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

宮川厚夫^{*}, 牧野 徹, 玉川 彰, 尾崎一穂^{*}

(1989年7月5日受理)

蛍光性カルシウム指示薬 Fura-2 を利用して細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の分布を定量する測定機器を, 倒立型落射蛍光顕微鏡をベースにして作製した. $[Ca^{2+}]_i$ 測定は細胞に種々の薬物刺激を与えることが必要のため, 薬物投与装置も作製し効率的で正確な実験が行えるようにした. 全 Ca 定量と異なり $[Ca^{2+}]_i$ は正確な定量法がなかったため, 測定方法ごとの不一致も大きい. 特に, Fura-2 の場合, 従来法より低濃度値が求められることが多く, 検量線作成に使用するカルシウム緩衝液に問題があるとされている. 今回はより細胞内の条件に近づけるため, 高濃度のタンパク質を添加したカルシウム緩衝液を用いた. その結果, 従来の実験から予測されている $[Ca^{2+}]_i$ と一致する濃度が測定できた. 又, 画像処理より得られた $[Ca^{2+}]_i$ 分布について検討し, 細胞周辺がより実際の変化に近い濃度であることを示した.

1 緒 言

細胞の生理作用や動的構造を解明するため, 細胞内情報伝達を担っている Ca^{2+} の測定が注目されている. カルシウムキレーターに蛍光分子を結合させた Fura-2 や Inolo-1 などの蛍光性カルシウム指示薬が Tsien らにより発表され, より容易に Ca^{2+} 定量ができるようになってから, その応用研究が, 急速に広まっている¹⁾²⁾. そして, 単一の生きた細胞や細胞内分布測定のできる測定機器が市販されるようになってきた.

この Fura-2 を用いる定量法は, 従来の Ca 定量法と異なり, 細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が測定できる優れた方法である. しかし, この方法は開発されて日もまだ浅く, 測定ノウハウも十分には固まっていないだけでなく, 幾つかの問題点も指摘されている. いままで $[Ca^{2+}]_i$ の絶対濃度を正確に求めるよい測定法がなかっただけに, この方法と他の方法で予想される濃度との差異が大きな問題となっている. この原因の一つとして, 細胞中のように高濃度のタンパク質が存在する場合, 蛍光性カルシウム指示薬とタンパク質の相互作用で指示薬のキレート効果や蛍光強度に変化が生じていると報告されている³⁾.

この報文では $[Ca^{2+}]_i$ 測定上の工夫と注意点について述べる. 又, 蛍光性カルシウム指示薬とタンパク質の

相互作用の影響を考慮したカルシウム緩衝液の組成と, より正確な $[Ca^{2+}]_i$ 算出のための検量線計算方法についても述べる. 更に, この測定法で測定された二次元的 $[Ca^{2+}]_i$ と細胞中の三次元 $[Ca^{2+}]_i$ 分布の関係についても検討した.

2 実 験

2・1 測定機器

測定機器は Fura-2 対応の倒立型落射蛍光顕微鏡 IMT-2-21-CA3 (オリンパス) に 75 W のキセノンランプと自動フィルター交換機構, 及び超高感度の SIT (silicon intensifier target) 撮像管 C2741-08 (浜松ホトニクス) を取り付けた構成である (Fig. 1). そして, 画像取り込みにフレームメモリ DVS-3000 (浜松ホトニクス) を, 画像処理と機器全体のコントロールにパーソナルコンピューター PC-9801 VX41 (日本電気) を用いた.

測定は温度一定の条件下で培養細胞に各種の薬物刺激を与える必要がある. 本実験に用いた細胞は粘性性であるが, ピペットなどで直接薬物投与をすると, 細胞が培養皿からはがれたり, ピペットが培養皿に接触して細胞が顕微鏡の視野から外れることも多い. しかも, 2 波長測光するため測定中に細胞の移動が少しでも生じると正確な $[Ca^{2+}]_i$ が算出できなくなる. 又, 高濃度な薬物溶液を直接投与すると, ウェル全体に均一に広がるのに長時間かかるだけでなく, 高濃度薬剤に接触した細胞の

^{*} オリンパス光学工業(株)バイオメディカルリサーチセンター: 192 東京都八王子市久保山町 2-3

Fig. 1 Block diagram of the instrument for intracellular free calcium ion measurement

This system is comprised of an inverted vertical light fluorescence microscope (IMT-2-21-CA3, Olympus) attached to a 75 W xenon lamp and filter automatic changer. Image data, recorded by SIT camera, are processed by a personal computer and displayed on VDT with pseudocolor.

