

## 細胞内 Ca イオン濃度測定に使われる装置

宮川 厚夫

(浜松医科大学光量子医学研究センター光テクノロジー(ホトニクス)研究部門)

### 1. はじめに

Ca イオンは、全ての生物のあらゆる種類の細胞でセカンドメッセンジャーとして共通的に利用されているため、細胞内遊離 Ca イオン濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) を測ることで、様々な生命現象で生じる過程を解明できる。このため、以前から arsenazo III や antipyrylazo III などの metallochromic dye を Ca 指示薬に利用<sup>1)</sup>したり、Ca 発光タンパク質 aequorin<sup>2,3)</sup>を用いた  $[Ca^{2+}]_i$  が行われていた<sup>4)</sup>。一方、R. Y. Tsien らによる蛍光性 Ca 指示薬 quin-2 の発表(1981年)<sup>5)</sup>を始めとし、多種類の蛍光プローブ試薬が合成<sup>6,7)</sup>され、生きている細胞や組織での  $[Ca^{2+}]_i$  の測定が容易になってきている。

これらの蛍光プローブ試薬が広く使用されるようになったのは、本実験講座の「Ca 指示薬の基礎」で述べられたように、Ca イオン濃度による蛍光強度変化が大きく、細胞に対する毒性が小さいなどの好ましい特徴を持つばかりでなく、アセトキシメチル誘導体を利用することで、細胞内に容易に導入(ロード)できるためでもある。現状では、蛍光プローブ試薬が利用できる多種類の  $[Ca^{2+}]_i$  測定装置が市販されるようになり、単一細胞から組織切片まで、ほとんどの実験はこれらを利用して行えるようになってきている<sup>8)</sup>。

したがって、ここでは、主に、蛍光プローブ試薬を用いた  $[Ca^{2+}]_i$  測定機器の種類と特徴について述べる。また、これらの測定機器に求められる光学特性や、使用上の注意点についても示す。最近では顕微鏡、測定装置とも Ca イオン濃度測定仕様のものを用意しているメーカーが多くなっている。新たに購入する場合は、

これらの機種を選択するのが賢明であるが、選択時にどのような点に注意を払わなければならないか示す。

### 2. 測定原理と測定装置の種類

蛍光プローブ試薬を利用した  $[Ca^{2+}]_i$  測定の原理は、いずれの装置でも同一であるが、サンプルの種類や形状により、表1のような種類が利用できる。各装置にはそれぞれの特長があり、自分の実験目的に合うものかどうかを検討する必要がある。基本的に顕微鏡と組み合わせる機種は単一細胞レベルで解析が行なえる。現在は、顕微鏡と画像処理装置を組み合わせると  $[Ca^{2+}]_i$  分布が測定できる装置が広く利用されていると思われるので、この装置を中心に、要求される光学特性や使用上の注意点を述べる。

#### 2.1 細胞内 Ca イオン濃度測定の原理

蛍光プローブ試薬を用いた  $[Ca^{2+}]_i$  測定は、細胞内に導入した蛍光プローブ試薬と Ca イオンの平衡反応に基づく蛍光強度を測ることで行われる<sup>6)</sup>。これは蛍光測光による定量法の一つであるため、濃度 C と蛍光強度 F の関係は式 1 で表される<sup>9)</sup>。

$$F = 2.303 I_{ex} \epsilon C \Phi \quad (1)$$

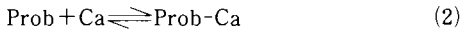
ただし、F は単位体積当たりの蛍光強度で、 $I_{ex}$  は励起光強度、 $\epsilon$  はモル吸光係数、 $\Phi$  は量子収率である。通常、 $\epsilon$ 、 $\Phi$  は定数、また、分光蛍光光度計では  $I_{ex}$  は一定であり、蛍光を発する体積も、キュベット中の均一な溶液を対象としている限り一定である。このため、蛍光を発している体積や励起光強度が明らかでなくても、検量線を作製すれば、蛍光強度より濃度は

表 1. 細胞内カルシウムイオン濃度測定に使われる蛍光測定装置

| 測定装置         | 主な測光方式                 | 対象試料と測定目的   |
|--------------|------------------------|---|
| 分光蛍光光度計      | 2 励起 1 蛍光<br>1 励起 2 蛍光 | 細胞の懸濁液<br>細胞集団の 1 秒程度の経時変化                              |
| フローサイトメーター   | 1 励起 2 蛍光<br>1 励起 1 蛍光 | 細胞の懸濁液<br>細胞毎の濃度分布                                      |
| 顕微測光装置       | 2 励起 1 蛍光<br>1 励起 2 蛍光 | 固着単一細胞, または, 組織切片<br>ポイント測定<br>10 ミリ秒程度の速い経時変化          |
| 蛍光顕微鏡と画像処理装置 | 2 励起 1 蛍光<br>1 励起 2 蛍光 | 固着単一細胞, または, 組織切片<br>細胞内, 組織内の 2 次元分布<br>0.1~1 秒程度の経時変化 |
| 走査型レーザー顕微鏡   | 1 励起 1 蛍光              | 固着単一細胞, または, 組織切片<br>細胞内, 組織内の 3 次元分布<br>数十秒程度の遅い変化     |

直ちに求められる。

一方, 蛍光プローブ試薬 Prob と Ca イオンは, 式 2 で示される平衡反応をしているため, それぞれの濃度は式 3 で表される。



$$K_d = \frac{[\text{Prob}] [\text{Ca}]}{[\text{Prob-Ca}]} \quad (3)$$

ただし,  $K_d$  は解離定数,  $[\text{Prob}]$ ,  $[\text{Ca}]$ ,  $[\text{Prob-Ca}]$  は, それぞれ, 蛍光プローブ試薬の濃度, Ca イオン濃度, Ca イオンと結合した蛍光プローブ試薬の濃度である。簡単にするため, Ca イオンと結合した蛍光プローブ試薬 Prob-Ca が蛍光を発する ( $C = [\text{Prob-Ca}]$ ) と仮定して, 式 1 より  $[\text{Prob-Ca}]$  が定量できたとしても, 式 3 から明らかなようにプローブ試薬の濃度  $[\text{Prob}]$  が判らなければ, Ca イオン濃度を算出することはできない。

また, 実際の細胞では, キュベットのように入れた既知濃度のプローブ試薬を入れることはほとんど不可能であるばかりでなく, 蛍光を発している体積もサンプル毎に異なると考えられる。したがって, 通常分光蛍光光度計と同じ方法で, 正確な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を定量することは非常に困難である。

このような場合, 2 波長測光法が用いられる。

2 波長測光法は, 図 1 に示した等吸収点(蛍光の場合は, 等蛍光点, または, 等励起点)を持つプローブ試薬<sup>10)</sup>にしか適用できない。しかし, 2 種類の波長で測光し, 強度比を求めると, この強度比はプローブ試薬濃度に依存せず, Ca イオン濃度だけで変化するため, 正確な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が測定できる。また, 蛍光強度は, 試料の運動や移動, 細胞内のプローブ試薬の分布変化, 蛍光試薬の退色などでも変化する。蛍光強度の変化だけからは, これらを原因とする変動と,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化との区別も難しいが, 2 波長測光法では Ca イオン濃度の変化に依存しない蛍光強度の変化を補正することができる。

蛍光を用いた 2 波長測光法には励起と測光の方法により 2 種類の方法があり, それぞれ, プローブ試薬の性質により使い分けられる。2 波長測光法を画像計測に応用した場合はレシオイメージング法と呼ばれることが多い<sup>11)</sup>。

#### a. 2 波長励起 1 波長蛍光測光法

異なる 2 つの波長で励起し, それぞれの励起で発光する蛍光強度を 1 種類の波長で測定し, その強度比を計算する方法である。この測光法は, 図 1 A の fura-2 のように, 励起スペクトルに Ca イオンの濃度が変化しても蛍光強度が変化しない波長(等吸収点, または, 等励起点)を持つ種類で用いられる。

