

## 細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の光学的測定法概説

小西 真人・栗原 敏

(東京慈恵会医科大学第二生理学教室)

### I はじめに

種々の細胞機能が Ca イオン (Ca<sup>2+</sup>) によって直接、あるいは間接的に制御・調節されてることが知られており、細胞内信号伝達における細胞内 Ca<sup>2+</sup> の重要性はあらためて強調するまでもない。細胞内 Ca<sup>2+</sup> による細胞機能の制御・調節機序を知るためには、細胞内(特に細胞質内)遊離 Ca<sup>2+</sup> 濃度の測定が重要であり、現在までに多くの測定法が試みられてきた。溶液中での Ca<sup>2+</sup> 濃度の測定と異なり、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) の測定のためには、細胞に対する侵襲が少なく細胞機能を損なわないこと、細胞内の Ca<sup>2+</sup> 以外の要因によって影響を受けにくいことなどの条件が要求される。また、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の変化はしばしば一過性であり (Ca<sup>2+</sup> transient)、その変化に十分に追従する時間分解能が必要である。現在のところ、理想的な細胞内遊離 Ca<sup>2+</sup> 測定法はなく、指示薬による光学的測定法や Ca<sup>2+</sup> 感受性微小電極法が実験の目的・条件に応じて選択されている。

1960年代に指示薬の吸光度変化<sup>9)</sup>や aequorin の発光<sup>1)</sup>を用いて細胞内 Ca<sup>2+</sup> transient の測定が初めて報告されて以来、種々の Ca<sup>2+</sup> 感受性色素、発光タンパク、Ca<sup>2+</sup> 感受性微小電極などが [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の測定に用いられてきた<sup>4)</sup>。しかし、それらの方法は主として比較的大型の細胞(あるいは多細胞標本)に限られて適用され、小さな単一細胞での [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定は技術的に困難であった。Tsien らのグループによって開発された一連の蛍光 Ca<sup>2+</sup> 指示薬<sup>7,17)</sup>は、acetoxy methyl エステルを用いて細胞内に容易に導入することができ、また [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の変化によって大きな蛍光信号が得られることなどから

小さな細胞にも適用され、またたく間に広く使われるようになった。その後も、多くの新しい指示薬が開発されている(図1)。

本稿では細胞内に導入した指示薬による光学的測定法、特に蛍光(吸光)指示薬による測定法について、原理と実際のアウトラインを解説する。なお、aequorin による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定法はすでに本誌に掲載されているので割愛した<sup>15)</sup>。

### II. 吸光と蛍光

分子はある特有の波長の光を吸収し、分子を構成する電子は高いエネルギー準位に移る(励起状態)。溶液中の Ca<sup>2+</sup> 濃度変化によって吸収が変化する(色が変わる)ことを利用したのが吸光 Ca<sup>2+</sup> 指示薬である。吸光度は入射光と透過光の強度比の常用対数値で表され、あまり吸光度が大きくない範囲では、Beer-Lambert の法則が成り立つ。ある波長λにおいて、

$$A \equiv \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot \ell \quad (\text{Beer's law}) \quad (1)$$

ここで、A は吸光度、I<sub>0</sub> は入射光強度、I は透過光強度、c は吸収物質の濃度(M)、ℓ は吸収物質の層の厚さ(cm)、ε は吸収物質のモル吸光係数(M<sup>-1</sup>・cm<sup>-1</sup>)である。波長を変えて吸光度を測定すると、吸光スペクトルが得られる。吸光 Ca<sup>2+</sup> 指示薬では、モル吸光係数が Ca<sup>2+</sup> との結合により変化する。この式から明らかのように吸光度は標本の厚さ(ℓ)に比例するので、小さい単一細胞のように厚みのない標本では測定が難しい。逆に、あまり厚い標本では吸収が大きくなりすぎ、やはり正確な測定はできない。また、細胞自身の吸収が紫外領域で急激に増大するため、紫外光の吸光度測定は非常に困難である。

