

シリーズ「細胞内 Ca²⁺ イオン濃度の光学的測定法」

共焦点レーザー顕微鏡による細胞内 Ca²⁺ 濃度の測定

久場 健司

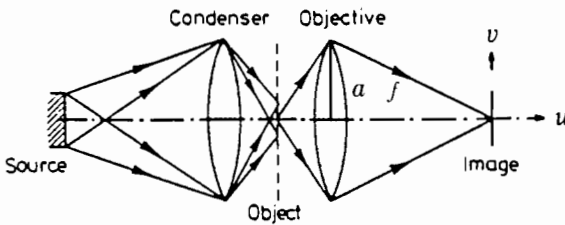
(佐賀医科大学生理学教室)

I. はじめに

細胞内2次メッセンジャーとして種々の細胞機能の仲介をする Ca²⁺ の作用機構を調べる場合に、細胞内遊離の Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) が、どこで、どの程度、どのような時間経過で変化するかを調べる必要がある。約10年前に、非常に優れた Ca²⁺ 蛍光指示薬が開発され、[Ca²⁺]_i の測定法が一般的となり、種々の刺激による [Ca²⁺]_i 上昇の機構や、上昇した [Ca²⁺]_i の処理機構が明らかになりつつある。しかしながら、未解明の重要な問題が残っており、また、新しい問題点が個々の細胞種で出現しており、今後も [Ca²⁺]_i 測定技術の応用範囲が広がるもの

と考えられる。[Ca²⁺]_i の蛍光測定法もこの講座シリーズで既に示されたように多様であり、[Ca²⁺]_i が関与する細胞機能の何を知ろうとするかにより、最適の方法の選択が必要となる。Ca²⁺ の作用が比較的緩やかに働くような細胞機構の場合(例えば、数10秒～数分の単位で作用するようなホルモンの作用)には、細胞質の平均化した [Ca²⁺]_i を記録する通常の落射蛍光法による光電子倍增管を使った [Ca²⁺]_i 測定や、テレビカメラを使った細胞質内の凡その Ca²⁺ の分布(光軸方向にかなり厚みを持った細胞質の [Ca²⁺]_i の分布)の測定で良い。しかしながら、Ca²⁺ の作用が数 msec～数10 msec の単位で起り、その作用部位が局在している場

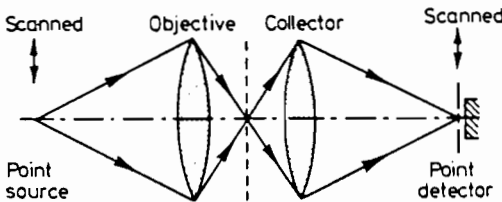
a) Conventional microscope



$$I(v) = \left(\frac{2J_1(v)}{v} \right)^2 \quad (1)$$

$$I(u, 0) = \left(\frac{\sin u/4}{u/4} \right)^2 \quad (2)$$

b) Confocal Scanning microscope



$$I(v) = \left(\frac{2J_1(v)}{v} \right)^4 \quad (3)$$

$$I(u, 0) = \left(\frac{\sin u/4}{u/4} \right)^4 \quad (4)$$

図1. 通常光学顕微鏡と共焦点走査型顕微鏡の原理の比較.

$I(v)$ は物体の光軸上の一点から出た光が結像点を中心とする領域に収束し、光軸に垂直な面での点像(光の強度)の分布を表す。 $v = (2\pi r \sin \alpha) / \lambda$ で“正規化された”光軸に垂直な面での光軸からの距離。 r は光軸に垂直な面での光軸からの距離、 $\sin \alpha$ は開口率(a/f)、 λ は波長。 $I(u, 0)$ は結像点を中心とする領域に収束した光の強度の光軸上での分布を表す。 $u = [8\pi z \sin^2(\alpha/2)] / \lambda$ で、“正規化された”光軸上での結像点からの距離。 z は結像点からの光軸方向の距離。(文献9の Fig. 1, 2 より改変)

合には、個々の作用部位での [Ca²⁺]_i 変化の局在とその速い時間経過の測定が必要になる。この為には、深さ方向の解像力の優れた組織切片の蛍光像を記録する必要がある。この目的にかなうのが、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Confocal laser scanning microscope: CLSM) である^{1,2,8,9)}。

II. なぜ CLSM が必要か：通常の落射蛍光法による [Ca²⁺]_i 局在測定上の問題点

通常の落射蛍光法では、試料を平行光で均等に照射し、蛍光物質を励起し、個々の点から発する蛍光をテレビカメラやフォトダイオードアレイにより2次元の蛍光強度分布として記録する(図1a)。従って、その解像度は、1点からの光を如何に受光面に絞って記録し、弁別できる2点間の距離を如何に小さく出来るかによる。しかしながら一点からの光のレンズによる集光により得られる像は、点にはならず、光の波としての特性によりレンズの特性と光の波長により決まる回折像となる⁶⁾。図2Aに、レーザー光が(リレイレンズを通して)対物レンズに後方から入り、前方の物点を中心とした領域に集るが、一点には集中しないことを示している⁴⁾。(これは、通常の顕微鏡で物を見る場合の光の方向と逆で、後述するようにレーザー光で試料中の蛍光物質を励起する場合を示しているが、本質的には同じことである。)光軸を含む面と光軸に対して垂直な面での対物レンズを通った光の強度は、物点を中心としてかなりの拡がりを持つことが解る。また、この中心になるラグビーボール型の0次の回折像の周辺に光の強度の弱い1次、2次の回折像が出現するが、これらはほとんど無視される。理論的には、この光軸に垂直な面での光強度分布は、光軸からの距離 *r* の関数である点像関数(I(*v*))：図1の(1式)で表される^{6,9)}。

