

シリーズ「生理学者のための分子モニタリング技術講座」

膜電位感受性色素をもちいた計測と解析法

神野耕太郎・佐藤容子・佐藤勝重・持田 啓

(東京医科歯科大学医学部・生理学第二講座)

§ 1. はじめに

1970年代から L. B. Cohen のグループを中心にして開発されてきた膜電位感受性色素 (voltage-sensitive dyes) をもちいる膜電位活動の光学的計測/イメージング法は、最近4~5年の間にめざましい発展をみせ、計測システムの市販化にもなっており、現在ではすでに神経科学を中心として心臓生理学や細胞生理学の領域で popular な計測法のひとつになってきている。従来、活動電位など、細胞膜の電位変化は、1940年代後半に Hodgkin と Huxley によってヤリイカ巨大神経軸索の興奮現象の解析にもちいられた細胞内電極 (voltage wires) や、Ling と Gerard (1949) によって開発され導入されたガラス管微小電極を細胞内に刺入して測定するのが通常の方法である。しかしながら、計測/実験方法で一般的に云えることであるが、これらの電極法にもおのずと適用限界がある。膜電位感受性色素をもちいて膜電位変化を記録するいわゆる光学的計測法は、電極法の適用限界を補完するというかたちで発展してきた。電極法と光学的方法は原理的にはちがっており、微小電極法が電気化学を基礎としているのに対して、光学的方法は膜電位に感受性をもつ色素を膜に吸着させて、膜電位の変化をその色素の光学的シグナルに変換して検出するという光量子化学的反応を基礎にしている。

この膜電位の光学的計測法は、1950年代初期における Hodgkin と Huxley の Na 説に基づく神経興奮の現象論的定式化のあとをうけて、興奮の分子レベルでのメカニズム、あるいは、興奮にともなう膜高分子の conformational changes を解析するために行われた実験から派

生的に開発されて発展してきたものである [1-3]。このことは、30年以上も経過したいま、忘れ去られているように見えるが、その開発の歴史のなかには今なお教訓的なことが数多くふくまれている。

本稿では膜電位感受性色素をもちいた膜電位の光学的計測法/イメージング法について、その開発の背景にふれながら、計測法、解析法とそれらの原理および適用や問題点について、physiology のできるだけ広い範囲から実測例をあげてまとめてみることにする。

§ 2. 膜電位感受性色素

細胞膜に吸着したり、細胞内にとり込まれたりする色素の多くは、その程度に大なり小なりの差はあるが、細胞膜の電位に依存して光学的 (吸光とか蛍光の) 性状が変化することが、スクリーニングの過程で見出されている。したがって、膜電位感受性色素 (voltage-sensitive dyes) というのは、特に厳密に定義されているわけではなく、便宜上、「膜電位変化に対して比較的大きいレスポンスを示す色素」というぐらいの意味でもちいられている。

膜電位変化に対して大きな感受性を示す色素は、まず、L. B. Cohen のグループによって、2000種類にも及ぶ色素が、ヤリイカ巨大神経軸索をもちいて、膜電位固定法と光学的計測を組み合わせた方法で (後述) スクリーニングされ、その中から選び出された [4-7]。これが、膜電位の光学的計測法開発の最初のステップである。[この過程で、日本感光色素研究所 (現 林原生物化学研究所・岡山市) が合成に協力してくれた。] 色素のスクリーニングが行われた段階では、色素の構造と膜電位感受性との関係は全

く不明であり、どのような色素が膜電位に対して感受性が大きいのか、また感受性のメカニズムはどうなっているのかというようなことを理論的に推測できる状態ではなかったため、スクリーニングは経験的に、かつ枚挙的になされた。そのような過程でメロシアニン(merocyanine)系、オキシノール(oxonol)系、スタイリル(styryl)系の色素が選出され、さらに、新しいいくつかの類似化合物が合成されて[e. g. 8 a], 「膜電位感受性色素」という名称が定着してきている。[はじめのころは, potential probes とか potential dyes というような呼称がもちいられたこともある.] なお, メロシアニン系には, メロシアニンのほかメロシアニン・オキサゾロン系(merocyanine-oxazolone dye), メロシアニン・ローダニン系(merocyanine-rhodanine dyes)がある。図1に一般にもちいられている代表的な膜電位感受性色素を示した。[ここでNKの記号がついている色素は林原生物化学研究所/感光色素研究所から入手できる.]

膜電位感受性色素の分類: 膜電位依存性の光学的変化を示す色素は、まず、①膜電位変化に応じて迅速な変化を示す色素(fast-response dyes)と、②比較的ゆっくりした応答を示す色素(slow-response dyes)の2つのカテゴリーに分類される。これと対応づけて、fast-response dyesの光学的変化を“fast signals”, slow-response dyesの変化を“redistribution signals”と呼ぶこともある。

メロシアニン系色素やオキシノール系色素の一部、スタイリル系色素はfast-response dyesに属しており、ニューロンや心筋細胞における活動電位のような一過性の迅速な膜電位変化の検出にもちいられている。一方、シアニン系色素やオキソール系色素の一部がslow-response dyeに属し、非興奮性細胞のsuspensionなどで、かなりゆっくりした膜電位変化をfollowするのに適している。なお、一般的に、fast-response dyesは膜に対して非透過性であり、slow-response dyesは膜を透過する。こ

れに応じて、光学的変化のメカニズムも両者ではちがっている[9-11]。本稿では、fast-response dyesを主題にして述べる。

光学シグナルにはどのような種類があるか：現在測定される光学シグナルは、主として、吸光シグナルと蛍光シグナルであるが、実験の条件や測定対象によっては複屈折性(birefringence)、二色性(dichroism)の測定も有効である[これについては後でも述べる]。これらの中からどれを選ぶかは測定する標本の種類に応じて決められる。また、それに際してもちいる色素も選択する必要がある。したがって、膜電位感受性色素はカルシウムイオン指示薬のように細胞の種類を問わず一意的に使用できるものではないことに注意する必要がある。すなわち、「あの細胞にこの色素が有効であるから、この細胞にもこの色素を用いてよい」ということにはならない。

ここで、膜電位感受性色素の化学的特性について少しばかりふれておく[12]。まず、化学構造と色に関しては、メチル基が長くなるほど長波長域に吸収帯があることはよく知られているとおりである。また、メチル基が長くなるにしたがい、一般的には他の物質に吸着しやすくなり、吸着したときの吸光、蛍光の変化量が大きくなる傾向がある。したがって、膜電位感受性色素では、メチル基が長いほうがよいといえる。じっさい、メロシアニン・ローダニン系色素でこれは示されている。しかしながら、メチル基が長くなると、色素の親水性が減少し、水に対する溶解度が小さくなり、かつ安定性が低下し退色が速くなる傾向を示す。また、合成も難しくなる。

fast-response dyesのなかでオキシノール系色素、スタイリル系色素は種類は少ないが、メロシアニン系色素には多くの種類がある。例えば、われわれの実験室でよくもちいているメロシアニン・ローダニン系色素では、その構造の中の、左右の複素環にはそれぞれ多くの種類があり、核の置換基、窒素原子に結合している基、メチル基の数を変えたときの組み合わせを

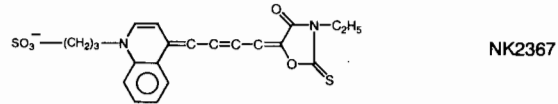
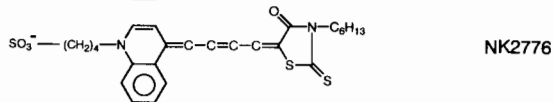
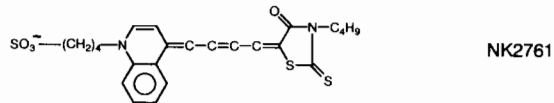
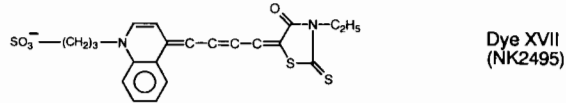
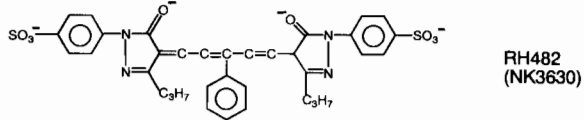
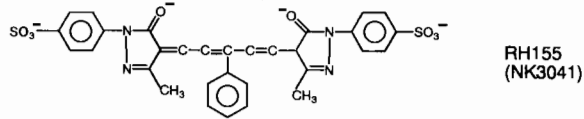
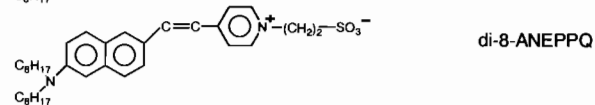
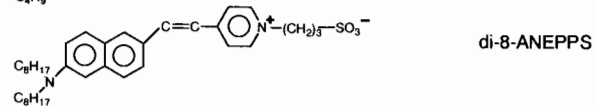
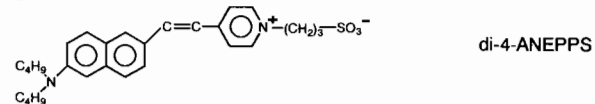
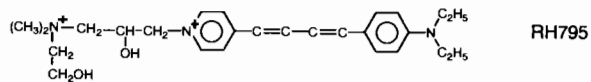
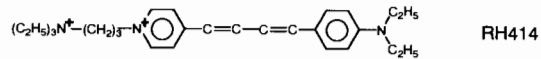
Merocyanine-Oxazolone Dye (absorption)**Merocyanine-Rhodanine Dyes (absorption)****Oxoniol Dyes (absorption / fluorescence)****Styryl Dyes (fluorescence)**

図 1. 一般的によくもちいられている膜電位感受性色素 (fast response-dyes)

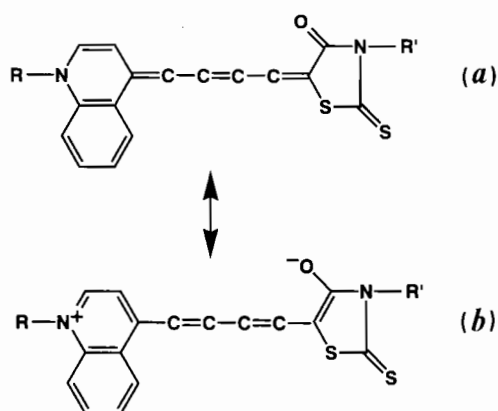


図2. メロシアニン・ローダニン系色素(NK 2761)の極限構造

考えると莫大な数になる。

メロシアニン・ローダニン系色素(NK 2761)を例にとって考えてみると、この色素は図2に示すような2つの極限構造をとることができる。メロシアニン系色素では非イオン性(a)の構造が主体である。低(非)極性溶媒中では色素はほとんど(a)の構造であるが、極性溶媒中ではその極性(誘電率)が大きくなると、イオン型である(b)の構造が安定化されるため、この効果が現れて色素の吸収スペクトルが変化する。このさい、波長スペクトルは、短波長側へシフト

トするか、あるいは長波長側へシフトする。そのシフトの大きさは、両端に結合している複素環相互の電気的性質によって変わるが、メロシアニン系色素の中には溶媒の極性プローブとしてもちいることができるほど溶媒の極性に敏感なものがあるのはこの構造のためである。さらに、この性質は色素が存在するまわりの環境(溶媒の極性、吸着する相手の電気的性質や疎水性環境)の影響を受けてスペクトルを大きく変化させる原因になっており、膜電位感受性色素としての特性もここから生じていることが推察される。

§ 3. 膜電位と光学シグナルの対応性

膜電位と色素の光学的変化との対応関係は、膜電位感受性色素の探索の過程で、ヤリイカの巨大神経軸索の膜電位固定(voltage-clamp)とそれにとりあう吸着色素の吸光、蛍光、複屈折性、二色性の変化を調べることによって検討された[4-7]。

図3に、メロシアニン系色素(Dye I)とメロシアニン・ローダニン系色素(Dye XVII)を吸着させたヤリイカ巨大神経軸索で静止電位から過分極側ならびに脱分極側の50 mVのレベル

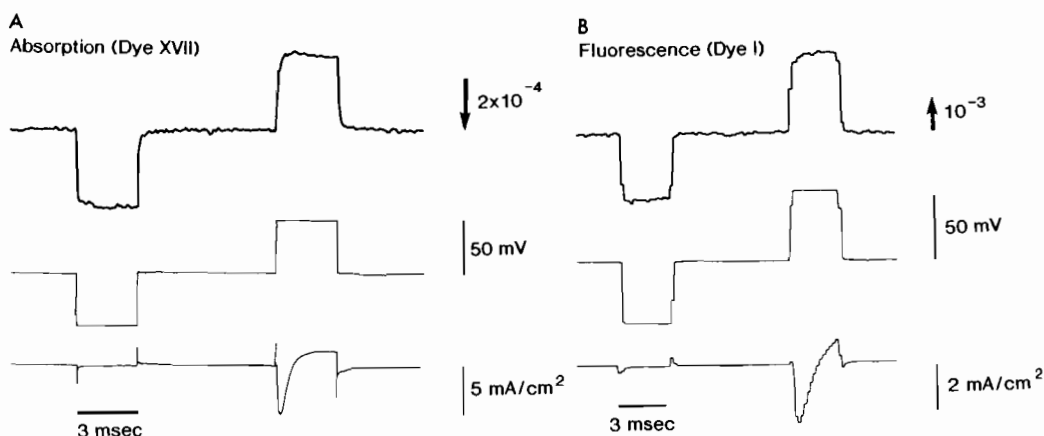


図3. A. メロシアニン・ローダニン系色素(Dye XVII)で染色したヤリイカ巨大神経軸索の膜電位固定にともなう吸光変化。測定波長 750nm. B. メロシアニン系色素(Dye I/Merocyanine 540)で染色したヤリイカ巨大神経軸索の膜電位固定にともなう蛍光変化。励起波長 570 nm, 蛍光波長 610 nm < [4,5].

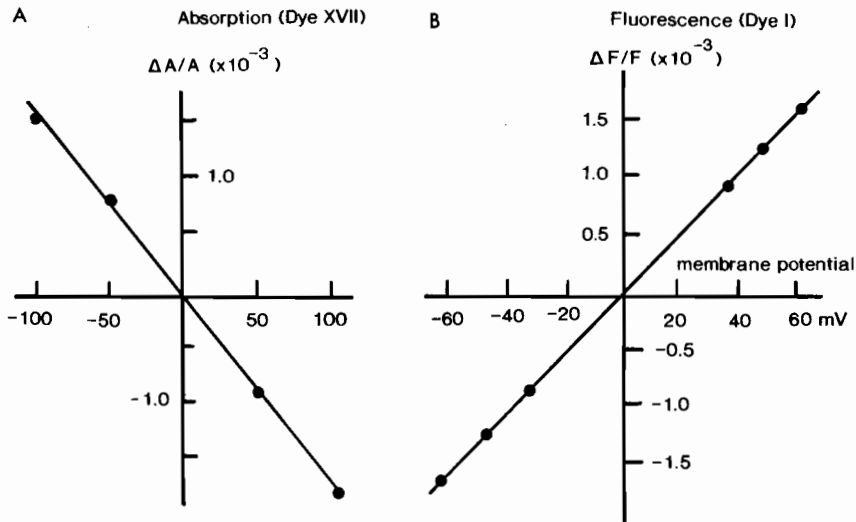


図4. メロシアニン・ローダニン系色素(Dye XVII/NK 2495)で染色したヤリイカ巨大神経軸索の吸光変化(A), およびメロシアニン系色素(Dye I)で染色したヤリイカ巨大神経軸索の蛍光変化(B)と膜電位の関係. 原点は静止電位に対応する[4,5].

に膜電位を固定し, それにともなう吸光(A), あるいは蛍光(B)の変化を同時記録した例を示す. この記録で, 上段は吸光あるいは蛍光変化, 中段は膜電位, 下段は膜電流である. この記録からわかるように, 吸光, 蛍光ともに, 膜電位に応じて変化しているが, 膜電流との対応性はみられない. ということは, 吸光や蛍光の変化は膜電位の変化にともなう二次的变化であり, 膜のコンダクタンスの変化とは関係がないことを示している. ここで, 矢印の向きは吸光, 蛍光ともに増大の方向を表している. したがって, メロシアニン系色素(Dye I)の蛍光は膜電位の過分極にともなって減少し, 脱分極に応じて増大していることがわかる. 一方, メロシアニン・ローダニン系色素(Dye XVII)の吸光は過分極で増大, 脱分極で減少する.

以上のような膜電位固定による実験で得られた光学シグナルの大きさを, 膜電位に対してプロットしたのが図4である[4,5]. このプロットからわかるように, 静止電位から過分極側ならびに脱分極側へ ± 100 mV 以内の範囲(すなわち, 生理的範囲)では膜電位と蛍光, 吸光, 複屈折性, 二色性の変化は近似的に直線関係で

対応づけられる. 一般に, 光学的変化(シグナル)の大きさは, 背景強度に対する蛍光や吸光強度の変化の比(fractional change: $\Delta F/F$; $\Delta A/A$)として表される. [通常, 光学的シグナルのsizeとはこのfractional changeのことである.] なお, 図5Aに, メロシアニン・オキサゾロン系色素(Dye I)の複屈折性の変化についての記録を示し, 図5Bにメロシアニン・ローダニン系色素(Dye XVII)の複屈折性と膜電位の関係を示す[5,6].

このような膜電位と光学変化の fractional change の間の直線関係はほとんどすべての膜電位感受性色素で成立することがわかっており, これが光学的膜電位計測の(準)定量性の拠りどころとなっている. さらに, この直線関係は心筋細胞でも成立することが示されている[13].

吸光度の変化は通常, 測定対象とする標本に対する透過光の変化として測定される. したがって, 透過光の変化を吸光変化に変換しなければならないが, 次の簡便式をもちいて吸光変化を求めることができる[5].

