

技術報告

ビデオ蛍光顕微鏡を用いた細胞内遊離カルシウムイオン
濃度分布測定におけるバックグラウンド蛍光の補正法

宮 川 厚 夫*

(1992 年 6 月 4 日受理)

蛍光顕微鏡と画像処理を用いた、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測定で、細胞周辺部のカルシウムイオン濃度が異常に高濃度に推定される場合が多い。これは、蛍光顕微鏡でしばしば見られる蛍光像のハレーションが原因である。このため、細胞の透過光像と、カルシウムイオン分布測定時の蛍光像を重ね合わせて表示して、バックグラウンド蛍光強度と共に、ハレーション強度を指定できるようにした。更にハレーション強度以下の蛍光強度の場合、カルシウムイオン分布を表示しないようにすることで、細胞像とよく一致した分布像を得ることが容易になった。このバックグラウンド蛍光推定法は、カルシウムイオン以外に、同様な蛍光性指示薬が用いられるマグネシウムやナトリウムイオン、pH などでも利用可能である。

1 緒 言

生きている単一の細胞における、細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の分布が、Fura-2 や Indo-1 などの蛍光性プローブ試薬を用いて広く測定されている^{1)~3)}。しかし、測定された $[Ca^{2+}]_i$ の正確性にはプローブ試薬と細胞内タンパク質の相互作用など⁴⁾、幾つかの問題点が残されている。

その一つが、蛍光顕微鏡を用いて、細胞や組織切片の $[Ca^{2+}]_i$ 分布を測定した場合、試料周辺部の $[Ca^{2+}]_i$ が異常な高濃度を示す場合があることである。この現象のため、細胞膜に存在するカルシウムチャンネルなどがオープンして、実際に細胞膜直下の $[Ca^{2+}]_i$ が上昇したときなどとの識別が困難になる。この現象は、バックグラウンド蛍光強度をわずかに変化させただけで、微妙に変化するので、アーチファクトであると推定できるが、真の濃度を求めることは困難である。

この細胞周辺部の現象は、蛍光顕微鏡でしばしば見られる蛍光像のハレーションが原因である。すなわち、単に蛍光像からだけでバックグラウンド蛍光強度を推定すると、ハレーション部分まで細胞として $[Ca^{2+}]_i$ 計算に含める場合が多いためである。

既報⁵⁾で報告した $[Ca^{2+}]_i$ 分布と顕微鏡画像を重ね合わせて表示できるシステムを利用して、ハレーション部

分を明確に区別することができるようになった。この報告では $[Ca^{2+}]_i$ 分布測定機器のハードウェアには手を加えず、プログラムを改良することで、正確なバックグラウンド蛍光強度を推定し、顕微鏡像とよく一致した $[Ca^{2+}]_i$ 分布像を求める方法について述べる。

2 実 験

2.1 測定機器と実験材料

測定機器は文献⁶⁾と同じく、倒立型落射蛍光顕微鏡 IMT-2-21-CA3 (オリンパス), SIT 撮像管 C2741-08 (浜松ホトニクス), フレームメモリ DVS-3000 (浜松ホトニクス), 及び、パーソナルコンピュータ PC-9801 VX41 (日本電気) で構成される。又、蛍光性カルシウム指示薬 Fura-2 などの試薬類も、文献⁶⁾と同様な種類を用いた。測定に用いる培養器具や、薬物刺激装置も文献⁵⁾と同じである。

又、測定に使用した培養細胞も、文献⁶⁾と同じマウスのニューロブラストーマとラットのグリオーマのハイブリッド細胞 NG108-15 である。培養条件と、Fura-2 の細胞へのロードも文献⁶⁾と同一に行った。

2.2 プログラム

従来のバックグラウンド蛍光強度推定は、蛍光像を擬似カラーで表示して、細胞から離れた位置の蛍光強度を読み取り、バックグラウンドとしていた (Fig. 2A 参照)。

