

解 説

画像処理による生命現象の解析の現状

工 藤 佳 久

三菱化成生命科学研究所脳神経科学部 〒194 町田市南大谷 11

(1993年4月27日受理)

Analysis of Biological Phenomena by Image Processing

Yoshihisa KUDO

Department of Neuroscience, Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences,
11, Minamiooya, Machida 194

1. はじめに

すでに 10 年以上前のことである、神経軸索の中を足早に駆け抜ける微粒子を顕微鏡ビデオ画像として鮮明に見せられた。Video enhanced contrast (VEC) カメラのデモ会場である。その粒はどうみても $0.1 \mu\text{m}$ 以下である。生きている組織の中で動いているこんなに小さなものが見えるなんてと素直に驚いた。この時の画像が私に与えたインパクトは極めて大きかった。興奮性の生物現象を観測するための方法として金科玉条のように信じてきた電気生理学による解析方法では見ることのできない側面を文字通り「見る」方法があると思い知らされたのである。当時既に電位感受性色素が使われており、 10×10 のホトダイードアレイを用いて、一気に 100 点の電位変動を測定している論文を見ると、ますます激しい無力感に襲われ、これから脳の研究にはこれしかないと思ったものである。そこで、電位感受性色素を買い込んで、なんとかまねをしてみようと思い立ったのが現在の我々の研究の大きな動因であった。

現在、神経科学に関する学会における研究報告の中には画像処理を使ったものが数多くみられるようになってきた。これほどまでに画像処理が発達してきたのは一重にコンピュータの発達のおかげであろう。20年前にはこんなことが実験室で自由にできるようになろうとは思いもしなかった。10年前には例え出来たとしても、高価であり極めて時間もかかり、よほどお金持ちのひまな人がやる仕事と思っていた。ところが、今では、様々なタイプの画像処理関連のハードウェアが安価に入手でき、そ

の気になれば容易に利用できる。さらに、いったん画像として捕えることができれば、様々な角度から解析が可能である。このような関連周辺技術の進歩のおかげで、現在応用されている生命現象の画像化のテクニックは急速にレベルアップして広まってきており、とてもその全てについて与えられた紙幅では語り尽くせない。ここではこれまでに報告されているダイナミックな生命現象の解析の内、重要なものに的を絞って解説したい。

画像処理は文字通り画像を様々な形で処理して、目的の成分を説得力ある形で示す方法であるから、ほとんどの場合、顕微鏡などの光学系による画像を対象にする。形や動きの変化を観察したり測定したりする場合は顕微鏡のレベルでの工夫でかなりのところまで目的は果たせる。位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡、暗視野顕微鏡、偏光顕微鏡、さらに最近急速に発達してきた共焦点顕微鏡などは見えにくいものより鮮明に見るために工夫されたものであるが、これらにしても使い方一つで驚くべきレベルの解析が可能になる。さらに、VEC のように顕微鏡で得られた画像を A-D コンバータでデジタル化した後に、画像処理を加えることによってさらに目的の部分を鮮明にすることができます。これらの顕微鏡の特徴や使い方については、最近刊行された「限界を超える生物顕微鏡一見えないものを見る」(日本分光学会、測定法シリーズ、宝谷、木下編、学会出版センター) に詳しくわかりやすく解説されている。

2. 生命現象の画像化

もともと光学顕微鏡で見ることができるものをさらに

鮮明に見えるようにするものはこの際考えにいれないで、本来は見ることができないものを見てしまう、定量してしまうという試みに話を限定してみることにする。そのためには本来は周りの物質と区別ができないものを区別できるようにする工夫が必要である。例えば、生化学研究には欠くことのできないラジオアイソトープはその最たるものである。特定の物質を放射活性物質で標識して、定量したり、物質の存在部位をオートラジオグラフィーとして示す方法はいまでもよく用いられている。最近、臨床にも使われ始めた positron emission tomography (PET) も測定や画像化原理こそ異なるが、本質的には同じものである。しかし、これらには放射活性物質というやっかいなものを使わなくてはならないという

