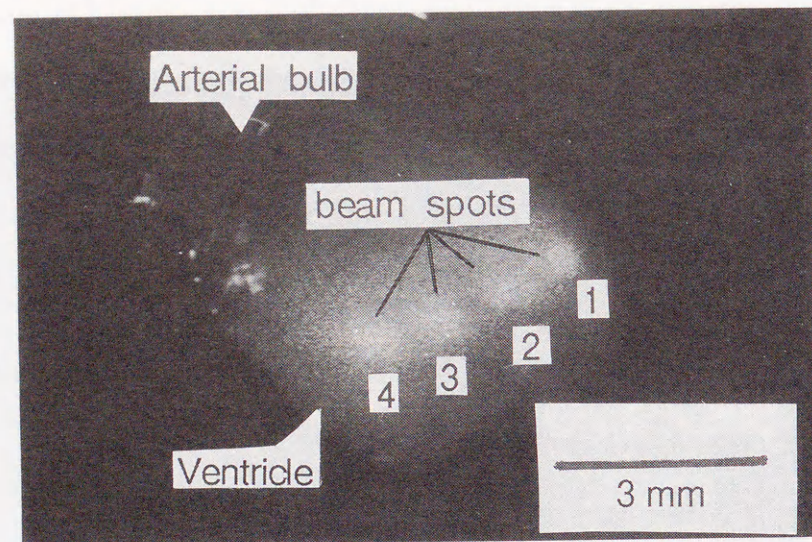


図 6. 3 2 心室表面を走査するビームスポット

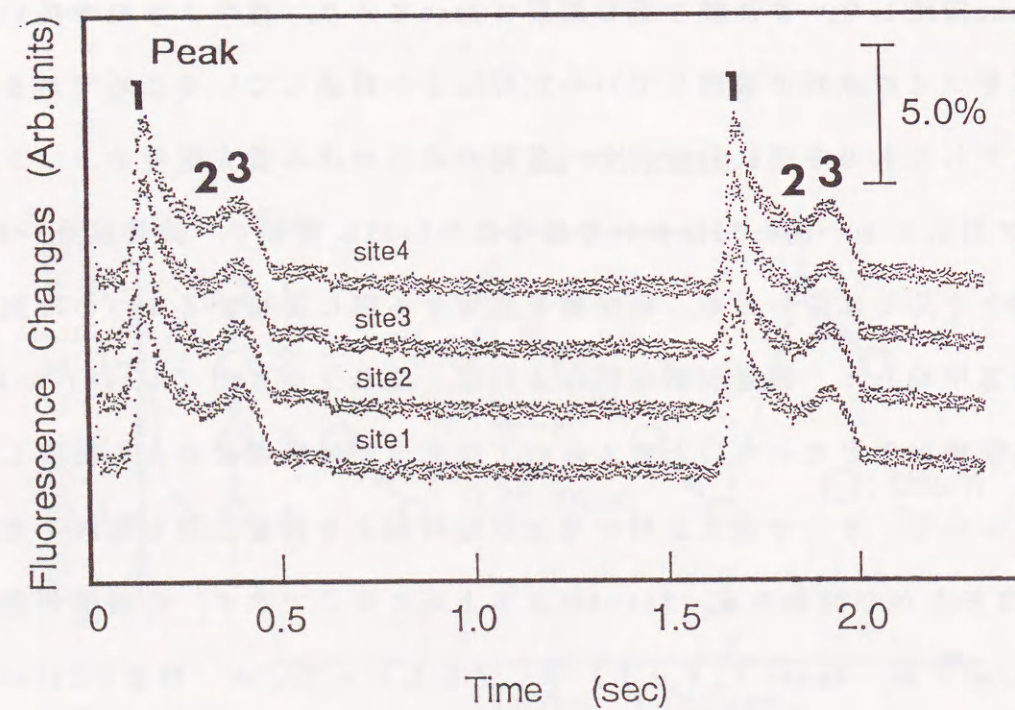


図 6. 3 3 蛍光放射強度の時間変化波形

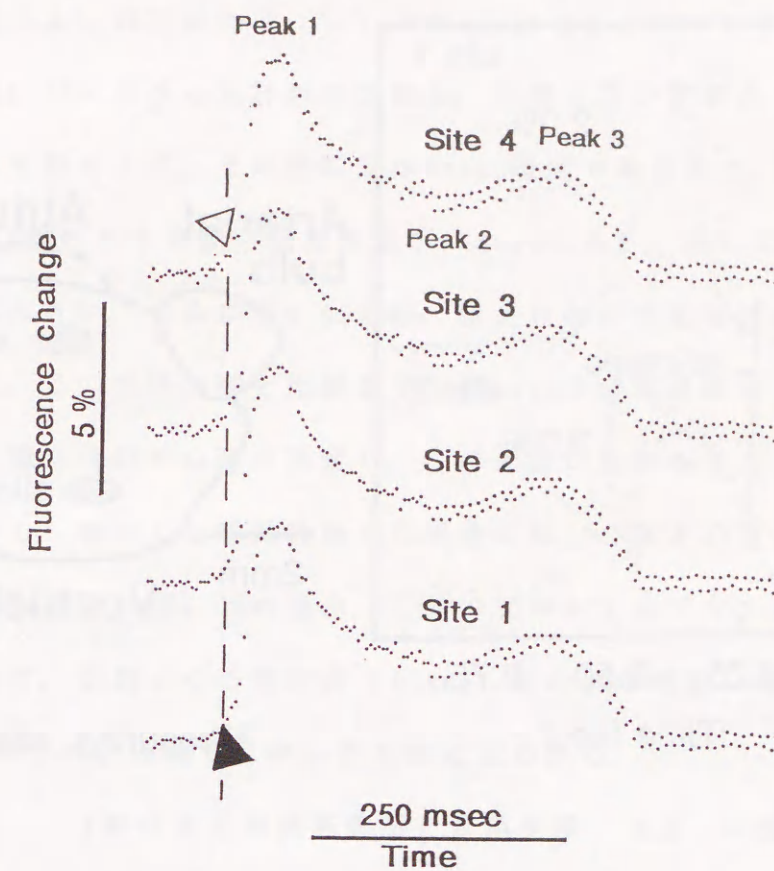


図 6. 3 4 4 点からの蛍光信号の立ち上がり相

図 6. 35 に興奮伝搬の遅延が大きい蛍光放射強度の時間変化波形の例を示す。これは先に示した 4 点からの計測結果とは異なる個体から計測したものである。2 つの測定点 (Site 1, 2) とともに心室上にあり、Site 2 の方が心房に近い測定点である。2 つの測定点間の距離は約 3mm である。Site 1, 2 のいずれにおいても、蛍光放射強度は最大 10% 増加した。蛍光放射強度の増加開始から最大になるまで 140msec 以上必要であり、これは活動電位のスパイク相に比べて長く、蛍光放射強度の経時変化の立ち上がり相には、筋収縮による光散乱 (Motion Artifact) が含まれていると言える。収縮により光強度が図 6. 33 では減少し、図 6. 35 では増加したと考えることにより、図 6. 33 と図 6. 35 は対応付けることができる。2 点間の興奮の伝搬遅延を蛍光放射強度の増加開始時刻より求めると 65msec であった。

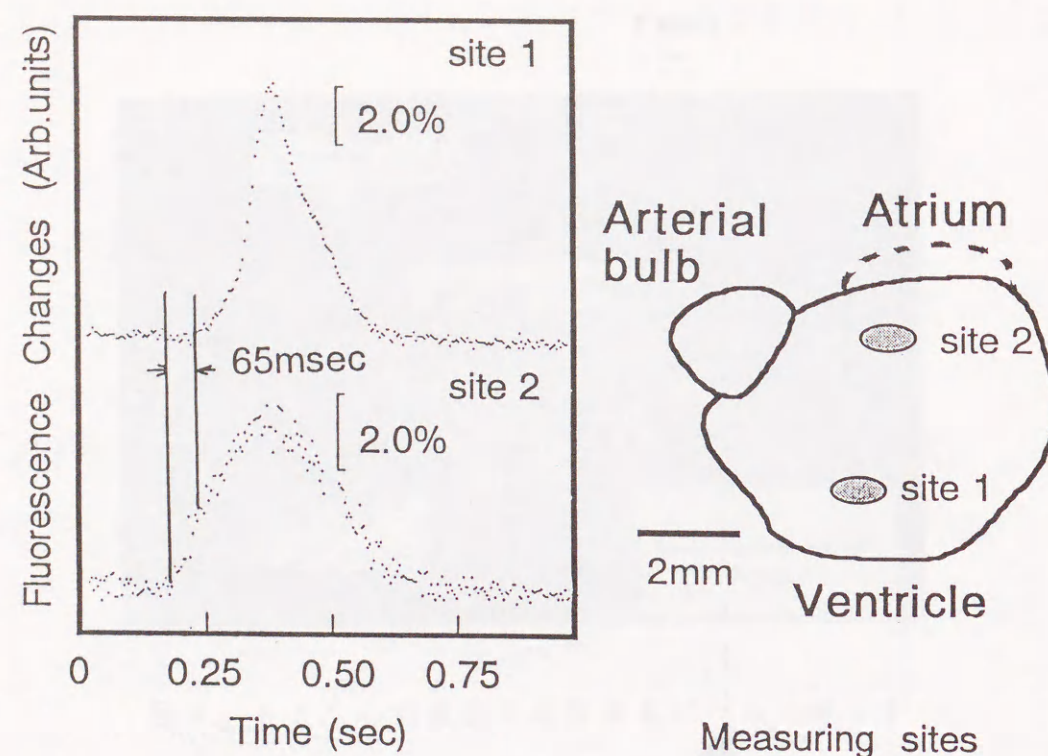


図 6. 3 5 蛍光信号（伝搬遅延が大きい例）

6.6.3 ガラス微小電極による計測との比較

ガラス微小電極を用いて計測した心室活動電位と蛍光を用いて光学的に計測した信号を比較する。図6.36は4本のガラス微小電極により記録された活動電位を示し、横軸は時間（ドット間隔4msec）、縦軸は膜電位を示している。各チャンネルの電極刺入位置は図6.37の通りである。4本のガラス微小電極を同じ電極支持棒に一行に固定し、マニピレータを用いて心室に刺入した。電極の間隔は約1mmであり、光計測同様にch-1が最も心房に近く、ch-2、ch-3と順に心房から遠ざかり、ch-4が心房より最も遠い測定点となる。図6.36において4本の電極を同一マニピレータで刺入したため、電極の刺入深さが異なり、各チャンネルの振幅とS/Nが異なった。特にch-2の刺入が十分でないため、スパイク相初期に過分極が見られる。ch-1及びch-4の立ち上がり時刻をそれぞれ▲、▽

で示す。ch-1（▲）の方がch-4（▽）より4msec（1ドット）早く立ち上がる。

この結果は図6.34における光計測の結果と、心房に近い測定点の方が他の3点より早く興奮を始める点、その時間差が4msec程度である点で一致する。図

6.35では約3mm離れた2点間の伝搬遅延が65msecであり、図6.34、図6.36と比較すると遅れは大きい。さらに図6.35では、蛍光放射の増加は300msec程度しか持続しておらず、この持続時間と比較しても65msecの伝搬遅延は大きな値と言える。コイの心臓では初め心房が興奮し、その興奮が終わると次に心室が興奮を始める。しかし、摘出し長時間経過した場合には、心房と心室の興奮が同期しなくなることもある。図6.35の場合、心房の切除が十分でなく心房の一部が残っていたために、心房よりの測定点（Site2）は心房の活動に依存し、他の測定点（Site1）はそれに同期しなかったものと思われる。