* 浜松医科大学メディカルホトニクス講座: 431-31, 静岡県浜松市半田町 3600

文献⁵⁾で $[Ca^{2+}]_i$ 分布像と顕微鏡像の重ね合わせが行えるようにプログラムを改良したので、顕微鏡像がバックグラウンド蛍光強度の推定にも利用できるように、次の3点の処理を追加した。1番目は、バックグラウンド蛍光強度の推定時に、透過光による顕微鏡像と重ねて蛍光強度を表示できるようにしたことである。2番目は、バックグラウンド蛍光強度として、従来の2波長の蛍光強度に加えて、ハレーション強度を新たに取得するようにした。3番目は、340 nm と 360 nm のいずれかの蛍光強度がハレーション強度以下の場合、蛍光強度比を計算せず、 $[Ca^{2+}]_i$ を表示しないようにした。従って、蛍光強度比の計算式は、式(1)となる。

$$R = \begin{cases} \frac{I_{340} - B_{340}}{I_{360} - B_{360}} & \text{ただし, } I_{340} \geq \text{Hal or } I_{360} \geq \text{Hal} \\ 0 & \text{ただし, } I_{340} < \text{Hal or } I_{360} < \text{Hal} \end{cases} \quad (1)$$

ただし、 R は蛍光強度比、 I_{340} と I_{360} は、それぞれ、波長 340 nm と 360 nm における蛍光強度、 B_{340} と B_{360} は、それぞれ、波長 340 nm と 360 nm におけるバックグラウンド蛍光強度、又、Hal はハレーション強度である。

2・3 測定

測定は、文献⁵⁾に示した手順で行った。ただし、顕微鏡像の入力には、必ず透過光像が必要である。ノマルスキー微分干渉像などは、顕微鏡像が蛍光像からずれるため、好ましくない。又、顕微鏡像と蛍光像をよく一致させるために、透過光像の入力後、蛍光測光の前にピントを合わせ直すことや、機械的な振動により、焦点の移動や試料細胞の移動が生じないように注意する必要がある。なお、顕微鏡像の入力にも、蛍光観察用の超高感度の SIT カメラを用いる関係上、強すぎる光を当てないようにする注意も必要である。

バックグラウンド蛍光とハレーションの強度の推定は、次の順序で行う (Fig. 1)。最初に Fig. 1A に示したように、顕微鏡像を表示させ、赤と水色で示された水平カーソルをバックグラウンド蛍光を推定したい場所まで上下に移度する。次に、カーソルで指示した位置の透過光強度が黄色の線で、340 nm と 360 nm の蛍光強度が、それぞれ、水色と緑色の線で表示される (Fig. 1B)。そして、透過光強度を見ながら、垂直カーソルを左右に動かして、細胞の縁まで移動する。最後に、3本の水平カーソルを、それぞれ、上下し、2波長のバックグラウンド蛍光強度とハレーション強度を決定する

(Fig. 1C)。通常、バックグラウンド蛍光は、細胞から十分に離れた位置の蛍光強度とし、ハレーションは垂直カーソル位置の蛍光強度とする。

3 結果と考察

3・1 従来法によるバックグラウンド蛍光強度推定法と $[Ca^{2+}]_i$ 分布

Fig. 2A に、通常行われている、従来のバックグラウンド蛍光推定法を示した。図は左側のウィンドウに擬似カラーで表示された蛍光像上で、バックグラウンド蛍光強度を推定したい位置へ水平カーソルを移動し、右側のウィンドウに蛍光強度のプロフィールを表示した状態である。その後、水平カーソルをバックグラウンド蛍光と思われるところまで上下させ、バックグラウンド蛍光の強度を指定する。それぞれの波長についてこの操作を行う。市販の測定機器により、表示方法は様々であるが、原理的には同じ方法である。

