

シリーズ「細胞内 Ca イオン濃度の光学的測定法」

カルシウム濃度の画像解析による測定法

工藤佳久・宮川博義・中村 健・高木 博
(東京薬科大学・生命科学部・生体高次機能学研究室)

I. はじめに

1980年代の初めに fura-2 を代表とする細胞膜透過性蛍光 Ca 指示薬が登場して以来、この種の試薬を用いた細胞内遊離 Ca 濃度測定法は実験生物学の分野における標準的な実験項目の一つとされるようになってきている。細胞内 Ca 濃度変化に依存する生物現象が極めて多く、それだけ強くその方法の確立が望まれていたということの意味しているのであろう。もちろん、蛍光 Ca 指示薬の開発がこの方法の発達の大きな要因には違いないが、最近10年間はコンピュータ技術の著しい発達の時期でもあり、それを十分に活用した測定技術が格段に進歩したことが普及を促進した大きな要因の一つに挙げられる。特に細胞内 Ca 濃度の変動の部位差や時間経過の画像処理による測定結果はまさに、“Seeing is believing”であり、その説得力は数値の羅列やグラフなどとは比べものにもならないものである。必要性が認められるにつれて、新しい試薬の開発や測定装置の開発にも拍車がかかり、ますます使いやすく、しかも入手しやすくもなっている。測定の原理や装置の実際についてはこのシリーズのこれまでの解説で詳しく述べられているので、この稿では、これから画像処理による Ca 測定を手掛けようとする研究者が実際に測定し始めた時に陥り易い問題点とその解決策を中心に解説させていただくことにする。

II. 蛍光 Ca 指示薬の選択

現在の Ca 測定基盤を築いたのは蛍光 Ca 指示薬である。これらの指示薬の性質については本シリーズで詳しく述べられているのでそれら

を参考にして頂きたい。この試薬を用いる測定法が急速に広まった理由の一つは、これらをエステル化することによって細胞の中に容易に導入出来るようにしたことにある。細胞内に入ると、そこに存在するエステラーゼで分解されて、もとのキレート剤の形に戻る。こうなると細胞膜を通過できないので細胞内に長時間に留まって指示薬として利用できるという仕組みである。しかし、現在では様々な要求に対応するために多様な試薬が合成され市販されており、必ずしも細胞膜透過型のみが求められるわけではない。表 I にまとめたようにその種類も数も多い。現在では測定する標本や用いる装置の特性にあわせて様々な選択ができる。

細胞膜を透過しやすくするために分子設計されたこと、すなわち、蛍光を発する部分が脂溶性であることがいくつもの問題点を含んでいた。その内の一つは、Ca キレート部分にエステル結合させた脂溶性アルコール部分がエステラーゼで分解されて、カルボキシル基がイオン化した状態になった指示薬は細胞外には出ないだろうと思っていたのが、意外にも再び洩れ出してしまうのである。神経細胞では、測定時間が短いこともあって、それほど大きな問題とはされていなかったが、平滑筋研究者達からは比較的早期に指摘されていた。蛍光に関わる部分構造の脂溶性が高く、キレート部位の陰性荷電も細胞膜の透過には期待したほどには完全なブロックにはならなかったためと考えられる。また、同様な性質が原因で負荷された色素が細胞内で不均一に分布すること（色素の細胞内分画化）もこの種の試薬の避けられない欠点と考えられてきた。こうした問題点を解決するための試薬が Fura-PE3/AM (Texas Fluorescence

表 I

細胞内透過性色素 (acetoxymethylester 型) ¹⁾							
	試 薬	低 Ca 濃度		高 Ca 濃度		Kd	
		Excit.	Emit.	Excit.	Emit.		
短波長励起型							
低濃度Ca対応型	quin-2	352	492	332	492	126 nM	(EX ratiometric)
	FURA-PE3 ²⁾	370	500	340	500	200 nM	(EX ratiometric)
	fura-2	362	512	335	505	224 nM	(EX ratiometric)
	indo-1	346	475	330	408	250 nM	(EM ratiometric)
高濃度Ca対応型	mag-fura-5 ³⁾	370	511	330	500	6.5 μM	(EX ratiometric)
	mag-indo-1 ³⁾	349	476	330	417	9 μM	(EM ratiometric)
長波長励起型							
低濃度Ca対応型	Fura-Red ⁴⁾	472	645	436	640	133 nM	
	Calcium Green 1	506	534	506	533	189 nM	
	Calcium Crimson	588	611	588	611	205 nM	
	fluo-3	506	526	506	526	316 nM	
	Calcium Orange	554	575	555	576	328 nM	
	Calcium Green 2	506	531	506	531	547 nM	
高濃度Ca対応型	rhod-2	556	578	553	576	1 μM	
	Calcium Green 5N	506	531	506	531	3 μM	
	Magnesium Green ³⁾	506	532	506	532	4.8 μM	
	BTC	480	500	400	500	7 μM	(EX ratiometric)

1) AM型（遊離イオン型も入手できる）。2)漏出が少なく、均一分散する。
 3)本来はMg検出試薬であるが、Caにも低い親和性があることを利用する。
 4)Ca増大に伴い蛍光が減少する。

細胞内非透過性色素（遊離イオン型）							
	試 薬	低 Ca 濃度		高 Ca 濃度		Kd	
		Excit.	Emit.	Excit.	Emit.		
均一分散型 ⁵⁾							
短波長励起型	fura dextran 10,000	376	501	341	495	346 nM	(EX ratiometric)
	fura dextran 70,000	365	502	341	496	436 nM	(EX ratiometric)
	indo dextran 10,000	356	466	341	408	251 nM	(EM ratiometric)
	inod dextran 70,000	361	464	342	408	363 nM	(EM ratiometric)
膜直下計測型	fura-C18	360	500	340	500	200 nM	(EX ratiometric)
	Calcium Green C18	500	530	500	530	200 nM	

