

カルシウム蛍光測光／パッチクランプ同時測定法

榎本浩一・古家喜四夫*

(島根医科大学, 生理学教室・*生理学研究所, 生体膜部門)

I. はじめに

超生体染色は生きた細胞に色素をとりこませ、形態の時間的変化を測る技術である。超生体染色された細胞は生理的活動性を維持しているため、生細胞の特定の細胞内器官の時間的形態変化や活動を観察することが可能である。この方法で、ギャップ結合を通じた細胞間連絡、分泌顆粒の放出、エンドサイトーシス等の情報が得られてきた。さらに形態観察だけではなく、細胞内の状態(pH, Ca, 電位など)を反映する各種色素が開発され、定量的解析も可能となった。特に蛍光色素は微量で高感度の検出ができるので近年多用されている。その代表的なものとして Tsien 達により、EGTA をもととして分子設計された、Quin-2¹⁾ に始まり fura-2²⁾, indo 1²⁾ にいたるカルシウム感受性蛍光色素がある。特に fura-2, indo 1 はカルシウムが結合することによりそれぞれ励起波長のシフトと蛍光波長のシフトが起こる。この性質を利用すると、2つの波長での蛍光比を求める事により、導入された蛍光色素量や細胞の厚さなどに依存しない、カルシウム濃度に直接関係した値が得られる。さらに Tsien 達はそれら水溶性色素にアセトキシメチル(AM)基をつけて疎水性にし、細胞外からの投与だけで細胞内に簡単に色素を導入する方法を開発した¹⁾。これらの技術によって、収縮、分泌、その他細胞内情報伝達物質としてあらゆる細胞で重要な働きをしている細胞内カルシウム動態の研究が飛躍的に向上した。

一方、電気生理の分野ではパッチクランプ法が発展をとげていた³⁾。この方法で一分子のチャネル(シングルチャネル)の電気的変化を計測することができる。パッチクランプは一分子

の時間変化をリアルタイムで捉える唯一の方法となっている。パッチクランプの応用として、パッチ膜を破ることにより細胞全体の電流が記録でき(Whole cell recording), さらに細胞内に電極内の物質を注入したり、細胞の内容物を交換できるようになった。この方法により、G蛋白、イノシトールリン酸代謝等の細胞内情報伝達系の研究が飛躍的に進んだ。また従来の細胞内電極では困難であった小さい細胞まで適用が可能となった。

細胞内カルシウム測定法とパッチ／ホールセルクランプが一般化されるにつれ、両方法の併用が要求されるようになってきた。われわれの場合は、乳腺上皮細胞の自発性過分極電位振動と細胞内カルシウム振動が同期しているかどうか、また細胞内セカンドメッセンジャーの同定のためにパッチ電極を介してそれらを注入しカルシウム反応をみるという必要にせまられた。細胞内カルシウムの光学的測定法^{4,5,6,7)}とパッチクランプ等による電気的測定法は、それぞれの装置さえあればそれほど困難なしに同時に測定する事は可能である。それぞれの測定技術については多くの良い総説がありそれらを参照して頂きたいが、ここではわれわれの経験をふまえ、二つの測定法を合わせるときに生ずる実際的な問題点とその解決法を中心に解説したい。

II. 装置のセットアップ

1. 顕微鏡など

顕微鏡としては倒立型、正立型(レボルバー上下型で、水浸対物があるとよい)、あるいは実体型でも、それぞれの実験試料に合わせて選べばよいが、蛍光装置(落射型)が取り付けられなければならない。紫外光(UV)励起の fura-2

や indo 1 を用いて蛍光強度比によるカルシウムの定量を行うのであれば UV 対応の光学系と対物レンズが必要となる。

蛍光観察と同時に、パッチ電極を細胞に近づけタッチさせるために、位相差やノマルスキー微分干渉による透過像観察が必要となる。最近の顕微鏡のように蛍光-ノマルスキーの同時観察ができる場合 (UV までは対応していないこともある) はよいが、大抵の場合、切り替えのためにレンズを交換したり、ノマルスキープリズムを動かしたりしなければならずパッチを細胞に当てた状態では不可能である。また測光のために光路切り替えが必要なときも振動が問題となる。ケラー照明による透過光で、コンデンサーレンズの絞りをしばっただけでもやれないことはないが、もう一つの解決法としては、電極を透過像でみながら細胞の真上まで持っていった後は、顕微鏡を蛍光測光用にセットし、電極抵抗をオシロスコープでみながらゆっくりと電極を下げ、抵抗の変化から細胞へのタッチを知ることである。