この方法で、バックグラウンド蛍光強度は、340 nm が相対値として 49、360 nm が 54 と見積もられた (Fig. 3A, B)。ところが、細胞の蛍光像にはハレーションによるすそがあり、どこが細胞の境界であるか不明りようである。従って、同じ測定データを用いて、この前後で値を変化させてみると Fig. 2B, C のような結果が得られる。蛍光像のすその少し上部をバックグラウンドとすると、340 nm では 75、360 nm では 25 と推定できる。このバックグラウンド蛍光強度で $[Ca^{2+}]_i$ 分布を計算すると、Fig. 2B のように細胞周辺部と神経突起が低 $[Ca^{2+}]_i$ を示す。又、340 nm のバックグラウンドをわずかに下げて、25 とすると、Fig. 2C に示したように、全く異なった様子になる。

一方、細胞内部の $[Ca^{2+}]_i$ は、バックグラウンド強度を変化させても、318~522 nM と細胞周辺部ほどの変化は生じていない。このように、バックグラウンド蛍光強度をわずかに変化させただけで、細胞周辺部の $[Ca^{2+}]_i$ は大きく変動する。

3・2 重ね合わせ法によるバックグラウンド蛍光強度推定例

Fig. 3 に従来法と重ね合わせ法で求めた2種類のバックグラウンド蛍光強度を使用して、 $[Ca^{2+}]_i$ 分布を計算した例を示した。Fig. 1の方法で求めたバックグラウンド蛍光強度は、340 nm のとき 24、360 nm で 16 であり、ハレーション強度は 120 である。この重ね合わせ法によるバックグラウンド強度は、従来法より低い値である。これは、従来法が細胞の存在しない背景に、ノイ