ダメージも大きい。従って、Fig. 2 のような薬物刺激装置を顕微鏡ステージに取り付けて、すべての培養液を刺激用薬剤を含む培養液と急速に入れ換える方法で刺激した。

測定に用いる培養皿は 340 mm の励起光を透過することが必要なため、Flexiperm-Disc (W. C. Heraeus: 西ドイツ) に 40×50 mm の大型カバーガラス #1 (マツナミ) を粘着させて用いた。

2.2 実験材料

蛍光性カルシウム指示薬 Fura-2, 1 mM Fura-2/AM {ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液} は同仁化学研究所から入手し、Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM) は GIBCO 製を、新生小牛血清は三菱化成製を用いた。

実験に使用した細胞はマウスのニューロblastoma とラットのグリオーマのハイブリッドである株化神経細胞 NG108-15 である。培養は約 10^4 細胞/ウェル接種し、5% 新生小牛血清を含む DMEM 中で、5% CO₂,

Fig. 2 Instrument for drug application

This device is attached to a microscope stage and incubation temperature is controlled by a heat-plate (IMT2-HP, Olympus). Cells were cultured in silicon rubber well (Flexiperm-Disc, Heraeus) adhering to a large-size cover glass (40×50 mm #1, Matsunami). For stimulation of cells, 1 ml drug solution was injected from a syringe connected to the device by silicon tube, and overflow medium was sucked up a peristaltic pump.

37°C の条件下で行った。そして、分化誘導のため 1 mM dibutyryl cyclic adenosine monophosphate を含む培地に交換し、5% CO₂, 37°C で 4~6 日培養を続けて神経突起を伸長させてから測定に使用した。

細胞への Fura-2 導入は 20 μ l の 1 mM Fura-2/AM (DMSO 溶液) を 2.0 ml の 20 mM HEPES (pH 7.4), 115 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 13.8 mM グルコースを含むレコーディングメディウムに分散させた溶液を、培養皿に 0.5 ml/ウェルに加え、5% CO₂, 37°C で 20 分間温置して行った。温置後、Fura-2/AM を含まないレコーディングメディウムに交換し、更に 60 分間温置をしてから測定に用いた。Fura-2/AM はできるだけ細かな粒子としてレコーディングメディウムに分散させる必要があるため、以下のように行った。2.0 ml のレコーディングメディウムを 50 ml プラスチック製遠心管 (ふた付き) に入れ、20 μ l Fura-2/AM (DMSO 溶液) を少量づつ壁面に付着させ、ふたを締めてボルテックスミキサーで激しくかき混ぜる。直接 Fura-2/AM をレコーディングメディウム中に滴下すると、十分な微粒子とするのは困難であった。

2.3 測定

試料のセットは Fura-2 導入した NG108-15 をヒートプレートで保温した薬物刺激装置を取り付けた顕微鏡ステージに載せ、検鏡しながら測定する細胞を選択し、視野中央に移動してピントを合せた。次の測定操作とデータ処理はコンピューターコントロールにより設定条件に従って自動的に行われる。まず、励起光を遮断して迷光、及び、撮像管の固定パターンノイズ (以下、両方合わせて暗ノイズと呼ぶ) を測定する。その後、340 と 360 nm で交互に励起された蛍光像を、1 組当たり 2 秒間隔で、最大 60 組取り込んだ。なお、ノイズを減少させるため、4 回の画像積算を行って 1 枚の画像とした。