蛍光測光時にテレビで透過像を同時観察することはちょっとした工夫で可能である。fura-2 蛍光 (波長 510 nm で測定) の場合、顕微鏡観察で普通使用される緑色等のフィルターの透過光とは波長が近いので、同時に使用するとスポット測光のホトマルのノイズの原因になる。透過観察光を赤色 (>610 nm) にすることで解決できる。TV カメラは赤色に感度がよく像質に問題はない。赤色フィルタは顕微鏡のバリアフィルタでもいいが、カメラのレンズにつける写真材料の R2 フィルタでもよい。カルシウム蛍光も TV カメラで見る場合は、顕微鏡の TV カメラ用光路にダイクロイックミラーを入れ蛍光と赤色透過光を分け、それぞれ別の TV カメラで観察することになる。

設置場所としては蛍光を観察するため暗くできなくては行けないが、完全な暗室である必要はない。パッチ用のシールドボックスを、暗幕で覆ったり、網ではなくアルミ板で作り中を黒く塗ったりし、さらに顕微鏡試料台の前につ

いたてを立てることによって、部屋が少し明るくても測定できるようになる。測定しているときの感度で迷光がない事をチェックすればよい。

2. カルシウム測光装置

カルシウム測光の方法としては、フォトマルを用いたスポット測光法 (オリンパス OSP-3, OSP-10, ニコン P-102 など) と高感度 TV カメラ (SIT, イメージインテンシファイア, 冷却 CCD 等) を用いた画像解析法 (浜ホト ARGUS 50 など) があるが、パッチクランプによる電気現象との同時計測には以下の理由でスポット測光法がよく用いられる。1) スポット測光法の方が時間分解能がよい (といっても最高 1~10 ms で電氣的測定よりずっと悪いが、画像法の最高 33 ms よりはよい、2) もともとパッチによる電氣的測定は一つの細胞でしかできないので同時測定も一点で十分、3) 電気測定と同時にデータを取ることが比較的容易などである。もちろん細胞内での空間的分布やスライスなどでカルシウム変化のパターンがみたい場合は画像処理法が必要である。

画像処理法の一変法として、動きのない試料で単にカルシウムの変化を見ればよいという場合はリアルタイム画像差分法⁸⁾が使える。これは fura-2 の 340 nm 励起蛍光や Fluo-3 などの蛍光像の TV カメラ出力をリアルタイム画像処理装置 (日本アビオニクス Image-Σ III, 浜ホト ARGUS-10, DSP-1000, 3000 など) を通してリアルタイムに差分を取りコントラストを増強することによって蛍光変化を可視化する方法で、リアルタイム (TV レート) でしかも比較的安価でカルシウム変化を見ることが出来る。画像は VTR に保存できる。この方法はパッチを適応する前の細胞のスクリーニングにも使える。例えばカルシウム振動が視野中の限られた細胞でしか起こらない場合、まず画像でチェックすることで確実にカルシウム振動している細胞にパッチを当てることが可能になる⁸⁾。

3. データ処理

パッチクランプのデータとカルシウムポイン

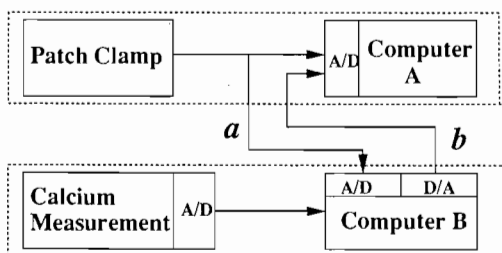


図1. パッチクランプ測定システムとカルシウム測光システムを接続し、同時測定する方法。パッチクランプアンプの出力をパソコンBのA/D入力に接続する(a)か、カルシウム蛍光の蛍光比をD/Aにより逐次アナログ出力し(b)、パソコンAに入力する方法を目的により使い分ける。パッチクランプ出力にはゲイン調整可能な増幅器とハイカットフィルタをいれておくといいい。われわれはパソコンAにIBM互換機とpCLAMP, BにNEC-PCとMiCaChanを使用している。

