

---

## 膜電位の光学的検出のための高能率の膜電位-光変換色素の探索

Screening of voltage-sensitive dyes for optical monitoring of rapid membrane potential changes

代表研究者 東京医科歯科大学医学部教授 神野 耕太郎  
Prof., Tokyo Medical and Dental Univ. School of Med.  
Kohtaro KAMINO

協同研究者 東京医科歯科大学医学部助手 広田 秋彦  
Instructor, Tokyo Medical and Dental Univ. School of Med.  
Akihiko HIROTA

東京医科歯科大学医学部助手 酒井 哲郎  
Instructor, Tokyo Medical and Dental Univ. School of Med.  
Tetsuro SAKAI

東京医科歯科大学医学部助手 小室 仁  
Instructor, Student, Tokyo Medical and Dental Univ. School of Med.  
Hitoshi KOMURO

In an effort to improve the utility of optical methods for monitoring rapid membrane potential changes in neuronal and muscular tissues, we have searched for dyes which are more sensitive to rapid changes in membrane potential. About 50 dyes were tested on the early embryonic chick hearts, the embryonic chick semilunar ganglion and giant axon from the squid, and larger changes in absorption were obtained with several merocyanine-rhodanine and oxonol dyes. Of these dyes, particularly, a merocyanine-rhodanine dye in which the 3-alkyl rhodanine is replaced with a 3-butyl rhodanine, was found to be the best molecular indicator for monitoring action potential activity.

---

### 研究の背景と目的

神経系における情報は活動電位という電気的信号によって伝えられ、骨格筋と心臓など筋細胞の収縮運動は細胞膜に発生する電気的興奮 (electrical excitation), すなわち活動電位と関連して発現する。このような活動電位という生体の電気活動は、通常、先端の直径が  $0.5\mu\text{m}$  以下の尖った細いガラス管で作った微小電極を細胞に刺入していわゆる電気生理学的方法で測定される。ところが、このような方法にもその適用には限界がある。例えば、微小電極を刺入できないほど微小な細胞からの活動電位の測定とか、さらに、非常に多数個の細胞とか、多数個所の部位から活動電位を同時記録するというようなことは技術的にまず

不可能とってよい。

最近、このような電気生理学的方法の適用限界を補ない得る方法の一つとして、活動電位を光学的信号に変換してモニターする方法が開発されてきた。

この方法は、イカ巨大神経線維で活動電位に伴う光学的変化が見いだされたことに端を発している。膜電位依存性の光学的変化は、膜自体の光学的特性に直接関係した光散乱とか複屈折性など内因性 (intrinsic) の変化と、外部から特定の色素を膜に吸着させたときに観測される蛍光とか吸光度など外来性 (extrinsic) の変化がある。

膜電位の光学的測定は、このような膜電位の変化に伴う光学的変化を利用して、光学的変化から

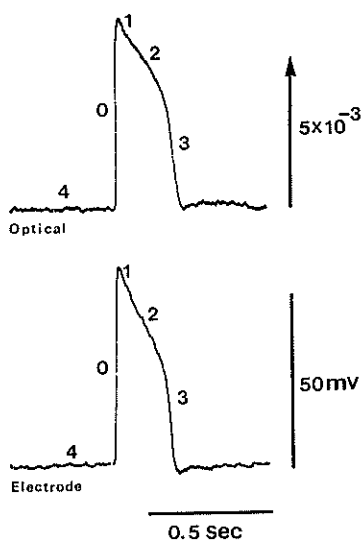


図 1. 蛙心房筋をメロシアン・ローダニ色素 (NK 2761) で染色して、微小電極による活動電位 (下側の記録) と吸光変化 (上側) の同時記録。測定波長 700 nm. 拍動によるアーチファクトを避けるため、リンゲル液内の  $\text{Ca}^{2+}$  を除去して測定。

逆に膜電位の変化を検出しようとするものである。しかしながら、内因性的変化は非常に小さいので、特殊な目的の測定でないかぎり、膜電位の光学的測定には、膜電位感受性色素 (voltage-sensitive dyes) を用いた蛍光とか吸光の変化が用いられる。

図 1 はメロシアン系の色素で染色したウシガエル (*Rana catesbiana*) の心房筋で活動電位と吸光変化を同時記録したものである。このように、時間経過、形状とも活動電位によく似た吸光変化が観測される。膜電位と光学的変化の直接的な対応関係はイカ巨大神経を用いた膜電位固定法 (voltage-clamp) による実験で確かめられている。

光学的変化の大きさは、通常、背景光 (細胞が静止状態にあるときの吸光あるいは蛍光の強度) に対する変化分の比、すなわち、fractional change ( $\Delta I/I$ ) で表す。この吸光あるいは蛍光の fractional change は、静止電位から膜分極側あるいは過分極側への 100 mV 範囲では、近似的に膜電位に比例する。