薬物投与はこの測定中に行った。刺激薬物は 1 ml の 80 mM KCl を添加したレコーディングメディウムを、薬物刺激装置を用い、3~5 秒かけて細胞に投与した。この装置により培養ウェル中の培地は常に一定量になるように吸引されているため、過剰なメディウムは速やかに排出されて刺激薬物を含んだメディウムと交換される。

測定終了後、データ処理は以下の手順で行われる。まず、各画像から暗ノイズ分が差し引かれる。次に蛍光のバックグラウンド分を見積もり、キーボードより入力する。340 と 360 nm の各励起波長の代表的な蛍光像をモニター画面上に擬似カラー表示したり、ヒストグラム表

示して、背景のバックグラウンド蛍光を見積もることで行う。そして、各画素ごとにバックグラウンド蛍光分を減算し、340 と 360 nm で励起した蛍光の強度比 (I_{340}/I_{360}) を算出する。この I_{340}/I_{360} から、次に述べる検量線を用いて $[Ca^{2+}]_i$ に変換し、擬似カラーでモニター画面に表示する。

2.4 検量線

$[Ca^{2+}]_i$ は I_{340}/I_{360} より検量線を用いて計算する。検量線は非対称 S 字状曲線を表す 4 係数のロジステック曲線の式を用いた¹⁾。

$$R = \frac{R_{\min} + R_{\max}}{1 + (C/K_d)^b} + R_{\max} \quad \dots\dots\dots (1)$$

ただし、 C は $[Ca^{2+}]_i$, R は蛍光強度比, K_d は見掛けの解離定数, b は次数である。 $R_{\min}$, $R_{\max}$ は、それぞれ、 Ca^{2+} 濃度最小と最大時の蛍光強度比である。

このままでは、測定された R と C より最小 2 乗法で各係数の最適化を行うのは困難なため、次の変換を行った。

$$Y = \log \frac{1-y}{y}, \quad y = \frac{R_{\max} - R}{R_{\max} - R_{\min}} \quad \dots\dots\dots (2)$$

$$X = \log C \quad \dots\dots\dots (3)$$

従って、式 (1) は

$$Y = K_1 X + K_2 \quad \dots\dots\dots (4)$$

となる。ただし、 $K_1 = b$, $K_2 = -b \log K_d$ であり、 K_d と b について最適値を求めることができた。

検量線作成に用いたカルシウム緩衝液は 50 mM HEPES-KOH (pH 7.14), 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 10 μ M Fura-2 に 0~2 mM CaCl₂ を加えた組成である⁵⁾。

又、細胞中の状態により近づけるための上記の組成に 0~80 mg/ml のウシ血清アルブミン (BSA) を添加したカルシウム緩衝液を用いた。

3 結果と考察

3.1 Fura-2 の蛍光スペクトル変化と検量線の作成

蛍光性カルシウム指示薬を利用した $[Ca^{2+}]_i$ 測定が広く行われるようになったが、 $[Ca^{2+}]_i$ の正確な値を求めるためには幾つかの問題が指摘されている。これらの中で最大の問題は、Fura-2 がカルシウム緩衝液中と細胞中で存在状態が異なり、解離定数や蛍光強度が変化していることである。希薄な塩溶液のカルシウム緩衝液中で Fura-2 は遊離状態で存在するが、細胞では高濃度で

Fig. 3 Effect of addition of bovine serum albumin (BSA) on Fura-2 fluorescence excitation spectra

Fura-2 solution consisting of 50 mM HEPES-KOH (pH 7.14), 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 10 μM Fura-2, 0–2 mM $CaCl_2$ and various concentrations of BSA. Emission intensity was measured at 510 nm and numbers inserted the figures show the concentration of free Ca^{2+} . A, B and C contains BSA concentration of 0, 40 and 80 mg/ml, respectively.