ト測光のデータを合わせるには、単に両装置からのデータをアナログ記録し、重ね合わせることも可能である。しかし現象が速かったり二つのデータの同期をとりたい場合、あるいはデータを加工したい場合コンピュータに最初からデータを取り込ませたい。それにはパッチ及びカルシウムのどちらかのプログラムにもう一方のデータを取り込めるようにするのが簡単である(図1)。一般にカルシウムデータのサンプリング間隔(1ms~数百ms)はパッチのそれ(10 μ s~1ms)より桁違いに遅い。電気的現象がゆっくりしており(静止電位の変化など)カルシウムデータのサンプリング間隔でよい場合はパッチのデータをADボードを介してカルシウムのソフト上に取り込ませる(図1のa)、われわれはオリンパスOSP-3にADボード入力が可能なソフト(MiCaChan;後述)をつくりそれを実現している⁹⁾。

速いパッチのデータが主になる場合はパッチのソフト上にカルシウムのデータを入れることになる(図1のb)。例えばパッチ用ソフトのpCLAMP(Axon Instruments)のAD入力2チャンネル目にカルシウムデータを入れればよい。われわれの場合カルシウムデータはOSP-3の蛍光比データをD/Aボードを介してDA変換した出力を使っている。単なる蛍光変化でよ

れば顕微鏡イメージプレーン上にフォトマルあるいはフォトダイオードを置いて測定した蛍光強度変化をデータとすることができる。

蛍光画像での同時計測の場合はパッチのデータとどのように合わせるか問題である。パッチデータをA/Dコンバーターよりとりこませ、画像入出力ボードを使用して画面上に重ね合わせたこともある¹⁰⁾が、これでは学会のビデオセッションで見せることはできても論文の図になりにくい。最も安易な方法は画像とパッチデータを別に記録し、あとで開始点と時間軸が一致するように重ね合わせることである。

画像上の1点だけのデータを抽出するだけでいいなら、TV画面の上にホトトランジスタをつけて画像の明暗をアナログ化することもできる¹¹⁾。あるいは画像入出力ボードを使用して蛍光や差分画像をコンピュータのメモリにとりこみ、測定したい領域の濃度を計算させ、それをD/Aより出力させることでシングル

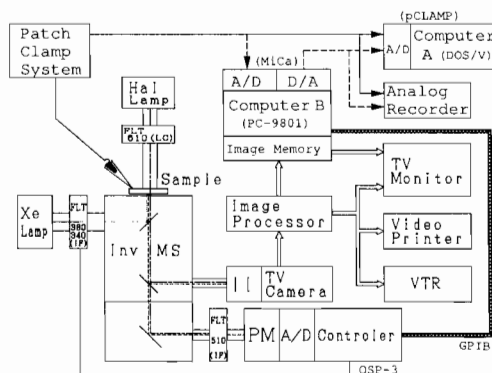


図2. われわれが使用している光学系と電気系の模式図⁸⁾。倒立蛍光顕微鏡(Inv MS)にパッチクランプ、スポット測光装置(OSP-3)、TVカメラと画像処理装置、2台のパソコン(Computer AとB)が接続してある。スポット測光での励起フィルタ切り替えと測光の制御はパソコンBよりGPIBを介して行う。カルシウム信号は図1に示したようにパッチクランプ信号と合わせてパソコンまたはアナログレコーダーで記録する。蛍光画像の場合はイメージンテンシファイア(II)を接続した超高感度TVカメラと画像処理装置でとらえ、VTRやビデオプリンタで記録する。さらに画像をイメージメモリよりパソコンBに入力し、特定した場所の蛍光強度をアナログ出力する。細胞は透過赤色光で同時観察できる。

チャンネルとの同時記録を行える⁸⁾(図5参照)。

図2にわれわれのセットアップの模式図を示す。

Ⅲ. 各種問題点とその対策

1. 電氣的ノイズ

パッチクランプ装置とカルシウム測光装置を同時に動かすため装置がかなり大がかりになり、パッチクランプの電気信号にノイズ(ハム及び高周波)が混入しやすい。特にカルシウム測光装置はもともと電氣的測定を考慮していない場合があり問題になることがある。ノイズの対策としては、発生源をつきとめることとちゃんとしたグランド(アース)をとる事が肝要である。ノイズの計測はパッチの場合まずヘッドアンプになにもつけないオープン状態で接続機器のノイズをチェックし、次に電極をつけ空中をとんでくるノイズをチェックする。

