

## 技術報告

データ処理による細胞内遊離カルシウムイオン濃度分布の  
ビデオ蛍光顕微鏡像と細胞構造との対応法

宮川 厚夫\*

(1992年5月23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、細胞の顕微鏡像とカルシウムイオン分布像を重ね合わせて表示するシステムを作成した。このシステムは、ソフトウェアで2種類の画像を重ねて表示できるようにしたもので、細胞像は7段階の白黒で、カルシウムイオン分布は24色で表示される。細胞像は、通常の透過光像以外に、ノマルスキー微分干渉像など、目的にあった種類が利用できる。この結果、カルシウムイオン分布と細胞構造の対比が容易になり、細胞内分布のみならず、組織切片など種々のサンプルのカルシウムイオン分布の研究にも有用であると考えられる。

## 1 緒 言

生きている単一の細胞で、細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 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るようになってきている<sup>1)2)</sup>。又、 $[Ca^{2+}]_i$  以外にも、種々のイオンに対する蛍光性プローブ試薬が容易に入手できるようになり、応用範囲も広がっている<sup>3)4)</sup>。そして、脳神経系における記憶と学習のメカニズムや、免疫系の応答など、数多くの生命現象を研究するための一つの実験方法として定着しつつある<sup>5)6)</sup>。

実験法も、蛍光分光光度計での測定から、蛍光顕微鏡による測定<sup>7)</sup>、又、光ファイバーを利用した生体組織中での測定<sup>8)</sup>まで広がりを見せている。一方、蛍光顕微鏡を用いた  $[Ca^{2+}]_i$  分布を測定する場合でも、細胞内組織構造と対比付けて議論されることは少ない。これは、市販の  $[Ca^{2+}]_i$  分布測定機器が、ここまでの機能をサポートしていないためでもある。しかし、これらの機器は、基本的には、顕微鏡と画像処理装置を組み合わせた装置であるため、比較的容易に  $[Ca^{2+}]_i$  分布像と顕微鏡像を重ね合わせることが可能であり、 $[Ca^{2+}]_i$  分布と細胞構造の対応をとることができる。

ここでは  $[Ca^{2+}]_i$  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、 $[Ca^{2+}]_i$  分布像と、通常の顕微鏡像を重ね合わせて表示できるシス

テムを作成した。そして、 $[Ca^{2+}]_i$  分布像と透過光像、及び、ノマルスキー微分干渉像との重ね合わせを行った。

## 2 実 験

## 2.1 測定機器と実験材料

測定機器は、倒立型落射蛍光顕微鏡 IMT-2-21-CA3 (オリンパス) と SIT 撮像管 C2741-08 (浜松ホトニクス)、フレームメモリー DVS-3000 (浜松ホトニクス)、及び、パーソナルコンピュータ PC-9801VX41 (日本電気) で構成される。これは、文献<sup>7)</sup>に示した装置と同じである。測定に用いる培養器具や、薬物刺激装置、又、蛍光性カルシウム指示薬 Fura-2 などの試薬類も、文献<sup>7)</sup>と同じ種類を用いた。

又、測定に使用した培養細胞は、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。細胞の培養条件と、Fura-2 のロードは文献<sup>7)</sup>と同一に行った。

## 2.2 測 定

測定は、Fig. 1 に示した手順で行った。細胞試料のセットなど、基本的な操作は文献<sup>7)</sup>と同じであるが、蛍光測定の前に、細胞の透過光像やノマルスキー微分干渉像などをコンピュータに取り込む操作が加わった。

顕微鏡像の入力は、蛍光測定の前にコンピュータの VDT (video display terminal) 画面に指示が表示されるので、これに従って、顕微鏡の光路を目的の観察モード