存在するタンパク質に吸着している³⁾。一方、カルシウム発光性タンパク質エクオリンや微小カルシウム電極などを用いる従来の $[Ca^{2+}]_i$ 測定法も精度や妨害物質の影響、細胞へのダメージなどの問題があり、標準的な方法として使用できない⁶⁾⁷⁾。

従って、細胞内により近い状態の検量線を作成するため、カルシウム緩衝液にタンパク質を添加した。添加するタンパク質は以下の条件より決定した。A) タンパク質と Fura-2 の相互作用はタンパク質の種類による影響をあまり受けない³⁾。B) タンパク質と Ca^{2+} の相互作用は考慮しなくてもよい。C) 脳各部位のタンパク質濃度は 65–90 mg/g と報告されている⁸⁾。D) 神経細胞内にはチューブリンやニューロフィラメントが多く含まれているが⁹⁾、これらのタンパク質は Ca^{2+} と相互作用を持ち重合度などが変化するので本目的には適当でない。従って、入手が容易な BSA と、細胞中に多く含まれているアルドラーゼについて実験した。

Fig. 3 に示したように、Fura-2 の励起蛍光スペクトルは BSA の添加で大きく変化した。主な変化は BSA 濃度の上昇に伴う 340 nm ピークの減少と、380 nm ピークの増大である。又、高 BSA 濃度では Ca^{2+} 濃度が 100 nM 以下、又は 1000 nM 以上でスペクトル変化がなくなり、100–1000 nM の範囲で大きく変化してい

Fig. 4 Calibration curve of the instrument

The same Fura-2 solution of Fig. 3 was used. Close and open circles indicate measured various of BSA concentration of 0 and 80 mg/ml, respectively. Upper and lower curves were fitted by the least square mean method at BSA concentrations of 0 and 80 mg/ml, respectively.

る。以上の結果から、40–80 mg/ml BSA では励起スペクトル変化は小さく、細胞内タンパク質濃度と考えられる範囲ではほぼ一定であった。

アルドラーゼを添加したカルシウム緩衝液の場合も BSA と同様な励起スペクトル変化が表れた。従って、以下の実験は多量に入手の容易な BSA を用いて行った。

通常、 I_{340}/I_{360} より $[Ca^{2+}]_i$ を算出する検量線は

Fig. 5 Intracellular free calcium ion distribution of NG108-15 stimulated by 80 mM KCl

These images were taken at intervals of 2 s and at 50 s, but showed only 0 to 16 s. The instrument conditions are objective lens $\times 20$, photocopy lens $\times 2.5$, and integration times 4. The upper side numbers on each picture are times(s) after stimulation with KCl. The image of upper left side displays a full VDT, and other images only show a part of the cells.

$C = K_d(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$ の式¹⁰⁾が用いられている。この式は検量線が対称 S 字状曲線と仮定している。しかし、Fig. 3 から予想されるように理想的な形状からずれた場合や、実際の測定機器のように励起や測光に良好な分光特性のフィルターが使用できない場合、誤差が大きくなる。このため、式(1)の非対称 S 字状曲線を用いて最小 2 乗法で最適化を行った。

Fig. 1 に示した測定機器の検量線を 80 mg/ml BSA を含んだカルシウム緩衝液と含まない緩衝液で作成すると、Fig. 4 のカーブが得られた。蛍光スペクトルの変化から予想されるように BSA を含むカルシウム緩衝液の場合、 I_{340}/I_{360} の変化量は少なくなり、100~1000 nM での変化が急激になっている。なお、見掛けの解離定数 K_d と次数 b は、80 mg/ml BSA を含む場合、それぞれ、138 nM, 2.04 で、BSA を含まない場合、109 nM, 0.80 であった。

3・2 細胞内遊離カルシウムイオンの分布とその解釈

NG108-15 を 80 mM KCl で刺激したときの $[Ca^{2+}]_i$ 分布の変化を Fig. 5 に示した。KCl 刺激により電位感受性カルシウムチャンネルがオープンし、細胞外 Ca^{2+} が流入する。しかし、個々の細胞により $[Ca^{2+}]_i$ 変化のパターンは大きく異なり、この場合は上部の細胞が早く、しかも、高濃度に上昇している¹¹⁾。 $[Ca^{2+}]_i$ は、80 mg/ml BSA を含む検量線を用いた場合、Fig. 5 上部の細胞で刺激前 185 nM, 刺激後 12 秒で 1072 nM に上昇した。Fig. 5 下部の細胞は、それぞれ、173 nM と 270 nM であった。一方、BSA を含まない検量線で計算した場合、Fig. 5 上部の細胞で、それぞれ、10 nM と 98 nM であった。

