

画像解析による培養ラット神経細胞内 Ca 濃度測定

中島一樹*・三輪泰生**・吉村利晴**・新貝鋤蔵***
原田有彦****・岡田秀希*・蛭名良雄*

Measurement of Free Ca From Digital Images in Cultured Rat Brain Neurons

Kazuki NAKAJIMA, Yasuo MIWA, Toshiharu YOSHIMURA, Ryuzo SHINGAI
Kunihiko HARADA, Hideki OKADA and Yoshio EBINA

Abstract

Recently it has been reported that the intracellular Ca^{2+} concentration of neurons can be obtained by analyzing suitably the intensity of the fluorescent light of 500nm emitting from the neurons loaded with fura-2 when they are excited by the light of 340,360 or 380nm. The present paper represents the measurement of free Ca^{2+} distribution in the cultured rat hippocampal neurons using the digital analysis system, ARGUS100/CA. The ratio images are obtained from the ratio of the brightness of the pixels in the picture obtained by the excited light of 340nm to that in the images obtained by the excited light of 360nm. In order to obtain the intracellular Ca^{2+} concentration from the ratio images, the corrected *in vitro* calibration curve is calculated by multiplying 0.85 to the values obtained from the intensity of F_{\max} and F_{\min} . This multiplication considers the effect of cytoplasmic microviscosity in the intracellular region of the neuron. The intracellular free Ca^{2+} concentration obtained is about $8 \times 10^{-8}\text{M}$ in the resting state of the neurons. After application of the neural transmitter L-glutamate of 10^{-4}M , the level of Ca^{2+} increases to about $6 \times 10^{-7}\text{M}$. These Ca^{2+} levels agree with the data reported by other groups.

1. 緒 言

我々はすぐれた情報処理機能をもつ脳の働きの解明にはまず、脳を構成している神経細胞の働きを理解することが必要であるとの立場に立っている。脳内の神経細胞は非常に複雑な回路網を作り情報を伝達処理している。この情報伝達処理においてカルシウムイオン (Ca^{2+}) は、セカンドメッセンジャーとして非常に重要な働きをしている¹⁾。神経細胞内の Ca^{2+} 濃度 (以下

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ と略) は 10^{-7}M 程度で、細胞外での濃度 10^{-3}M との間に大きな濃度勾配を保っている。そして刺激がきたときに 10^{-4}M にも及ぶ濃度勾配にしたがって Ca^{2+} を細胞内へ流入させ、それをシグナルとして用いる²⁾。

脳の海馬神経細胞は学習や記憶に関係するといわれている。ラットの脳から取り出したこの細胞を培養し、試料として用いる。この培養細胞に、神経情報伝達物質(グルタミン酸, その作用薬である NMDA (N-methyl-D-aspartic acid), キスカル酸, カイニン酸など)を投与したときの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分布の時間変化を、カルシウムインジケータ (fura-2)²⁾³⁾⁴⁾を用い画像の輝度変化として捕らえ、各細胞の応答の違いから刺激伝達処理機構を解明することを目的としている。

本論文ではその研究の予備的な結果を述べる。すな

* 電気工学科

** 大学院電気工学専攻

*** 薬理学教室

**** 脳神経外科

われら $[Ca^{2+}]_i$ の時間変化を定量的に得るために必要な、我々の測定系における脳細胞での校正曲線の決定、そしてそれを用いた脳細胞体での $[Ca^{2+}]_i$ の時間変化解析結果例を述べる。校正曲線についてはすでにいくつかのグループが報告²⁵⁾している。しかし測定系によって違いがあるため、我々はまずそれを決めることにした。

2. 実験

2-1: 細胞培養

海馬神経細胞をラット胎児(19-21日目)から採取し、酵素(トリプシン)処理で単離した。単離した細胞を、シリコンゴム壁(Flexiperm-Disk, Heraeus Biotechnology)をカバーガラス(マツナミ0.13mm厚)に密着させた容器に培養液と共にまいた。そして5-14日間インキュベータ内(5%CO₂, 37°C)で培養した。培養液(Eagle's MEM+5%牛胎児血清)は1週間に3回交換した。