\* 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

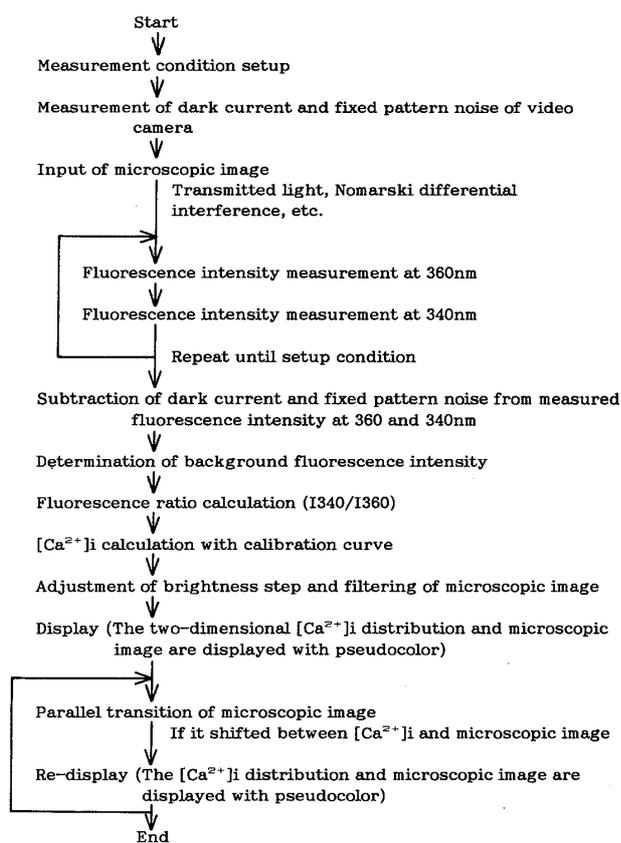


Fig. 1 Sequence of measurement and image processing

に切り替えてから、キーボードのキーを押すことで行われる。そして、蛍光測定の光路に戻してから、 $[Ca^{2+}]_i$  測定のための蛍光測光を開始させる。

ただし、透過光像の観察では、蛍光励起光を遮へいし、透過光照明用のタングステンランプを点灯すればよいが、ノマルスキー微分干渉像の観察では、偏光子とノマルスキープリズムを光路中に挿入する必要がある。このため、機械的な振動により、焦点の移動や試料細胞の移動が起きやすく注意する必要がある。又、透過光像や微分干渉像の入力後、蛍光測光の前にピントを合わせ直すことは、特に微分干渉観察の場合、お互いの像の位置が移動するので避けなければならない。なお、微分干渉観察の場合は、ノマルスキープリズムの影響で像の移動が生じるため、プログラム上で一致を取らせた。

又、これらの顕微鏡像の入力にも、蛍光観察用の超高度の 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った。

### 2.3 プログラム

従来の  $[Ca^{2+}]_i$  測定プログラム<sup>7)</sup>は、設定した条件

に従い、2種類の波長で交互に励起した蛍光像を取り込み、各々の画素ごとにバックグラウンド蛍光強度の処理などを行い、蛍光強度比を計算する。更に、検量線を用いて、蛍光強度比から  $[Ca^{2+}]_i$  を求め、カラーコードに従って擬似カラーで  $[Ca^{2+}]_i$  分布像を表示する。

今回のプログラムは、 $[Ca^{2+}]_i$  分布像と細胞の顕微鏡像の重ね合わせを行うため、従来のプログラムに次の2点の処理を追加した。1点目は蛍光測定の前に細胞の顕微鏡像を取り込むことができるようにしたことであり、2点目は、測定結果の表示で、2種類の像を重ね合わせて表示するようにしたことである。

