

LECTURES

多変量解析的手法による蛍光スペクトル成分分離法と その細胞生理学的実験への応用

東京女子医科大学 医学部 第二生理学教室

白川 英樹

要 旨

多様な分子間の相互関係・相互作用からなる細胞内シグナル伝達機構の解明のためには、複数のシグナル分子の動態の同時測定・解析が重要になる。現在様々な蛍光性プローブが生細胞での測定に利用可能であるが、多くのプローブを同時に用いる場合それぞれのシグナルを正確に分離する手段が必要になる。複数の成分が混在する試料の蛍光の分光測定データから各成分を分離する方法の中で、Parallel Factor Analysis (PARAFAC) は、個々の成分スペクトルについての先見情報を必要としないこと、他の多変量解析的な方法と違い実際のスペクトルが一意な解として得られることなどから、未知の成分を含む生物試料にも適用可能な有力な手法である。単一細胞の顕微分光測光データに適用することで、複数のプローブと内因性蛍光成分との同時測定や、シグナル変化率の小さなプローブを用いた測定を容易に行うことができる。

キーワード：蛍光顕微分光測光，蛍光分光イメージング，多因子同時測定，スペクトル分離，多変量解析

1. はじめに

今日の医学生物学諸分野での研究は「蛍光」なくしては成り立たないのではないか。そう思わせるほど、各種蛍光分子を利用した観察・測定法は様々な目的の実験で用いられている [1]。生理学分野においても、fura-2を用いて生きた細胞内のカルシウム濃度変化を測定する、機能タンパク質にGFPをつないで細胞内での動的な挙動を可視化する、といった実験は今やごく一般的な手法の部類に入る。

蛍光を検出シグナルとして使うことの利点の一つはその感度の高さで、光学系の改良や光検出器の進歩により近年では蛍光分子1分子レベルの観察すら可能である。しかし実用的な観点からさらに重要なのは、蛍光分子の状態や種類によって波

長特性、すなわちスペクトルが異なるという点である。fura-2によるカルシウム測定は、カルシウムと結合することで励起スペクトルがシフトすることを用いたものである。また、異なるスペクトルを持つプローブを組み合わせると2つ以上の分子種を「色分け」して同時観察することも可能である。複数のプローブを同時に使用する際は、なるべくスペクトルが大きく異なるものを選び、それぞれの測定チャンネルとして互いのシグナルの混入（クロストーク）がない励起波長・蛍光波長を選ぶのが基本である。しかし実際には利用できるプローブの種類や光学系の制限のため、クロストークのない測定波長の設定が困難なことも多い。この問題は同時使用するプローブ数が多くなるほど必然的に深刻化し、完全にクロストークのない測

定チャンネルの設定は事実上不可能になる。従って多種類のプローブの同時測定の際には、クロストークのない測定データを得ようとするよりも、クロストークが含まれるデータ系列からそれぞれのシグナルを分離する手段を講ずる方が実際的である。

本稿では、多くの成分が混在する蛍光測定データから個々のスペクトル成分を分離する方法 (spectral decomposition methods) の一例として、最近筆者が行っている多変量解析的手法によるアプローチとその細胞生理学的実験への応用について紹介したい [2]。

II. 蛍光シグナルの線形性

低濃度の溶液では、その蛍光強度と蛍光分子濃度との関係は線形である。すなわち蛍光強度は蛍光分子濃度に比例し、また複数の蛍光分子種が混在している試料の蛍光強度は各々の分子種由来の蛍光強度の和になる。

$$f_m = \sum_{n=1}^N s_{mn}c_n \quad (1)$$

ここで f_m はある波長条件 m における蛍光強度、 c_n と s_{mn} は成分 n の濃度および単位濃度あたりの m における蛍光強度、 N は含まれる蛍光分子の種類数である。目的は蛍光強度データから各成分の濃度 c_n を推定することであるが、それには複数の波長条件での測定、すなわち分光 (スペクトル) 測定が必要になる。得られる一連のデータ f_m ($m = 1, 2, \dots, M$) は、蛍光波長を固定し励起波長を変えれば励起スペクトル、励起波長を固定して蛍光波長を変えれば蛍光スペクトルになる。多波長条件での蛍光強度データ (分光データ) と複数種の蛍光成分濃度はともにベクトル量であり、式1の関係は

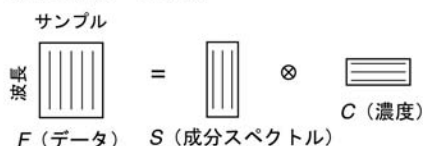
$$F = SC \quad (2)$$

と表せる。ここで、 F および C はそれぞれ混合試料の分光データと各成分濃度を表す M 次元、 N 次元の列ベクトル、 S は各列の要素が各成分のスペクトルを表す $M \times N$ の行列である。これは単純な線形変換であり、 C の値を得るには F に S の逆行列 (ないしは疑似逆行列) をかければよい。成