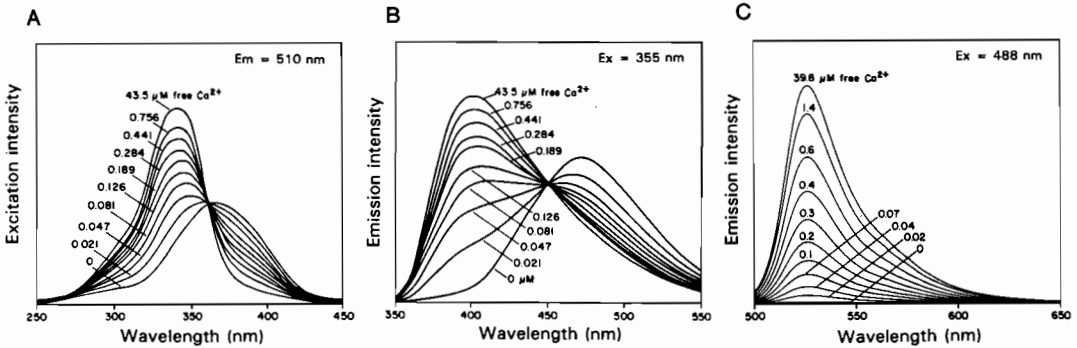


図1. 蛍光性カルシウム指示薬の蛍光スペクトル

A Fura-2 の励起蛍光スペクトル, B Indo-1 の蛍光発光スペクトル, C Fluo-3 の励起蛍光スペクトル. グラフ縦軸の蛍光強度は任意目盛りである. (MOLECULAR PROBES, INC. のカタログより)<sup>10)</sup>

Fura-2 の励起スペクトルと Ca イオン濃度との関係を見ると, 360 nm 付近に Ca イオン濃度に依存せずに蛍光強度が一致する等励起点を持ち, それよりも短波長側では Ca イオン濃度が増すにつれて蛍光強度が増加する. また, 360 nm よりも長波長側では Ca イオン濃度が増すと逆に蛍光強度が減少するという特長を示す. そこで, fura-2 を使った測定では, 励起波長として, 例えば, 340 nm と 360 nm を用い, 510 nm の発光強度を測定する. そして, 340 nm 励起の蛍光強度を 360 nm 励起の蛍光強度で割り算し, 蛍光強度比(レシオ値とも呼ばれる)  $I_{340}/I_{360}$  を求める. この蛍光強度比は, fura-2 濃度に依らず一定で, Ca イオン濃度によってのみ変化する. 例えば, Ca イオン濃度が増え, fura-2 濃度が 2 倍になると, いずれの波長の蛍光強度も 2 倍になるが, レシオ値には変化がない. しかし, Ca イオン濃度が増加するとレシオ値が上がり, 濃度が減少すると値も下がる.

この波長の組み合わせは, 340 nm と 360 nm に限らず, 340 nm と 380 nm の組み合わせや, これらの波長以外の組み合わせでも同じことである. しかし, 変化量が多い方が測定誤差が少なくなるので, スペクトルのピークに近い波長を利用するのがよい.

#### b. 1 波長励起 2 波長蛍光測光法

a とは逆に, 1 波長で励起して, 蛍光を 2 波長に分光して測定しその強度の比, レシオ値, を計算する方法である. 図 1 B の indo-1 のように, 蛍光発光スペクトルに Ca イオン濃度に依存せず蛍光強度が一致する波長(等蛍光点)を持つ種類で用いられる. Indo-1 では, 通常, 360 nm で励起して, 405 nm と 480 nm の蛍光が測光される.

2 波長励起 1 波長測光では, 励起光を切り換えて測光する必要があり, 2 波長間のデータに時間の遅れが生じる. しかし, 1 波長励起 2 波長測光では, 検出器を 2 台取り付け, それぞれの波長の蛍光を同時に測光すれば, 2 波長間のデータの時間遅れは生じない. したがって, ミリ秒以下の非常に速い Ca イオン濃度変化や, 心筋細胞のような動きのある試料の測定も可能である.

このためには, ビデオカメラのような検出器が 2 台必要になり, fura-2 用の測定機器と比較すれば, 高価格になる場合が多い. ARGUS-50(図 2 参照)では CAII が 1 波長励起 2 波長測光に対応している. CAII は 2 分岐光学系(W-View 光学系)を用いることで, 1 台のカメラの画面を 2 分割してそれぞれの波長の蛍光像が入力できるようになっている. したがって, 比較的低価格であるが画素数は半分

なる。また、indo-1 の蛍光強度は fura-2 と比較して弱いにもかかわらず、高速の測定を行う関係上、蓄積時間が短くなり、ノイズの多いデータになるなどの欠点がある。このため、fura-2 に比べて、利用している研究者は多くない。

#### c. 1 波長励起 1 波長蛍光測光法

通常の蛍光法は 1 波長励起 1 波長測光で、等吸収点を持つプローブ試薬でも、強度が変化するだけのプローブ試薬のいずれでも利用できる。しかし、細胞内のプローブ試薬の濃度と蛍光を発生する体積が分かっているだけで定量はできないが、Fura Red や fluo-3 のように、Ca

イオンと結合しても励起、発光スペクトルとも強度のみの変化を示す種類には、この 1 波長励起 1 波長測光法しか使えない。

1 波長の蛍光強度変化で測定した場合には、その実験結果の解析には注意が必要である。例えば、細胞の核内の蛍光強度が強くても Ca イオン濃度が高いのか、プローブ試薬濃度が高いのか、区別できない。また、蛍光強度の変化が観測された場合も、細胞の変形や運動、プローブ試薬濃度の変化がない場合に限り、Ca イオン濃度が変化したことになる。一方、蛍光強度の差分を計算しただけでは、プローブ試薬の濃度の高いところの変化が大きくであるため、変化

表 2. 細胞内カルシウムイオン濃度測定用分光蛍光光度計の製品例

| 分光蛍光光度計型名                 | 付 属 品  | 特 徴   |
|---------------------------|--|---|
| RF-1500<br>(島津)           | シリジアダプター<br>スターラー付き恒温セルホルダー<br>恒温水環流装置             | 波長切り換え 最短0.2秒   |
| RF-5000<br>(島津)           | シリジアダプター<br>スターラー付き恒温セルホルダー<br>恒温水環流装置             | 波長切り換え 1 秒  |
| CAF-100<br>(日本分光)         | 専用機のためスターラー、恒温槽<br>などは内蔵                           | 励起波長は 340 nm と 380 nm<br>干渉フィルターで分光<br>オプションに固体試料測定ユニットもある            |
| CAF-110<br>(日本分光)         | 専用機のためスターラー、恒温槽<br>などは内蔵                           | 励起波長切り換え 7.8ミリ秒<br>2 波長同時測光(ダイクロイック<br>ミラーで分離)<br>オプションに固体試料測定ユニットもある |
| F-2000<br>(日立)            | スターラー付き恒温セルホルダー<br>マイクロサンプリング用<br>アッセンブリ<br>マイクロセル | 最大 4 波長測定<br>波長切り換え 1 秒   |
| F-3010/<br>F-4010<br>(日立) | スターラー付き恒温セルホルダー<br>マイクロサンプリング用<br>アッセンブリ<br>マイクロセル |   |
| F-4500<br>(日立)            | スターラー付き恒温セルホルダー<br>マイクロサンプリング用<br>アッセンブリ<br>マイクロセル | 最大 8 波長測定<br>データ間隔 0.6秒<br>(340/380切り換え時)                             |