大きな問題がある。そのために測定方法にも制限があり、とても実時間測定は望めない。

ダイナミックな生物現象を可視化する方法で最も一般的に用いられるのが蛍光指示薬である。その数も種類もきわめて多い、各種イオンの動態、cAMP の動態、カルモデュリンの動態、伝達物質の遊離、電位の変化など細胞の機能に直接結びつく重要な現象が蛍光色素によって可視化されている。

3. 細胞内 Ca 濃度の画像処理による測定

3.1 蛍光 Ca 指示薬を用いた細胞内 Ca イオン濃度の変動の測定（細胞膜透過性試薬の利用）

蛍光指示薬の中で最もよく論文に登場するのが Ca 指

I. 蛍光 Ca 指示薬

表 1 各種イオン指示薬の一覧表

試薬名	L-Ca ²⁺		H-Ca ²⁺		Kd-Ca ²⁺	特長
	ABS.	EM.	ABS.	EM.		
Calcium Crimson	588	611	588	611	205 nM	長波長励起
Calcium Green-1	506	534	506	533	189 nM	長波長励起
Calcium Green-2	506	531	506	531	574 nM	長波長励起
Calcium Green-5 N	506	531	506	531	3.3 μM	長波長、高濃度対応
Calcium Orange	554	575	555	576	328 nM	長波長励起
fluo-3	506	526	506	526	316 nM	長波長励起
fura-2	362	512	335	505	224 nM	(EX ratio, 340/380 nm)
Fura-Red	472	645	436	640	133 nM	長波長励起
indo-1	346	475	330	408	250 nM	(EM ratio, 400/480 nm)
quin-2	352	492	332	492	126 nM	(EX ratio, 340/380 nm)
rhod-2	556	576	553	576	1.0 μM	長波長励起

II. Ca²⁺ 以外の陽イオンおよび陰イオン蛍光指示薬

試薬名	L-ion		H-ion		Kd (mM)	特長
	ABS.	EM.	ABS.	EM.		
SBFI	346	551	334	525	18	Na ⁺ indicator
PBFI	346	551	334	525	107	K ⁺ indicator
mag-fura-5	370	511	330	491	1.5	Mg ²⁺ indicator
mag-indo-1	349	476	330	417	2.7	Mg ²⁺ indicator
Magnesium Green	506	532	506	532	0.9	Mg ²⁺ indicator
SPQ	344	443	344	443	118	Cl ⁻ indicator
MQAA	346	445	346	445	113	Cl ⁻ indicator
pH indicators	acid		basic		pKa	
BCECF	457	520	508	531	7.0	EX ratio 450/500 nm
SNAFL	506	535	538	620	7.2	EX ratio 490/540 nm EM ratio 540/630 nm (acid sensitive)
SNARF	553	580	585	630	6.8	EM ratio 580/630 nm (base sensitive)

各試薬の特性は Molecular probe 社の "Handbook of fluorescent probes and research chemicals." (by R.P. Haugland) (1992-1994) による。

示薬である。表1に示したようにその種類も数も多い。測定する標本や用いる装置の特性にあわせて様々な選択ができる。Ca指示薬の性質についてはこれまでいくつもの総説があるので、ここでは詳しくは述べないが、1980年に最初の報告がなされて以来、世界中に急速に広まった¹⁾。その理由の一つは、これらをアセトオキシメチル化することによって細胞の中に容易に導入できることである。もともとCaキレータであるこれらの試薬はもちろん細胞膜を通過できない。そこで、キレータとしてのカルボキシル基をエステル化して脂溶性を高めることによって、細胞膜を通過しやすくしたものである。細胞内にはエステルを分解する酵素（エステラーゼ）が存在しており、これらの指示薬のエステル部分はやがて分解されて、もとのキレータの形に戻る。こうなると細胞膜を通過できないので細胞内に長時間留まり、細胞内のCa濃度に応じて蛍光強度を変化する。蛍光顕微鏡と高感度のビデオカメラでその画像をとらえて、画像処理することによって、細胞内におけるCaの分布を測定することができる。この方法は初代培養細胞における細胞内Ca濃度の測定に広く用いられている。共焦点顕微鏡の発達もあって、応用の範囲はますます拡大している。