膜電位変化に対する感受性はかなり多くの色素で見られるが、その感受性の程度は色素により差異がある。これまで、1000 種類以上の色素がスクリーニングにかけられ、その中から膜電位変化に対して比較的大きい応答を示す色素として、メロシアン系 (merocyanine) 系、オキソノール系 (oxonol) 系、スティリル系 (styryl) 系およびシアン系 (cyanine) 系色素が選別され、ポテンシャル・プローブとして用いられている。しかしながら、これらの色素では、50 mV の膜電位変化に伴う光学的変化 (fractional change) は  $10^{-4}$  のオーダーであり、微小な膜電位変化をモニターするためには膜電位変化に対して感受性のより大きい色素が要求される。

そこで、我々は、高効率で膜電位変化を光学変化に変換する高感度膜電位感受性色素の探索、合成開発を行ってきた。

膜電位検出用の色素としては、いろいろな条件を満たさなければならないが、色素の選別は次のような基準のもとになされた。

1. 膜電位変化に対して大きな蛍光あるいは吸光変化を示すこと；
2. 信号対雑音比が大きいこと；
3. 膜電位変化に対する応答時間が短いこと；
4. 細胞に対して薬理的毒性、光化学的作用を与えないこと；
5. 退色時間ができるだけ長いこと。

比較的大きな膜電位依存性の光学変化を示す色素でも、他の条件を満足しないものは、人工膜のような実験系では有効であっても、生理学的実験には適さないので除外された。

#### 研究経過と成果

今迄に得られたデータから、メロシアン系、オキソノール系、スティリル系色素が膜電位変化に対して比較的高い感受性を示すことが見だされていたが、さらに、新しく合成された色素、最近入手した色素について、膜電位依存性の光学的変化を調べた。実験は鶏初期胚心臓の自発性活動電位、鶏初期胚の三叉神経節の誘発性膜電位応答、およびイカ巨大神経線維の膜電位固定に伴う吸光あるいは蛍光変化について行なわれた。

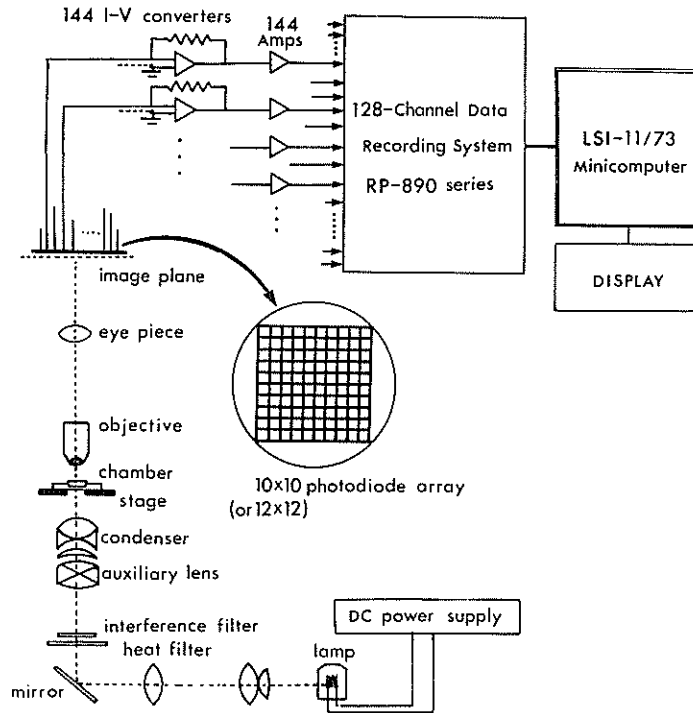


図 2. 吸光変化を 100~128 か所から同時記録する装置の模式図。

現段階では、まだ結果を体系的にまとめるまでに至っていないので、ここでは、これまで得られた結果を枚挙的に記載することにする。

#### 初期胚心臓における自発性活動電位

ふ卵約 25~28 時間の (7 体節期) の鶏胚で、中胚葉由来の左右一対の心臓原基 (cardiac primordium) はお互いに融合し始め、30~32 時間 (9 体節期) までに単一の管状のプリミチヴな心臓が形成され、やがて最初の拍動が開始するが、膜電位感受性色素を用いた光学的測定法によって我々は、この心臓形成の初期段階で、拍動開始に先行して、自発性の電氣的興奮が既に始まっていることを初めて見いだした。これは、心機能の初期発生についての研究の突破口ともなったが、一方、拍動開始以前の初期胚心臓は、ポテンシャル・プローブとしての色素をスクリーニングするためにも適していることが確かめられた。