グランドの基本はめったやたらアースを取るのではなく、グランドループによる磁場ノイズを避けるため一点に集中させる¹²⁾。さらにケース(電源)グランドとシグナルグランド(パッチのアンプによって10オームでケースグランドにつながっている場合や、完全に浮いている場合などがある)とを完全に分離してとることである。まずファラデーケージ内部特に顕微鏡まわりをひとつひとつテスターでつながっているかどうかチェックしながら、確実に全ての物をグランドする。顕微鏡のステージやコンデンサー、マニピュレータの微動部と粗動部などの部品はつながっている様に見えても電氣的に大きな抵抗がある事があるので要注意である。グランドの取れていない物があるとそれがアンテナとなって外からのハムを拾う。それぞれの物からのグランド線は一点に集めそれをパッチアンプのシグナルグランドにつなぐ。次に測定機器やコンピュータのケースグランド、ラック、除振台、ファラデーケージなどをやはり一つにまとめグランド(電源のグランドあるいは別に取ったグランド)に落とす。机上型のファラデーケージの場合両グランドどちらでもよいが二つのグ

ランドラインがつながり易い場所なので接しないよう注意する。シグナルグランドとケースグランドの分離が完璧にできればノイズの問題はほとんどなくなる。

測定機器(特に民生用)の中にはシグナルグランド(BNCコネクタの外側)とケースグランドがわかれていないことがある。そのような機器ではケースグランドを浮かすのも一つの手である。しかしカルシウム測光装置やコンピュータのA/Dコンバーター等もケースグランドが分かれておらずそれらを含めシグナルグランドを完全に分離する事は不可能である事が多い。アイソレーションアンプを使えば可能だが、高価であり複数必要となる事もある。このような場合ノイズを見ながら機器を順番に一つずつないでいき、グランドの取り方を工夫する以外にない。机上型ファラデーケージの場合は、天井の蛍光灯などからハムをひろいやすいが、ケージ前面の全体あるいは上半分を金網の「すだれ」で覆うか、顕微鏡ステージの前面についてをシールドとして置くことよい。

蛍光励起用のキセノン放電管や超高圧水銀燈は通常のパッチの測定周波数(<10kHz)ではノイズの原因にならない。透過光に使用するハロゲンランプはランプ周辺で電源コードが露出している事があり交流点灯の場合ハムを出すので銅の網やアルミホイルなどで覆いシールドする。電源コードも当然シールドする。ただし顕微鏡本体はシグナルグランドに落しているので電源コードのグランドは浮かしておく。最近の顕微鏡は直流点灯を採用するなど生理実験を考慮した設計になり問題が少なくなった。

もう一つ問題となりやすいノイズはコンピューター特にCRTディスプレイからくる高周波のノイズである。これらのノイズもシグナルグランドが完全に分離されている場合は問題とならないはずである。しかしそれができない場合、CRTにノイズ防止スクリーンをはったり、CRTケーブルにトロイダルコアをつけたり、アースまわりを工夫したり、CRTとパッチクランプアンプの間にアルミ板のついたてを

おいたりしてみて測定周波数範囲内でノイズが見えないようにする。コンピューターをパッチクランプ装置から離しておくのが最も効果的である。

2. 機械的振動とノイズ

細胞にパッチをかけるようにすると電流トレースに低周波数の振幅の変化する波がのり、電極をぬくとおさまる。このような場合床の振動を疑う必要がある。床を足でどんとやっけて減衰振動がみられるなら、まずこれである。最も良い対策は空気圧で定盤を持ち上げる除振台を使用することである。除振台は卓上型よりデスク型のほうがはるかにいい。ただし高価であることと、重いので運搬が大変である。鉄板の下にテニスボールを置いて除振をすることもできるが、そのままだと鉄板が動いて危険である。バイクか自転車のタイヤのインナーチューブ、医療用のエアクッション等を中心におくといい。この方法だと、半年ごとにテニスボールを交換する必要があるし、性能は市販の除振台におよばない。