我々が開発した、画面上に任意に設定した複数の点（現在の装置では、30～40点）におけるCa濃度の変動を同時に測定する方法、多点実時間計測法も基本的には画像処理によるものである。刺激による応答や薬物に対する反応性を検討するのにきわめて有効である。ビデオ画像を使うと、録画をすることができるので、実験は能率的になる。我々が「タイムマシン測定法」と呼んでいる方法は測定中の画像をすべて録画しておき、実験終了後にその細胞を任意の抗体を用いて免疫染色して、細胞の素性を特定する。ビデオテープをプレイバックして、その抗体に反応する細胞、すなわち、特定のグリア細胞やニューロンと同定された細胞についての反応を選択的に測定することが可能である^{2,3)}。

外から適用するだけで、細胞内に負荷できるという利点を活かした測定方法として、我々は中枢組織のスライス標本における細胞内Ca濃度の分布と変化の時間経過を測定した（図1）。中枢組織スライスをCa指示薬で染色するのはそれほど容易なことではないが、安定なCa指示薬の溶液を調製すれば十分可能である^{4,5)}。

厚み方向の蛍光の重なりが、実際の細胞内分布の測定の妨げになることがあるが、ここ数年の間に発達してきたレーザー共焦点顕微鏡により、光学断層像をとり、これを三次元構築する方法も使えるようになってきてい

る。以前の装置では一セットの画像を得るために相当の時間が必要であり、実時間というわけにはいかなかった。しかし、最近はレーザーのラインスキャン法を用いて、ビデオレートの速度で実時間計測をすることも可能になってきた。これらはまだ高価であるが、細胞内におけるCa上昇の部位差を検討するための方法として定着しつつある⁶⁾。

3.2 蛍光指示薬を直接細胞内に注入する方法

さきに述べた蛍光Ca指示薬のエステル誘導体を用いる方法は、不特定多数の細胞を一気に染色してしまう方法として有効である。しかし、その一方で、多種の細胞が混在しているような中枢組織のスライス標本では、もしさで反応が生じたとしても、それがニューロンで生じているのか、グリアで生じているのかそれとも神経線維で生じているのかを明らかにすることはできない。もし、こうした組織の中の特定の細胞だけに指示薬を注入することができれば、全体の組織としての活動に関与している代表細胞の中での細胞内Ca濃度の変動を測定することができる。この方法はむしろ、細胞内に容易に負荷することができる試薬としての利点を使わないで、微小電極やパッチ電極の先端にエステル化しない色素をつめておいて、ねらった細胞内に直接キレータを注入するのである。我々の経験でも注入された蛍光Ca指示薬、

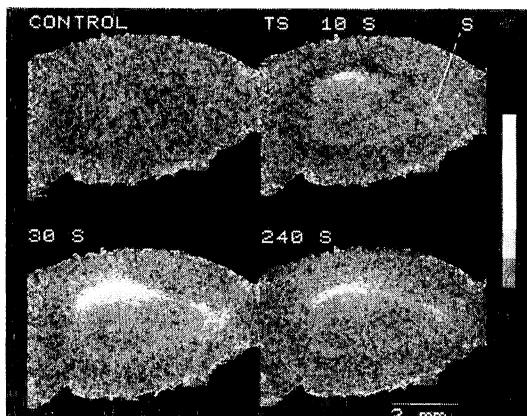


図1 ラット海馬スライスにおけるテタヌス刺激時の細胞内Ca²⁺上昇部位
fura-2/AMで染色した海馬スライスのCA3部位に刺激電極をおき、50 Hzで2秒間テタヌス刺激を与えた。上昇部位とその持続時間を検討する目的で、刺激前の340 nm励起に対する蛍光画像で刺激後の340 nm励起画像の比(F340/F340)として表した⁵⁾。したがって、刺激直前の画像(control)はどの部位も同じ比を示している。テタヌス刺激によるCa²⁺濃度上昇部位が特定できる。

fura-2 や rhod-2 の遊離型の注入後の拡散はかなり早く、細胞全域に拡散して行く。

この方法は最初に小脳スライスにおけるプルキンエ細胞に適用された⁷⁾。この細胞には特徴的な樹状突起があるが、入力線維の刺激によって、細胞内の Ca が上昇する様が見事にとらえられている。最近、この方法と、冷却 CCD カメラを用いた方法によって、シナプスを介した刺激後のプルキンエ細胞での Ca の上昇がグルタミン酸受容体を介した成分より、脱分極依存性の Ca チャネルの活性化による成分の方が大きいことが示されている⁸⁾。この方法は最近になって、海馬ニューロンにも適用されており、この組織で重要な現象である長期増強現象を生じさせるためのテタヌス刺激は海馬錐体細胞のシナプス層にきわめて一過性の Ca の上昇を生じさせるに留まると報告されている^{9,10)}。

