

シリーズ「細胞内 Ca イオン濃度の光学的測定法」

単一細胞における細胞内 Ca イオン濃度測定の実際

林 秀 晴*・金子雅則**・寺田 肇**

(* 浜松医科大学光量子医学研究センター・** 浜松医科大学第3内科)

I. はじめに

細胞内 Ca^{2+} は種々の細胞機能において重要な役割を果たしているため、細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を測定することは細胞機能の解明において重要である。 $[Ca^{2+}]_i$ の測定にはイオン選択性電極、 Ca^{2+} 感受性発光蛋白 (aequorin)、NMR 法などが用いられてきた。fura-2¹⁾ を代表とする Ca^{2+} 感受性蛍光色素法は、感度が高いため、種々の単一細胞における $[Ca^{2+}]_i$ の連続的な測定のみでなく、 $[Ca^{2+}]_i$ の細胞内分布の画像化も可能とした^{2,3)}。本稿では、主に単一心筋細胞を中心に、蛍光色素法による $[Ca^{2+}]_i$ 測定の実際と注意点について述べる⁴⁾。

II. 蛍光色素法の原理

Ca^{2+} 感受性色素は、 Ca^{2+} を結合するキレート部分と、光をあてると蛍光を出す発色団の部分よりなり、 Ca^{2+} 結合の有無により、励起光や蛍光の波長が変化したり、蛍光強度が変化する。これらの色素を細胞内に入れ、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化による蛍光波長特性の変化や蛍光強度の変化を測定することにより、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定する。励起光及び蛍光が1波長のみであると、測定された蛍光強度は細胞内の蛍光試薬の量や細胞の厚さ、また励起光の強度に影響される。そこで2波長蛍光測定による ratio 法が一般的に用いられる。例えば、 Ca^{2+} 感受性色素の中で最も広く使われている fura-2 の特徴は、図1に示した様に、 Ca^{2+} 濃度が低いときには380 nm で励起時、高いときには340 nm で励起時に、510 nm で強い蛍光が得られるが、360 nm 付近では蛍光強度は Ca^{2+} 濃度には影響を

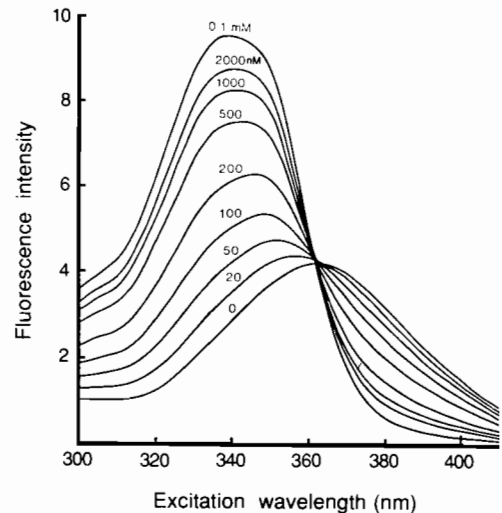


図1. Ca^{2+} 濃度による fura-2 の蛍光特性の変化。横軸は励起波長を、縦軸は 510 nm での蛍光強度を示す。

受けない (isosbestic point). 340 nm と 380 nm で励起した時の蛍光比により、fura-2 の細胞内濃度や細胞の厚さに関係なく $[Ca^{2+}]_i$ を測定できる¹⁾。340/360 nm, または 380/360 nm で励起時の蛍光強度比も使用できるが、340/380 nm の比の変化が最も大きいため、一般的にはよく使われる。fura-2 などの2波長励起型の蛍光色素を用いた時の $[Ca^{2+}]_i$ の絶対値は以下の式により求められる¹⁾。

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \times \beta \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

ここで、Kd = 蛍光色素と Ca^{2+} の解離定数、 R_{min} = すべての色素が遊離型の時の 340/380 nm での蛍光比、 R_{max} = すべての色素に Ca^{2+} が結合した時の 340/380 nm での蛍光比、 R = 測定した 340/380 nm での蛍光比、 $\beta = R_{min}$ と R_{max} 測定時の 380 nm での蛍光比である。Kd は 135 nM (20°C) または 224 nM (37°C) と報告さ

れているが¹⁾、温度や細胞内の条件により種々の値が報告されている。

上式からわかるように、細胞内イオン濃度の測定は細胞内の色素濃度や細胞の厚さに影響を受けないが、fura-2 または fura-2 と Ca^{2+} の結合体以外に蛍光物質は存在しない、fura-2 は calibration を作成する溶液中と細胞内でその蛍光特性が変化しないなどの種々の前提があるため、実際の測定においては多くの誤差要因がある。特に AM (acetoxymethyl) 体による色素の負荷法を用いた時には、未加水分解物による影響や、色素の細胞内でのコンパートメント化の問題がある。これらの検討すべき問題点については後述する。