6.7 まとめ

オキサジン系膜電位感受性色素:Nile Blue A及びオキソノール系膜電位感受性色素:WW781を用いて、コイ心室活動電位を2波長同時計測した。各膜電位感受性色素の諸特性を表6.2にまとめる。Nile Blue A, WW781はともに心筋膜電位を光学的測定するための有効なプローブである。

また、音響光学効果によるビーム偏向器を用いて、コイ心室上の4点より活動電位を光計測し、興奮伝搬を検討した。心房に近い測定点より興奮が始まり、約3mmを4msec程度で興奮は伝搬した。この結果は、ガラス微小電極による細胞内誘導の計測結果と一致している。

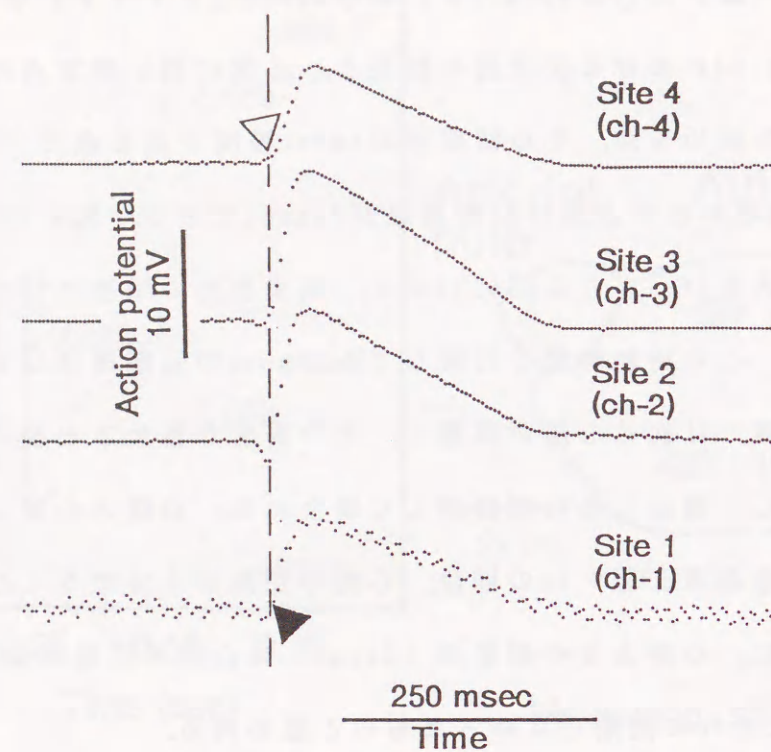


図 6. 3 6 コイ心室活動電位

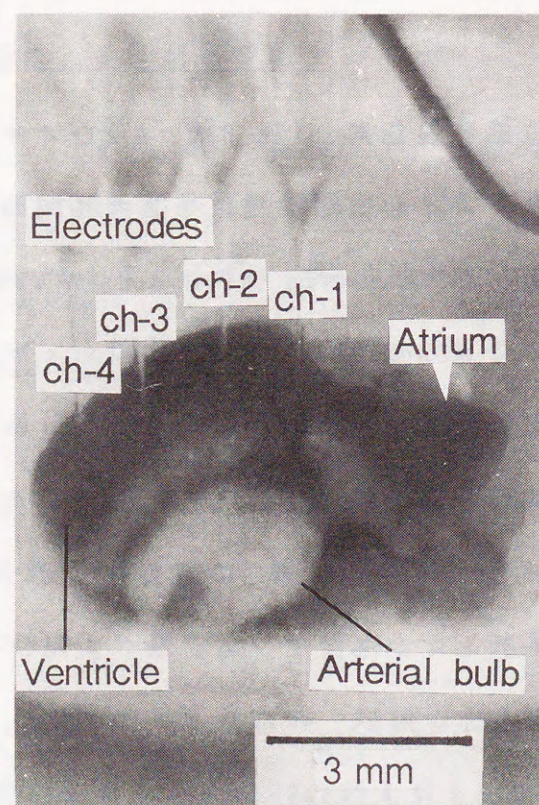


図 6. 3 7 コイ心室に刺入されたガラス電極

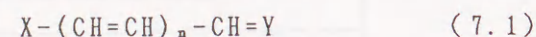
表 6. 2 膜電位感受性色素の特徴

	膜電位感受性色素	
	Nile Blue A	WW781
染色濃度	0.02mg/ml	0.1mg/ml
染色時間	10分	30分
染色後試料より蛍光	計測可	計測可
極大蛍光放射波長	680nm	655nm
活動電位に対する 光放射強度変化	4%	3%
スパイク相に おける応答	やや遅れる	速い
蛍光放射変化の 膜電位依存性	非線形 (閾値有り)	40mVぐらい まで線形
心筋膜電位プローブ としての適性	適	適

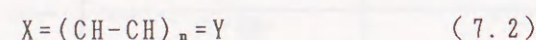
7 章 膜電位感受性色素の膜電位感受機構

7.1 はじめに

ポリメチン染料の分子構造は一般にX, Yの2つの複素環, 芳香環などの基を, 複数のメチン鎖で結んだ構造になっており,



または,



とかける。これらの色素は分子構造が類似しており, 光の吸収・発光過程の共通点が多いと考えられる。例えば, 吸収スペクトルはメチン鎖の数に依存し, X, Yが同じであれば, n が1増えると吸収帯は100nmほど長波長側に移動することが知られている[122]-[124]。

ポリメチン染料には, 現在用いられているメロシアニン系, オキソノール系, スチリル系色素が属していることをすでに述べた。このためオキソノール系色素の膜電位感受機構を解明することにより, 主要な膜電位感受性色素の膜電位感受機構を解明することが期待できる。そこで本章では, オキソノール系膜電位感受性色素について, 膜電位感受機構のメカニズムを理論的, 実験的に検討する。メロシアニン系膜電位感受性色素では, 膜電位感受機構として活動電位による吸収スペクトルの移動が指摘されている[54][85]。ここでは, 膜電位感受機構が吸収スペクトルの移動に直接依存しているとして, このスペクトル移動のメカニズムを, 理論的, 実験的に検討した。

7.2 外部電界による電子スペクトルの移動

溶媒中では, 色素分子・原子のエネルギー準位は溶媒と分子・原子の相互作用により真空中の状態とは異なり, 吸収, 蛍光スペクトルの移動が生じる。この現象は溶媒効果と呼ばれている。細胞膜染色後の膜電位感受性色素のエネルギー準位も真空中の状態と考えるよりも, むしろ溶液中のエネルギー準位に近いと考えられる。また, 細胞膜の興奮により生体組織の周囲の電場は変化し, この電場の変化により色素分子・原子は, 回転したり, その電子分布状態を変化させる。ここでは外部電界変化により生じる現象を理論的に検討する。

分子・原子の電子状態は量子力学の基礎方程式であるSchrödingerの波動方程式により記述される。

$$H \Psi_i = \epsilon_i \Psi_i \quad (7.3)$$

ここで H は色素分子・原子に電界が印加されていない時のハミルトニアン, ϵ_i , Ψ_i はそれぞれ, i 番目のエネルギー準位の波動関数及びそのエネルギーを示す。 ϵ_i は,

$$\epsilon_i = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} \Psi_i H \Psi_i d\tau}{\int_{-\infty}^{\infty} \Psi_i \Psi_i d\tau} \quad (7.4)$$

によって与えられる。

分子・原子は正と負の電荷を持ち双極子として取り扱うことができる。 i 番目のエネルギー準位にある色素分子・原子の双極子を μ_i とし, この分子・原子に E なる外部電場が加わったとする。この時, 色素分子・原子には変位, 偶力がはたらき, 色素分子・原子は電場 E と平行になろうとする。この分子・原子の変位, 回転に必要なエネルギー U は,

$$U = -\mu_i \cdot E \quad (7.5)$$

で与えられる。この分子・原子と外部電場の相互作用を、

$$H' = -\mu_i \cdot E \quad (7.6)$$

で表すとする、Schrodingerの波動方程式、式(7.3)は、

$$(H+H') \Psi_i = \epsilon_i' \Psi_i \quad (7.7)$$

とかけ、そのエネルギー ϵ_i' は、次式で与えられる。

$$\epsilon_i' = \epsilon_i + \Delta \epsilon_i \quad (7.8)$$

$$\epsilon_i = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} \Psi_i H' \Psi_i d\tau}{\int_{-\infty}^{\infty} \Psi_i \Psi_i d\tau} \quad (7.9)$$

真空中の分子・原子の基底ならびに励起エネルギーを ϵ_g, ϵ_e とし、この2つのエネルギー準位間の遷移が起きるものとする。これに伴う光の吸収または発光は式(7.10)、(7.11)により記述される。

$$\epsilon_e - \epsilon_g = h\nu \quad (7.10)$$

$$\nu = c\lambda \quad (7.11)$$

外部電場による影響があるときには、

$$\epsilon_e - \epsilon_g = h\nu' \quad (7.12)$$

$$\nu' = c\lambda' \quad (7.13)$$

$$\nu' = \nu + \Delta\nu \quad (7.14)$$

となる。ここで h : Planck定数、 $\nu^{(g)}$: 振動数、 c : 光速、 $\lambda^{(g)}$: 波長をそれぞれ示す。

分子・原子の光吸収、発光とエネルギー準位の関係を図7.1に示す。吸収スペクトルの測定より極大吸収波長 λ_{max} が求まり、基底準位 ϵ_{sol} と吸収のフランク-コンドン準位 f_{abs} とのエネルギーの差を知ることができる。また、蛍光スペクトルより、蛍光極大 F_{max} が得られ発光準位 ϵ_{fl} と発光のフランク-コンド

ン準位 f_{fl} のエネルギー差を知ることができる。しかし、吸収、蛍光スペクトルより知ることができるのは、光の吸収、発光前後の分子・原子が持つエネルギーの差であり、 $\epsilon_{sol}, f_{abs}, \epsilon_{fl}, f_{fl}$ や、それらと真空中の基底準位 ϵ_g 、励起準位 ϵ_e との差を知ることにはできない。

実際の光学的膜電位計測では、膜電位感受性色素は溶媒中にあると考えられる。基底状態および励起状態の双極子をそれぞれ μ_g, μ_e とする。 $|\mu_e| > |\mu_g|$ のとき吸収、蛍光スペクトルの長波長側への移動、深色化が生じ、 $|\mu_e| < |\mu_g|$ のとき短波長側へのスペクトルの移動、浅色化が起きる。

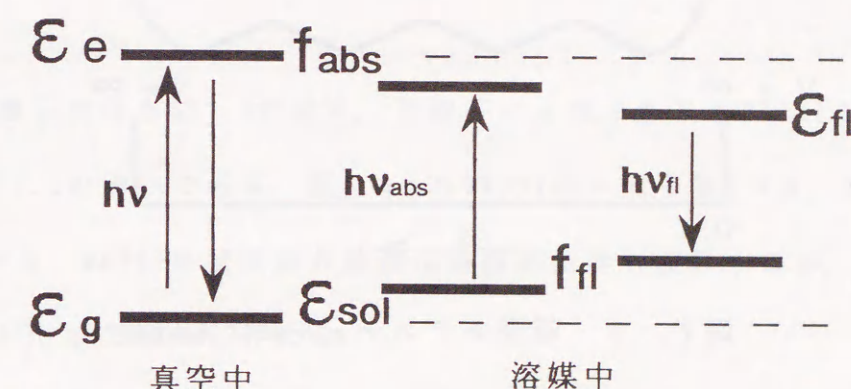


図7.1 溶媒中の分子の光吸収と発光

7.3 膜電位感受性色素の大きさ

ここでは、膜電位感受性色素WW781の大きさを自由電子モデルに従い極大吸収波長より試算した。

自由電子モデルは、 σ 電子と π 電子の相互作用がないと仮定し、 π 電子は色素分子の長さを L として、図7.2のような1次元箱型ポテンシャル中を運動するとする。このとき、 π 電子の波動関数 $\Psi_i(x)$ は波動方程式の式(7.15)で与え