2-2: Fura-2の負荷法

最終濃度4 μ Mのfura-2/AM²⁶⁾を5分間超音波分散させた細胞外液(145mM NaCl, 6mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 0.5mM NaH₂PO₄, 12.5mM glucose, 5mM HEPES(pH 7.25))⁷⁾を培養液と交換する。その後30-60分間インキュベータ内で保持すると、fura-2/AMは細胞膜を通り細胞内でfura-2となる。測定前に、余剰の細

胞外fura-2/AMを除去するため細胞外液を交換し、再びインキュベータ内で10分間保持した。

2-3: 細胞の蛍光像測定

Fig. 1は測定および解析の流れを示すシステム図である。Xeランプと半値幅10nmの励起フィルタから340nmと360nmの2波長光が得られる。この2波長光を順に倒立顕微鏡で観察中の細胞にあてる。340nmと360nm光で励起²⁴⁾された蛍光像(以下340像, 360像と略)は、中心波長500nmの光を通す半値幅20nmの吸収フィルタを通り超高感度カメラ(SITカメラ)に入る。蛍光像は電気信号となり画像処理装置(ARGUS-100/CA, 浜松ホトニクス株)に取り込まれる。測定結果はフロッピーディスクに保存された。

実験開始から終了まで培養容器に細胞外液を流し続けた。また測定は、室温(25 \pm 5°C)で行なった。

2-4: 解析装置及び解析前処理

画像は8bitの輝度情報(256階調)で、測定枚数(n)と構成画素数(x \times y)の積(n \times x \times y)が最大3Mバイトまで取り込まれる。最大画素数は512 \times 483であり、このときの最大測定画像枚数は12枚である。ただしnは作業用とSITカメラ無信号時の画面(暗電流像)を1枚ずつ、そしてfura-2退光補正用360像を2枚含むため、最大画素数では340像を8枚までしか測定できない。360像は、測定する一連の340像の前後にそれぞれ1枚ずつ測

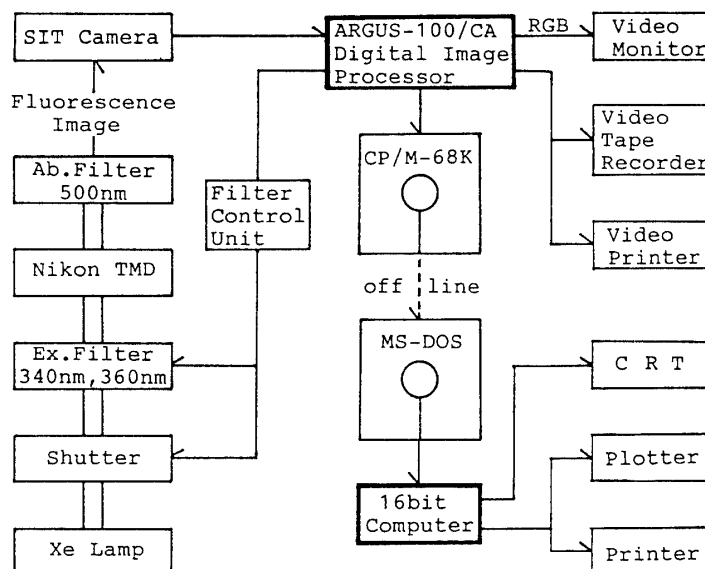


Fig. 1 Schematic illustration of measurement and analysis system of the digital images.

定される。全測定終了後、各340像に対応する360像が自動的に計算される。340像の最短測定時間間隔は1/30秒である。

ARGUS-100/CAはCP/M-68K上のプログラムで制御されている。このプログラムでは2枚の測定画像をフレームメモリ1画面として扱っている。つまり偶数番号測定画面の輝度を16bitの下位8bitに、続く奇数番号測定画面の輝度を16bitの上位8bitに各画素毎、割り当てている。しかし、我々はMS-DOS上で解析プログラムを開発している。8086系CPUでは画像のアドレス計算において、測定画像の輝度を1画面づつ扱う方が便利である。したがって、CP/M-68K上で得られた測定データをDOS変換と画像を1画面毎測定順に並べ変えた後に、MS-DOS上の解析用データとした。