## Rat ventricular myocytes

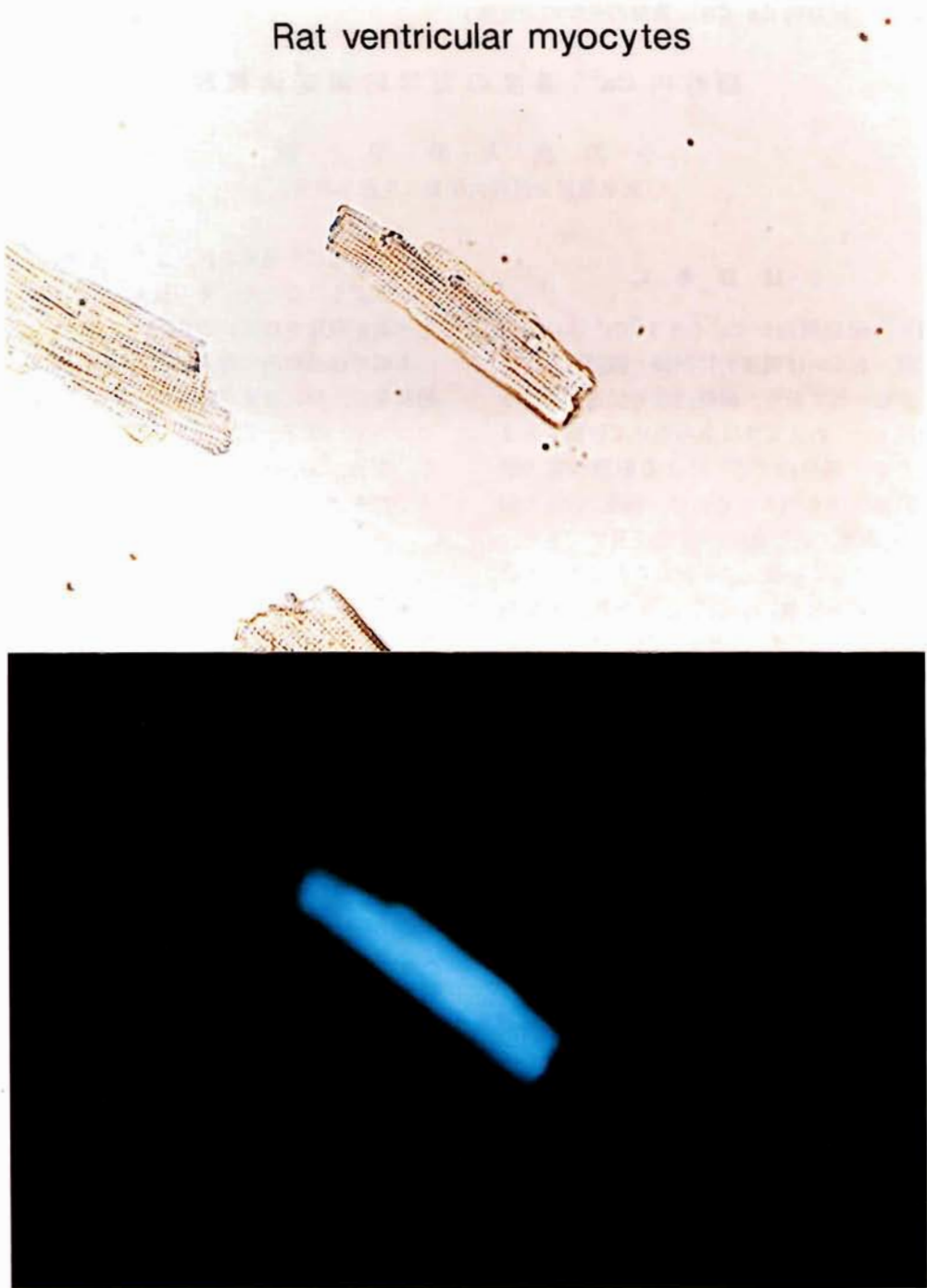


図1. ラット単一心室筋細胞からの蛍光測定. 酵素処理により単離した細胞に  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  指示薬, mag-fura-2 (furaptra) を AM エステルを用いて導入した. (上) 白色光による顕微鏡像. 三つの細胞が見える. (下) 近紫外光励起 (380 nm) による中央の細胞からの蛍光像. 励起光の照射領域を中央の細胞に絞ってあるため, まわりの細胞は蛍光を発していない.

蛍光分子は、励起状態の電子が元の基底状態に戻るとき励起光よりエネルギーの低い(波長の長い)光を出す。そのため励起スペクトル(励起波長を変えて、ある波長の蛍光強度を測定したものは吸光スペクトルに近い波長域にあるが、発光スペクトル(励起波長を固定して、測定する蛍光の波長を変える)は一般に吸光スペクトルより長波長側にある<sup>16)</sup>。

$$F = 2.303 I_0 \cdot \epsilon \cdot \Phi \quad (2)$$

$F$  は蛍光強度、 $I_0$  は入射光(励起光)の強度、 $c$  は蛍光分子の濃度(M)、 $\epsilon$  はモル吸光係数( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )である。 $\Phi$  は量子収率と呼ばれ、吸収された光子あたりの発光量を表す。多くの蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬では、 $\text{Ca}^{2+}$  との結合によりモル吸光係数、量子収率の両方が変化し、蛍光強度が変化する。(2)式からもわかるように、蛍光強度は入射光強度に依存しているため、装置により異なる。つまり、異なった光学系で測られた蛍光強度を単純に比較することはできない。また、一般に蛍光は吸光に比べて、環境の影響を受けやすい。蛍光に影響を与えることが知られている環境因子の例としては次のようなものがある。a) 温度：低温で一般に蛍光強度は増加する(蛍光寿命が長くなるため)。b) 消光分子の存在(quenching)： $\text{O}_2$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{Cs}^+$ などは蛍光分子と結合して蛍光を減少させることがある。c) 粘度：粘度が高くなると一般に蛍光強度は増大する。d) タンパク分子などへの結合：タンパク質などの高分子と結合すると、蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬の特性( $\text{Ca}^{2+}$  結合、蛍光スペクトル)が変化する。e) 自家蛍光 auto-fluorescence：細胞自体が蛍光物質を持っており(例えば、励起光の波長 340 nm 付近では NADH など)、 $\text{Ca}^{2+}$  指示薬の蛍光の測定に影響を与えることがある。

### Ⅲ. 測定装置

測定に必要な最も基本的な装置は、光源(ランプ)、励起波長選択器(分光フィルター、またはモノクロメータ)、蛍光波長選択器(分光フ

ルター、またはモノクロメータ)、検出器、記録装置である。さらに、小さな細胞からの蛍光測定には顕微鏡が必要で、適当な対物レンズと組み合わせて用いる。顕微鏡を用いた蛍光測光(顕微測光)の光学系には、落射型と透過型の2種類がある。図2は倒立顕微鏡の例を示す。落射型(図2B)では、励起光と蛍光が共通の光路を通るが、ダイクロイックミラーが短波長の光(励起光)を反射し、長波長の蛍光を透過するので、両者を分離することができる。使用する  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬によって、適当なダイクロイックミラーを選択する必要がある。

#### A. 光源

光源としては、目的とする励起波長によって、キセノンランプ、水銀ランプ、タングステンランプ(タングステン・ハロゲンランプ)が用いられる。タングステンランプは、ノイズの少ない安定した光源であり、可視光領域ではよく使われるが、紫外領域( $<400 \text{ nm}$ )では発光が極端に弱くなる。キセノンランプは広い波長範囲にわたって比較的平坦な発光スペクトルを示すので<sup>11)</sup>、自由に励起波長を選択できる。水銀ランプの発光スペクトルは連続ではなく、多くの発光ピーク(輝線)を持つ<sup>11)</sup>。目的とする励起波長が水銀ランプの輝線と一致する場合には、水銀ランプを光源として用いることができる。多くの場合、キセノンランプが第一選択となる。

#### B. 光学素子(ガラスか石英)

光源から検出器までの光路を構成する光学素子(レンズ、オプティカルファイバーなど)の材質としては、通常は光学ガラスが用いられる。しかし、ガラスは紫外光の透過性が極端に落ちるので、紫外光の光路には(高価ではあるが)石英の素子が必要である。たとえば紫外領域で励起して可視領域の蛍光を測定する場合、励起光の光路には石英の素子を使い、蛍光の光路には光学ガラスの素子を用いるようにする。