床の振動のノイズについては、使用する場所も問題である。同じ部屋でも端と真ん中では違い、梁がどこにあるかにもよる。聴診器を壁に当ててエアコンディショナー等に起因する低周波のうなりが聞こえるような場所は要注意で、ひどい場合は除振台を使用してすらノイズがなくならず、場所を移動する以外に方法がないこともある。

カルシウム測光装置のフィルター切り替え等の機械的振動にも注意する必要がある。fura-2を二波長励起で使う場合、励起用フィルターを回転させるがその振動はパッチクランプの障害となる。われわれは顕微鏡本体からフィルター切り替え装置(と光源)を切り離して、除振台のフレームに固定することで解決した。光ファイバーで照射するシステムではその問題はなくなる。

3. 灌流システム

カルシウム測光の場合、もれでた色素を洗い流すために灌流することは大事であるが、その

灌流方法は液面の揺れやサクシオンする音などこだわらなくともよかった。パッチの場合はそれらがノイズの原因となる。そのため液の吸引にはサイフォン(流出口の高さで液面が調節できる)や毛細管現象(ろ紙やちりがみをブリッジにして流れ出る)を使うとよい。液の流入も高置ボトルで重力を使う。流速はニードルバルブでコントロールする。

灌流チェンバーは、倒立顕微鏡を使用する場合、対物レンズの作動距離と標本までの厚さを考慮する必要がある。可視光で励起するならばプラスチック皿と長焦点対物レンズを使用できる。しかし紫外光で励起する色素では、プラスチック皿は蛍光を発するため使えない。また、こうした色素では紫外線対応の蛍光用レンズを使用することになるが、このレンズは作動距離が短いため、チェンバーの底はカバーガラス(石英ガラスの必要はない、マツナミのNo.1(0.13~0.17mm)で十分)にする。細胞はプラスチック培養皿に丸型カバーガラスをいれその上に培養する(図3)。x20以下の場合それをチェンバーに移し測定する。x40以上や油浸レンズを使う場合は直接培養できるチェンバーをつくるか、細胞をはやしたカバーガラスを直接チェンバーにマウントできるようにするなど工夫が必要である。

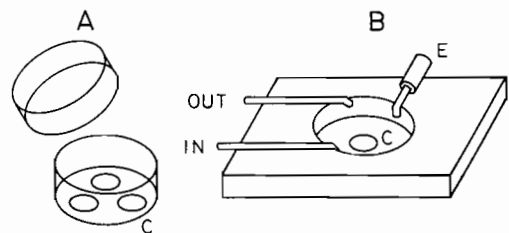


図3. 蛍光測光のためのカバーガラス上での細胞培養と灌流用チェンバー

A. 3枚の15mmφのカバーガラス(c)を35mmプラスチック皿に入れその上に細胞を培養する。

B. 灌流用チェンバーはプラスチック板を加工して作り、底にカバーガラスを貼る。灌流液は二本の細管で出し入れする(IN, OUT)。不関電極(E)をチェンバーの横に取り付ける。細胞をはやしたカバーガラスをチェンバーにのせ真空グリスなどで固定する。

IV. 測定 の 準備

1. 色素の負荷

蛍光色素の AM 体を細胞外に投与する方法と、電極内に蛍光色素を入れておき、細胞に注入する方法がある。AM 体は細胞外に投与するだけなので簡単だが、細胞に対する選択性がない。電極から細胞に注入するなら選択的に細胞を染色できるが、操作に熟練を要する。神経細胞なら、神経断端より fura-2 dextran を注入することも可能である¹³⁾。われわれは fura-2 AM (DMSO 中 1 mM) 2~4 μ l を 35 mM ペトリ皿の 2 ml の培養液で希釈し(終濃度 1~2 μ M), 30~45分間おいてから観察している。長時間負荷するとカルシウム反応がなくなったり蛍光が細胞内に局在化する。AM 体は水溶性でないので、投与するとき水中でよく分散するように工夫している。細胞によっては染まりが悪いものもある。その場合は界面活性剤 (Cremophor EL 等) を 2 μ l 程度入れるか、色素溶液を 20 μ l 程度にすると染色が改善される。

電極から蛍光色素を細胞に注入するには電極内液に活性型色素 (AM 体ではない) を 30~100 μ M 程度入れておく¹⁴⁾。ホールセルになったら細胞内に色素が拡散する。