ステージ面に平行な面での解像度は、焦点面での2つの点像の分布の重なりが、2つの山と明瞭に判別できる物体での2点間の最小距離で

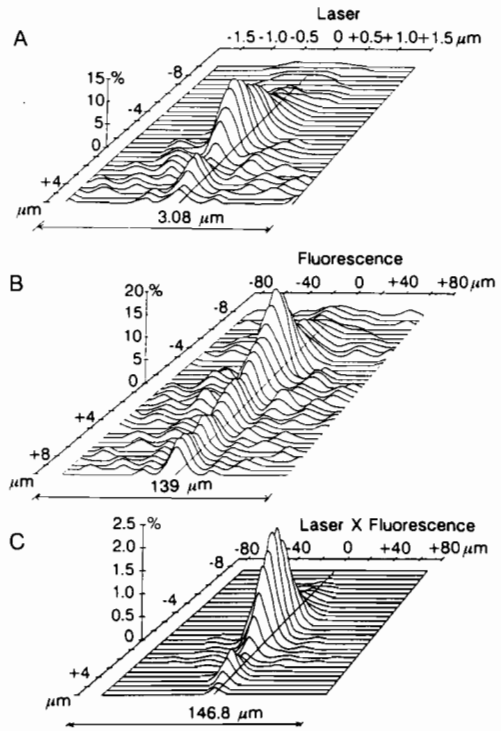


図2. CLSMによる結像のシュミレーション。

ニコンCF FLUOR 40×, N. A. 0.85による例。A. 対物レンズの焦点を中心とした光軸に平行な面でのレーザー光の強度分布。レーザー光(351 nm)は、図5に示す補正レンズ(e)とリレイレンズ(d)を通して対物レンズの結像点に収束させた後、対物レンズの前方の光軸上の物点を中心とした領域に収束させている。光軸方向(図中右傾斜の軸)と光軸に垂直な方向での光強度分布を示す。光の強度は理想的な光学系の最大値の%で示す。B. 光軸上の物点を含む異なる点から発する蛍光が、対物レンズを通して結像点を中心とした領域に収束する時の結像点(リレイレンズの焦点ともなる)に於ける光軸に垂直な面での蛍光強度分布。この強度分布を対物レンズの物空間の光軸上での光源の位置に対してプロットしてある。すなわち、基本的なCLSMでは、この結像点に、ピンホールが存在し、その光強度を測光することとなる。C. レーザー光の強度分布と蛍光の強度分布のたたみこみ積分の結果。すなわち、結像点の光軸に垂直な面でのレーザー光により励起された蛍光強度分布が、蛍光が励起される点の位置が変ることによりどう変わるかを示したもの。光軸からの距離(水平方向)を小さくすること、すなわち、ピンホールを絞ることにより、水平、及び垂直方向の分解能が上がることを解る。尚、水平方向の解像力は、光強度の分布の距離の単位を顕微鏡の倍率(45×：この場合、鏡筒長を210 mmとしている)で割った単位で表すことに注意。(文献4のFig. 2より改変。)

決まるが、その基準を山の半径(回折像の第1暗輪の半径)で表す(Rayleighの分解能)と、次のようになる。

$$\Delta x = 0.61 \lambda / \sin \alpha$$

このことから、顕微鏡の解像力は、対物レンズの開口率と光の波長により決まることになる。

一方、光軸方向の解像度は、光軸上での焦点から距離 Z での点像の光強度の分布 ($I_{(u,0)}$) : 図1の(2)式から推定される⁹⁾。図2Bは、結像点での光軸に垂直な面での光強度の分布が、物空間の光軸上での点光源の位置を物点を中心として変えた時に、どのように変化するかを示しており、光軸方向の光強度の拡がり非常に大きいことが解る⁴⁾。この例では、半値幅で $5 \mu\text{m}$ 以上ある。光軸方向の解像度は、ステージ面の上下動による一層の薄い平面の試料(例えば、 $1 \mu\text{m}$ 以下の径の蛍光ビーズを一層に広げたもの)の像の鮮明度の変化からある程度推定できるが、上述の理由と焦点面以外からの光が

重なるため非常に悪くなる。このような理由により、通常のテレビカメラを使用した落射蛍光法による球形の細胞の画像は、その細胞質の厚みが厚いほど強い蛍光となってでてくる(図3A)。更に、物体の像は、結像点での光軸に垂直な面での光強度の2次元の分布として記録するわけであるから、光軸方向に異なる位置にある2点間の光強度を同じ条件で記録することは不可能である。従って、通常の光学顕微鏡では、光軸方向の解像度はないに等しいと云ってよい。

III. CLSM の原理と性能

CLSM では、点光源としてのレーザーにより対物レンズを通して物体の一点を照射し、そこから発する光の強度を同一の光学系を通して、焦点面からの光をピンホールにより除外して記録し、レーザーの2次元走査による光強度の分布をコンピューターにより画像として再構成