しかし、彼らのシナプス部位にあたる位置の画像はスライス内に埋もれているためにぼけており、軸索全体としての画像にはなっているが、シナプス部位の特定ができるほどではない。それに対して、同様な方法で細胞内に fura-2 を注入し、錐体細胞の樹状突起の部分を拡大して、スペイン（棘突起：シナプスを作る部位）の部分に焦点を絞って、電気刺激を与えると、確かに、樹状突起の部分の Ca の上昇は数十秒しか持続しないが、スペインの部分の Ca は数分間にわたって上昇していることが認められている¹¹⁾。長期増強現象の発現には一定時間の Ca 上昇が必要であることは、別の実験で確かめられている。

そんなわけで、筆者としてはスペイン部分の Ca を正確に測定した後者の研究の方を支持したい。我々が、1987 年にテタヌス刺激により長期増強現象が発現した時の海馬組織全体での細胞内 Ca の変動を測定した時には、シナプス部位の Ca が数分にわたって増大しているのが見られた¹²⁾。単一ニューロンに注入するという方法をとったとしても、スペインの部分が見えなければ、軸索部分の早くて大きな変動にまどわされて、本質的なスペイン部分の局所的な変動を見落とすのではないかと考えられる。むしろ我々がやったように多数の細胞のスペイン部分の反応を加重した形にした方が、変動を正確にとらえられるのではないかと考えられる。画像処理の難しさと問題点を如実に示す例と言えよう。

表 1 に示すように、現在、Ca 以外に、H⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Cl⁻ の蛍光指示薬が開発されている。うまく使い分けて、画像処理に持ち込むことによって、電気生理学では解釈できない二次元的な反応の広がりや反応部位を

説得力のある形で示すことができる。

4. cAMP 量と A-キナーゼ活性化状態の画像化

cAMP は細胞内二次情報伝達物質として重要な物質であり、アデニレートシクラーゼ (AC) の活性化により、ATP から作られる。特に、cAMP 依存性キナーゼ (A-キナーゼ) は Ca 依存性のキナーゼと同様に細胞機能の維持や調節に重要な役割を果たしていることが知られている。この物質の神経系における関わりはアメフランの“えらと水口ひっこめ反射”の“学習”的初期段階に証明されている。すなわち、感覚神経終末に作られたシナプスの活性化により、AC が活性化され、cAMP の量が増大する。その結果、A-キナーゼが活性化され、感覚ニューロン終末部の S 型 K-チャネルがリシン酸化されて、閉じられる。この状態では一度生じた終末部の脱分極の再分極の時間が遅延し、終末の脱分極による Ca チャネルの開口時間が長引き、伝達物質の遊離量が多くなるという調節システムである¹³⁾。そのほかにも、cAMP の量の変動を引金としている現象は数多く報告されている。しかし、これらは、cAMP 量を増大させる試薬、Forskolin や dibutyl-cAMP などを使ったときの変化から類推されたものや細胞内 cAMP または細胞外に漏れてきた cAMP 量を cAMP の抗体を使って測定したものである^{14,15)}。

この cAMP 量を Ca 濃度の変動と同じように画像化によって測定したいという要望は高かったが、これについても Ca 指示薬を開発した Tsien のグループが成功している。そのアイデアは図 2 に示すようなものである。すなわち、この方法では cAMP 依存性プロテインキナーゼが触媒部分 (catalytic subunit : C) と調節部分 (regulatory subunit : R) からなり、cAMP が R 部分に結合すると、C 部分から離れることによって C 部分のキナーゼ活性が発現するという機能を利用している。C 部分にはフルオレスセイン、R 部分にはローダミンをそれぞれ結合させてから両者をホロエンザイムとする。この状態では図に示すように、R 部分が二量体となり、それぞれのサブユニットに C 部分が結合した型となる (R₂C₂)。これにフルオレスセインに対する励起光 (490 nm) を与えると、発生する蛍光共鳴エネルギーは近くに存在するローダミンに移行し、結果としてローダミンの蛍光が発色する（はずであるが、実際にはそれほど強くはない）。ここに cAMP が加えられると、R 部分に結合して、C 部分を切り放す、この状態ではフルオレスセインそ