分数と等しい数の波長条件 ($M = N$) で測定すれば解は一意に定まるが、通常はデータにノイズが有意に含まれるので、より多くの波長で測定し ($M > N$) 最小二乗解として C を定めることが一般的である。多点計測の分光データ (複数の試料についてのデータ、時系列分光データ、分光画像データなど) についても、例えば K 点での分光データであれば、式2において F 、 C がそれぞれ列要素に各点のスペクトルおよび成分濃度をもつ $M \times K$ 、 $N \times K$ の行列になるだけで、扱いは同じである (図1)。

この逆変換による方法が最も一般的なスペクトル成分分離法であり、実際に各成分個々のスペクトルがすべて測定可能 (つまり S が既知) な場合には、正確かつ迅速に解 (分離結果) が得られる [3, 4]。しかし逆に単独でスペクトルを測定できない成分が一つでも含まれる場合には、この方法は適用できない。適用しても、特に成分数が多い場合や成分間の蛍光強度差が大きい場合などは分離結果は極めて不正確になる。生物試料の場合し

A bilinear モデル



B trilinear モデル

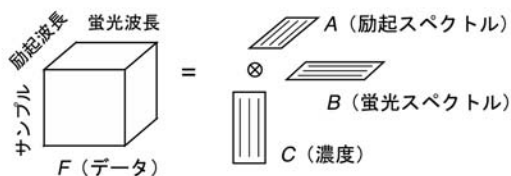


図1. 蛍光分光データの構造モデル

A. 波長軸×サンプル軸の2次元データ行列 (F) は成分スペクトル行列 (S) と濃度行列 (C) の積として表される (bilinear モデル)。

B. 励起波長軸×蛍光波長軸×サンプル軸の3次元データ配列は (F)、励起スペクトル行列 (A)、蛍光スペクトル行列 (B) と濃度行列 (C) の積として表される (trilinear PARAFAC モデル)。

ばしば内因性の蛍光成分，いわゆる自家蛍光が複数種存在するのが普通であり，それらのスペクトルを個々に正確に測定することは事実上不可能である．そのような場合には未知のスペクトル成分が含まれていても適用可能な成分分離法が必要となる．

III. 成分未知のデータからのスペクトル成分分離法 (blind spectral decomposition methods)

多変量解析 (multivariate analysis) は，自然科学，工学，社会科学など様々な分野において多変量データの相互関連の分析に用いられる統計的解析手法の総称である．ケモメトリクス (chemometrics, 計量化学) の分野においては，蛍光に限らず様々な分光計測データの分析に応用されている．未知の組成からなる一連の標本についての多変量データから意味ある変数を抽出する代表的な方法に主成分解析 (principal components analysis; PCA) があり，化学データの解析においてもしばしば用いられる．PCA は，データの分散のより多くの部分を説明する成分 (主成分) として互いに非相関な変数を抽出する．例えば M 波長で測定した K 個のサンプルのスペクトルのデータ行列 F ($M \times K$) は，その特異値展開 (singular value decomposition; SVD) (ないしは共分散行列の固有値展開 eigen value decomposition) によって

$$F = PX + E \quad (3)$$

のように分解される．ここで P は N 個の主成分を表す $M \times N$ の負荷量行列 (loading matrix), X はそれらの成分量に相当する $N \times K$ の得点行列 (score matrix), E は誤差行列 ($M \times K$) である．しかし得られる解は，一般には実際のスペクトル S と濃度 C (式2) そのものの推定量ではない [5]．ある P と X が解であるとき，任意の正則行列 A ($N \times N$) による変換 $P' = PA^{-1}$ と $X' = AX$ も， $P'X' = (PA^{-1})(AX) = P(A^{-1}A)X = PX$ であることから，また解である．PCAに限らず，SVDに基づく成分分離の解には，このようないわゆる回転の不確定性 rotational ambiguity が存在し，実際のスペクトル S と成分濃度 C を得るためには $S =$

PA^{-1} , $C = AX$ なる A を決定しなければならない．蛍光のスペクトルデータに関して，ある種の拘束条件を付与して解を限定する方法も考案されているが [6]，本質的な解決策にはならない．

筆者らは単一細胞レベルの顕微測光データの解析に，Parallel Factor Analysis (PARAFAC) とよばれる成分分離法を適用することを試みた [2]．PCA など従来の手法が2次元配列 (= 行列) データ (変数軸 \times サンプル軸) を扱うのに対し，PARAFACでは多次元配列 (multi-way array) データ (変数軸1 \times 変数軸2 \times ... \times サンプル軸) から成分を分離する [7]．もともとは計測心理学 (psychometrics) での解析手法の一つとして提唱されたものであるが [8]，近年ケモメトリクス分野での蛍光スペクトル分析にも応用されている [9, 10]．この方法の最大の特長は，成分の実際のスペクトルが一意的な解として得られる点である [11]．