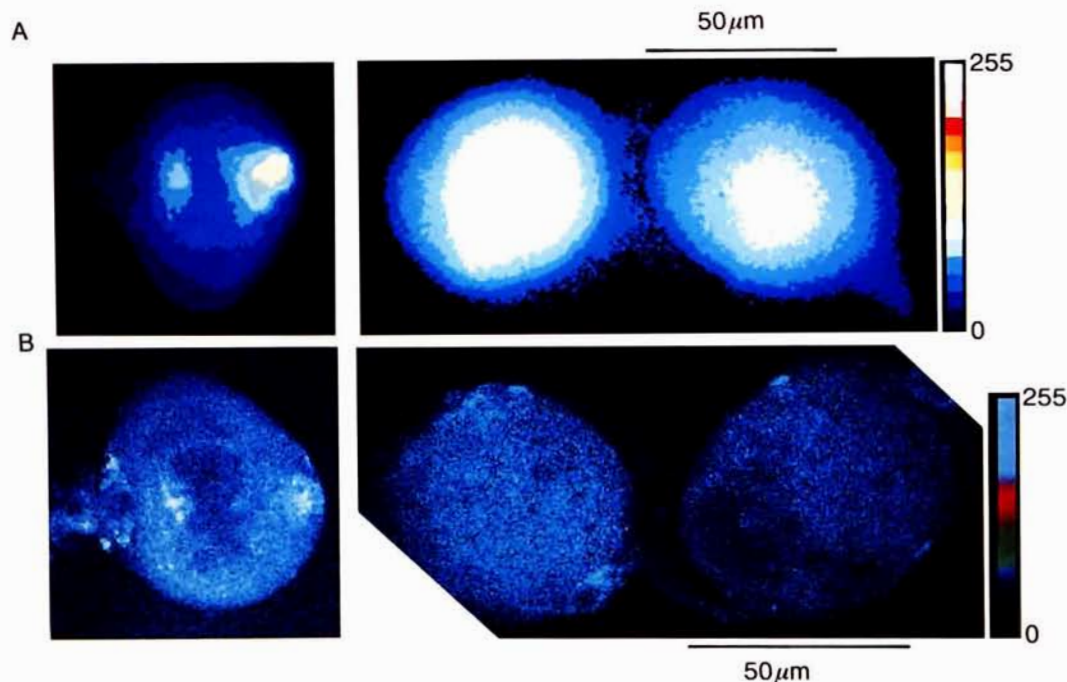


図3. 培養ウシガエル交感神経節細胞のテレビカメラ(A)による蛍光像と CLSM による蛍光像(B)。fluo-3/AM を神経節細胞に負荷し、同じ細胞を光路を切換えて SIT カメラ(A)と CLSM (B : 488 nm アルゴンレーザー)により記録し、蛍光強度を疑似カラーで表示。(文献3の Fig. 2 より)

し、更に焦点面のレベルを換えることにより3次元の構造が再現される。

図4にCLSMの基本原則を示し、図5に具体的CLSMの構成の一例を示す。点光源としてのレーザーにより、顕微鏡光学系を通して、試料の焦点面の一点を通して照射し、その一点からでた蛍光(又は反射光)を同じ光学系を通した後、ミラーにより光路分割した後に結像させる(図4)。この結像点の光強度を結像点に置いたピンホールで焦点面以外からの光を除外して、光電子増倍管で記録する。機種によっては、蛍光も対物レンズで結像させた後、リレイレンズ(d)で平行光とし、レーザー光と光路分割した後に、長い光路による回折により広がった光束を比較的大きなピンホールで制限して測光するようになっている(図5)。この為、ピンホールの大きさの調節が容易となっている。レーザー光と蛍光(又は反射光)の共通の光路に置いた2枚のミラーにより、X-Y方向に試料面を走査し、コンピューターメモリーに蓄積された2次元の光強度分布から試料の切片画像を再構成する(図3B)。

A. CLSMの分解能

CLSMでは、このように点光源の光を試料内

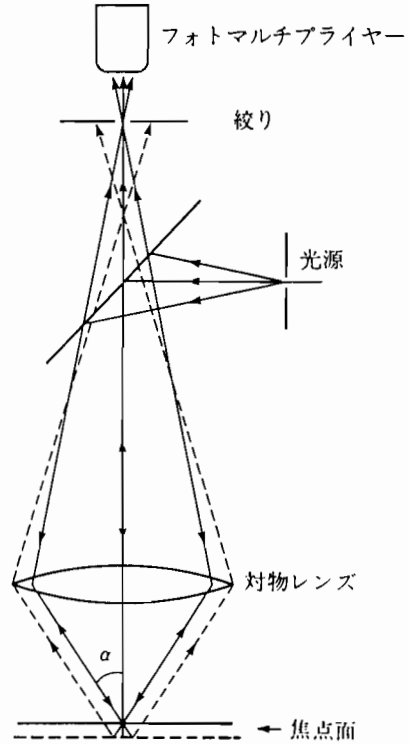


図4. CLSMの基本原則。(BIORAD, MRC-500のUser's Manual Diagram 1.1より改変)