5)直接細胞内に注入する必要がある。

Labs, 和光純薬から入手できる) である。この試薬の蛍光指示薬としての使い方や性質は fura-2 とほとんど同じであるが、蛍光分子内にピペリジンを導入し陽性チャージを持たせることによって、エステラーゼ分解後の膜透過性を低下させる工夫がなされている。T-細胞や平滑筋において確かに有効なことが確かめられているし、我々も神経細胞において確かに fura-2 に比べて格段の残存率であることを確かめている。さらに、細胞内での均一な分布が長時間保たれることも確かめられており、現在入手できる試薬の中では最も理想的な試薬といえる。この試薬より先に細胞内分画化を防止する目的で開発されたのが、デキストランを結合させた蛍光指示薬である。しかし、この場合はエステル化して負荷するということができないので、使いやすさの点では残念ながら劣ることになる(表I)。

初期の指示薬はいずれも紫外線領域で励起されるものであった。そのために、測定装置の設計や測定条件にはレンズの材質や測定用チャンバーの選択、励起光の強さ、照射時間の短縮など配慮が必要であった。さらに、360 nm 前後の励起波長で NADH や NADPH の蛍光がかなり大きくかぶってくる。これは特に、脳のスライス標本や平滑筋組織標本を使ったときには無視できない。さらに、最近、急速に利用されるようになってきた共焦点レーザー顕微鏡においては、標準励起はアルゴンイオンレーザーの 488 nm であり、最も一般的に使われている fura-2 は利用できない。短波長レーザーを使った装置も使われているが、高価で一般性がない。こんな事情から、488 nm 付近で励起される蛍光指示薬が開発されている(表I)。もちろんこれらにも問題はあつた。何より重要な問題点は、先にも述べた分画化である。染色後約1時間後には、細胞膜や核膜に集まってくる。この性質は上述の FURA-PE3 以外の試薬にはどれにも見られる性質であるが、特に fluo-3 にその傾向が強い。可視光励起型の指示薬の多くは、fura-2 に見られるような Ca 濃度に依存した励

起波長の移動がなく、二波長測定により、絶対量を予測することができない。しかし、最近、長波長励起でしかも Ca 濃度に応じた波長シフトのある試薬が開発された。BTC と呼ばれる試薬である。この試薬は表に示すように Kd が大きく、従って高濃度の Ca の変動の測定に有利である。最近は生理現象に伴う細胞内 Ca 濃度の変化幅がこれまでに考えられていたよりはるかに高いらしいとする報告もあり、この種の試薬はこれから重要性を増すかも知れない。また、Fura-Red と Calcium Green 1 を併用することによって、Indo-1 と同様な Ratiometry もできる。

Ⅲ. 細胞膜透過性蛍光 Ca 指示薬を用いた細胞内 Ca イオン濃度の画像処理による測定:

Ⅲ-1. 励起装置の工夫

画像処理による細胞内 Ca 濃度の測定に必要な機器類の説明はこれまでの本シリーズの解説で十分である。ここでは測定する際に最も苦勞する励起光の均一性に関する若干の改良法について述べる。

通常の蛍光顕微鏡の光源としては水銀ランプが装着されている。もちろん、これも使えないことはない、しかし、波長によって大きなエネルギー差があるので、二波長励起の際には一方の励起光を neutral density filter で抑え込まなければならない。計測用には比較的エネルギーの均一なキセノンランプの方がよい。もちろんこの場合も二波長励起の場合は両方の励起強度をなるべく同じレベルに合わせる必要があるが、水銀に比べてはるかに容易である。目的の励起波長を得る方法についてもこれまでの解説で述べられているように、干渉フィルターを用いる方法と分光器を用いる方法がある。前者は波長が固定されるので、必要な波長のフィルターをそれぞれ用意する必要がある点で面倒であるが、比較的強い励起光を得ることができるので、75 W 程度の光源で十分である。また、この場合の二波長励起を行う場合はフィルター

を交互に切り替えるための装置が必要である。円盤またはスライド式のフィルターホルダーに必要な干渉フィルターをのせて、コンピュータドライブの切り替え装置で駆動する場合（浜松ホトニクス、フルサワ・ラボ・アプライアンスなど）と光源を二光路に分けて、それぞれの光路に干渉フィルターをおきシャッターを使って切り換える場合（オリンパス、OSP-EXA）がある。どちらも、非常に使いやすく十分に満足の行くものである。

分光器を用いた装置（日本分光、CAM 230）は300～700までの任意の波長の励起光をダイヤル操作で作ることができるので、様々な色素に自由に対応できる利点がある。若干光源を明るくする必要があるので、150 W のキセノンランプを用いている。しかし、干渉フィルター方式に比べてかなり高価になる点が問題になる。

励起光を顕微鏡に導入する方法として、従来型の蛍光顕微鏡用の集光レンズによる光ガイドを用いる方法と光ファイバーを用いる方法がある。前者は最も一般的であるが、しばしば光むらに悩まされることになる。特に対物レンズの倍率が $\times 10$ といった低倍率の場合にはその傾向が強い。キセノンランプの輝点の部分を十分に画像全体に散らすことがなかなか難しく、中央部分がやたらに明るくなってしまふ。ビデオカメラと画像処理システムのダイナミックレンジが十分に大きく、最も暗いところと明るいところが十分にその範囲の中に入っている場合は、画像処理によって光むらをカバーすることも可能であるが、多くの場合、光むらの結果生ずる画像が計測画像の上に被って来る。倍率が高くなるとこの危険は小さくなるが、それでも励起光はなるべく均一にするように努力する必要がある。光むらをなくす最も効果的な方法が光ファイバーによる光の導入である。そのうち一つは光ファイバー束を使う方法である。日本分光の CAM 230 やオリンパスの OSP-3 の光源では細い石英ファイバーを多数束にした光ファイバーを用いている。前者では光ファイ