量は不明である。むしろ、同一の波長でも割り算を行った方が、プローブ試薬の濃度の差を吸収できるため、より実態に近い Ca イオン濃度変化になる。

## 2. 2 分光蛍光光度計

蛍光指示薬を利用した  $[Ca^{2+}]_i$  測定には、通常の分光蛍光光度計が利用できる(表2)。主に、キュベットに試料を入れて測定するため、浮遊細胞が対象になる。2波長測光を行うためには、いくつかの付属品と制御プログラムが必要になるが、各社より細胞内カルシウム測定セットとして入手可能である。

分光蛍光光度計は蛍光スペクトルを測定する機器であるため、分光学的な問題は少ない。しかし、元来が溶液の蛍光スペクトルの測定が目的のため、顕微鏡を利用した  $[Ca^{2+}]_i$  測定装置より多量の試料が必要であり、また、 $[Ca^{2+}]_i$  も平均値が求められるだけであり、個々の細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  を求めることはできない。2波長測光を行う場合、多くの機器で波長切り換えは分光器のグレーチングを回転させて行うため、数秒程度の時間が掛かる。しかも、この切り換え時間は切り換える波長が離れているほど長時間掛かるようになる。しかし、広い波長範囲にわたっての励起と測光が可能のため、2波長測光に限らず、4波長測光でも、8波長測光でも行える機種もある。したがって、異なった波長のプローブ試薬を選択してロードすること

により、 $[Ca^{2+}]_i$  と細胞内 pH などの同時測定も可能である。

分光蛍光光度計タイプでも、 $[Ca^{2+}]_i$  測定専用器として2組の分光器を設けて2波長測光ができるようにした機器もある。

## 2. 3 顕微測光装置

個々の細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  を測定するためには顕微鏡を利用した測定機器が必要になる(表3)。顕微測光装置では、顕微鏡下の1点を測光する。測光する点のサイズと位置は任意に変更できるので、1個の細胞一部や組織全体など、実験目的に合った部分の  $[Ca^{2+}]_i$  を測定することができる。

顕微測光装置では、検出器に光電子増倍管を用いていることが多いので、1ミリ秒以下の時間分解能で速い変化の測定も可能な機種が多い。ただし、2波長励起を行う fura-2 のようなプローブ試薬の場合は、高速の励起光切り換え装置が必要である。また、indo-1 のような2波長蛍光の場合は、それぞれの波長の蛍光に対して検出器を備えた顕微測光装置でなければ特長を生かすことはできない。

## 2. 4 蛍光顕微鏡と画像処理装置

現在、もっとも広く使用されるようになったのが、蛍光顕微鏡に画像処理を組み合わせた装置であろう。表4に示したような装置を用いれば、細胞や組織の  $[Ca^{2+}]_i$  分布が測定できるだけでなく、視野に多数の細胞を入れて、1個

表3. 細胞内カルシウムイオン濃度測定のできる顕微測光装置例

| 機種名                  | 特徴   |
|----------------------|--|
| OSP-3<br>(オリンパス)     | fura-2 専用<br>時間分解能 10ミリ秒<br>測光範囲の確認が容易                 |
| OSP 10-CA<br>(オリンパス) | 2波長励起 1波長測光, 1波長励起 2波長測光<br>時間分解能 2.5ミリ秒<br>測光範囲の確認が容易 |
| CAM-230<br>(日本分光)    | 2波長励起 1波長測光, 1波長励起 2波長測光<br>時間分解能 1ミリ秒                 |
| P 102<br>(ニコン)       | 2波長励起 1波長測光, 1波長励起 2波長測光<br>時間分解能 1ミリ秒                 |

表4. 細胞内カルシウムイオン濃度分布測定装置の製品例

| 機種名                              | 特長  |
|----------------------------------|---|
| ARGUS-50/CA<br>(浜松ホトニクス)         | Fura-2 などの2波長励起1波長蛍光測光用<br>励起波長切り換え時間 最短0.73秒<br>波長切り換え装置はオリンパス, ニコン, ツァイスに接続可能       |
| ARGUS-50/CAII<br>(浜松ホトニクス)       | Indo-1 などの1波長励起2波長蛍光測光用   |
| ARGUS-50/CA/MACRO 1<br>(浜松ホトニクス) | Fura-2 などの2波長励起1波長蛍光測光用<br>組織切片のような10倍以下の対物レンズを使用する大きな試料用<br>励起波長切り換え装置付きの光ファイバー光源が付属 |
| ARGUS-50/CA/MACRO 2<br>(浜松ホトニクス) | Fura-2 などの2波長励起1波長蛍光測光用<br>マクロ撮影レンズを使用した更に大きな試料用<br>励起波長切り換え装置付きの光ファイバー光源が付属          |

1個の細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  変動を観察することもできる。以前は多くのメーカーから種々の機種が発売されていたが、我国の現状は、表4に示した機種が主流になった様子である。装置の構成例を図2に示す。

検出器にビデオカメラを用いている関係上、最短の時間分解能はTVレートの1/30秒に制限される。しかし、2波長励起を行う場合、実際の時間分解能は励起光切り換え装置の切り換え時間で1秒程度に制限されることも多い。TVレートの時間分解能が必要ならば、励起光切り換え装置がビデオカメラに同期して作動できるかどうか確認する必要がある。また、2波長蛍光測光を利用するためには、ビデオカメラを2台取り付けて同期させて作動させるか、1台のビデオカメラに2波長の蛍光像を同時に取り込むような光学系が必要になる。

蛍光プローブ試薬利用時の検出器として使用するビデオカメラは、蛍光用の高感度な種類を使用する。多くの場合、SIT、または、ICCDタイプのビデオカメラが用いられる。一般的に、ICCDカメラの方が高感度であるが、画質はSITカメラの方がよいようである。高感度ビデオカメラにはC-CCD(冷却CCD)タイプもあるが、速い経時変化を測る場合は適していない機種が多い。さらに、aequorinによる微弱発光の場合はVIMカメラが必要になることが多いが、蛍光プローブ試薬の場合はここまでの感度

は不要であろう。

## 2.5 共焦点レーザー顕微鏡

最近共焦点レーザー顕微鏡を利用した  $[Ca^{2+}]_i$  の3次元分布測定も行われている(表5)。光源にはレーザーが使用されるため、レーザーの種類により利用できる励起光の波長も決められ、励起波長も1波長に限られる場合が多い。このため、fluo-3やFura Redなどの可視光で励起できる1波長励起1波長測光のプローブ試薬がよく利用される<sup>12)</sup>。特に、Arレーザーの488nmで励起できるfluo-3が多く使われる。レーザー顕微鏡では紫外光励起で2波長測光のできる機種は、まだあまり一般的にはなっていないが、表5に示したように、各メーカーから発売されるようになってきている。より正確な  $[Ca^{2+}]_i$  測定には、indo-1タイプのプローブ試薬を利用できる機種を使用したい<sup>13)</sup>。

レーザー顕微鏡は走査型レーザー顕微鏡とも呼ばれるように、基本的には、1個のスポットを3次元走査して立体像を構築している。このため、データを取得するのに数秒から数分かかり、速い変化を3次元で追うのは難しい。しかし、スポットを平面(2次元)走査や、直線(1次元)走査、1点(0次元)測定に限定すれば、1秒以下の速い  $[Ca^{2+}]_i$  変化を捉えることができる<sup>14,15)</sup>。このような平面や線状の測定でも、従来の光学顕微鏡のように深さ方向の重なりの影響がない  $[Ca^{2+}]_i$  が求められる。した