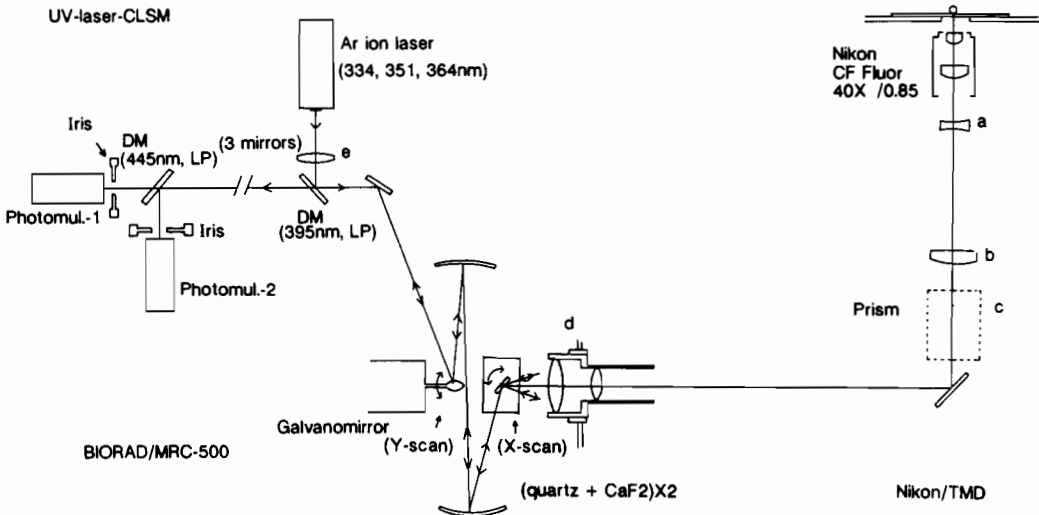


図5. CLSMの一機種の光路図。BIORAD, MRC-500を基本として、紫外レーザーを応用する為に、色収差補正レンズ(e)と特製のリレイレンズ(d:紫外と可視光間の色収差補正)を装着している(文献4のFig.1より改変)。

の一点に結像させ、そこから出た蛍光(又は反射光)を同じ光学系により結像させるので、試料内の一点の結像特性は、同じ光学系の点像関数をかけ合わせた(convolution)結果(図1 b, 2 C)⁴⁾となる(平たく云えば、光束を2回絞った結果となる)。点像関数は図1 bの(3)式に示すように、通常の顕微鏡の点像関数を2回かけ合わせた形になる⁹⁾。従って、X-Y面での分解能が $\sqrt{2}$ 倍増加する。また、光軸方向の光強度分布(図2 C)の拡がりも図1 Bの(4)の式で示されるように、共焦点の原理から小さくなる⁹⁾。

ところが、実際の CLSM では、光強度を記録する光電子倍増管の受光面は、非常に大きいので、ピンホールがなければ、焦点面以外からの広がった光も受光することとなり、CLSM と云えども光軸方向の解像力はなきに等しいことになる。ピンホールが無限小とした時のピン

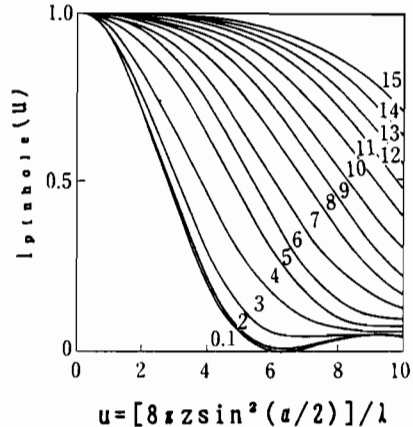


図6. CLSMの深さ方向の分解能とピンホールの大きさとの関係。横軸は“正規化された”光軸上での距離(u)で表し、各曲線上の数字はピンホールの大きさを“正規化された”光軸に垂直な面での距離、 $v = (2\pi r \sin\alpha) / \lambda$ (r: 真の距離), を示す。(文献10の Fig. 10 より改変)

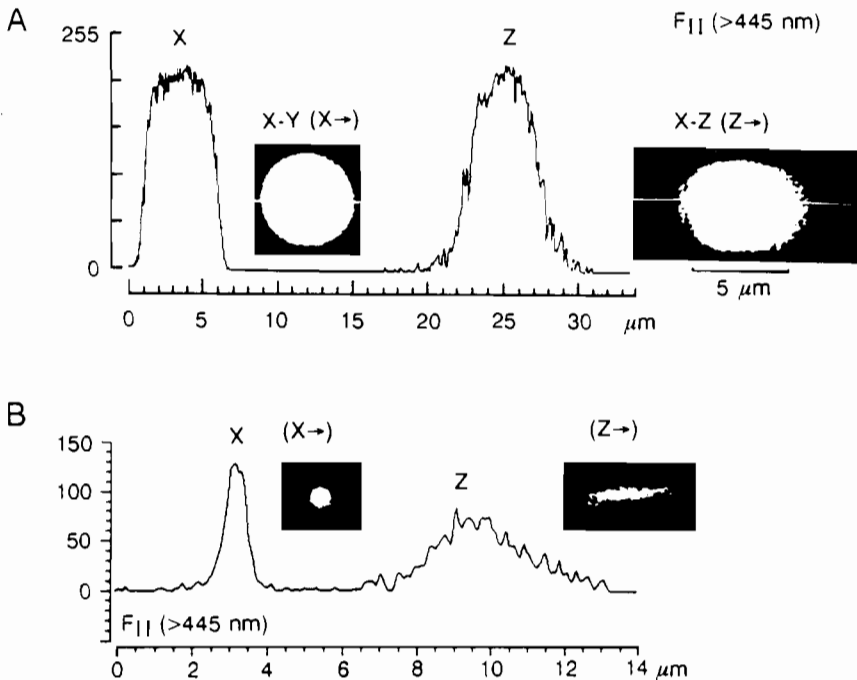


図7. 紫外レーザーを応用した CLSM の蛍光ビーズの像で表した性能。A. 直径 $5.0 \mu\text{m}$ の蛍光ビーズ(Fluorescent yellow-410, 410 nm 励起, 460 nm 蛍光, Dow Chemicals)の X-Y と X-Z 走査による画像とその光強度分布。B. 直径 $0.33 \mu\text{m}$ の蛍光ビーズ(励起 378 nm , 蛍光 413 nm , Dow Chemicals)の X-Y と X-Z 走査による画像とその光強度分布。(文献4の Fig. 3 より)