2. パッチ電極

カルシウム計測を併用しても、パッチ/ホールセルクランプの方法に大きな違いはない。ホールセルクランプをかけると電極内液が細胞に入り込み、細胞内カルシウムの濃度に影響することがありうる。電極内液は細胞内組成と同じようにするが、通常カルシウムと EGTA でカルシウムバッファーとする。バッファーが強いと細胞活動によるカルシウム変化までバッファーしてしまう。現実には Ca/EGTA の緩衝液をカルシウムイオンが 0.1~0.01 μ M になるよう調整し、カルシウムバッファーの濃度を普段の 1/10 程度にする¹⁵⁾か、カルシウムを入れない電極内液でも十分やれる。カルシウムなしで、EGTA の代わりに fura-2 を 10 μ M

程度入れておいてもよい¹⁵⁾。電極内液のカルシウムバッファーが弱いので、液は超純水を使用し、プラスチック容器で作成する。

電極内液に使用するカルシウムと EGTA 等のキレート剤が存在する場合のカルシウムイオン濃度の計算はイオン強度、ATP の共存等を考慮する必要があるため簡単ではない。われわれはシェアウェアの IBM-PC 用ソフト「Chelator (Schoenmaker T, 1992)」や洲崎¹⁶⁾による NEC-PC 用ソフト「Ca」を使用して計算している。「Chelator」は Nifty Serve の FBio より入手できる。

V. 測定 の 実際

1. スポット測光での同時計測

スポット測光なら、スポットの中心にある細胞にパッチをかける。パッチクランプアンプの出力をカルシウム測光用コンピューターの A/D コンバーターに接続し、MicaChan により蛍光とパッチデータを同時に計測させる。ギガシール生成後、カレントクランプにし、膜電位と膜抵抗をモニタしながらピペット内を減圧すると突然膜電位は静止電位に落ちホールセルになったことがわかる(図 4 A)。乳腺上皮細胞は ATP を投与するとプリン受容体が活性化され、細胞内カルシウムが増加するが、同時に膜電位では過分極がみられる(図 4 A)。この過分極は細胞内カルシウム増加によりカルシウム依存性カリウムチャネルが開いたためである¹⁷⁾。

ホールセルになった瞬間からカルシウム濃度の変化が起こる時は機械的刺激によるカルシウムの増加か、電極内のカルシウム濃度が高すぎる可能性がある。機械刺激が起こっている場合は蛍光画像を同時に観察しておくことでカルシウム波が広がっていくのでわかる。

パッチ電極は 10 μ m ϕ 以下の小さな細胞に対しても細胞内にセカンドメッセンジャーなどの物質を導入するのに使える。その時カルシウムを同時計測しているとカルシウムの変化によって活性の有無を検定することができる。図 4 B は電極内にイノシトール 1, 4, 5-3 リ

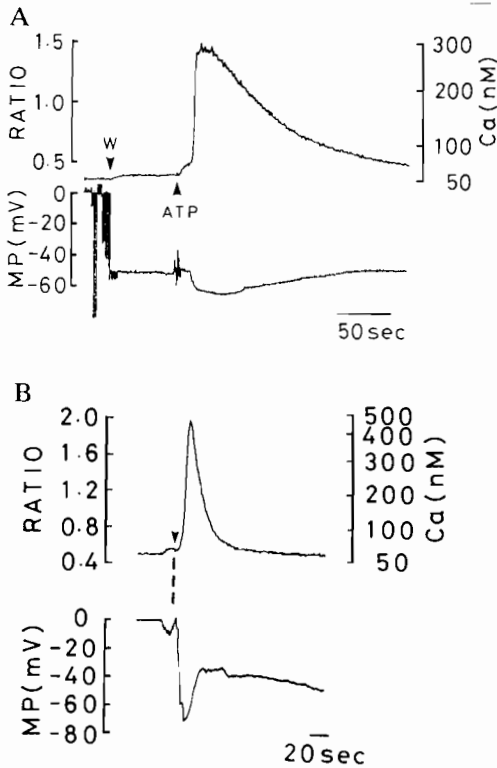


図4. fura-2 蛍光比と膜電位の同時記録の例。マウス乳癌由来樹立細胞 (MMT 060562) を使用。電極内液には高カリウム液 +0.18 mM Ca, 0.78 mM EGTA で弱くキレートしている。上段と下段はそれぞれ fura-2 蛍光比, 膜電位を示す。上段右にカルシウム濃度 (推測値) を示す。