一般にある蛍光分子の蛍光スペクトルの形状はどの励起波長でも不変であり (Kashaの法則)，また励起スペクトルの形状も観察する蛍光波長に依存しない [12]．従って複数の試料の二次元的スペクトル，つまり励起波長と蛍光波長を独立した変数としたスペクトルは，

$$f_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{ijk} \quad (4)$$

と表される．ここで f_{ijk} は励起波長 i ，蛍光波長 j におけるサンプル k の蛍光強度， a_{in} ($i = 1, 2, \dots, I$), b_{jn} ($j = 1, 2, \dots, J$), c_{kn} ($k = 1, 2, \dots, K$) はそれぞれ成分 n ($n = 1, 2, \dots, N$) の励起スペクトル，蛍光スペクトルおよび各サンプル内の濃度に相当する． x 次元の multi-way データに対して互いに独立な x 個の軸を持つ multi-linear モデルをフィットさせるのが PARAFAC モデリングであるが，式4で表される蛍光データの構造は， $x = 3$ つまり trilinear PARAFAC モデルが適用できることを意味する (図1)．行列表記を用いれば，サンプル k の二次元スペクトル F_k ($I \times J$) は

$$F_k = AD_k B^T + E_k \quad (5)$$

とかける (T は行列の転置を表す)．ここで A

$(I \times N)$ と $B (J \times N)$ は各成分の励起スペクトルおよび蛍光スペクトルを表す行列であり、それぞれ a_{in} , b_{jn} を各列の要素として持つ。 D_k は濃度 c_{kn} を対角要素にもつ $N \times N$ の対角行列、 E_k は誤差行列 $(I \times J)$ である。

実際には、測定されたスペクトルの三次元（励起波長×蛍光波長×サンプル）データ配列に対して trilinear PARAFAC モデルを二乗誤差が最小になるように最適化することで、負荷量行列として励起スペクトル行列 A と蛍光スペクトル行列 B 、および得点行列として c_{kn} を列要素として持つ濃度行列 $C (K \times N)$ 、の三つの行列を求める（詳細については文献 [7, 10] を参照）。ただし解にはスケージングの自由度が残るため、得られる濃度も相対値である。生理学的実験への応用においては相対値で十分な場合が多いが、濃度既知のサンプルのデータの一つ含めることができれば絶対濃度を得ることもできる。

IV. スペクトルデータ測定と PARAFAC モデリングの実際

PARAFAC モデルが適用可能な蛍光3次元データは、trilinearity が損なわれていない限りその種類は問わない。蛍光分光光度計を用いて幾つかの溶液サンプルの2次元スペクトルを測定したものの（励起波長×蛍光波長×サンプル）でもよいし、細胞の蛍光を経時的に顕微分光測光したもの（励起波長×蛍光波長×時間）でもよい。複数の励起・蛍光波長条件で記録した、いわゆる分光画像（励起波長×蛍光波長×空間）でもよい。細胞レベルの2次元蛍光スペクトルを経時的に測定するために筆者らが用いた装置の概略を図2に示す。バンドパスフィルタを切り替えることで励起波長をスキャンし、蛍光はファイバーを通して市販の分光器に導いて多チャンネルセンサによって全波長域を同時記録した。ダイクロイックミラーは、Sawano らの方法 [13] に準じてすべての励起波長で共通のものを用いた。例えばUV 励起用のダ