バーに導入される前に二波長分割して、分光器で作られた目的の波長がファイバーの起始部に集光される。後者では、二カ所に設置された干渉フィルターで作られた励起光が二本の光ファイバーで導出され、二本の光ファイバーは顕微鏡に導入される前に一本にまとめてられている。光の切り替えはどちらかをシャッターで閉じることによって行う。どちらの場合も光源の輝点が多数の光ファイバーに分散される形になるので、非常に均一な励起光を取り出すことができる。欠点と言えば石英光ファイバーが高価なことである。この欠点を解消する可能性のあるのが液体光ファイバー（フルサワ・ラボ・アプライアンス）である。液体では短波長が吸収されてしまうのではないかと思ったが意外にも340 nm もよく通る。値段は5分の1程度であり、使い方によってなかなか有効であることを確かめている。

同じ光ファイバーでも単線の光ファイバーを使う方法もある。この場合はフィルターや分光器を通した光を1 mm 程度の細い単線光ファイバーの起始部に集光し、これを顕微鏡に導入するが、直線的に結び付けたのでは通常集光装置と変わりがない、ところがこの光ファイバーを途中で一回転させてから導入するとみごとにむらがなくなる。「クオーツスクランブラー」と呼ばれている装置であり、アメリカの一部の研究者が利用している。我々の研究室でも利用しているが、非常に有効である。液体光ファイバーも直線的に導入するより、 90° 以上曲げる方が均一な励起ができる。

こうして、均一かそれに近い励起により、均一な蛍光が得られれば、画像処理装置による解析は非常に容易である。

III-2. 染色時の注意

培養細胞などのように細胞の表面が直接外光にふれるような場合は比較的低濃度（ $5 \mu\text{M}$ 程度）で十分染色できる。色素の負荷量は必要最小限がよいとされているが、どこが必要最小かを定めるのがなかなか難しい。色素の負荷が不十分であると、自家蛍光を検出したり、ノイズ

の多い画像しか得られない。どのくらいがよいかは実験的に試行錯誤で判定するしかない。我々の経験では $5 \mu\text{M}$ 程度の染色で満足の行く結果が得られている。

染まらない場合の原因の一つとして、細胞外にエステラーゼが存在していることが考えられる。培養液をよく洗い流してから、染色液を適用するとよく染まることもある。もし、それでもうまく行かないときは色素適用時に外気温を室温かそれ以下に下げて、約30分ぐらい後に37度上昇させてさらに30分間インキュベートするとうまく染まることもある。細胞の性質によっていろいろな工夫が必要である。

我々は海馬や小脳のスライスを蛍光 Ca 指示薬で染色している。この種の組織の染色には、さらに高濃度の色素を使う必要がある。しかし、fura-2 などの蛍光色素はすべて脂溶性が高く、高濃度の希釈液を安定な状態に保つのは難しい。Molecular Probe 社から fura-2/AM を買うと、Pluronic F 127 という界面活性剤をおまけに付けてくれた。これを DMSO にとかして溶解補助剤として使うように指示しているが、これで行った試しがない。現在は Cremophore EL (Sigma) という溶解補助剤を用いて非常に良い結果を得ている。これは我が国の平滑筋研究者達が早くから導入していた方法であるが、 $10 \mu\text{M}$ 液どころか $100 \mu\text{M}$ 液でも容易に調整できる。スライス標本の染色には $10 \mu\text{M}$ 液に酸素を通気しながら室温で40~60分間ほど置き、その後、十分な量の栄養液に1時間以上おいた後に測定することになっている。この補助剤も界面活性剤であり、酸素の通気時に泡が生ずる。スライスを入れた器に直接通気すると、泡とともにスライスが押し出されてしまうことがある。これを避けるには、スライスをステンレスの金網か、ナイロン網で作った小さな器に入れてから色素液に浸し、その外側に通気する方法をとるとよい。

スライス標本における Ca 濃度の測定には、fura-2 もよいが、rhod-2 が非常に有効である。しかし、fluo-3 は使うべきではない。我々の経

験では fluo-3 はスライス表面の死んだ細胞に結合してしまうためか、細胞外 Ca 濃度を測定してしまう。蛍光発色部分の脂溶性の程度の差によるものと考えられるが、これは rhod-2 には見られない。

III-3. 多点同時計測法

染色ができたら計測である。単純に画像処理による計測といってもいろいろな方法がある。そのうちの一つで、我々が初期に開発した方法、多点同時計測法をここに紹介する。

中枢神経系のような不均一系を実験対象する場合。例えば、海馬の初代培養細胞の場合、グリア細胞も含めて、6種類以上の細胞がある。形態も異なるし、生理学的性質も多様である。従って、個々の細胞における反応を個別に検討する必要がある。我々が最初に開発した蛍光顕微鏡画像の画像処理による細胞内 Ca 濃度計測法は、実時間で画面上に映し出された多数の細胞やスライス標本のいろいろな部位の細胞内 Ca 濃度の変動を同時に計測したいという要求の中から生まれたものである。しかし、残念ながら、当時のコンピュータでは画面全体の画像処理には時間がかかりすぎる。そこで、画像の数画素に限定し、その部位の光の強度をデジタル化してコンピュータで逐次解析する方法をとった。当時のパーソナルコンピュータでは 5×5 画素を0.3秒毎に計測する場合は最大でも8点しか同時解析できなかったが、最近のパーソナルコンピュータを用いると、40点以上を楽に計測できる。この種の測定方法が可能な市販の機種は一機種しかない（フルサワ・ラボ・アプライアンス、FC-500）。この方法を使えば計測後統計計算が容易に出来るなど、生理学や薬理学の研究には非常に有用であることは初代培養細胞や脳組織スライス標本における研究で実証されている¹⁻³⁾。画像をビデオ録画しておけば、先に測定できなかった点をビデオを再生することによって、さらに測定できる。これまでの研究方法とは比較にならないほどの能率である。それだけではない。我々が「タイムマシン測定法」と呼んでいる方法では録画できること

を利用して、免疫染色により素性を特定した細胞の反応を測定することができる⁴⁾。この方法によって特定のグリア細胞やニューロンと同定された細胞についての反応を選択的に測定することが容易にできる⁵⁾。図1に示す例では、海馬の初代培養細胞を fura-2 で染色し、NMDA (イオンチャンネル活性化) とキスカル酸 (AMPA 受容体とGタンパク質連動) を与えたときに、グリアのマーカー蛋白質、GFAP に対する抗体に陽性の細胞 (グリア細胞) と陰性の細胞 (おそらくニューロン) がそれぞれどのように反応するかを検討したものである。