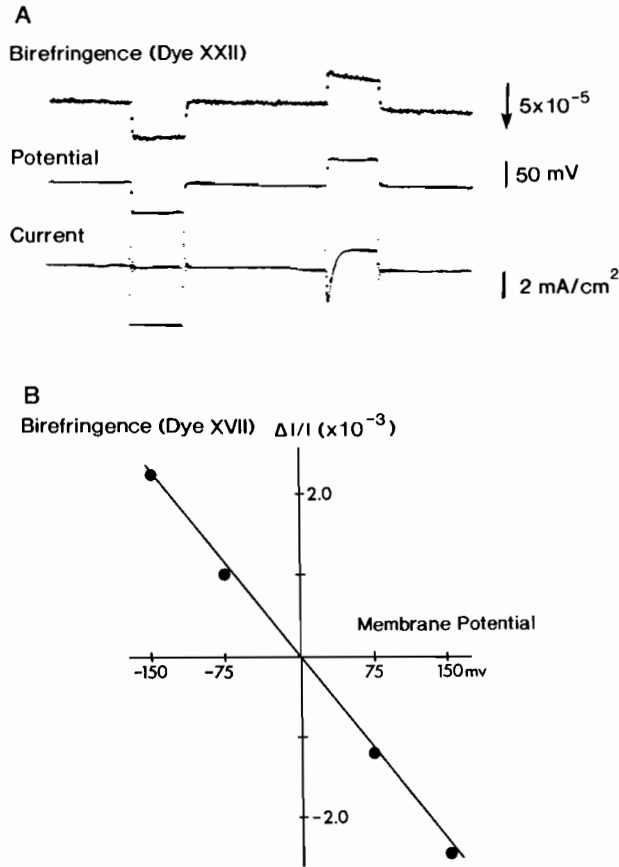


図5. メロシアニン・ローダニン系色素 (Dye XXII) で染色したヤリイカ巨大神経軸索の膜電位固定にともなう複屈折性の変化(A), および膜電位と複屈折性変化の関係(B). 原点は静止電位. 測定波長は 720 nm [5,6].

$$\Delta A/A =$$

$$-\Delta T / (T_{\text{before}} - T_{\text{after staining}}) \quad (1)$$

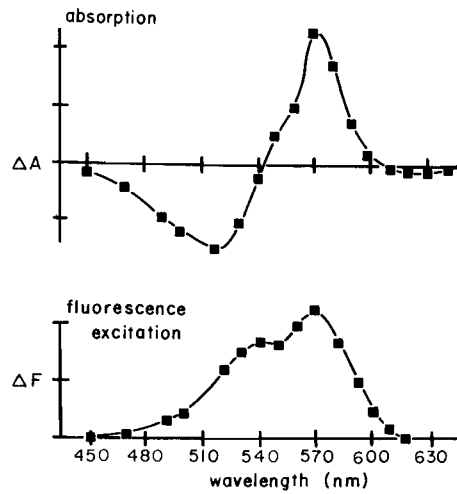
ここで ΔA は吸光変化, ΔT は透過光強度の変化, A は吸光の背景強度, T_{before} , $T_{\text{after staining}}$ はそれぞれ染色前後における透過光の背景光強度を表す.

§ 4. 光学シグナルの波長スペクトル

膜電位変化にともなう光学変化(シグナル)は, 当然, 入射光の波長に依存して変化する. それは“action spectrum”と呼ばれ, 色素の種類によって異なるスペクトルを示す. 動物や細胞の種類によっても微妙な違いがみられる [e.

g. 14]. したがって, 使用する色素については, 測定する標本ごとに, action spectrum を調べて, 最適波長を決めることが必要となる. 図6 A に, Dye I の吸光, および蛍光の action spectra [5], 図6 B に Dye XVII の吸光, 偏光, 二色性, 複屈折性の action spectra [5] をまとめて示した. この図6 B でみられるように, 吸光シグナル, 偏光性シグナル, 二色性シグナル, 複屈折性シグナルの action spectrum は異なったパターンを示す. このような action spectra の特性を利用すれば, 膜における色素の配列状態とか神経組織内における活動ニューロンの配列パターンなどについていろいろな情報が得られる可能性がある(未発表データ).

A. Dye I



B. Dye XVII

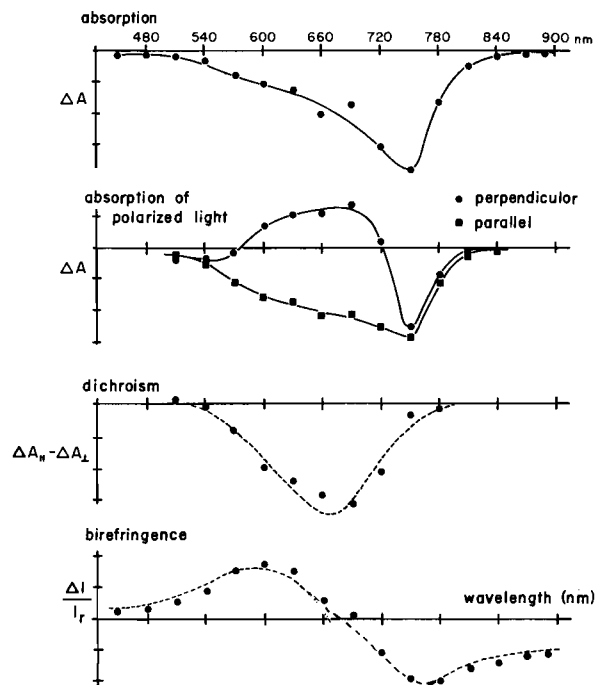


図6. A. Dye I の吸光と蛍光変化の波長スペクトルの比較. B. Dye XVII (NK 2495) の吸光, 偏光, 二色性, 複屈折性変化の波長スペクトルの比較[5].

これらの action spectra は生理的食塩水(あるいは水)や、エタノールに溶かしたときの色素の波長スペクトルとは一致しない。したがって、色素溶液の波長スペクトルから最適な波長を求めることはできないことに注意する必要がある。

§ 5. 膜電位感受性色素の選別基準

ここで、膜電位感受性色素の選別基準をまとめておく。図1にリストアップした色素が、膜電位感受性色素として選出されるまでには、多くのテストがくり返され、さらに、膜電位固定法をもちいたテストの結果に基づいて、合成と改良が重ねられてきた。その過程で、次のようなことがらが検討された[e. g. 15].

- ①背景光に対する光学的变化ができるだけ大きい：すなわち fractional change が大きい；
- ②信号対雑音比が大きい；
- ③細胞機能に対する毒性や薬理作用、さらに、光化学的(photodynamic)毒性ができるだけ小さい；
- ④色素が退色しにくい：すなわち退色時間ができるだけ長い；
- ⑤活動電位のような一過性の電位変化をモニターするために膜電位変化に対する応答時間(時間定数)が短い；
- ⑥できるだけ低濃度で使用できる。

現在用いられている色素の fractional change は $10^{-4} \sim 10^{-3}$ オーダーのものが多いが、蛍光では 10^{-2} ぐらいの色素もある。fractional change に加えて重要な因子は信号対雑音比であるが、これについては §9 で詳しくとりあげることにする。通常用いられている fast-response dyes としては膜電位に対する応答時間が $5.0 \mu\text{sec}$ 以下であり、これは活動電位をじゅうぶん follow できる時間分解能である。

毒性と退色：膜電位感受性色素をもちいるとき、それが細胞に与える毒性や薬理作用はかなり serious な問題となる。毒性には色素そのものが内在的にもっている毒性と、色素が光の照

射を受けることによって生じる光化学的(photodynamic)毒性がある。毒性は channels, receptors, 代謝など、いろいろな機能について個別的にチェックしなければならないが、電位活動だけを問題とする場合はシグナルが発現するか否かでその毒性の有無を一応知ることは出来る。光化学的毒性は、膜電位感受性色素のスクリーニングでは、膜電位固定したときの内向きの Na^+ 電流が減衰するはやさ(時間)を調べることによってきびしくテストされた。光化学的毒性の強い色素の場合、光照射をうけない状態では内向き電流に変化はみられないが、光を照射した瞬間から、急速に減少していくのがみられる[5]。このような光化学的毒性を示す典型的な色素は Merocyanine 540 (Dye I) であるが、これは一回目の刺激で誘発されるシグナルの検出にはもちいられるが、くり返し実験には向かないということになる。またメロシアン・オキサゾロン系色素(NK 2367)は不安定で退色時間が短い、膜電位に対する応答時間が他の色素に比べて短い($< 2 \mu\text{sec}$)という長所がある[16]。これらの例でみられるように、上記の条件をすべて満足する色素を探し出すことは難しいので、各々の色素がもつ長所を考慮して、測定の目的に応じて適当な色素を選択することが必要になる。

測定対象とする標本の染色は、通常、色素($0.1 \sim 0.5 \text{ mg/ml}$)を溶かした生理的食塩水に標本を5~30分間浸したあと、色素をふくまない生理的食塩水で置き換えるだけでよい。溶液中の色素濃度が大きいと浸透圧のため細胞が収縮する可能性がある、出来るだけ色素の濃度は低い方がよい。生理的食塩水に溶け難い色素では界面活性剤、Pluoronic F-127 (high molecular-weight surfactant polyol)を加えることによって溶けやすくなることもある[5]。

§ 6. ニューロンの活動電位とシナプス後電位

ここまでは、ヤリイカ巨大神経軸索について

膜電位固定法で得られた結果に基づいて、膜電位依存性の光学的変化の基本的性状について述べてきたが、活動電位やシナプス後電位にともなう光学的変化、すなわち、活動電位とシナプス後電位の光学的計測に話を移す。

活動電位：活動電位にともなう光学的変化もまた、まず、ヤリイカ巨大神経軸索で記録され、これがニューロン電位活動の光学的計測の端緒となった[4-6]。これに続いて、巨大フジツボやヒルなど無脊椎動物の神経節細胞で活動電位に対応する光学シグナルが記録され[17,18]、膜電位感受性色素が、ヤリイカ巨大神経軸索だけでなく単一の神経細胞にも適用できることが証明されたが、これは膜電位感受性色素の適用

範囲が広がるきっかけとなった。

無脊椎動物の神経節細胞は比較的大きく、ガラス管微小電極を細胞に刺入して記録される活動電位とそれにとともなう光学的変化が直接比較できる。図7は巨大フジツボの神経節細胞(supraesophageal ganglion cell/メロシアニン・オキサゾロン系色素(Dye XXII : NK 2367)で染色)における活動電位と吸光シグナルの同時記録例(A) [18]と、ヒルの神経節(segmental ganglion)の細胞(P cell : スタイリル系色素(RH 237)で染色)における活動電位と蛍光シグナルの同時記録例(B) [8a]である。なお、これらの図には電位活動の光学的計測システムの基本的構成を模式的に図示した。

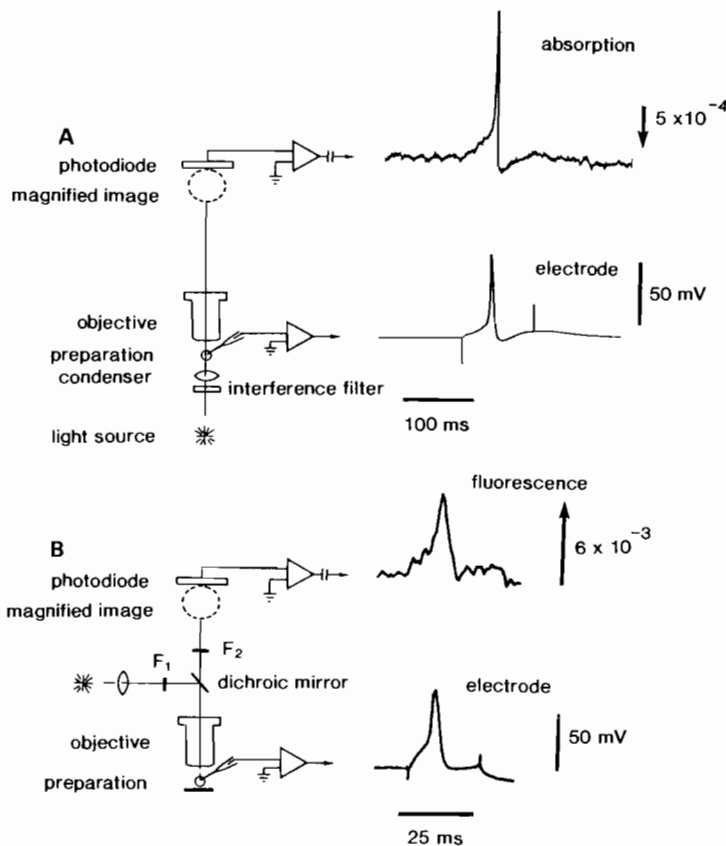


図7. メロシアニン・オキサゾロン系色素(NK 2367)で染色した、巨大フジツボの神経節細胞における、微小電極法による活動電位とそれにとともなう吸光変化の同時記録[18]。B. スタイリル系色素(RH 237)で染色したヒルの神経節細胞における活動電位と蛍光変化の同時記録[8a]。

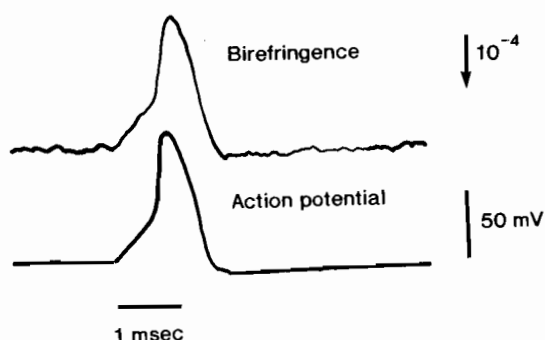


図8. Dye XXII (NK 2367)で染色したヤリイカ巨大神経軸索の活動電位と複屈折性変化の同時記録[6].

この記録例でみられるように、電気刺激によって誘発される吸光シグナル、蛍光シグナルはガラス管微小電極によって記録される活動電位と形状、時間経過ともにほとんど一致し、吸光シグナル、蛍光シグナルが活動電位をよくコピーしている。さらに、膜電位感受性色素の複屈折性シグナルや二色性シグナル(入射光の垂直成分、水平成分で得られるシグナル)も活動電位によく一致する。図8に複屈折性シグナルと活動電位の同時記録例を示す。

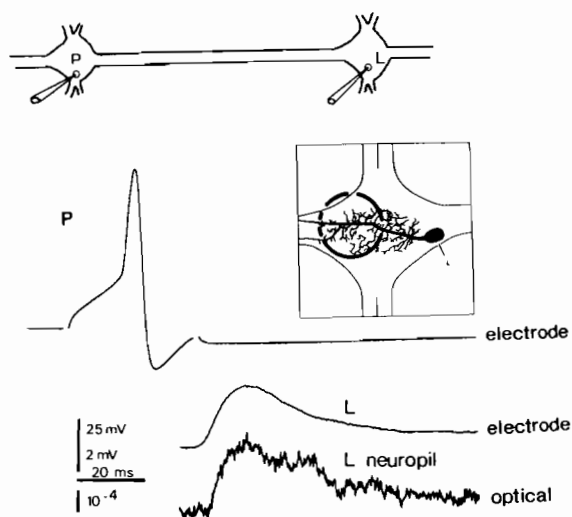


図9. ヒルの神経節内における運動ニューロン(RH 461で染色)の樹状突起から記録された興奮性シナプス後電位と吸光変化の同時記録。励起波長 546 nm, 蛍光波長 610 nm < [2b].

シナプス後電位：興奮性のシナプス後電位も膜電位感受性色素をもちいた光学的シグナルとして、巨大フジツボやヒルの神経節内の単一ニューロンから記録され、光学的計測法がシナプス機能の解析にも有効であることが示された。ヒルの神経節(segmental ganglion)内における運動ニューロン(L-motoneuron)の樹状突起から光学的に記録された例が図9である[8b].

§ 7. 心筋細胞の活動電位と光学シグナル

心筋細胞における活動電位の光学的計測は基本的には神経細胞の場合と同じであるが、心筋細胞の場合、活動電位と連関した収縮(拍動)由来の光散乱の変化(シグナル)が入り込んでくるのが問題になる。したがって、活動電位を光学的に記録するためには、拍動による光散乱の成分を極力抑えることが要求される。一方、活動電位依存性の吸光や蛍光シグナルと連関した拍動依存性の光散乱シグナルを記録することによって興奮-収縮連関を解析することもできる[19].

拍動による光学シグナルの成分を抑えるためには、通常外液の Ca^{2+} 濃度を低くする方法がとられているが、最近、収縮抑制剤(2,3-butanedione monoxime : BDM)を併用して測定する方法ももちいられている[20].

図10は、メロシアニン・ローダニン系色素(NK 2761)で染色した蛙の心房筋から、low- Ca^{2+} の Ringer 液中で活動電位(細胞内記録)と光学シグナルを同時記録して比較したものである[21]. 光学(透過光)シグナルは、700 nm と 610 nm (カエル心房筋においてメロシアニン・ローダニン系色素の action spectrum で吸光変化がゼロになる波長)で心房標本の5ヶ所から同時記録している(この方法については後述する). 波長 700 nm では、光学シグナル“a”は細胞内電極で記録した活動電位に同期したスパイク状のシグナルだけで、これは 610 nm ではほとんど消失している。記録“b”, “c”, “d”では、700 nm で記録された光学シグナルは活

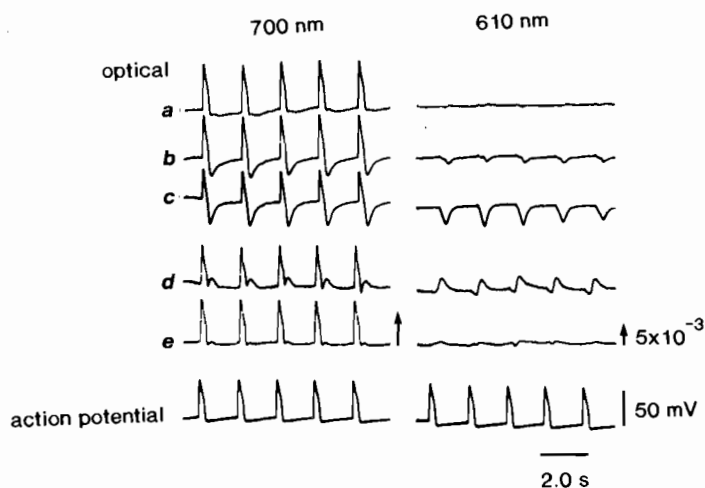


図10. NK 2761 で染色したカエル心房標本における自発性活動電位と透過光変化の同時記録. 測定波長 700 nm および 610 nm [21].

