同時蛍光計測による細胞膜活動電位と 細胞内遊離カルシウムイオン濃度の相互作用解析

森 義彦 宮崎 保光

豊橋技術科学大学 情報工学系

Interaction Analysis of Membrane Action Potential and
Intercellular Free Calcium Ion Density with Simultaneous Fluorescence Measurement

Yoshihiko MORI Yasumitsu MIYAZAKI

Toyohashi University of Technology
Department of Information and Computer Science

Abstract

This paper investigates an optical method which measures cytoplasmic membrane action potential and intercellular free calcium ion density at the same time and point. The measurement (simultaneous fluorescence measurement) is brought to realization with two kind of fluorescent dyes. The multi-dyeing of voltage-sensitive dye and fluorescent calcium indicator is considered, and spectrum characteristic of these dyes is examined.

The experiment is gone as follows. First, absorption spectrum of Rhod2 and Fluo3, which fluorescent calcium indicator can be pumped by visible light, is measured. These solutions are composed of distilled water, 5[μ M] dye, and 50[mM] CaCl_2 . The result suggests that Rhod2 and Fluo3 can be pumped with Ar or Kr laser and Ar laser for high efficiency respectively. Second, Fluorescence spectrum of Rhod2 and Fluo3 is measured. Absorption spectrum and fluorescence spectrum of WW781, which voltage-sensitive dye can be pumped, is measured too. Rhod2 solution and Fluo3 solution are prepared as has been pointed out. WW781 solution is made up of ethanol and 0.025[mg/ml] WW781. These spectrums show that simultaneous fluorescence measurement of cytoplasmic membrane action potential and intercellular free calcium density with WW781 and Fluo3 is possible.

1 はじめに

膜電位感受性色素を用いた光学的膜電位計測法は、^{1), 2)} 100箇所以上の多数点の活動電位を同時計測可能な手法として、心臓の興奮伝搬の解明³⁾などに用いられている。また蛍光性Ca指示薬を用いたCaイオン濃度の光学的計測⁴⁾は、細胞内Caイオン濃度を2次元的な分布を捕らえ

ることのできる手法として、様々な細胞におけるCaイオンの働きやその調節機構の解明に用いられている。

ところで心筋は数多くの興奮性細胞から成り、その興奮伝搬のメカニズムは明らかにされていない。図1に示すように心筋細胞の活動電位の形成には、心筋細胞内へのCaイオンの内向き流

が大きく関与しているので、⁶⁾細胞膜活動電位および細胞内Caイオン濃度を同時に計測する手法を確立できれば、心筋の興奮伝搬のメカニズムの解明に大きく貢献する。我々は、蛍光性色素の蛍光放射強度の変化を利用する光学的計測を蛍光計測と呼び、心筋細胞の細胞膜活動電位と細胞内Caイオン濃度の同時検出に蛍光計測を適用する。

図1 心筋の活動電位

2 レーザを用いた蛍光計測

蛍光計測は、膜電位感受性色素の膜電位依存性蛍光放射や蛍光性Ca指示薬のCaイオン濃度依存性蛍光放射を利用して膜電位やCaイオン濃度を計測する方法である。この方法の特徴は非接触で計測できることであり、微小電極の刺入の困難な形状の組織における膜電位の計測、微弱な細胞からの計測が可能となる。さらに多数箇所からの同時計測が可能となる。特に単色性、エネルギー集中性、指向性、非干渉性に優れたレーザー光を光源とすることで光ファイバー等の光機能素子を効果的に適用でき、高空間分解能な膜電位測定が可能となる。またハロゲンランプ等による蛍光計測に比べ、光散乱の計測への影響を非常によく抑えることができる。⁸⁾

3 膜電位感受性色素と蛍光性Ca指示薬

膜電位感受性色素は膜電位変化に対する光学的变化の応答時間の長短によりfast-response dyes と slow-response dyes に分類される。fast-response dyes の膜電位変化に対する応答時間は2.0～5.0 μ s で非常に短く、活動電位のような一過性の速い膜電位変化を測定するのに適している。

蛍光性Ca指示薬のうち、R. Tsienらによって開発されたQuin2, Fura2, Indo1, Fluo3, Rhod2⁷⁾はいずれもCaイオンのキレーターとして作用し、

- 1) 高いCaイオン選択性をもつ。
- 2) 細胞内Caイオン濃度の生理的変動の範囲でCaイオンと比較的速やかに結合し、速やかに解離する。
- 3) 励起光を与えると、一定かつ高強度の蛍光を放射する。

といった特長を持つ。表1にこれら蛍光性Ca指示薬の特徴をまとめる。

表1 蛍光性Ca指示薬の特徴

項目 種類	開発時期	励起光	Ca ²⁺ 結合定数Kd [nM]
Quin2	1980年	紫外光 ↑ ↓	110
Fura2	1985年		224
Indo1	1985年		224
Fluo3	1988年	可視光 ↑ ↓	400
Rhod2	1988年		1000