Ⅲ-4. 二次元画像処理による反応部位の検出

画像処理による細胞内 Ca 濃度の計測といえば二次元分布計測が一般的である。その方法の詳細についてはこれまでの解説に述べられているのでここでは説明を割愛させていただく。作用薬投与前の Ca 濃度の二次元分布画像と適用後の分布画像を比較すると、反応した細胞だけが、カラーコード上で暖色系に変化して浮かび上がってくる。よく洗浄してから、別の作用薬を適用すれば同じ画面上で別の作用薬に対する受容体の分布部位を検出することができる。これを利用して例えば NMDA と t-ACPD では反応している細胞が大きく異なることを検出できる。このように細胞内 Ca 濃度の変化を指標として機能的受容体の発現を検出することもできる。もちろん細胞内 Ca 濃度上昇に関連する受容体という制限はつくものの、アイソトープを用いた結合実験に比べて、結果が早く、生細胞で、しかも繰り返し「機能的」受容体の存在を示すことができるという点ではるかに優れている。

我々は中枢組織のスライス標本における細胞内 Ca 濃度の分布と変化の時間経過を測定している。中枢組織スライスを Ca 指示薬で染色するのはそれほど容易なことではないが、先に述べたように安定な Ca 指示薬の溶液を調製すれば十分可能である⁶⁾。我々は、海馬を強く電気刺激したときにどの部位に Ca 濃度の変動が生ずるのか、グルタミン酸受容体サブタイプに特

異的な作用薬を作用させたときにどの部位が反応するか、また虚血状態にしたときどの部分の細胞が影響を受けやすいのかなどを見るためにスライス標本全体の画像を得たいと考えた。しかし、ここで、一つ問題が生ずる。培養細胞での蛍光測光をする蛍光顕微鏡画像処理装置を使うとすれば、低倍率の蛍光用レンズが必要である。もともと、蛍光顕微鏡は拡大された細胞の像を観察するために設計されている。そのため、低倍率 (例えば4倍) の蛍光用レンズは発売されていない。この問題は次のような方法で解決することが出来た。励起光を直接サンプルに与え、生じた蛍光 (可視光) を通常の4倍の対物レンズで捕らえるというものである。励起光を直径 8 mm の石英光ファイバーを使って導き、45° の角度で斜め下方からサンプルに与えると、極めて均一に励起することができる (図2)。もちろん二波長で測定することもできる。図3はこの方法により、CA3 部位をテタヌス刺激した時に海馬のどの部位の Ca がどの程度上昇するかを検討したものである。この例では、CA1 の細胞体層の直下の層に約3分間持続する Ca の上昇が見られた。うまく用いれば特定の受容体の存在を画像として示すこともできる⁷⁾。この方法はさらに海馬のスライス培養標本における細胞内 Ca 測定にも利用され、スライス標本で得られた結果を確かめることができた⁸⁾。

Ⅳ. 蛍光 Ca 指示薬を直接細胞内に注入する方法

さきに述べた蛍光 Ca 指示薬のエステル誘導体を用いる方法は、不特定多数の細胞を一気に染色してしまう方法として有効である。しかし、その一方で、多種の細胞が混在しているような中枢組織のスライス標本では、そこで反応が生じたとしても、それがニューロンで生じているのか、グリアで生じているのかを明らかにすることができない。こうした組織の中の特定の細胞だけに指示薬を注入することができれば、全体の組織としての活動に関与している代表細胞

の中での細胞内 Ca 濃度の変動を測定することができる。この方法はむしろ、細胞内に容易に負荷する事が出来る試薬としての利点を使わないで、微小電極やパッチ電極の先端にエステル化しない色素をつめておいて、ねらった細胞内に直接キレータを注入するのである。我々の経験でも注入された蛍光 Ca 指示薬, fura-2 や rhod-2 の遊離型の注入後の拡散はかなり早く、細胞全域に拡散して行く⁹⁾。この方法は最初に小脳スライスにおけるプルキンエ細胞に適用された¹⁰⁾。この細胞には特徴的な樹状突起があるが、入力線維の刺激によって、細胞内の Ca が上昇する様が見事にとらえられている。当時の画像の時間分解能はビデオレートによるものであったが、最近では冷却 CCD (Photometrics, CC-200 など) をもちいて、画像を捉え、空間分解能を犠牲にして、時間分解能を高めることによって、10 msec/画像の速度での解析が可能になっている。図 4 はホールセルパッチで fura-2 を注入した小脳プルキンエ細胞にこの方法を適用し、脱分極刺激を与えたときの、細胞内 Ca 上昇の部位差を検討したものである。この方法によって、シナプスを介した刺激後のプルキンエ細胞での Ca の上昇が主として Ca^{2+} 依存性活動電位の発生を伴うものであることが示されている¹¹⁾。さらに、海馬ニューロンにも同じ方法が適用され、長期増強現象を生じさせるためのテタヌス刺激が海馬錐体細胞のシナプス層にきわめて一過性の Ca の上昇を生じさせるに留まると報告されている^{12,13)}。しかし、この場合、シナプス部位にあたる位置の画像はスライス内に埋もれているためにぼけており、ニューロン全体としての画像にはなっていないが、シナプス部位の特定ができるほどではないという。それに対して、同様な方法で細胞内に fura-2 を注入し、錐体細胞の樹状突起の部分を拡大して、スパインの部分に焦点を絞って、電気刺激を与えると、確かに、樹状突起の部分の Ca の上昇は数十秒しか持続しないが、スパインの部分の Ca は数分間にわたって上昇していることが認められている¹⁴⁾。この