対物レンズの選択も光学測定の結果を大きく左右する。対物レンズに表示されている開口数

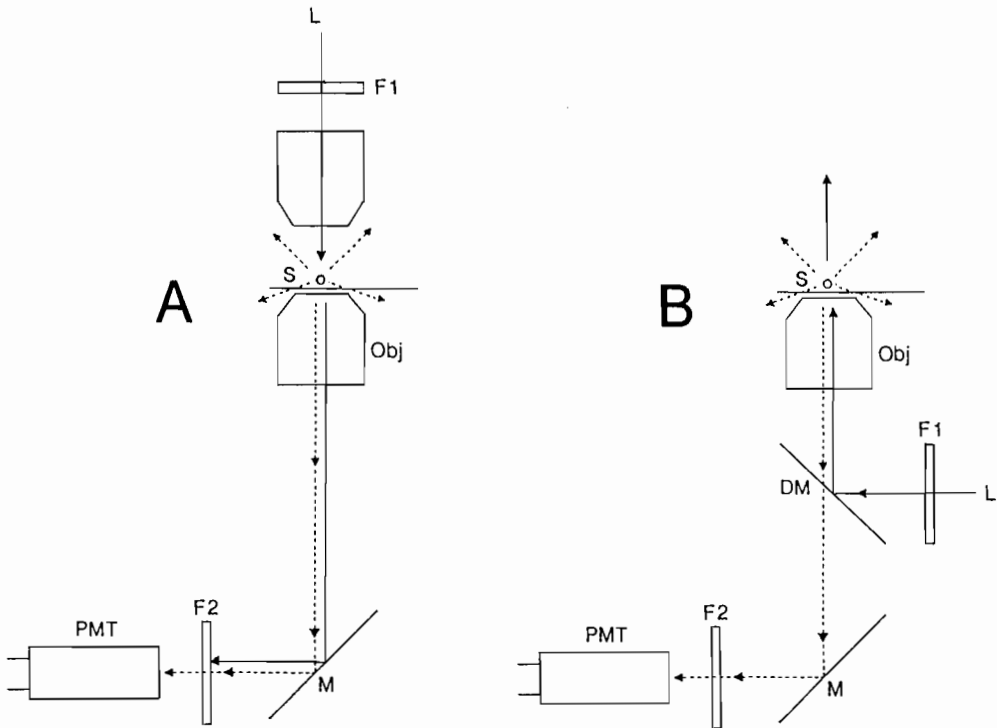


図2. 倒立顕微鏡を用いた透過型(A), 落射型(B)蛍光測定装置の光路のダイアグラム. 実線の矢印は励起光の進路を, 点線の矢印は蛍光の進路を示す. L:光源. F1:励起光用のフィルター. DM:ダイクロイックミラー. Obj:対物レンズ. S:標本. M:反射鏡. F2:蛍光用のフィルター. PMT:光電子増倍管.

(N. A.; numerical aperture) が大きいほど明るいレンズで, より感度のよい蛍光測定ができる. 測定される蛍光の明るさは, 下の式のように開口数の2乗に比例する.

$$I = I_0 \left[ \frac{N. A.}{M} \right]^2 \quad (3)$$

N. A. は開口数, M は倍率である. 特に落射型の蛍光測定の場合には, 対物レンズが励起光の集光レンズを兼ねるため, 蛍光の明るさは開口数の4乗に比例する<sup>5)</sup>.

分光フィルターには, 特定の波長域の光のみを透過するバンドパスフィルターと, 特定の波長より長波長側の光を透過する長波長透過フィルターとがある. バンドパスフィルターは, ピーク透過波長が自分の必要とする波長と一致するものを選ぶ. また, バンドパスフィルターには種々の半値幅(最大透過率の50%の波長域)のも

のがあり, 目的に応じて選択するとよい. 半値幅の小さなものは, 波長の精度は良いが透過光の強度は落ちる. 場合によっては, 半値幅の大きなフィルターを使い, 波長の分解能を犠牲にしても光の強度を稼いだ方がよいこともある. また, 同じ半値幅であっても透過域のすそが広がっているフィルターは思わぬ迷光の原因となることがあり, 注意を要する. 時に, 2倍, 3倍波長の副透過帯をもつこともあり思わぬ障害を引き起こすことがある. フィルターの透過スペクトルは, 購入時に添付されてくることもあるが, そうでなければ分光光度計で容易に調べることができるので, 使用前にチェックするとよい. 測定する蛍光強度が弱い時には, 蛍光側のフィルターとして長波長透過フィルターを使用することも考えられる. この場合, 蛍光の波長特性は犠牲になるが, 広い波長域の蛍光を捕

らえることができるので、特に幅の広いスペクトルをもつ  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 (例えば, fura-2, fluo-3) には有効である. 分光フィルターを設置する際には, 光がフィルターに垂直に入射するように注意する. もし光路に対して傾いていると, フィルターの透過域は短波長側にずれる<sup>11)</sup>.

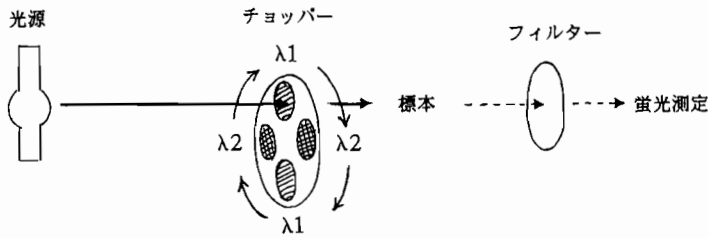
標本を入れる実験槽はアクリルに穴を開けたものにカバーガラスをはって自作できる. 紫外光で励起する場合は, カバーガラスはできるだけ薄い方が紫外光の吸収が少ない. また, 接着剤は蛍光を出すことが多いので, 測定視野の中にはみださないように注意した方がよい. 培養

細胞を用いる時は, そのまま蛍光測定ができる培養ディッシュも市販されている.