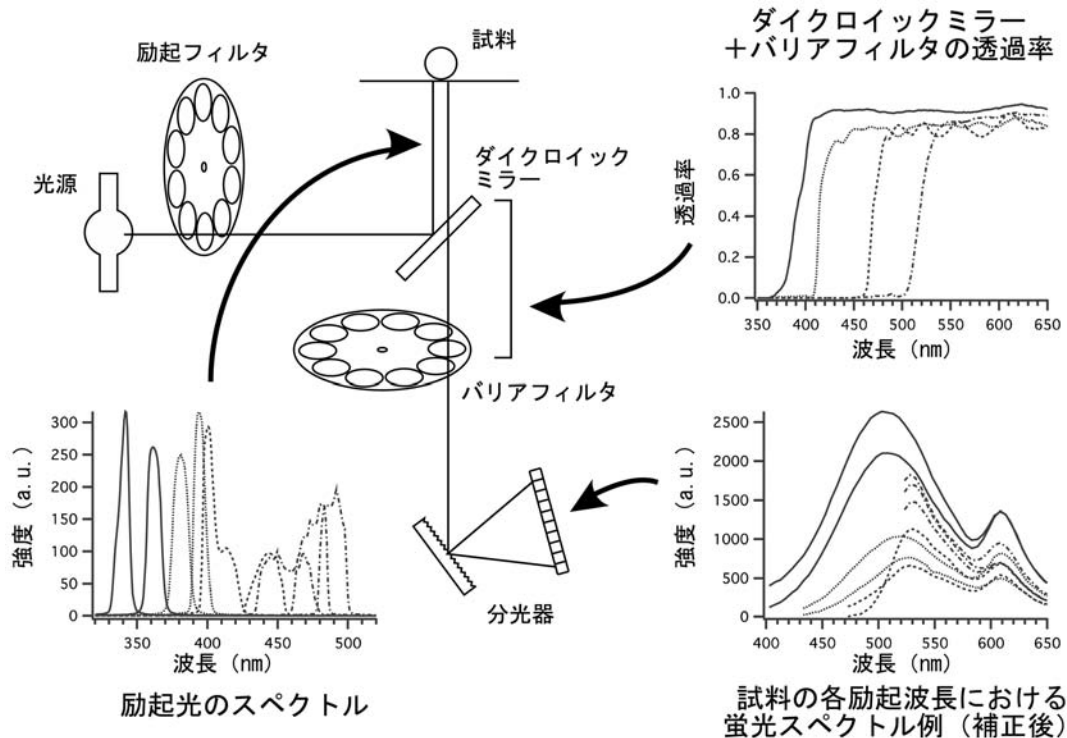


図2. 単一細胞レベルの蛍光スペクトル測定装置の概略と測定データの例

マイクロ鏡ミラーでは、通常透過帯として用いる可視光域では90%程度の光は透過するが、反射する残りの10%の光でもたいの場合十分な励起光強度が得られる。ただし励起光の反射光や散乱光が検出器に入らないように適当なバリアフィルタ（ロングパスフィルタ）を通すことは必須である。励起波長域が広範囲にわたる場合には、励起波長に応じて数種類のバリアフィルタを切り替えることで、より広い蛍光波長域のスペクトルが得られるようにした（図2）。得られたデータに対する補正としては、trilinearityの保持という観点からすればバックグラウンド減算と（励起波長によって異なるものを使った場合は）バリアフィルタの透過率についての補正のみが必須である。しかし解として得られるスペクトルの形状をより現実的なものにしたほうが、成分分離の結果の正当性を評価するために都合が良いので、対物レンズから射出される励起光のスペクトルも同じ分光器を用いて測定しておき、各波長の励起光強度についての補正も施した。

PARAFACモデルにおいては、式4からも分かるように励起スペクトル、蛍光スペクトル、相対濃度は互いに対称であり、それらの取り扱いに本質的な差はない。実際のアルゴリズムでは、適当な成分数および初期値を設定した上で、3つの行列のうち2つを固定して残りの1つを最適化する、というステップを繰り返して二乗誤差を段階的に最小化する（alternating least-square method）。この際幾つかの拘束条件を付与することができるが、実際にはすべての成分スペクトルおよび濃度の要素について非負拘束を適用した。なおデータ処理およびモデリングはすべて一般的なパソコンにより、行列演算のプラットフォームであるMATLAB（The MathWorks, Inc.）を用いて行った。PARAFACのアルゴリズムについては、市販の拡張モジュールPLS_Toolbox（Eigenvector Research, Inc.）のものを一部改変して用いた。

このシステムの性能を示す例として、7種類の蛍光性カルシウムプローブの混合水溶液について、カルシウム濃度の異なる11のサンプルの2

次元蛍光スペクトル（励起波長：340～490 nmの9点、蛍光波長：420～650 nmの47点）と、その成分分離の結果を図3に示した。ratiometricなプローブ3種（fura-2, indo-1, BTC）についてはそれぞれカルシウム結合型と解離型があるので、カルシウム濃度非依存性のレファレンス（Texas Red）の成分とあわせると、11個のスペクトル成分（3 ratiometric × 2 + 4 non-ratiometric + 1 reference）が混在することになる。混合液のスペクトルデータからPARAFACモデリングによって分離された成分はすべて、その励起・蛍光スペクトルの形状およびカルシウム濃度依存性が、それぞれのプローブ単独の水溶液から得られたものと完全に一致した。また波長分解能も高く、あえて用いたスペクトルの非常に似た成分（Calcium Green-1, fluo-3, Oregon Green 488 BAPTA-1）についても分離することができた。分離可能な最大成分数は正確には確認していないが、色素の組み合わせによっては15個以上、より長波長の励起光も用いるなど測定条件を改良すれば20個以上のスペクトル成分が分離可能であろうと思われる。

V. 生細胞への適用例（1）—細胞内カルシウム、pH、自家蛍光の同時測定

生細胞への適用例として、最も一般的に用いられるカルシウムおよびpHの蛍光プローブであるfura-2とBCECFをロードした単一細胞（マウス未成熟卵細胞）のスペクトル測定と、その成分分離の結果について図4に示す。プローブ濃度がある程度高い細胞のスペクトルデータからは、fura-2由来の成分として、水溶液中でもみられるカルシウム結合型と解離型に対応する2つの成分のほかに、短波長にシフトした蛍光スペクトルを持つ第3の成分が同定された（図4A）。これは、同様の成分が牛血清アルブミンを加えたfura-2水溶液にもみられることから、細胞内のタンパク質に非特異的に結合したfura-2分子に由来するものであると考えられる。BCECFについてはそのような成分は現れず、H⁺結合型と解離型に対応する2つの成分のみが同定された。一方、プローブ