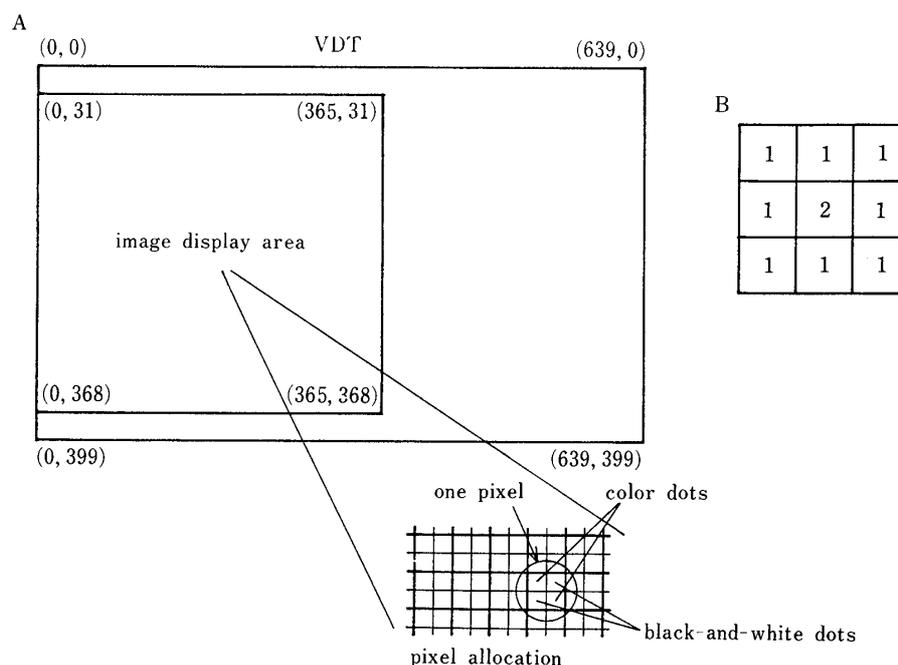
顕微鏡像の入力は、蛍光測定の前に、VDT画面の表示に従ってキーを押すことで、画像データが画像データファイルに入力される。この画像は必要な枚数を入力できるが、蛍光測定の画像データファイルと共用しているので、多くの枚数を入力すると、蛍光測定データの測定数が減少する。実験に用いたシステムでは、パーソナルコンピュータの増設メモリの容量から、両方合わせて60枚まで入力できる。

細胞像と  $[Ca^{2+}]_i$  分布像の重ね合わせは、細胞像を7段階の白黒で、 $[Ca^{2+}]_i$  分布像は文献<sup>7)</sup>と同じ24色で、合計175色で表示した。しかし、使用したパーソナルコンピュータ PC-9801VX41では、1ドット当たり16色しか表示できないため、4ドットで1画素を表示した。(Fig. 2A)これは、もとの画像データが  $183 \times 169$  画素で構成されているため可能であった。

しかし、これでも細胞像は7段階の白黒でしか表現できない。画面を見やすくするため、輝度分布の変換<sup>9)</sup>と、平滑化<sup>10)</sup>を行った。細胞の顕微鏡観察の場合、輝度のヒストグラム分布は明るいほうに片寄っている。従って、フレームメモリに入力された256段階の輝度を単純に7段階に分けて表示すると、多くの場合、細胞の外形を見分けることすら困難である。このため、7段階の輝度に、それぞれ同数の画素数が分布するようにヒストグラム・イコライゼーションを行った。

又、画像のノイズを減少させるため、平滑化フィルターをかけた。平滑化に使用した空間フィルターは Fig. 2B に示した値を使用した。

ノマルスキー微分干渉像観察の場合、 $[Ca^{2+}]_i$  分布像と位置や大きさのズレが生じる。この中で、像の平行移動の影響が最も大きいため、微分干渉像を平行移動して一致させるようにした。このため、VDT画面上で、微分干渉像と  $[Ca^{2+}]_i$  分布像の、それぞれ一致すると思われる点を2か所指定し、この2点の距離の差が最小になるように、微分干渉像を平行移動させた。



**Fig. 2** Representation of superimposed image and spatial filter

A. The VDT used in this experiment represented  $640 \times 400$  dots; however, one dot displayed only 16 colors out of 4096 colors. Therefore, one pixel was comprised of a set of 4 dots and could show 175 colors. Two dots among 4 dots show 24 colors for the  $[Ca^{2+}]_i$  distribution image which is made up of red, green and blue colors combined. The other 2 dots show 7 levels of black-and-white for the display of microscopic image which is made up of black, dark gray, light gray and white combined. B. The  $3 \times 3$  spatial filter value for smoothing of the microscopic image.