Ca^{2+} 感受性色素には、励起波長は変わらず最大蛍光の波長が変化する色素がある。indo-1 は、励起波長はあまり変化せず、 Ca^{2+} 濃度により蛍光波長特性が変化する。つまり、 Ca^{2+} 濃度が低いときには 485 nm、高いときには 405 nm の蛍光が強いため、二つの波長で測定した蛍光の比をとることにより $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を算出する。

fura-2 を代表とする蛍光色素法により、非侵襲的に心筋細胞のような小型細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定することが可能で、光電子増倍管により蛍光強度を測定するのが一般的であるが、細胞内の Ca^{2+} 濃度分布を検討するためには、ビデオカメラで捉えた蛍光顕微鏡像をデジタル変換し、画像処理する必要がある。蛍光色素法は信号が明るいため、この蛍光顕微鏡画像法にも適している。

Ⅲ. 実験装置

A. 画像法^{4,5)}

図 2 は、fura-2 法による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定用装置のブロックダイアグラムである。倒立顕微鏡のステージに実験槽を置き、アセトキシメチル化した色素 (AM 体) をインキュベートして色素を取り込ませた細胞、あるいは色素を直接細胞内に注入した細胞を倒立顕微鏡のステージに置き、落射蛍光装置を用いてキセノンランプから

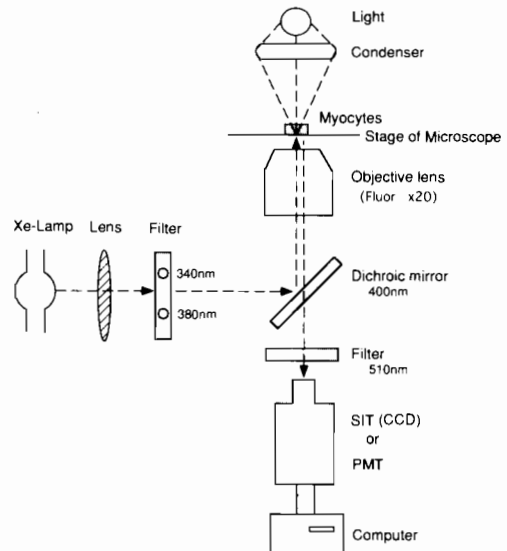


図 2. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定用蛍光顕微鏡解析装置 (fura-2 法)。

の光を分光器または干渉フィルターにより必要な励起光のみを選択して取り出す。fura-2 の場合は 400 nm より短波長の励起光はダイクロイックミラーを反射して蛍光用対物レンズを通して細胞に照射され、放出された 400 nm より長波長側の蛍光はダイクロイックミラーを通過して、510 nm の蛍光用干渉フィルターを介して検出器に達する。蛍光の検出器としては画像法では SIT (silicon intensified target) カメラまたは CCD (charge-coupled device) カメラなどの高感度テレビカメラを用いて蛍光を取得する。高感度テレビカメラを用いて取得された蛍光画像は、A/D 変換されてコンピューターである画像処理装置のフレームメモリーに取り込まれ、蛍光強度比の画像作成などの処理がされる。この画像法は細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分布を観察できることと、一回の実験で複数の細胞における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定できる利点があるが、上記のビデオシステムを用いた画像解析法では、時間分解能は基本的には 1/30 秒が限界である。

B. 光電子増倍管

光電子増倍管 (photomultiplier tube: PMT) は微弱光を電流に変換するが、感度が高く、高速

応答性が特徴である。装置としては、図2のテレビカメラを光電子増倍管(PMT)にして、取得した蛍光データはA/D変換して、コンピュータにより蛍光強度比の計算や $[Ca^{2+}]_i$ への変換がされる。蛍光色素としては、 Ca^{2+} に対する親和性が高く、強い蛍光を発するfura-2がよく用いられてきたが、心筋細胞の収縮時のように動く細胞や、 $[Ca^{2+}]_i$ の速い変化(Ca^{2+} transient)を観察するためには、交互に2波長で励起して比を計算する必要がある。同じ現象を繰り返すコントロールの Ca^{2+} transientなどは、340 nmと380 nmの蛍光を各々記録した後に比を計算できる。しかし、薬剤投与後など速く変化する Ca^{2+} transientを記録する必要がある時には、340 nmと380 nmの励起波長をチョッパーや回転フィルターで高速に切り換え、蛍光を数 msec 毎に取得することになるが、信号対雑音(S/N)比は低下する。1波長励起2波長蛍光のindo-1を用いると、2個の検出器で同時に蛍光を測定することができるため、より正確に $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定することができる。実際のindo-1法による実験装置は後述する(Ⅵ, 図6)、しかし、fura-2やindo-1の Ca^{2+} との結合解離の速度定数は数 msecと報告されているため⁶⁾、蛍光の取得速度をこれ以上に速くする意味はないと考えられる。

Ⅳ. 測定の実際

A. 細胞の分離

fura-2を代表とする蛍光色素による測定法は、感度が高いため単一細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 測定を可能とした。培養細胞または酵素により分離した単一細胞を使用するが、その方法は動物種および細胞種による。単一細胞を用いることにより、自律神経系や内分泌的な影響を取り除き、細胞間の不均一性を検討できるが、培養や酵素による影響があるため、組織やin situの状態と異なった条件であることに注意を払う必要がある。また、単一細胞を用いた実験では $[Ca^{2+}]_i$ と関連した他の細胞機能の同時測定に困難を伴