表 5. 主な走査型レーザー顕微鏡

| 機種名                        | 特  | 長          |
|----------------------------|--|------------|
| LSM-BG 200<br>(オリンパス)      | Indo-1 によるレシオイメージング可能<br>走査速度 1 秒<br>正立型と倒立型蛍光顕微鏡の両タイプ<br>検出系 蛍光/反射 最大 3 チャンネル | 透過 1 チャンネル |
| LSM 310/31 UV<br>(ツァイス)    | 正立型蛍光顕微鏡タイプ<br>走査速度 0.5 秒<br>Indo-1 によるレシオイメージング可能<br>検出系 蛍光/反射 最大 2 チャンネル     | 透過 1 チャンネル |
| LSM 410/410 UV<br>(ツァイス)   | 倒立型蛍光顕微鏡タイプ<br>走査速度 0.5 秒<br>Indo-1 によるレシオイメージング可能<br>検出系 蛍光/反射 最大 3 チャンネル     | 透過 1 チャンネル |
| RCM 8000<br>(ニコン)          | 倒立型蛍光顕微鏡タイプ<br>リアルタイム観察可能 走査速度 1/30 秒<br>Indo-1 によるレシオイメージング可能                 |            |
| MRC-500<br>(パイオ・ラッド)       | 各メーカーの落射蛍光顕微鏡が利用可能<br>走査速度 1 秒   |            |
| MRC-1000<br>(パイオ・ラッド)      | 各メーカーの落射蛍光顕微鏡が利用可能<br>走査速度 1 秒<br>検出系 蛍光/反射 3 チャンネル                            | 透過 1 チャンネル |
| ACAS 575 UVC<br>(メリディアン)   | 倒立型蛍光顕微鏡タイプ<br>Indo-1 によるレシオイメージング可能   |            |
| INSIGHTPLUS-IQ<br>(メリディアン) | 各メーカーの落射蛍光顕微鏡が利用可能<br>スリット方式による共焦光学系のため 1/120 秒の高速走査                           |            |

がって、細胞外の Ca イオンがカルシウムチャンネルを通して細胞内へ移動していく様子などをより正確に観察することができる。

### 3. 装置の光学的特性と使用上の注意点

分光蛍光光度計を利用する場合は、ほとんど問題を起すことはないが、顕微鏡を使用した単一細胞での測定では様々な光学的なトラブルを生じることがある。紫外線励起の fura-2 や indo-1 を使用して  $[Ca^{2+}]_i$  を測定する場合、測定装置の光学的な問題が多く生じるので、以下の説明もこの点に重点をおいて述べる。Fluo-3 などの長波長の光が利用できるプローブ試薬では測定装置の問題も少なくより容易に測定できるが、2 波長測光で  $[Ca^{2+}]_i$  を求められないのは残念である。

#### 3. 1 測定チャンパー

##### a. 分光蛍光光度計用キュベット

分光蛍光光度計では、付属品の種々のキュベットが使用できる。細胞の懸濁液を測定する場合は、測定中に細胞が沈降しないように攪拌したり、温度コントロールをする必要があるが、いずれも付属品として別途購入できる。培養フラスコに付着した培養細胞をそのまま測定するには、キュベットに入るサイズに切断した基板の上に培養したものを、光軸に対して 45° 傾けて挿入して測定する。

##### b. 倒立型顕微鏡用チャンパー

$[Ca^{2+}]_i$  測定実験では、顕微鏡を使用する場合がもっとも多いであろう。この場合、試料の形状や測定方法により、様々な工夫が求められる。試料は、倒立型、正立型にかかわらず、原



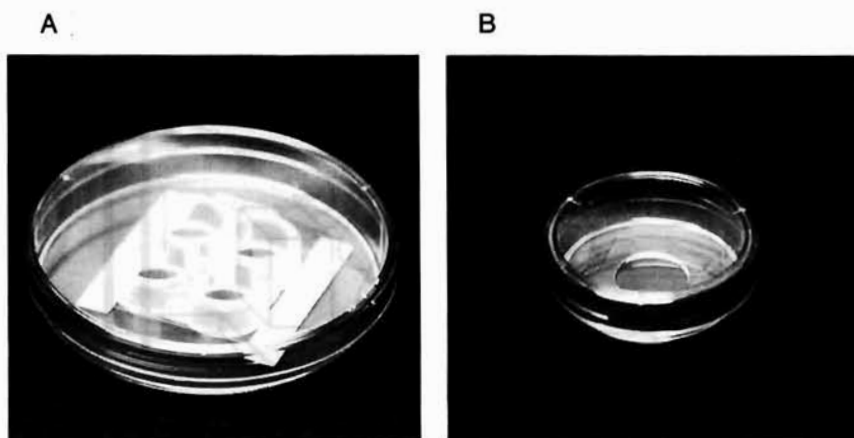


図3. 倒立型顕微鏡用チャンバーの例  
A Flexiperm-Disc で組み立てたチャンバー. B ガラスボトムカルチャーディッシュ.

則として、固着し動かないことが必要である。したがって、浮遊細胞は基盤に付着させ、組織切片は固定具などで押さえるようにしなければならない。

培養細胞は倒立型顕微鏡で測定されることが多い。倒立型顕微鏡で fura-2 の蛍光を観察する場合、対物レンズの作動距離が短いこと、また、紫外の励起光がチャンバーの底面を通過して細胞に照射されることから、チャンバーの底面は薄く、紫外光をよく通し、さらに、無蛍光であることが要求される。したがって、細胞培養によく使われているプラスチック製の培養フラスコやディッシュは底が厚く、また、蛍光を生じることがあるため使用を避けた方がよい。

培養細胞の多くの実験では、Flexiperm-Disc (W. C. Heraeus) に、40×50 mm のカバーガラス (No. 1, 0.12~0.17 mm 厚: Matsunami) を粘着させたチャンバーが使用されている (図 3 A)。Flexiperm-Disc はシリコン製の 4 穴のウェルで、下面に粘着剤がついているので、カバーガラスに押しつけて接着させ底にする。Flexiperm-Disc はオートクレーブ滅菌でき、10 回以上繰り返して使用できる。カバーガラスは、 $[Ca^{2+}]_i$  測定では、無蛍光の石英ガラス製を使用する必要はない。

細胞はこのチャンバーのカバーガラス上に培

養する。培養時には図 3 A のように、濾紙を敷いたシャーレ (直径 90 mm, 深さ 15 mm 程度) に入れて行う。濾紙は水分によりカバーガラスがシャーレに吸い付くのを防ぐ。濾紙は一部分だけ敷くようにすると、培養状態をシャーレのままクリーンベンチの外の顕微鏡で観察するのに便利である。実験時にこのチャンバーを扱うときは、漏水を防ぐために必ずカバーガラスの部分を持つようにする。古くなると粘着力が弱まり、漏水し易くなるので注意する。

また、カバーガラスを貼り付けたプラスチックシャーレ (直径 35 mm: メリディアンなど) も同様に利用できる (図 3 B)。

細胞や組織の  $[Ca^{2+}]_i$  測定では、灌流装置を取り付けたり、刺激用薬剤を投与するためのインジェクターを使用したり、温度を一定に保つことが必要な場合が多い。灌流装置類は自分の実験に合わせて部品を揃え、組み立てる必要がある。一例を図 4 に示す。図 4 の例ではポンプにより培養液や試薬を送り、一方、アスピレーターで液を吸い出すことで、チャンバー内の液量を常に一定に保っている。灌流装置のチューブ類はマニピュレーターに取り付け、位置が調整できるようにする。3次元マニピュレーターならば左右、前後、上下に移動させやすく便利である。マニピュレーターを顕微鏡のステージ