ホールに入る焦点面以外からの光の強度は焦点面からの距離の増加と共に顕著に減少し、次の式で表される¹⁰⁾。

$$I_{\text{pinhole}}(u) = [\sin(u/2)/(u/2)]^2$$

ここで、 $u = [8 \pi z \sin^2(\alpha/2)]/\lambda$ である。図6に異なるサイズのピンホールに入る光強度と光軸上での光源の位置との関係を示す。

このような理由により、CLSMの分解能は理論的には無限小のピンホールサイズで開口率0.85の対物レンズで、ステージ面で $0.21 \mu\text{m}$ 、光軸方向で $0.25 \mu\text{m}$ となる。実際に、開口率0.85、40×の対物レンズの特性を考慮したシュミレーション(図2)では、X-Y面で $0.33 \mu\text{m}$ 以下、光軸方向で $1.5 \mu\text{m}$ 以下が得られている。 $0.33 \mu\text{m}$ の蛍光ビーズによる蛍光の強度分布の半値幅(最大蛍光強度の1/2になる蛍光を示す距離)の測定でも、同様の結果が得られている(図7)。

B. CLSMの画像取得速度

CLSMは、このように光軸方向の解像力に於いて優れているが、レーザー走査により点の情報を集めて1枚の画像を得るために、画像取得の速度は、テレビカメラや多数のフォトダイオードを使った多点同時測定と比べて遅い。多くの機種では、1枚の画像を得るのに1/4~2秒かかるが、機種によっては、ビデオレート(30 Hz)で画像取得が可能である。しかしながら走査速度が速くなると、レーザーによる一点の照射時間が短くなり、フォトンノイズが増加し、像の鮮明度が低下する。

C. 画像処理能力

得られた画像データは、最近の進歩したコンピュータの画像処理技術により、拡大、縮小、加算、平均、減算、除算、平滑化(low pass filter)、辺縁強調(high pass filter)、3次元立体像の構築など、多彩な編集や修飾が可能である。

IV. CLSMによる画像取得の必須条件

A. 光軸の調整

最良の画像を得るためには、レーザー光と蛍光が、対物レンズ、リレイレンズ、走査ミラー、

ピンホールの中心をきちんと通ることが必須条件である。多くのCLSMの機種は、メーカーが光軸を調整し、ユーザーによる調整は不要となっているが、ユーザーは使用している機種が正しい性能を発揮しているかどうか常時点検した方がよい。この点検は、明視野下での視野の中心が走査画像の中心になっていることと、 $1 \mu\text{m}$ 以下の蛍光ビーズのX-Z走査による楕円形の画像の長軸が垂直になっていることや蛍光強度が最大値を示すことや分解能が期待される値になっていることを調べればよい。

B. 分解能の測定

$1 \mu\text{m}$ 以下の蛍光ビーズをカバーガラスとスライドガラスの間に一層になるように広げ、その間に顕微鏡オイルを入れ、1個のビーズのX-YとX-Z走査による画像を取得し、その蛍光強度分布、その半値幅(最大傾向強度の1/2の強度での蛍光の拡がり)から分解能を求める(図7A, B)。 $5.0 \mu\text{m}$ 直径の蛍光ビーズによる測定では、X-YとX-Z走査により同じ様な鮮明な円形の画像が得られれば、最良の分解能と云える(図7A)。

C. 光学系に色収差がないこと

対物レンズとリレイレンズを含めた全ての屈折光学系に励起光と蛍光の波長間に色収差(光軸方向および光軸に垂直な方向)がないこと。すなわち、共焦点の条件が成立することが必要である。

D. ダイクロイックミラーや全反射ミラーや蛍光フィルターの波長特性(コーティングの特性)

蛍光プローブの特性と一致し、最大の反射効率で蛍光が測光できること。

E. レーザーの強度

鮮明な画像が得られる最小強度にすること。

F. ピンホールの大きさ

必要とする光軸方向の分解能と画像のS/N比により決定すること。

G. 光電子倍增管の増幅率

直線性のある範囲で使用すること。

V. CLSM による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分布の測定

A. 顕微鏡の選択

正立型は、脳切片や摘出標本などの厚みのある組織で比較的表層の細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定したり、パッチクランプ法などの電極操作が伴わない場合に適している。倒立型は、培養細胞や脳切片標本でカバーガラスに接する底部の組織間隙の溶液を容易に早く交換できるような場合に適している。特殊な方法として、厚みのある組織を上下移動式のプレートに固定し、カバーガラスを底部とする記録槽の中に下向きに固定し、液の交換を容易にした条件下で倒立型顕微鏡により記録する方法がある。

B. 可視光蛍光プローブによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定

可視光 Ca^{2+} 蛍光プローブとして、fluo-3, calcium green, rhod-2 など⁵⁾があるが、いずれも CLSM に装備されている標準の空冷のアルゴンレーザー (488, 512 nm) で励起される。ただ、これらの Ca^{2+} 蛍光プローブは、 Ca^{2+} 濃度により蛍光波長域の変化がないので、2 波長域蛍光の比による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の絶対値への変換は出来ず、部位による蛍光プローブの濃度の違いによる蛍光強度の違いを補正できない。これに対して、細胞の刺激により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が変化した時の蛍光と刺激前の蛍光比を取る方法が取られている。しかしながら、以下に示すように部位による蛍光プローブの濃度の違いは補正できるが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の絶対値への変換はかなり面倒である。