うことがある。

B. 蛍光色素の負荷

マイクロインジェクションによる細胞内注入またはパッチクランプ電極による細胞内灌流で直接細胞内にfura-2を導入することもできる⁷⁾。fura-2は水溶性で細胞膜を通過できないため、fura-2のカルボキシル基にアセトキシメチル(acetoxymethyl: AM)基をエステル結合させて脂溶性にしたfura-2/AMは、DMSO(dimethyl sulfoxide)に溶解されているものとされていないものがある。溶解されていないfura-2/AMは粉末のため、DMSOにより1 mMの溶液にしてから、一回の実験に使用する量に分け、遮光して凍結保存する。この保存方法で通常半年位はfura-2/AMの劣化はないが、凍結融解を繰り返すと早期に劣化する。使用する時にはfura-2/AMを融解して灌流液で0.3~10 μ Mの濃度に希釈するが、fura-2/AMは脂溶性のため、試験管ミキサーで灌流液を攪拌しながらfura-2/AMを希釈するか、超音波処理をする。細胞を室温~37°Cで10~120分間インキュベートした後に、fura-2/AM溶液を灌流液で数回洗浄し、fura-2/AMが加水分解されるまで30~60分間放置する。

fura-2/AM負荷条件(濃度, 温度, 負荷時間)は細胞の種類や動物種により異なるため、各々がその条件を決める必要がある。例えば心筋細胞は5 μ Mのfura-2/AMを室温で30分間インキュベートすることにより容易に負荷されるが、平滑筋細胞では0.3 μ Mのfura-2/AMを60~90分間のインキュベートが必要であると報告されている⁸⁾。負荷された蛍光の強度は自家蛍光(autofluorescence)に対する比で評価されるが、蛍光が暗くてS/N比が低下する時には、Pluronic F-127⁹⁾やcremophor ELなどの界面活性剤を追加する必要がある。fura-2/AMは、細胞膜を通過して細胞内のエステラーゼによる加水分解を受けてfura-2とAM体に分解するが、未加水分解物の存在(incomplete deesterification)や細胞内でのコンパートメント化などがあり、負荷条件に関しても種々の検

討すべき問題があるため後述する。

C. 蛍光測定

1) 画像法

平滑筋細胞などでは、核や筋小胞体(SR)の Ca^{2+} 濃度は細胞質より高く、細胞内 Ca^{2+} 濃度分布は不均一であると報告されている⁸⁾。Wierらは¹⁰⁾、fura-2を心室筋細胞に負荷して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の細胞内分布を画像化し、静止細胞内の Ca^{2+} 濃度分布は均一であったが、自発性収縮細胞では細胞内 Ca^{2+} 濃度分布が不均一であることを報告した。図3は、fura-2法によりモルモットの静止心室筋細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度分布を画像化したものである。左上は単一心室筋細胞の透過光像で、右上および左下はそれぞれ340 nm および380 nm で励起した時の蛍光画像である。右下は細胞内 Ca^{2+} 濃度分布を示す340/380 nm の比の画像であるが、細胞内 Ca^{2+} 濃度分布は均一で、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は70 nMであった。一方、静止心室筋細胞でもfura-2による細胞内 Ca^{2+} 濃度分布は不均一で、これはミトコンドリア内の高い Ca^{2+} 濃度によるとする

報告もある¹¹⁾。この様に、細胞内 Ca^{2+} 濃度分布の不均一性があることは、浮遊細胞を用いた測定や、光電子増倍管による測定結果の評価には注意を要することを示している。

2) 光電子増倍管による Ca^{2+} transient の測定

興奮性細胞における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の一過性の上昇と下降などの速い $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化 (Ca^{2+} transient) を測定したり、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の細胞内分布の解析を必要としない時には光電子増倍管により蛍光を取得するが、実際の測定については後述する(VI. 細胞内 Ca^{2+} 濃度と他のパラメーターとの同時測定)。

高感度テレビカメラを用いた画像法でも光電子増倍管を用いた方法でも、注意すべきことに光軸のブレがある。急にコントロールの細胞の蛍光比が変化した時には、光軸のブレにより励起光の照明が不均一となっているためのことがあり、光軸の調整が必要である。