動電位に同期したスパイク状のシグナル(上向き)とそれに続く, *b*, *c*では下向き, *d*では上向きのシグナルの2つ(第一成分, 第二成分と呼ぶことにする)の成分から成り立っており, 610 nm では第一成分は消失し, 第二成分だけが記録されている. 活動電位との比較から, 上向きのスパイク状の第一成分のシグナルは活動電位に対応する吸光変化であり, 第二成分のシ

グナルは収縮(拍動)に起因した光散乱の変化であることがわかる. この光散乱変化の方向は収縮(拍動)の大きさや一個の photodiode の受光領域における収縮のトポロジカルな性状によって変動する.

心電活動は蛍光法によっても計測されているが, 吸光シグナルよりも蛍光シグナルの方が大きい fractional change が得られる傾向がある.

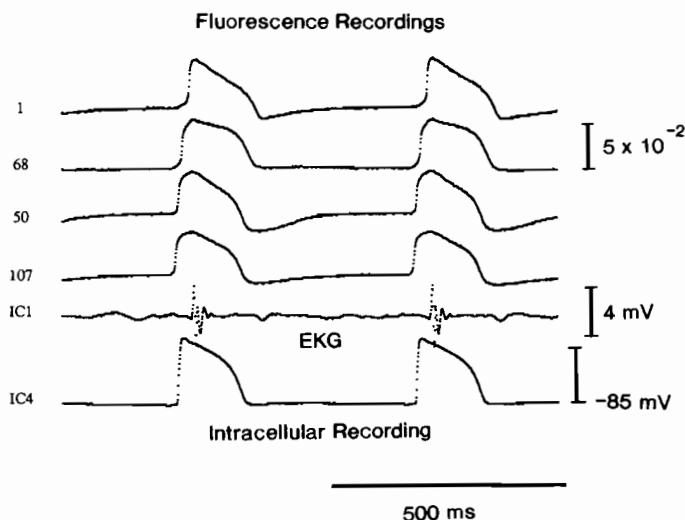


図11. スタイリル系色素(di-4-ANEPPS)で染色したモルモット心室筋の活動電位, 心電図, 蛍光変化の同時記録[22a].

図11は Langendorff 灌流でモルモット右心室をスタイリル系色素(di-4-ANEPPS)で染色し、自発性活動電位の細胞内記録、心電図、および蛍光シグナルの記録を同時に行った例である[22a]。この記録でも、細胞内電極によって記録された活動電位と蛍光シグナルの時間経過および形状がよく一致していることが示されている。なお、この計測は通常の Ringer 液で行われているにもかかわらず、拍動による artifact が無視できるほど小さい。これについては §14でまた述べることにする。

§ 8. 骨格筋横行小管の膜電位変化

骨格筋線維(skeletal muscle fiber)における光学計測は、興奮-収縮連関に関与する横行小管(transverse tubular system: T-system)膜における電位変化を検出するためにもちいられている。微小電極をもちいて T-system の電位変化を記録することは技術的に不可能である。そのため、形質膜(表面膜)に発生した活動電位が T-system に伝播することは間接的な実験で示唆されていながらも、T-system の膜電位変化は直接的には測定されていなかった。それは、膜電位感受性色素をもちいてはじめて記録された。図12は、表面膜における細胞内電極による活動電位とメロシアニン・ローダニン系色素(Dye XVII/NK 2495)をもちいた T-system の膜

電位の光学シグナルを同時記録した例である[23]。表面膜の活動電位は刺激後 0.53 ms でピークに達しているが、それに続く T-system の活動電位に対応する吸光シグナルは表面膜の活動電位にやや遅れて発生し、1.07 ms でピークに達していることがわかる。表面膜の活動電位と吸光シグナルのピークの時間差は活動電位が表面膜から T-system へ伝わる時間に対応する。

さらに、興奮-収縮連関の過程で、T-system における電荷移動(charge movement [24,25])と T-system の膜電位との関係が膜電位感受性色素をもちいて調べられた[26]。図13は表面膜の膜電位を 0, -20, -30, -40, -60 mV のレベルに固定して、それにともなう T-system の膜電位をメロシアニン・ローダニン系色素(NK 2495)の吸光シグナル(右のトレース)として記録し、それと電荷移動(charge movements: 左のトレース)を比較したものである。図13Bは固定された表面膜の膜電位に対して T-system の吸光変化と電荷移動量, $Q/Q_{\max}$ をプロットしたものである。ここで、電荷移動量 $Q/Q_{\max}$ は、Boltzmann の式を用いて次のように表される。

$$Q/Q_{\max} = 1 / \{ 1 + \exp(V_{\text{mid}} - V) / k \} \quad (2)$$

V は表面膜の膜電位, V_{mid} (in mV) は電荷が

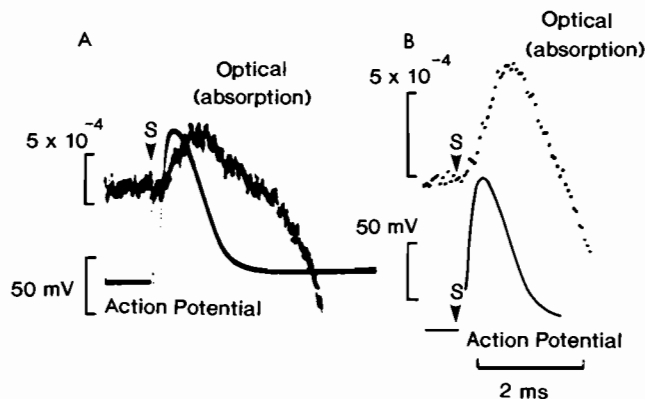


図12. メロシアニン・ローダニン系色素(Dye XVII/NK 2495)で染色した骨格筋の T-system から、吸光シグナルとして記録された活動電位。Aは single sweep で記録。B は 4 回の trials を加算平均して記録[23]。

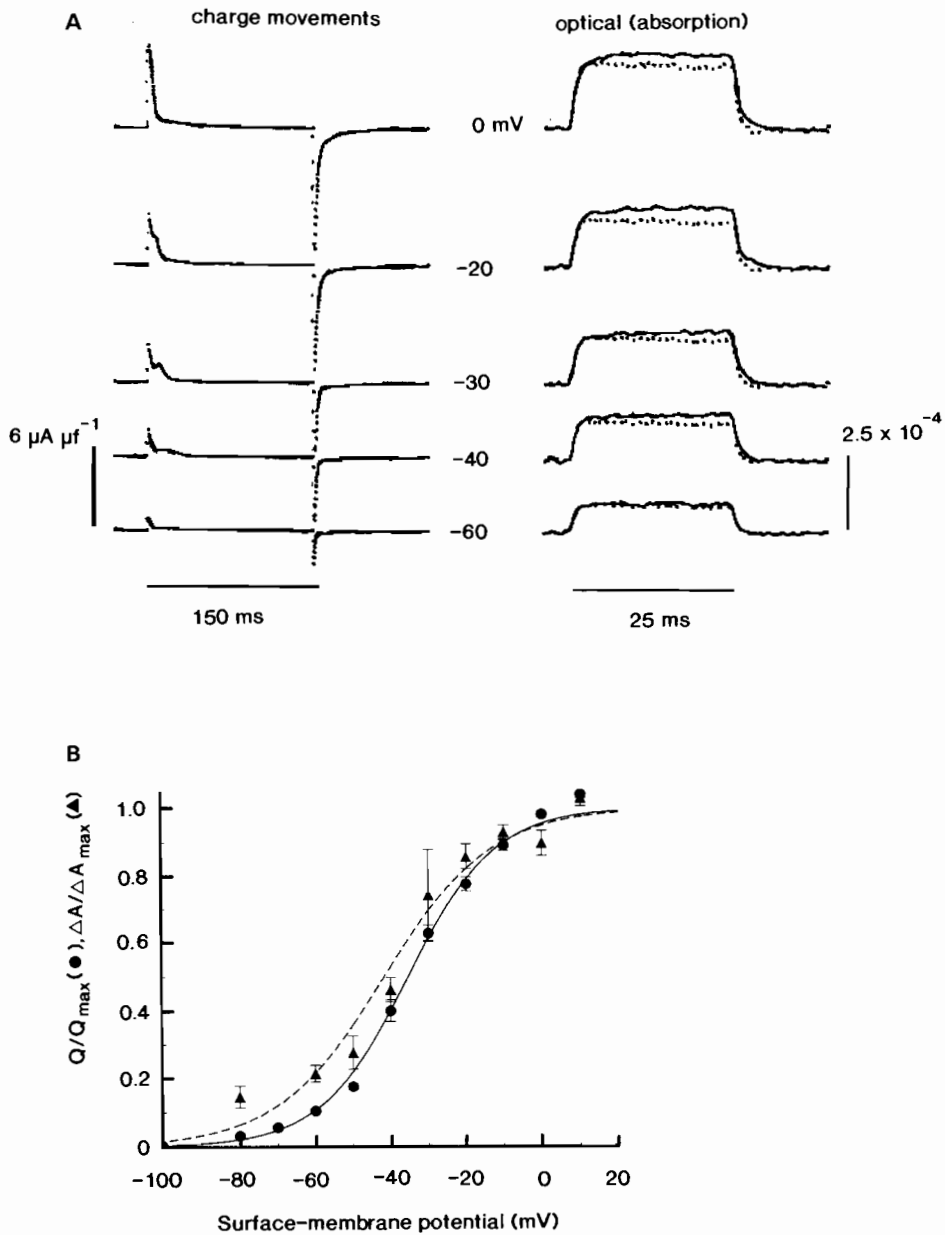


図13. A. 骨格筋の電荷移動と光学的(吸光)シグナルとして記録した T-system における電位変化との関係. 表面膜を膜電位固定して記録. B. 表面膜電位と電荷移動量および T-system における吸光変化(電位変化に対応)との関係[26].

50%だけ移動したときの膜電位, k は傾斜を表すパラメータ (slope constant) である.

この実験で, 表面膜の膜電位と T-system の膜電位の関係は S 字状曲線で, 非線形性を示し

ている. さらに, T-system における膜電位の変化と電荷移動量 (charge movement) は平行していることがよく示されている. さらにこのグラフから, T-system の膜電位と電荷移動の関

係も非線形性であることがよみとれる。膜電位感受性色素をもちいたこの実験によって表面膜の膜電位変化、T-systemでの膜電位変化および charge movement 間の定量的関係が捉えられたことは光学的計測の新しい適用として注目してよい。

§ 9. 信号対雑音比

膜電位変化を光学的シグナルに変換して記録する場合、信号対雑音比(signal-to-noise ratio: S/N 比)は深刻な問題となる。一般に、光学計測は noise と artifact との戦いであるといわれる所以でもある。光学計測がやや popular な方法となった現在、シグナルの波長依存性や S/N 比に注意を払わない傾向がしばしばみられるが、これは得られた imaging やデータの解析に信頼性を欠く結果を招きかねないし、また計測に緊張感を感じさせないことにもなるので注意しなければならない。

じっさいの測定では次のような雑音が問題となる。①ショット雑音(shot noise)、②detector 内の暗電流による雑音、③光源の光量の変動による雑音、④電気回路、シールドリング、周辺光による雑音、⑤被検体の微小な動きによる雑音。

このなかで、③～⑤のような外来性の雑音はその発生源を点検して除去することができるが、ショット雑音は光電子発生の確率的な不規則性により、これが光電流自体の雑音となったもので、これを除くことはできない。

Detector (photodiode)で受ける透過光シグナルあるいは蛍光シグナルとショット雑音の比、 $(S/N)_T$ 、 $(S/N)_F$ は次のように表すことができる[27]。

$$(S/N)_T = (\Delta I/I) \cdot (2q \cdot \gamma)^{1/2} \cdot I^{1/2} \quad (3)$$

$$\gamma = (1/4) \cdot \Delta F \quad (\Delta F \text{ は帯域幅})$$

I : detector が受ける透過光強度

q : detector の量子収率

$$(S/N)_F = (\Delta F/F) (2\gamma q)^{1/2} \cdot (gF)^{1/2} \quad (4)$$

F : 被検体からの蛍光強度で入射光強度に比例する。

g : detector の受光領域に関係する装置定数。

$\Delta I/I$ あるいは $\Delta F/F$ は、1つの色素および実験系では一定と考えてよい。さらに、 $S/N = k \cdot I^{1/2}$ と表されることから、じっさいの実験では、得られたシグナルとノイズ比(S/N)を背景光強度(入射光強度に比例する)の平方根に対してプロットして、上の関係式と照らし合わせるにより、雑音がショット雑音近くまで小さくなっているか否かチェックすることができる。もし、S/N と背景光強度の平方根との間に直接関係が成り立つなら、ほとんどショット雑音まで追い込んだと考えてよい。

図14にその例をあげる[28]。これは3種類のメロシアニン・ローダニン系色素(NK 2761, NK 3360, Dye XXIII)について、ニワトリ胚の脳幹に誘発された吸光シグナル(S)とノイズ(N)の比、S/N を入射光強度の平方根に対してプロットしたものである。このプロットで、入射光強度がある値以上のところでは、S/N 比と入射光強度との間には直線関係が得られている。このことから測定にもちいられる入射光強度では、ノイズはショット・ノイズのレベルまで追いこまれていると考えてよい。

さらに、この S/N 比と $I^{1/2}$ の間には次のような経験式が導きだされている[文献28の Appendix 参照]。

$$S/N = k \cdot I^{1/2} - [\alpha - \alpha\beta / (I^{1/2} + \beta)] \quad (5)$$

ここで k, α , β は色素の種類や測定対象とする標本の種類によって決まる定数である。この式は、われわれの計測における雑音は、通常の計測でもちいられる入射光強度の範囲では光量子の量子的性質に依存するが、入射光強度の小さいところではそれとは関係のない因子がまぎれ込んでいることを示している。後者の成因については少なくとも現時点では不明であるが、おそらく、装置定数あるいは暗電流に関係していることが考えられる。さらに、これとは別に、detector が受けるフォトン数と S/N 比の関係が求められている[e. g. 35]。

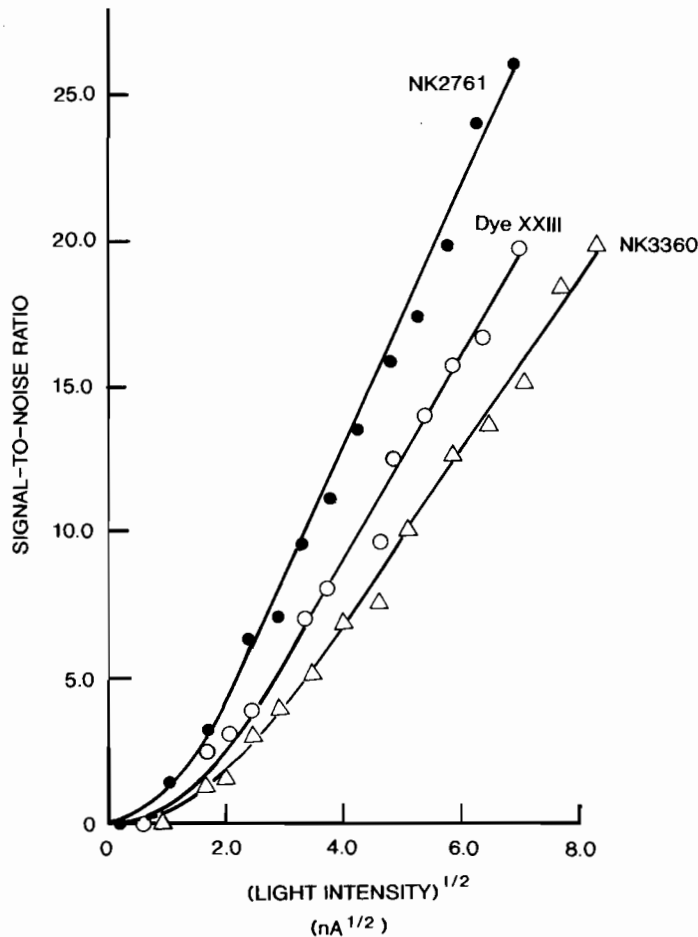


図14. 3種類のメロシアニン・ローダニン系色素について、ニワトリ胚脳幹で得られた S/N比と照射光強度の関係[28].