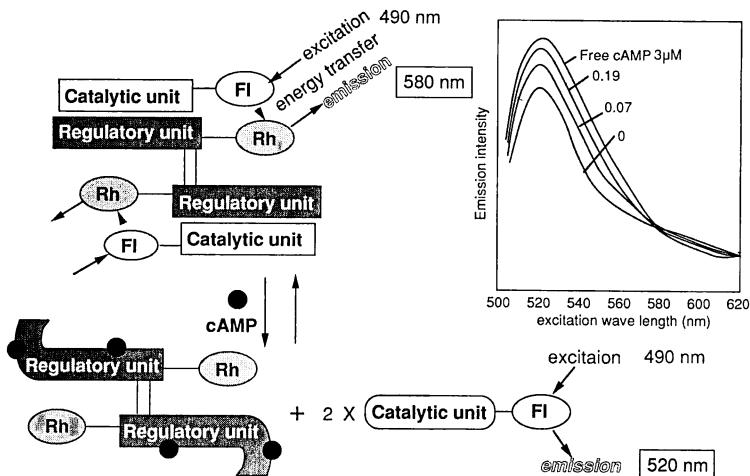


図2 蛍光cAMP指示薬の原理

cAMP依存性プロテインキナーゼ(A-kinase)のcatalytic subunitにはフォレスセイン(Fl)をregulatory subunitにはローダミン(Rh)を結合させ、これをホロエンザイムの形にする(図上段)。このとき490 nmで励起するとこれで励起されたFlのエネルギーは近接しているRhに移行して、Rhの蛍光(F580)が優位になる(はずであるが、実際にはRhの蛍光は強くはないようである)。この状態のホロエンザイムを細胞内に注入する。細胞内のcAMPが増加すると、regulatory subunitに結合して、catalytic subunitを遊離状態とする。こうして、A-kinaseの活性が生ずるが、このときはFlとRhの距離が離れるので、490 nm励起によって本来のFlの蛍光(F520)が生ずる。この時の蛍光の極大のシフトは右上の挿入図のようになる。これを用いれば、cAMPの定量もできるし、A-kinaseの活性化状態もモニターできる^{15,16)}。

のものの蛍光が発現する。

このような蛍光波長の変化は図2に示すようにcAMPの濃度に依存している。そこで、520 nmの蛍光と580 nmの蛍光の比を測定すれば、cAMPの量が類推できる。しかも、この場合はcAMPキナーゼの活性化状態をも示すことになるので、生物学的な意義は大きい。彼らはこれを線維芽細胞などに微量注入し、プロスタグランジンを適用したとき細胞内cAMPが上昇する様子を画像化することに成功している。

この論文が報告された後しばらくは応用例が報告されていなかったが、最近になって、やっと、我々が期待していたアメフラシの感覚ニューロンの終末に応用した例が報告された¹⁶⁾。この試薬を注入したニューロンにおいて共焦点蛍光顕微鏡でニューロン内のcAMPを解析した結果、セロトニンを適用すると、神経細胞体よりも終末部のcAMPが高くなり、終末部で上昇したcAMPが細胞体に向かって流れ込んで行く様子が見事な画像として捕えられたのである。ここにきてcAMP依存性キナーゼを介する神経終末部の調節の可能性が一段と説得力を増したように思われる。

確かに、この方法は巧妙であるが、誰もが試薬を入手

できるというようなものではなく、分子生物学者、有機化学者の助けがなければできそうもない。Ca測定の容易さになれている我々はもっと簡単な方法を工夫したいところである。