### 3 結果と考察

#### 3・1 細胞の透過光像と細胞内遊離カルシウムイオン分布の重ね合わせ

Fig. 3 に NG108-15 の 50 mM KCl 刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  分布変化を示した。蛍光像からのハレーションにより、蛍光強度が大きく異なる細胞体と神経突起の両方の  $[Ca^{2+}]_i$  分布を同時に表示するのは困難である。図では細胞体のハレーションに合わせて  $[Ca^{2+}]_i$  分布を計算したため、細胞体部分の  $[Ca^{2+}]_i$  分布は顕微鏡像とよく一致しているが、神経突起部分の  $[Ca^{2+}]_i$  は表示されていない。

$[Ca^{2+}]_i$  は、刺激前は約 100 nM であったが、刺激後直ちに上昇を始め、約 6 秒で最高濃度 400~600 nM 前後の濃度まで増加した。このように、動きのない細胞では、測定開始前の細胞像でもよい一致をする。そして、細胞のどの部分の  $[Ca^{2+}]_i$  が高濃度であるかを容易に知ることができる。

しかし、顕微鏡像が 7 段階の白黒でしか表示できないため、目視では簡単に確認できる核などの細胞内構造

が不明りょうである。より多色表示のできるコンピュータが利用できるならば解決可能であろう。

#### 3・2 ノマルスキー微分干渉像と細胞内遊離カルシウムイオン分布の重ね合わせ

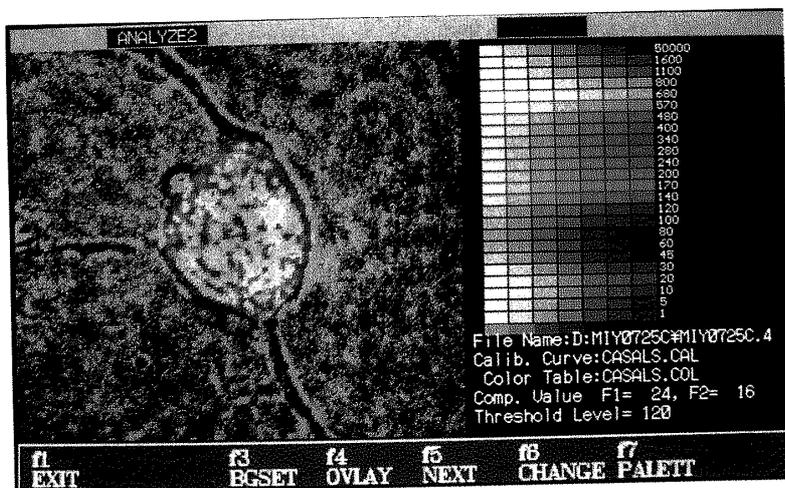
ノマルスキー微分干渉像と  $[Ca^{2+}]_i$  分布像のずれを修正して、重ね合わせを行った例を Fig. 4 に示した。これは、Fig. 3C の  $[Ca^{2+}]_i$  分布データを使用した。

重ね合わせるために、微分干渉像と分布像の、それぞれ一致すると思われる 2 組の点を指定する必要がある。Fig. 4A は 2 組目の  $[Ca^{2+}]_i$  分布像上の点を決めているところである。決定後、2 組の点が最もよく一致するように、微分干渉像が移動する。移動の結果、微分干渉像の上部はデータがなくなり、Fig. 4B の上部は正常に表示されていない。