られる。

$$-\frac{h^2}{8\pi^2 m} \frac{d^2}{dx^2} \Psi_i = \epsilon_i \Psi_i \quad (7.15)$$

ここで、 m は電子の質量を表す。

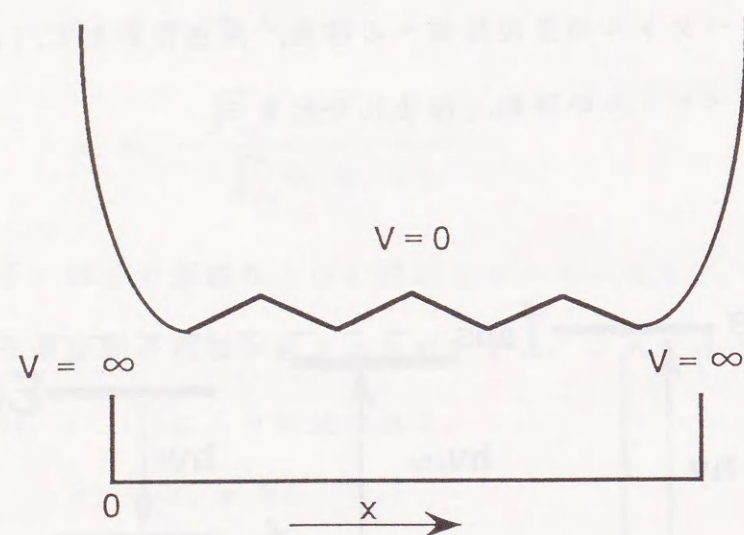


図 7. 2 箱型ポテンシャルによる近似

境界条件 $\Psi_i(0) = 0$ 及び、 $\Psi_i(L) = 0$ より、固有値 ϵ_i は、

$$\epsilon_i = \frac{n^2 h^2}{8 m L^2} \quad (7.16)$$

で与えられる。さらに規格化条件 $\int_{-\infty}^{\infty} \Psi_i^* \Psi_i d\tau = 1$ より、波動方程式の解は、

$$\Psi_i(x) = \sqrt{\frac{2}{L}} \sin \frac{n\pi x}{L} \quad (7.17)$$

となる。色素分子の π 電子の数を $2N$ 個として、最高被占軌道 (HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital) より最低空軌道 (LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital) への遷移のために必要なエネルギー ΔE は、

$$\begin{aligned} \Delta E &= \epsilon_{N+1} - \epsilon_N \\ &= \frac{h^2}{8mL^2} \{ (N+1)^2 - N^2 \} \\ &= \frac{h^2 (2N+1)}{8mL^2} \end{aligned} \quad (7.18)$$

で、与えられ、吸収波長 λ と分子長 L との関係は、

$$\lambda = \frac{8mL^2 c}{h (2N+1)} \quad (7.19)$$

となる。

ここで、 $m = 9.19534 \times 10^{-31} \text{ kg}$,

$$c = 2.9979245 \times 10^8 \text{ m/sec}$$

$$h = 6.626176 \times 10^{-34} \text{ J sec}$$

である。

WW781の π 電子骨格を図 7.3 に示す。各原子の π 電子数及び WW781 の π 骨格中での結合数は表 7.1 の通りである。表 7.1 より WW781 の π 電子数 $2N$ は、 $2N=30$ であることがわかる。WW781 の吸収極大波長は溶媒に依存し変化するが、図 4.11 より $\lambda_{\text{max}} = 600 \sim 610 \text{ nm}$ であると考える。

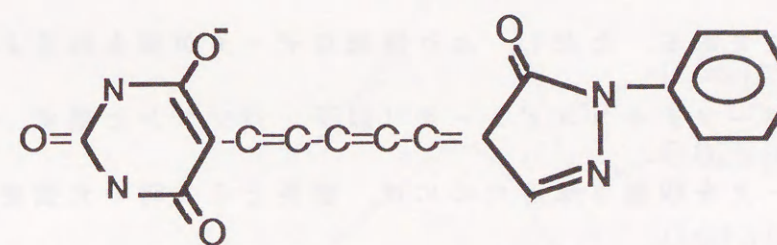


図 7. 3 WW781 の π 電子骨格

表 7. 1 WW781の π 電子数

原 子	原子あたり の π 電子数	WW781での 結合数	小 計
-C<	1	18	18
-N<	2	3	6
-N=	1	1	1
O=	1	3	3
-O ⁻	2	1	2
合 計			30

$N=15$, $\lambda = 600 \sim 610$ nmを式(7.19)に代入し, $L=2.38 \sim 2.41$ nmを得る. 細胞膜の厚さが10nm程度であるので, WW781は細胞膜を細胞外から細胞内へ貫通することはないと思われる.

7.4 測定条件とスペクトル

7.4.1 測定方法

吸収スペクトル及び, He-Neレーザ励起の蛍光放射スペクトルの分光方法は, 既に述べた通りである. ただし, より詳細なデータが得られるように, スペクトルの記録をパーソナルコンピュータ(以下, パソコンと略す.)で行った. パソコンでデータを収集させるためには, 波長とその時の光強度をパソコンに入力しなければならない. 波長の入力のためにロータリーエンコーダ(コパル RES20, A,B相, 50P/R)を分光器に接続しロータリーエンコーダの出力をパソコンのマウスポートへ入力した. また光強度は, 受光素子で電圧に変換後, 適当な大きさに増幅し, デジタルマルチメータでA/D変換し(12bit相当), GPIBバスを用いてパソコンに取り込み, 記録した.

吸収スペクトルの測定はダブルビーム式吸光度計(島津UV140)で行い, 波長校正は後部ランプ室より吸光度計内に入射したHe-Neレーザ光を分光することにより行った. ロータリーエンコーダを接続することにより, 波長分解能は0.8 nmとなった.

蛍光スペクトルの分光は, 光ファイバ型膜電位計測装置で行い, 分光器(日本分光CT-10)にロータリーエンコーダを接続することにより2nmの波長分解能を確保した.

7.4.2 吸収スペクトルの濃度依存性

各種濃度のWW781吸収スペクトルを図7.4に示す. 溶媒は生理食塩水である. 濃度が低下するに従い, 吸光度は低下するが, 極大吸収波長は変化せず, 溶媒を変化させた場合のような顕著な極大吸収波長の移動は見られなかった.

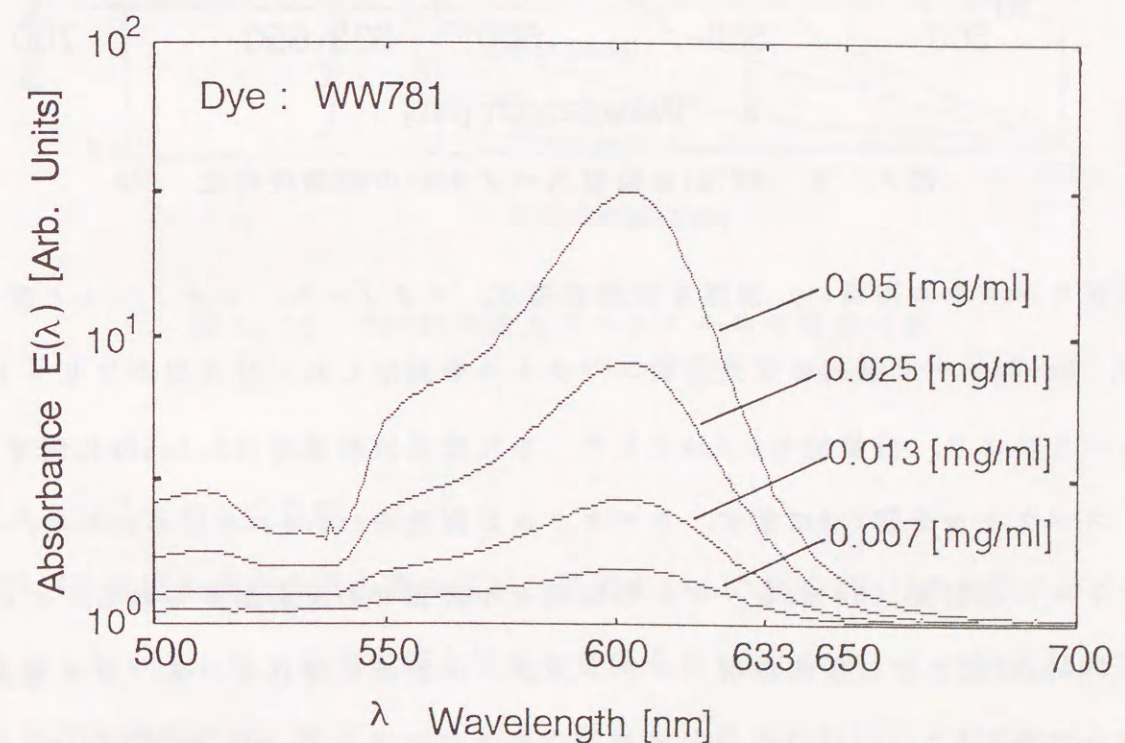


図 7. 4 WW781の吸収スペクトルの濃度依存性

7.4.3 溶媒効果の検討

溶媒を生理食塩水、メタノール、エタノールと変化させ、WW781の吸収スペクトルを検討した。吸収スペクトルを図7.5に示す。極大吸収波長は、溶媒を生理食塩水(R)、メタノール(Me)、エタノール(Eth)としたとき、それぞれ $\lambda_{max}^R = 602\text{nm}$, $\lambda_{max}^{Me} = 608\text{nm}$, $\lambda_{max}^{Eth} = 612\text{nm}$ であった。