2-5: 解析法

比画像は340像と360像を基にして(1)式で求まる。

$$I_{ratio} = (I_{340} - I_{dark}) / (I_{360} - I_{dark}) \quad (1)$$

ここで I_{ratio} , I_{340} , I_{360} , I_{dark} は各々比画像, 340像, 360像, 暗電流像の信号強度(輝度)を示す。各340像の全画素に(1)式を適用し、測定した340像と同枚数の比画像を得る。Fig. 2に8日間培養し、60分間fura-2/AMを負荷した単一神経細胞の位相差顕微鏡像(a), 340像(b), 360像(c)の輝度の3次元表示図、及び比画像(d)の3次元表示図を示す。(b)(c)(d)の画像は128×120画素で構成されている。

Fura-2には次のような性質がある。 I_{340} は Ca^{2+} 濃度に

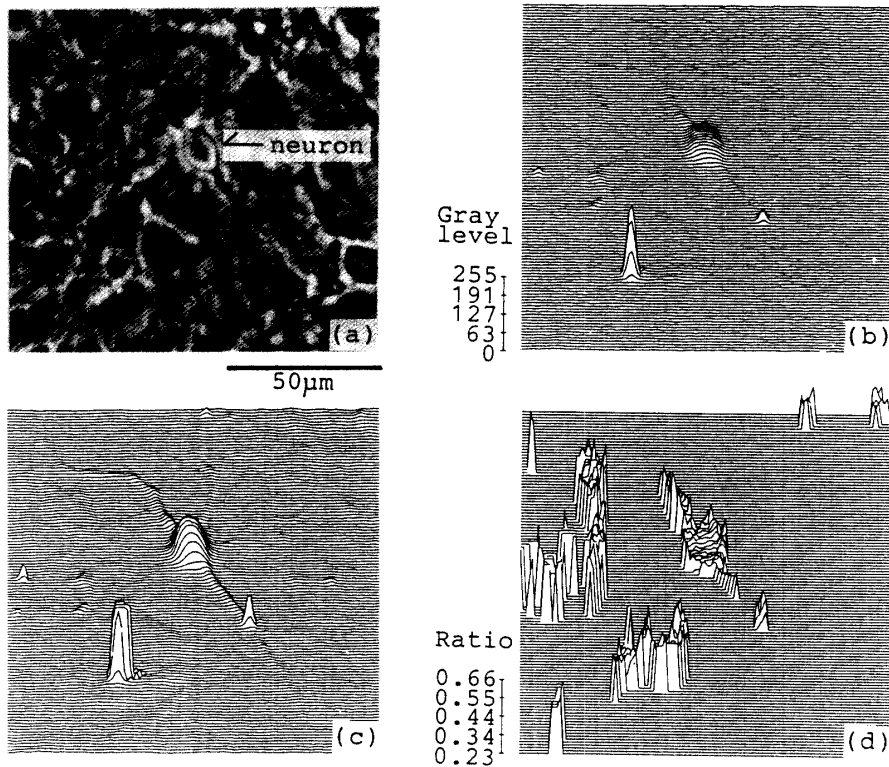


Fig. 2 Pictures of cultured rat hippocampal neuron. (a) : photograph of neuron taken by the phase contrast microscope, (b) : stereo-plot of digital image (IM340), (c) : stereo-plot of digital image (IM360), (d) : stereo-plot of ratio image (IM340/IM360). The digital images IM340 and IM360 are obtained from the fura-2 loaded neuron irradiated by the exciting light of central wavelength of 340nm and 360nm, respectively. The ratio image (IM340/IM360) is constructed from the ratio of the pixel intensity of IM340 to the corresponding one of IM360. Photograph (a) and 3 digital images (b, c, and d) correspond to the same area of the neuron. Horizontal bars indicate 50µm.