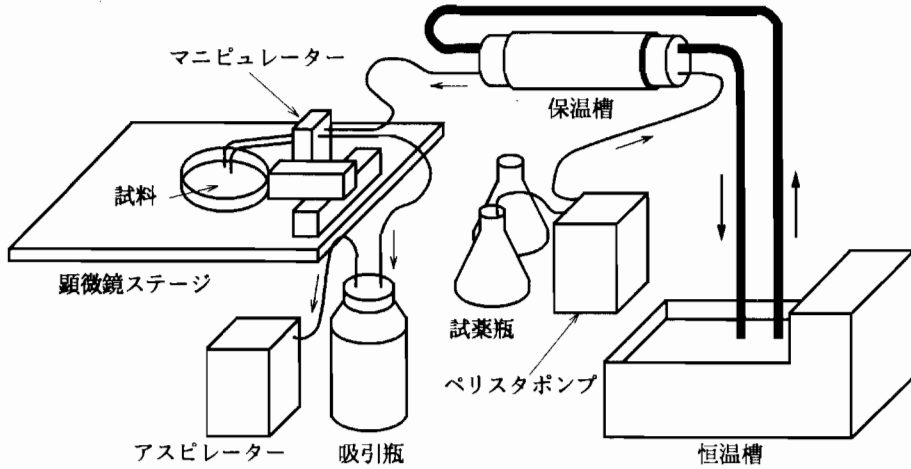


図4. 灌流装置の例

各パーツは径1mm程度のシリコンチューブで接続する。試薬瓶に灌流液や刺激用薬剤溶液を準備しておき、シリコンチューブを差し替えることで薬剤を添加する。チューブを差し替えてから測定チャンバーに溶液が到達する時間を計っておけば、1秒程度の正確さで刺激時間が分かる。

に固定するには、専用のアダプターを使用する。

チャンバー内の温度を一定に保持させたい場合は、図4のように液を恒温装置により一定の温度に保たれた水中を通過させてからチャンバーへ送り込む方式の他、顕微鏡のオプションとして用意されている温風循環方式の保温装置やヒートプレートも利用できる。しかし、小さな容積の部分を恒温に保つのは意外と困難である。正確な温度条件で実験をしなければならないときは、熱容量の十分小さい熱電対やサーミスタ温度計で実測する必要がある。自作の装置などでは、驚くほど設定温度との差が大きい場合も多い。

### c. 正立型顕微鏡用チャンバー

正立型蛍光顕微鏡ではチャンバーを光が通過しないため、蛍光を出すことがなければ、自由な材質や形状のものが使用できる。しかし、正立型顕微鏡では、液層の厚さや、表面張力による液面の曲がり方が試料の見え方に影響を与える。また、培養液を灌流しながら測定する時には、液面の上下や波が測定に影響することがある。短時間の測定ならば灌流を止めて測定するのもよい。長時間にわたる測定や、薬物投与な

どで灌流を止められない場合は、水浸対物レンズや図5のような蓋のできるチャンバーを利用すると良好な結果が得られる。

倒立型顕微鏡では、落射蛍光観察時にはステージ上を光が通ることもなく、広く使えるので、これらの装置を取り付けても、問題は少ないが、正立型では対物レンズのじゃまになることもある。特に、高倍率対物レンズ使用時に影響が大きくなるので、器具類の形状や配置を工夫する必要がある。

チャンバーを保温する場合、チャンバーだけを加熱すると気泡が発生することが多い。特に、図5のようなチャンバーのカバーガラスに気泡が付くと、測定の妨害になる。このため、灌流液をチャンバーの温度より数度高く温めてから供給する。特に、酸素などを通気している灌流液には注意が必要である。

## 3. 2 顕微鏡

### a. 顕微鏡本体

測定サンプルが培養細胞や単離細胞である場合が多いため、おもに、倒立型蛍光顕微鏡が利用される。Fura-2 や indo-1 を使用する場合は、励起が 340 nm の紫外光であることを特に考慮

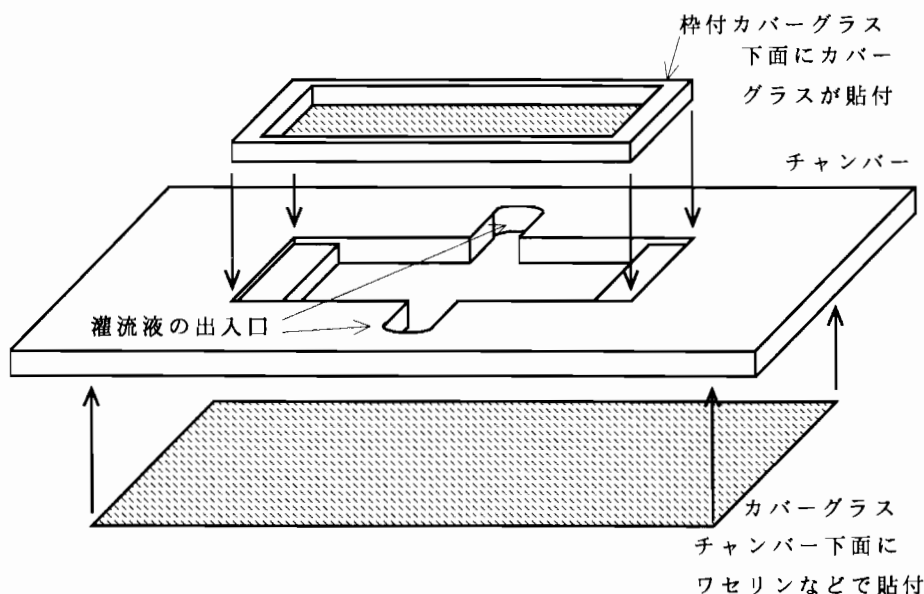


図5. 正立型顕微鏡用チャンバーの例

そのまま測定すると、液面の揺れや、表面張力による液面の歪みにより、測定データが変動したり、像がボケたりする。このため、液面をカバーガラスで覆うとよい結果が得られる。ただし、保温していると、気泡が発生しやすいので注意が必要である。

する。以前は、多くの蛍光顕微鏡が、360 nm より短波長の励起光を透過できなかったが、各顕微鏡メーカーとも、倒立型蛍光顕微鏡は“Ca<sup>2+</sup> 対応”と唱った機種を出しているので、340 nm までの励起光を利用する場合は、必ずこの製品を使用する必要がある。これらの顕微鏡は励起光源の光学系と鏡体内部のリレーレンズなどを紫外線の透過率の高い材質に変更してある。旧タイプの倒立型顕微鏡でも、メーカーに改造を依頼できる。

正立型顕微鏡では [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定例があまり見られないが、倒立型顕微鏡のように内部のレンズ類が多くないため、励起光源の光学系が 340 nm まで利用できれば、多くの機種が使用可能である。

蛍光顕微鏡でレシオイメージングを行う場合には、蛍光像周辺のハレーションに注意する必要がある。通常、レシオ値を計算する前に、バックグラウンド蛍光強度を見積り、これ以下の蛍光強度の場合はレシオ値の計算を行わずに、しかし、蛍光像からだけでバックグラウンド蛍

光を見積るため、ハレーション部分まで含めてしまうことが多い。この結果、蛍光像周辺の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が低濃度や高濃度に表示され、一見、細胞膜周辺の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 濃度が変化しているように見えることになる。これは、蛍光像と透過光像をスーパーインポーズさせると明らかになるが<sup>16,17)</sup>、バックグラウンド蛍光強度を僅かに増減させるだけで、周辺部の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が大きく変化することでも見分けられる。なお、ハレーションの強度は弱いので、顕微測光では問題になることは少ない。また、共焦点光学系を利用しているレーザー顕微鏡では、実用上、ハレーションの影響はない。

顕微鏡を利用する上で忘れてはならないのが、光軸調整である。光軸調整が狂っていると、視野の明るさが均一にならないだけでなく、十分な強度の励起光が得られなかったり、解像度が低下したり、ハレーションが増加する。光軸が大幅にずれていると、全く何も見えないこともあるので、注意しなければならない。光軸調整の手順は、顕微鏡の取り扱い説明書に書い

である。

#### b. 対物レンズ

Fura-2 や indo-1 を用いる場合、対物レンズは 340 nm を透過する蛍光観察用の種類を使用する(例えば, CF Fluor, NCF Fluor: ニコン)。100倍のレンズは油浸となるので、紫外線を透過し、無蛍光の専用油浸オイルを用いる。