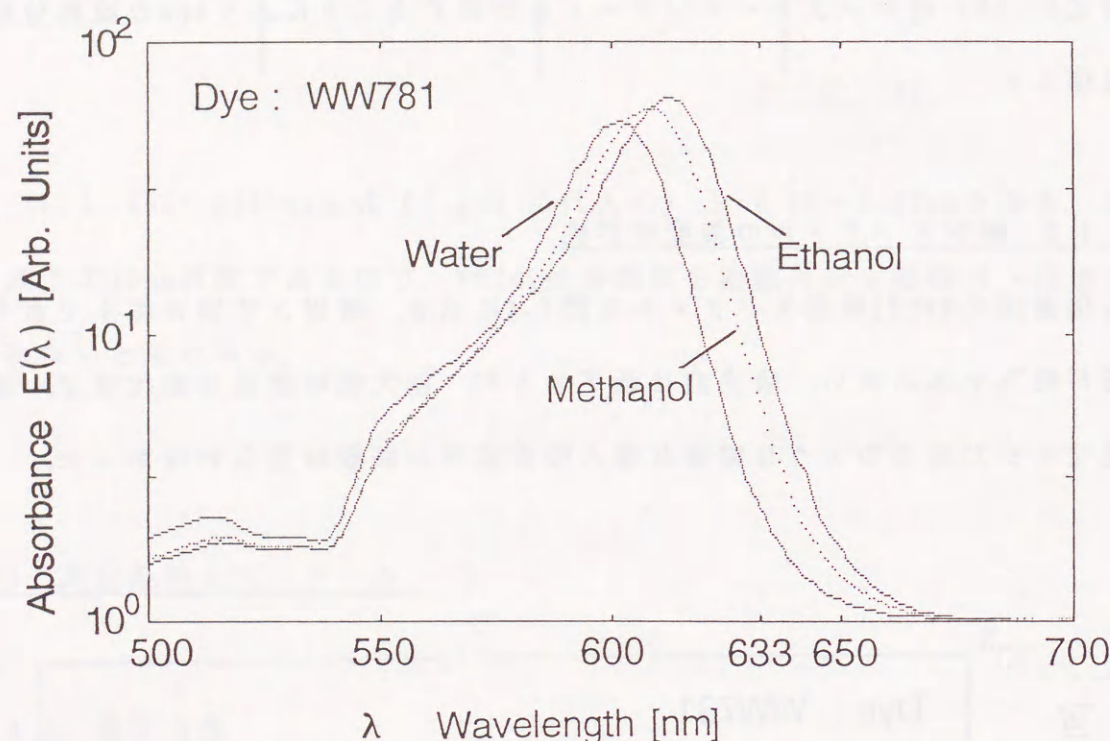


図7.5 WW781の吸収スペクトルの溶媒依存性

吸収スペクトル同様に、溶媒を生理食塩水、メタノール、エタノールと変化させ、He-Neレーザー励起の蛍光放射スペクトルを測定した。分光器のスリットを絞ることにより、分解能を6.5nmとした。また蛍光放射強度は2.0nm毎に測定した。スペクトルを図7.6に示す。スペクトルの測定を630nmより始めたため、スペクトルに励起光(He-Neレーザー)の試料セル表面での反射が見られる。このため、640nm付近までは蛍光放射スペクトルが、反射光に隠れている。蛍光極大の位置は濃度が0.01mg/mlの場合、エタノール中では656nmとなったが、メタノール中では反射光の影に隠れて明確な蛍光極大は見られなかった。同じメタノール

ル溶媒中でも濃度が0.05mg/mlの場合、蛍光極大波長は658nmとなった。吸収スペクトルと同様に、エタノールとメタノールで溶媒としての性質に類似性があると言える。励起光の反射スペクトルの極大の位置が、各蛍光放射スペクトルで一定とはいえず、今後測定精度を向上させる必要がある。

メタノール中での蛍光放射スペクトルは、吸収スペクトルに比べ濃度依存性が強く出たが、発光準位： ϵ_{11} は、基底準位： ϵ_{00} より不安定な状態にあったためと考えられる[123]。今後、さらに詳細な検討が必要である。

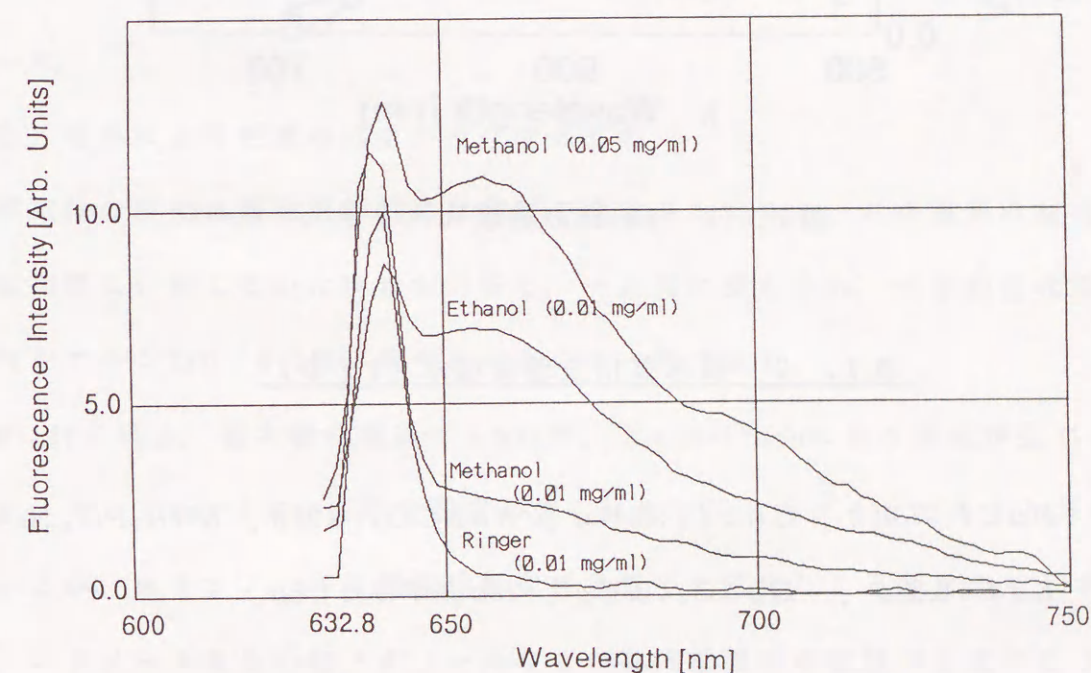


図7.6 WW781の蛍光スペクトルの溶媒依存性

7.4.4 各イオンの影響

図7.7は溶媒を淡水魚用生理食塩水、蒸留水とした時のRH155の吸収スペクトルを示している。淡水魚用生理食塩水の組成を表7.2に示す。この程度の Na^+ , K^+ イオンの増加では、吸収スペクトルの深色化は見られないことがわかる。

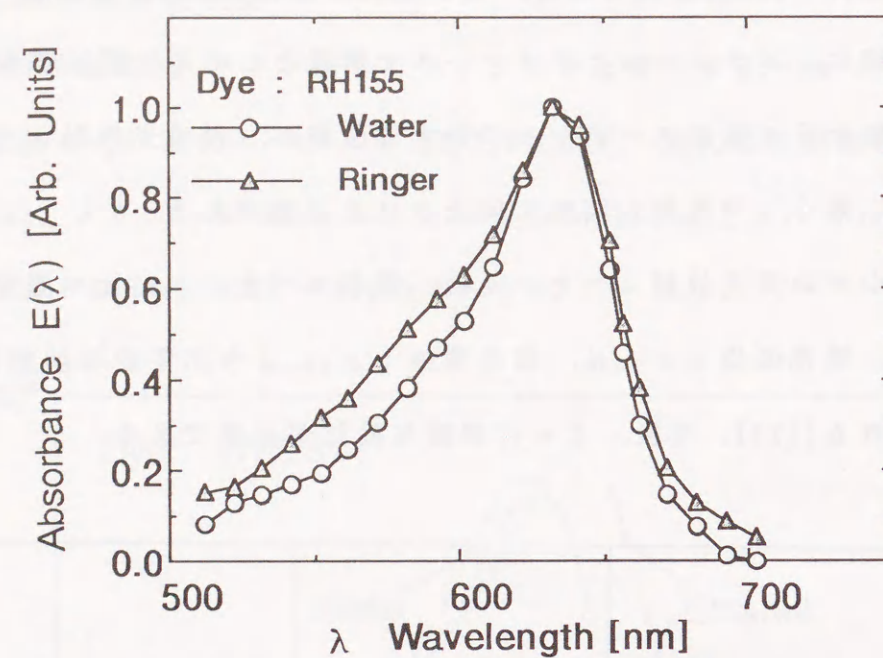


図 7. 7 RH155の吸収スペクトル

表 7. 2 淡水魚用生理食塩水 (1ℓ中)

$\text{NaCl} : 7.41\text{g}$, $\text{CaCl}_2 : 0.17\text{g}$, $\text{NaHCO}_3 : 0.31\text{g}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 : 0.4\text{g}$,
 $\text{KCl} : 0.36\text{g}$, $\text{MgSO}_4 : 0.15\text{g}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 : 1.6\text{g}$.

7.5 まとめ

膜電位感受性色素のメカニズムとして、吸収スペクトルの移動が関与していると考え、スペクトル移動のメカニズムを検討してきた。このスペクトル移動のメカニズムとしては以下のような現象が考えられる。

(1) 化学的变化に反応するもの

膜電位の変化にともない各種イオンが膜を通過し、細胞膜近傍のイオン濃度が増加する。この時、色素があるイオンと結合し、その構造を変化させ光学特

性を変化させる。このようなメカニズムで光強度を変化させるものに、

Fura-2 (Ca^{2+} インジケータ) [15]がある。しかし、図7.7で示したように、生理食塩水中に含まれているイオン程度では、吸収スペクトルの移動は見られなかった。

(2) 色素の凝集に由来するもの

膜電位が変化すると色素の局所的な凝集が生じ、それにより吸光スペクトルが移動すると考えられる。しかし、図7.4に示したように、光路長1cmの試料セルを用いて吸光度計で測定可能な範囲では、吸光スペクトルの移動は見られなかった。

(3) 電界により色素の向きが変化するもの

膜電位の変化は電磁気学的には電界の変化をもたらす。この電界の変化により細胞膜に付着していた色素が回転し、一方向に整えられ、光学的変化を生む。メロシアニン540 (M-540) のモデルもこの一例である。

M-540の場合、極大吸収波長： λ_{max} が、 $\lambda_{\text{max}}=570\text{nm}$ にあり蛍光が生じる状態がモノマ、 $\lambda_{\text{max}}=520\text{nm}$ にあり蛍光が生じにくい状態がダイマであると考えられているが、オキソノール系膜電位感受性色素でも同様なことが言える。すなわち、エタノールあるいはメタノールなどの有機溶媒中の状態が蛍光の生じやすいモノマ、水溶液中の状態が蛍光の乏しいダイマと考えられる。NK1939を界面活性剤（商品名Drywell）中に溶かした場合のスペクトルを図7.8に示すが、有機溶媒中と同様に、吸収スペクトルの深色化と蛍光放射が見られた。界面活性剤は、親水性の”頭部”と炭化水素の長い鎖からなる疎水性（親油性）の”尾”を持っており、生体膜を構成する生体膜脂質と似た構造を持っている[126]。細胞膜染色後の膜電位感受性色素は有機溶媒中の状態に近いと考えられる。ダイマには、H-会合体とJ-会合体がある[122]が、ダイマの極大吸収波長がモノマのそれより短波長側に生じることより、H-会合体が生じていると考えられる。