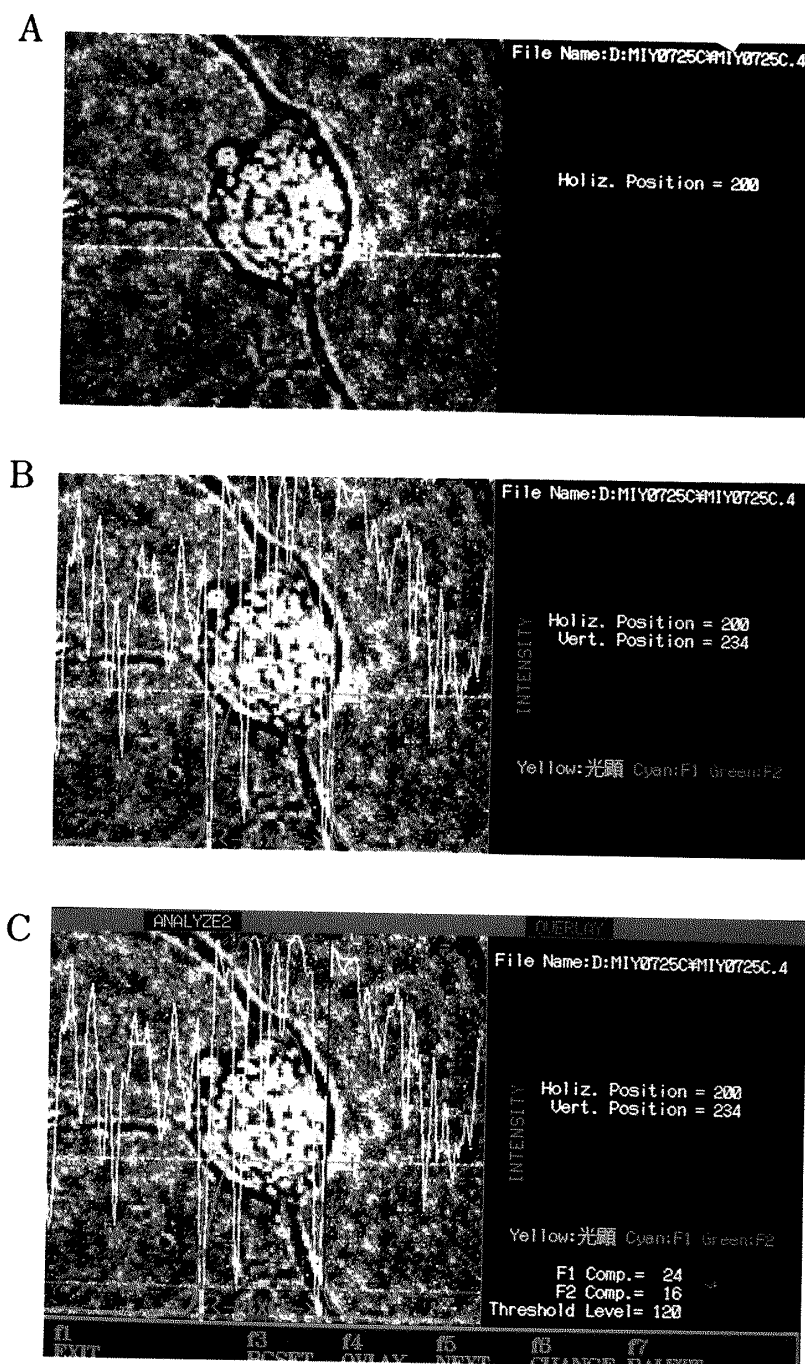


Fig. 1 Improved estimation method of background fluorescence intensity using microscopic imagery

A. First step of background fluorescence estimation shows the microscopic cell image by transmitted light on VDT at 7 levels of black-and-white. Then, horizontal cursor representing the red and cyan color line was moved into position for background estimation. B. After set of the position, the transmitted light intensity of microscopic image (yellow line), the fluorescence intensity at 340 nm (cyan line) and 360 nm (green line) were displayed. The vertical cursor was shifted to right and left, and adjusted at the edge of the cell. C. Three horizontal cursor shows on the VDT. The first cursor indicated the background fluorescence intensity at 340 nm, and the second was the background at 360 nm. These cursors were moved to background intensity which was estimated at separately from the cells. The third cursor was transferred at the cross point of the vertical cursor line and the fluorescent profile line at 340 nm or 360 nm. This cross point indicate the halation intensity.