ように、どんな現象を解析するかによって、測定装置やその利用法を選択する必要がある。Ca がそれだけ多面的ダイナミクスを持っていることの良い証拠かも知れない。

V. お わ り に

以上、細胞内 Ca 濃度の画像解析による測定法についての問題点とその解決法を中心として概説した。現在では、細胞のダイナミックな活動を論議する場合には細胞内 Ca の変動との関係を検討することが必須となってきている。特に、Ca 濃度の変化を蛍光強度の変化に置き換え、これを画像化する事が可能になったことが、データの説得力を増しているように思える。我々が10年前に最初に手掛けた画像処理装置では一画像の解析するのに30分以上が必要であったが、今では同一画像を3秒程度で解析できる。コンピュータの発展はまだ留まるところがないし、周辺ハードウェアの進歩も著しいので、装置だけについての記述はすぐに陳腐なものになってしまうであろう。我々は画像と言え、ビデオカメラと思い込み、画像での時間分解能はビデオレートを越えることはできないと思いこんでいたが、ここに述べた冷却 CCD カメラをうまく使って、msec オーダーの画像解析をする方法やさらにホトダイオードアレーによる光計測装置 (浜松ホトニクス, Argus 50/PDA) や新しく開発された高密度のホトダイオードマトリックス (Deltaron, 富士フィルム) を使えば、電位感受性色素で染色された神経組織の興奮が msec 以下の時間分解能で画像化できる。我々はこれらこの方法の Ca 濃度測定への応用を試みているが、時間分解能を高めることはこれまでは思いもよらなかった生理学的側面を捉える可能性を秘めている。最近、共焦点レーザー顕微鏡も使いやすくまたビデオレートでの計測も可能になっており、画像処理のレベルは文字通り日進月歩で進んできている。蛍光プローブを用いた生物現象の計測は Ca のみにはとどまらない。既に報告されているように cAMP や活性化カルモデュリンの画像化にも応用でき

る^{15,16)}。我々も、蛍光プローブによるリン酸化過程の画像化を試み、すでにそのプロトタイプの開発に成功している¹⁷⁾。今後、生理学者、薬理学者、有機化学者、コンピュータ関連研究者の共同研究によりさらに発展させれば、生物科学研究の様相は一変するはずである。これは夢ではなく、21世紀を待たず実現するものと確信している。

参考文献

- 1) Ogura, A., Akita, K. and Kudo, Y.: Non-NMDA receptor mediates cytoplasmic Ca^{2+} elevation in cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* **9**, 103-113(1990)
- 2) Kudo, Y., Ito, E. and Ogura, A.: Topographical heterogeneity of glutamate agonist-induced calcium increase in hippocampus. *Adv. Exptl. Med. Biol.* **268**, 125-133(1990)
- 3) Ogura, A., Nakazawa, M. and Kudo, Y.: Further evidence for calcium permeability of non-NMDA receptor channels in hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* **12**, 606 - 616(1992)
- 4) 工藤佳久, 小倉明彦: 神経細胞の細胞内カルシウム測定法—タイムマシン測定法?—, *Clinical Calcium*, **2**, 82-84(1992)
- 5) Barry, de J., Ogura, A. and Kudo, Y. Ca^{2+} mobilization in cultured rat cerebellar cells: Astrocytes are activated by t-ACPD. *Europ. J. Neurosci.* **3**, 1146-1154(1991)
- 6) Kudo, Y., Ito, E. and Ogura, A.: Heterogeneous distribution of glutamate receptor subtypes in hippocampus as revealed by calcium fluorometry. *Adv. Exptl. Med. Biol.* **287**, 431-440(1991)
- 7) Kudo, Y., Nakamura, T. and Ito, E.: 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(1991)
- 8) Kudo, Y., Takita, M., Nakamura, K., Sugaya, K. and Ogura, A.: Heterogeneous distribution of functional glutamate receptor subtypes in organotypic slice culture of rat hippocampus revealed by calcium fluorometry. *Bioimage* **1**, 159-166(1993)
- 9) Takagi, H., Takimizu, H., Barry, J. de, Kudo, Y. and Yoshioka, T. The expression of presynaptic t-ACPD receptor in rat cerebellum. *Biochem Biophys. Res. Comm.* **189**, 1287-1295(1992)
- 10) Tank, D. W., Sugimori, M., Connor, J. A. and Llinas, R. R.: Spatially resolved calcium dynamics of mammalian Purkinje cells in cerebellar slice. *Science* **242**, 773-777(1988)
- 11) Miyakawa, H., Lev-Ram, V., Lasser-Ross, N. and Ross, W. N.: Calcium transient evoked by climbing fiber and parallel fiber synaptic inputs in guinea pig cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci.* **68**, 1178-1189(1992)
- 12) Miyakawa, H., Ross, W. N., Jaffe, N., Callaway, J. C., Lasser-Ross, N., Lisman, J. E. and Johnston, D.: Synaptically activated increases in Ca^{2+} concentration in hippocampal CA1 pyramidal cells are primarily due to voltage-gated Ca^{2+} channels. *Neuron* **9**, 1163-1173(1992)
- 13) Regehr, W. G. and Tank, D. W.: Calcium concentration dynamics produced by synaptic activation of CA1 hippocampal pyramidal cells. *J. Neurosci.* **12**, 4202-4223(1992)
- 14) Muller, W. and Connor, J. A.: Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca^{2+} responses. *Nature* **354**, 73-76(1991)
- 15) Bacskai, B. J., Hochner, B., Mahaut-Smith, M., Adams, S. R., Kaang, B-K., Kandel, E. R. and Tsien, R. Y.: Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons. *Science* **260**, 222-226(1992)
- 16) Hahn, K., DeBiaso, R. and Taylor, D. L.: Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells. *Nature*, **359**, 736-738(1992)
- 17) Kudo, Y., Omori, A., Sato, K. and Higashi, H. Fluoroprobe labelled syntide 2 as an indicator for dynamics of calcium-calmodulin dependent protein kinase II in neuronal cells. Abstracts for 4th IBRO world congress of neuroscience, p 139 (1995)