対物レンズとしては、倍率にかかわらず開口数の大きな対物レンズを使用できれば、励起光の強度を弱めることができる。その結果、fura-2 などのプローブ試薬の退色を少なくできるだけでなく、細胞や組織切片の紫外線によるダメージも少なくすることができる。しかし、現在入手可能な対物レンズは目視観察を主目的に設計されているため、倍率が決まれば開口数もほぼ決まってしまう、選択の余地はあまりない。

倍率10倍以上の対物レンズは 340 nm の励起光が利用できる種類があるが、これより低倍率では利用できるレンズはない。したがって、組織切片のように低倍率で広い領域を測定したい場合は、図 6 に示すように、斜め横から紫外線を透過できる光ファイバーで照射するなどの工夫が必要になる<sup>18)</sup>。励起光をこのように照射

するならば、蛍光顕微鏡を使用する必要性はなく、どんな種類の顕微鏡でも利用可能になる。むしろ、開口数の小さい対物レンズを使用するよりも、F 値の小さい写真用レンズと接写撮影用の装置を利用した方が明るく、容易に測定できる。たとえば、35 mm 1 眼レフカメラで一般的な 50 mm F 1.2 の標準レンズは開口数 0.42 に相当し、計算上は 1 倍の対物レンズ(開口数 0.04, NCF Plan 1×: ニコン)の約 100 倍も明るいことになる。

### 3. 3 光源とフィルター

#### a. 光源

従来型の顕微鏡で、fura-2 を使用して 2 波長測光を行う場合は、光源には安定した紫外域の光が得られるキセノンランプを用いる(図 7 A)。蛍光顕微鏡で多く使われている高圧水銀灯は、365 nm などの輝線が強く、340 nm~380 nm 範囲の光強度が波長により大きく異なるため fura-2 には使用できない。Indo-1 や fluo-3, Fura Red などは、キセノンランプでも超高圧水銀ランプでも利用できる。ランプの容量は、通常は、表 3, 4 に示した測定装置に付属している 75~100 W で十分な明るさが得られる。

共焦点レーザー顕微鏡では、高価なレーザー

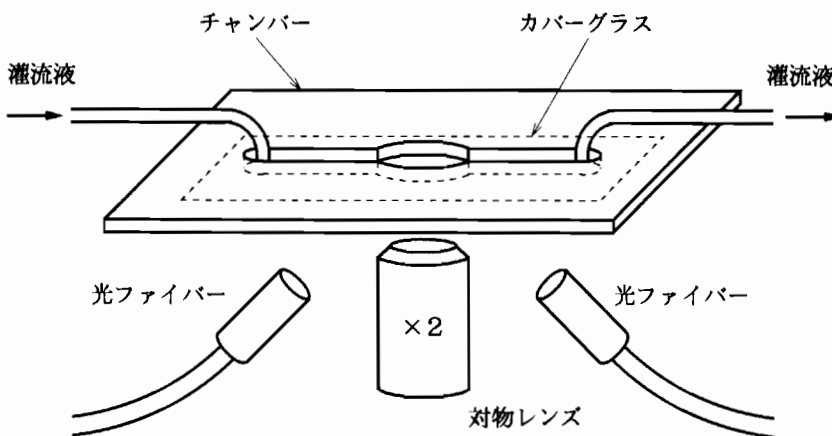


図 6. 低倍率で測定するための照明法

多くの低倍率の蛍光用対物レンズは 340 nm の励起光を透過できない。したがって、対物レンズの横から紫外光を透過する光ファイバーで照明する。対物レンズは紫外線を透過する必要がないので、たいがいのレンズが使える。図は倒立型顕微鏡の場合であるが、正立型顕微鏡や、写真レンズを使用したマクロ測定でも同様な照明法が利用できる。

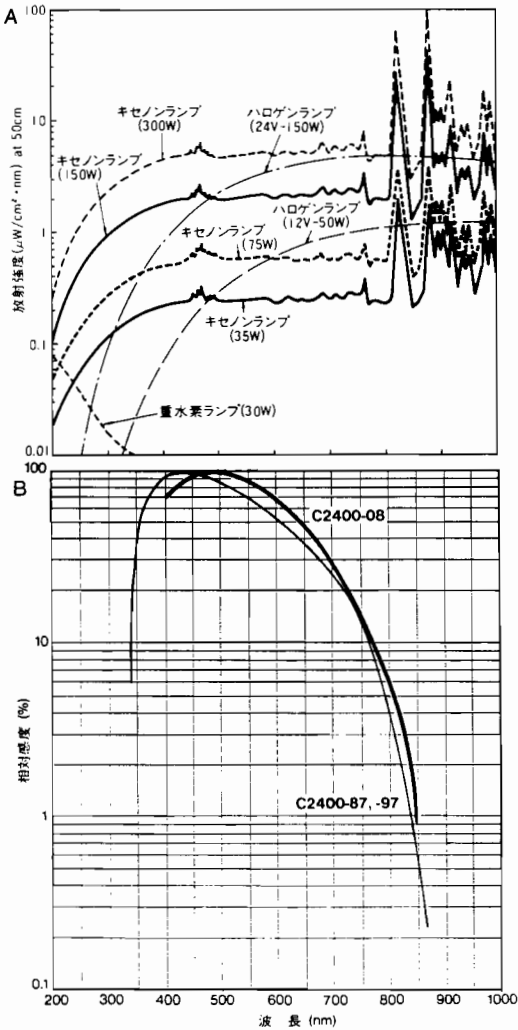


図7. キセノンランプ、蛍光用高感度ビデオカメラのスペクトル例

A キセノンランプの放射スペクトル分布. B SITカメラ(C2400-08), および、イメージンテンシファイヤ付き CCD (ICCD) カメラ(C2400-87, および, C2400-97)の分光感度特性. 分光感度は最大感度を100%とした相対値で示してある. これらのカメラは900 nm 付近まで感度があるので, キセノンランプの強い近赤外領域の光が迷光となって入射すると, 測定の妨害になる.

をプローブ試薬毎に揃えるのは費用がかかりすぎるため, Ar レーザーが励起光源として使われることが多い. したがって, 多くの場合, Ar レーザーの488 nm が利用できる fluo-3 が使用されている.

#### b. 励起フィルター

キセノンランプを励起光源とする場合, 励起波長はバンドパスタイプの干渉フィルターで選択ことが多い. Fura-2 では, 透過する中心波長は340 nm, 360 nm, および, 380 nm で, 透過させる波長の幅を示す半値幅は10 nm 程度の種類を使用する. 2波長測光をするため, 測定中に励起波長を切り換えられるように波長切り換え装置を使用し, 励起側のフィルターはその中に組み込む. 2種類の励起波長での蛍光強度を揃えるため, 強い波長の方に ND (Neutral density) フィルターを入れ, レシオ値が1付近を中心として変化するようにする. ND フィルターは干渉フィルターより光源側に挿入する. 一般的に干渉フィルターは, 光の照射や熱, 湿度などに弱いので, 色ガラスフィルター類を光源側に入れ, 干渉フィルターも色ガラス側を光源に向けるようにセットする.

Fluo-3 や Fura Red を利用する場合も, それぞれの蛍光スペクトルにあった励起フィルターを使用するが, これらのプローブ試薬の場合は, 標準の蛍光顕微鏡用フィルターセットの中に利用できる種類がある(表6).

#### c. ダイクロイックミラーと蛍光フィルター

Fura-2 や indo-1 の場合, ダイクロイックミラーは, 各メーカーの標準品では400~455 nm のものが使える. 蛍光フィルターは490~500 nm 以下をカットする吸収フィルターを使用する. バンドパス干渉フィルターでは, 510 nm を中心波長とした, 半値幅は20~40 nm 程度の透過率が高いフィルターを使用する.

