

### 3 細胞内2価陽イオン顕微定量測定法に関する基礎研究

○古本政嗣 梶田充彦\*\* 橋本守 荒木勉  
東野勢津子\* 東野義之\* 山崎峰夫\*\* 森川肇\*\*

阪大・院・基礎工 \*奈良医大・第1解剖 \*\*奈良医大・産婦人科

#### 1. はじめに

カルシウムやマグネシウムに代表される細胞内遊離2価金属イオンは、情報伝達等細胞の生理活動において重要な働きを担っている。したがって、これらイオンの細胞内分布を知ることは生理学的にもまた病態学的にも極めて重要である。2価金属イオンを標識する方法として蛍光色素法があり、その検出系には蛍光分光光度計、顕微鏡等が使用されている。前者の場合、金属イオン濃度はある一定個数の細胞の平均値として得られるのに対し、後者では個々の細胞単位における濃度および細胞内局所分布を測定することが可能であるという特徴をもつ。したがって顕微方式はin situ計測が展開できるなど応用性が高い。しかしながら装置として市販品を使うのが通常であるため自由度に欠けるきらいがある。そこで我々は、蛍光色素法のうち2波長励起1波長測光法を採用し、市販の顕微鏡をベースとした細胞内イオン定量装置を独自に試作した。さらに、その応用性についての検討を行った。

#### 2. 測定原理および装置

fura-2に代表される2波長励起1波長測光法用蛍光色素は、イオン濃度の変化に伴ってその励起スペクトルがシフトする。このため、ある2波長を励起波長として選択し、それぞれの励起光による蛍光強度を検出して、それらの強度比からイオン濃度を求めることができる。

Fig. 1に試作した装置の概略図を示す。マグネシウム検出用蛍光色素である mag-fura-2の使用を前提として中心波長339, 379nmのフィルタより2波長の励起光を取り出す。

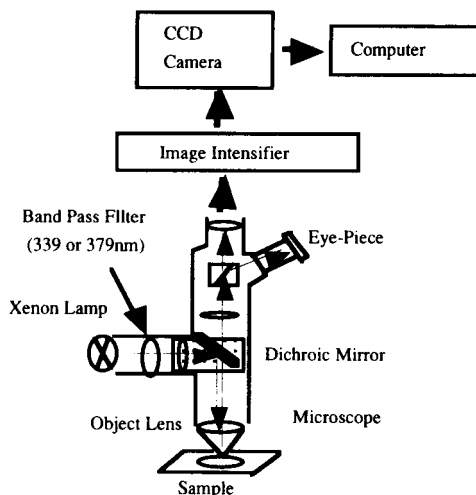


Fig. 1 Experimental Setup

試料からの蛍光は470-650nmの範囲が検出部へ透過し、イメージンスンシファイアで光強度が増幅された後、CCDカメラで画像として記録される。測定終了後、コンピュータによる各種解析を行う。解析には画像処理等目的に応じた自作のプログラムを使用した。

#### 3. 実験と結果

Fig. 2に本装置を用いて得たヒト白血球細胞のマグネシウム蛍光画像を示す。5  $\mu$  M mag-fura-2の濃度で37°C、30分間のインキュベーションを行い、試料に色素をロードした。

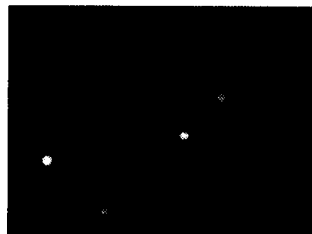


Fig. 2 Mg Fluorescence Image of Human Leukocyte (Object Lens; X40)

Fig. 3は細胞内マグネシウムイオン濃度解析に使用するための検量線である。このように、予め求めておいたマグネシウム濃度と蛍光強度比の関係から、測定で得られた蛍光強度比を濃度に変換することで定量を行う。検量線作成には各濃度のマグネシウムバッファを使用し、実際の測定時に近い状況となるように装置のセッティングや蛍光色素の濃度を調整した。図のように検量線はスムーズであり、マグネシウム濃度の定量に関しては信頼性が得られていると考える。

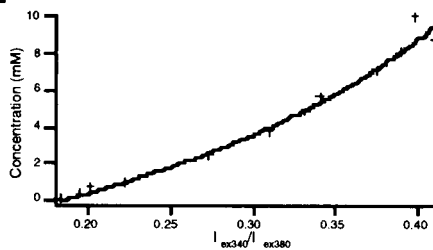


Fig. 3 Calibration Curve of Mg Concentration

本システムの以上のような特徴を利用し、妊娠中毒症における血球細胞内マグネシウムイオン濃度の動態について、細胞レベルでの検討を行っている。

謝辞 本研究に対し文部省科研費基盤(B)10558134の助成を得た。