§10. Multiple-Site Optical Recording Methods

膜電位感受性色素をもちいた膜電位活動の光学的計測法の利点は、①微小電極を刺入できないぐらい小さい細胞やそれらの突起(processes)から電位活動を記録できる、ということに加えて、②測定対象の多数分画領域(部位)や多数の細胞から電位活動を同時に記録することができる、ことである。

電位活動を多領域から同時記録するシステム(multiple-site optical recording system)は光学系に光学顕微鏡(大型が操作的に便利である)をもちいて組み立てられている。その基本構成は

図15にも示したように、膜電位感受性色素で染色した標本を chamber に固定し、それを載物台上にセットする。これに所定波長の光(通常、可視光線)を入射し、対物鏡を通して実像面(image plane)に結像した標本の拡大実像に受光器を置いて標本からの光学シグナルを検出する。通常、受光器としては photodiode がもちいられる。

前節までは、ほとんどが一個の photodiode をもちいた記録例をとりあげたが、この single photodiode 法からスタートして、多数の細胞や標本の多数領域から電位活動を記録する方法が発展してきた。したがって、multiple-site 計

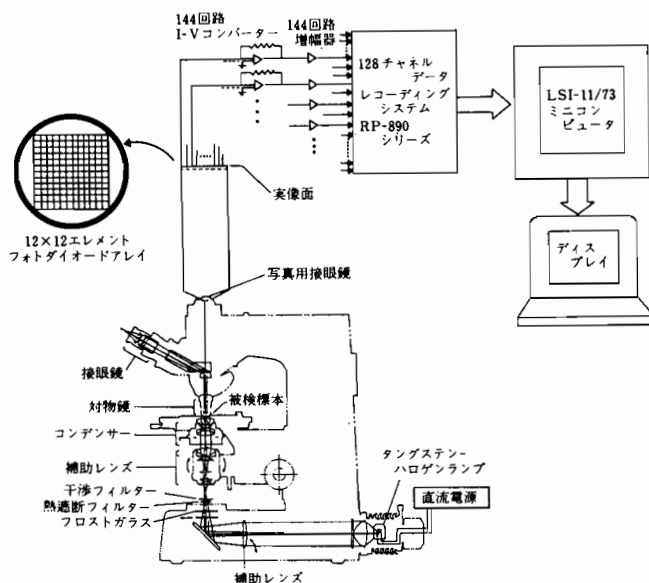


図15. 12×12-element photodiode array をもちいた128領域同時計測システム(東京医科歯科大学医学部第二生理学教室) [37,40].

測の原理は基本的には single photodiode 法と同じである。

多数細胞や多領域から光学シグナルを同時記録する方法は、まず、single-photodiode を light guides (optic fibers)の先端に取り付けたものを何本か作り、それらの他端を実像面上に並べて標本の実像の複数領域から光学シグナルを同時記録する方法が導入された[17,29,30,31]. これが multiple-site optical recording method の出発点である。

optical fibers をもちいた light guide 方式は、実験の目的や実験対象によってはまだその有用性は決して失われていない。これをもちいることによって工夫次第ではいろいろな実験ができることを指摘しておく。われわれは、この方法を適用することによって脳の深部からの光学シグナルの検出を試みている[32]. なお、この light-guide (optic fiber)方式と、次に述べる photodiode array を組み合わせたシステムも開発されていることも付言しておく[33].

photodiode array 方式：light guide 方式で

は、最高16ヶ所の領域からの同時記録ができたが、それ以上測定領域を増やすことには、顕微鏡の実像面のスペースなどシステム構成の面から限界がある。そこで、新しい方法として、複数の photodiode をマトリックス型にならべた multi-element photodiode matrix array 法が導入された[34-37]. この photodiode array 方式には現在、①多素子 silicon photodiode array をもちいて、電位活動を多領域から parallel read-out 方式で同時計測するシステムと、②CCD カメラや128×128ピクセルアレイをもちいて、フレーム方式でシグナルを呼び出す serial read-out 方式がある[38]. われわれは serial read-out 方式には経験がないので、ここでは、われわれがもちいている parallel read-out 方式について述べる。

photodiode array には、5×5(MD 25), 10×10(MD 100), 12×12(MD 144)-element photodiode array (Centronics, Croydon, UK)をはじめとして、16×16-element photodiode array (Argus-50 PDA/浜松フォトニクス)がもちいられている。[Argus-50 PDA はすでに市販されている.] われわれの研究室では、現在12×

12-element photodiode array (MD 144) と 34×34-element photodiode array (後述) をもちいて自作した計測システムを使用している。われわれの計測システムと他研究室で組み立てられた計測システムおよび市販品の構成と原理は基本的にはすべて同じである。

12×12-element photodiode array 計測システム：これは1.4×1.4 mm の silicon photodiode を144個、12×12のマトリックス型に配列したもので、各エレメント間は0.1 mm 幅で絶縁されている。これらの各エレメントからの光電流は、各エレメントと連絡した144個のI-V コンバータによって、電圧信号に変換されてから、144個のアンプリファイアによって各々増幅されて記録系へ送り込まれる(図15) [37]。

レコーディングシステムとしては、128チャンネル PCM データレコーディングシステム (RP-890 シリーズ：NF 回路設計ブロック) をもちいている。これはメインプロセッサ、I/O プロセッサ、ウェーブメモリおよびカセット式 VTR から構成されており、I/O プロセッサでアナログ信号はデジタル信号に変換されてメインプロセッサに入り、続いて、ビデオ信号に変換されて記録される。記録された信号はコンピュータ (LSI-11/73 minicomputer：Digital Equipment Co.) へ転送され、シグナルの表示や解析が行われる。ソフトウェアは、われわれの研究室で独自に開発したものをを用いている。アナログデータの入力部である I/O プロセッサは16チャンネルからなり、これを増設して最高128チャンネルにして144ヶ所のうち128ヶ所からの光学的シグナルを同時記録することができるように構成されている。なお、この装置では、心電活動のリズム解析を行えるように PCM データレコーディングシステムをもちいているが、この代わりに通常はマルチプレクサーがもちいられている。

1020-element photodiode array recording system：このシステムは、主として中枢神経系のニューロン活動を計測することを目的としてわれわれの研究室で設計されて組み立てられ

た [39,40]。そのさい、次のような性能が保持されていることを基本的条件とした。

- ① single sweep で活動電位が識別できると同時に、シグナルの波形からシナプス後電位の識別と定量的解析ができるだけの十分な時間分解能と S/N 比を有している。
- ②秒オーダーの持続時間をもつ電位変化もできるだけ歪なく記録できる。
- ③長時間 (分オーダー) の連続記録において、色素の退色等によるドリフトを測定を中断することなく補正できる。
- ④透過光測定の場合、透過光がもっとも大きい部分における (透過光) 強度が full scale に近い値に測定条件を設定すると、光の透過が小さい部分の測定精度が不十分となる可能性がある。そこで、透過光が大きい部分で saturation することなく、同時に、透過光が小さい部分もできるだけ高い精度で測定することができるようにする。

測定システムは基本的には12×12-element photodiode array system と同じで、光学系 (顕微鏡)、検出ユニット、プリアンプ、マルチプレクサー・ユニット、AD 変換ユニットから構成され、コンピュータをもちいてシステム全体の制御やデータの記録を行うように設計されている。1020-element photodiode matrix array はわれわれの研究室でデザインしたものを浜松ホトニクス(株)に特注して作製した。この array では34×34個の element (photodiode) が matrix 状に配置されているが、実像面に合わせて四隅の element は一部省略し、全体としてはほぼ円形状の受光面を持つようにしてある(図16)。この測定システム構成の模式図を図17に示した。

データの取り込み、表示、解析などのソフトウェアは、すべてわれわれの研究室で開発したのをもちいている。(言語は大部分 RT-11 (ver. 5.0) の OS 上で FORTRAN と Macro-11 のアンセンブラ言語である。) この計測システムの開発によって、標本の1020ヶ所の分画領域から膜電位変化を parallel read-out 方式で同時記録することができるようになった。次節から、

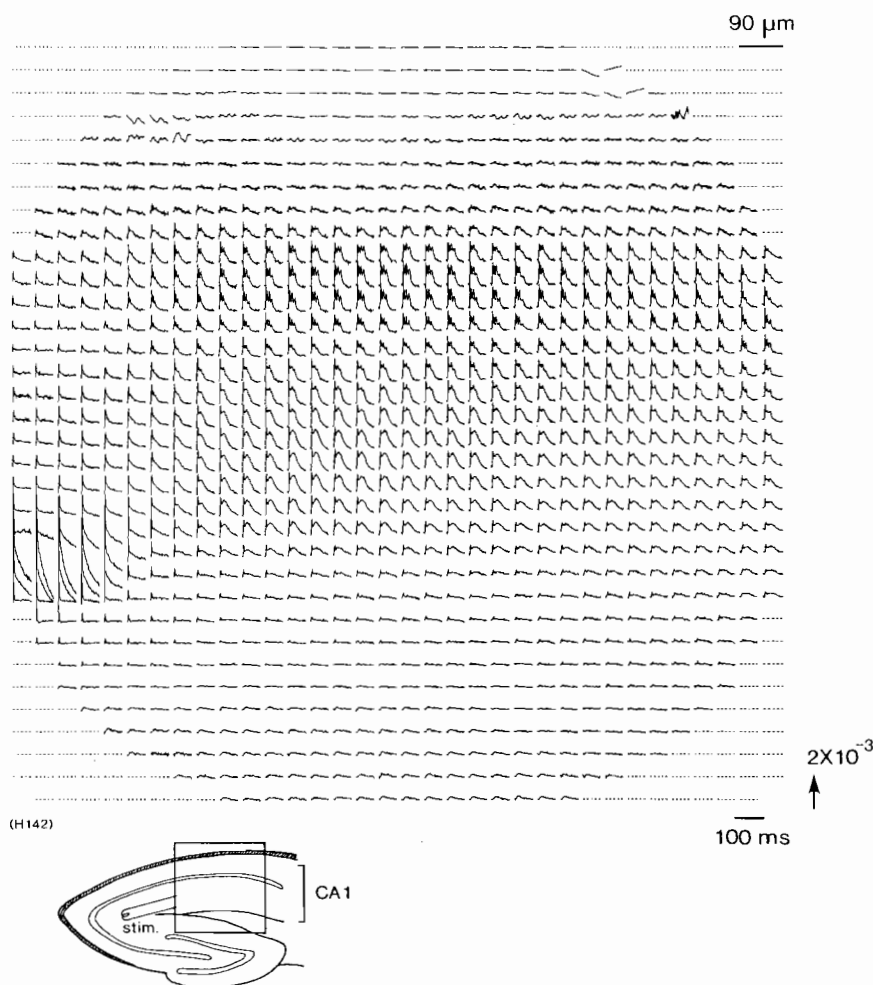


図18. ラット海馬スライス標本(RH 482/NK 3630で染色)で Schaffer 側枝の電気刺激によって誘発された吸光シグナルの1020ヶ所からの同時記録例[41].

図18は1020ヶ所の分画領域からニューロンの電位活動を同時記録した例である[41]. ラット海馬から厚さ $300\ \mu\text{m}$ の slice 標本をつくり, これを oxonol 系色素(RH 482/NK 3630)で染色したあと, Schaffer 側枝の電気刺激によって誘発されたニューロン電位活動を 1020-element photodiode array recording system をもちいて1020ヶ所の分画領域から波長 $700\ \text{nm}$ で同時記録したものである. 一個の photodiode は $41 \times 41\ \mu\text{m}^2$ の領域からシグナルをひろっている.

この記録で, 放射線維層(stratum radiatum)

では活動電位に対応するスパイク状のシグナルと, それに続くシナプス後電位に対応するシグナル, 錐体細胞層(stratum pyramidale)と多形細胞層(stratum oriens)では multiple discharge に対応する光学的シグナルが捉えられている. われわれは現在, これらのシグナルの波形やそれらの場所的分布を調べることによって海馬におけるニューロン活動の時間的・空間的パターン形成の解析を行っている.

もうひとつ, Onoda のグループによる serial read-out 方式(Deltaron 1700; Fuji Photo Film)をもちいてニューロン電位活動伝播を

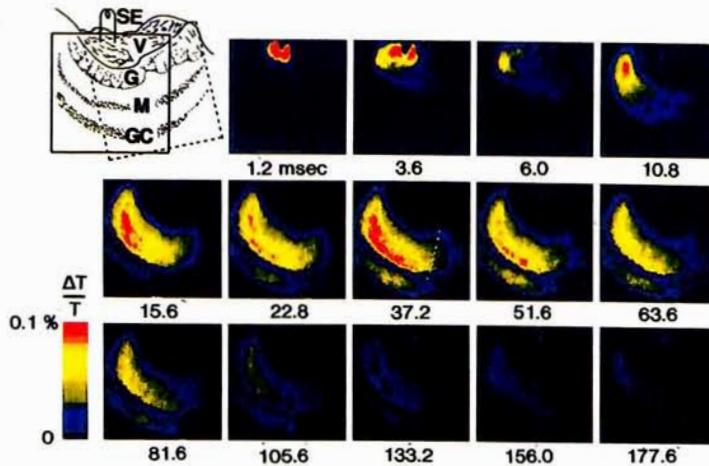


図19. oxonol 系色素 (RH 482/NK 3630) で染色したモルモット嗅球のスライス標本で、前鋤鼻神経層の電気刺激で誘発されたニューロン活動の光学的マッピング [42].

imaging 化した例を図19に示す [42]. モルモット嗅球 (accessory olfactory bulb) の slice 標本を oxonol 系色素 (RH 482/NK 3630) で染色し、前鋤鼻神経層 (anterior vomeronasal nerve layer) の電気刺激によって誘発されたニューロン活動の伝播過程を realtime optical imaging で示している。これによって、ニューロン活動の空間的/時間的なひろがりが見事に写しだされているのがわかる。

1) 無脊椎動物の神経節などでは一個の neuron から電位活動を光学的に記録することができるが [17, 18], 脊椎動物における中枢神経系の neuron は小さいので、一個の photodiode がひろいあげるシグナルは単一ニューロンでなく、一個の photodiode の受光領域における複数のニューロン、すなわち、ニューロン群からのシグナルを detect している。したがって、脊椎動物の中枢神経系や神経節では、膜電位感受性色素をもちいた光学的計測法は単一ニューロンにおける計測ではなく、neural-population level における電位活動の解析に威力を発揮する。シグナルの fractional change は近似的に一個の photodiode の受光領域にふくまれる活動性ニューロンの数に比例す

る。なお、記録されるシグナルは焦点面からのシグナルが主体になっていると考えてよい。一方、この性状を利用して、焦点面をずらしながら記録することによって、ニューロン応答領域の三次元的解析をすることができる [43]。これはいわゆる光学切片法 (optical sectioning) と同じ手法である。

2) slice 標本を測定対象とする場合、電位変化に応じた色素の吸光変化は、透過光 (transmittance) の変化として検出することになる。したがって、透過光の変化のなかには、細胞膜に吸着した膜電位感受性色素の吸光変化だけでなく、細胞の膨潤や収縮、細胞間スペースの変化、さらに slice の厚さの変化に起因する内因性の光散乱 (light scattering) の変化が紛れ込んでくる。これらには生理学的にはあまり意味のない artifacts のほかに、膜電位変化と共役した変化であることもあるので注意する必要がある。したがって、吸光変化の測定にさいしては光散乱の変化がふくまれているかどうかを check する必要がある。その check の処方には①波長依存性を調べる；②白色光でシグナルが検出されるか否かを調べる；③染色しない標本で透過光変化がみられるか否かを調べる、という方法がある。一方、膜電位感受性色素に

よる吸光変化と内因性の光散乱変化の同時記録によって、ラットの下垂体における興奮—分泌関連[44]や、ニワトリ胚脳幹で glutamate あるいは GABA によって誘発される脱分極と共役したニューロンの膨潤や収縮[45,46]が捉えられている。

3) imaging (画像化)では電位活動のひろがりの時間的／空間的パターンを視覚化して捉えるという点では便利であるが、光学的変化をすべていっしょにして画像化しているので、画像化された電位活動にとりこまれる成分、例えば活動電位とシナプス後電位などの判別ができない。したがって、シグナルの記録を併せて行い、imaging とシグナル波形を比較することが必要となってくる。さらに、画像の中には artifacts も noise もすべてふくまれてしまうので、それらを画像化している危険性もあることに細心の注意を払う必要がある。極端な場合、noise あるいは artifacts だけを画像化している cases が見受けられることも指摘しておく。

4) 電位変化の光学的計測で注意しなければならないもうひとつの因子に光散乱によるシグナルや imaging の“ぼけ” (blurring)がある[35]。したがって、シグナルや画像の解析をするときこれを考慮する必要がある。特に画像化ではこれは serious である。光散乱強度は波長の n 乗(一般に $n > 4$: Rayleigh 散乱のとき $n = 4$)に反比例するので、action spectra でピーク波長が2つある場合は、波長の大きい方が光散乱の影響は小さいことになる。

§12. “まるごと”動物における脳皮質のニューロン活動

“まるごと”動物における脳皮質のニューロン電位活動の光学的計測は、まず(1983年, 1985年) L. B. Cohen の研究室で、サンショウウオの嗅球[47]、およびラットの体性感覚野と視覚野[48]でなされたが、これをきっかけとして膜電位感受性色素をもちいた in vivo 光学的計測法に新しい適用面が開かれた。

図20にラット体性感覚野皮質におけるニューロン活動を光学シグナルとして記録した例をあげる。まず、ラットの体性感覚領域に対応する部分の頭蓋骨を除去して露出した脳皮質を styryl 系色素 RH 414 : 2 mg/ml solution で100分間浸して染色し、一本のヒゲを動かすことによって体性感覚野に誘発されたニューロン電位応答を蛍光シグナルとして128ヶ所の分画領域から同時記録したものである。蛍光シグナルはダイクロイックミラーをもちいた落射蛍光法によって記録されている。このシグナル群は一本のヒゲの動きによる機械的刺激によってそのヒゲに対応する一個の barrel 皮質に誘発されたニューロン応答に対応する。なお、この記録では32回の刺激によって誘発されたシグナルを加算平均している。

“まるごと”動物の脳皮質を光学的計測の対象とするとき、serious な問題となるのは、動物の呼吸運動、心拍、血流に起因する noise と artifact である。図20に示した測定では、filter の使用と subtraction によって呼吸運動、心拍動による noise を除去する方法がとられている[47]。

図21に Kamino と Grinvald による記録例をあげて、noise の混入とその除去効果の実例を示す。顕微鏡の載物台を取り外し、styryl 系色素 RH 414 で染色した視蓋部を対物鏡の下に位置するようにして、カエルを“まるごと”のまま固定した。この視蓋部をダイクロイックミラーを通して 540 nm の励起光で照射し、眼球の光照射刺激によって視蓋皮質に引き起こされた電位活動に対応する蛍光シグナル(波長 580 nm)を、 10×10 -element photodiode array をもちいて96ヶ所の部位から同時記録した。視蓋皮質は、色素(2 mg/ml)をふくむ Ringer 液を5分間隔で120分間連続で皮質に滴下(約 1 ml)して染色した。