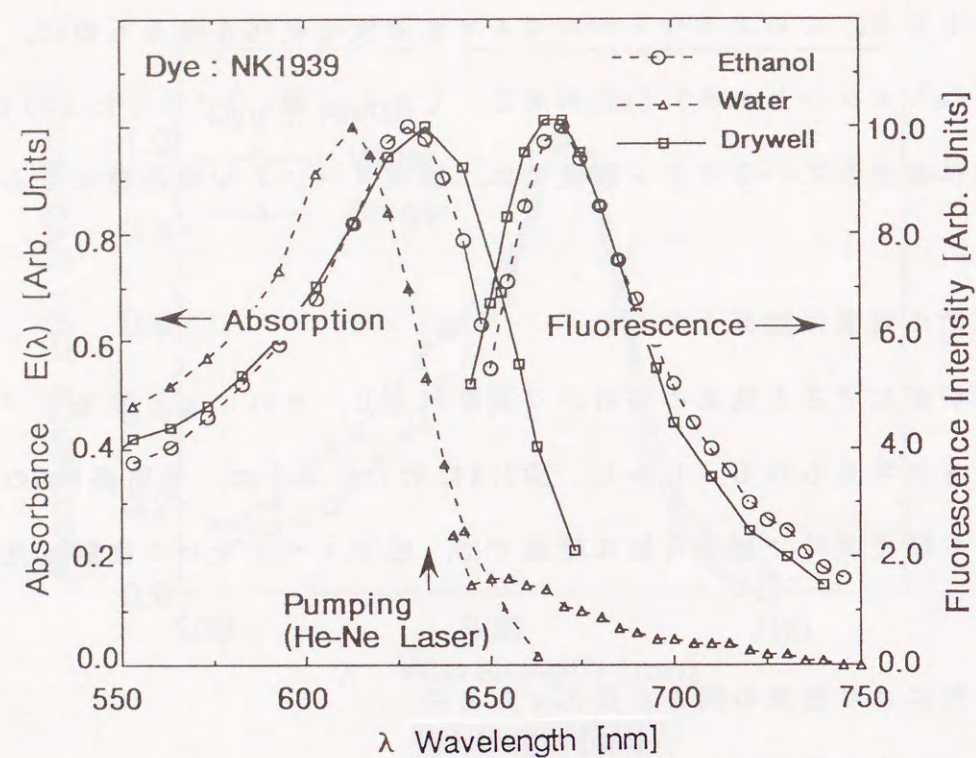


図 7. 8 界面活性剤中のスペクトル

動物，組織種により有効な膜電位感受性色素が異なることが指摘されている[87]。この一因として，同じ有機溶媒中でも吸収スペクトルの深色化の度合が異なることがあげられる。

しかし，吸収帯移動のメカニズムを，モノマ，ダイマのみで考えるべきではなく，Stark効果によっても吸収帯の移動は生じる。また，細胞膜内に取り込まれた色素分子は，液晶中の色素分子と同様な状態になる。カラー表示用液晶中にメロシアニン色素を用いられることを考慮しなければならない[123]。

(4) 電界の変化が色素の電子配置を変化させるもの

電界の変化により色素の最外殻の電子配置が変化し(Stark効果)，それにより吸光度，蛍光放射強度の変化が生じる。この効果が大きくなるように，色素分子の構造をデザインした膜電位感受性色素として，"charge-shift probe"[88][127]がある。

膜電位感受性色素のメカニズムはその詳細が明らかにされていない。近年，分子軌道法によるエネルギー準位の検討が行われ始め[128]，その結果に詳細な検討が期待される。また，生体膜あるいは人工膜を用いた実験的な検討や，イオン濃度や各種溶媒中でのスペクトルの検討と理論的検討が十分に比較され，相補的に発展することを期待したい。

8 章 総括

光学的膜電位計測は、神経回路網の解析や、心臓の異常興奮伝搬の解明のための強力な手法と成り得る。特に、レーザ光源を用いた光細胞プロービングと組み合わせることにより、 $1\mu\text{m}$ 程度のビームスポットが容易に形成でき、個々のイオンゲートの状態などの細胞膜自体の構造も明らかにできる。

本論文では、光ファイバセンサ型膜電位計測装置の基礎を与えるために、レーザ光源、セルフォックレンズ、光ファイバ、光変調器などの光通信技術を応用した光学系を試作し、またビーム走査法により多数ヶ所の同時測定の基礎的検討を行った。さらに、脳外科、心臓外科手術中の異常興奮部位の検出などの臨床応用のために基礎的知見を得ることを目的とし、無摘出なラット大脳皮質や、摘出はしているもののコイ体内と同じ形態をしているコイ心室の活動電位の光計測を行った。特に、生体の動きによる光信号の消失 (motion artifact) には多波長同時計測を試みた。以下に本研究で得られた結果を要約し、それを記す。

第1章では、光による生体計測、治療などをまとめ、光学的膜電位計測の歴史的背景を述べ、本研究を位置付けた。

第2章では、光学的膜電位計測について、使用されている膜電位感受性色素、実際の計測方法、またメロシアニン540について提唱されている膜電位感受機構について述べた。さらに、光学的膜電位計測の特徴を述べ、レーザ光源を用いた場合の長所を明らかにした。さらに、光学的計測を行う際の基礎知識として、物質の光吸収について、透過法及び反射法により測定したWW781の吸収スペクトルを用いて説明し、光の吸収、発光スペクトルと分子のエネルギー準位の関係を概説した。

第3章では、生体の電気現象について概説し、細胞膜興奮時に細胞外に生じ

る電位分布を理論的に求める方法について検討した。

第4章では、計測対象の大きさにより、光細胞プロービングを5つのレベルに分類し、それぞれのレベルの計測に求められる空間分解能、同時測定可能な領域の大きさ、時間分解能を明らかにするとともに、光集積型細胞プロービングシステムの構想について述べた。さらに、本研究で用いた膜電位感受性色素の分光特性について述べた。Nile Blue A (オキサジン系), WW781, NK1939, RH155 (オキソノール系) の生理食塩水中あるいはエタノール中の極大吸収波長: λ_{max} , 極大蛍光波長: F_{max} は下表の通りである。

表 8. 1 膜電位感受性色素の分光特性

	Nile Blue A	WW781	NK1939	RH155
Ringer $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	620	600	610	620
Ringer $F_{\text{max}}(\text{nm})$	680	測定不能		
Ethanol $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	未測定	612	625	未測定
Ethanol $F_{\text{max}}(\text{nm})$	未測定	655	670	未測定

これらの膜電位感受性色素の分光特性を基にして、He-Neレーザ、A/O光変調器、光ファイバを用いた、光ファイバ型膜電位計測装置を試作した。また、ラットの呼吸により振動する大脳皮質や、興奮にともない収縮するコイ心室より安定した光学的膜電位計測を実現するために、多波長同時計測を提案し、その光学特性を示すとともに、蛍光放射と反射光の2波長の光強度を同時計測可能な計測装置の試作し、その基本性能について述べた。

第5章では、大脳皮質について機能の局在などの生理学的知見を述べ、intactな状態のラット大脳皮質活動電位の光計測法について述べた。

膜電位感受性色素として Nile Blue A を用いた。ラット後肢座骨神経に双極電極を固定し、微かに後肢が反応する程度の刺激を加え、対側の脳皮質に生じる誘発応答を光学的に計測した。計測にあたり、計測領域上の頭蓋骨並びに硬膜を切除し、Nile Blue A で染色した。染色は、染色液 (0.02mg/ml の割合で Nile Blue A を含む。) を含む脱脂綿を脳皮質に接触させることにより行った。約1時間の染色で、脳皮質が Nile Blue A で染色されていることが肉眼で確認できた。また、He-Ne レーザ励起の蛍光放射スペクトルは、Nile Blue A 特有のものになり、680nm 付近で蛍光極大となった。

ネンブタール及びケタラル麻酔併用のもとで、ラット後肢を刺激した。このとき Nile Blue A 染色を施した脳皮質に、He-Ne レーザを照射し、蛍光放射強度の変化を計測した。motion artifact 確認のためにはほぼ同時刻の反射光強度変化を記録した。蛍光放射強度のみが刺激に応じて1-2%増加した。刺激に対する潜時は200msec 程度であった。計測領域が嗅球側によった場合、この応答は見られなかった。

第6章では、Nile Blue A 及び WW781 を膜電位感受性色素として用いたコイ心室活動電位の2波長同時計測について、さらにレーザ走査によるコイ心室活動電位の4点同時計測について述べた。

はじめに染色のための条件を明らかにした。染色のための条件は以下の通りである。Nile Blue A を用いた場合、濃度0.02mg/ml の色素溶液を用いて10分間染色を行う。染色により、吸収極大の位置： λ_{\max} 、蛍光極大の位置： F_{\max} は、水溶液中のそれと変わらず、それぞれ $\lambda_{\max}=620\text{nm}$ 、 $F_{\max}=680\text{nm}$ であった。

WW781 を用いた場合、染色は0.1mg/ml の割合で WW781 を含む生理食塩水を染色液として、30分間染色を行えばよいことがわかった。WW781 の分光特性は色素分子の周囲の溶媒環境に大きく依存し、WW781 によって染色されたコイ心室では、極大吸収は、エタノール中の吸収極大の位置よりさらに深色移動し、 $\lambda_{\max}=$

630nm に位置した。蛍光極大はエタノール中と同様に $F_{\max}=655\text{nm}$ に位置し、測定可能であった。

それぞれの色素で染色したコイ心室に He-Ne レーザを照射し、計測領域より生じる蛍光放射と、励起光の反射を2波長同時計測し、ガラス微小電極により計測した心室活動電位と比較した。Nile Blue A では蛍光放射が最大4%変化し、WW781 を用いた場合、蛍光放射の変化は最大3%であった。活動電位のスパイク相における応答は、Nile Blue A では活動電位にやや遅れて増加し、蛍光放射強度と膜電位は非線形に対応付けられ、Benzanilla ら [103]、金山ら [81] の報告に一致した。また、WW781 を用いた場合、蛍光放射強度変化はほぼ線形に膜電位と対応付けられ、スパイク相において Nile Blue A より速い応答が得られた。

音響光学効果によるビーム偏向器 (A/O 素子) を用いてビーム走査を行い、コイ心室表面上の4ヶ所の活動電位を同時計測した。心房に近い測定点が他の3点より4msec ほど早く興奮を始めた。測定点は最大3mm 離れていたため、75cm/sec で興奮は伝搬したことになる。これらの計測結果は、ガラス微小電極で計測した結果と一致した。

第7章では、膜電位感受性色素のメカニズムの基礎的考察を、実験的、理論的に行った。特に、オキソノール系膜電位感受性色素では吸収スペクトルが生理食塩水中の状態より深色化することによって蛍光放射強度が変化すると考えられ、吸収スペクトルを各種条件下で測定した。溶液の濃度、溶媒の種類、溶媒中の各種イオン濃度のなかでは、溶媒の種類により吸収帯は移動した。また、蛍光放射スペクトルにも溶媒効果が認められ、今後、さらに詳細な測定及び理論的な検討を行わなければならない。

以上、本論文ではレーザ光源を用いた光学的膜電位計測を実験的に検討した。光学的膜電位計測は、多数ヶ所の活動電位を同時計測する方法として、生理学、

臨床医学上重要な計測手法である。レーザ光源を用いることにより、光通信、光計測用に開発された、光ファイバ、光変調器、セルフォックレンズなどの光機能素子を用いることができ、小型で取り扱いの容易な計測システムを構築することが可能である。さらに、近い将来には光増幅器、光コンピュータなどが実現し、測定精度、データ処理技術が飛躍的に向上すると考えられる。これらの光技術の応用のためには、レーザ光源の使用が不可欠である。

臨床応用では、計測対象の位置的変動（動き）が問題となり、多波長同時計測が有効である。さらに、機能が異なる色素で生体を多重染色することなどにより、生体の電気現象の他に各種イオン濃度、形状変形、温度などの複数の生体機能情報を同時に得ることが可能になり、より詳細な生体システムの研究が進められると思われる。本論文で述べた、光ファイバ型膜電位計測装置や、2波長同時計測装置、intactなラット大脳皮質における計測方法は、光学的膜電位計測を臨床応用するために重要であるとともに、イオンゲートなどのマイクロプロービングを実現する上でも重要な技術となる。