細胞内全 Ca と異なり、 $[Ca^{2+}]_i$ は測定法により異なった濃度が報告されているが、静止時は 10~100 nM, 刺激時は 1000~10000 nM に達すると考えられている¹²⁾。Fura-2 などの蛍光性カルシウム指示薬を用いた $[Ca^{2+}]_i$ 測定では低濃度の定量値が得られていたが、今回の BSA を含んだ検量線では従来報告されている濃度に近い値が得られた。Fig. 3 の蛍光スペクトルの BSA 濃度による変化から見ても、今後より細胞質に近い組成のカルシウム緩衝液を利用しても算出される $[Ca^{2+}]_i$ に大きな変化はないと思われる。

薬物刺激は 3~5 秒かけて培養皿中の培養液を交換することで行われるが、Fig. 5 では薬物投与方向による $[Ca^{2+}]_i$ の偏りは観察されない。これは顕微鏡視野内ではこの測定機器の最短時間分離能 1 秒と比較して、十分に短時間で刺激されているためである。又、測定して

いるのが $[Ca^{2+}]_i$ 分布のため、カルシウムチャンネルがオープンして細胞外 Ca^{2+} が細胞内に分布するのに数秒~数十秒かかり、実際に刺激される時間は無視できるためでもある。

KCl 刺激で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が生じる原因は細胞外 Ca^{2+} の流入であり、Fig. 5 でも細胞周辺から中心に向かって $[Ca^{2+}]_i$ が上昇しているように見える。特に、Fig. 5 上部の細胞で時間経過を測定すると、刺激直後から 20 秒までは細胞周辺の $[Ca^{2+}]_i$ が高いが、それ以後はほぼ同一の濃度となる。しかし、カルシウムチャンネルは細胞膜全体に分布しているのに細胞周辺での $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が認められるのは次の理由によると思われる。顕微鏡で単一細胞を測定した場合、横方向の分解能は高いが、深さ方向の分解能はなく測光された蛍光強度は細胞の厚み分が積分された値となる。

この現象を明らかにするため、蛍光強度変化を Fig. 6 に示した。Fig. 6 は Fig. 5 上部の細胞の中心を通る 1 本の走査線を取り出し、その蛍光強度の時間変化を示した。蛍光強度は KCl 刺激直前と 10 秒、及び 16 秒後を示した。横軸は画素であり、細胞が存在する 150 から 250 番目の画素のみを示してある。360 nm 励起では使

Fig. 6 Profile of fluorescence intensity change in NG108-15

The sample is the same as the upper cell in Fig. 5. A and B show fluorescence intensity at 340 nm and 360 nm, respectively. The inserted numbers in the figures show time (s) after stimulation with KCl. Fluorescence intensity at 340 nm increased by stimulation of the drug, but intensity at 360 nm decreased because the actual wavelength of the excitation filter shifted to the long wavelength.

用したフィルターの透過波長帯が長波長側に寄っているため蛍光強度の減少が見られるが, 340 nm 励起の場合, 細胞全体で大体均一に強度が増加している. 細胞周辺での 340 nm の強い増加は認められない. これは, 相対的に蛍光強度の弱い細胞周辺での $[Ca^{2+}]_i$ 変化がより実際に近い濃度を示し, 厚い中心部では平均化された $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を観察しているためと思われる. 最終的に均一な $[Ca^{2+}]_i$ となった時点では, このような現象を考慮する必要はなくなる.

以上のように蛍光性カルシウム指示薬を利用することで, より容易に生きた細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 分布が定量できた. しかし, より正確な $[Ca^{2+}]_i$ の測定には, 更に検量線作成方法の改善や, 画像処理上の工夫が求められるであろう.