光照射刺激としては、持続時間 150 m 秒の白色光のフラッシュをライトガイド(光学繊維)を通して角膜に直接照射した。図21 A は、呼吸、

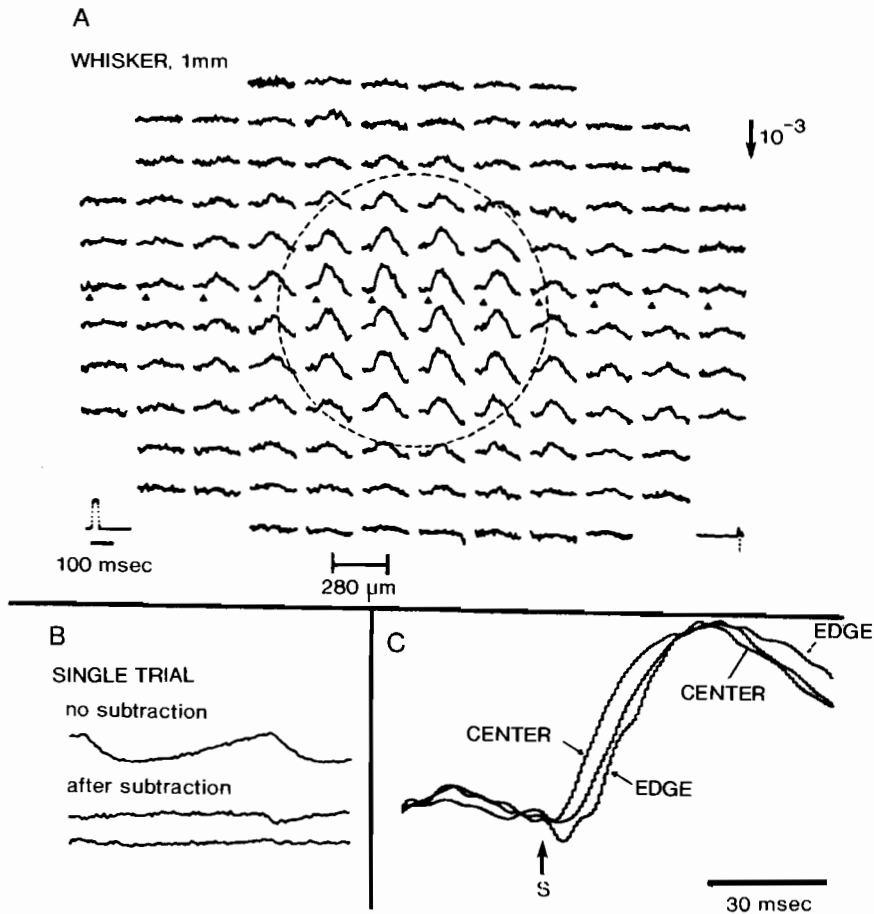


図20. A. 一本のひげの刺激によって、ラット大脳皮質の体性感覚野に誘発されたニューロン活動の光学的記録。ラットの大脳皮質を露出し、膜電位感受性色素 RH 414 (2 mg/ml) で100分染色した後、一本のひげ(whisker)を動かして(1 mm の偏位)、誘発されるニューロン活動を蛍光シグナルとして124ヶ所から同時記録している。32回の加算平均処理とデジタルフィルタによりノイズの低減化を行っている。光学的シグナルは、大脳皮質上の測定点の位置に対応して表示されており、上側が内側、左側が後側である。測定領域の中央部で最も大きなシグナルが観測され、周辺に向かってシグナルは小さくなっている。なお、中心部と辺縁部の間には、シグナルの発現に delay がみられる(C)。B. subtraction による拍動由来のノイズの除去[48]。

心活動、血液循環ともに保存したままの状態では記録されたものであるが、非常に大きな noise が記録され、シグナルがそれにほとんど隠れてしまっている。このような noise については、その原因として、Grinvald は呼吸運動と心拍動をあげているが[27]、これはむしろ脳皮質における微小血管内における赤血球の不連続的な流動によるものと考えられる。事実、図21Aに

示した記録で、ノイズは血管の走行に沿ってみられる。また、脳皮質における微小血管では拍動流はみられず、乱流も生じていない。ただ、血管内における赤血球の不連続的な流れが顕微鏡下で観察できる。

この noise を消去するため、心室にカニューレを挿入してカエルを“まるごと”そのまま、酸素で飽和したリンゲル液を層流で全身灌流しながら測定することを試みた。その結果、図21

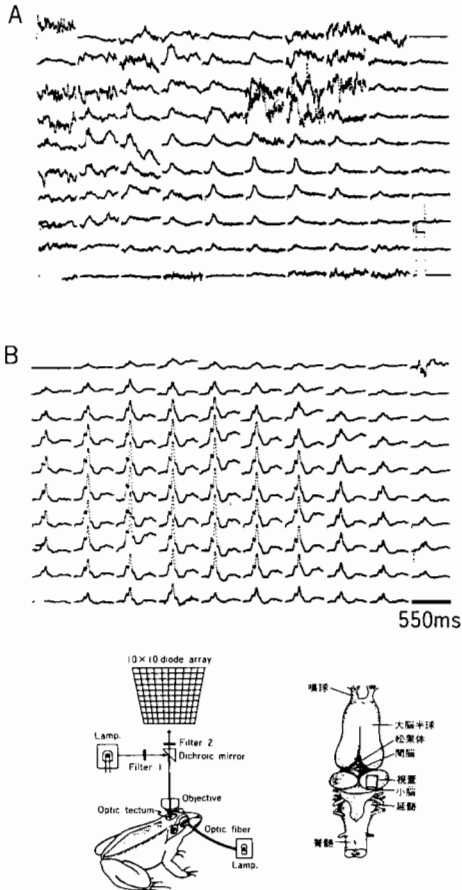


図21. カエル (*Rana ridibunda*) の右眼を光照射 (150 ms のフラッシュ) 刺激して右視蓋部 (optic tectum) の96ヶ所の領域から誘発電位を蛍光シグナル (励起波長 540 nm, 蛍光波長 580 nm) として同時記録したもの。ディテクターは10×10エレメント・マトリックス型フォトダイオードを使用。シグナルの配列は記録位置の配列に対応する。視蓋部皮質はスタイリル系色素 (RH 414) で染色した。Aは生理的な血液循環状態で記録し、Bは Ringer 液の全身灌流状態で記録したもの。図の下側に測定方法、カエル脳の模式図を示す。視蓋の正方形で囲んだ部分からシグナルを検出した。(Kamino K. and Grinvald A., 1983)

Bに示したように noise は除去され、きれいなシグナルを記録することができた、このような灌流のもとでも、約3時間にわたりシグナル記録が可能であった。

ここに示したのは、noise 処方の一例であるが、計測対象、計測条件に応じて適切な対策を

講じることが必要である。それには、ルーチン化された処方箋はないといってよい。

もうひとつ、音刺激によって聴覚野に誘発された皮質ニューロン応答の光学的計測例をあげる。Taniguchi のグループは、モルモットに二つの短い音刺激 (持続時間 30 ms) を周波数の組み合わせを変えて 70~100 ms の間隔で与えたときに、スタイリル系色素 (RH 795) で染色した大脳皮質聴覚野 (anterior (A) および dorso-caudal (DC) 領域) に誘発された蛍光シグナルの解析をおこなった [49]。その結果、①第2音に対する応答は、第1音に対するものと比べ抑制される；②抑制は同一周波数の組み合わせで強く；③第2音の遅れが 50 ms 以下では応答はほぼ完全に抑制される；④異なった周波数の組み合わせでは抑制は同一周波数のときよりも弱い；さらに、⑤抑制の度合いには部位による違いがある、ということが見出された。

図22は、二音連続刺激によってモルモットの大脳皮質聴覚野に誘発されたニューロン応答の光学的なマッピングである。「A」は144ヶ所から同時記録された蛍光シグナルで、点線はA領域 (左側) と DC 領域 (右側) の境界を示している。20 kHz の2音連続刺激 (20~20 kHz) では、第一音に比べて第2音に対応する応答がどの領域でもほとんど現れていないことが示されている。「B」は 20 kHz と 10 kHz の2音連続刺激に対する応答で、第2音に対応する応答が現れている。「C」はニューロン応答の大きさの疑似カラーマッピングで、右から 20~20 kHz, 20~10 kHz, 10~20 kHz, 10~10 kHz, 最上段が第一音 (Masker) に対する応答マップで、下の三つは 70, 90, 110 ms 遅れて与えられた第二音 (Probe) に対する応答が示されている。このマップで同じ周波数の組み合わせでは強い抑制により応答が見られないが、異なる周波数の組み合わせでは弱い応答が現れているのが見られる。

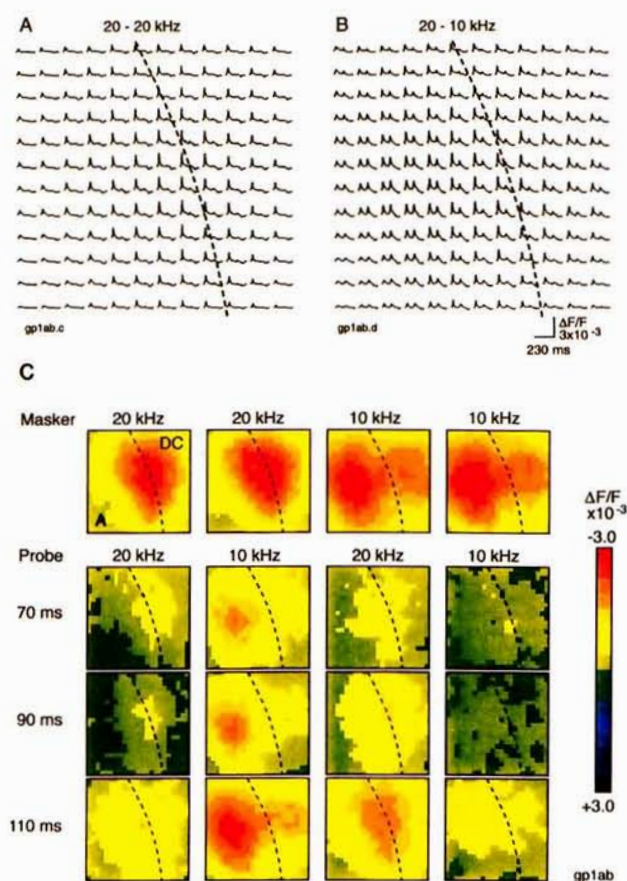


図22. モルモットに二音連続刺激を与えたとき大脳皮質聴覚野(RH 795で染色)に誘発されたニューロン応答の光学的マッピング。A/B. 144ヶ所から同時記録された光学的シグナルを測定分画領域に合わせて表示。点線はA領域(左側)とDC領域(右側)の境界。C. ニューロン応答の疑似カラーマッピング。赤、緑、青は各々強い興奮、静止レベル、強い抑制を表している[49]。

§13. Embryonic Neuro-Electrophysiology

複雑きわまりない脳機能を解析しようとして、いろいろなアプローチが考えられ、また試みられているが、そのひとつとして、個体発生的アプローチがある。しかしながら、この方向の研究は、分子生物学的手法を基軸にして、おもに形態形成(morphogenesis)に集中しており、“形態形成”に対応する“機能形成”の研究は立ちおけている。じっさい、“morphogenesis”というコトバはあるが、これに対応した“functiogenesis”というコトバをわれわれはまだ持ち合わせていない。

これは、初期胚における中枢神経系のニューロンやグリア細胞がきわめて微小で、かつ機械的に脆弱であり、微小電極を刺入することができないため、従来の電気生理学的方法の適用が技術的にきわめて難しいか、あるいは、ほとんど手がつけられないことに起因している。またパッチクランプ法の適用もうけつけない。いわゆる生理学的という意味での、機能発生/機能形成、を研究しようとする場合、幼若胚の中枢神経系は、まことにやっかいなしろものである、ということである。そこで、われわれは、個体発生にともなう中枢神経系の機能発生/機能形成/機能構築過程、を解析するため、膜電位感

受性色素法による膜電位活動の光学的計測を導入した。

われわれが機能発生/機能形成/機能構築の光学的計測/イメージングとして、まず選んだ対象は、ニワトリ、ラット胚における神経節、脳神経核である。現在では、脊髄、さらに大脳皮質にまで及んでいるが、ここでは、脳幹延髄と脊髄についての測定例をあげることにする。

迷走神経応答 [50,51] : 図23は孵卵8日目のニワトリ胚から摘出した脳幹を merocyanine-rhodanine 系の膜電位感受性色素(NK 2761)で

染色したあと、吸引電極で迷走神経を電流刺激($8\mu\text{A}/5\text{msec}$ の脱分極性の矩形波電流)したとき延髄部に誘発されたニューロンの電位応答を、1020素子のフォトダイオードアレイをもちいて光学的に1020ヶ所の分画領域から同時記録したものである。この図で、「A」は摘出した intact 脳幹標本、「B」は迷走神経の位置(レベル)で切り出したスライス標本からの記録である。ニューロン応答は刺激した側の延髄部に局限した領域に発現している。DiI をトレーサーとした形態観察との比較から、この応答領域は

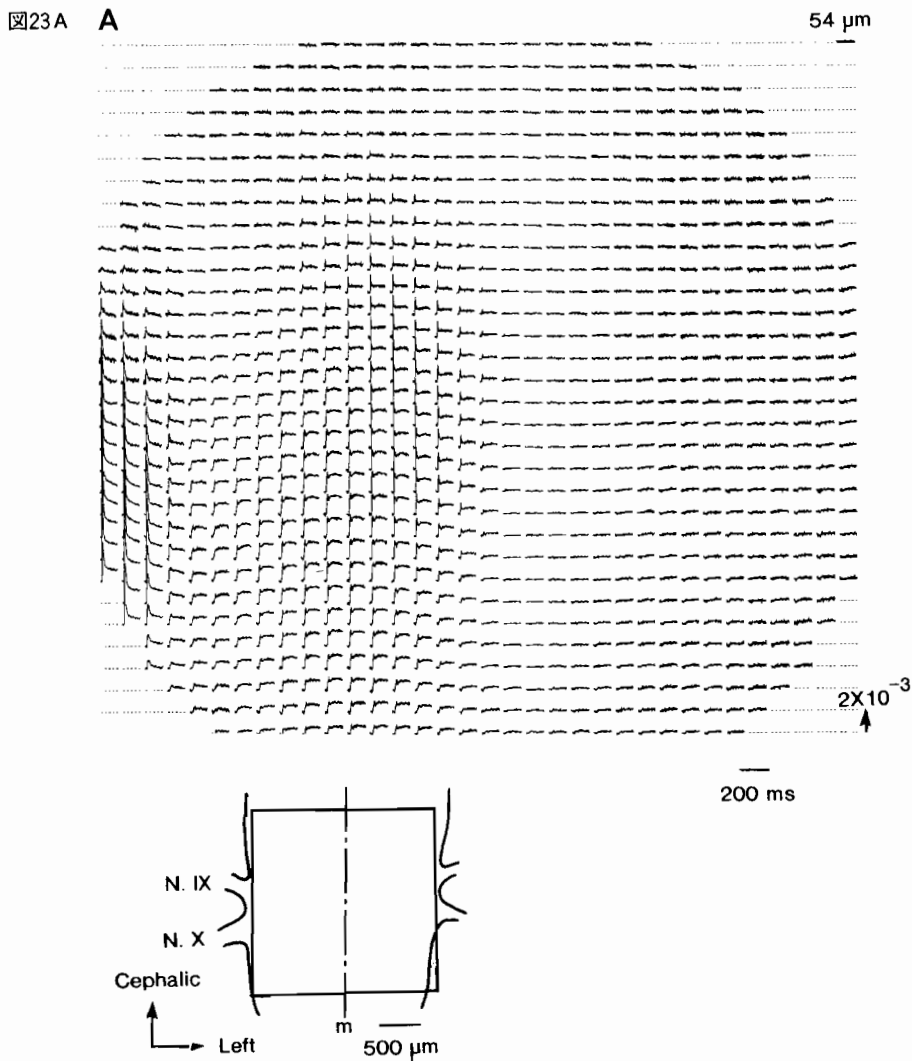


図23B

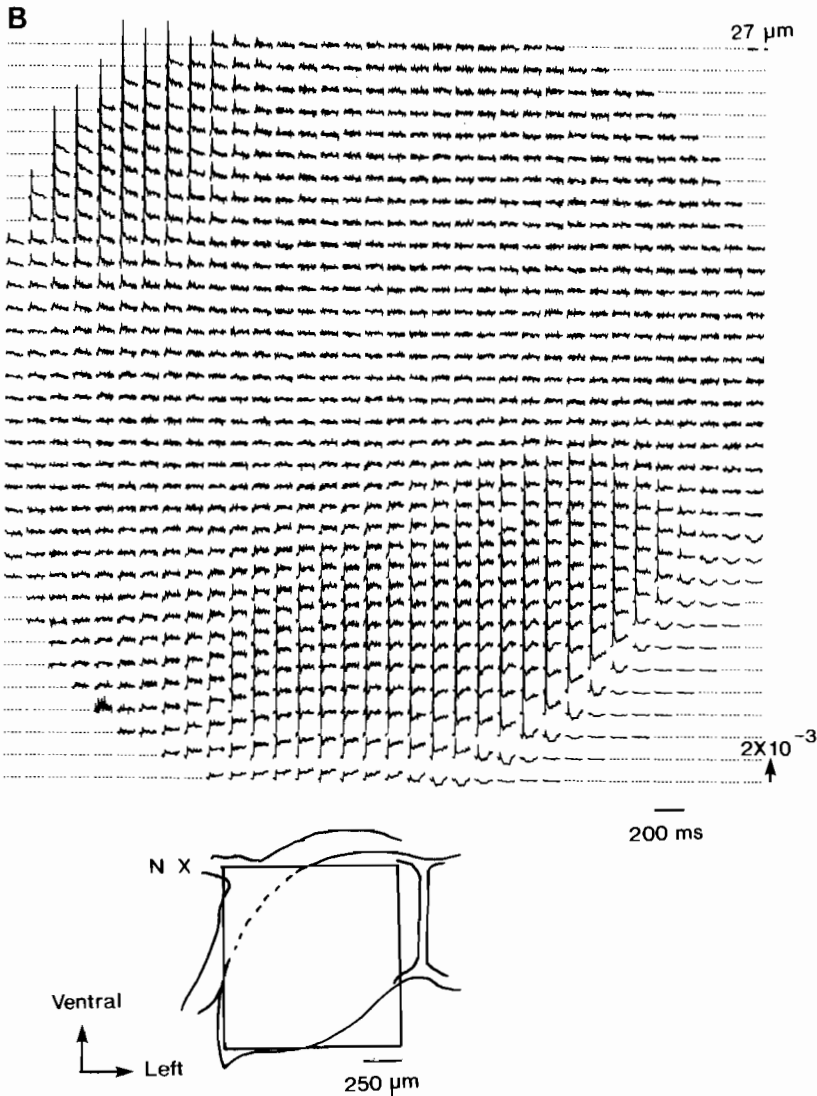


図23. A. 孵卵8日のニワトリ胚から抽出した脳幹のインタクト標本で、右迷走神経を吸引電極で刺激($8 \mu\text{A}/5 \text{ msec}$)したときに誘発された光学的シグナルを、1020チャンネル同時測定システムにより、図左下に示した領域から同時に検出した。一回の掃引で得られたシグナルを示す。B. 迷走神経レベルで切り出したスライス標本についてAと同じ刺激法によって誘発された光学的シグナルの1020ヶ所からの同時記録。A, B, とも標本はNK 2761で染色[39]。