謝 辞

著者が豊橋技術科学大学大学院工学研究科博士後期課程在学中に終始有益なる御討論をしていただき、熱心な御指導、御鞭撻を賜りました豊橋技術科学大学情報工学系教授工学博士宮崎保光先生に謹んで感謝致します。また、本研究の遂行ならびに論文作成にあたり、有益な御教示、御激励をいただきました豊橋技術科学大学情報工学系教授工学博士秋丸春夫先生、豊橋技術科学大学情報工学系教授Ph.D臼井支朗先生、豊橋技術科学大学情報工学系助教授医学博士榊原学先生、豊橋技術科学大学情報工学系講師工学博士後藤信夫先生に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、適切な御助言を頂きました山家光男先生（昭和63年7月まで豊橋技術科学大学情報工学系講師、現在岐阜大学教養部助教授）に深く感謝致します。生体の取扱いならびに実験方法に関して御助言頂きました名古屋大学医学部講師口脇博治先生に感謝致します。また、実験や事務等で終始御世話頂きました宮脇治雄技官に感謝致します。

本研究の先駆的研究なされた金山省一氏（現東芝）、西村誠一氏（現三洋電気）に感謝致します。

修士研究を共にし、有益な御討論をして頂きました小林茂君、中野基生君、山田光志君に感謝致します。

さらに、実験や、学会発表のスライド作成などで御協力頂いた佐藤隆君（現リコー）、花井浩一君（現中部電力）、間瀬久康君（現アイシン精機）、佐藤健志君（現横河メディカルシステム）、石黒雄一君、丸山邦彦君をはじめとする情報伝送研究室の皆さんに感謝致します。

最後に文献検索等で御世話頂きました図書館の皆さんならびに実験装置の製作の際に御世話頂きました実習工場の皆さんに心より感謝致します。

[参考文献]

- [1] 渥美和彦他：特集レーザー医学の進歩—オプトエレクトロニクスの臨床医学への貢献—。日本臨床，45巻4号，pp685-876 (1987)
- [2] 渥美和彦他：特集レーザー医学。日本ME学会雑誌，1巻7号，pp499-556 (1987)
- [3] 山本有平，佐藤信紘，井戸健一，佐藤俊一他：特集レーザー計測と診断。日本レーザー医学会誌，9巻1号，pp9-42 (1988)
- [4] 田村守，戸井田昌宏，林成之，加藤治文，山本秀樹：特集診断。日本レーザー医学会誌，11巻2号，pp17-58 (1990)
- [5] 松本伍良他：特集生体の光応用計測。日本ME学会雑誌，4巻4号，pp1-70 (1990)
- [6] 藤田哲也，田村守編：特集分子生物学における分光分析。病体生理，9巻11号，pp851-898 (1990)
- [7] 梶谷文彦，平松修，小笠原康夫，三戸恵一朗，辻岡克彦：レーザドブラ血流計測法。日本ME学会雑誌，4巻4号，pp2-11 (1990)
- [8] 平松修，小笠原康夫，三戸恵一朗，辻岡克彦，梶谷文彦：2つのファイバを用いたレーザ・ドブラ血流速計の開発と冠動脈狭窄血流計測への応用。医用電子と生体工学，26巻2号，pp92-97 (1988)
- [9] 山本有平，野平久仁彦，大浦武彦，藤居仁：レーザースペックル法による末梢循環系の画像化。日本レーザー医学会誌，9巻1号，pp9-13 (1988)
- [10] 池田公，王天明，口脇博治，影山直樹，金山省一，宮崎保光：光ファイバセンサーを用いたレーザ・ドブラ法による血流速分布の計測。信学技報，MBE83-66 (1983)
- [11] 大原到，田口善雄：疼痛緩解用半導体レーザー機器 (SKL-101) の開発。日本レーザー医学会誌，10巻2号，pp23-30 (1989)
- [12] 野口義夫，猪飼国夫，黒沢浩：プロファイル型染色体ソータのパターン判定速度。91年信学春季全大，D-206 (1991)
- [13] A. Scarpa, F.J. Brinley, Jr. & G. Dubyak: Antipyrilazo III, a "middle range" Ca^{2+} metallochromic indicator. Biochem. Vol. 17, No. 8, pp1378-1386 (1978)
- [14] L. Cleemann & M. Morad: Optical measurements of extracellular calcium depletion during a single heartbeat. Science, Vol. 226, pp174-177 (1984)

- [15] G. Grynkiewicz, M. Poenie & R.Y. Tsien: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. the J. of Biological Chem., Vol. 260, pp3440-3450 (1985)
- [16] O.T. Jones, D.L. Kunze & K.J. Angelides: Localization and mobility of ω -contonxin-sensitive Ca^{2+} channels in Hippocampal CA1 neurons. Science, Vol. 244 pp1189-1192 (1989)
- [17] N. Ishii, A.W.M. Simpson, C.C. Ashley: Free calcium at rest during "Catch" in single smooth muscle cells. Science, Vol. 243, pp1367-1368 (1989)
- [18] J.K. Foskett & J.E. Melvin: Activation of salivary secretion: Coupling of cell volume and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in single cell. Science, Vol. 244, pp1582-1584 (1989)
- [19] L.A. Blatter & W.G. Wier: Intracellular diffusion, binding, and compartmentalization of the fluorescent calcium indicators indo-1 and fura-2. Biophys. J., Vol. 58, pp1491-1499 (1990)
- [20] M.R. McAinsh, C. Brownlee & A.M. Hetherington: Abscissic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. NATURE, Vol. 343, pp186-188 (1990)
- [21] J. Lechleiter, S. Girard, D. Clapham & E. Peralta: Subcellular patterns of calcium release determined by G protein-specific residues of muscarinic receptors. NATURE, Vol. 350, pp505-508 (1991)
- [22] R.M. Mulkey & R.S. Zucker: Action potentials must admit calcium to evoke transmitter release. NATURE, Vol. 350, pp153-155 (1991)
- [23] J. Vergara, M. DiFranco, D. Compagnon & B.A. Suarez-Isla: Imaging of calcium transients in skeletal muscle fibers, Biophys. J., Vol. 59, pp12-24 (1991)
- [24] A. Ashkin, J.M. Dziedzic & T. Yamane: Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. NATURE, Vol. 330, No. 24, pp769-771 (1987)
- [25] 草野文雄，佐藤俊一，小川洋，稲葉文男：1.5 μm 帯半導体レーザー光による微小物体の非接触トラッピング操作。医用電子と生体工学，29巻特別号，pp147 (1991)

- [26] 日暮栄治, 佐藤俊一, 田口善雄, 稲葉文男: レーザー細胞融合法の実験的検討Ⅱ レーザー光照射条件の検討.
医用電子と生体工学, 29巻特別号, pp146 (1991)
- [27] 大頭仁: レーザ走査型眼底検査装置の開発.
日本眼光学学会誌, 8巻1号 (1987)
- [28] L.B.Cohen & B.M.Salzberg: Optical measurement of membrane potential. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., Vol. 83, pp35-88 (1978)
- [29] 神野耕太郎, 広田秋彦, 酒井哲朗, 小室仁: 活動電位の光学的多チャンネル測定. 医用電子と生体工学, Vol. 23, pp73-80 (1985)
- [30] A.Grinvold: Real-time optical mapping of neuronal activity: from single growth cones to the intact mammalian brain, Ann. Rev. Neurosci., Vol. 8, pp263-305 (1985)
- [31] L.Cohen: More light on brains.
NATURE, Vol. 331, No. 14, pp112-113 (1988)
- [32] A.Grinvold R.D.Frostig, E.Lieke & R. Hildesheim: Optical imaging of neuronal activity. Physiol. Rev., Vol. 68, pp1285-1366 (1988)
- [33] 早川義博, 加藤治文, 野口正之, 中嶋伸: エキシマダイレーザーを用いた癌の光線力学的診断治療.
日本ME学会雑誌, 1巻7号, pp532-535 (1987)
- [34] 久住治男: 金蒸気レーザーの光線力学的癌治療への応用.
日本ME学会雑誌, 1巻7号, pp536-540 (1987)
- [35] 丹野直弘: レーザー励起差分蛍光スペクトル分析による分光学的ガン細胞検診装置の開発研究.
Suzuken Memorial Foundation, Vol. 4, pp24-32 (1985)
- [36] 荒川宏, 水野杏一, 栗田明, 中村治雄: 蛍光ガイダンスを用いたエキシマレーザー血管形成術システムの検討.
医用電子と生体工学, 29巻特別号, pp170 (1991)
- [37] 宮崎公臣, 内藤克輔, 新田政博, 久住治男, 三好憲雄, 福田優: 細胞内取込みアドレマイシンの光増感による殺細胞作用の実験的研究.
日本レーザー医学会誌, 9巻4号, pp3-9 (1989)
- [38] 岩崎賢二, 清水進, 長田光博, 谷野隆三郎, 宮坂宗男, 森田泰鎮:
あざ治療用レーザー装置の開発.
医用電子と生体工学, 27巻1号, pp26-34 (1989)
- [39] 特集レーザー眼科. 日本レーザー医学会誌, 11巻3号, pp9-34 (1990)

- [40] 坂口正雄, 小野伸幸, 亀井智成, 横井裕, 中島浩二, 大橋俊夫:
エキシマレーザーによる角膜切除を対象としたレーザスキャニング切除システムの開発. 医用電子と生体工学, 28巻2号, pp143-151 (1990)
- [41] 特集レーザーアンギオプラスティ.
日本レーザー医学会誌, 10巻1号, pp19-36 (1989)
- [42] 小山田喜敬: He-Neレーザー照射によるリウマチ性疾患の治療の試み.
日本レーザー医学会誌, 9巻2号, pp17-24 (1988)
- [43] 菊池眞: レーザーによるハイパーサーミア - レーザーサーミア -.
日本レーザー医学会誌, 9巻2号, pp59-65 (1988)
- [44] 神野耕太郎: 中枢神経系ニューロン活動の光学的リアルタイムマッピング.
病態生理, 8巻5号, pp418-426 (1989)
- [45] 塩野悟, 中島道夫, 山田訓, 柳浦真美子, 前田満雄: 488チャンネル光学多点同時計測装置の試作とアメフラシ神経系への適用, 第4回生体生理工学シンポジウム論文集, pp307-310 (1989)
- [46] 福西宏有, 村井伸行, 谷口郁雄: 光学的測定によるモルモット聴覚の応答特性の検出, 第4回生体生理工学シンポジウム論文集, pp323-326 (1989)
- [47] 本間広樹, 轡田昇: 神経膜電位の光学的検出法.
日本工業大学研究報告, 16巻3号 (1987)
- [48] 松本元, 飯島敏夫, 市川道教: 脳の光生理学,
病体生理, 9巻11号, pp882-891 (1990)
- [49] 谷藤学, 外山敬介: 膜電位感受性色素による神経活動の光学的計測 - ビデオカメラによる神経興奮伝搬の可視化 -. 日本ME学会雑誌, 5巻2号, pp20-27 (1991)
- [50] 飯島敏夫, 市川道教, 秋山修二, 重松征史, 松本元: 海馬の光生理学.
電子技術総合研究所彙報, 55巻, 6号, pp17-29 (1991)
- [51] 木下一彦: 一瞬を見る (パルスレーザー顕微鏡) / n: 限界を越える生物顕微鏡, 宝谷紘一・木下一彦, 学会出版センター (1991)
- [52] M.Hibino, M.Shigemori, H.Itoh, K.Nagayama & K.Kinosita, Jr.: Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. Biophys. J., Vol. 59, pp209-220 (1991)
- [53] 秋山修二, 重松征史, 飯島敏夫, 松本元: 神経回路網生理データ解析・モデリングシステム. 90信学春全大, D-57 (1990)
- [54] 松本元, 大津展之編: 神経細胞が行う情報処理とそのメカニズム,
培風館 (1991)