D. キャリブレーション(検量線の作成)

fura-2の蛍光比を $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に変換するため

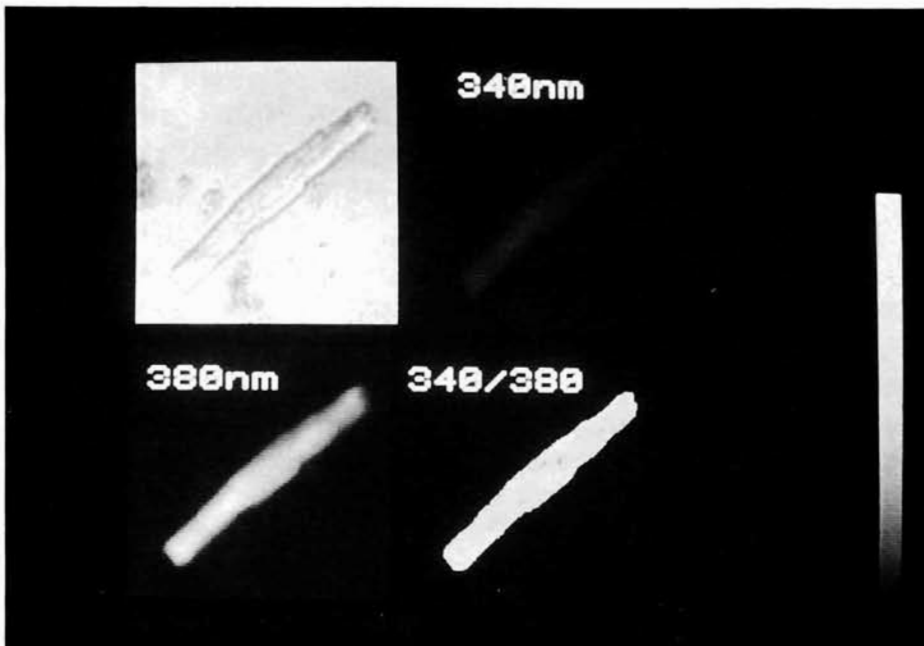


図3. fura-2によるモルモットの静止心室筋細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定例。左上: 透過光像。右上: 340 nm で励起時の蛍光画像。左下: 380 nm で励起時の蛍光画像。右下: 340/380 nm の ratio 像で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を示す。

に、蛍光比と Ca^{2+} 濃度との関係を示す検量線を作成する。既知の Ca^{2+} 濃度の溶液は、 CaCl_2 と EGTA を混合することにより作成できるが、100 nM 程度の低濃度 Ca^{2+} 溶液を正確に作成するには種々の注意が必要であるため、Molecular Probes 社より市販されている Ca^{2+} 緩衝液を使うと便利である。キャリブレーションには、細胞内液類似の溶液中における蛍光試薬の蛍光強度比と Ca^{2+} 濃度との関係を示す検量線を作成する in vitro calibration¹⁾と、AM 体により蛍光試薬を細胞内に取り込ませてイオノフォアを用いて細胞内で検量線を作成する in vivo calibration⁸⁾がある。

1) in vitro calibration

1 ~ 50 μM の fura-2 (free acid) を、100 nM から 1 μM の間の最低3種類の濃度の Ca^{2+} 濃度緩衝液に溶解し、実験と同じ光学系および装置を使用して fura-2 の蛍光強度比を測定する。この時に、fura-2 の K_d 値に影響を与える溶液の pH と温度を調整することが大事であり、低濃度の Ca^{2+} 溶液を使用するため、溶液の保存には Ca^{2+} が遊出するガラス器具を使わないこと、灌流槽などは再蒸留水または超純水で十分に洗う必要がある。測定した点は Tsien らの理論式に合うように最小2乗法で計算すれば $K_d \times \beta$, M_{max} , R_{min} の定数を求めることができる。この方法は簡便であるが、fura-2 の蛍光特性は細胞内の viscosity や細胞内蛋白の影響を受け¹²⁾、 K_d は pH により大きく影響される¹³⁾。また、fura-2/AM を用いた場合には、後述の様に incomplete desesterification 等の問題点がある。一方、free の fura-2 または indo-1 をパッチクランプ電極により細胞内に直接負荷すれば、基本的には in vitro calibration による値を使用できることが示されている¹⁴⁾。これらの in vitro calibration 欠点を少なくするために、in vivo (in situ) calibration がある。

2) in vivo calibration

実験に使用する細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を設定するために、イオノフォアである ionomycin (1

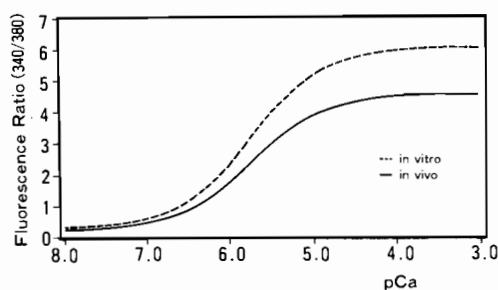


図4. fura-2 蛍光の較正曲線. 点線は in vitro calibration を、実線は in vivo calibration を示す。

~10 μM)^{8,15)} を加えて細胞膜の Ca^{2+} に対する透過性を高くして、細胞外液の Ca^{2+} 濃度を変えることにより $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を変化させて、細胞内の fura-2 の蛍光強度比との関係を求めて較正曲線を作成する。心筋細胞は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が高くなると細胞拘縮をきたすため、ionomycin を使用する前に La^{3+} 、BDM (2, 3-butanedione monoxime) を使用して拘縮を防いだり¹⁵⁾、代謝阻害による rigor を起こさせてから¹⁶⁾、ionomycin を与えて細胞外の Ca^{2+} 濃度を変える。図4は、in vitro calibration と、Li ら¹⁶⁾の方法によりモルモット心室細胞を用いて作成した in vivo calibration を比較したものであるが、両曲線は異なっている。ionomycin により確実に細胞内外の Ca^{2+} 濃度が平衡化しているのか不明であるため、in vivo calibration も完全ではないが、より正確に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ への換算がされると考えられる。