孤束核と迷走神経背側運動核に対応しており、それらは部分的に重なり合っていることが示唆された。

この記録から、誘発された光学的シグナルは、速いスパイク状の成分に加えて、それに続く時間経過の遅い成分の2つの相(phase)により構

成されている。速いスパイク状の成分は、活動電位由来のシグナルであるが、これに続く時間経過のゆっくりした遅いシグナルは、1) 連続刺激で次第に減衰し(シナプス疲労に対応)、2) 細胞外液からの Ca^{2+} の除去、 Mn^{2+} や Cd^{2+} の添加によって抑制あるいは消滅する。

このことから、この遅いシグナル成分は孤束核におけるシナプス後電位に対応していることが結論された。

この遅いシグナルは、キヌレン酸 (kynurenic acid) で特異的に抑制され、さらに、APV によりその後期相 (later phase) が、CNQX によりその初期相 (early phase) が、それぞれ特異的に抑制される。これらのことから遅いシグナルはグルタミン酸を伝達物質とする興奮性のシナプス後電位 (EPSP) に対応し、そのシグナルの初期相 (early phase) は non-NMDA 型、後期相 (later phase) は NMDA 型の受容体機能に対応しており、この発生段階で、NMDA および non-NMDA タイプの受容体がすでに分化形成されていることが示された。

一方、迷走神経線維束は運動神経線維と知覚神経線維をふくんでおり、これを吸引電極で刺激するとき、運動神経に対しては逆行性刺激 (antidromic)、知覚神経線維に対しては順行性刺激 (orthodromic) になる。したがって、迷走神経背側運動核に対応する領域で記録される速いスパイク状のシグナルは、運動神経細胞における逆行性の活動電位であり、孤束核に対応する領域におけるスパイク状のシグナルは、知覚神経終末における順行性の電位活動であることを示している。

ここに示したように、生理学的、形態学的、薬理学的処方を用いることによって、シグナルの波形を解析して、その生理学的構成要素を明らかにすることができる。

図24はラット胚延髄で迷走神経刺激によって誘発される活動電位とシナプス後電位の“embryogenesis”を捉えたものである。この図

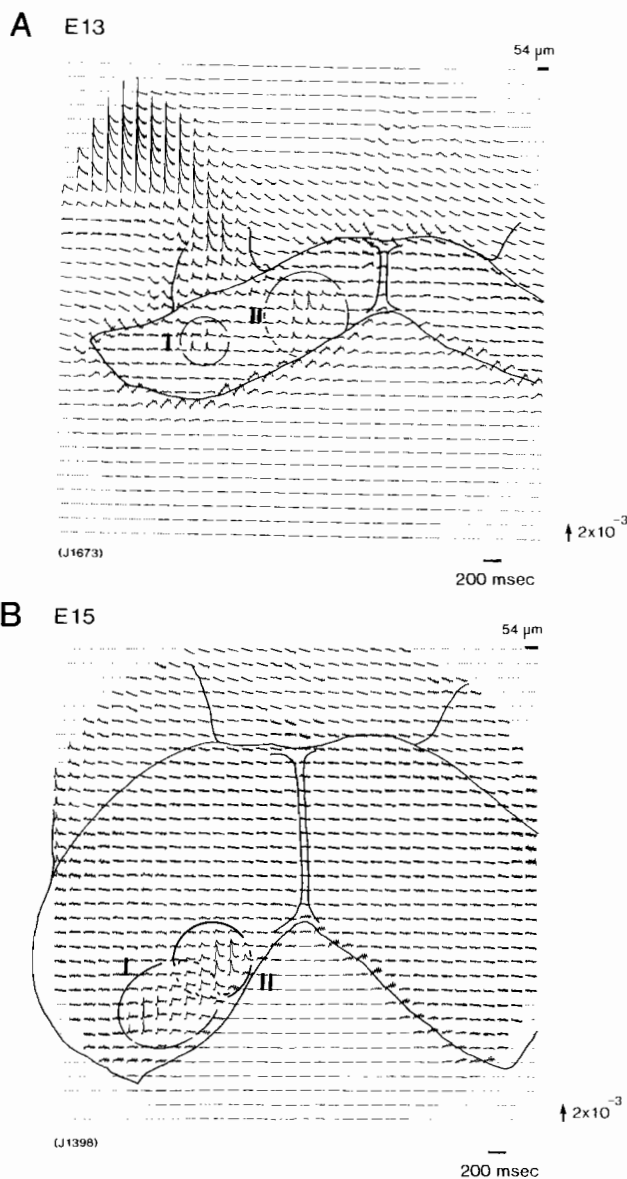


図24. 胎生13日目および15日目のラット胚から切り出した脳幹スライス標本で、迷走神経を吸引電極で刺激したときに、延髄に誘発された光学的シグナルの1020チャンネル同時測定例 (A: 胎生13日, B: 胎生15日). 図Aの丸で囲んだI, IIの領域は、それぞれ孤束核、迷走神経背側運動核に対応する[51].

で、「A」は胎生13日目のラット胚の脳幹から迷走神経の位置で切り出したスライス標本をメロシアン・ローダニン系色素で染色し、迷走神経を電流刺激 ($8 \mu\text{A}/5 \text{ msec}$ の脱分極性の矩形波電流) したとき延髄部に誘発されたニュー

ロン活動の記録である。この記録で、刺激した側の延髄背側に二つの応答領域(領域Ⅰ, 領域Ⅱ)があることが識別できる。

迷走神経刺激によるニューロン応答は、ラット胚では胎生期12日にはじめて発現するが、12～14日目の胎生期における光学シグナルはスパイク状のシグナルだけであり、これは、電気生理学的、薬理学的特性から、刺激により誘発された活動電位のシグナルであることが示された。さらに、形態観察との比較から、二つのニューロン応答領域は、孤束核(領域Ⅰ)および迷走神経背側運動核(領域Ⅱ)に対応しているこ

とが示された。

個体発生の段階がすすみ、胎生15日目以降のラット胚になると、刺激によって誘発される光学的シグナルは、速いスパイク状の成分と、時間経過の遅い成分の2つの相(phase)により構成されるようになる。図24 Bは胎生15日目のラット胚で記録した光学的シグナルである。速いスパイク状の成分は、活動電位由来のシグナルであるが、これに続く時間経過のゆっくりした遅いシグナルは、先述のニワトリ胚と同じように、孤束核におけるシナプス後電位に対応していることが明らかにされている。

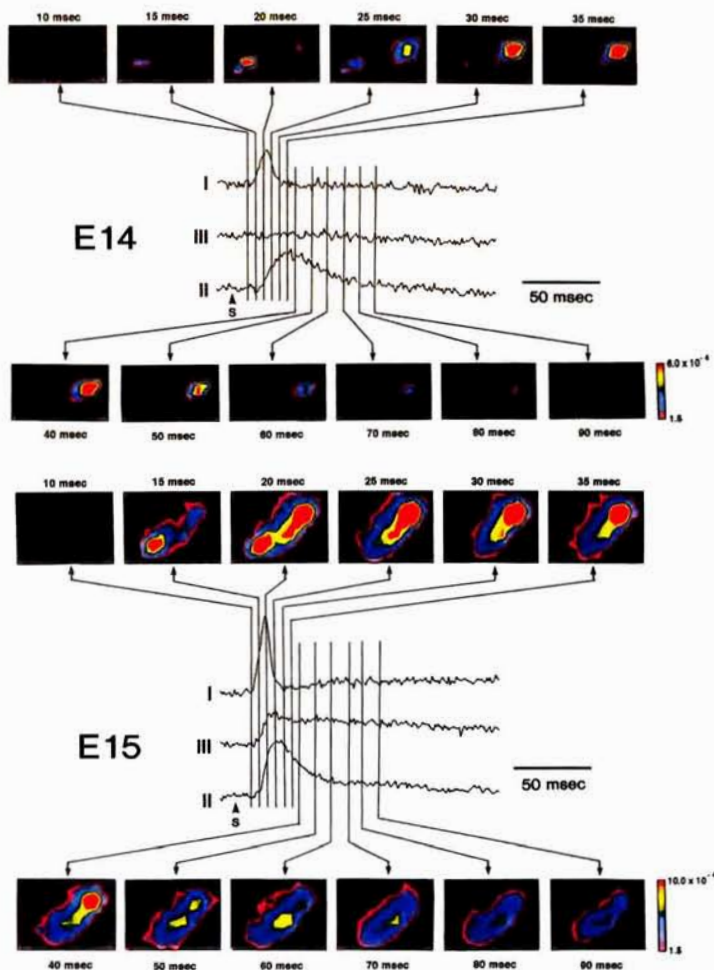


図25. ラットの胎生期の脳幹スライス標本で、迷走神経を吸引電極で刺激したときに、延髄に誘発された光学的シグナルの spatiotemporal mapping (A: 胎生14日, B: 胎生15日). 3ヶ所で得られた光学的シグナルと比較してある[51].

一方、胎生15日目のラット胚では孤束核、迷走神経背側運動核に加えて形態的には疑核が形成されていることが観察されるにもかかわらず、これに対応するニューロン応答はまだ発現していない。これは、「形態形成」と「機能形成」は時間的にずれて進行することを示している。ここに、「機能形成」と「形態形成」との間の相関性におもしろさがある。「形態形成」がさらに「機能的に組織化される」ことが「機能形成」につながるのであろう。

図25には、胎生14日目と15日目のラット胚脳幹スライス標本で迷走神経刺激により延髄に誘発されたニューロン活動を疑似カラー表示で示した。この疑似カラーマップで、迷走神経刺激により延髄に誘発されたニューロン応答は、発現位置とシグナル波形との比較から、まず孤束核に発現し、次第に広がっていくこと、背側運動核における逆行性の活動電位は孤束核における順行性の活動電位よりやや遅れて発現することを示している。

脊髄ニューロン回路の形成[52]: 図26は、孵卵8日目(Hamburger-Hamilton stage 33)のニワトリ胚から切り出した脊髄のスライス標本で、脊髄神経後根(the 5th lumbosacral spinal

nerve)を刺激することによって脊髄神経後根→脊髄後角→中間帯→脊髄前角という経路に沿って誘発されたニューロンの電位活動を光学的シグナルとして多数分画領域から同時記録し、それをイメージング化したものである。刺激後6 msec 秒後には後角にニューロン活動が誘発され、それは次第に広がっていき、60 msec 秒後には、ニューロン活動は前角へ伝えられ、そこでまた広がっていく過程がよみとれる。光学的多領域同時計測法で得られる記録ではそのほとんどが、まだ興奮の広がりパターンを捉えるだけにとどまっているが、ここに示した記録はニューロン回路に沿った電位活動を記録することに成功した例のひとつである。またこの実験では、この発生段階で、mono-synaptic connections と poly-synaptic connections が形成されていること、およびそれらの分布領域がはじめて明らかにされた。

§14. 心電活動

multiple-site optical recording methods は心臓における興奮波伝播のマッピングやパターン解析、不整脈波の解析に適用されている[e. g. 21,53-57].

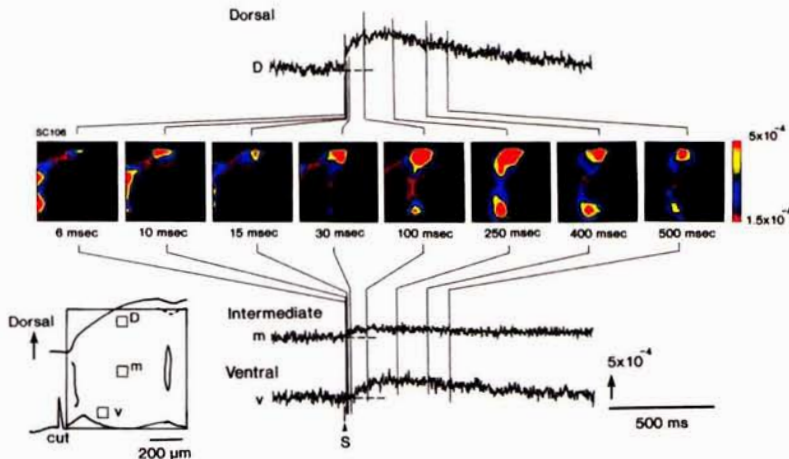


図26. 孵卵8日目(H-H stage 33)のニワトリ胚からLS-5のレベルで切り出した脊髄のスライス標本で脊髄神経後根の刺激によって、脊髄神経後根→脊髄後角→中間帯→脊髄前角という経路に沿って誘発されたニューロン電位活動の光学的イメージング・マップ[52].

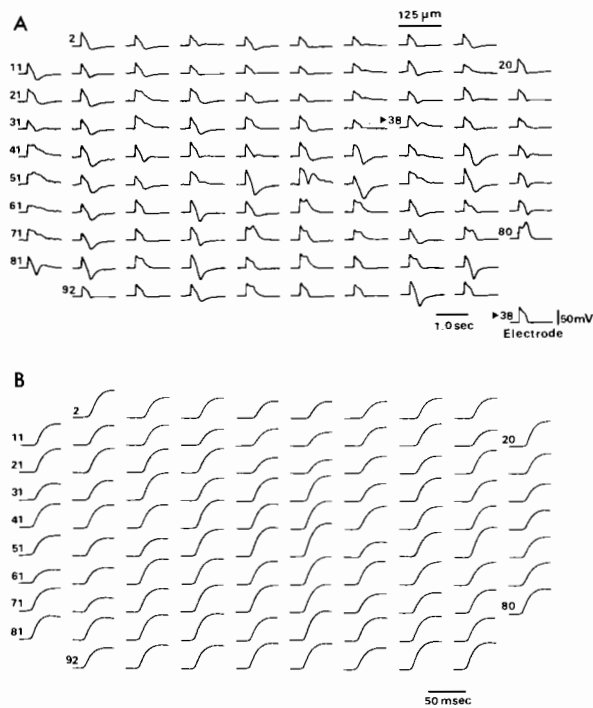


図27. カエル心房の95ヶ所の領域からの自発性活動電位の同時記録. 心房はNK 2761で染色して700 nmの入射光で測定. A, Bともにマトリックス表示で, シグナルの並びはフォトダイオードのエレメントの並びに対応する. Bは, 掃引時間を速くして記録[21].

図27は摘出した心房標本をメロシアニン・ローダニン系色素(NK 2761)で染色し, 自発性活動電位を光学的(吸光)シグナルとして95ヶ所から同時記録した例である[21]. 測定は低濃度の Ca^{2+} をふくむRinger液中でなされているが, 記録「A」でみられるように, 光学シグナルは活動電位に対応する光学シグナルとそれに続く小さな収縮に由来する光散乱変化によるシグナルの2つの成分をふくんでいる. 図27Bに示した記録は, sweep時間を早くして(図27Aに示したsweep時間の20倍)得られたもので, 活動電位由来のシグナルの初期相だけがトレースされており, 活動電位の立ち上がりのタイミング(delay)を比較することができる. photodiode arrayの標本上の位置をずらすことによって, 128ヶ所の同時記録を4~5部位で行い, それを組み合わせると, 自発性活動電位のdelayの違いから, 興奮波の伝播パターンを等時線で示したのが図28である. ここで, 活動電位が最

も早く立ち上がっている領域, すなわちペースメーカー部位を基準としてシグナルの立ち上がりの時間のdelayを計測している. このマッピングはペースメーカー部位に発生した自発性の興奮波伝播の様子をよく表している.