- [55] X.M. Huang & Y. Miyazaki : Connected associative memory neural network with dynamical threshold function. IEICE Trans. on infor. & sys. Vol.E75D, No.1, pp170-179 (1992)
- [56] 源純一, 宮崎保光 : 機能性薄膜導波路を用いた光学的ニューラル素子, 信学技報, NC90-57, pp25-30 (1991)
- [57] A.Grinvold, W.N.Ross & I.Farber: Simultaneous optical measurements of electrical activity from multiple sites on processes of cultured neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.78, No.58, pp3245-3249 (1981)
- [58] A.Grinvold & I.C.Farber: Optical recording of calcium action potentials from growth cones of cultured neurons with a laser microbeam. Science, Vol.212, pp1164-1166 (1981)
- [59] A.Grinvold, A.Manker & M.Segal : Visualization of the spread of electrical activity in rat hippocampal slices by voltage-sensitive optical probes. J. Physiol. , Vol.333, pp269-291 (1982)
- [60] A.Grinvold, L.B.Cohen & M.B.Boyle: Simultaneous optical monitoring of activity of many neurons in invertebrate ganglia using a 124-element photodiode array. J. of Neurophysiol. , Vol.45, No.5, pp829-840 (1981)
- [61] A.Grinvold, A.Fine, I.C.Farber & R. Hildesheim : Fluorescence monitoring of electrical responses from small neurons and their processes. Biophys. J., Vol.42, pp195-198 (1983)
- [62] B.M.Salzberg, A.L.Obaid, D.M.Senseman & H.Gainer : Optical recording of action potential from vertebrate nerve terminals using potentiometric probes provides evidence for sodium and calcium components. NATURE, Vol.306, No.3, pp36-40 (1983)
- [63] P.Shrager, S.Y.Chiu, J.M.Ritchie, D. Zecevic & L.B.Cohen : Optical recording of action potential propagation in demyelinated frog nerve. Biophys. J. , Vol.51, pp351-355 (1987)
- [64] T.D.Parsons, D.Kleinfeld, F.R.Behling & B.M.Salzberg : Optical recording of the electrical activity of synaptically interacting *Aplysia* neurons in culture using potentiometric probes. Biophys. J. , Vol.56, pp213-221 (1989)

- [65] K.Kamino, Y.Katoh, H.Komuro & K.Sato : Multiple-site optical monitoring of neural activity evoked by vagus nerve stimulation in the embryonic chick brain stem. J. of Physiol. Vol.409, pp263-283 (1989)
- [66] A.Grinvold, B.M.Salzberg V.Lev-Ram & R.Hildesheim: Optical recording of synaptic potentials from processes of single neurons using intracellular potentiometric dyes. Biophys. J., Vol.51, pp643-651 (1987)
- [67] A.Watanabe : Optical activity signals recorded from nerve fibers using a photoelastic modulator. Biomedical Res., Vol.7, supplement, pp21-25 (1986)
- [68] K.Kamino, A.Hirota & S.Fujii : Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. Nature, Vol.290, No.16, pp595-597 (1981)
- [69] 神野耕太郎, 広田秋彦, 藤井志郎, 酒井哲朗 : 活動電位の光学的測定による初期胚における心機能発生へのアプローチ. 日本生理誌, 45巻, pp231-244 (1983)
- [70] H.Windisch, W.Müller & H.A.Tritthart : Fluorescence monitoring of rapid changes in membrane potential in heart muscle. Biophys. J. Vol.48, pp877-884 (1985)
- [71] H. Komuro, T. Sakai, A. Hirota & K. Kamino : Conduction pattern of excitation in the amphibian atrium assessed by multiple-site optical recording of action potentials, Jpn. J. Physiol. Vol.36, pp123-137 (1986)
- [72] W.Müller, H.Windisch & H.A.Tritthart : Fast optical monitoring of microscopic excitation patterns in cardiac muscle. Biophys. J. , Vol.56, pp623-629 (1989)
- [73] H.S.Orbach & L.B.Cohen : Optical monitoring of activity from many areas of the in vitro and in vivo salamander olfactory bulb: a new method for studying functional organization in the vertebrate central nervous system. J. of Neuroscience, Vol.3, No.11, pp2251-2262 (1983)
- [74] A.Grinvold, L.Anglister, J.A.Freeman, R.Hildesheim & A.Manker : Real-time optical imaging of naturally evoked electrical activity in intact frog brain. NATURE, Vol.308, No.26, pp848-850 (1984)

- [75] H.S.Orbach, L.B.Cohen & A.Grinstead: Optical Mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex. J. of Neuroscience, Vol.5, No.7, pp1886-1895 (1985)
- [76] G.G.Blasdel & G.Salama : Voltage-sensitive dyes reveal a modular organization in monkey striate cortex. NATURE, Vol.321, No.5, pp579-585 (1986)
- [77] J.S.Kauer :Real-time imaging of evoked activity in local circuits of the salamander olfactory bulb. NATURE, Vol.331, No.14, pp166-169 (1988)
- [78] 佐藤智夫, 宮崎保光, 口脇博治: 脳機能組織における活動電位のレーザー光プロービング. 日本レーザー医学会誌, 9巻3号, pp519-522 (1988)
- [79] S. Dillon & M. Morad : A new laser scanning system for measuring action potential propagation in the heart. Science, Vol.214, pp453-456 (1981)
- [80] M.Morad, S.Dillon & J.Weiss : An acousto-optically steered laser scanning system for measurement of action potential spread in intact heart. /n: Optical Methods in CELL PHYSIOLOGY, pp211-226, ed. by P.Weer & B.M.Salzberg, Wiley, New York (1986)
- [81] 金山省一, 宮崎保光, 外山淳治: He-Neレーザー励起による心筋膜電位の分光特性, 信学技報, MBE85-57, pp85-90 (1985)
- [82] L.B.Cohen, R.D.Keynes & B. Hille : Light scattering and birefringence change during nerve activity. NATURE, Vol.218, pp438-441 (1968)
- [83] I.Tasaki, L.Carnay, R.Sandlin & A.Watanabe :Fluorescence changes during conduction in nerves stained with acridine orange. Science, Vol.163, pp683-685 (1969)
- [84] R.K.Gupta, B.M.Salzberg, A.Grinstead, L.B.Cohen, K.Kamino, S.Lesher, M.B. Boyle, A.S. Waggoner & C.H.Wang : Improvements in optical methods for measuring rapid changes in membrane potential. J. Membrane Biol. , Vol.58, pp123-137 (1981)
- [85] B.E.Wolf & A.S.Waggoner : Optical studies of the mechanism of membrane potential sensitivity of merocyanine 540. /n: Optical Methods in CELL PHYSIOLOGY, pp101-113, ed. by P.Weer & B.M.Salzberg, Wiley, New York (1986)

- [86] E.B.George, P.Nyirjesy, M.Basson, L.A.Ernst, P.R.Pratap, J.C.Freedman & A.S.Waggoner :Impermeant potential-sensitive oxonol dyes: I.evidence for an "On-Off" mechanism. J. Membrane Biol., Vol.103, pp245-253 (1988)
- [87] B.M.Salzberg, H.V.Davila & L.B.Cohen : Optical recording of impulses in individual neurones of an invertebrate central nervous system. NATURE, Vol.246, pp21-28 (1978)
- [88] L.M.Loew, G.W. Bonneville & J. Surow:Charge shift optical probes of membrane potential.theory. Biochem. ,Vol.17, No.19, pp4065-4071 (1978)
- [89] A.Grinstead, E.Lieke, R.D.Frostig, C.D.Gilbert & T.N.Wiesel : Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. NATURE, Vol.324, No.27, pp361-364 (1986)
- [90] D.Y.Ts'o, R.D.Frostig, E.E.Lieke & A.Grinstead:Functional organization of primate visual cortex revealed by high resolution optical imaging. Science, Vol.249, pp417-420 (1990)
- [91] L. B. Cohen & S. Lesher :Optical monitoring of membrane potential ;methods of multisite optical measurement. /n: Optical Methods in CELL PHYSIOLOGY, ed. By P.D.Weer & B.M. Salzberg, pp71-99, WILEY-INTERSCIENCE, New York (1986)
- [92] 応用物理学会光学懇話会編: 光集積回路. 朝倉書店 (1988)
- [93] N. Goto & Y. Miyazaki : Integrated optical multi-/demultiplexer using acoustooptic effect for multiwavelength optical communications. IEEE J. on selected areas in commun. Vol.8, No.6, pp1160-1168 (1990)
- [94] K. Hasegawa & Y. Miyazaki : Three-dimensional magneto-optic waveguide for integrated optics. The Institute of Electrical Engineers of Japan, Papers of Technical Meeting on Electromagnetic Theory OFSET'90, EMT90-151, pp67-74 (1990)
- [95] 和田充弘, 宮崎保光: Ndドープガーネット薄膜を用いた光導波路型増幅素子の基礎特性. 信学技報, MW90-147, pp13-18 (1991)
- [96] Y. Miyazaki & K. Taki : An analysis of isolation properties of mono-sectional optical isolators consisting of magneto-optic guide layers and substrates. The Trans. of the IEICE, E73, No.5, pp695-704 (1990)

- [97] 柴田和雄：分光測定入門. pp62-82, 共立出版 (1976)
- [98] 市村昭二：生物学のための光学的測定. pp3-41, 共立出版 (1973)
- [99] 杉森彰：有機光化学. pp4-30, 裳華房 (1991)
- [100] B.Katz著, 佐藤晶康監訳, 千葉元丞, 山田和廣訳 : 神経・筋・シナプス, 医歯薬出版 (1970)
- [101] R. Plonsey, D. G. Fleming : Bioelectric Phenomena. McGraw-Hill, New York (1969)
- [102] N. Ganapathy, J. W. Clark, Jr., O. B. Wilson & W. Giles : Forward and inverse potential field solutions for cardiac strands of cylindrical geometry. IEEE Trans. Biomed. Eng., Vol. BME-32, No. 8 (1985)
- [103] F. Bezanilla and J. Vergara : Fluorescence signals from skeletal muscle fibers. Biophys. Aspects Card. Muscle, pp229-254 (1978)
- [104] 大河原信, 北尾悌次郎, 平嶋恒亮, 松岡賢 : 色素ハンドブック. pp viii-X, 講談社サイエンティフィック (1986)
- [105] 柴田和雄：分光測定入門. pp105-125, 共立出版 (1976)
- [106] 関根隆光：螢光プローブ. /n: 螢光測定. 木下一彦, 御橋廣眞編, pp161-167, 学会出版センター, (1983)
- [107] 佐々木和夫：大脳皮質. /n: 新生理学上巻. 問田直幹, 内菌耕二, 伊藤正男, 富田忠雄編, pp522-550, 医学書院 (1960)
- [108] 山門誠：マウスのヒゲと大脳の樽形成. 生体の科学, 31巻6号, pp474-481 (1980)
- [109] 岩村吉晃：体性感覚. /n: 脳の科学 I. 中村嘉男, 酒田英夫編, pp200-214 朝倉 (1983)
- [110] C. Welker : Receptive fields of barrels in the somatosensory neocortex of rat. J. Comp. Neur., Vol. 166, pp173-190 (1976)
- [111] 松波謙一：運動の大脳皮質性制御. /n: 脳の科学 I. 中村嘉男, 酒田英夫編, pp272-287 朝倉 (1983)
- [112] 後藤昌義：心臓の生理. 南江堂 (1984)
- [113] 間瀬久康, 宮崎保光：光学的走査法による心筋活動電位の伝搬計測. 信学技報, MBE-90-82 pp15-20 (1990)
- [114] 大地陸男：心臓の構造, 心筋. /n: 生理学. 入来正, 外山敬介編, pp2-29, 文光堂 (1986)
- [115] 堀川宗之：心臓の電気現象. 東京電機大学出版局 (1981)