実験に用いた株化神経細胞 NG108-15 を供与いただいた三菱化成生命科学研究所の天野武彦博士に感謝します. 又, 実験を手伝っていただいたオリンパス光学工業(株)バイオメディカルリサーチセンターの大矢早和子さん, 堀邦夫さんに感謝します.

文 献

- 1) G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien: *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440 (1985).
- 2) 小倉明彦, 石橋 昭, 工藤佳久: “細胞内カルシウム実験法”, p. 91 (1989), (羊土社).
- 3) M. Konishi, A. Olson, S. Hollingworth, S. M. Boylor: *Biophys. J.*, **54**, 1089 (1988).
- 4) D. Rodbard, D. M. Hutt: “Symposium on RIA and related procedures in medicine”, p. 165 (1974), (Int. Atomic Energy Agency, Vienna)
- 5) A. Fabito, F. Fabito: *J. Physiol.* (Paris), **75**, 463 (1979).
- 6) 遠藤政夫: “細胞内カルシウム実験法”, p. 55 (1989), (羊土社).
- 7) 岡田泰伸, 老木成稔: 生体の科学, **36**, 401 (1985).
- 8) A. L. Miller, F. N. Pitts: *J. Neurochem.*, **14**, 579 (1967).
- 9) 酒井彦一: 蛋白質核酸酵素, **22**, 647 (1977).
- 10) R. Y. Tsien, T. Pozzan, T. J. Rink: *J. Cell Biol.*, **94**, 325 (1982).
- 11) 尾崎一穂, 宮川厚夫: 第 66 回日本生理学会大会予稿集, p. 113 (1989).
- 12) 阿部輝雄: “神経生化学 (上)”, p. 268 (1984),

(共立出版).

☆

Determination of intracellular free calcium ion distribution with fluorescent calcium reagent Fura-2 using video image processing. ATSUO MIYAKAWA, TOHRU MAKINO, AKIRA TAMAGAWA and KAZUHO OZAKI (Biomedical Research Center, OLYMPUS OPTICAL Co., Ltd., 2-3, Kuboyama-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192)

We constructed an instrument for determining the distribution of intracellular free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) using fluorescent Ca indicator Fura-2. This instrument consists of an inverted vertical light fluorescence microscope attached to a 75 W xenon lamp and automatic changer of excitation filters. Image data, recorded by high sensitive SIT camera, are processed by personal computer, and displayed on VDT with pseudocolor. We improved the drug applicator for rapid stimulation of cells and accuracy measurement. The $[Ca^{2+}]_i$ estimated with Fura-2 resulted in a lower concentration in comparison with other methods as bioluminescent protein Aequorin, Ca microelectrode, etc. It appears that Fura-2 may interact with intracellular proteins. We used a new Ca concentration buffer containing 80 mg/ml bovine serum albumin (BSA). As for the influence of BSA, fluorescence excitation spectra of Fura-2 alters reduction at 340 nm peak intensity, enlargement at 380 nm, and constant at 360 nm. Also, the appearance dissociation constant of Fura-2 for Ca^{2+} changed from 109 nM to 138 nM by adding 80 mg/ml BSA. When using the calibration curve calculated by BSA containing the buffer, $[Ca^{2+}]_i$ in NG108-15 cells with stimulation of 80 mM KCl were increased 185 nM to 1072 nM. These $[Ca^{2+}]_i$ almost agreed with the estimated concentration from other methods. Increased $[Ca^{2+}]_i$ with KCl stimulation is due to opening voltage sensitive Ca channels present on cell membranes. Fluorescence intensity excited at 340 nm from the KCl stimulated cells increase whole aspect of the cells. But the pseudocolor image showed the peripheral part of the cells to rapidly increase, and then central part to do so slowly. These results due to fluorescence intensity differed with cell thickness that central part of cell show an averaged $[Ca^{2+}]_i$; change and peripheral part are a nearly real.

(Received July 5, 1989)

Keyword phrases

intracellular free calcium ion; Fura-2; fluorescence microscope; video image processing.