心電活動の光学的計測は, 摘出した“まるごと”の心臓(intact-heart preparation)でもなされている. 図29はG. Salamaらによってもちいられている計測法である[22b]. 膜電位感受性色素で染色した心室の外側壁にガラス板を押しつけておいて, ダイクロイックミラーをもちいて光照射(励起光)し, 電位活動に由来する蛍光変化を 12×12 -element photodiode arrayをもちいて検出している. この方法は, ガラス板を押しあてることによって心臓の拍動を抑制した準等尺性収縮の状態で蛍光変化を計測できること, 心臓を灌流しながら計測できるという利点がある. 図30は, この方法をもちいて得られた記録例である. モルモットの心臓をLangen-

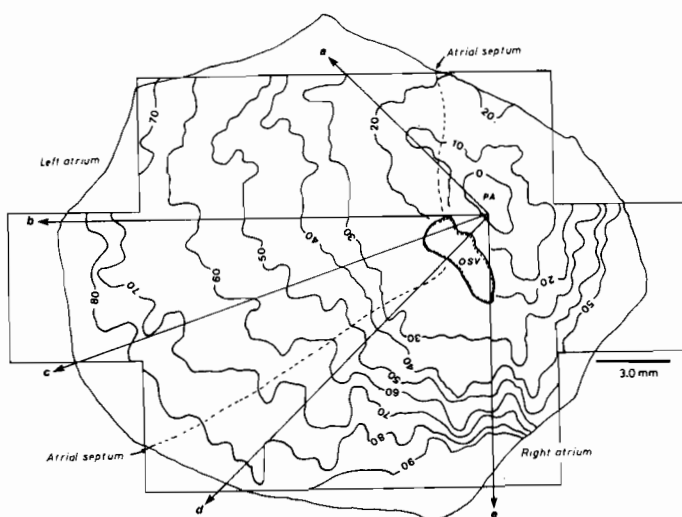


図28. 発性活動電位の多領域同時計測の記録から作成した興奮波の等時線マップ. 方向によって興奮伝播の速さに違いがみられて, b, c 方向で速く, e 方向でゆっくり伝播している [21].

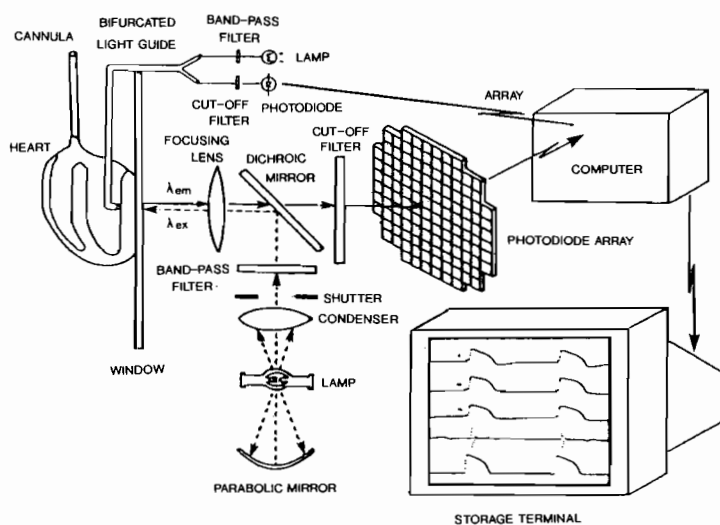


図29. 摘出した“まるごと”の心臓(intact heart preparation)の心電活動の光学的計測システムの模式図 [22b].

dorff 灌流法によってスタイリル系色素(RH 421)で染色し, 励起波長 520 ± 20 nm, 蛍光(emission)波長 645 nm で, 自発性活動電位由来の蛍光シグナルを124ヶ所から同時記録している.

§15. Ontogenetic Cardio-Electrophysiology

個体発生において心臓は他の器官に先がけてもっとも早く機能を開始する器官である. 器官としての心臓の形成は, まず, 左右一対の中胚葉由来の心臓原基が融合することから始まる. ニワトリ胚でこの心原基融合が始まるのは, 7

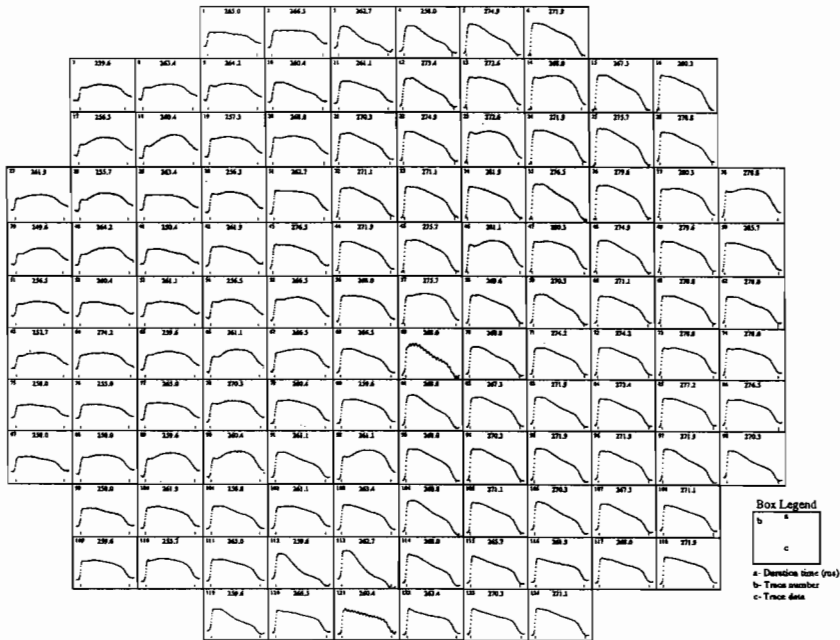


図30. 抽出した“まるごと”の心臓(スタイリル系色素/RH 421で染色)の心電活動を蛍光シグナルとして124ヶ所の分画領域からも同時記録した例。励起波長 520 ± 20 nm, 蛍光波長 645 nm [22b].

体節期中期(ふ卵25～28時間)であり、これによってプリミチヴな管状心が形成され、9体節期中期(ふ卵約30時間)になると最初の自発的でリズムカルな心拍動が開始する。この心臓形成の初期相では、心臓を形づくる細胞は、きわめて小さく、脆弱であるため、微小電極を刺入する事が不可能であり、通常の電気生理学的手法を適用できない。このような方法論的制約のため、心機能の初期発生についての研究は完全に立ち遅れてきた。

そこで、Kamino のグループは、これに膜電位の光学的測定法を適用して、心機能の初期発生、特に電気活動とそれに関連した機能の発生、形成過程を追跡し、自発性活動電位の発生学的起源、ペースメーカー電位の発達とリズム形成、ペースメーカー領域の形成と局在化、興奮伝播パターンの形成、興奮-収縮連関の形成と心拍動の開始などについて明らかにすることができた[58,59]。

自発性活動電位の起源[60]: 心筋細胞におけ

る自発性の電気的興奮形成の個体発生の起源については、アリストテレスが「心機能は発生のかかなり早い時期に発現する」と示唆して以来、その正確な時期は捉えられないまま長い間謎につつまれていたが、それは、光学的測定法を導入したわれわれの研究ではじめて明らかにされることになった。

図31は6体節期の心臓原基から測定されたものである。記録された光学的シグナルは、きわめて小さく、これは電位活動が小さく、かつ活動性細胞数が少ないことを反映している。さらに光学的シグナルは限局した狭い領域に発現しているが、これは活動性細胞が場所的に限局して発現していることを示しており、シグナルが同期していることは、これらの活動性細胞が電気的に連絡し合っていることを示している。このような事実から、未融合の心臓原基にペースメーカー能を持った細胞群がすでに発現していることがはじめて明らかになった。

ペースメーカー領域の微小測定[61]: 心臓原

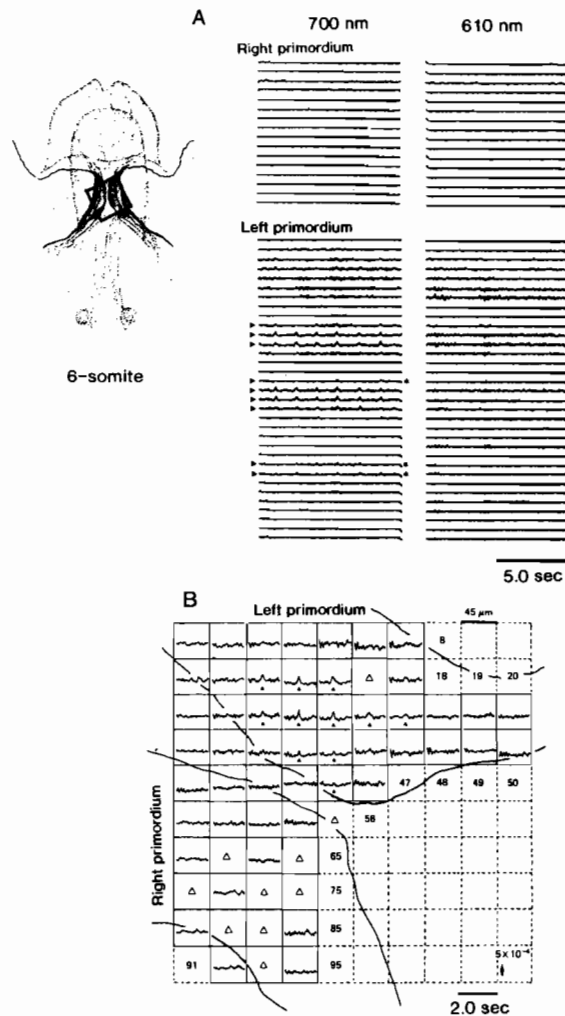


図31. 6体節期ニワトリ胚の融合以前の心臓原基から光学的に記録された自発性活動電位。これによって、心臓原基細胞にリズムカルな自発性の電氣的興奮能が形成されていることが初めて示された。Aは10秒間の連続記録(波長 700 nm)で、リズムカルなシグナルが左心臓原基から記録され、これは 610 nm で消失していることがわかる。Bはシグナルを photodiode の並びに合わせて配列してある [60]。

基が融合した後の7体節期から9体節期にかけて、自発性の活動電位はしだいに発達し、心臓全体にわたって広がるようになる。

光学的多領域同時記録によってトレースされる自発性活動電位に由来する光学的シグナルの立ち上がりには、測定領域ごとに興奮の伝播に伴ってわずかなタイミングの違い(delay)がみられる。活動電位が最も早く立ち上がっている領域がペースメーカーに対応し、ここから興奮

波が心臓全体に伝播している。このペースメーカー領域のより詳しい解析を行うため、測定システムの光学系の拡大倍率を上げて、より高空間分解能の測定を行った。

図32は、9体節期初期のニワトリ胚で、心房原基を含んだ心臓の左側の部分から自発性活動電位を光学的シグナルとして同時記録した例である。縦横10×10の枠はフォトダイオードアレイの各エレメントの並びに対応している。活動

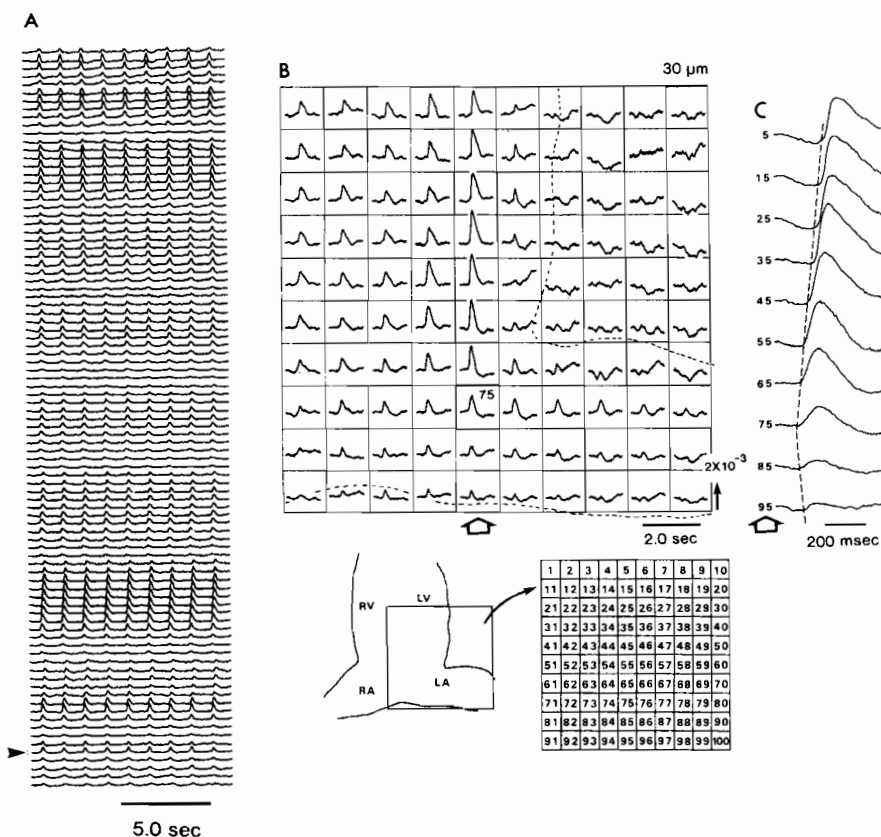


図32. A. 9 体節期ニワトリ胚心臓の多数部位から光学的に同時記録した自発性電位活動の10秒間の連続記録。矢印の部位(トレース)で活動電位は最初に発現し、他の部位へ広がっているのがわかる。B. シグナルを photodiode の位置に合わせて配列。75の位置に最初の活動電位が発現している。C. 部位75をふくむ左から5行目の10ヶ所の領域で記録されたシグナルの立ち上がり時間の比較[61]。

電位は、左の心房原基の領域75において最も早く立ち上がっており、ペースメーカーはこの領域の周辺に存在するものと考えられる。

この記録から、われわれは次のような手順で、ペースメーカー領域の位置と大きさを同定した。これをわれわれは「微小測量」法と名づけた。

1) 各測定領域における光学的シグナルの立ち上がりのタイミングの delay を領域75を基準として測る。

2) 各測定領域の中心と領域75の中心との直線距離を横軸にとり、縦軸に delay をとってプロットを行う(図33)。このプロットで、シグナルの delay と距離の間には直線関係が成り

立っていることから、興奮波は、ペースメーカーから心臓のすべての方向に向かって、同心円状に等速度で伝播していることがわかる(図33)。直線の勾配の逆数から興奮の伝播速度が求められる。この心臓では 1.3 mm/sec である。

3) さらに、この直線は原点を通らず、横軸を原点から離れた点でよぎっている。このことは興奮波の発生する場所がある領域を持っていることを示している。そこで、直線を横軸に外挿すると、その外挿値は $21 \mu\text{m}$ である。したがって、この例では、ペースメーカー領域の広さは約 $1,400 \mu\text{m}^2$ となる。

このようにして、8～9 体節期の100例の鶏胚心臓について、ペースメーカー領域の大きさ

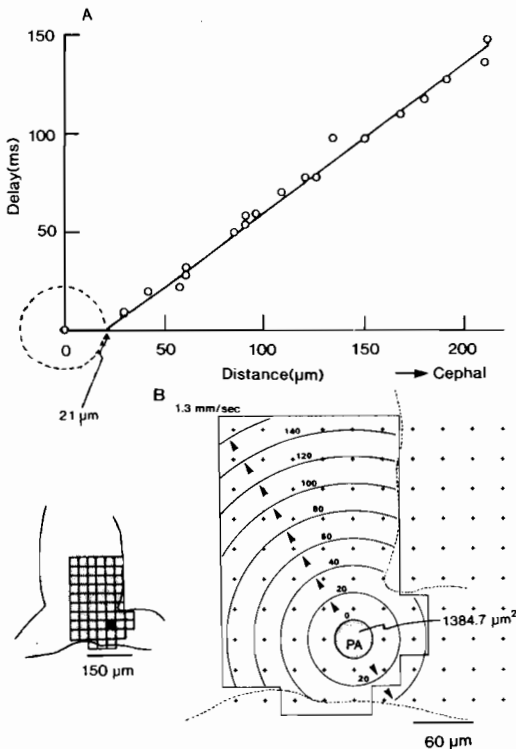


図33. 図32で示した記録をもとにして、興奮波が最初に発現した位置からの直線距離に対して興奮波の立ち上がり時間(delay)をプロットして作成したグラフ(A). および興奮の等時線マップ(B). PAがpacemaking areaに対応する[61].

を測った結果、ペースメーカー領域の半径は、8体節期で $25.2 \pm 5.3 \mu\text{m}$ ($n = 35$), 9体節期で $24.9 \pm 5.1 \mu\text{m}$ ($n = 65$) という値が得られた. このことから、この時期の心臓のペースメーカー領域の大きさは、 $1,200 \sim 3,000 \mu\text{m}^2$ であることがわかる. この結果は、8体節期から9体節期にかけて、心臓全体の大きさが序々に成長してゆくのに対し、ペースメーカー領域の大きさは余り変化しないことを示している.

形態学的には、この時期の心臓は、ほぼ単層に並んだ直径約 $5 \mu\text{m}$ の心筋細胞の層から形成されていることが電顕像から得られている. したがって、心臓形成初期相においては、ペースメーカー領域は、60~150個の細胞から成るシート構造で構成されていると考えることができる. このことは、心臓形成期においても、ペー

スメーカーは単一の細胞ではなく、ペースメーカー能を持った複数の細胞が機能的に強く結合した細胞群によって構成されていることを示している.

ペースメーカー領域の位置は、7~8体節期においてはまだ固定的ではなく、流動的であるが、発生段階がすすみ、9体節期になると左の心房原基に局在するようになり、11体節期になると、さらに左静脈洞原基に移動してくる[62].

このようなペースメーカー領域の形成、局在化には、ペースメーカー電位の場所的勾配が重要な役割をしていることも明らかにされた[63-65].

§16. 補遺：光学計測により最近提示された新しい概念/仮説

膜電位感受性色素をもちいた細胞膜電位活動の光学的計測法による実験結果から最近提示された興味ある概念、仮説のいくつかについてつけ足しておく.

軟体動物アプリシアはエラ周辺の刺激によってエラを引っ込めるという反射行動を示す. L. B. Cohen のグループは、サイフォン(siphon)皮膚の軽い機械的刺激(light-mechanical touch)や感覚神経の電気刺激によって、神経節(abdominal, pleural, pedal, cerebral ganglia)内のニューロン集団(neural population)に誘発される電位活動を光学的に同時計測することによって、神経節内における情報処理は単純な集中回路(dedicated circuit)ではなく分散システム(distributed system)であるという概念(仮説)を打ち出した[66,67]. さらに、これに関連して感覚神経のくり返し刺激による神経節内におけるニューロン応答の trial-to-trial variations とその整合性(consistency)についても新しい概念を提示している[66].