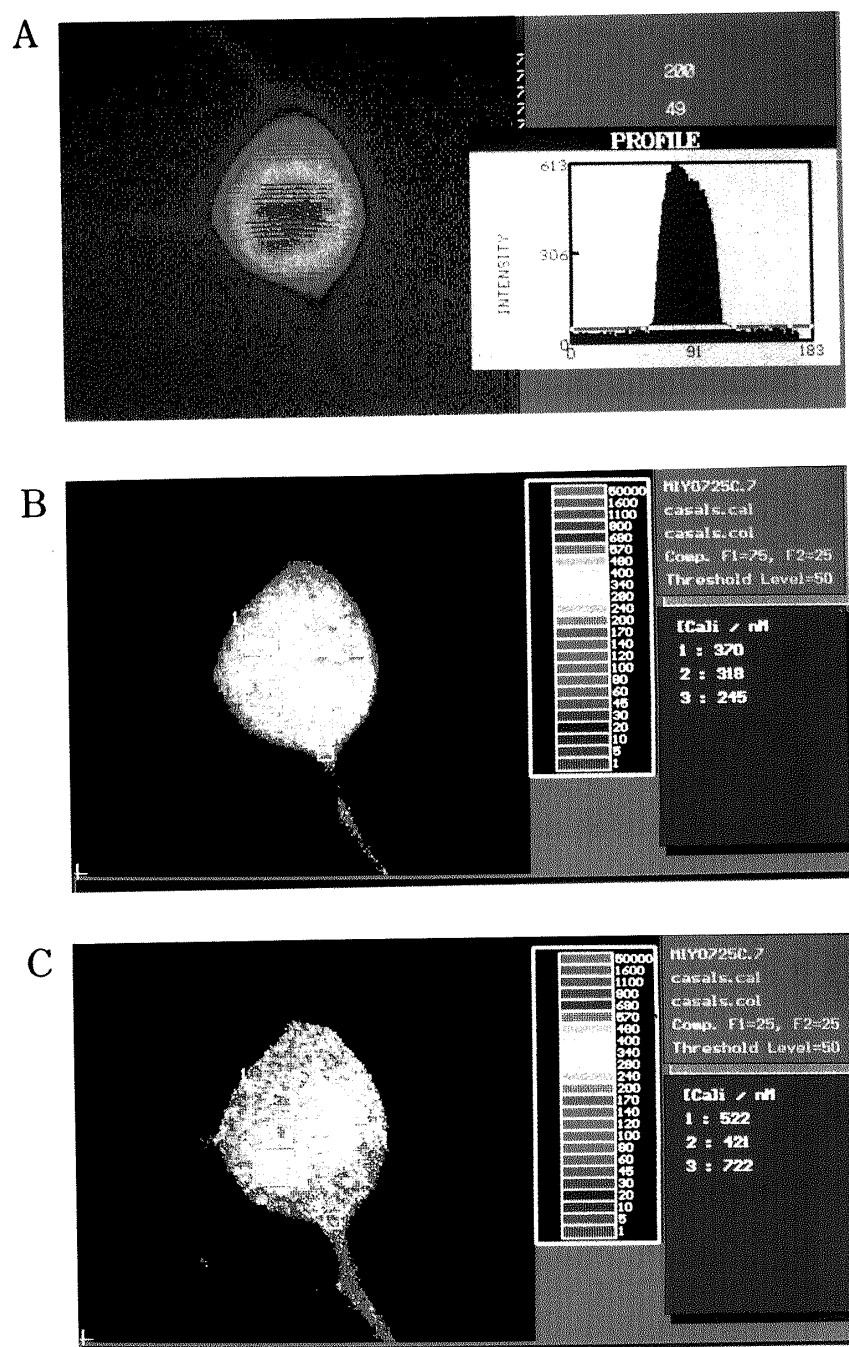


Fig. 2 Conventional estimation method of background intensity and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ distribution

A. Conventional estimation method of background fluorescence intensity. Fluorescent image illustrated with pseudocolor on the left window. Next step, horizontal cursor was moved up and down, and set in position for the estimation. Fluorescence intensity shows in the right window. The horizontal cursor was transferred to background intensity level. This operation was done at 340 nm and 360 nm for both image data. B. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ distribution was done calculated using the background value 75 at 340 nm and that of 25 at 360 nm. C. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ distribution calculated for a background of 25 at both 340 nm and 360 nm. Comparing B with C, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ express plausible distribution. Around of the cell point out very different $[\text{Ca}^{2+}]_i$. However, the inner part of the cell shown has the almost same concentration. The measurement conditions: objective lens, $\times 20$; intermediate lens, $\times 1.5$; photoeyepiece lens, $\times 6.7$; and integration times 4. The numbers shown on the right side of the VDT is the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM) indicated by the square cursor in the distribution image.