### C. 検出器

蛍光の検出器としては, 一般に光電子増倍管が使われる. 光電子増倍管の感度は光の波長によって変化する. 分光感度特性は, 光が入射する窓や光電面の材質によって決まるので, 自分の測定する光の波長に適した光電子増倍管を選択するとよい. さらに, 測定する蛍光が暗い時には, 暗電流(光が入射していない時の出力電流)の低いものが望ましい. 吸光度の測定, あ

### A. 二波長励起／一波長測光



### B. 一波長励起／二波長測光

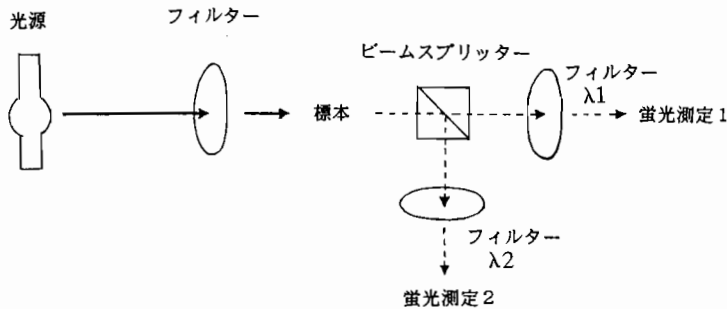


図3. 二波長蛍光測定装置の原理. A: 二つの異なる波長で交互に励起して, 一波長の蛍光を測定する.  $\text{Ca}^{2+}$  結合により励起スペクトルがシフトする fura-2 などの指示薬での測定に有効. この例では, 2種のフィルターをいれたフィルターホルダーが回転することにより励起波長が交互に変化する(チョッパー). 標本からは  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  それぞれの励起による蛍光が交互に出るので, サンプル & ホールド回路などを使って両者を分離する必要がある. B: 一波長で励起して, 二つの異なる波長の蛍光を測定する. 標本から出た蛍光をビームスプリッターで二つに分けて, 異なる透過域のフィルターで測定する. indo-1 のように  $\text{Ca}^{2+}$  により発光スペクトルがシフトする指示薬に有効.

るいは非常に明るい蛍光の測定には、フォトダイオードもノイズの少ない検出器として適している<sup>5)</sup>。

光電子増倍管、フォトダイオードは基本的には視野全体から信号を検出するため、得られる情報は平均  $\text{Ca}^{2+}$  濃度である。そのため、細胞内(あるいは標本内)での局所的  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化をとらえることは困難である。標本内での位置情報を得たい時には(イメージングまたはマッピング)、検出器として撮像管(またはフォトダイオードアレイ)を用いる。撮像管にも多くの種類があり、それぞれ分光感度特性や感度が異なる<sup>10)</sup>。

光電子増倍管の出力電流を電圧に変換した後は、通常の記録装置(ペンレコーダー、データレコーダ)が使用できる。A/D 変換してコンピュータに取り込むと後の解析に便利である。

#### D. その他

後述するように、実験によっては二波長の励起光を交互に切り換える、あるいは二波長の蛍光を検出する方法が使われる。図3はそのような測定のための装置の原理を示す。二波長の励起光を交互に切り換える場合は(図3A)、チョッパーが必要であり、また蛍光測定後に信号を分けるためのサンプル & ホールド回路などがつくため装置としては多少複雑になる。

### IV. $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬

#### A. $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬の選択

現在までに用いられてきた  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬には、1) aequorin, obelin などの発光蛋白質(生物発光を利用)、2) arsenazo III, antipyrilazo III などの誘導体(吸光度測定)、3) murexide, tetramethylmurexide, purpurate diacetic acid (PDAA) などの purprate 誘導体(吸光度測定)、4) fura-2, indo-1, fluo-3, rhod-2 などの tetracarboxylate 誘導体(蛍光・吸光度測定)などがある。

適当な  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬の選択にあたっては、次のような諸点を考慮すべきである。

#### 1) 細胞毒性がない

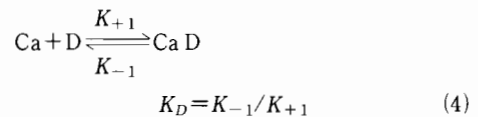
目的とする細胞に対し毒性のあるものはもちろん、何らかの pharmacological な作用のあるものは避けるべきである。Arsenazo III などは、骨格筋筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプを抑制することが報告されている<sup>19)</sup>。

#### 2) 測定したい $\text{Ca}^{2+}$ 濃度範囲

$\text{Ca}^{2+}$  に対して親和性の高い指示薬は、静止レベル付近の低い  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  測定に適しているが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  があまり高くなると指示薬が飽和してしまい測定の信頼性が低くなる。逆に低親和性指示薬は、低いレベルの  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  では小さな信号しか得られず、S/N 比が低くなってしまふ。解離定数( $K_D$ )が目的とする  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  付近にあれば、最も感度の良い測定ができる。

#### 3) 十分に速い反応速度

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化の時間経過を忠実に追うためには、指示薬と  $\text{Ca}^{2+}$  の反応速度が  $\text{Ca}^{2+}$  transient に比べて十分に速い必要がある。低親和性の(解離定数の大きい)指示薬ほど反応速度が速い傾向がある。今、 $\text{Ca}^{2+}$  と指示薬が 1:1 の結合をする場合を考える。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度がステップ状に上昇した時、指示薬と  $\text{Ca}^{2+}$  との結合の時間経過は指数関数であらわされる。



$$\text{rate constant} = \frac{1}{\tau} = K_{+1}[\text{Ca}]' + K_{-1} \quad (5)$$

$[\text{Ca}]'$  は変化後の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度、 $K_{+1}$ 、 $K_{-1}$  はそれぞれ結合と解離の速度定数である。式11より、指示薬が  $\text{Ca}^{2+}$  と結合する速さ(rate constant)は結合の速度定数( $K_{+1}$ )だけでなく、解離の速度定数( $K_{-1}$ )にも依存することがわかる。もし、最終  $\text{Ca}^{2+}$  濃度( $[\text{Ca}]'$ )が、 $K_D$  よりも十分低い場合には( $[\text{Ca}]' \ll K_D$ )、 $K_{+1}[\text{Ca}]' \ll K_{-1}$  となるから、rate constant はほとんど  $K_{-1}$  によって決まることになる。