依存するが I_{360} は依存しない。(1)式の I_{340} を I_{360} で割る方法を用いれば、細胞内のfura-2濃度の違い、励起用光源の照明むら、細胞の厚みなどの条件に依存しない Ca^{2+} 濃度を測定できる。比画像は Ca^{2+} 濃度分布を定性的に表わすことになる。この比画像から Ca^{2+} 濃度分布を得るためには、更に比画像の各画素毎に後で示す較正曲線を用いて変換する必要がある。

2-6: 較正曲線

2-6-1: 器具の洗浄

ここで使用する器具を、全て0.1mM HCl, 1mM EGTA (Ethyleneglycol bis(2-aminoethylether) tetraacetate acid), 再蒸留水で各10回づつ洗浄し、無菌実験台上で乾燥させた。

2-6-2: Ca^{2+} -EGTA 緩衝液の調整

1mM $CaCO_3$ と1mM EGTAを、Table 1に示す割合で混合しNo.1-7の Ca^{2+} 溶液を作製した。このとき2倍濃度のBufferとして130mM KCl, 20mM NaCl, 10mM MOPS(3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)を使用し、pHは20°Cで7.05にKOHで調整した。Fura-2を各液に分注するとき、その分注量が微量なため分注誤差を生じやすい。これをなくすため、Bufferの全量(10.5mL)にfura-2の全量(73.5 μ L)を溶かしてから分注した。最終fura-2濃度は3.5 μ Mとした。

2-6-3: 蛍光強度比(340nm/360nm)と蛍光スペクトル測定

得られた各 Ca^{2+} -EGTA緩衝液を2-1の細胞培養に使用している容器に約0.5mLづつとり、Fig.1のシステムで340nmと360nmの蛍光強度比を測定した。

各 Ca^{2+} -EGTA緩衝液を分光蛍光光度計(HITA-

CHI,650-10S)で励起波長300nm-400nmまで、500nmの蛍光波長で測定した。このときスリット幅は2nmとした。

各測定は、温度20°Cで行なった。

2-7: 薬物投与の方法

薬物は外径0.8mm ϕ の曲げたパイプの先端部の穴(直径約40 μ m)から加圧により細胞に与えられた⁹⁾。パイプの穴と細胞の距離は約1-1.5mmである。

3. 結果と討論

3-1: Fura-2の負荷法について

1985年にTsien⁹⁾らによって、 Ca^{2+} 蛍光性指示薬fura-2が開発された。この色素は親水性であるため細胞膜を通過できない。そのためfura-2のカルボキシル基をすべてアセトキシメチル基でエステル化して、電荷を中和した形のfura-2/AM(疎水性)を用いる。

細胞膜を通過したfura-2/AMは、細胞自身の非特異的エステラーゼによりもとの遊離酸となり細胞質内へ放出される²⁾⁶⁾。

現時点では、常用しているfura-2の負荷時間は30-60分間である。しかし、この負荷時間は次のことがあり、まだ検討の余地がある。15分間程度でも細胞が十分量の蛍光を発することや、逆に90分間程負荷しても測定可能な蛍光強度を得られないこともあるが、現段階ではこれらの原因は不明である。そのため最終fura-2/AM濃度や負荷時間を変化させ、安定した負荷条件を求めべきであろう。

3-2: 蛍光像と比画像の測定結果

Fig.2(b)(c)では細胞体中央に大きなピークをもっている。しかし、比画像の(d)では細胞壁付近や樹状突起

Table 1 The composition of Ca^{2+} -EGTA solution.

No.	Ca^{2+} Conc. nM	1mM $CaCO_3$ mL	1mM EGTA mL	$\times 2$ Buffer mL	1mM fura-2 μ L
1	0	0.0	1.5	1.5	10.5
2	16	0.1	1.4	1.5	10.5
3	39	0.2	1.3	1.5	10.5
4	71	0.3	1.2	1.5	10.5
5	122	0.4	1.1	1.5	10.5
6	214	0.5	1.0	1.5	10.5
7	5×10^5	1.5	0.0	1.5	10.5