A. ATP の作用。セルアタッチモードで膜抵抗モニタのパルスを観察しながら電極内を減圧すると突然ホールセルモードになり、静止電位が記録できた (W)。100 μ M ATP の細胞外投与により細胞内カルシウムの増加 (上段) と同時に過分極電位 (下段) が観察できた。過分極は細胞内カルシウムの増加によりカルシウム依存性カリウムチャンネルが活性化したためである。

B. イノシトール-1, 4, 5-3リン酸の細胞内注入。電極内液にイノシトール-1, 4, 5-3リン酸 (20 μ M) を入れておき、同様に記録した。セルアタッチよりホールセルモードになった瞬間 (矢印) に一過性の細胞内カルシウム増加と過分極が観察できた¹⁸⁾。

ン酸 (IP₃) を入れた電極で乳腺培養細胞にパッチをかけた例で、ホールセルにすると細胞内カルシウムの上昇がみられ同時に膜電位の過分極が観察された¹⁸⁾。この反応は電極内液である High-K 溶液だけや IP₄ 添加では起こらず乳腺

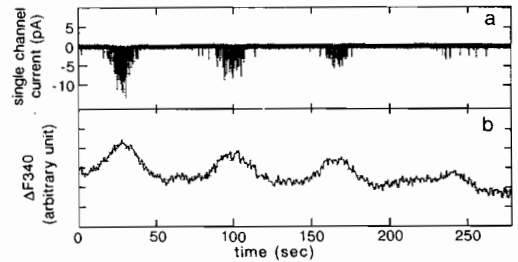


図5. 単一チャンネル活動と fura-2 蛍光の同時記録⁸⁾。fura-2 を負荷した乳癌細胞を 340 nm の紫外光で励起し、蛍光変化をリアルタイム画像差分法⁸⁾で観察した。340 nm で励起した蛍光の増加はカルシウム増加に対応している。単一チャンネルを計測している細胞の蛍光変化をイメージメモリボードを介してリアルタイムでアナログ出力した。

細胞に IP₃ 感受性のカルシウムストアーがあることを示している。

2. 画像ボードを使った同時計測

われわれは fura-2 の 340 nm 励起の蛍光像に上述のリアルタイム画像差分法を適応し、カルシウム変動を可視化している (図2参照)。その TV 信号出力を画像入出力ボード (Microtechnica, MT 9801 FMM) を介して差分画像をメモリにとりこみ、ある領域の画像の濃度の積分値を計算させ、それを D/A より出力させることでシングルチャンネルとの同時記録を行った⁸⁾ (図5)。前もってカルシウム振動している細胞をリアルタイム画像差分法で同定した上で、パッチをあてシングルチャンネル記録し、蛍光変化の方はその細胞の領域を指定しその濃度を D/A 出力させた。

VI. プログラム「MiCa」について

われわれはオリンパス OSP-3 を使って、fura-2 蛍光のスポット測光と電気現象の同時計測ができるプログラム Measurement of Intracellular Calcium 「MiCa」を開発した⁹⁾。蛍光と電気現象の同時記録の場合、本ソフトの名は Measurements of Intracellular Calcium and Channel ということで「MiCaChan (みかちゃん)」となっている。本ソフトは蛍光測光と A/D, D/A コンバーターが同時に使用できるので、蛍光計測と同時にアナログデータを取り

こむこともできるし、蛍光比を直接アナログ出力することもできる。タイムラプスによる間欠照明で長時間にわたる記録も可能になっている。さらに、Fluo-3, Rhod-2 等の一波長励起、一波長蛍光色素にも対応している。電気現象が比較的ゆっくりしている場合(たとえば図 4 A, B)なら、蛍光測光の各点ごとに A/D コンバーターから 1 点をとりこむことで測定できる。インパルスのように時間経過が速い場合、必要なサンプリングクロックは数十 μ 秒となり、OSP-3 の時間分解能では不十分である。その場合は fura-2 蛍光比あるいは蛍光強度を D/A コンバーターからアナログ信号として出力させ、パッチの膜電流や電位信号と同時にデータレコーダーに記録するか、パッチ用ソフトに A/D 介していれば同時記録することになる。(図 2 参照)