#### 4) 励起・蛍光波長

できれば、可視領域での励起・蛍光測光の方

が細胞の吸収・自家蛍光などの影響を受けにくく、装置も安価である。また、caged 化合物と組み合わせて使用する場合には、caged 化合物を紫外光で光分解する際に、 $\text{Ca}^{2+}$  指示薬も同時に分解されてしまわないように紫外領域に吸収を持たない指示薬が適している<sup>12)</sup>。

#### 5) 他のイオン、薬物による妨害

たとえば、目的とする実験条件下で細胞内 pH や  $\text{Mg}^{2+}$  濃度変化が予測される場合には、 $\text{H}^+$  や  $\text{Mg}^{2+}$  によって影響を受けにくい指示薬が望ましい。多くの指示薬は  $\text{Ca}^{2+}$  だけでなく  $\text{Mg}^{2+}$  と結合するから、 $\text{Ca}^{2+}$  との親和性は  $\text{Mg}^{2+}$  存在下で見かけ上、低下することになる。

$$K'_{D,\text{Ca}} = K_{D,\text{Ca}} \left( 1 + \frac{[\text{Mg}^{2+}]}{K_{D,\text{Mg}}} \right) \quad (6)$$

ここで、 $K'_{D,\text{Ca}}$  は Ca に対する見かけの解離定数、 $K_{D,\text{Ca}}$  は Ca に対する解離定数、 $K_{D,\text{Mg}}$  は Mg に対する解離定数、 $[\text{Mg}^{2+}]$  は遊離 Mg 濃度である。

また、細胞内に入る薬物や生体活性物質を使用する場合には、指示薬に対するその物質の直接効果(蛍光への、あるいは  $\text{Ca}^{2+}$  との結合反応への効果)をあらかじめ検討しておく必要がある。例として、カフェインが indo-1 の蛍光に影響を与えることが報告されている<sup>20)</sup>。

#### 6) 測定装置と解析法

Fura-2 の励起スペクトル(吸光スペクトル)が  $\text{Ca}^{2+}$  との結合によって大きくシフトする<sup>7)</sup>。このような場合には、二つの励起波長での蛍光を測定(二波長励起/一波長蛍光測光)し、その比をとることにより、指示薬濃度の変化や細胞運動による形態変化などの影響を少なくすることができる(図 4 A)。その場合には、二波長の励起光を切り換えて細胞に照射する装置が必要である(図 3 A)。一方、indo-1 のように、 $\text{Ca}^{2+}$  によって発光スペクトルがシフトする指示薬<sup>7)</sup>では、励起光は一波長で良いが、蛍光を二波長で測定することができる(一波長励起/二波長蛍光測光)(図 4 B)。その場合、細胞からの蛍光を二方向に分ける光学系が必要となる(図 3 B)。

### B. 細胞内への導入

#### 1) microinjection

細胞に  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬溶液を充填した微小電極を刺入し、圧力または電気泳動(iontophoresis)により微小電極の先端から細胞内に注入する。細胞への機械的ダメージを最小限にとどめられるなら、microinjection は指示薬の導入法としては最良の方法であろう。

#### 2) パッチピペットからの灌流

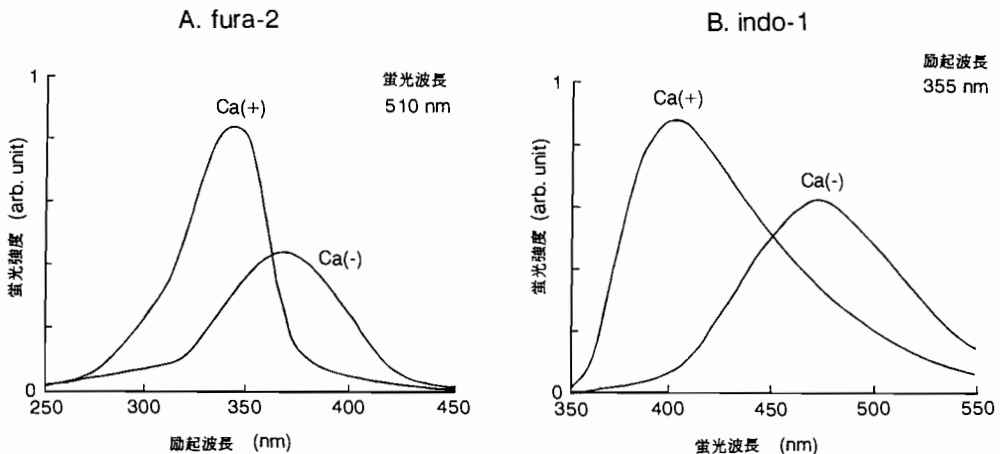


図 4.  $\text{Ca}^{2+}$  結合状態(Ca(+))、非結合状態(Ca(-))における  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬の蛍光スペクトルの例。A: fura-2 の蛍光励起スペクトル。B: indo-1 の蛍光発光スペクトル。

$\text{Ca}^{2+}$  指示薬をパッチピペット内液に入れておき、細胞膜を破り whole cell recording モードにして、ピペットから細胞内に拡散させる。蛍光と膜電流の同時測定が可能である。ただし、細胞内が十分ピペット内液で灌流されている場合には、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  はピペット内液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度により影響される可能性がある。

### 3) AM (acetoxymethyl) エステルによる導入

指示薬の AM エステル(細胞膜を透過する)を含む溶液中で細胞をインキュベートする。AM エステルは細胞膜を透過し細胞内に入り、そこで細胞内 esterase 活性により分解され、細胞膜非透過性の指示薬になる。この方法は、小さな細胞にも機械的なダメージをあたえるこ