V. 検討すべき項目

A. incomplete deesterification (未加水分解物の存在)

fura-2/AM が細胞内のエステラーゼにより分解されず、 Ca^{2+} との結合とは無関係に蛍光を発する未加水分解物¹⁷⁾の存在の程度は、エステラーゼ活性が異なるため細胞種や動物種により差がある。fura-2/AM で負荷した細胞で測定した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ や、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させる薬剤などの投与時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が reasonable でない時には、この未加水分解物の存在の

可能性が考えられる。Mn²⁺ は fura-2 と複合体を形成してその蛍光を消失させる (quench) ため、Mn²⁺ を投与後に残存した蛍光が fura-2 以外の未加水分解物を含んだ蛍光を示すと考えられる。実際には fura-2/AM 負荷後に溶液を ionomycin (0.1~10 μM) と Mn²⁺ (1 mM) に変えて蛍光を測定する。また、キャリブレーションの項で記した様に、in vivo キャリブレーションと in vitro キャリブレーションと比較することにより、未加水分解物の存在がある程度判定できる。未加水分解物の程度が大きい場合には、fura-2/AM の負荷条件(濃度, 温度, 負荷時間)を変えたり、fura-2/AM の負荷後に細胞外液の fura-2/AM を洗い流して30~60分間の post-incubation を行なう。それでも fura-2/AM の加水分解が不十分な時には、電極により遊離の蛍光色素(fura-2 の free acid)を注入するのが望ましいと考えられる⁷⁾。

B. コンパートメント化 (compartmentation)

色素がミトコンドリアや筋小胞体などの細胞内小器官に取り込まれるコンパートメント化¹⁸⁾は、細胞種により差があるが [Ca²⁺]_i の測定の誤差の原因となる。画像法で直接色素の分布を観察したり、適量のジギトニン(2~10 μM)で形質膜を破壊して、残存する色素量を測定することによりその程度をある程度算出することが可能である。コンパートメント化を防ぐためには室温での負荷が有効と報告されている³⁾。

C. 退色 (bleaching)

励起光による細胞内蛍光試薬の bleaching (退色)^{18,19)}の程度は、蛍光試薬により差があり、indo-1 は fura-2 より bleaching が速い。光により分解した中間体が蛍光を発することと、波長により bleaching の程度に差があるため、ratio 法による測定でも bleaching は実験誤差の原因となる。蛍光の取得時間をなるべく短くし、測定しない時には励起光にシャッターを降ろすように注意する。また、ND (neutral density) フィルターを励起光の光路に追加することによ

り励起光の強度を調整し、各々の実験プロトコルに従って bleaching の程度を測定して ratio にも変化のないことを実験前に確認する必要がある。また、bleaching とは別に細胞内の fura-2 が細胞外に漏出 (leak) することが細胞種によっては問題となるが³⁾、この場合には有機アニオン輸送の阻害剤である probenecid を追加したり、低温下の実験により防げると報告されている。

D. 自家蛍光 (autofluorescence)

fura-2 蛍光に対して NADH などによる自家蛍光 (autofluorescence) が無視できない時には、色素負荷前に計測値より background として減ずる。fura-2/AM を負荷した時にはその細胞の autofluorescence は測定できないため、色素を負荷していない細胞で測定した autofluorescence を差し引いて比を計算する。また、低酸素や虚血時には NADH が増加して autofluorescence も増加するため注意が必要である。

E. buffering

autofluorescence の影響を減少させたり他の誤差要因を減らすためには、蛍光強度を強くするために細胞内の fura-2 濃度をある程度高くする必要がある。しかし、fura-2 は Ca²⁺ のキレート剤であるため、細胞内の fura-2 濃度が高いと [Ca²⁺]_i を低下させたり、[Ca²⁺]_i の変化を減少させて細胞機能に影響を与える可能性がある²⁰⁾。細胞内の fura-2 濃度は約 50 μM とされているが、各々の細胞での fura-2 濃度を測定することは困難であり、一般的には fura-2 の負荷条件を変えて細胞機能に影響がないことを検討する。

E. motion artifact

心筋細胞や筋細胞などの収縮する細胞や、形態が速く変化するときには問題となる。motion artifact の時には 340 nm と 380 nm で励起時の蛍光が鏡像にならず、同じ方向の動きを示す。2波長の比をとることにより機械的な動きの影響はキャンセルできることが多い。

VI. 細胞内 Ca^{2+} 濃度と他のパラメーターとの同時測定

心筋細胞において $[Ca^{2+}]_i$ は興奮-収縮連関において重要な役割を果たしており、電位依存性 Ca^{2+} 流入が筋小胞体からの Ca^{2+} 放出をきたして Ca^{2+} transient を形成する。この Ca^{2+} transient が収縮を引き起こすため、膜電流、 Ca^{2+} transient と細胞収縮を同時に測定することは興奮-収縮連関の解明において重要である。