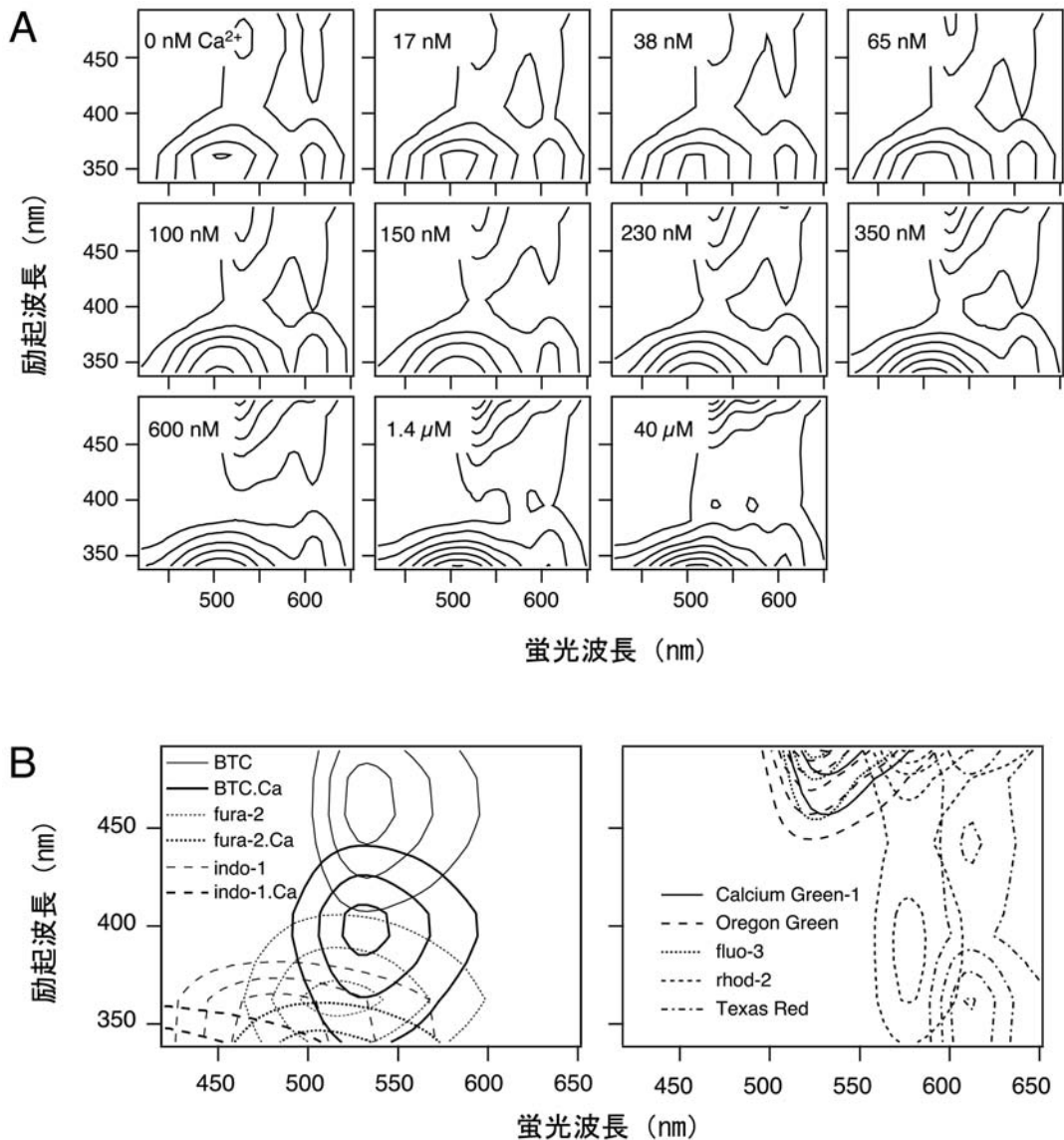


図3. カルシウムプローブ混合水溶液のスペクトルデータからの成分分離

A. 7種類のカルシウムプローブとTexas Redの混合水溶液の蛍光2次元スペクトルを11の異なるカルシウム濃度で測定したデータ（等高線表示）。

B. PARAFACモデリングにより分離された11個のスペクトル成分. ratiometricなプローブ（左）と non-ratiometricなプローブ（+ Texas Red）（右）にわけて各成分スペクトルを示した。

濃度が低い細胞のスペクトルデータからは、これらプローブ由来の成分と同時に自家蛍光成分も分離測定することができる。マウス卵の場合、励起波長340～490 nm、蛍光波長420～600 nmの範囲で4つの自家蛍光成分が同定された（図4B）。