となく比較的容易に適用できる。AM エステルのインキュベーションの最適条件(濃度、時間、温度、溶液組成)は用いる細胞により異なるので、検討が必要である。細胞によっては esterase 活性が低く、うまくいかないこともある。AM エステルの溶媒として用いる DMSO の濃度は、細胞機能に影響を与えない程度に低く保つ。問題点としては、a) 中間代謝産物の発生(不完全加水分解物が蛍光を持つことがある)<sup>3)</sup>、b) 細胞内コンパートメント(mitochondria, ER)に取り込まれる可能性<sup>18)</sup>、c) 細胞外への漏出などが指摘されている。

## IV. 蛍光測定

実際の測定にあたっての一般的な注意点とし

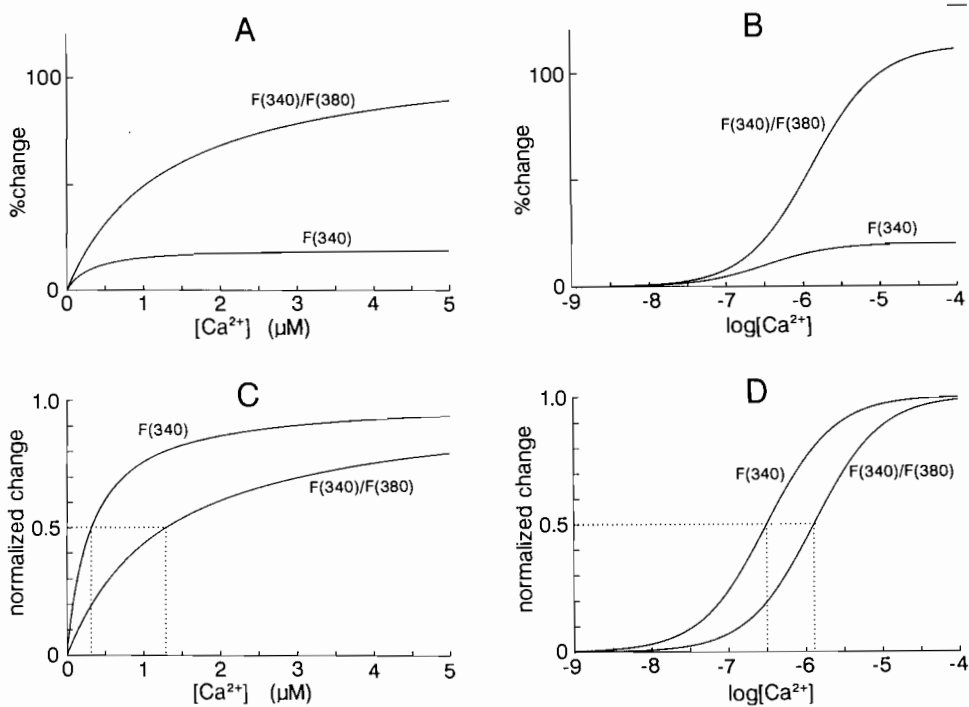


図5. fura-2 蛍光強度の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度による変化.  $F(340)$ : 励起光波長 340 nm での蛍光強度.  $F(380)$ : 励起光波長 380 nm での蛍光強度. 一波長 ( $F(340 \text{ nm})$ ) での解析と二波長での蛍光強度比 ( $F(340)/F(380)$ ) の解析を示す. 図 4 A に示したスペクトルに基づいて、 $K_D$  を 300 nM として計算した。

横軸は、溶液中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を、A、C では線形スケール、B、D では常用対数スケールで表示してある。 $F(340)/F(380)$  の  $\text{Ca}^{2+}$  による変化を、A、B では無  $\text{Ca}^{2+}$  状態に対する % 変化として、C、D では最大変化で正規化して示した。正規化した曲線から明らかなように (C、D)、蛍光強度比をとると  $\text{Ca}^{2+}$  に対する見かけの感度(点線で示す)が変わる。



ては、次のような点があげられる。

1) 細胞への不必要な励起光の照射をさける。指示薬の光分解 (photobleaching) は蛍光強度が減少するだけでなく、蛍光スペクトルの形を変えキャリブレーションにも影響をあたえることがある<sup>3)</sup>。そのために、a) 励起光のシャッターを測定の時だけ開く (手動, 電磁シャッター) あるいは、b) 励起光の光路に ND フィルターを入れて励起光強度をおとす。蛍光信号が小さくなる分は、蛍光側のフィルターに半値巾の大きなものを用いることにより改善する。

2) 光電子増倍管は非常に光に対して感度が高いので、(特に、高電圧をかけて作動させている時に) 強い光をあてないように注意する。光電子増倍管の焼き付きをおこすことがある。また、強い光を照射したあとでは暗電流が増加し、以後の測定に影響を与える。

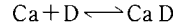
3) 蛍光信号に対する動きのアーチファクトに注意する (細胞の収縮, 振動, 溶液の流れ)。

4) 特殊な溶液で灌流する時には、溶液自身の吸収・蛍光を測ってみる (懸濁液, 蛍光物質を含む溶液)。薬物の細胞に対する影響を調べる時は、薬物の指示薬に対する影響もチェックする必要がある。蛍光を出すゴミ (糸屑, ティッシュの繊維, 死んだ細胞など) がないように実験槽をきれいに清掃し、また時々顕微鏡下で確かめるとよい。

## V. 解析(キャリブレーション)

測定した蛍光強度からバックグラウンド蛍光 (光学系からでる蛍光+細胞の自家蛍光) を差し引いて、細胞内指示薬の蛍光強度を得る。バックグラウンド蛍光が正しく差し引かれていないと誤差の原因となる。

$\text{Ca}^{2+}$  と指示薬が 1:1 の結合をする場合、指示薬分子は  $\text{Ca}^{2+}$  と結合していないもの(D) と  $\text{Ca}^{2+}$  と結合しているもの(CaD) の二種類であると仮定して、解析を進める。



$$K_D = \frac{[\text{Ca}][\text{D}]}{[\text{CaD}]} \quad (7)$$

### 1) 1 波長での測定・解析

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_D \cdot \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F} \quad (8)$$