付近にピークが認められる。また(b)(c)(d)画像中の左下にピークが認められるが、(a)から判断して神経細胞以外の組織である。Tsienらは平滑筋細胞で核や筋小胞体そして細胞体周辺の $[Ca^{2+}]_i$ が高いと報告⁵⁾している。我々の結果でも細胞体周辺の Ca^{2+} 濃度が高いという同様の結果が得られた。しかし、細胞体内に存在する核などの $[Ca^{2+}]_i$ 分布は認められず、この原因は細胞の違いによるものか、画像の解像度不足であろうと考えられる。

3-3: 較正曲線

Table 1の Ca^{2+} 濃度は計算値であるが、実際は空気中のほこりや分注誤差により多少の実験誤差を生じる。したがって、各液の蛍光強度を測定し正確な Ca^{2+} 濃度を求める必要がある。

Fura-2の Ca^{2+} -EGTA緩衝液の蛍光スペクトル測定結果をFig. 3に示す。各液の蛍光強度は波長340nmでは Ca^{2+} 濃度の増加と共に大きくなるが、波長360nmでは Ca^{2+} 濃度に依存せず一定値である。前述したように、fura-2のこの性質を利用して Ca^{2+} 濃度を測定する。すなわち波長340nmにおいて各液(No.2-No.6)の蛍光強度(F), 0- Ca^{2+} 溶液(No.1)の蛍光強度(F_{min})と飽和

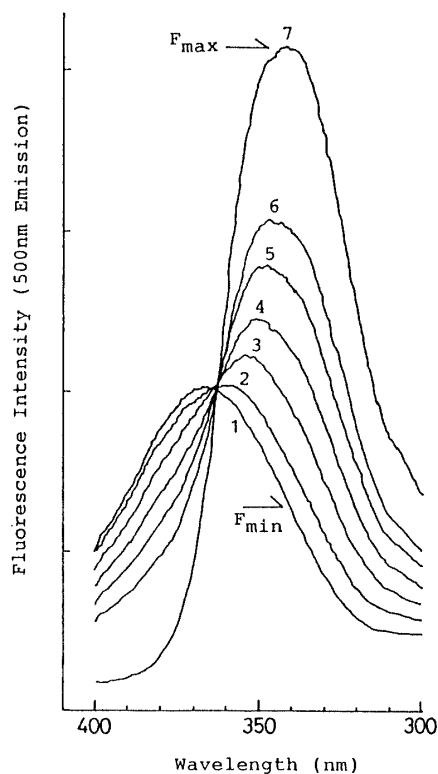


Fig. 3 Excitation spectra of $3.5\mu M$ fura-2 at $20^\circ C$.

Ca^{2+} 溶液(No.7)の蛍光強度(F_{max})から、(2)式⁹⁾を用いて各液の真の Ca^{2+} 濃度を求めた。

$$[Ca^{2+}] = Kd(F - F_{min}) / (F_{max} - F) \quad (2)$$

ここでKdは Ca^{2+} の解離定数であり、本研究でもTsienらが報告している $135nM$ ⁹⁾を用いた。

Fura-2には*in vivo*で粘度の影響を受け減光する性質がある。またfura-2は Ca^{2+} キレート剤の1種であるため、キレート効果により $[Ca^{2+}]_i$ を低く見積る可能性がある⁹⁾。したがって、*in vitro*(Ca^{2+} -EGTA緩衝液)で得られた F_{min} と F_{max} に補正係数(0.85)¹⁰⁾を乗じた値を用いた。

これらから得た蛍光強度比値と $[Ca^{2+}]_i$ の関係をFig. 4に示す。Fig. 4は5個の測定データから算出した。このときの Ca^{2+} 濃度範囲は約 $30nM$ - $500nM$ である。したがってこの濃度範囲外で較正曲線を外挿して、低濃度域や特に $500nM$ を越える高濃度域に使う場合、多少の誤差を生じる可能性があることに注意すべきだろう。測定で得られた比画像(Fig.2d)とFig. 4から $[Ca^{2+}]_i$ が得られる。

3-4: 較正曲線の検討

前節で我々は、粘度補正を行なった較正曲線を比画像(Fig.2d)の各画素毎の値に適用して、それぞれの点での $[Ca^{2+}]_i$ を得ることを提案した。ここでは補正を行なって得たFig. 4の妥当性について $[Ca^{2+}]_i$ を求め、