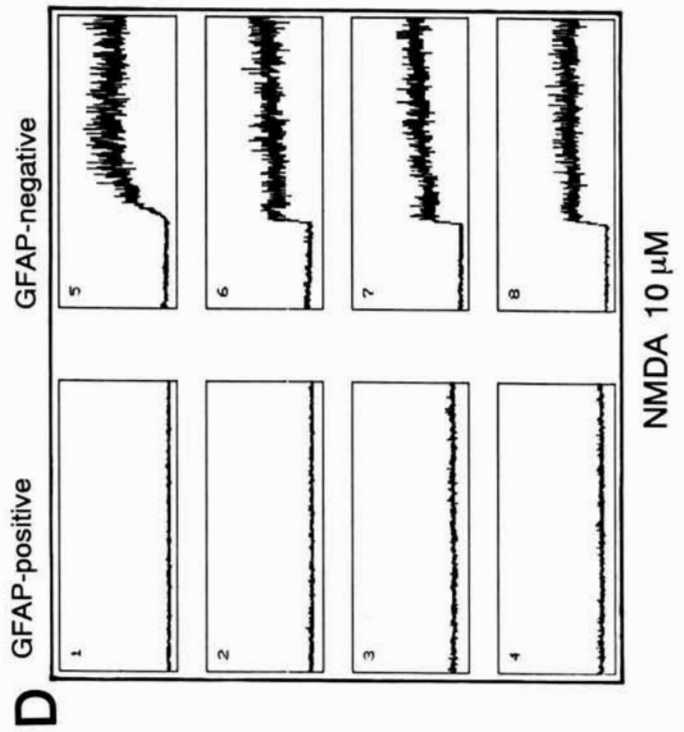
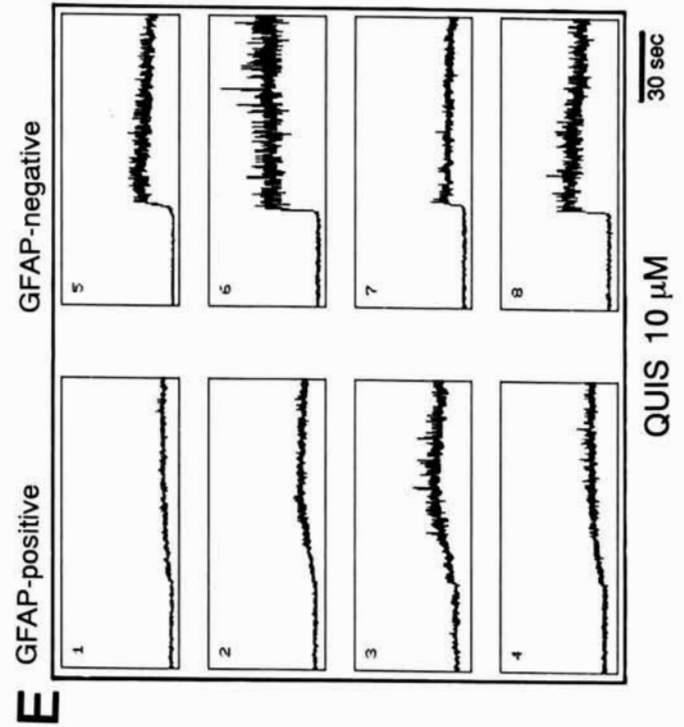
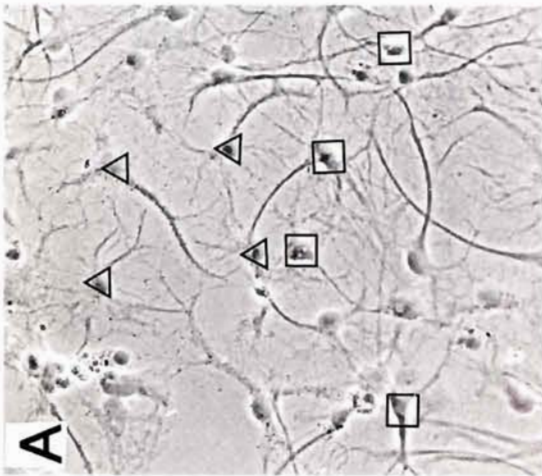
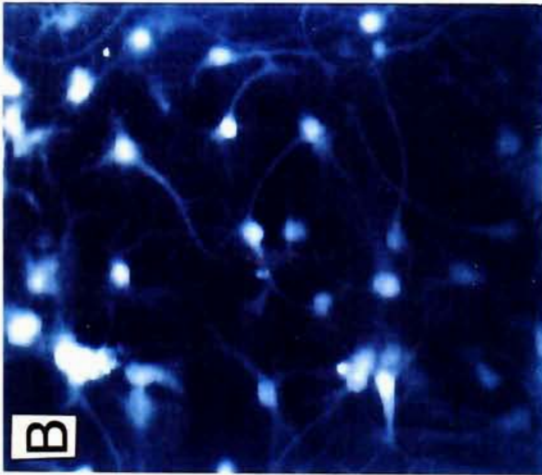