- [116] 宮崎保光：等価電荷鏡像法を用いた心電図逆方向問題の特性. 心電図, 4巻5号, pp634-635 (1984)
- [117] 宮崎保光：心筋組織の電気興奮. ME学会誌, 23巻7号, pp22-27 (1985)
- [118] A.M.Katz著, 多田道彦, 井上通敏, 阿部裕監訳：心臓生理学. 学会出版センタ. pp225-251 (1981)
- [119] 佐藤智夫, 宮崎保光, 口脇博治：興奮性細胞膜における膜電位の2波長同時計測. 日本レーザー医学会誌, 11巻9号, pp9-15 (1990)
- [120] 佐藤智夫, 宮崎保光, 口脇博治：可動生体組織の蛍光による活動電位の計測. 1990信学春季全大, D-184 (1990)
- [121] 宮崎保光, 佐藤智夫：光プローブ用色素の蛍光特性. 信学技報, OME90-58, pp49-54 (1991)
- [122] 岡崎正樹：銀塩写真. /n: 増感剤. 徳丸克己, 大河原信編, pp108-120 講談社サイエンティフィック (1987)
- [123] 時田澄男：カラーケミストリー. 丸善 (1982)
- [124] 大河原信, 北尾悌次郎, 平嶋恒亮, 松岡賢：色素ハンドブック. pp71-72, 講談社サイエンティフィック (1986)
- [125] 右衛門佐重雄：光生物学のための量子物理学序説. pp139-140, 共立出版 (1973)
- [126] 杉森彰：有機光化学. pp292-295 裳華房 (1991)
- [127] A. Hassner, D. Birnbaum & L.M. Loew : Charge-shift probes of membranepotential. synthesis. J. Org. chem., Vol. 49, pp2546-2551 (1984)
- [128] 石黒雄一, 宮崎保光：オキソノール系色素を用いた膜電位計測の分子軌道法による吸収・蛍光特性. 信学技報, MBE91-70 (1991)
- [129] 塩野悟, 中島道夫, 山田訓, 中子真美子, 前田満雄：アメフラシえら運動系の光学的多チャンネル測定. 第3回生体生理工学シンポジウム論文集, pp281-284 (1988)
- [130] K. Fukunishi, H. Uno, N. Murai : Spatio-temporal observation of guinea pig auditory cortex with optical recording. The 17th SEIRIKEN CONFERENCE on "Frontiers in Optical Neuroscience" and "Comparative Neurophysiology" ABSTRACTS pp12 (1992)

研究発表

<論文>

- 1) 佐藤 智夫, 宮崎 保光, 口脇 博治
脳組織の活動電位分布のレーザー光による光化学的計測
日本レーザー医学会誌, 第8巻3号, pp111-112 (1987)
- 2) 佐藤 智夫, 宮崎 保光, 口脇 博治
脳機能組織における活動電位のレーザー光プロービング
日本レーザー医学会誌, 第9巻3号, pp519-522 (1988)
- 3) 佐藤 智夫, 宮崎 保光, 口脇 博治
興奮性細胞膜における膜電位の2波長同時計測
日本レーザー医学会誌, 第11巻2号, pp9-15 (1990)
- 4) 佐藤 智夫, 宮崎 保光, 口脇 博治
膜電位感受性色素WW781を用いた膜電位のレーザ計測
医用電子と生体工学, 第30巻2号掲載予定
- 5) 間瀬 久康, 宮崎 保光, 佐藤 智夫
レーザ走査による心室活動電位の光プロービング
電子情報通信学会(投稿中)

<国際会議>

- 1) Tomoo SATO, Yasumitsu MIYAZAKI and Hiroji KUCHIWAKI
"Motion Artifact Removal for Optical Micro Cell-Probing of
Membrane Potential Measurement"
LOW POWER LASER IN MEDICINE '90 TOKYO
September 21-23 (1990)
Surgical and Medical LASERS Vol.3, No.3, pp144-145 (1990)
- 2) Tomoo SATO, Hisayasu MASE and Yasumitsu MIYAZAKI
"Multichannel Laser Probing for Active Membrane Potential
Measurement using Fluorescence Dye"
FAR EASTERN CONFERENCE ON MEDICAL AND BIOLOGICAL ENGINEERING 1990
October 11-13 (1990)
Proceedings of FAR EASTERN CONFERENCE ON MEDICAL AND BIOLOGICAL
ENGINEERING, pp122-123 (1990)
- 3) Yasumitsu MIYAZAKI and Tomoo SATO
"Optical Micro-Probing and Motion Artifact Removal for Action
Potential Measurement of Heart Muscle"
12th ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE IEEE
ENGINEERING in MEDICINE and BIOLOGY SOCIETY
November 1-4 (1990)
Proceedings of 12th ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE of THE IEEE
IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY SOCIETY, Vol.12, No.2,
pp658-659 (1990)

- 4) Yasumitsu MIYAZAKI and Tomoo SATO
"Optical micro-probing for action potential and ion channel
measurement in cardiac myocytes"
World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering
July 7-12 (1991)
Medical & Biological Engineering & Computing, Vol.29,
Supplement, pp1249 (1991)
- 5) Yasumitsu MIYAZAKI, Yuichi ISHIGURO and Tomoo SATO
"Optical probing of active membrane potential using lasers and
microoptics"
THE 17th SEIRIKEN CONFERENCE on "Frontiers in Optical Neuroscience"
and "Comparative Neurophysiology" March 3-7, 1992
ABSTRACTS, pp8 (1992)

<研究会>

- 1) 佐藤, 宮崎, 口脇: 脳組織の活動電位分布のレーザ光による光学的計測.
第2回生体・生理工学シンポジウム論文集pp69-72 (1987)
- 2) 佐藤, 宮崎, 口脇: レーザ光を用いた脳機能組織活動電位の光プロービング.
第3回生体・生理工学シンポジウム論文集pp353-356 (1988)
- 3) 宮崎, 佐藤, 口脇: レーザ光を用いた活動電位の光学的多波長同時計測装置
の開発. 信学技報, MBE88-82, PP11-16 (1988)
- 4) 佐藤, 宮崎, 口脇: 光学的多波長同時計測による生体細胞活動電位の計測.
第4回生体・生理工学シンポジウム論文集pp315-318 (1989)
- 5) 佐藤, 宮崎, 口脇: 生体組織における膜電位の蛍光による多波長同時計測.
信学技報, MBE89-94, PP47-52 (1989)
- 6) 佐藤, 宮崎, 口脇: 有機色素の蛍光放射を用いた膜電位の光学的計測.
信学技報, MBE90-80, pp 1-6 (1990)
- 7) 宮崎, 佐藤: 光プローブ用色素の蛍光特性.
信学技報, OME90-58, pp49-54 (1990)

<学会発表>

- 1) 佐藤, 宮崎, 口脇: レーザ光を用いた脳組織の活動電位に関する光学的測定.
昭和62年信学・総合全国大, No.2537 (1987)
- 2) 佐藤, 宮崎, 口脇: 脳組織の活動電位分布のレーザ光による光化学的計測.
第一回日本レーザ医学会東海地方会(名古屋)(6/7/87)
- 3) 佐藤, 宮崎, 口脇: 光化学的手法を用いた脳組織における活動電位分布の計測.
昭和62年東海連大, No.535 (1987)
- 4) 佐藤, 宮崎, 口脇: 脳組織における活動電位のレーザ光を用いた光化学的計測.
昭和62年信学半導体・材料全大, No.265 (1987)
- 5) 佐藤, 宮崎, 口脇: 脳機能組織における活動電位の光化学的計測.
昭和62年日本ME学会東海支部学術集会(名古屋)(10/31/87)
- 6) 佐藤, 宮崎, 口脇: 脳組織における活動電位分布のレーザ光を用いた光化学
的計測. 昭和63年信学会春期全国大会, D-21 (1988)

- 7) 佐藤, 宮崎, 口脇: 脳機能組織に関する活動電位の光細胞プロービング.
第2回日本レーザー医学会東海地方会(名古屋)(6/4/88)
- 8) 佐藤, 宮崎, 口脇: 脳機能組織における活動電位の光細胞プロービング.
昭和63年信学会秋季全国大会, D-29 (1988)
- 9) 佐藤, 宮崎, 口脇: 大脳皮質活動電位のレーザー光を用いた光化学的計測.
昭和63年東海連大, No. 582 (1988)
- 10) 佐藤, 宮崎, 口脇: 大脳皮質活動電位のレーザー光プロービング.
昭和63年日本M E学会東海支部学術集会(名古屋)(10/15/88)
- 11) 佐藤, 宮崎, 口脇: 光学的多波長同時計測による活動電位計測装置の開発.
89年信学会春期全国大会, D-44 (1989)
- 12) 佐藤, 宮崎, 口脇: 動きを伴う生体組織における光学的膜電位計測.
第3回日本レーザー医学会東海地方会(名古屋)(7/8/89)
- 13) 佐藤, 宮崎, 口脇: 光学的多波長同時計測による心筋活動電位の計測.
89年信学秋季全国大会, D-11 (1989)
- 14) 佐藤, 宮崎, 口脇: 心筋活動電位の光学的多波長同時計測.
平成元年東海連大, No575 (1989)
- 15) 佐藤, 宮崎, 口脇: 可動生体組織の蛍光による活動膜電位の計測.
90年信学春期全国大会, D-184 (1990)
- 16) 佐藤, 宮崎, 口脇: 動きを伴う生体組織における多波長による光学的膜電位計測. 医用電子と生体工学, 28巻特別号, pp227 (1990)
- 17) 佐藤, 宮崎, 口脇: オキソノール系有機色素の膜電位感受性機構の検討.
第4回日本レーザー医学会東海地方会(名古屋)(7/21/90)
- 18) 佐藤, 宮崎, 口脇: 膜電位感受性色素色素WW781の細胞膜依存性.
90年信学秋季全国大会, D-134 (1990)
- 20) 佐藤, 宮崎, 口脇: オキソノール系膜電位感受性色素の分光特性.
90年東海連大, No596 (1990)
- 21) 佐藤, 宮崎, 口脇: オキソノール系膜電位感受性色素における光学特性の興奮性膜依存性, 平成2年度日本M E学会東海支部学術集会(名古屋)
(10/27/88)
- 22) 佐藤, 宮崎, 口脇: 膜電位感受性色素の光化学特性の実験的検討.
日本レーザー医学会誌, 11巻, 大会論文集, (印刷中)
- 23) 佐藤, 宮崎, 口脇: 膜電位感受性色素色素WW781の分光特性.
91年信学春期全国大会, D-208 (1991)
- 24) 佐藤, 宮崎, 口脇: 光細胞プロービングによる心筋活動電位とイオンチャンネル計測. 医用電子と生体工学, 29巻特別号, pp261 (1990)
- 25) 佐藤, 宮崎, 口脇: オキソノール系膜電位感受性色素を用いた活動電位の光計測. 第5回日本レーザー医学会東海地方会(名古屋)(7/13/90)
- 26) 佐藤, 宮崎, 口脇: コイ心室における膜電位感受性色素の応答特性.
信学'91秋大, D-76 (1991)
- 27) 佐藤, 宮崎, 口脇: 光学的膜電位計測における受光系応答速度の特性
平成3年度日本M E学会東海支部学術集会(名古屋)(10/26/91)