単波長 Ca^{2+} 蛍光プローブによる蛍光強度 (F) の溶液中の遊離の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]$) 依存性は次の式で表される。

$$F = C_t \cdot (S_b + S_f K_d / [\text{Ca}^{2+}]) / (1 + K_d / [\text{Ca}^{2+}])$$

ここで、 C_t は全 Ca^{2+} 蛍光プローブの濃度、 S_f と S_b は遊離型及び Ca^{2+} 結合型の蛍光プローブの濃度から蛍光強度への変換係数 (蛍光物質の特性と測光条件による)、 K_d は蛍光プローブの Ca^{2+} の解離定数である。刺激により変化した時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{test}}$) とコントロールの

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cont}}$) による蛍光強度の比、 $R = F_{\text{test}}/F_{\text{cont}}$ (上の式の $[\text{Ca}^{2+}]$ をそれぞれ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{test}}$, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cont}}$ により置き換えたもの) をとると、 C_t は消失し、 R は蛍光プローブ濃度とは無関係になる。この R の式に S_b , S_f , K_d , $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cont}}$ を入れて、任意の R の時の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{test}}$ が求まる。 S_f と S_b はその細胞での最低及び最大の $[\text{Ca}^{2+}]$ の蛍光強度 ($F_{\text{min}} = S_f \cdot C_t$, $F_{\text{max}} = S_b \cdot C_t$) から求まり、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cont}}$ は 2 波長蛍光プローブにより別に同種の細胞から求めることが可能で、 K_d は試験管中の校正曲線から求まり、理論的に R から $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{test}}$ が求まることになるが、その作業は大変なことが解る。また、可視光蛍光プローブの生体高分子への結合が強く、これは蛍光比を取ることにによりある程度補正されるが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は正しく伝えないことになる。この事は R の式の分子と分母に Ca^{2+} 非依存性の項が加わり、真の R の値が得られなくなることを考えると明らかである。

C. 紫外蛍光プローブによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定

CLSM による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定に使用する紫外光励起の Ca^{2+} 蛍光プローブとしては、単波長域励起で $[\text{Ca}^{2+}]$ により蛍光波長特性が変る Indo-1 が最適である。

a. 使用するレーザー

Indo-1 の蛍光スペクトラムは、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加により短波長側に約 10 nm 変位し、 $[\text{Ca}^{2+}]$ の変化による蛍光スペクトラムの短波長域の変化が小さくなるので、使用するレーザーの波長は、355 nm 以下が望ましい。水冷のアルゴンレーザーは 351 と 364 nm (大出力では 331, 334 nm もあり) を発振するが、351 nm を使用するのが良い。He-Cd レーザーの紫外光領域での発振波長は 325 nm で、この目的に合うが、以下に述べる屈折光学系の色収差の補正が Argon レーザーに比べて困難になる。

b. 光学系の条件

次に、紫外レーザーを応用した CLSM による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定では、全ての屈折光学系が、紫外光と可視光領域を通して色収差がないこと

が必須条件である。励起光と蛍光の焦点が一致しない場合には、ピンホール内に入る蛍光量が少なくなり、分解能の悪い暗い画像となる。この条件は、光軸上だけでなく、光軸からはずれた点でもあてはまる。

従って、リレイレンズ及び対物レンズはこの条件を満たす必要がある。リレイレンズはかなり以前からこの条件に合ったものが市販されているが、この条件を満たす対物レンズの開発は、紫外透過のガラスの種類に限られるため(水晶や蛍石やBK7等)、困難と云われていたが、最近この条件を近軸領域に限って満たす対物レンズが製造市販されはじめ、その性能は十分に使用に耐えるものである。しかし、かなり高価なものになっている。また、顕微鏡メーカーによる顕微鏡と走査装置が一体となった紫外レーザーを応用した CLSM が、いくつか市販されている。しかしながら、これらの機種は通常の CLSM に比べ高価なものになっている。

通常の紫外透過の対物レンズを紫外レーザーによる画像取得に応用することは可能であり、近軸領域(100 μm 直径の領域)では紫外対応の CLSM とほぼ同様の性能が得られている⁴⁾。これは、対物レンズの光軸方向の色収差をレーザー光路に入れた補正レンズにより補正してやることと、リレイレンズを対物レンズの色収差とは逆方向の特性を持たせたものを応用することにより可能となる⁴⁾。

次に反射系の光学系も Indo-1 の蛍光領域(380~500 nm)で最大の反射効率を持つものが必要になる。機種によっては、多層コートにより特定の波長域が最大になるようなミラーを装着したものがあり、仕様上では蛍光の反射による損失を最小になるようにしてあるが、Indo-1 蛍光に対しては不適切なものがある。

c. Indo-1 蛍光比の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ への変換

Indo-1 の蛍光を 445 nm のダイクロイックミラーにより分割し、蛍光比を取り、カバーガラス上の既知の $[\text{Ca}^{2+}]$ の Indo-1 含有液(イオン組成は細胞溶液に類似)の一滴(10~20 μl)の蛍光比と比較することにより、細胞から得られた

Indo-1 の蛍光を $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の絶対値に変換できる。この場合、大事なことは、この In vitro Ca^{2+} 較正法による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の値は実際の値より低い値になること^{5,7)}を忘れないことと、走査装置の光電子倍增管の増幅器の増幅率やピンホールの大きさを $[\text{Ca}^{2+}]$ 較正曲線を取った時と同じ条件で、細胞から画像を取得することである。