このうち2つはスペクトルおよびミトコンドリア阻害剤投与時の変動などから、NAD(P)Hと酸化型フラビンに相当するものであることがわかる。このようにスペクトル成分分離によって、細胞内カルシウムとpH、および自家蛍光成分から細胞

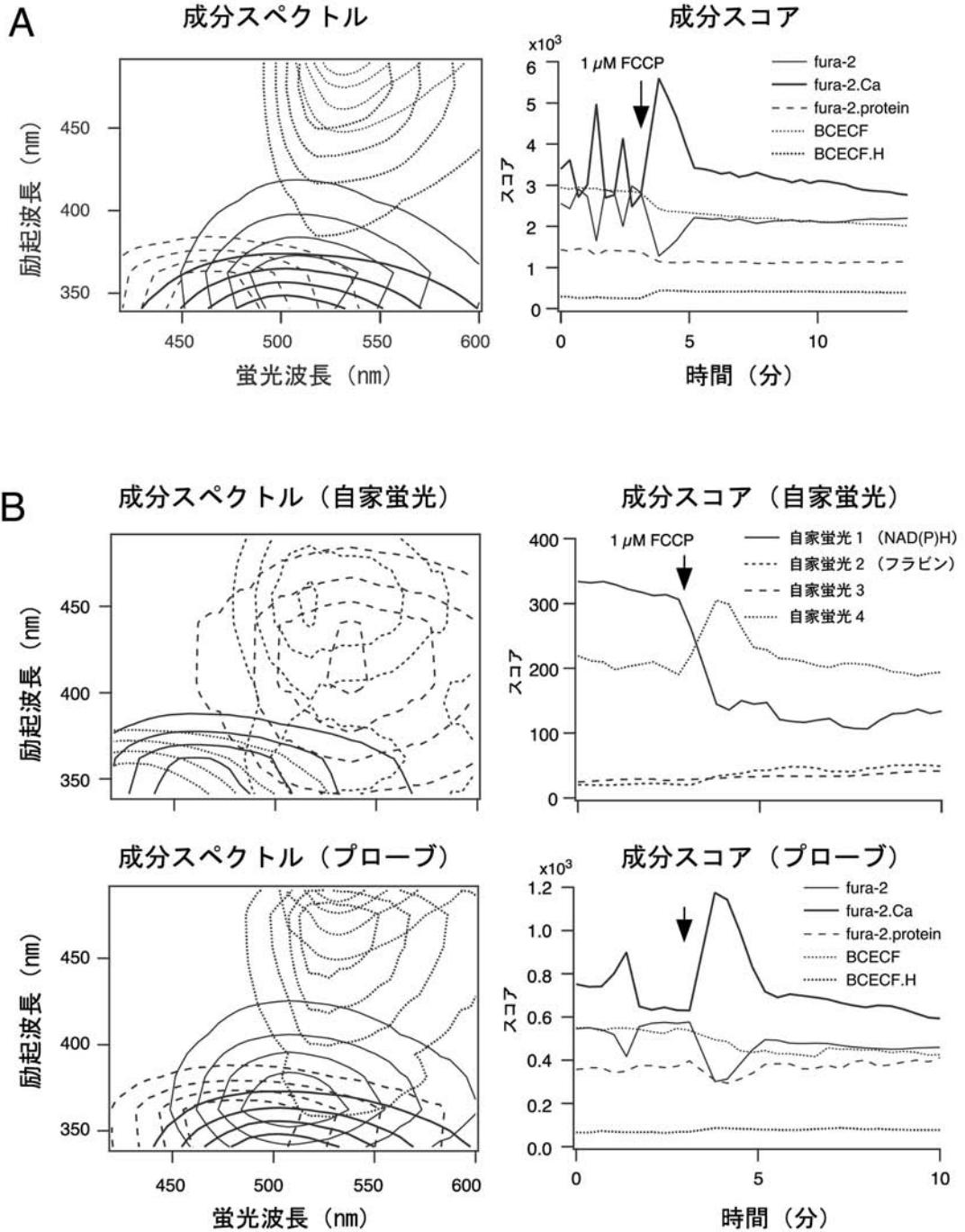


図4. fura-2とBCECFをロードしたマウス卵の時系列スペクトルデータからの成分分離
 A. プローブ濃度が比較的高い場合。
 B. プローブ濃度が比較的低い場合. プローブ由来の成分 (下段) と同時に4つの自家蛍光成分 (上段) も分離される。
 いずれの場合もプローブの成分スコアの変化から, ミトコンドリア脱共役剤FCCPの投与により細胞内のカルシウム上昇と酸性化が起きていることが分かる. またFCCP投与前には自発的なカルシウムオシレーションがみられる。