必要なハードウェアはオリンパス OSP-3, NECPC-9 8 0 1 (VM から RA まで、その後の最新型でも動くはずだがチェックはしていない)、GPIB ボード、A/D はカノーブス DMA, アナログプロ, ネオログ, D/A はカノーブス DMA またはアドテックである。「MiCa」はフリーウェアで、Nifty Serve の FBio に登録してある。

Ⅶ. お わ り に

蛍光測光法はカルシウム測光だけに限らず蛍光を使った生理活性及び形態観察すべてに応用できる。一方パッチもチャンネルや電流測定以外に膜容量測定と合わせたり、あるいは細胞内セカンドメッセンジャーの注入に用いたりすることもでき、二つの方法を合わせるにより多くの新しい情報が得られる。

書き終わってみると多くの部分がパッチのセットアップの基本の記述となってしまった。逆にいうとカルシウム測光との併用は基本のところをちゃんと抑えておけば問題がないということでもある。また、このセットアップの基本は、実際パッチを始めようとするとき重要であり、いままであまり触れられていない部分もあ

る。パッチを始めようというとき少しでも拙文がお役に立てば望外の幸せである。

文 献

- 1) Tsien RY (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis and properties of prototype structures, *Biochemistry* 19, 2396
- 2) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties *J Biol Chem* 260, 3440
- 3) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch* 391, 85-100
- 4) 唐木英明(1989) 蛍光カルシウム指示薬の実験基礎, 唐木, 工藤, 栗山編, 実験医学 7, 羊土社 26-31
- 5) 金子晃, 田中由宇志, 林紀夫(1992) 細胞内カルシウムおよび PH 測定法, 東山監修, 神経科学研究の先端技術プロトコール 2, 情報伝達の分子基盤, 厚生社 16-23
- 6) Thomas AP, Delaville F (1991) The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells, In: Cellular Calcium, Ed McCormack JG, Cobbold PH, IRL Press Oxford, 1-53
- 7) Williams PA, Fay FS (1990) Imaging of Cell Calcium, *Cell Calcium* 11 No. 2/3 (Cell Calcium の特別号)
- 8) Furuya K and Enomoto K (1990) Real-time imaging of intracellular calcium change with simultaneous single channel recording in mammary epithelial cells, *Brain Res Bull* 25, 779-781
- 9) 小島美香, 伊藤昭光, 筒井泉雄, 榎本浩一, 古家喜四夫(1991) 細胞内カルシウムと他現象との同時測定プログラムの開発, *生物物理* 31, 51-53
- 10) 榎本浩一, 古家喜四夫(1990) 細胞内カルシウムとシングルチャンネルの同時計測, 第12回生理学コンピューター研究会
- 11) 小倉明彦, 工藤 久(1987) 海馬神経細胞での細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定, *生体の科学* 38, 597-603
- 12) 竹中敏文(1982) 測定の条件と実際, 平本幸男, 竹中敏文編, 電氣的測定法, 実験生物学講座, 丸善 99-104
- 13) Yawo H, Chuhma N (1993) Preferential inhibition of ω -conotoxin-sensitive presynaptic Ca^{2+} channels by adenosine autoreceptors, *Nature* 365, 256-258
- 14) Thomas AP, Delaville F (1991) The use of

- fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells, In: McCormack JG, Cobbold PH, Cellular Calcium, Chap 1, IRL Press, Oxford
- 15) Evans MG, Marty A (1986) Potentiation of muscarinic and α -adrenergic responses by an analogue of guanosine 5'-triphosphate, Proc Natl Acad Sci USA 83, 4099-4103
 - 16) 洲崎敏伸 (1987) Ca-EGTA 緩衝液における遊離カルシウムイオン濃度を計算するためのプログラム, 動物生理 4, 19-24
 - 17) Enomoto K, Furuya K, Maeno T, Edwards C, Oka T (1987) Mechanically induced electrical responses in murine mammary epithelial cells in primary culture, FEBS Lett 223, 82-86
 - 18) Enomoto K, Furuya K, Yamagishi S, Maeno T (1993) Proliferation-associated increase in sensitivity of mammary epithelial cells to inositol-1, 4, 5-trisphosphate, Cell Biochem Funct 11, 52-62