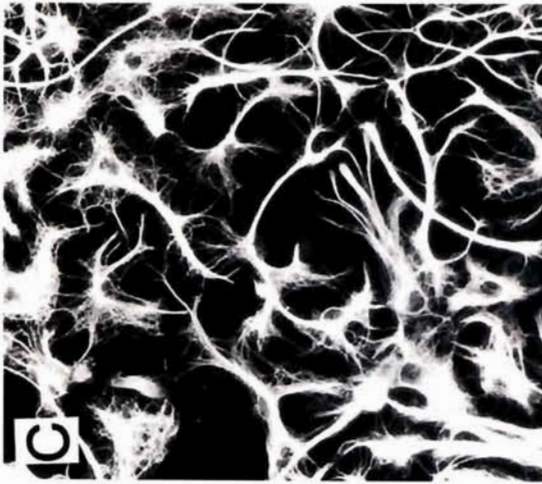
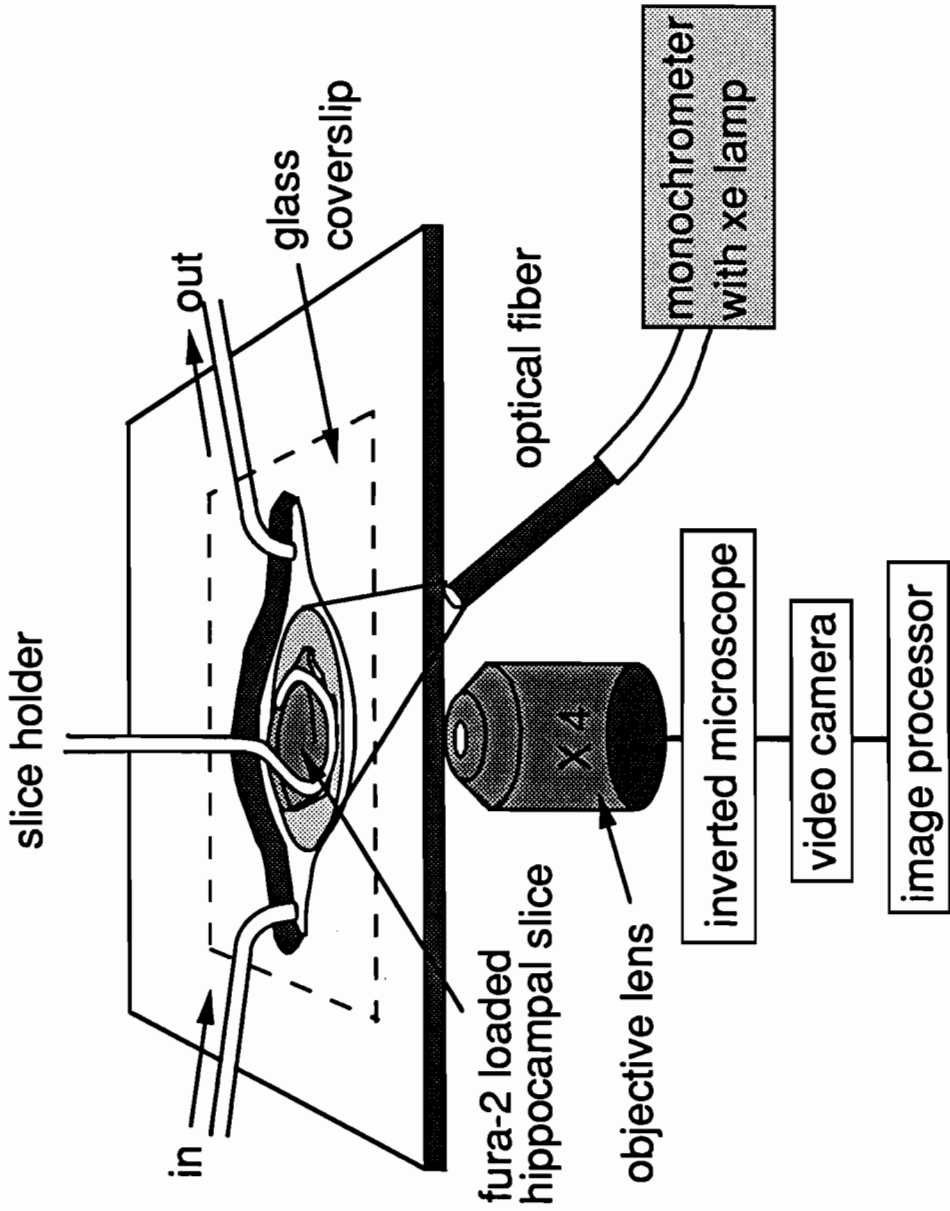
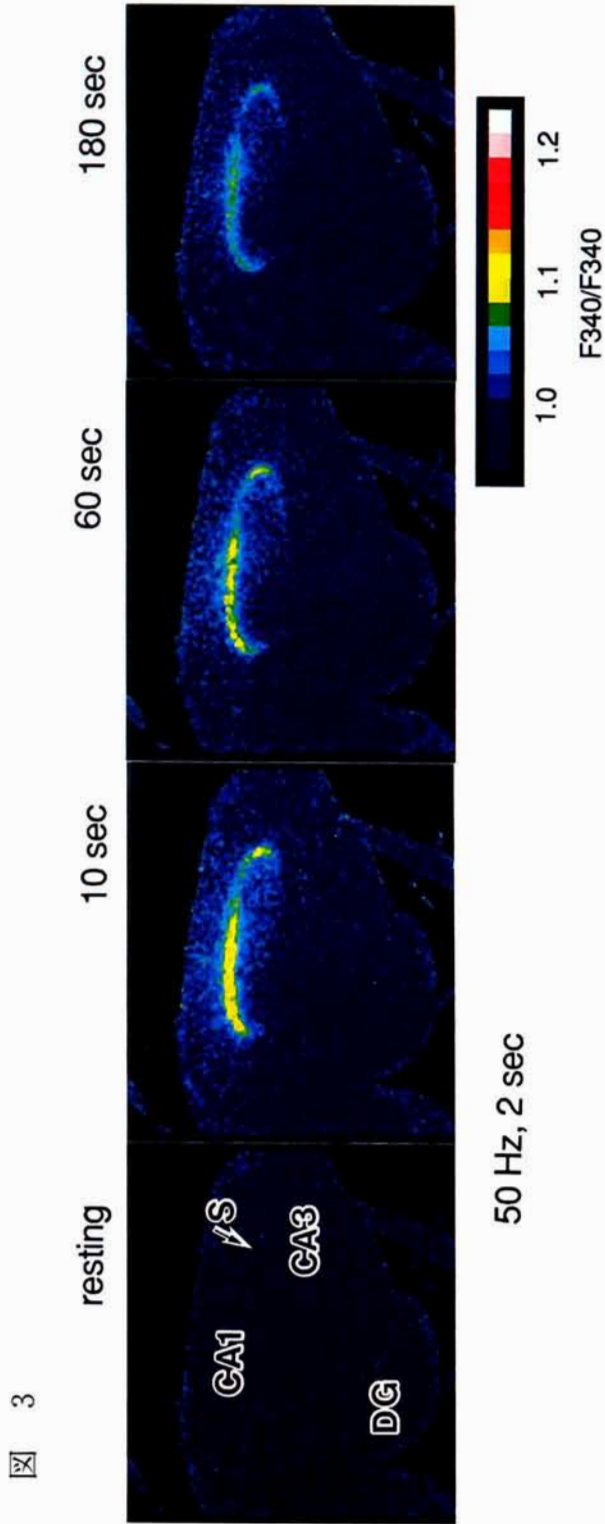