そこで、我々は、9 体節期鶏胚の心臓を用いて、いくつかの色素について、膜電位感受性テストを

行なった。

図 2 は、この実験に用いた測定装置の模式図である。光学系には大型の光学顕微鏡 (Olympus Vanox, model AHB-LB-1) を用いている。干渉フィルターによって準単色光にした光源からの光で顕微鏡のステージに置いたチェンバー内初期胚についてそのままの状態で色素で染色した心臓を照射し、拡大された実像面からフォトダイオードで心臓からの透過光 (吸光) の変化を検出した。光源にはタングステン・ハロゲンランプを用い、直流安定化電源で駆動し、フォトダイオードとしては、100 個あるいは 144 個のフォトダイオードを 10×10 あるいは 12×12、マトリックス型に並べて作られたダイオードアレイ (Matrix Array, Type MD 100 or MD 144) を用いた。100~144 個の電流-電圧変換装置によって、光電流を電圧に変換してから 100~144 個のアンプリファイアによって増幅した後、まず、多チャンネルレコーディングシステムに収録し、さらにコンピュー

表 1. 初期胚心臓でテストされたメロシアンニン・ローダニン色素

$n$	Alkyl chain	Signal size ( $\Delta I/I$ )*
2	Ethyl	$< 10^{-4}$
3	Propyl	$3.0 \sim 7.0 \times 10^{-4}$
4	Butyl	$2.0 \sim 3.5 \times 10^{-3}$
5	Pentyl	$1.5 \sim 2.0 \times 10^{-3}$
6	Hexyl	$1.7 \sim 2.0 \times 10^{-3}$
8	Octyl	$0.7 \sim 1.0 \times 10^{-3}$

\* Signal size は fractional change で表してある。

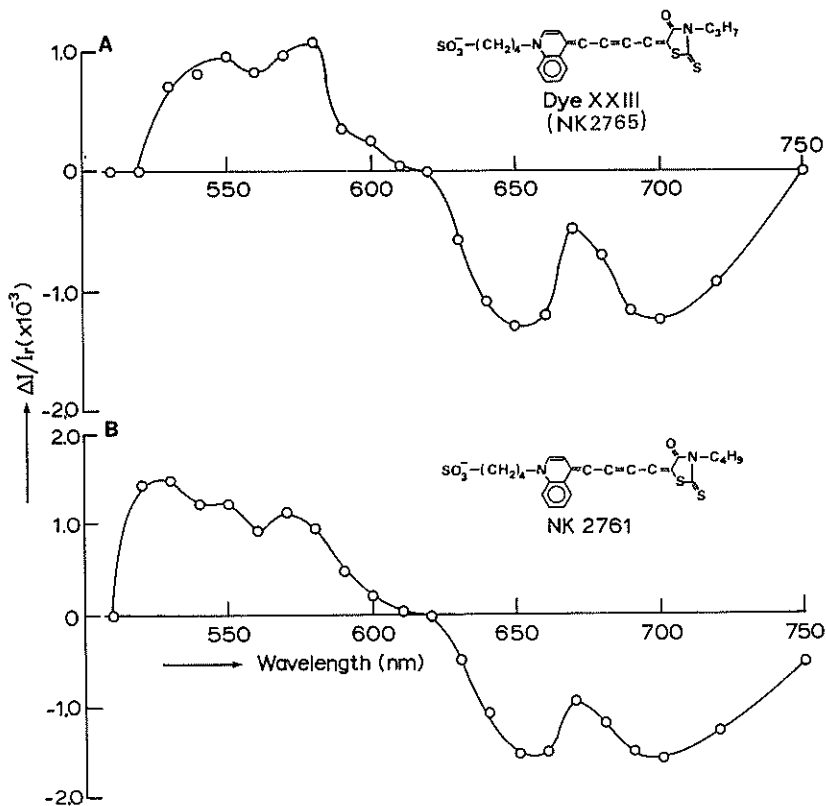


図 3. メロシアンニン・ローダニン色素 (NK 2761, 2765=DyeXXIII) で染色した鶏初期胚 (9 体節期) 心臓における自発性活動電位に伴う透過光変化 (fractional change) の波長スペクトル. 上向きが透過光の増大 (吸光度の減少), 下向きが透過光の減少 (吸光度の増大) を表す。

ターに転送して記録した。

メロシアンニン系の中で特にメロシアンニン・ローダニン (merocyanine-rhodanine) 系の色素, sodium-4[4-(3-alkylrhodanine-5)-[1- $\delta$ -triethyl-

ammonium sulphobutyl-1,4-dihydroquinoline-4-]-tetramethinemerocyanine を選び, ローダニン核についたアルキル基を, ethyl, propyl, butyl, pentyl, hexyl, octyl にしたものを

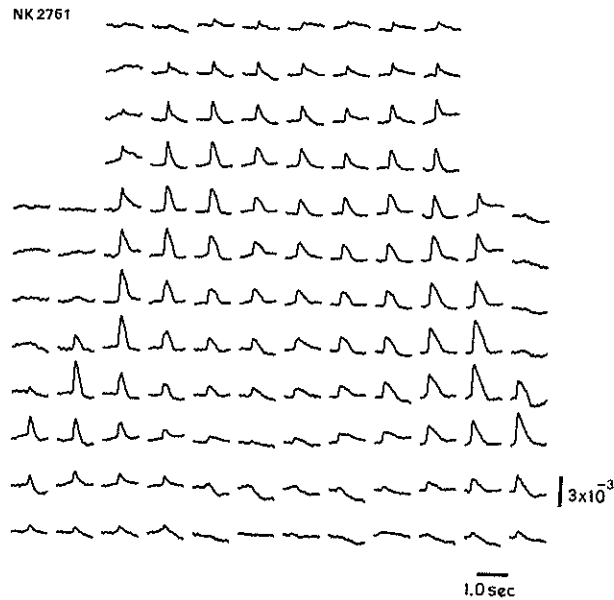


図 4. NK 2761 で染色した鶏の体節期胚心臓の 128 か所からの自発性活動電位の同時記録例。測定波長 700 nm.