5. 活型カルモデュリンの測定

カルモデュリンは直鎖の不定形タンパク質であるが一分子に4箇所のCa結合部位を持ち、Caが結合すると大きくその構造を変化させて、様々な酵素を活性化する生物学上重要な物質である。それだけに、細胞内でのカルモデュリンのCaによる活性化を測定する方法が待望されていた。Hahnらは巧妙な方法でカルモデュリンの蛍光プローブを作り出した¹⁷⁾。すなわち、蛍光物質テトラメチレンメロサイアニンのいくつかの誘導体を合成し、これをカルモデュリンと共有結合させたのである(図3)。こうして得られた、蛍光物質としてのMeroCaMにはカルモデュリンと同様なCa結合能があり、また、phosphodiesteraseの活性化因子としての性質にはもとのカルモデュリンと本質的差はない。ところが、605 nmおよび530 nmで励起した時の635 nmの蛍光の比は、Caが上昇した時、すなわちカルモデュリンの活性化型

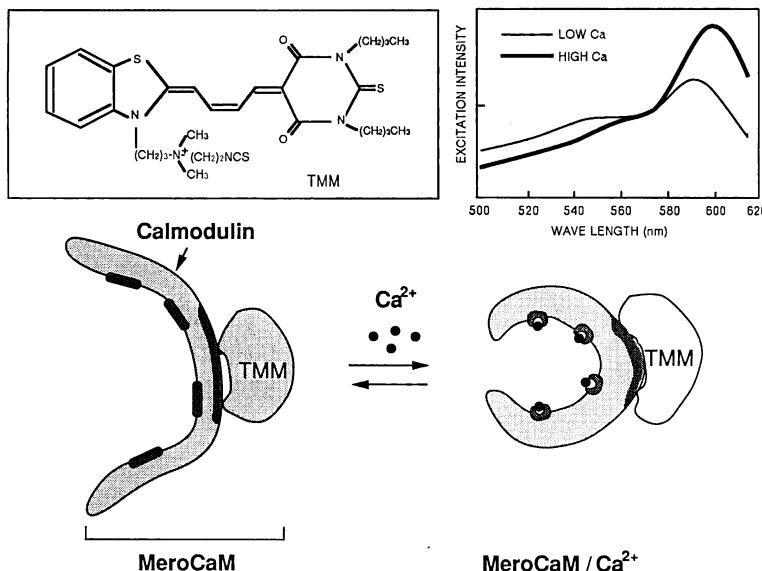


図 3 活性化カルモデュリン蛍光指示薬の原理模式図

蛍光物質テトラメチレンメロサイアニン (TMM) (図上段) をカルモジュリンの疎水部に共有結合させた試薬、メロカルモジュリン (MeroCaM) はもとのカルモジュリンと同様な Ca 結合能を持ち、Ca 濃度が上昇すると、Ca を結合してその構造を大きく変える。その結果、結合している蛍光物質の蛍光極大値が図右上挿入図のようにシフトするので、これを指標として活性型のカルモジュリンが検出できる^{17,18)}。

になった状態では 3 倍近くに増大する。

彼らはこの MeroCaM を線維芽細胞に注入して、血清で刺激した場合に細胞内で Ca の上昇と共にカルモデュリンが活性化される様子を画像化することに成功し、さらに傷口の修復時に活性化された線維芽細胞の収縮に伴うカルモデュリンの活性化の部位差を画像化することに成功している¹⁸⁾。しかし、考えてみると、この MeroCaM はキレータとしてのカルモデュリンに蛍光プローブを結合させたという点では、フルオレスセンスやローダミンに Ca キレータをつないだ、Ca 指示薬 fluo-3 や Rhod-2 と類似の物質である。このアイデアを活かせば他にも様々なプローブを作ることができそうである。

6. 伝達物質遊離の測定

最近、酵素電極を使って、特定の物質の濃度を測定する方法が実用化している。確かに酵素の基質特異性を利用すれば、特定の物質の定量は可能である。この場合は、酵素反応の過程で生ずる NADH や NADPH の蛍光を指標とするものや、生成された過酸化物または還元性物質による酸化還元電位を利用するものなどいくつもの方法が実用化されている。画像化の場合には反応過程で生ずる蛍光を指標にしたり、生じた過酸化物による色