A. 膜電流

パッチクランプ電極内に fura-2(free acid, 30 ~ 70 μ M) を溶解して whole cell clamp を行な

い、膜電流と Ca^{2+} transient を同時に記録する⁷⁾。図 5 は、モルモットの心室筋細胞の Ca^{2+} 電流と Ca^{2+} transient を記録したものである。

B. 張力

単一細胞の収縮性の測定には、平滑筋細胞では高感度微小張力トランジューサーによる方法もあるが²¹⁾、video motion detector²²⁾ や photodiode array²³⁾ により細胞長の変化を計測する方法もある。図 6 は、1 波長励起 2 波長蛍光の indo-1 を用いた細胞収縮と $[Ca^{2+}]_i$ の同時測定装置のブロックダイアグラムであり、細胞収縮は 600 nm 以上の長い波長の光により photodiode array により測定する。キセノンランプ

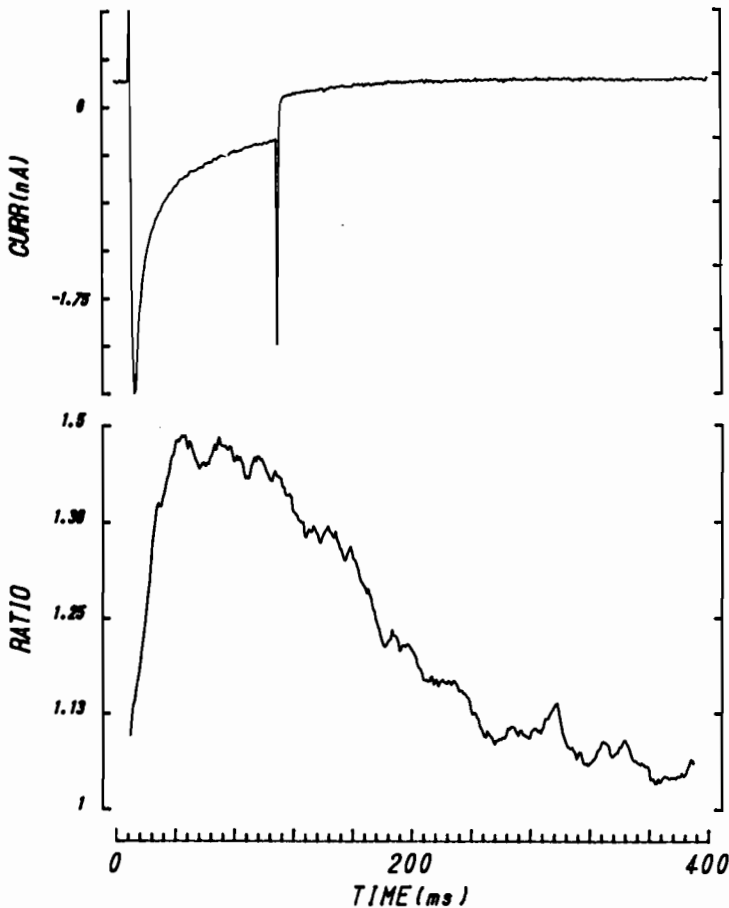


図 5. モルモット心室筋細胞における Ca^{2+} 電流と Ca^{2+} transient の同時測定例. 70 μ M の fura-2(free acid)を含むパッチクランプ電極により whole cell clamp を行なった。