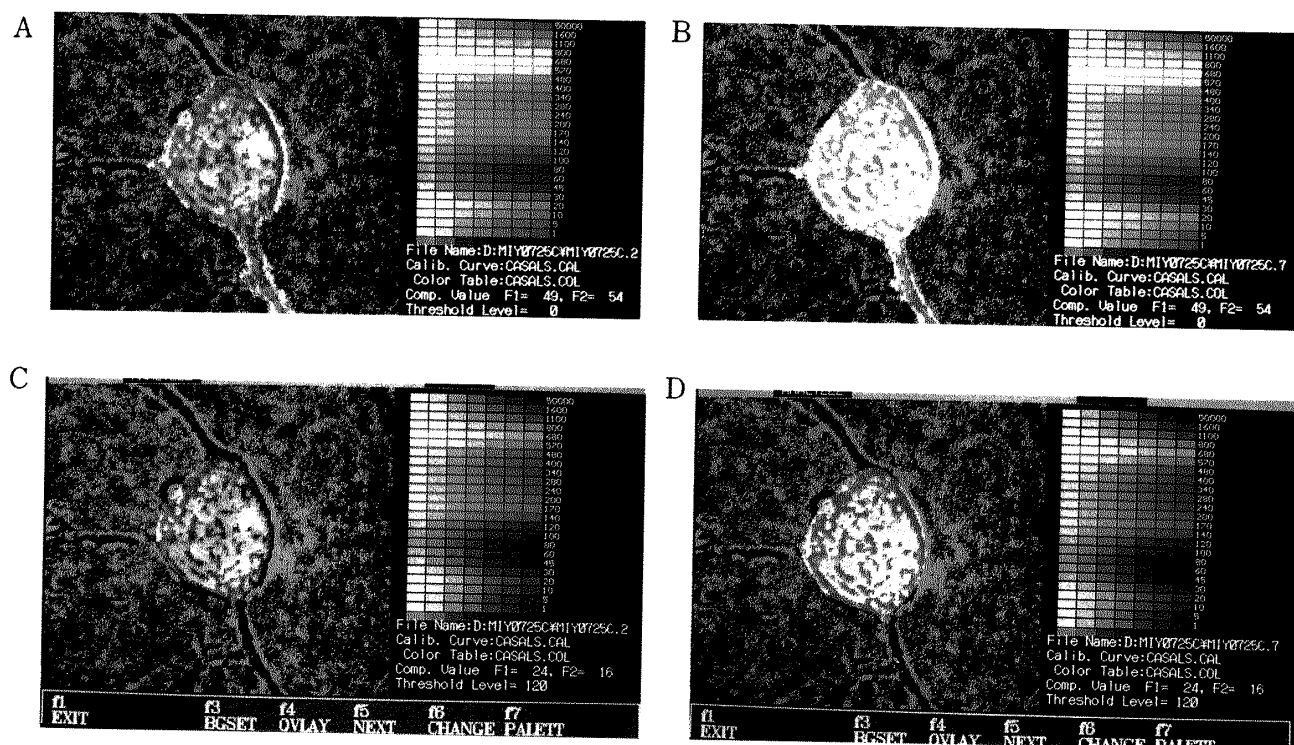


Fig. 3 Comparison of two estimation methods for background fluorescence intensity

A, B. Conventional estimation method. C, D. Improved estimation method. $[Ca^{2+}]_i$ distribution of the A and B was pushed beyond the border of the superimposed cell image. However, C and D images show good correspond with $[Ca^{2+}]_i$ distribution and the cell image obtained by transmitted light. A, C and B, D are the same data, respectively. The measurement conditions are the same as Fig. 2. A and C, before stimulation with 50 mM KCl; B and C, after the stimulation at 8 s.

ズ的な $[Ca^{2+}]_i$ 分布を表示しないように、やや高いバックグラウンド強度を指定する傾向があるためである。

細胞像と $[Ca^{2+}]_i$ 分布を重ね合わせて表示してみると、従来のバックグラウンド推定法の問題点が明確になっている。従来法によるFig. 3A, B では細胞からはみ出した部分にまで $[Ca^{2+}]_i$ 分布が表示されている。しかも、Fig. 3B では、細胞の存在しない部分の $[Ca^{2+}]_i$ 分布が上昇して見える。

一方、重ね合わせ法で決定したバックグラウンド蛍光とハレーション強度を使用した場合は、細胞像と $[Ca^{2+}]_i$ 分布はよく一致している (Fig. 3C, D)。そして、細胞像と一致した部分の $[Ca^{2+}]_i$ 分布は、従来法と重ね合わせ法のどちらのバックグラウンド蛍光強度を用いても、ほぼ同じ濃度を示している。しかし、この例ではバックグラウンド蛍光とハレーションの強度を細胞体の部分で推定したため、神経突起部分の $[Ca^{2+}]_i$ 分布は表示されていない。