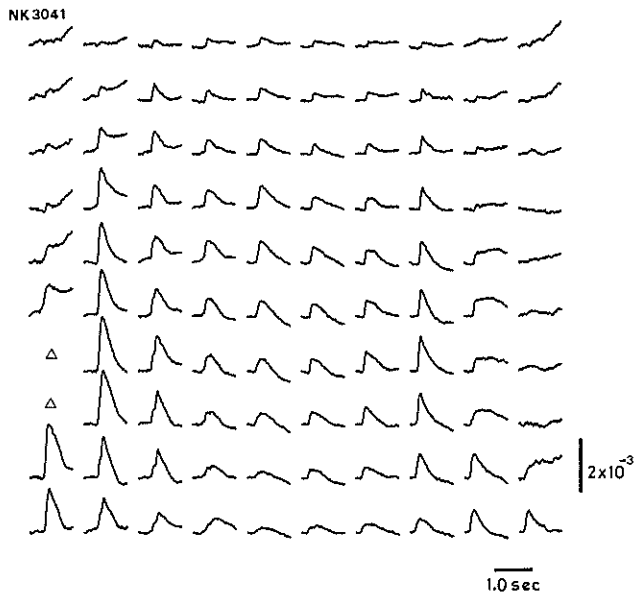
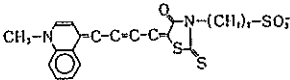
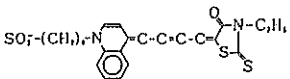
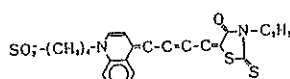
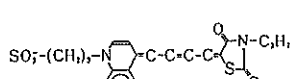
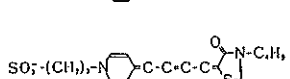
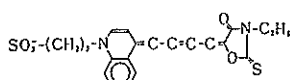
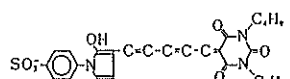


図 5. オキソノール系色素 (NK 3041, RH 155) で染色した鶏 9 体節期胚心臓の 100 か所の部位からの自発性活動電位の同時記録例。

合成して、活動電位依存性の吸光シグナルの大きさを比較した。表 1 に結果をまとめて示してある。アルキル基,  $-C_nH_{2n+1}$  を  $n=2$  から 4, すなわち ethyl から butyl まで長くするに従ってシグナ

ルの大きさは大きくなり, butyl にしたとき, 最も大きなシグナルが得られた。ところが, アルキル基を pentyl から octyl までさらに長くすると, 色素は生理的塩溶液に溶けにくくなり, シグナル

表 2. 神経節でテストされた色素

MEROCYANINE-RHODANINES	
NK 2385	
NK 2389	
Dye XVII (NK 2495)	
Dye XXII (NK 2765)	
NK 2761	
MEROCYANINE-OXAZOLONE	
NK 2367	
OXONOL	
NK 2935	

の大きさもしだいに減少した。これは、アルキル基の長さが  $n=5$  以上では、色素の疎水性が増大することによって水溶性が失われる結果によると考えられる。このことから、メロシアン・ローダニン系色素では、ローダニン核についたアルキル基の長さがシグナルの大きさを決める因子の一つであり、そのポテンシャル・プローブとしての最適の長さは  $n=4$  で、すなわち butyl であることが明らかにされた。このことから、アルキル基

を持つ他の色素でも、これを butyl にすることで、かなり高感度の膜電位感受性色素を合成することが可能であることが示唆された。

図 3 は、アルキル基を butyl にした色素 (NK 2761) と propyl にした色素 (Dye XXIII, NK 2765) で染色した心臓から測定されたシグナルの fractional change の波長依存性である。メロシアン・ローダニン系色素では、一般にこのように、700 nm と 530 nm 付近に極大値を持つ 2 相性のスペクトルを示し、610~620 nm でシグナルは消失する。したがって、我々は通常 700 nm の波長で測定している。