厳密には、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 応答を記録した細胞を最大と最小の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 値の条件にして(イオノマイシンや Ca キレート剤の負荷、あるいはパッチ電極から高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ また無 $[\text{Ca}]$ の Ca キレート剤の高濃度の液を細胞内に入れる)得た最大と最小の蛍光比を使って、蛍光比から $[\text{Ca}^{2+}]_i$ への変換式に入れるのが良い。

D. 画像取得と処理の方法

a. 平面 (X-Y) 走査による画像取得

細胞質の数 μm 以内の領域の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は、数 msec~数 10 msec の時間経過で変化するので、画像取得の速度は、ビデオレート 30 Hz)以上が望ましい。最近の CLSM の機種によっては、これが可能である。しかしながら、蛍光測定時間が短くなり、フォトンノイズが増加するので、画像の鮮明度と取得速度の間での妥協点が必要である。

b. 線 (X-T) 走査による画像取得

通常の CLSM で、最大の画素数(例えば 768 \times 512)での画像取得速度は毎秒 1 画面以上であるので、速い $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の局所変化は記録できない。しかしながら細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化やその作用機構を解明する場合には、一次元での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の空間分布の時間経過を知ることで十分なことが多いので、同一の直線上を繰り返し走査し、その蛍光強度分布の変化を時間軸に展開することにより、一次元空間の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の時間変化を知ることが出来る(図 8)。ただし、この場合、スクリーン上に表示できる走査線の本数は限られるので、記録する現象の全経過と変化速度から、走査する線の本数(N)と表示する個々の線の加算数(n)を決める必要がある。全走査時間(T: 1 画像/秒の機種で、1 本の

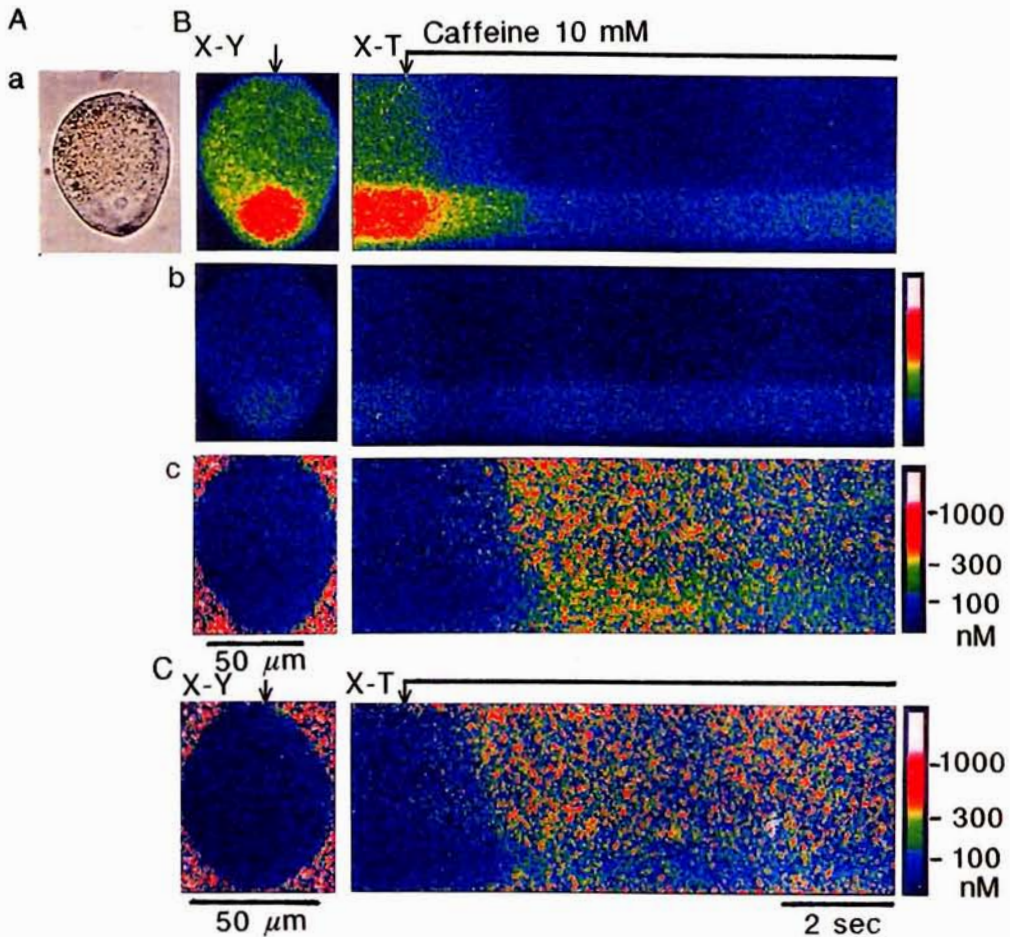


図8. 培養ウシガエル交感神経節細胞でのカフェインにより活性化した Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離とその細胞質内伝播。2つの細胞(A, BとC)で示す。A. 明視野像。B. Aで示した細胞の X-Y 走査(左側)の 412 nm (F 412) と 475 nm (F 475) での蛍光像 (b, a) とその比 (c : F 412/F 475) 及び X-T 走査による蛍光像とその比(右側)。X-Y 走査は 5 画面の平均, X-T 走査の 1 本の線は 5 回走査の平均による。カフェインを急速投与し, 最初に F 412 と F 475 の両方の蛍光が少し消光し, カフェインが急速に細胞膜を透過することを示す。約 1.5 秒後に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が細胞膜直下から起り, 細胞質深部に伝播し, 核の中では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が遅れることを示す。C. 別の細胞での同様の X-Y と X-T 走査による蛍光比の画像。この細胞も含め大部分の細胞では, 核内の Ca^{2+} 濃度上昇は, 細胞質に比べ遅れ, 小さいことを示す。(S.-Y. Hua & K. Kuba, 未発表)。