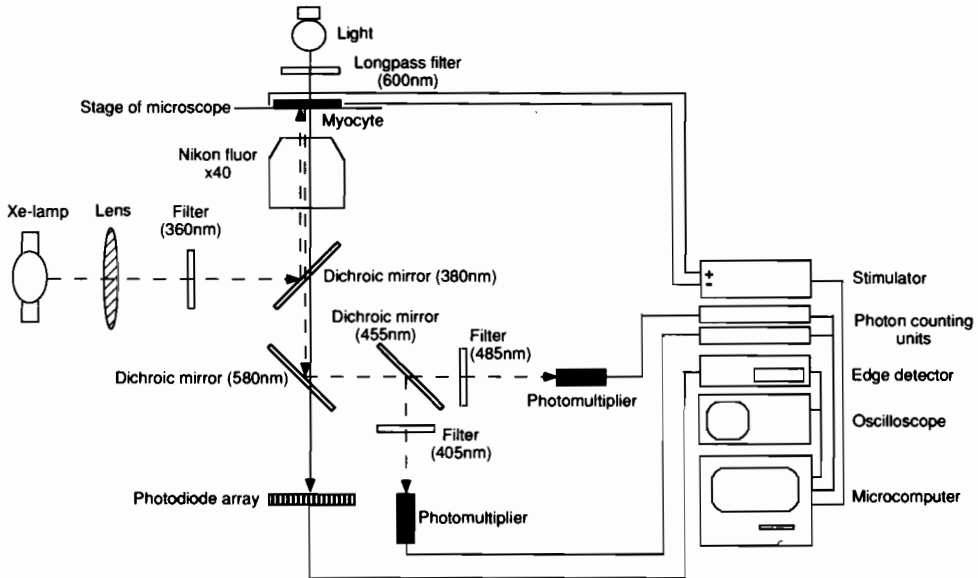


図6. indo-1 を用いた細胞収縮と Ca^{2+} transient の同時測定装置のブロックダイアグラム。細胞長は、実線で示すように、600 nm 以上の光で photodiode array に結像された細胞像から、edge detector により測定する。キセノンランプからの蛍光は、破線で示すように、360 nm で照射され、405 nm と 485 nm の蛍光は 2 本の光電子増倍管 (photomultiplier tube) により検出され、 $[Ca^{2+}]_i$ は 405/485 nm の比として示される。

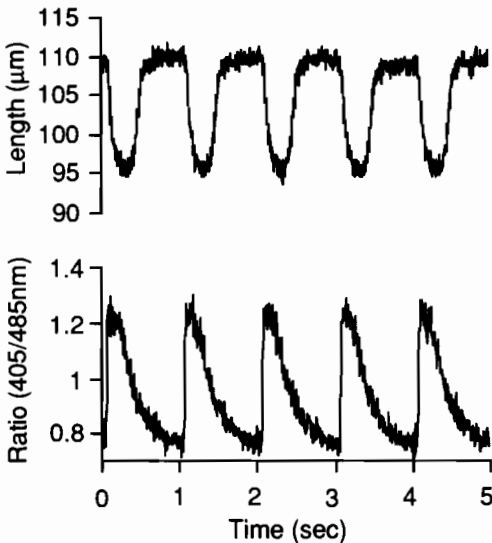


図7. モルモット心室筋細胞における細胞収縮 (上段) と Ca^{2+} transient (下段) の同時測定例。

からの蛍光は、2枚のフィルター(405 nm と 485 nm)を通して2台の光電子増倍管で記録し、 Ca^{2+} transient は 405/485 nm の蛍光比として算出する。図7は、この装置により測定したモルモット心室筋細胞の細胞収縮と Ca^{2+} transient を示す。しかし、indo-1 は fura-2 に比較し photobleaching が大きいことや細胞内でのコンパートメント化が強いなどの使いにくい面もあり、まだ一般的ではない。

Ⅶ. 他の細胞内イオン濃度測定への応用

pH 感受性色素の 2', 7'-bis(carboxyethyl)-5, 6-carboxyfluorescein (BCECF) や Na^+ 感受性色素である sodium-binding benzofuran isophthallate (SBFI) は、fura-2 と同様に 2 波長励起 1 波長蛍光型の色素であり、BCECF と SBFI の励起波長はそれぞれ 490 nm と 450 nm、340 nm と 380 nm であり、蛍光はそれぞれ 520 nm、510 nm である²⁾。従って、基本的には fura-2 法と同じ装置により細胞内 pH や細胞内 Na^+ 濃度

$[Na^+]_i$ の測定が可能である。

$[Ca^{2+}]_i$, 細胞内 pH 及び $[Na^+]_i$ は, $Ca^{2+}-H^+$ interaction, Na^+-H^+ 交換, Na^+/Ca^{2+} 交換を介してお互いに関連している。また, fura-2 などの蛍光色素と Ca^{2+} との解離定数 (Kd) は細胞内 pH により影響を受けるため¹³⁾, 特にアシドーシス溶液灌流時や虚血時の細胞内イオン測定時には, 同時に pH_i を測定することが必要となる。我々は, 各蛍光試薬の波長特異性の差を利用して, 複数の蛍光色素を同時に負荷して単一心筋細胞内における 2 種類のイオン濃度を測定することが可能であることを報告した^{24, 25)}。

VIII おわりに

蛍光色素法による $[Ca^{2+}]_i$ 測定は簡便で有効な方法であるが, 特に $[Ca^{2+}]_i$ の絶対値の算出には種々な誤差があることを認識して, 基本的な検討をしてから実験を始める必要がある。また, 薬剤には蛍光を有したり, 蛍光を吸収して蛍光試薬の蛍光特性に影響を与えることも多いため, 細胞に投与する前に蛍光分光光度計でチェックするべきである。また, Mn^{2+} や Ni^{2+} などの 2 価の陽イオンは蛍光試薬の蛍光を消失させる (quench) ため, 投与時にはこれらのイオンが細胞内に入るかどうかを調べる必要がある。

蛍光顕微鏡画像法の問題点として時間分解能および空間分解能の改善がある⁵⁾。現在の蛍光顕微鏡画像法の空間分解能を規定しているものとしては, 光学系やテレビカメラの性能の他に, 蛍光色素のシグナルが空間的に平均化されたものであることから, 焦点外の蛍光も検出している問題点がある。共焦点レーザー走査顕微鏡を用いると焦点面を薄くできるため, 解像能が優れ, 細胞の一断面の Ca^{2+} 濃度の変化を画像できる。また, 時間分解能の改善には, photo-multiplier による測定が一般的である。