$F$  : 蛍光強度の測定値

$F_{\max}$  : 飽和  $\text{Ca}^{2+}$  濃度での蛍光強度

$F_{\min}$  :  $\text{Ca}^{2+}$  free での蛍光強度

### 2) 2 波長での測定・解析 (ratiometric method)

二波長励起 / 一波長測光または一波長励起 / 二波長測光により二つの異なる波長での蛍光強度 ( $F_1, F_2$ ) を測定し、その比をとって解析する。

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_D \cdot \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \cdot \frac{S_f}{S_b} \quad (9)$$

$R$  : 蛍光強度比 ( $F_1/F_2$ ) の測定値

$R_{\max}$  : 飽和  $\text{Ca}^{2+}$  濃度での蛍光強度比

$R_{\min}$  :  $\text{Ca}^{2+}$  free での蛍光強度比

$S_f, S_b$  : 各々  $\text{Ca}^{2+}$  free と飽和  $\text{Ca}^{2+}$  での  $F_2$  蛍光強度

### 3) スペクトルによる解析

細胞内で励起スペクトルまたは蛍光スペクトルを測定し、 $\text{Ca}^{2+}$  free, 飽和  $\text{Ca}^{2+}$  濃度でのスペクトルと比較して  $[\text{Ca}^{2+}]$  を求める。基本的には一波長での解析を多くの波長で繰り返すことになるが、より良い精度が得られる。また、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  だけでなく、細胞内での指示薬の特性の変化などの情報も得られる。

問題は、どうやって  $F_{\max}, F_{\min} (R_{\max}, R_{\min})$  および  $K_D$  を求めるか? ということになる。

## A. In vitro calibration

細胞内のイオン環境を模した塩溶液中で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を変え、蛍光を測定する。飽和  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 (例えば、解離定数の100倍) で  $F_{\max} (R_{\max})$  を得、実際上無  $\text{Ca}^{2+}$  条件下 (EGTA などのキレート剤による) で  $F_{\min} (R_{\min})$  を得る。 $F_{\max}, F_{\min}$  は指示薬濃度に依存するので、指

示薬の細胞内濃度がわからないと求めるのは困難である。二波長での蛍光強度比は指示薬濃度に依存しないので(極端に指示薬濃度が変わらなければ), この方法で  $R_{max}$ ,  $R_{min}$  を見積もることができる。その場合, 必ず細胞の測定と同じ装置(光学系)で測定することが重要である。近年, 問題点として, 細胞内環境で指示薬と  $\text{Ca}^{2+}$  の反応が塩溶液中と変わってしまうことが指摘されている<sup>13)</sup>。

### B. In vivo calibration

細胞内環境を保ったままで, 細胞内で  $F_{max}$ ,  $F_{min}$  ( $R_{max}$ ,  $R_{min}$ ) を求めようとする試みもある。 $\text{Ca}^{2+}$  指示薬を導入した細胞を Ca イオノフォア (A 23187, ionomycin など) で処理し, 細胞膜の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する透過性を高め, 細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を変えることにより細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を変えて蛍光を測定する<sup>23)</sup>。この場合, 細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化にともなって, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が非常に低いレベルから飽和  $\text{Ca}^{2+}$  濃度まで実際に変わっているかどうかの確認は難しい。また, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が細胞外と同じになっているかどうかかわからないので,  $K_D$  を見積もることは困難である。

## VI. 解析上の問題点

### 1) 標本による励起光, 蛍光の吸収

厚い標本(組織)を用いる場合, 組織による吸収が無視できないことがある。また, 強い蛍光信号を得ようとして指示薬濃度を高くすると, 指示薬自身による吸収(inner filter effect)が大きくなり, 蛍光信号の歪みの原因となることがある<sup>11)</sup>。対策としては, できるだけ薄い標本を用い, 指示薬濃度を不必要に高くしないようにする。

### 2) 細胞内コンパートメントへのトラッピング(特に AM エステルを用いた場合)

指示薬の AM エステルが細胞内コンパートメント(mitochondria, ER など)の膜を透過して中に入り, そこで分解されると, 指示薬分子がコンパートメント内にトラップされる。その場

合, 蛍光信号は細胞質でなくコンパートメント内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を反映する<sup>18)</sup>。

サポニンによって細胞膜の透過性を選択的に高めた時, 細胞質の指示薬は速やかに漏出し, 残る蛍光強度は細胞内コンパートメントにトラップされた指示薬の指標となる<sup>6)</sup>。また,  $\text{Mn}^{2+}$  を含む溶液中に細胞をインキュベートすることより, 細胞質の指示薬蛍光を  $\text{Mn}^{2+}$  で消光する方法も試みられている<sup>18)</sup>。

### 3) 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の 'buffering'

細胞内指示薬濃度が高すぎると, 指示薬が多くの  $\text{Ca}^{2+}$  を結合するため(buffering),  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  や細胞機能に影響を与える<sup>2)</sup>。

$$\begin{aligned} [\text{Total cytoplasmic Ca}] \\ = [\text{Ca B}] + [\text{Ca D}] + [\text{Ca}^{2+}] \end{aligned} \quad (10)$$

ここで, Bは細胞自身の  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位で,  $\text{Ca}^{2+}$  がBと結合すると(Ca B)細胞機能が現れる。これに対して, 指示薬に結合する  $\text{Ca}^{2+}$  がわずかであれば( $[\text{Ca D}] \ll [\text{Ca B}]$ ), 細胞機能に影響を与えない。

### 4) 細胞内での macromolecule への結合による蛍光スペクトル特性や $\text{Ca}^{2+}$ 結合特性の変化。

細胞内での指示薬が蛋白質などの macromolecule と結合すると蛍光特性や  $\text{Ca}^{2+}$  結合特性( $K_D$ )が変化することが知られている<sup>13,21)</sup>。この問題は, 指示薬の信号から  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を定量する上で大きな問題であり, 決定的な対策は今のところない。上述の  $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォアを用いた in vivo calibration は, 細胞内で  $\text{Ca}^{2+}$  に対するキャリブレーションをしようとする一つの試みである。また, 細胞に高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  や EGTA を注入して  $R_{max}$ ,  $R_{min}$  を見積もった報告もある<sup>22)</sup>。塩溶液中でのキャリブレーション(in vitro calibration)において, 塩溶液にさらに細胞内タンパク質を加えて蛍光測定をすることも試みられている<sup>8,14)</sup>。