図 4 は NK 2761 で染色した 9 体節期心臓の 104 か所の領域 (区画) から自発性の活動電位を同時記録したものである。fractional change が  $2 \times 10^{-4}$  から  $3 \times 10^{-3}$  までの大きさのシグナルがディテクトされており、この色素ではかなり小さな活動電位も検出できることがわかる。実際、我々は、この色素を用いて、6 体節期における未融合の心臓原基細胞から非常に小さい電気活動の記録に成功している。さらに、オキソノール系の色素、(NK 2935) についてのテストを行なった。図 5 はその測定例である。この色素も 700 nm で最も大きいシグナルが得られ、fractional change も  $10^{-3}$  のオーダーで比較的大きい値を示す。しかしながら、NK 2761 に比べて、退色時間が比較的短い傾向がみられた。したがって、この色素は長時間の測定には適していないが、短時間に終る測定には有用である。

#### 初期胚三叉神経節

三叉神経節は鶏の個体発生の過程で、最も早く認められる最も大きな神経節である。三叉神経節には眼神経 (ophthalmic nerves), 上顎神経 (maxillary nerves) および下顎神経 (mandibular nerves) の 3 種類の求心性神経線維が入っている。しかしながら、ふ卵 6 日から 10 日ごろの鶏胚では、三叉神経節の近くでは、上顎神経と下顎神経は一つの束となっており、両者を区別することは困難である。

我々は、眼神経、あるいは上顎-下顎神経束を吸引電極で刺激して、三叉神経節内のニューロンに

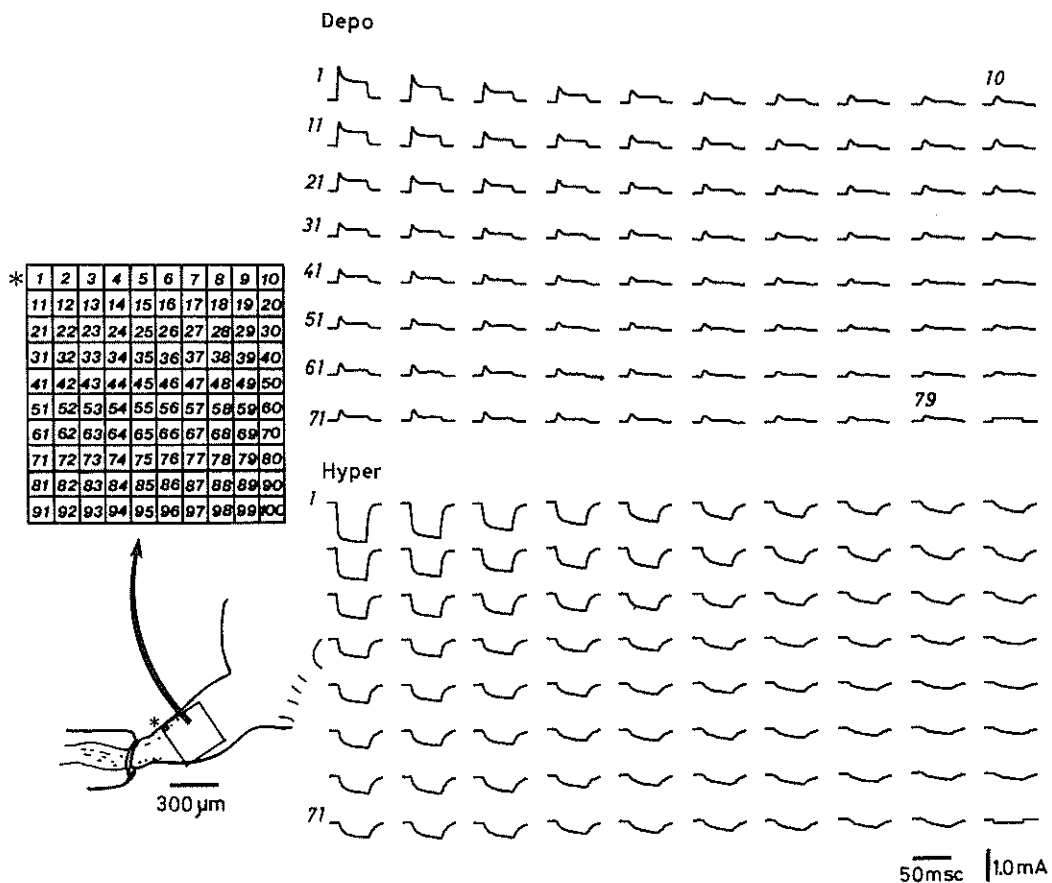


図 6. NK 2763 で染色した鶏胚 (子卵 6 日) 三叉神経節の膜電位応答の光学的記録例. 求心性の眼神経を吸引電極で脱分極側 (Depo) および過分極側 (Hypo) へ 0.5 mA の電流を流して刺激し, 700 nm の波長で 80 か所の部位から同時記録したもの.

誘発される膜電位応答を光学的に検出することによって, 個体発生に伴う三叉神経節内における機能的連絡構造の形成過程を追跡するため, いくつかの膜電位感受性色素についてのテストを行なった. スクリーニングにかけられた色素は merocyanine-rhodanine, merocyanine-oxazolone, および oxonol 系である (表 2).