内の酸化還元状態の変化を同時に解析することができる。

一般に blind decomposition においては、試料中の成分数を客観的に決定する確たる基準はなく、結局は得られた解の「尤もらしさ」から判断する場合が多い。実用上問題ない程度に尤もらしい解が得られるまでモデル中の成分数を一つずつ増やしていくわけだが、前述のように PARAFAC では解が実際のスペクトルに相当するので、その結果の正当性を評価するのが比較的容易である。成分数を増やすほどモデルはデータをより正確に再現する（二乗誤差は小さくなる）が、これは単にデータ中のノイズ成分も説明するようになるためである。成分数が必要以上に多いモデルは、解に明らかに不自然な形状のスペクトル成分が生じることから判断がつく場合が多い。また、蛍光強度が低い場合や露光時間を短くして速い変化を記録する場合は、個々のスペクトルデ

ータの S/N は非常に悪くなるが、PARAFAC モデリングはデータ全体に対する最適化として行われるので、サンプリング数を十分多くすれば微弱な成分も分離可能である。

VI. 生細胞への適用例 (2) — 膜電位感受性蛍光色素

測定波長を固定した通常の測定法では小さなシグナル変化率しか得られないような蛍光プローブでも、スペクトル測定・分離の手法を用いればより変化率の大きい成分が抽出されるのではないかと期待される。膜電位感受性蛍光色素は一般に数%/100 mV 程度のシグナル変化率しかなく、プローブとしての使い勝手は良くない。マウス卵細胞の細胞膜をスティリル系膜電位感受性蛍光色素 di-8-ANEPPS で染色し、膜電位を変化させた時の 2 次元蛍光スペクトルデータ (420 ~ 500 nm の 5 励起波長, 520 ~ 650 nm の 蛍光波長域) に対

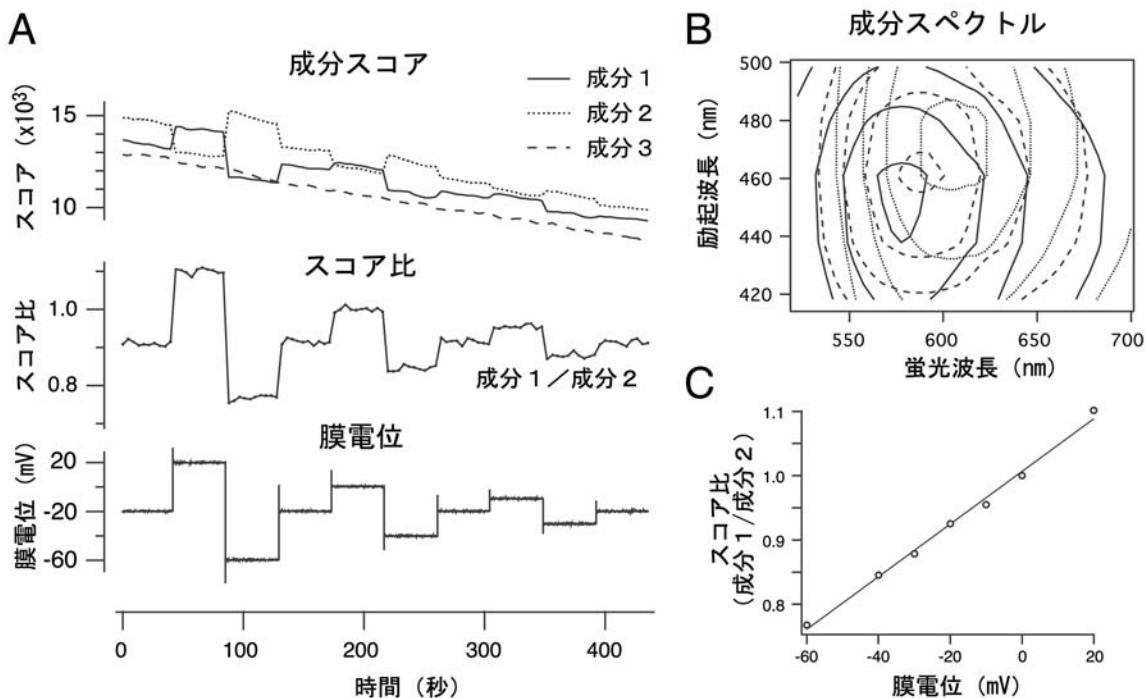


図5. 細胞膜を di-8-ANEPPS で染色したマウス卵の時系列スペクトルデータからの成分分離

A, B. 膜電位固定した卵から分離された成分スコアとスペクトル。

C. 短波長成分 (成分 1) と長波長成分 (成分 2) のスコア比の膜電位依存性。

してPARAFACモデリングによる成分分離を適用したところ、3つのスペクトル成分が分離され、そのうち最も短波長と長波長の成分は互いに逆向きの大きな膜電位依存性を示した [14] (図5A, B)。これらの成分の比は広い範囲でリニアな膜電位依存性をもち、40~50%/100 mVという大きな変化率を示した (図5C)。fura-2などと違い膜電位感受性蛍光色素は本来有限個の成分に分けられるものではなく、膜電位に依存して連続的にスペクトルがシフトする [15]。従って分離された3成分も個別の分子状態に対応したものではなくあくまで見かけ上のものであるが、微小な膜電位変化も検出可能でかつ長時間にわたって安定したratiometricな膜電位インデックスとしては有効であろうと思われる。