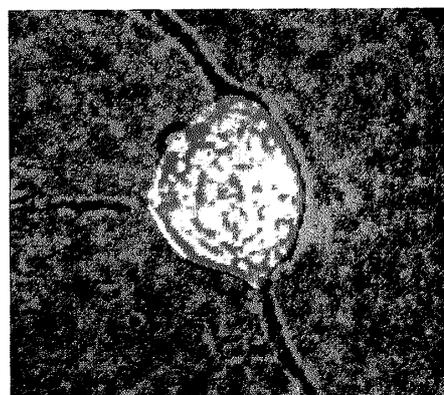
#### 3・3 考察

$[Ca^{2+}]_i$  分布測定機器のプログラムに変更を加えることで、細胞構造と  $[Ca^{2+}]_i$  分布の対応を取ることが可能になった。同様な測定が、 $Ca^{2+}$  以外に、pH や

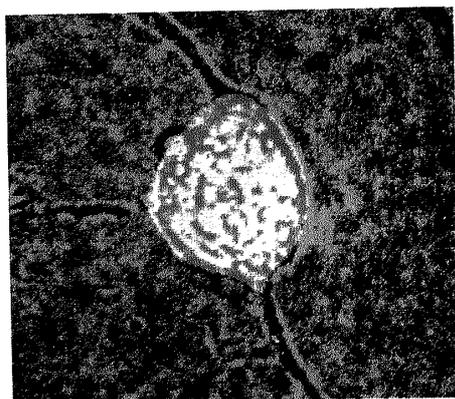
A



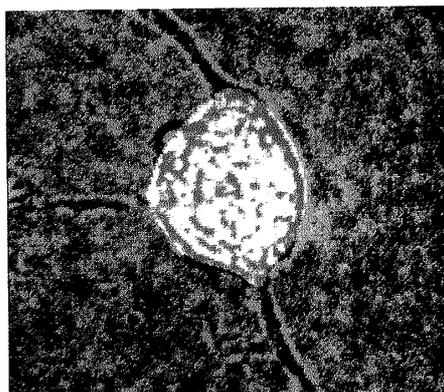
B 0 s



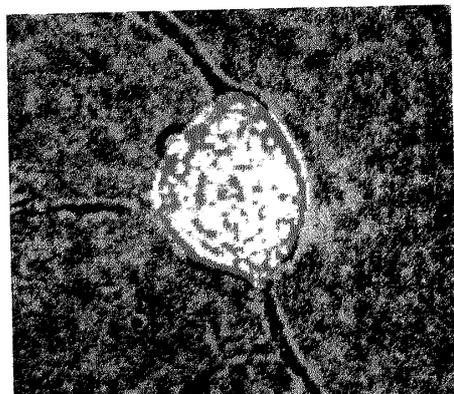
C 4 s



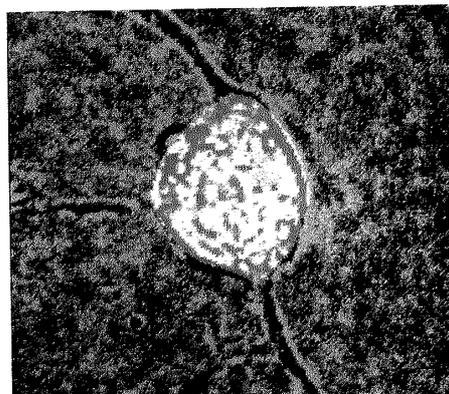
D 8 s



E 16 s

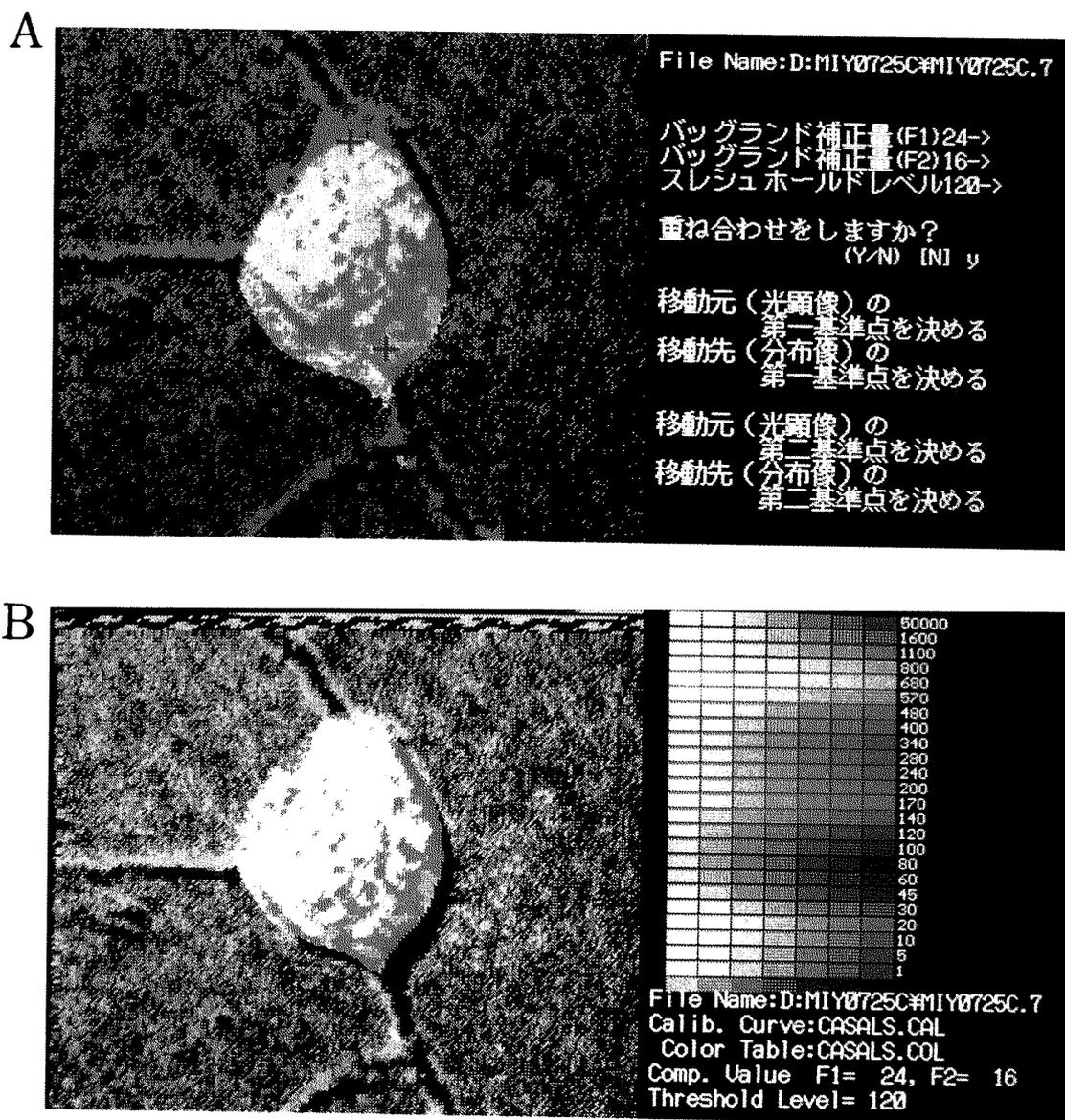


F 56 s



**Fig. 3** Superimposed images of NG108-15:  $[Ca^{2+}]_i$  distribution image and microscopic image with transmitted light

These images were taken at intervals of 4 s, and showed before and after 50 mM KCl stimulation. The upper side numbers on each picture are time(s) after stimulation. A displays a full VDT, and other images only show a part of the cell. The instrument conditions are: objective lens,  $\times 20$ ; intermediate lens,  $\times 1.5$ ; photoeyepiece lens  $\times 6.7$ , and integration times 4.