三叉神経の場合でも, 最も大きなシグナルが得られたのはメロシアン・ローダニン系の NK 2761 であった. 図 6 は, この色素で記録した三叉神経節におけるニューロンの膜電位応答である. これはふ卵 6 日目の鶏胚から摘出した神経節を NK 2761 で染色して, 眼神経を吸引電極で脱分極向きあるいは過分極向きへの刺激電流によ

て誘発された神経節内の膜電位応答を 80 か所の部位 (区画) から同時記録したものである. 測定装置と測定方法は, 心臓における測定と全く同じである (図 2).

図 6 の記録で, 膜電位応答の場所的広がりとその減衰の様子がよくわかり, NK 2761 の吸光変化が膜電位応答のレベルをかなり鋭敏に反映していることを示している.

図 7 はオキソノール系色素 (NK 3041) で染色して得られた膜電位応答をふ卵 6 日目鶏胚の三叉神経節の 15 か所から同時記録したものである. この場合に比較的大きな膜電位依存性の吸光変化を示している.

NK 2761, NK 3041 以外の色素で得られた結

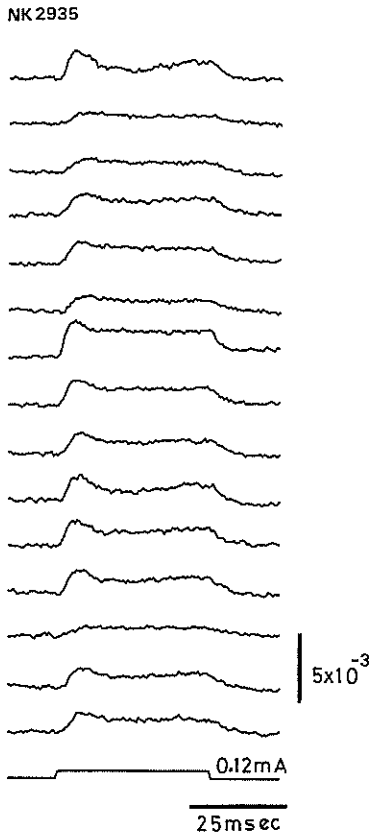


図 7. 鶏胚 (ふ卵 6 日) の三叉神経節における膜電位応答のオキソノール系色 NK 2935 による光学的測定. 眼神経を脱分極側へ 0.12 mA で刺激して, 波長 700 nm で 15 か所から同時測定したもの.

果は図 8 にまとめておく。

さらに, いくつかの styryl 系色素についてもテストを行なったが, 吸光測定に関する限り, ポテンシャル・プローブとして有効なシグナルを示す色素は見いだせなかった。

#### イカ巨大神経線維

この実験は 1985 年 7~8 月, Marine Biological Laboratory (Woods Hole, Massachusetts, USA.) において, L.B. Cohen (Yale 大) の協力のもとに行なわれた。

ヤリイカ (*Loligo pealei*) の神経線維 (軸索) は直径が 300~700  $\mu\text{m}$  で, 内部灌流や膜電位固定などが行ないやすいことで神経生理学の実験では

よく用いられてきた材料の一つである。このヤリイカの巨大神経線維をいろいろな色素で染色して, 膜電位固定を行ない, これに伴う吸光および蛍光の変化を同時測定した。

図 9 はイカの巨大神経線維の蛍光および吸光変化の測定に用いられた装置の模式図である。この装置は蛍光と吸光変化が同時記録できるように設計されている。光源としてのタングステン・ハロゲンランプからの光をコンデンサーで集め, 干渉フィルター 1 によって所定波長の準単色光とした後, 色素で染色した神経線維に照射する。入射光の前方方向で透過光の変化, すなわち吸光変化を測定するが, 神経線維からの透過光はまず対物鏡で集め, スリットを神経線の像の幅と同じぐらいに絞ったあとフォトダイオードで受光し, 光電流を電圧に変換し, さらに増幅してコンピューターを介して記録した。一方, 入射光と直角方向にフォトダイオードを置き, フィルター 2 (emission filter) を通して蛍光変化を記録した。神経線維の中には通電用の電極 (current wire) と電位記録用の電極 (voltage wire) を挿入して, 膜電位を一定レベルに固定した。この実験で膜電位は通常, 静止電位レベルから脱分極側および過分極側へ向かって 50 mV に固定して, この電位に対応した蛍光および吸光の変化を記録した。

イカ巨大神経線維を膜電位感受性色素で染色したとき, 吸光変化あるいは蛍光変化は, 時間経過も形状も膜電位固定と一致する。今回の実験では, styryl, oxonol, merocyanine-rhodanine, cyanine その他の色素約 40 種類についてテストを行ない, 信号対雑音比 (S/N) を測定した。得られた結果は表 3 に示した通りであった。ただし, テストした cyanine 系色素のほとんどで蛍光, 吸光とも変化を検出することができなかった。それらの大半については表から除外した。