これらのフィルター類は, 各メーカーの Ca イオン測定機器に付属しているものを説明書通りに使用する場合は問題ないが, 独自に組み合わせる場合は副透過帯の影響を考慮しなければならない. 図8に示したように, バンドパス干渉フィルターは原理的に透過帯の整数倍の波長を透過する. また, ダイクロイックミラーや色ガラスフィルターも全波長にわたって理想的な特性にするのは困難なため, 近赤外部を透過してしまうフィルターが多い. 近赤外部

表 6. 蛍光プローブ試薬とフィルターの組み合わせ例

| 試薬名   | 測光法*1     | 励起フィルター                                      | ダイクロイックミラー       | 蛍光フィルター                      | 備考                     |
|---|-----------|--|------------------|------------------------------|------------------------|
| fura-2  | 2 ex 1 em | MBP 340 W 25<br>MBP 360 W 25<br>MBP 380 W 25 | DM 400           | BA 420                       | U-MU/FURA(オリンパス)       |
|   |           | EX 340 nm<br>EX 360 nm<br>EX 380 nm          | DM 400           | BA 492                       | ニコン                    |
| indo-1  | 1 ex 2 em | MBP 350                                      | DM 385<br>DM 455 | BA 370<br>MBA 405<br>MBA 480 | U-MM/INDO(オリンパス)<br>*2 |
|   |           | EX 355 nm                                    | DM 380<br>DM 450 | IF 405<br>IF 480             | ニコン<br>*2              |
| fluo-3<br>Calcium Green-1<br>Calcium Green-2<br>Calcium Green-5 N<br>Calcium Orange | 1 ex 1 em | MBP 490                                      | DM 505           | BA 515 IF                    | U-NIB/FLUO(オリンパス)      |
|   |           | EX 470-490                                   | DM 510           | BA 515 IF                    | B-1 H(ニコン)             |
| Calcium Crimson   | 1 ex 1 em | BP 545-580                                   | DM 600           | BA 610 IF                    | U-MWIY(オリンパス)          |
| rhod-2  | 1 ex 1 em | BP 520-550                                   | DM 565           | BA 580 IF                    | U-MWIG(オリンパス)          |
| Fura Red  | 1 ex 1 em | BP 470-490                                   | DM 570           | BA 610 IF                    | オリンパス                  |
|   |           | EX 470-490                                   | DM 580           | BA 610                       | ニコン                    |

注：\*1 2 ex 1 em は 2 波長励起 1 波長蛍光測光を，1 ex 2 em は 1 波長励起 2 波長蛍光測光を，1 ex 1 em は 1 波長励起 1 波長測光を示す。測光法は代表的な例を示したので，これ以外の方法でも可能な場合もある。

\*2 1 波長励起 2 波長蛍光測光で，発光して蛍光を分光する時のダイクロイックミラーとフィルターの組み合わせを示す。

備考に示した型名は，各メーカーで標準品として用意されている組み合わせである。型名が示されていないものは，それぞれのフィルターとダイクロイックミラーを組み合わせで使用する。フィルター類は標準品の組み合わせを示したので，最適な条件になっていない組み合わせもある。

は目に見えないが，励起光源としてよく使われるキセノンランプはこの波長領域でも強い光を出している。一方，ビデオカメラなどの検出器はこの近赤外でも感度を持っている。このため，副透過帯を通過してきて迷光となった光で測定が妨害されることが度々ある。この近赤外光をカットするためには熱線吸収フィルター(例えば CM-500 : HOYA など)を用いる。

特に，fura-2 や indo-1 では，340 nm と 360 nm の副透過帯が 680 nm と 720 nm になり，この波長域では検出器の感度が高いこともあり，大きな妨害となる(図 7 B)。Fluo-3 や Fura Red で使用する 450 nm 以上の励起光では副透

過帯が 900 nm 以上になり，検出器の感度も低下するため，影響は小さくなる。

### 3. 4 検出器

#### a. ビデオカメラ

ビデオカメラは蛍光観察用の高感度タイプを使う。代表的な種類は，撮像管タイプの SIT (Silicon intensified target) カメラと，CCD (Charge coupled device) カメラにイメージインテシファイアを接続した ICCD (Image intensified charge coupled device) カメラがある。ICCD カメラは SIT カメラと比べ，解像度はやや低いが，感度も高く，また，残像が少ないため蛍光強度の速い変化を解析するのに適してい

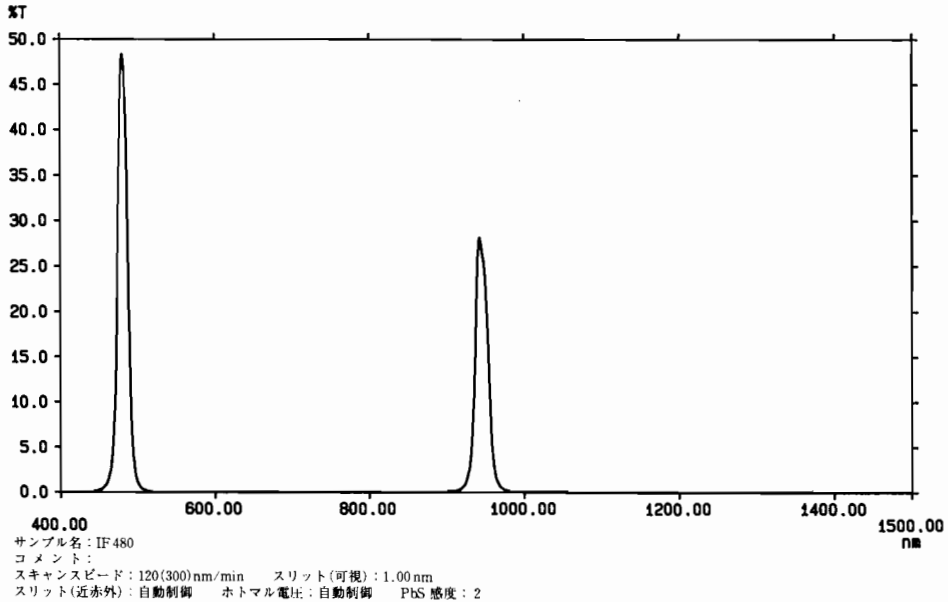


図8. バンドパスタイプ干渉フィルターの特性例

中心波長 481 nm, バンド幅 14 nm, 透過率46%の干渉フィルターである。透過帯は1峰で、透過帯の裾も狭く、比較的良好な特性ですが、2倍波長の 962 nm に副透過帯が出ている。なお、3倍波長以上の副透過帯はこのフィルターでは認められなかった。

る。したがって、SIT より ICCD カメラを選択した方がよいであろう。

これらの高感度ビデオカメラを使用するときの注意点は、強い光を入射させないようにすることである。保護回路は内蔵しているが、光が入射してから作動するので万全ではない。場合によってはカメラの性能が低下したり、最悪の場合、壊してしまうことにもなりかねない。特に、明視野照明を切り忘れて光路をビデオカメラ側へ切り替えることや、外部の強い照明光を入射させたりすることがないように注意する必要がある。

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定では経時変化を測定することが多いため、特殊な場合を除いて、冷却 CCD や VIM (Video intensified microscopy) カメラのような微弱光用の超高感度ビデオカメラは使用できない。これらのビデオカメラは、数秒から数時間の間の光を蓄積することで高感度化している。したがって、時間分解能が悪く、速い [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変化を観察するには向いていない。

また、通常の CCD や撮像管タイプのビデオカメラも、高感度タイプと唱っていても、感度が足りないため強力な励起光が必要になり、プローブ試薬の退色や細胞のダメージが大きくなり、利用は薦められない。