## VII. おわりに

「細胞内 Ca イオン濃度の光学的測定法」の

概説と題して述べてきたが、本稿では主に蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬について解説した。その理由は、現在の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度測定において、蛍光指示薬が最もよく使われ、また生理学研究所の「生理学における実験手技に関する研究会」でも受講者のほとんどが蛍光指示薬による測定の手技習得を希望されたからである。蛍光指示薬は感度に優れ、小さな単一細胞での測定が可能であること、また指示薬の AM エステルによる細胞内への導入の容易さも、広く使われている理由だと思われる。しかし、このことは必ずしも、蛍光指示薬が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度測定法として他の方法より優れているということを意味するものではない。むしろ、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の定量性ということに関しては、環境の影響を受けやすい蛍光測定には、考慮すべき難しい点が多々ある。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の正確な定量については、蛍光指示薬による方法を含めてまだ試行錯誤が続いている段階である。吸光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬について、また蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬のさらに詳しい内容については本稿以後の総説を参照していただきたい。Aequorin を初めとする発光タンパクについては優れた総説がある<sup>4)</sup>。

蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を定性的あるいは半定量的にモニターする上では非常に有用な方法である。また、 $\text{Ca}^{2+}$  以外のイオンに対する蛍光指示薬も開発されているので、同様な装置・方法は細胞内の他のイオン濃度の測定にも応用可能である。本稿では、 $\text{Ca}^{2+}$  測定を始めるための基本的な原理を述べた。引き続き、種々の標本における測定について各専門の方々による、より詳しい総説が連載される予定である。

測定装置や試薬の具体的な入手先については、本稿では触れなかったが、もし必要なら著者にご連絡ください。

#### 参 考 文 献

- 1) Ashley, C. C. & Ridgway, E. B. (1968) Simultaneous recording of membrane potential, calcium transients and tension in single muscle fibres. *Nature* **219**, 1168-1169.
- 2) Baylor, S. M. & Hollingworth, S. (1988) Fura-2 calcium transients in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* **403**, 151-192.
- 3) Becker, P. L. & Fay, F. S. (1987) Photobleaching of fura-2 and its effect on determination of calcium concentrations. *Am. J. Physiol.* **253**, C613-C618.
- 4) Blinks, J. R., Wier, W. G., Hess, P. & Prendergast, F. G. (1982) Measurement of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in living cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **40**, 1-114.
- 5) Cohen, L. B. & Leshner, S. (1986) Optical methods in cell physiology, 1st Ed., Optical monitoring of membrane potential: methods of multisite optical measurement, Society of General Physiologists and Wiley Interscience, New York, 71-99.
- 6) Eisner, D. A., Nichols, C. G., O'Neill, S. C., Smith, G. L. & Valdeolmillos, M. (1989) The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and pH in isolated rat ventricular cells. *J. Physiol. (Lond.)* **411**, 393-418.
- 7) Grynkiewicz, G., Poenie M. & Tsien, R. Y. (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.
- 8) Harkins, A. B., Kurebayashi, N. & Baylor, S. M. (1993) Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3. *Biophys. J.* **65**, 865-881.
- 9) Jobsis, F. F. & O'Connor, M. J. (1966) Calcium release and reabsorption in the sartorius muscle of the toad. *J. Gen. Physiol.* **25**, 246-252.
- 10) 神谷 清 (1989) 細胞内カルシウム測定機器の基礎知識—ビデオと画像処理の基礎知識。実験医学(臨時増刊号) **7**, 643-649.
- 11) 神山 勉 (1983) 蛍光測定 生物学への応用(日本分光学会 測定法シリーズ 3) II 章 定常光励起 蛍光光度計蛍光法, 学会出版センター, 東京, 34-98.
- 12) Kao, J. P. Y., Harootunian, A. T. & Tsien, R. Y. (1989) Photochemically generated cytoplasmic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J. Biol. Chem.* **264**, 8179-8184.
- 13) Konishi, M., Olson, A., Hollingworth, S. & Baylor, S. M. (1988) Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. *Biophys. J.* **54**, 1089-1104.
- 14) Kurebayashi, N., Harkins, A. B. & Baylor, S. M. (1993) Use of fura red as an intracellular calcium indicator in frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* **64**, 1934-1960.
- 15) 栗原 敏, 小西真人, 高橋智幸 (1982) Aequorin による筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  transient の測定. 日本生理学雑誌 **44**, 37-48.
- 16) 御橋広真 (1983) 蛍光測定 生物学への応用(日本分光学会 測定法シリーズ 3) I 章 蛍光法で

- 何がわかるか, 学会出版センター, 東京, 1-43.
- 17) Minta, A., Kao, J. P. Y. & Tsien, R. (1989) Fluorescent indicators for cytoplasmic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* **264**, 8171-8178.
  - 18) Miyata, H., Silverman, H. S., Sollot, S. J., Lakatta, E. G., Stern, M. D. & Hansford, R. G. (1991) Measurement of mitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in living single rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* **261**, H 1123-H 1134.
  - 19) Ogawa, S., Harafuji, H. & Kurebayashi, N. (1980) Comparison of the characteristics of four metalochromic dyes as potential calcium indicators for biological experiments. *J. Biochem.* **87**, 1293-1303.
  - 20) O'Neill, S. C., Donoso, P. & Eisner, D. A. (1990) The role of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sensitization in the caffeine contracture of rat myocytes: measurement of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and  $[\text{caffeine}]_i$ . *J. Physiol. (London)* **425**, 55-70.
  - 21) Uto, A., Arai, H. & Ogawa, Y. (1991) Reassessment of fura-2 and the ratio method for determination of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *Cell Calcium* **12**, 29-37.
  - 22) Westerblad, H. & Allen, D. G. (1993) The influence of intracellular pH on contraction, relaxation and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in intact single fibres from mouse muscle. *J. Physiol. (London)* **466**, 611-628.
  - 23) Williams, D. A. & Fay, F. S. (1990) Intracellular calibration of the fluorescent calcium indicator Fura-2. *Cell Calcium* **11**, 75-83.