4 同時蛍光計測の原理

細胞膜活動電位と細胞内Caイオン濃度の同時蛍光計測の原理を図2に示す。図に示す膜電位感受性色素は、細胞膜表面に着して蛍光を放射する。一方蛍光性Ca指示薬は、アセトキメチルエステル（AM）化によって細胞膜を透過し、細胞内に取り込まれる。⁷⁾従って、蛍光性Ca指示薬で細胞を染色した後に膜電位感受性色素で同じ細胞を染色すると、互いの色素による化学変化の影響を無視できる。染色後、膜電位感受性色素用励起光および蛍光性Ca指示薬用励起光を細胞に照射する。すると膜電位感受性色素からは膜電位に依存した強度の蛍光放射が得られ、蛍光性Ca指示薬からは細胞内Caイオン濃度に依存した強度の蛍光放射が得られる。両者を分光して同時に光計測することにより、膜電位と細胞内Caイオン濃度を同時に計測できる。

図2 同時蛍光計測の原理

5 蛍光性色素の多重染色

図3に、複数の色素を用いた蛍光計測の際に膜電位感受性色素などの蛍光性色素に求められる分光特性を示す。短波長側に吸収帯のあるdye-1の蛍光放射がdye-2に吸収されないように色素を選択しなければならない。またdye-1の蛍

光放射の強度差が顕著な場合、一方の色素からの生体情報が消滅する可能性がある。そのためdye-1とdye-2は、蛍光スペクトルができるだけ重ならないように選択する。⁶⁾

図3 色素に要求される分光特性

膜電位感受性色素と蛍光性Ca指示薬の選定の際、dye-1とdye-2にそれぞれ各種蛍光性Ca指示薬とHe-Neレーザ（発振波長：632.8nm）によって励起可能な膜電位感受性色素であるWW781を充てて検討した。蛍光性Ca指示薬のうちFluo3及びRhod2は、紫外光励起による細胞損傷がない、細胞由来の蛍光バックグラウンドと細胞内Caイオン濃度に依存した蛍光の波長が近接していない、といった利点を持つ。そこでこの2つのいずれかを同時蛍光計測に用いることにし、Rhod2の吸収スペクトル（図4）とFluo3の吸収スペクトル（図5）を測定した。これらの吸収スペクトルから、Rhod2はArレーザ（発振波長：514.5nm）またはKrレーザ（発振波長：568nm）によって励起可能であること、Fluo3はArレーザ（発振波長：488nm, 514.5nm）によって励起可能であることが分かった。次に蛍光性Ca指示薬を決定するために、Rhod2、Fluo3の蛍光スペクトルと膜電位感受性色素WW781の吸収・蛍光スペクトルを実測

した(図4、図5)。なお各々のスペクトルは、極大値を1に正規化した。

図4 WW781とRhod2の分光特性

図5 WW781とFluo3の分光特性

図4より、Rhod2の極大蛍光波長は約580nmである。Rhod2の蛍光放射がWW781の吸収帯に重なるため、Rhod2からのCaイオン濃度に依存した蛍光放射の検出が困難になることが分かる。図5より、Fluo3の極大蛍光波長は約535nmとなり、その蛍光放射はほとんどWW781に吸収されることなく検出できる。またWW781の極大蛍光波長は約655nmであり、Fluo3の蛍光スペクトルとWW781の蛍光スペクトルは、両者の蛍光放射を区別して検出するのに十分な波長差を持っている。したがって同時蛍光計測には、WW781とFluo3を用いることにした。表2に細胞膜活動電位と細胞内Caイオン濃度の同時蛍光計測における計測条件

をまとめる。

表2 計測条件

項目	細胞膜活動電位	細胞内Caイオン濃度
蛍光性色素	WW781	Fluo3
極大吸収波長	600	505
極大蛍光波長	665	535
励起用レーザー	He-Neレーザー	Arレーザー
計測対象	コイ心室筋細胞	

5 まとめ

細胞膜活動電位と細胞内Caイオン濃度の同時蛍光計測の手法を提案し、膜電位感受性色素と蛍光性Ca指示薬の多重染色・分光特性について検討した。

〔参考文献〕

- 1) L. B. Cohen & B. M. Salzberg: Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 83, 35/88 (1978)
- 2) 神野耕太郎, 広田秋彦, 酒井哲朗, 小室仁: 医用電子と生体工学, 23, 73/80 (1985)
- 3) H. Komuro, T. Sakai, A. Hirota & K. Kamino: Jpn. J. Physiol., 36, 123/137 (1986)
- 4) 石渡信一編: 実験生物物理, 54/55, 丸善 (1993)
- 5) 大澤一爽: 小動物心臓の実験33章, 68/71, 共立出版 (1986)
- 6) 佐藤智夫, 宮崎保光, 口脇博治: 信学技法, MBE-92, 382, 1/6 (1992)
- 7) A. Minta, J. P. Y. Kao & R. Y. Tsien: J. Biol. Chem., 264, 14, 8171/8178 (1989)