文 献

- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, RY. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450
- Tsien, RY. (1989) Fluorescent indicators of ion concentrations. *Methods Cell Biol.* **30**, 127-156
- Malgaroli, A., Milani, D., Meldolesi, J. & Pozzan, T. (1987) Fura-2 measurement of cytosolic free Ca^{2+} in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J. Cell Biol.* **105**, 2145-2155
- Hayashi, H. & Miyata, H. (1994) Fluorescence imaging of intracellular Ca^{2+} . *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **31**, 1-10
- Moore, EDW., Becker, PL., Fogarty, KE., Williams, DA. & Fay, FS. (1990) Ca^{2+} imaging in single living cells: theoretical and practical issues. *Cell Calcium* **11**, 157-179
- Jackson, AP., Timmerman, MP., Bagshaw, CR. & Ashley, CC. (1987) The kinetics of calcium binding to fura-2 and indo-1. *FEBS Lett.* **216**, 35-39
- Cannell, MB, Berlin, JR. & Lederer, WJ. (1987) Effect of membrane potential changes on the calcium transient in single rat cardiac muscle cells. *Science* **238**, 1419-1423
- Williams, DA., Fogarty, KE., Tsien, RY. & Fay, FS. (1985) Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. *Nature* **318**, 558-561
- Poenie, M., Alderton, J., Steinhardt, R. & Tsien, RY. (1986) Calcium rises abruptly and briefly throughout the cell at the onset of anaphase. *Science* **233**, 886-889
- Wier, WG., Cannell, MB., Berlin, JR., Marban, E. & Lederer, WJ. (1987) Cellular and subcellular heterogeneity of $[Ca^{2+}]_i$ in single heart cells revealed by fura-2. *Science* **235**, 325-328
- Williford, DJ., Sharma, VK., Korth, M. & Sheu, SS. (1990) Spatial heterogeneity of intracellular Ca^{2+} concentration in nonbeating guinea pig ventricular myocytes. *Circ. Res.* **66**, 234-241
- Konishi, M., Olson, A., Hollingworth, S. & Baylor, SM. (1988) Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. *Biophys. J.* **54**, 1089-1104
- Lattanzio Jr., FA. (1990) The effects of pH and temperature on fluorescent calcium indicators as determined with Chelex-100 and EDTA buffer systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 102-108
- Noma, A., Shioya, T., Paver, LFC., Twist, VW. & Powel, T. (1991) Cytosolic free Ca^{2+} during operation of sodium-calcium exchange in guinea-pig heart cells. *J. Physiol.* **442**, 257-276
- Borzak, S., Kelly, RA., Kramer, BK., Matoba, Y., Marsh, JD. & Reers, M. (1990) In situ calibration

- of fura-2 and BCECF fluorescence in adult rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **259**, H 973-H 981
- 16) Li, Q., Altshuld, RA. & Stokes, BT. (1987) Quantitation of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 120-126
- 17) Scanlon, M., Williams, DA. & Fay, FS. (1987) A Ca^{2+} -insensitive form of fura-2 associated with polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **262**, 6308-6312
- 18) Blatter, LA. & Wier, WG. (1990) Intracellular diffusion, binding, and compartmentalization of the fluorescent calcium indicators indo-1 and fura-2. *Biophys. J.* **58**, 1491-1499
- 19) Becker, PL. & Fay, FS. (1987) Photobleaching of fura-2 and its effect on determination of calcium concentrations. *Am. J. Physiol.* **253**, C 613-C 618
- 20) Baylor, SM. & Hollingworth, S. (1988) Fura-2 calcium transients in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **403**, 151-192
- 21) Yagi, S., Becker, PL. & Fay, FS (1988) Relationship between force and Ca^{2+} concentration in smooth muscle as revealed by measurements on single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4109-4113
- 22) Peeters, GA., Hlady, V., Bridge, JH. & Barry, WH. (1987) Simultaneous measurement of calcium transients and motion in cultured heart cells. *Am. J. Physiol.* **253**, H 1400-H 1408
- 23) Spurgeon, HA., Stern, MD., Baartz, G., Raffaelli, S., Hansford, RG., Talo, A., Lakatta, EG. & Capogrossi, MC. (1990) Simultaneous measurement of Ca^{2+} , contraction, and potential in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* **258**, H 574-H 586
- 24) Hayashi, H., Miyata, H., Noda, N., Kobayashi, A., Hirano, M., Kawai, T. & Yamazaki, N. (1992) Intracellular Ca^{2+} concentration and pH_i during metabolic inhibition. *Am. J. Physiol.* **262**, C 628-C 634
- 25) Hayashi, H., Satoh, H., Noda, N., Terada, H., Hirano, M., Yamashita, Y., Kobayashi, A. & Yamazaki, N. (1994) Simultaneous measurement of intracellular Na^+ and Ca^{2+} during K^+ -free perfusion in isolated myocytes. *Am. J. Physiol.* **266**, C 416-C 422