VII. おわりに

多変量解析の手法に基づく蛍光分光データからのスペクトル成分分離法とその適用例について述べた。文中でもふれたように、PARAFACモデルは第3の軸の種類を問わないので、様々な測定系のデータに広く適用できる。励起・蛍光波長を変えて経時的に蛍光画像を記録したイメージングデータについても、空間軸 (x, y) と時間軸 (t) をまとめて1つの次元に直線化すれば trilinear PARAFACモデルが適用できる。ただし、PARAFACモデリングはiterativeな最適化プロセスに時間がかかるのが最大の欠点である。分光画像のようにデータ量が多い場合は特に計算時間が膨大になるため、アルゴリズムの効率化が重要になる。ほかにも、類似性が高い成分が含まれる場合やノイズが多いデータに対しては、最小ではない極小に収斂してしまうケースもあり、アルゴリズムの頑健性 (robustness) を高める工夫についても今後検討が必要であろう。

細胞内シグナル伝達の複雑な分子機構の解明のためには、複数のシグナル分子の動態の同時測定によるその相互関係・相互作用の解析が重要になる。生体シグナル分子を測定するための様々な蛍光プローブが近年開発され利用可能であり、特にGFP等の蛍光性タンパク質をベースにしたもの

は適当な移行配列を付加することで特定の細胞内部位に局在させることが可能なことなどから、細胞生理学の実験のための有力なツールである。しかし一般にプローブ波長の選択の自由度はあまり高くはなく、多くのプローブを同時に用いる際にはシグナルのクロストークは事実上不可避である。またプローブによっては弱いシグナル強度しか得られないこともあり、そのようなケースでは内因性蛍光成分の混入が問題となる。そのような意味で、分離能が高くかつrobustな測定・解析システムの確立は、新規プローブの研究・開発と相補う重要なテーマであると考えられる。

文 献

1. Mason WT: Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis. Academic Press, London, 1993
2. Shirakawa H & Miyazaki S: Blind spectral decomposition of single-cell fluorescence by parallel factor analysis. *Biophys J* **86**: 1739-1752, 2004
3. Dickinson ME, Bearman G, Tille S, Lansford R & Fraser SE: Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy. *BioTechniques* **31**: 1272-1277, 2001
4. Zimmermann T, Rietdorf J, Girod A, Georget V & Pepperkok R: Spectral imaging and linear un-mixing enables improved FRET efficiency with a novel GFP2-YFP pair. *FEBS Lett* **531**: 245-249, 2002
5. Kroonenburg PM: Three-mode Principal Component Analysis. Theory and Applications. DSWO Press, Leiden, 1983
6. Sasaki K, Kawata S & Minami S: Component analysis of spatial and spectral patterns in multispectral images. II. Entropy minimization. *J Opt Soc Am A* **6**: 73-79, 1989
7. Harshman RA & Lundy ME: PARAFAC: Parallel factor analysis. *Comp Stat Data Anal* **18**: 39-72, 1994
8. Carroll JD & Chang J: Analysis of individual differences in multidimensional scaling via an N-way generalization of "Eckart-Young" decomposition. *Psychometrika* **45**: 3-24, 1970
9. Geladi P: Analysis of multi-way (multi-mode) data. *Chemom Intell Lab Syst* **7**: 11-30, 1989
10. Leurgans S & Ross RT: Multilinear models in spectroscopy. *Statist Sci* **7**: 289-319, 1992
11. Kruskal JB: Three-way arrays: rank and uniqueness

- of trilinear decomposition, with application to arithmetic complexity and statistics. *Linear Algebra Appl* **18** : 95–138, 1977
12. Lakowicz JR : *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999
 13. Sawano A, Hama H, Saito N & Miyawaki A : Multicolor imaging of Ca^{2+} and protein kinase C signals using novel epifluorescence microscopy. *Biophys J* **82** : 1076–1085, 2002
 14. Shirakawa H & Miyazaki S : Application of blind spectral decomposition method to the measurement of membrane potential with voltage-sensitive fluorescent dyes. *Jpn J Physiol* **54** Suppl : S65, 2004
 15. Loew LM, Bonneville GW & Surow J : Charge shift optical probes of membrane potential. *Theory. Biochemistry* **17** : 4065–4071, 1978