中枢神経系における情報処理機構に関する研究で、単一ニューロン活動を解析するか、ニューロン集団の相互活動を解析するか、のいずれの場合でも、従来の研究は、ほとんどが、なんらかの刺激を与えたときのニューロン活動の変化

を解析してきた。そして、その変化の基準となる刺激前の自発性活動は、ランダムな定常状態であることを前提としている [68]。A. Grinvald のグループは膜電位感受性色素をもちいた光学的計測によって、ネコの視覚野のニューロン集団の活動状態を多数領域から同時記録して得られた結果の解析から、この従来の考え方(仮定)に対して疑問を投げかけ、新しい概念を提示している [69, 70]。すなわち、ニューロン集団の周期的な相関活動“ongoing activity”は、刺激のないときでも常に自発的に発生しており、その同調性はそのニューロン集団内だけでなく、かなり離れた集団の間でもみられることを示した。これは、中枢神経における情報処理機構の研究に新しい視点を与えたものとして注目してよい。

一方、われわれのグループは、孵卵 7~10 日のニワトリ胚脳幹に、従来明らかにされている GABA リセプター (GABA_A, GABA_B, GABA_C) とは性状の異なる新しい GABA リセプター (GABA_D-receptor と名づけた) が存在する可能性を示した [71]。さらにラット胚における延髄で、新しいタイプの Ca-spike を見出し、新しい Ca²⁺-channels の存在を示唆している [72]。これらは、中枢神経系の発生過程で何らかの役割を果たしている可能性があり、光学的計測ではじめて見出されたものとして注目してよいだろう。

本稿から読みとっていただけたと思うが、電位活動の光学的計測法は、決して固定的に体系化されたものではなく、これからも改良が加えられながら、その適用範囲は広がっていくべき実験技術であるといつてよい。したがって、これまでの方法にこだわることなく、新しい色素の合成、計測と解析に必要なコンピューター・プログラミングをふくめて新しい計測システム、データ解析法を開発していくべきであり、そこが腕の見せどころともなる。補足的に膜電位感受性色素をもちいた光学的計測についての最近のレビューを 2 つつけ足しておく [73, 74]。

参 考 文 献

- 1) Cohen LB : Changes in neuron structure during action potential propagation and synaptic transmission. *Physiol. Rev.* **53**, 373-418, 1973
- 2) 神野耕太郎 : 膜電位の光学的検出とポテンシャル・プローブ. *生物物理* **18**, 105-119, 1978
- 3) 神野耕太郎 : ニューロン活動の光学的測定の背景と展開. *神経科学レビュー* 5 (伊藤正男, 植林博太郎編) pp. 155-187, 1991
- 4) Cohen LB, Salzberg BM, Davila HV, Ross WN, Landowne D, Woggoner AS & Wang CH : Changes in axon fluorescence during activity : molecular probes of membrane potential. *J. Memb. Biol.* **19**, 1-36, 1974
- 5) Ross WN, Salzberg BM, Cohen LB, Grinvald A, Davila HV, Waggoner AS & Wang CH : Changes in absorption, fluorescence, dichroism, and birefringence in stained giant axons : optical measurement of membrane potential. *J. Memb. Biol.* **33**, 141-183, 1977
- 6) Gupta RK, Salzberg BM, Grinvald A, Cohen LB, Kamino K, Leshner S, Boyle MB, Waggoner AS & Wang CH : Improvements in optical methods for measuring rapid changes in membrane potential. *J. Memb. Biol.* **58**, 123-137, 1981
- 7) Grinvald A, Kamino K, Leshner S, Cohen LB, Wang CH & Waggoner AS : Larger fluorescence and birefringence signals for optical monitoring of membrane potential. *Biophys. J.* **21**, 82a, 1978
- 8a) Grinvald A, Hildesheim R, Farber IC & Anglister L : Improved fluorescent probes for the measurement of rapid changes in membrane potential. *Biophys. J.* **39**, 301-308, 1982
- 8b) Grinvald A, Salzberg BM, Lev-Ram V & Hildesheim R : Optical recording of synaptic potentials from processes of single neurons using intracellular potentiometric dyes. *Biophys. J.* **51**, 643-651, 1987
- 9) Waggoner AS & Grinvald A : Mechanisms of rapid optical changes of potential sensitive dyes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **303**, 217-242, 1977
- 10) Waggoner AS : Dye indicators of membrane potential. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **8**, 47-68, 1979
- 11) Loew LM : Design and characterization of electrochromic membrane probes. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **6**, 243-260, 1982
- 12) 安井茂夫 : 膜電位感受性色素, 「感光色素」日本感光色素研究所編, pp. 117-133, 1997
- 13) Morad M & Salama G : Optical probes of membrane potential in heart muscle. *J. Physiol.* **292**, 267-295, 1979
- 14) Ross WN & Reichardt LF : Species-specific effects on the optical signals of voltage-sensitive dyes. *J. Memb. Biol.* **48**, 343-356, 1979
- 15) Cohen LB & Salzberg BM : Optical measurement

- of membrane potential. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **83**, 35-88, 1978
- 16) Salzberg BM, Obaid AL & Bezanilla F : Microsecond response of a voltage-sensitive merocyanine dye : Fast voltage-clamp measurements on squid giant axon. *Jpn. J. Physiol.* **43** (suppl. 1), S37-S41, 1993
 - 17) Salzberg BM, Davila HV & Cohen LB : Optical recording of impulses in individual neurones of an invertebrate central nervous system. *Nature* **246**, 508-509, 1973
 - 18) Grinvald A, Salzberg BM & Cohen LB : Simultaneous recording from several neurones in an invertebrate central nervous system. *Nature* **268**, 140-142, 1977
 - 19) Kamino K, Hirota A & Komuro H : Optical indications of electrical activity and excitation-contraction coupling in the early embryonic heart. *Adv. Biophys.* **25**, 45-93, 1989
 - 20) Sakai T, Hirota A, Momose-Sato Y, Sato K & Kamino K : Optical mapping of conduction patterns of normal and tachycardia-like excitations in the rat atrium. *Jpn. J. Physiol.* **47**, 179-188, 1997
 - 21) Komuro H, Sakai T, Hirota A & Kamino K : Conduction pattern of excitation in the amphibian atrium assessed by multiple-site optical recording of action potentials. *Jpn. J. Physiol.* **36**, 123-137, 1986
 - 22a) Loew LM, Cohen LB, Dix J, Fluhler EN, Montana V, Salama G & Wu J-Y : A naphthyl analog of the aminostyryl pyridinium class of potentiometric membrane dyes shows consistent sensitivity in a variety of tissue, cell, and model membrane preparations. *J. Memb. Biol.* **130**, 1-10, 1992
 - 22b) Kanai A & Salama G : Optical mapping reveals that repolarization spreads anisotropically and is guided by fiber orientation in guinea pig hearts. *Circ. Res.* **77**, 784-802, 1995
 - 23) Nakajima S & Gilai A : Radial propagation of muscle action potential along the tubular system examined by potential-sensitive dyes. *J. Gen. Physiol.* **76**, 751-762, 1980
 - 24) Schneider MF & Chandler WK : Voltage dependent charge movement in skeletal muscle : A possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* **242**, 244-246, 1973
 - 25) Chandler WK, Rakowski RF & Schneider MF : A non-linear voltage dependent charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* **254**, 245-283, 1976
 - 26) Jong D-S, Stroffekova K & Heiny JA : A surface potential change in the membranes of frog skeletal muscle is associated with excitation-contraction coupling. *J. Physiol.* **499**, 787-808, 1997
 - 27) Grinvald A, Frostig RD, Lieke E & Hildesheim R : Optical imaging of neuronal activity. *Physiol. Rev.* **68**, 1285-1366, 1988
 - 28) Momose-Sato Y, Sato K, Sakai T, Hirota A, Matsutani K & Kamino K : Evaluation of optimal voltage-sensitive dyes for optical monitoring of embryonic neural activity. *J. Memb. Biol.* **144**, 167-176, 1995
 - 29) Grinvald A, Salzberg BM, Cohen LB, Kamino K, Waggoner AS, Wang CH & Ti D : Simultaneous recording from twelve neurons in the supraesophageal ganglion of *Balanus nubilus* using a new potential sensitive dye. *Biol. Bull. (Woods Hole)* **151**, 411, 1976
 - 30) Salzberg BM, Grinvald A, Cohen LB, Davila HV & Ross WN : Optical recording of neuronal activity in an invertebrate central nervous system : Simultaneous monitoring of several neurons. *J. Neurophysiol.* **40**, 1281-1291, 1977
 - 31) 神野耕太郎 : 膜電位の光学的測定. 「実験生物学講座 5 : 電気的測定法」平本幸男, 竹中敏文編. 丸善, pp.215-233, 1982
 - 32) 佐藤容子 : 光ファイバーセンシングを用いた中枢神経系深部電気活動の光学的測定システムの開発. 平成7年度科学研究費補助金(試験研究B(2))研究成果報告書. 1996
 - 33) Rohr S & Kucera JP : Optical recording system based on a fiber optic image conduit : Assessment of microscopic activation patterns in cardiac tissue. *Biophys. J.* **75**, 1062-1075, 1998
 - 34) Grinvald A, Cohen LB, Leshner S & Boyle MB : Simultaneous optical monitoring of activity of many neurons in invertebrate ganglia using a 124-element photodiode array. *J. Neurophysiol.* **45**, 829-840, 1981
 - 35) Cohen LB & Leshner S : Optical monitoring of membrane potential : Methods of multisite optical measurement. In : *Optical Methods in Cell Physiology*. De Weer P & Salzberg BM (eds), Wiley, New York, pp.71-99, 1986
 - 36) Wu J-Y & Cohen LB : Fast multisite optical measurement of membrane potential. In : *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*. Mason WT (ed), Academic Press, pp.389-404, 1993
 - 37) 神野耕太郎, 広田秋彦, 酒井哲郎, 小室仁 : 活動電位の光学的測定 - Multiple-site optical recording について. *生物物理* **26**, 138-143, 1986
 - 38) Ichikawa M, Iijima T & Matsumoto G : Real-time optical recording of neuronal activities in the brain. In : *Brain Mechanisms of Perception and Memory*. Ono T, Squire LR, Raichle ME, Perrett DI & Fukuda M (eds), Oxford Univ. Press, New York, pp.638-648, 1993
 - 39) Hirota A, Sato K, Momose-Sato Y, Sakai T & Kamino K : A new simultaneous 1020-site optical recording system for monitoring neural activity using voltage-sensitive dyes. *J. Neurosci. Meth.* **56**, 187-194, 1995
 - 40) 神野耕太郎, 広田秋彦, 酒井哲郎 : 細胞膜電位

- 活動の光学的マルチサイト同時計システムの開発. 中谷電子計測技術振興財団十周年記念誌, 249-276, 1995
- 41) Momose-Sato Y, Sato K, Arai Y, Yazawa I, Mochida H & Kamino K : Evaluation of optimal voltage-sensitive dyes for monitoring hippocampal neural activity. submitted
 - 42) Sugai T, Sugitani M & Onoda N : Subdivisions of the guinea-pig accessory olfactory bulb revealed by the combined method with immunohistochemistry, electrophysiological and optical recordings. *Neuroscience* **79**, 871-885, 1997
 - 43) Sato K, Momose-Sato Y, Sakai T, Hirota A & Kamino K : Responses to glossopharyngeal stimulus in the early embryonic chick brainstem : Spatiotemporal patterns in three dimensions from repeated multiple-site optical recording of electrical activity. *J. Neurosci.* **15**, 2123-2140, 1995
 - 44) Salzberg BM, Obaid AL & Gainer H : Large and rapid changes in light scattering accompany secretion by nerve terminals in the mammalian neurohypophysis. *J. Gen. Physiol.* **86**, 395-411, 1985
 - 45) Sato K, Momose-Sato Y, Arai Y, Hirota A & Kamino K : Optical illustration of glutamate-induced cell swelling coupled with membrane depolarization in embryonic brain stem slices. *Neuroreport* **8**, 3559-3563, 1997
 - 46) Momose-Sato Y, Sato K, Hirota A & Kamino K : GABA-induced intrinsic light-scattering changes associated with voltage-sensitive dye signals in embryonic brain stem slices : Coupling of depolarization and cell shrinkage. *J. Neurophysiol.* **79**, 2208-2217, 1998
 - 47) Orbach HS & Cohen LB : 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. Neurosci.* **3**, 2251-2262, 1983
 - 48) Orbach HS, Cohen LB & Grinvald A : Optical mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex. *J. Neurosci.* **5**, 1886-1895, 1985
 - 49) Horikawa J, Hosokawa Y, Nasu M & Taniguchi I : Optical study of spatiotemporal inhibition evoked by two-tone sequences in the guinea pig auditory cortex. *J. Comp. Physiol. A* **181**, 677-684, 1997
 - 50) Momose-Sato Y, Sakai T, Hirota A, Sato K & Kamino K : Optical mapping of early embryonic expressions of Mg^{2+} -APV-sensitive components of vagal glutaminergic EPSPs in the chick brainstem. *J. Neurosci.* **14**, 7572-7584, 1994
 - 51) Sato K, Momose-Sato Y, Hirota A, Sakai T & Kamino K : Optical mapping of neural responses in the embryonic rat brainstem with reference to the early functional organization of vagal nuclei. *J. Neurosci.* **18**, 1345-1362, 1998
 - 52) Arai Y, Momose-Sato Y, Sato K & Kamino K : Optical mapping of neural network activity in chick spinal cord at an intermediate stage of embryonic development. *J. Neurophysiol.* **81**, 1889-1902, 1999
 - 53) Sawanobori T, Hirano Y, Hirota A & Fujii S : Circus-movement tachycardia in frog atrium monitored by voltage-sensitive dyes. *Am. J. Physiol.* **247**, H185-H194, 1984
 - 54) Dillon S & Morad M : A new laser scanning system for measuring action potential propagation in the heart. *Science* **214**, 453-456, 1981
 - 55) Salama G, Lombardi R & Elson J : Maps of optical action potentials and NADH fluorescence in intact working heart. *Am. J. Physiol.* **252**, H384-H394, 1987
 - 56) Muller W, Windisch H & Tritthart HA : Fast optical monitoring of microscopic excitation patterns in cardiac muscle. *Biophys. J.* **56**, 623-629, 1989
 - 57) Rohr S & Salzberg BM : Characterization of impulse propagation at the microscopic level across geometrically defined expansions of excitable tissue : multiple site optical recording of transmembrane voltage (MSORTV) in patterned growth heart cell cultures. *J. Gen. Physiol.* **104**, 287-309, 1994
 - 58) Kamino K : Optical approaches to ontogeny of electrical activity and related functional organization during early heart development. *Physiol. Rev.* **71**, 53-91, 1991
 - 59) 神野耕太郎 : 心臓の発生と調律の発現. 心電図 (日本心電学会誌) **18** (S2), 32-54, 1998
 - 60) Hirota A, Kamino K, Komuro H & Sakai T : Mapping of early development of electrical activity in the embryonic chick heart using multiple-site optical recording. *J. Physiol.* **383**, 711-728, 1987
 - 61) Kamino K, Komuro H, Sakai T & Hirota A : Functional pacemaking area in the early embryonic chick heart assessed by simultaneous multiple-site optical recording of spontaneous action potentials. *J. Gen. Physiol.* **91**, 73-591, 1988
 - 62) Kamino K, Hirota A & Fujii S : Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. *Nature* **290**, 595-597, 1981
 - 63) Sakai T, Hirota A, Fujii S & Kamino K : Flexibility of regional pacemaking priority in early embryonic heart monitored by simultaneous optical recording of action potentials from multiple sites. *Jpn. J. Physiol.* **33**, 337-350, 1983
 - 64) Kamino K, Komuro H & Sakai T : Regional gradient of pacemaker activity in the early embryonic chick heart monitored by multisite optical recording. *J. Physiol.* **402**, 301-314, 1988
 - 65) Sakai T, Yada T, Hirota A, Komuro H & Kamino K : A regional gradient of cardiac intrinsic rhythmicity depicted in embryonic cultured multiple

- hearts. Pfluger. Arch.-Eur. J. Physiol. **437**, 61-69, 1998
- 66) Tsau Y, Wu J-Y, Hopp H-P, Cohen LB, Schimino-vich D & Falk CX : Distributed aspects of the response to siphon touch in Aplysia : Spread of stimulus information and cross-correlation analysis. J. Neurosci. **14**, 4167-4184, 1994
 - 67) Wu J-Y, Cohen LB & Falk CX : Neuronal activity during different behaviors in Aplysia : A distributed organization? Science **263**, 820-823, 1994
 - 68) 櫻井芳雄 : ニューロン集団の相関活動をみる. 科学 **66**, 784-792, 1996
 - 69) Arieli A, Shoham D, Hildesheim R & Grinvald A : Coherent spatiotemporal patterns of ongoing activity revealed by real-time optical imaging coupled with single-unit recording in the cat visual cortex. J. Neurophysiol. **73**, 2072-2093, 1995
 - 70) Arieli A, Sterkin A, Grinvald A & Aertsen A : Dynamics of ongoing activity : Explanation of the large variability in evoked cortical responses. Science **273**, 1868-1871, 1996
 - 71) Momose-Sato Y, Sato K, Hirota A, Sakai T, Yang X-S & Kamino K : Optical characterization of a novel GABA response in early embryonic chick brainstem. Neuroscience **80**, 203-219, 1997
 - 72) Momose-Sato Y, Sato K & Kamino K : Optical identification of calcium-dependent action potentials transiently expressed in the embryonic rat brainstem. Neuroscience, **90**, 1293-1310, 1999
 - 73) Ebner TJ & Chen G : Use of voltage-sensitive dyes and optical recordings in the central nervous system. Prog. Neurobiol. **46**, 463-506, 1995
 - 74) Wu J-Y, Lam Y-W, Falk CX, Cohen LB, Fang J, Loew L, Prechtel JC, Kleinfeld D & Tsau Y : Voltage-sensitive dyes for monitoring multineuronal activity in the intact central nervous system. Histochem. J. **30**, 169-187, 1998