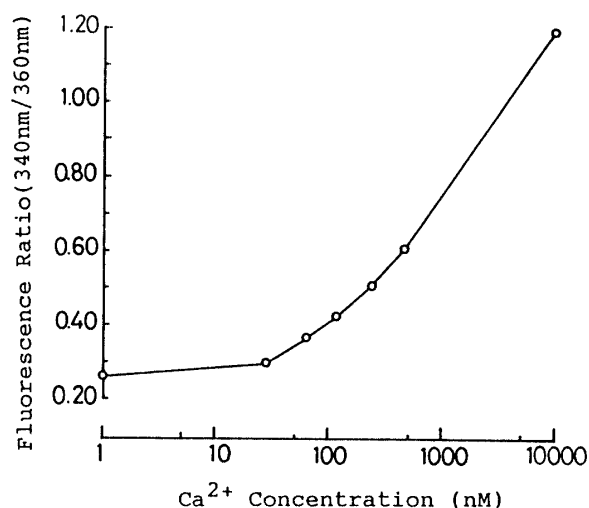


Fig. 4 Corrected *in vitro* calibration curve. The line is drawn by connecting the experimental data (open circles) corrected by the factor 0.85.

他の人々の結果と比較して検討する。

Fig. 2 とは別のやはり 5 日間培養した細胞に、神経伝達物質である $100\mu\text{M}$ の L-glutamate を投与した例を示す。測定画像には 5 個の神経細胞が存在した。Fig. 5 に、反応を示した神経細胞体の細胞全体の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 時間変化の代表例を示す。図中の横棒で示す間 (12 秒間) 薬物を投与した。測定画像の全細胞 (5 個) について $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の平均と標準偏差 (mean \pm s. d.) は、薬物を投与しない状態 (以下静的状態と略) で $82 \pm 11\text{nM}$ 、薬物により $657 \pm 235\text{nM}$ まで上昇し再び静的状態にもどった。我々が範とした工藤氏らの実験⁴⁾と比較してみよう。試料は培養海馬神経細胞で我々と同じであるが、薬物投与の方法が少し異なる。すなわち測定時に流す細胞外液中に薬物を混ぜる方法で、L-glutamate を $0-100\mu\text{M}$ まで変化させ投与している。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は静的状態で約 30nM であり、最も高濃度である $100\mu\text{M}$ の投与で約 500nM まで上昇している。我々の測定結果より静的状態の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は小さいが、薬物による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は我々と近い値である。また、Shawn¹¹⁾らは同様の実験をマウスの single striatal neuron について行っている。彼らは薬物をピペットからわずかな時間だけ吹き付ける方法を用いている。この投与方法では、薬物量が少ないという点で我々の実験方法と似ている。その結果は静的状態で 56nM であり、 $100\mu\text{M}$ の L-glutamate 投与では約 300nM 程度まで上昇している。

これらの結果はどれも、我々の測定値より小さくなっている。この大きな原因として、我々は粘度補正を行なった較正曲線を使用していることが考えられる。我々の場合でも、もし補正係数を 0.85 でなく 1.0 、すなわち粘度補正を行なわない較正曲線を使うと、静的状態で $47 \pm 6\text{nM}$ 、薬物投与で $242 \pm 58\text{nM}$ と小さい値を示す。

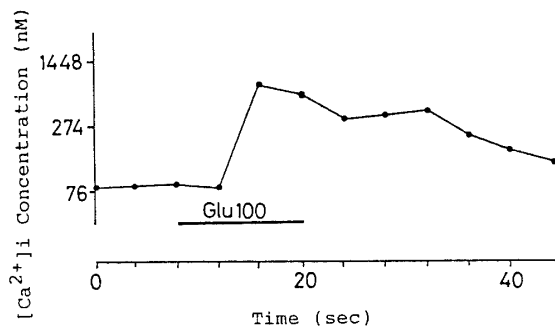


Fig. 5 Elevation of intracellular free Ca^{2+} concentration induced by L-glutamate. L-glutamate of $100\mu\text{M}$ is applied during the horizontal bar (Glu100).