このテストでは, NK 2761 および NK 3041 についても合せて行なわれたが, この表に見られるように, 他の色素の中からは, 優れたものを見いだすことはできなかった。しかしながら, NK 2383 および NK 2792 は, その構造をいくらか変えることによって, より感受性の大きい色素に改



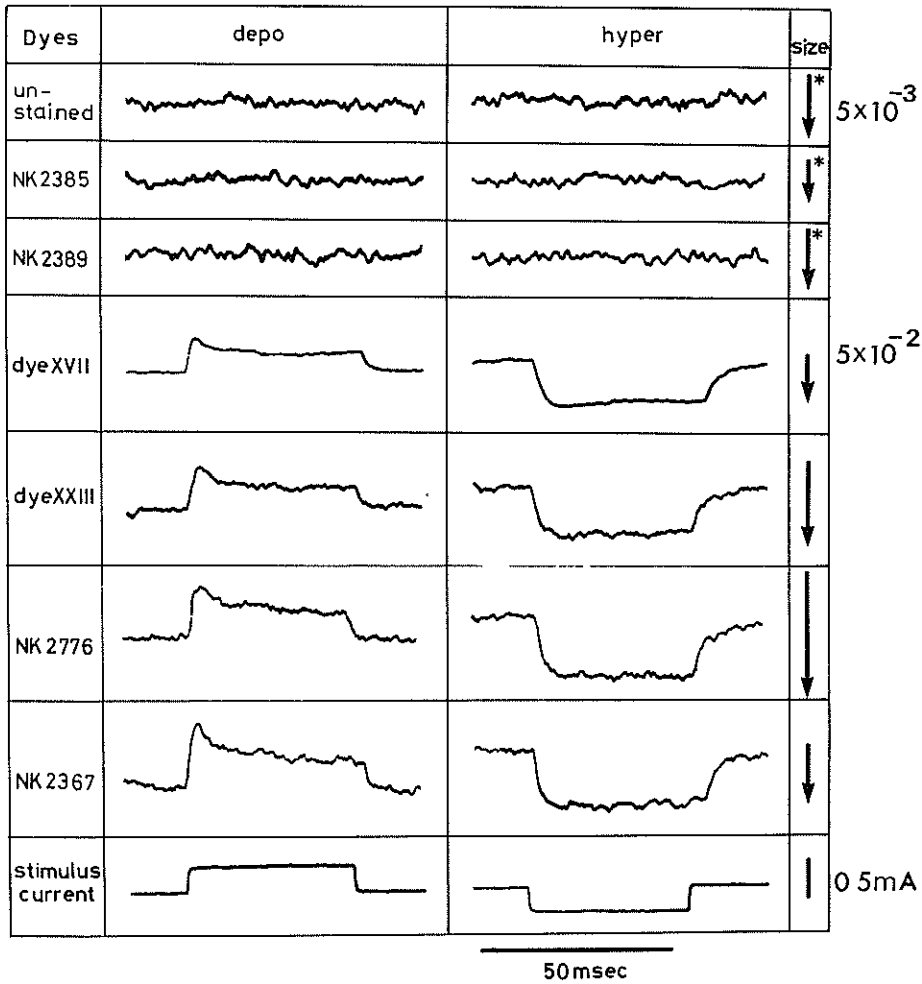


図 8. 鶏胚三叉神経節における膜電位応答に対する 6 種類の色素の感受性の比較。

良できることが期待される。

#### 今後の課題

この研究は、現在でも進行中のものであり、まだ、完成したものではない。したがって、最終的結論を出すに至っていないが、これからの研究に対して、いくつかの示唆を与えているように見える。

まず、これまでに得られた結果としては、吸光測定に関しては、(1) メロシアニン・ローダニン系色素とオキソノール系色素の中に、膜電位変化に鋭敏な感受性を示す色素が見いだされ、(2) 特にメロシアニン・ローダニン系色素では、3

-alkyl 鎖の長さが吸光変化の大きさに関与していること、(3) 一般には分子吸光係数の大きい色素が膜電位依在性の変化も大きい傾向を示すこと、が得られた。このような実験結果は、これからの色素の探索、合成開発にとって、一つの方向性を示唆している。

さらに、膜電位依存性の光学的変化のメカニズムの解明と、色素の構造と吸光、蛍光変化との間の対応関係のより詳細な解析が、より高感度な膜電位感受性色素の開発にとって今後に残された大きな課題である。しかしながら、一方、枚挙的な方法もまだまだ必要であると考えられる。