素の色調の変化を指標にする方法が考えられる。例えば、よく知られているように、NADH や NADPH は 340 nm 付近の励起光を吸収し、480 nm 付近の蛍光を呈する。したがって、この補酵素を使っている反応系に持ち込めば、特定の物質の定量は可能である。すでに、使われているものとしてはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) がある。

反応式 (図 4) に示すように、NADH はグルタミン酸の量に対応した蛍光強度の増大を生ずるので、まさにグルタミン酸の定量には理想的である。グルタミン酸は中枢神経系において興奮性伝達物質であり、シナプスの可塑性の最も端的なモデルとしての海馬における長期増強現象にはグルタミン酸遊離量増大が伴っているとの仮説もある。また、虚血時の損傷が、グルタミン酸の著しい

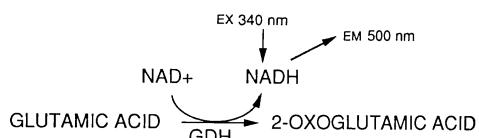


図 4 グルタミン酸定量の原理
グルタミン酸の代謝経路の一つであるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) による脱水素反応で生ずる還元型補酵素、NADH の蛍光を測定する。

遊離を伴うとの報告もある。もし、画像化によってこれを明らかにできれば、確固たる証明になるはずである。

この方法を用いて、虚血時の海馬からのグルタミン酸遊離量を画像化した例が報告されている。この研究では NAD^+ と GDH を海馬のスライスを灌流する栄養液の中に添加しておき、340 nm の励起光を与えて、虚血侵襲に遊離されるグルタミン酸を NADH の蛍光として蛍光顕微鏡下で観察しようというアイデアである。この報告では確かに、虚血性の侵襲（グルコース除去および低酸素）が加わると、数分の後に海馬の特定部位の蛍光が著しく増大しており、グルタミン酸が大量に遊離されてくる様が画像化されている¹⁹⁾。

我々も、この方法を海馬における可塑性モデルとしての長期増強現象の際のグルタミン酸遊離量の解析に利用しようとした。しかし、これには重大な問題があった。すなわち、海馬スライスなど生体にはもともと、NAD や NADP が大量に存在しており、強い電気刺激や虚血侵襲を加えると、これらが還元型にかわって、明らかな蛍光を呈するのである。この事実は、fura-2 を使って、海馬スライスにおける細胞内 Ca を測定する際にも何度も悩まされた問題点であった。Ca の場合は fura-2 の負荷量が多くして、内因性の蛍光の寄与率を小さくしたり、rhod-2 など励起波長帯域が内因性蛍光を生じない色素を使ってカバーできる。しかし、GDH を使う方法では内因性の蛍光と外因性の NAD から生ずる NADH を区別することはできない。

さらに、もう一つ重要な問題点があった。すなわち、NAD には強いシナプス伝達抑制作用があることである。したがって、スライスに直接試薬を適用する前出の報告では、伝達がまったく止められているという条件下でのデータということになり、著しい蛍光の上昇がグルタミン酸の遊離を反映しているかどうかは疑問である。現在、この方法をさらに改良して、グルタミン酸遊離の可視化を試みているが、特に、蛍光を指標にしたり、この種の検出試薬を直接標本に適用する場合は予期しない問題が生ずることがあるので、十分注意を要する。

7. おわりに

「画像処理による生命現象の解析の現状」などと大きなタイトルを掲げてしまったが、そのごく一部を紹介するに留まった。しかも、この分野の進歩はきわめて急速であり、特にコンピュータなどのハードウェアの発達が著しいので、ここに述べた内容もすぐに古く陳腐なもの

になってしまふであろう。我々は画像と言えば、ビデオカメラと思い込み、画像での時間分解能はビデオレートを越えることはできないと思いついたが、新しく開発された高密度のホトダイオードマトリックス (Delta-ron 7000, 富士フィルム) を使えば、電位感受性色素で染色された神経組織の興奮がミリ秒以下の時間分解能で画像化できるようになってきた。これについては開発者の解説におまかせするべきでここには取り上げなかったが、生命現象の画像処理による解析の心臓と言うべきものであろう。それにしても、我国の技術水準の高さには驚かされる。今後、生命科学分野の研究者と光光学関連の研究者の共同研究が積極的に進められることによって、さらに詳細で本質に迫る解析が可能になって行くものと期待している。