3.3 考察

$[Ca^{2+}]_i$ 分布測定上の問題点の一つである、細胞周辺部の異常な $[Ca^{2+}]_i$ が、細胞構造と $[Ca^{2+}]_i$ 分布の対応を取ることで防止できるようになった。同様な現象が、 Ca^{2+} 以外に、 Mg^{2+} や K^+ , Na^+ , Cl^- などでも生じることを考えれば、広い応用領域があるであろう。又、細胞だけにとどまらず、組織切片などでも周辺部の $[Ca^{2+}]_i$ 異常が認められることが多いため、細胞や組織中での Ca^{2+} の生理的機能や役割を解明するために重要な実験手段になるであろう。

1 個の細胞でも、例えば、神経細胞の細胞体と神経突起のように、細胞の部分により蛍光強度が異なれば、ハレーション強度も異なる。従って、この報告で述べた方法では、観察したい場所によりハレーション強度を最適化する必要がある。Fig. 3 に示したように、神経細胞では、細胞体と神経突起の両方の $[Ca^{2+}]_i$ 分布を同時に正確に表示するのは困難であった。

コンピュータプログラムによる細胞の輪郭抽出が行

えれば、この問題点を解決し、しかも、自動的にバックグラウンド蛍光強度を決定できる可能性がある。輪郭の抽出を行うには不均一な照明による背景を局所の変換⁷⁾により補正し、二次元二次微分⁸⁾を行うことで可能である。しかし、今回は輪郭抽出は試みなかった。サンプルが孤立した1個の細胞であるとは限らないことや、不均一な照明により常に抽出が成功するとは限らないためである。又、使用したパーソナルコンピュータの性能から、処理に時間がかかりすぎるという問題もあり、今後の課題としたい。

測定機器の画像処理プログラムの改良を手伝っていただいた牧野 徹氏 {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} と実験にご協力いただいた尾崎一穂博士 {オリンパス光学工業(株)第二開発部} に感謝します。

文 献

- 1) G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien: *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440 (1985).
- 2) R. Y. Tsien, M. Poeni: *Tr. Biochem. Sci.*, **11**, 450 (1986).
- 3) A. Ogura, M. Nakazawa, Y. Kudo: *Neurosci. Res.*, **12**, 606 (1992).
- 4) M. Konishi, A. Olson, S. Hollingworth, S. M. Baylor: *Biophys. J.*, **54**, 1089 (1988).
- 5) 宮川厚夫: 分析化学, **41**, T113 (1992).
- 6) 宮川厚夫, 牧野 徹, 玉川 彰, 尾崎一穂: 分析化学, **38**, 643 (1989).
- 7) 河田 聡, 埜田友也, 南 茂夫: インターフェース, **137**, 172 (Oct., 1988).
- 8) 河田 聡, 南 茂夫: インターフェース, **137**, 192 (Oct., 1988).



Improved method of estimating background fluorescence intensity for intracellular free calcium ion distribution with video fluorescence microscopy.

Atsuo MIYAKAWA (Department of Medical Photonics, University of Hamamatsu School of Medicine, 3600, Handa-cho, Hamamatsu-shi, Shizuoka 431-31)

The distribution of intracellular free calcium ion concentration ($[Ca^{2+}]_i$) is measured using a fluorescent calcium indicator dye and video fluorescence microscope. In many cases, the $[Ca^{2+}]_i$ distribution around cells is unusually concentration. This well-known phenomenon is due to the halation from the fluorescent cell images. The $[Ca^{2+}]_i$ distribution containing the halation is usually calculated by a conventional background estimation method. In the improved method, three types of background fluorescence intensity are distinguished. Two types are the same as the conventional background intensity. The third is halation intensity. The estimation of halation intensity is performed as follows. The first step is the display of superimposed fluorescent image and cell image obtained by transmitted light microscopy. The second step specifies the halation intensity by the fluorescence intensity at the edge of the cell. The $[Ca^{2+}]_i$ distribution is calculated only from that fluorescent intensity which exceeds the halation intensity. By this improved estimation method, the $[Ca^{2+}]_i$ distribution correspondence to the microscopic cell images could be obtained.

(Received June 4, 1992)

Keyword phrases

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