フィルターの項でも指摘したが、しばしば、フィルターの副透過帯が問題を起こす。赤外光は肉眼で観察する時には問題にならないが、多くの種類のビデオカメラは赤外域まで感度がある(図7B)。赤外光が洩れていると蛍光像に赤外光が加わり、画像のコントラストを落としたり、ダイナミックレンジが狭くなる要因となる。特に、異なるメーカーの部品を組み合わせる時は、フィルターの組み合わせによっては赤外光が透過することもあるので注意が必要である。

#### b. 光電子倍增管

分光蛍光光度計や顕微測光装置、共焦点レーザー顕微鏡の検出器には光電子倍增管が用いられている。これらを選定したり直接取り扱うことはあまりないと思われるので、注意点を示す

にとどめる。基本的には高感度ビデオカメラと同様に強い光を入射させないことが必要である。蛍光光度計では、測定室の蓋を開けるとシャッターが閉まったり、電源を切ったりして保護するので壊すことはないが、顕微測光装置では構造的に保護が十分に行えないので注意を要する。装置を組み立てたり分解する時には電源を切って行うのは当然であるが、電源を切っても受光面にはできるだけ光を当てないようにする。

また、顕微測光装置では、近赤外光に対するフィルターの副透過帯の問題も同様に注意が必要である。

### 3. 5 画像処理装置

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定を行うための画像処理装置には、画像間での割り算と検量線作成ができる必要がある。また、2波長励起の場合は、画像取り込みと励起フィルターの切り換えを同期をとってコントロールする必要もある。画像処理自体はごく普通の処理であるが、フィルター切り換え装置をコントロールする機能を持った機種が [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定専用としてあるので、これを利用するのが簡単である。広く使われている ARGUS-50 シリーズ(浜松ホトニクス)は自社製の切り換え装置 C 4312 以外に、オリンパスや日本分光製のフィルター切り換え装置も接続できるようになっている。また、ファイバー光源 C 5151(浜松ホトニクス)のフィルター切り換えも行える。これらの [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定用機種は、多くの場合、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定の為の処理以外に、一般的な画像処理も実行できる。したがって、得られた [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 分布像にさまざまな画像処理を施して見やすくわかりやすい分布像とすることも可能である。

画像処理装置を [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 用として使用する場合、フレームメモリの画素数と容量に注意する。普通、画素数はあまり必要ない。水平256×垂直256程度で十分で、場合によっては水平128×垂直128でも使用できる。むしろ、メモリ容量の方が1回の実験で取得できる画像の枚数に影響するので重要で、この画像の枚数で、ど

の程度の時間変化をどのくらいの細かさで調べられるかが決まる。ARGUS-50 は、標準では水平512×垂直483のメモリを4枚持っている。このメモリは分割して使用できるので、水平512×垂直483の画素数では2組のデータしか取れないが、水平256×垂直241にすれば8組、水平128×垂直120で32組のデータが取れる。なお、ARGUS-50 では、測定のインターバルが十分長い場合はハードディスクにデータが保存できるので、ハードディスクの容量が許す限り多量の画像データを取得することも可能である。

ビデオカメラによって撮影された画像は画像処理装置により、その明るさに応じたアナログ信号がデジタル化され、輝度と呼ばれる数値に置き換えられ、画像メモリに記録される。このとき、どのくらいの諧調で輝度データが保存できるかにも注意が必要である。通常の画像処理装置では8ビット(256諧調)でAD変換を行う。欲を言えば、もっと多くの諧調、たとえば、10ビット(1024諧調)以上があればなおよいが、現状では非常に高価な装置になる。安価な画像処理装置では6ビットと言うものもあるが、この程度の諧調では利用は困難である。

また、AD変換は8ビットでも、フレームメモリの深さが8ビットでは不足する。これは、ノイズを低減させるために画像積算を行う場合のオーバーフローを防ぐためである。たとえば、64枚積算する場合、理想的には14ビットの深さのメモリが必要となる。ARGUS-50 では、メモリの深さは16ビットになっているので、256枚の積算ができる。

画像処理をリアルタイムで行う必要がないため、パソコンの拡張スロットに挿入するビデオ入力ボードと、フィルター切り換えに使用するデジタル出力ボードも利用できるであろう。これらを利用すれば、安い価格で [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定システムを組み上げることができると思われるが、問題はソフトウェアをどうするかである。フリーソフトなどで使うことができるプログラムがあればよいが、基本的には自作するしかないであろう。機能を限ってしまえば比較的簡単



にできるかもしれませんが、時間があり、プログラミングに自信があるならば試みるのもよいであろう。

### 文 献

- 1) S. M. Baylor, W. K. Chandler & M. W. Marshall (1982) Use of metallochromic dyes to measure changes in myoplasmic calcium during activity in frog skeletal muscle fibers. *J. Physiol.* **331**, 139-177
- 2) J. R. Blinks, F. G. Prendergast & D. G. Allen (1976) Photoproteins as biological calcium indicators. *Pharmacol. Rev.* **28**, 1-93
- 3) 小島 至(1990)細胞内カルシウムイオン濃度. 新生化学実験講座 8 細胞内情報と細胞応答(日本生化学会編) pp. 136-141 東京化学同人, 東京
- 4) 栗原 敏, 須田憲男, 口羽謙二(1989) 発光蛋白による細胞内カルシウム測定の実験基礎—種々の Ca 指示薬との比較. *実験医学* **7**, 632-636
- 5) R. Y. Tsien, T. Pozzan & T. J. Rink (1982) Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.* **94**, 325-334
- 6) G. Grynkiewicz, M. Poenie & R. Y. Tsien (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450
- 7) A. Minta, J. P. Y. Kao & R. Y. Tsien (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* **264**, 8171-8178
- 8) 宮川厚夫, 牧野 徹, 玉川 彰, 尾碕一穂(1989) ビデオ画像処理を用いた蛍光性カルシウム指示薬 Fura-2 による細胞内遊離カルシウムイオン濃度分布の測定. *分析化学* **38**, 643-649
- 9) 御橋廣真(1983) 蛍光法で何がわかるか. 日本分光学会測定法シリーズ 3 蛍光測定生物学への応用(木下一彦, 御橋廣真編) pp. 1-43 学会出版センター, 東京
- 10) R. P. Haugland (1992) *HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS*. Molecular Probes, Inc., USA, pp. 113-128
- 11) D. A. William, K. E. Fogarty, R. Y. Tsien & F. S. Fay (1985) Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using fura-2. *Nature*, **318**, 558-561
- 12) T. Furuno, T. Hamano & M. Nakanishi (1993) The effects of an inhibitor of the intracellular Ca<sup>2+</sup> pump on nuclear calcium signals in B cells. *Bioimages* **1**, 9-12
- 13) T. Kawanishi, H. Asou, T. Kato, C. Uneyama, K. Toyoda, H. Ohata, K. Momose & M. Takahashi (1994) Ratio-imaging of calcium waves in cultured hepatocytes using rapid scanning confocal microscope and indo-1. *Bioimages* **2**, 7-14
- 14) K. Kuba, S.-Y. Hua & M. Nohmi (1991) Spatial and dynamic changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> measured by confocal laser-scanning microscopy in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Neurosci. Res.* **10**, 245-259
- 15) 久場健司(1991) 共焦点レーザー顕微鏡: 生理学への応用(細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態の分析). *細胞* **23**(3), 73-75
- 16) 宮川厚夫(1992) データ処理による細胞内遊離カルシウムイオン濃度分布のビデオ蛍光顕微鏡像と細胞構造の対応法. *分析化学* **41**, T113-T118
- 17) 宮川厚夫(1992) ビデオ蛍光顕微鏡を用いた細胞内遊離カルシウムイオン濃度分布測定におけるバックグラウンド蛍光の補正. *分析化学* **41**, T119-T124
- 18) Y. Kudo, T. Nakamura & E. Ito (1991) A 'macro' image analysis of fura-2 fluorescence to visualize the distribution of functional glutamate receptor subtypes in hippocampal slices. *Neurosci. Res.* **12**, 412-420