上で取り上げた工藤氏ら、Shawn らはいずれも粘度補正を行っていないので、この我々の補正無しの場合と彼らの値を比較すると、静的状態では両グループと近く、また薬物投与による値は Shawn らと近くなるが、工藤氏らよりもかなり小さくなっている。工藤氏らの値が大きいのは、細胞が正味として感じる薬物量が我々や Shawn らの場合よりも多いためではないだろうか。

すでに上で述べたように fura-2 による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定では、*in vitro* での較正曲線を用いると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を低く見積る可能性があり、粘度補正を行なった較正曲線を使うことを提案した。もし我々の Fig. 4 の補正した較正曲線を使ったことを想定すると、工藤氏ら、Shawn らの結果の値は大きくなり、我々の値に近くなることが予想される。特に工藤氏らの薬物による値は我々よりも大きくなるのが予想されるが、これは実効的な薬物投与量が多いことから納得できるだろう。

今後より正確な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を求めるためには、補正係数を Tsien¹⁰⁾らのように 0.85 とするのがどの程度まで正しいのか、また Kd 値の吟味などを検討すべきである。

4. まとめ

カルシウムイオンのインジケータである fura-2 を用い、340 像と 360 像の比画像と粘度補正をした較正曲線から海馬培養神経細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定した。比画像より海馬培養神経細胞にも $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分布があることがわかった。得られた較正曲線は、 $30-500\text{nM}$ 程度の Ca^{2+} 濃度域において妥当なものであった。我々の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定結果は他のグループの報告より、較正曲線に粘度補正を行なったため $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の静的状態、薬物により上昇した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ とも大きな値であった。

今後、刺激伝達機構を解明するために薬物の種類や濃度を変化させ、細胞応答の違いを調べる必要がある。

参考文献

- 1) 葛西道生・吉岡亨・木島博正・塚原保夫・栗原堅三・鈴木英雄, 神経情報伝達分子, pp72-79, 培風館, 1988
- 2) 小倉明彦・工藤佳久, 海馬神経細胞での細胞内 Ca 濃度の測定, 生体の科学, vol38, pp597-603, 1987
- 3) G. Grynkiewicz, M. Poenie and R. Y. Tsien, A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties, J. Biol. Chem., vol260, pp3440-3450, 1985
- 4) Y. Kudo and A. Ogura, Glutamate-induced increase in intracellular Ca^{2+} concentration in isolated hippocampal neurones, Br. J. Pharmacol.,

- vol89, pp 191-198, 1986
- 5) David A. Williams, Kevin E. Fogarty, Roger Y. Tsien and Fredric S. Fay, Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2., *Nature*, vol318, pp558-561, 1985
 - 6) 中林洋・駒田洋・中野洋・伊豆津公作, Fura-2による細胞内カルシウム濃度測定法, *細胞工学*, vol15, pp996-1003, 1986
 - 7) R. Shingai and Y. Ebina, Some properties of membrane current fluctuations induced by kainate, quisqualate, and NMDA in cultured septal neurons of rat., *Brain Res.*, vol448, pp198-203, 1988
 - 8) 永岡諭・蛭名良雄・新貝御蔵・橋本基, 培養脳細胞の全膜電位固定法, 及び局所的膜電位固定法によるグルタミンイオンチャネル特性の解析, *山口大学工学部研究報告*, vol39, pp251-257, 1988
 - 9) 小川靖男, 細胞内情報伝達物質としてのカルシウムイオン, *ぶんせき*, vol2, pp111-118, 1989
 - 10) M. Poenie, J. Alderton, R. Steinhardt and R. Tsien, Calcium rises abruptly and briefly throughout the cell at the onset of anaphase, *Science*, vol233, pp886-889, 1986
 - 11) Shawn N. Murphy, Stanley A. Thayer, and Richard J. Miller, The effect of excitatory Amino Acid on intracellular calcium in single mouse striatal neurons *in vitro.*, *J. Neuroscience*, vol7, pp4145-4158, 1987

(平成元年4月15日受理)