**Fig. 4**  $[Ca^{2+}]_i$  distribution of NG108-15 upon Nomarski differential interference image  
The  $[Ca^{2+}]_i$  distribution data is the same as Fig. 2C. In the case of observation of differential interference images,  $[Ca^{2+}]_i$  image shifted from microscopic image cause of inserted Nomarski prism, etc. in the optical path way of microscope. Parallel translation most effects in the superimposed image. A is designating the 2 set landmark for harmonized of  $[Ca^{2+}]_i$  image, and microscopic image. One landmark had two points, one point put on  $[Ca^{2+}]_i$  image, and other point put on microscopic image. B shows the translated image.

$Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  などでも可能なことを考えれば、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  $[Ca^{2+}]_i$  分布測定が行われるようになってきていることから、このような構造との対比は、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。

しかし、より有効にこの重ね合わせ法を利用するため

には、幾つかの改良が必要である。一つは、この実験で使用したパーソナルコンピュータの表示能力の限界から、細胞像が7段階の白黒でしか表示できず、細胞のディテールが十分に表現できないことである。これは、より高い能力をもったコンピュータが低価格で供給されるようになってきている状況から、あまり問題にはならないであろう。

二つ目は、蛍光測定の開始前にしか細胞像が入力できないことである。これは、透過光観察の場合には、ハードウェアに多少の追加を行い、タングステンランプの点灯と蛍光励起光の照射を自動的に交互に行えるようにすれば可能である。これを行うことで、多少の動きや構造変化のある試料の測定もできるようになるであろう。

測定機器のコントロールと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) 小倉明彦, 石橋 明, 工藤佳久: “細胞内カルシウム

実験法”, p. 91 (1989), (羊土社).

- 3) R. P. Haugland: “*Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*”, p. 78 (1989), (Molecular Probes, Inc., Eugene).
- 4) 宮川厚夫: *Cell Science*, **7**, 529 (1991).
- 5) Y. Kudo, T. Nakamura, E. Ito: *Neurosci. Res.*, **12**, 412 (1992).
- 6) S. Ito, N. Mochizuki-Oda, K. Hori, K. Ozaki; A. Miyakawa, M. Negishi: *J. Neurochem.*, **56**, 531 (1991).
- 7) 宮川厚夫, 牧野 徹, 玉川 彰, 尾崎一穂: *分析化学*, **38**, 643 (1989).
- 8) Y. Kudo, K. Takeda, T. P. Hicks, A. Ogura, Y. Kawasaki: *J. Neurosci. Methods*, **30**, 161 (1989).
- 9) 河田 聡, 埜田友也, 南 茂夫: *インターフェース*, **137**, 172 (Oct., 1988).
- 10) 河田 聡, 南 茂夫: *インターフェース*, **137**, 192 (Oct., 1988).



**Superimposed imagery for intracellular free calcium ion distribution and cellular structure with video fluorescence microscopy.** Atsuo MIYAKAWA (Department of Medical Photonics, University of Hamamatsu School of Medicine, 3600, Handa-cho, Hamamatsu-shi, Shizuoka 431-31)

In life science research, the distribution of intracellular free calcium ion concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) is widely done using a fluorescent indicator dye such as Fura-2, Indo-1. Of particular interest is correspondence between  $[Ca^{2+}]_i$  distribution and cellular structure. This report describes a system for superimposition of  $[Ca^{2+}]_i$  distribution and cellular microscopic images made with transmitted light or Nomarski differential interference. This system uses the instrumentation described in the previous report but with improved the computer software. The superimposed image shows 24 colors for  $[Ca^{2+}]_i$  and 7 levels of black-and-white in the microscopic image.  $[Ca^{2+}]_i$  images of NG108-15 corresponded well with transmitted light image of microscope. However, the  $[Ca^{2+}]_i$  and differential interference image differed by parallel shift, rotation and magnification cause by insertion of the Nomarski prism, etc. in microscopic light path. The superimposed image was particularly affected by parallel shift. The parallel translation of microscopic images was included in the image processing program in order to bring the image into correspondence.

(Received May 23, 1992)

### Keyword phrases

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