線走査で 2 msec, 2 波長測定で 4 msec である) は, 一本の線の走査時間と次に走査するまでの時間間隔の和 (x) とすると, $T = x \times n \times N$ となる。

線走査の場合も, 画像取得速度と画像の鮮明度は相反する条件となり, 線走査をする前に線走査と同じ画像の加算数 (n) で, 平面画像を記録し, その加算数での画像の鮮明度を知って

おく必要がある。

F. データの分析方法

2 波長域での蛍光画像の強度比(個々の対応する点で)を取り, ある領域での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を知るのが目的であるが, 個々の点の蛍光強度はフォトンノイズやその他のノイズによりかなり大きなばらつきを示すので, 蛍光比のばらつきは更に増大する。従って, 空間フィルター

をかけて周辺の点の値を含めた平滑化を行った後に画像間の除算をする必要がある。但し、空間フィルターをかけすぎると空間解像力を犠牲にすることを忘れてはならない。又、除算の前に分子となる画像の蛍光強度の値に、スクリーンに表示する最大値の $1/10 \sim 1/3$ (例えば、256の最大値で $20 \sim 80$) を乗算後に除算をしないと、除算の結果が非常に小さな値となること(デジタル量で表現することから)に注意せねばならない。

上述の方法で得た蛍光比の時間経過が、大きなばらつきを示す場合には、測定する領域の蛍光強度分布の平均値を取った後に除算をすることにより、かなりそのばらつきが小さくなるが、その領域内の蛍光強度分布が均一でない場合には、理論的に正しくない $[Ca^{2+}]_i$ の時間経過となる。

VI. CLSM 機種を選択

CLSM を選択する際の要点を表1に示す。

表1. CLSM 選択の要点

1. 顕微鏡：正立か倒立か
正立型：摘出標本(脳切片標本など)に適している。
倒立型：培養細胞、電極操作(パッチクランプ等)が伴う場合に適している。
2. レーザーの選択
蛍光プローブの波長による。
3. 走査装置
顕微鏡と一体型か独立型(顕微鏡を任意に変更可)
4. 走査機構と速度
サーボガルバノミラー：低速(1 KHz)、水平方向の走査に使用すると1画面 $1/16 \sim 2$ sec 前後(走査面の広さによる)。直線性良く任意の部位に固定可。
共振ガルバノミラー：高速(8 KHz 以上)、水平方向に使用し、ビデオレート(30 Hz)で全画面の走査可。任意の位置固定不可。
音響光学偏光素子：高速(15 KHz 以上)の走査が可。光の回折現象を動作原理としているので走査方向に波長特異性があり、蛍光測定には使えない。
5. 走査制御
走査範囲の変異性(固定したズーム比の変更によるのか任意の値の設定によるのか)。

6. 顕微鏡ステージの駆動方式
サーボモーター方式：Z軸(光軸方向)の走査範囲は、ステージの可動域まで可能。
ピエゾ素子方式：位置の再現性高い。Z軸走査範囲狭い。
7. フィルター交換の任意性
メーカー指定のものだけか、ユーザーによる任意のフィルター交換の可能性。
8. 光学素子の波長特性
走査光路中の屈折ミラーの coating の波長特性が目的とする励起及び蛍光波長で最大の反射効率になっているか。光電子倍增管の波長特性が測定する蛍光波長で最大感度か。
9. 光軸調整の信頼度
全てメーカーが行うのか。利用者が調整可能か。
10. 画像処理プログラム
加算、減算、乗算、除算、拡大、縮小、X-Y比変換、回転、輝度の強度分布と空間分布と時間変化、輝度の対数変換、空間フィルター、辺縁強調(空間微分)、3次元表示、立体視像等

ワープロ入力をして頂いた山北さとみさんに感謝する。

文 献

1. 藤田哲也監修、河田聡編(1995)新しい光学顕微鏡。第1巻レーザー顕微鏡の理論と実際。学際企画。
2. 藤田哲也監修、石川春律、高松哲郎編(1995)新しい光学顕微鏡。第2巻共焦点レーザー顕微鏡の医学・生物学への応用。学際企画。
3. Kuba, K., Hua, S.-Y. & Nohmi, M.(1991). Spatial and dynamic changes in intracellular Ca^{2+} measured by confocal laser-scanning microscopy in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Neuroscience Res.* **10**, 245-259.
4. Kuba, K., Hua, S.-Y. & Hayashi, T.(1994). A UV laser-scanning confocal microscope for the measurement of intracellular Ca^{2+} . *Cell Calcium* **16**, 205-218.
5. 宮川厚夫：日本生理学雑誌 **57**, 401-418, 1995.
6. 村田和美(1987). サイエンスライブラリー物理学 **29**, 光学。サイエンス社。
7. 小川靖夫、呉林なごみ：日本生理学雑誌 **57**, 365-374, 1995.
8. J. Pawley, Editor.(1995). The handbook of biological confocal microscopy. Second edition. IMR Press.
9. Wilson, T., & Sheppard, C.: Theory and practice of scanning optical microscopy. Academic Press. 1984.
10. Wilson, T., & Carlini, A. R.: *J. Microscopy* **149**, 51-66, 1988.