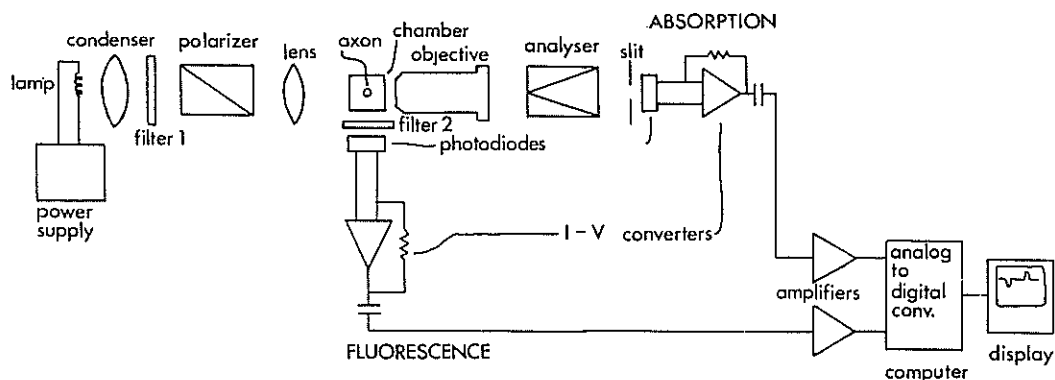
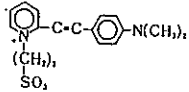
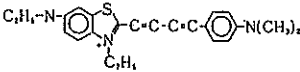
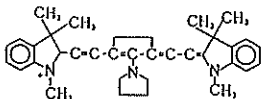
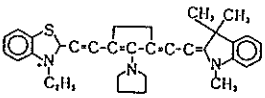
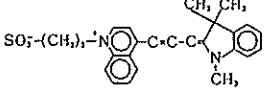
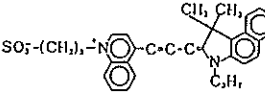


図 9. イカ巨大神経線維の吸光，蛍光変化の測定に用いられた装置の模式図。

表 3. イカ巨大神経線維でテストされた色素

色 素	構 造 式	S/N	
		螢光	吸光
MEROCYANINE-RHODANINES			
NK 2761		Small	> 40
NK 2775		ns	ns
NK 2814		ns	ns
MEROCYANINES			
NK 2383		0.2	7
NK 2565		0.1	ns
OXONOL			
RH 155 (NK 3041)		> 30	> 30

表3. つづき

色 素	構 造 式	S/N	
		蛍光	吸光
STYRYLS			
NK 2451		ns	ns
NK 2792		3.5	3
CYANINES			
NK 2437		1	2
NK 2447		2	2
NK 2802		0.2	ns
NK 2803		1.7	3

最後に、本研究を遂行するにあたりご援助いただいた日産科学振興財団、ならびに色素の合成にご協力をいただいた日本感光色素研究所に感謝の意を表します。

発表論文

- 1) T. Sakai, A. Hirota, H. Komuro, S. Fujii and K. Kamino: Optical recording of membrane potential from early embryonic chick ganglia using a voltage-sensitive dyes. *Dev. Brain Res.*, 17, 39-51 (1985).
- 2) H. Komuro, A. Hirota, T. Yada, T. Sakai, S. Fujii and K. Kamino: Effects of calcium on electrical propagation in early embryonic pre-contractile heart as revealed by multiple-site optical recording of action potentials. *J. Gen. Physiol.*, 85, 365-382 (1985).

- 3) T. Yada, T. Sakai, H. Komuro, A. Hirota, and K. Kamino: Development of electrical rhythmic activity in early embryonic cultured chick double-heart monitored optically with a voltage-sensitive dye. *Dev. Biol.*, 110, 455-466 (1985).
- 4) A. Hirota, K. Kamino, H. Komuro, T. Sakai and T. Yada: Optical studies of excitation-contraction coupling in the early embryonic chick heart. *J. Physiol. (London)*, 366, 89-106 (1985).
- 5) A. Hirota, K. Kamino, H. Komuro, T. Sakai and T. Yada: Early events in development of electrical and contraction in embryonic rat heart assessed by optical recording. *J. Physiol. (London)*, 369, 209-227 (1985).
- 6) H. Komuro, T. Sakai, A. Hirota and K. Kamino: Conduction pattern of excitation in the amphibian atrium assessed by multiple-site op-

- tical recording of action potentials. *Jpn. J. Physiol.*, **36**, 123-137 (1986).
- 7) A. Hirota, K. Kamino, H. Komuro and T. Sakai: Mapping of early development of electrical activity in the embryonic chick heart using multiple-site optical recording. *J. Physiol. (London)*, **383**, 711-728 (1987).
- 8) K. Kamino, A. Hirota, T. Sakai and H. Komuro: Conduction of spontaneous action potential in the early embryonic precontractile heart monitored by multiple-site optical recording. In *Cardiac Muscle*, ed. by W. R. Gilles, Alan R. Liss, Inc. New York, in press (1987).
- 9) 神野耕太郎: 心機能の初期発生—活動電位の光学的測定によるアプローチ, *科学*, **55**(5), 290-299 (1985).
- 10) 神野耕太郎: 広田秋彦, 酒井哲郎, 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*, **23**(2), 73-80 (1985).
- 11) 神野耕太郎: 膜電位感受性色素, *生体の科学*, **36**(4), 376-379 (1985).
- 12) 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, *生物物理*, **26**(3), 138-143 (1986).