文 献

- Y. Kudo: "Calcium fluorometry employing a fluorescence microscope coupled with a video system," *Optical Methods in Biophysics*, ed. A. F. Leung (The Chinese University Press, Hong Kong) pp. 291-332.
- 工藤佳久, 小倉明彦: "神経細胞の細胞内カルシウム測定法—タイムマシン測定法?—" *Clin. Calcium*, **2** (1992) 82-84.
- A. Ogura, M. Nakazawa and Y. Kudo: "Further evidence for calcium permeability of non-NMDA receptor channels in hippocampal neurons," *Neurosci. Res.*, **12** (1992) 606-616.
- Y. Kudo, E. Ito and A. Ogura: "Heterogeneous distribution of glutamate receptor subtypes in hippocampus as revealed by calcium fluorometry," *Neuroreceptor Mechanisms in Brain*, ed. Kito (Plenum Press, New York, 1991) pp. 431-440.
- Y. Kudo, T. Nakamura and E. Ito: "A 'macro' image analysis of fura-2 fluorescence to visualize the distribution of functional glutamate receptor subtypes in hippocampal slices," *Neurosci. Res.*, **12** (1991) 412-420.
- P. Camacho and J. D. Lechleiter: "Increased frequency of calcium waves in *Xenopus laevis* oocytes that express a calcium-ATPase," *Science*, **260** (1993) 226-229.
- D. W. Tank, A. Sugimori, J. A. Connor and R.R. Llinas: "Spatially resolved calcium dynamics of mammalian Purkinje cells in cerebellar slice," *Science*, **242** (1988) 773-777.
- H. Miyakawa, W. N. Ross, D. Jaffe, J. C. Callaway, N. Lasser-Ross, J. E. Lisman and D. Johnston: "Synaptically activated increases in Ca^{2+} concentration in hippocampal CA1 pyramidal cells are primarily due to voltage-gated Ca^{2+} channels," *Neuron*, **9** (1992) 1163-1173.
- W. G. Regehr and D. W. Tank: "Postsynaptic NMDA receptor mediated calcium accumulation in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites," *Nature*, **345** (1990) 807-810.
- W. G. Regehr and D. W. Tank: "Calcium concentration dynamics produced by synaptic activation of

- CA1 hippocampal pyramidal cells," *J. Neurosci.*, **12** (1992) 4202-4223.
- 11) W. Muller and J.A. Connor: "Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca²⁺ responses," *Nature*, **354** (1991) 73-76.
- 12) Y. Kudo, A. Ogura, K. Ito, H. Miyakawa and H. Kato: "Roles of cytosolic free Ca²⁺ in the modulation of neuronal activities," *Biomed. Res.*, **9** (1988) 153-156.
- 13) E.R. Kandel and J.H. Schwartz: "Molecular biology of learning: modulation of transmitter release," *Science*, **218** (1982) 433-443.
- 14) H. Akagi and Y. Kudo: "Opposite action of forskolin at pre- and postsynaptic sites in rat sympathetic ganglia," *Brain Res.*, **343** (1985) 346-350.
- 15) S.R. Adams, A.T. Harootunian, Y.J. Buechler, S.S. Taylor and R.Y. Tsien: "Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells," *Nature*, **349** (1991) 694-697.
- 16) B.J. Bacska, B. Hochner, M. Mahaut-Smith, S.R. Adams, B-K. Kaang, E.R. Kandel and R.Y. Tsien: "Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons," *Science*, **260** (1993) 222-226.
- 17) K.M. Hahn, A.S. Waggoner and D.L. Taylor: "A calcium-sensitive fluorescent analog of calmodulin based on a novel calmodulin-binding fluorophore," *J. Biol. Chem.*, **265** (1990) 20335-20345.
- 18) K. Hahn, R. DeBiaso and D.L. Taylor: "Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells," *Nature*, **359** (1992) 736-738.
- 19) A. Mitani, F. Kadoya, Y. Nakamura and K. Kataoka: "Visualization of hypoxia-induced glutamate release in gerbil hippocampal slice," *Neurosci. Lett.*, **122** (1991) 167-170.