図 2





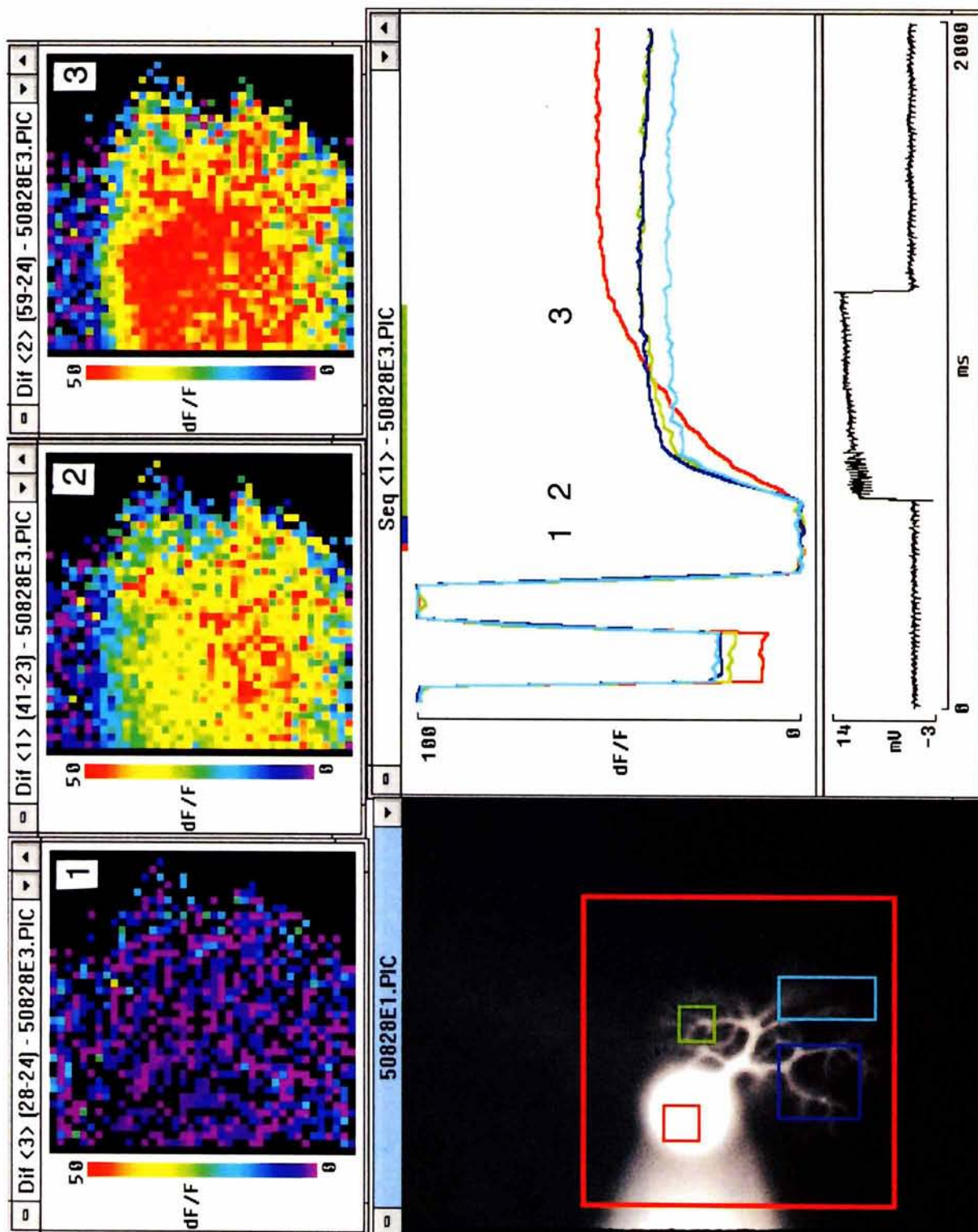


図 の 説 明

図1 免疫細胞化学的に同定された細胞における細胞内 Ca 測定の場合。

A : 位相差顕微鏡で捉えた培養細胞。 B : A の細胞に fura-2 を負荷したときの蛍光顕微鏡像、これについて画像処理、多点計測を行う。この間に同時に、ビデオテープで記録しておく。 C : 実験終了後、GFAP 抗体を用いて、グリア細胞を検出した。ビデオテープを再生し、グリア（三角でマーク）とグリアでない（ニューロンと思われる）細胞（四角でマーク）の蛍光の変動を解析する。 D : NMDA を投与した結果、GFAP 抗体に陰性の細胞のみが反応している。 E : キスカル酸はニューロンに分布する AMPA 受容体とグリアに分布する G-タンパク連動の受容体の両方を刺激している。

図2 低倍率の対物レンズ（×4）を用いて、スライスなどのマクロな Ca 濃度の変動の解析をする場合の装置。

図3 fura-2 で染色したラットの海馬のスライスを図2の装置で画像処理し、CA3 にテタヌス刺激を与えた時の反応部位を検討した結果。

この結果からでは、上昇している Ca がニューロン由来かグリア由来かは特定できない。

図4 冷却 CCD によるラット小脳プルキンエ細胞内 Ca 濃度の高速画像解析。

プルキンエ細胞にホールセルパッチにより fura-2 を注入し（左下図）、脱分極刺激を与えたときのプルキンエ細胞各部位における Ca 濃度変動を解析した。細胞体部分には脱分極に応じた Ca 濃度の上昇がみられ、樹状突起部分には脱分極刺激によって誘発される Ca スパイクに伴う早い Ca 濃度の上昇が見られる（右下図、フルスケール、2000 msec）。番号を記したそれぞれの時間での画像を上段図に示す（図は左下図の赤枠の範囲を画像処理したもの。空間分解能を低くしてある）。