

ビデオ顕微分析法の開発と  
好中球刺激応答系解析への応用

1993年

洲 崎 悦 子

ビデオ顕微分析法の開発と  
好中球刺激応答系解析への応用

1993

洲崎悦子

## 略語表

CCD	charge coupled device (video detector)
Con A	concanavalin A
Cyto E	cytochalasin E
DETAPAC	diethylenetriamine-pentaacetic acid
HBSS	Hanks' balanced salt solution
I-CCD	intensified CCD (video detector)
MCLA	2-methyl-6[p-methoxyphenyl]3,7-dihydroimidazo[1,2-a]-pyrazin-3-one
$O_2^-$	superoxide
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
SOD	superoxide dismutase
XOD	xanthin oxidase

## 目次

[第I章] 序論 .....	1
[第II章] 高分解能明視野顕微システムの開発と好中球貪食過程追跡 への応用 .....	3
1. 序論 .....	3
2. CCDカメラ .....	5
3. システムの開発及び画像の取得 .....	5
4. 好中球貪食過程への応用 .....	7
5. 差像処理によるミリ秒レベルでの分析 - 開口放出の瞬間の抽出 .....	10
(1) 差像処理法のZ軸分解能の検討 .....	12
(2) 好中球貪食時の食胞形成過程における開口放出現象の頻度及 び局在解析 .....	18
[第III章] 微弱光観察法の開発と好中球Ca <sup>2+</sup> 動態の追跡 .....	23
1. 序論 .....	23
(1) 高感度ビデオカメラ .....	23
(2) Ca <sup>2+</sup> イメージング法 .....	23
2. Ca <sup>2+</sup> イメージング法の好中球[Ca <sup>2+</sup> ]動態追跡への応用 .....	27
(1) 市販システムを用いた340nm/380nm蛍光比像による解析 .....	29
(2) 同時イメージングシステムを用いた380nm/360nm蛍光比像 による解析 .....	29
[第IV章] 極微弱光観察法の開発と好中球の生成する活性酸素分析 .....	38
1. 序論 .....	38
(1) 超高感度ビデオカメラ(フォトンカウンティングカメラ) .....	38
(2) フォトンカウンティングイメージング法 .....	38
(3) フォトンカウンティングイメージング法の好中球活性酸素 生成系への応用 .....	41

2. システムの開発及び画像の取得 .....	43
3. ルミノール依存性化学発光検出 - 好中球貪食過程で生成する次 亜塩素酸の検出 .....	43
(1) 化学発光の検出 .....	44
(2) 化学発光の細胞内局在解析 .....	44
4. MCLA依存性化学発光検出 - 好中球刺激系で生成する $O_2^-$ の検出 .....	47
(1) Cyto EとCon Aとの併用による増強効果 (priming効果) の検出 ..	48
(2) 化学発光の2次元検出 .....	49
(3) $O_2^-$ 特異的化学発光であることの確認 .....	51
5. MCLA依存性化学発光検出 - $O_2^-$ の定量解析 .....	53
(1) 検量線の作成 .....	55
(2) 2つの装置 (ルミネッセンスリーダーとビデオ顕微システム) を用いた化学発光法による $O_2^-$ 検出 .....	57
(3) 好中球の生成する $O_2^-$ の細胞レベルでの定量解析 .....	57
まとめ .....	62
引用文献 .....	63
《付録 1》試薬及び細胞調製法 .....	66
《付録 2》自作プログラムのリスト .....	70
謝辞 .....	81

## [I章] 序論

近年までに集積された数々の生化学的データは、細胞が置かれた環境・与えられた刺激に対して的確かつ巧妙に反応することを示してくれる。また同時に、電子顕微鏡を武器とする組織化学的実証により、細胞1個の中にも独自の構造と機能を持つ様々な細胞内小器官が存在することが明かとなった。生化学的手法は生きた材料を対象としてはいるが、検出器の持つ感度の限界という制約等のため材料が集団として取り扱われており、そのため得られた結果も集団の平均的反応性である場合が多い。これに対して組織化学的手法は、細胞レベルでの知見を得られるという利点を持つ一方で、時間の止められた細胞現象の結果の観察であり、動態そのものではない。そこで、各々の利点を引き出した解析、すなわち「細胞1個における動態解析」を目的とし、現在何が可能であるのか、また今後どのような方向への分析法の開発が必要なのか検討を試みた。

「光学顕微鏡のルネッサンス」と言われてから十数年の間に顕微鏡技術は益々発展し、さらにエレクトロニクスや計算機技術の進歩によって、これまではとても見えないと思われていた速い現象や暗い現象を映像化することが可能となった<sup>1), 2)</sup>。そこで、「細胞1個を観察しながらまさに起こっている現象の解析」を行い得る手法として、「ビデオ顕微分析法」を取り上げた。細胞1個というマイクロの世界を覗く入口として光学顕微鏡を用い、近年その性能を大きく向上させたビデオカメラ・画像解析装置を組み合わせることにより、光学像の持つ情報を電気信号に変換し様々な画像処理が可能となると同時に定量性が獲得される。さらに、得られた画像をフロッピーディスクに記録したりビデオ録画することが可能となり再生像による詳細な繰り返し解析ができるという利点も大きい。そこで「ビデオ顕微分析法」を確立し、その有用性を検討・評価する対象として、ここでは好中球を用いた。血球系の細胞は容易にある程度の量を採取可能な生体材料として、多くの研究者に用いられてきているが、中でも遊走能・貪食能を有する好中球は細胞の刺激伝達機構解析の良いモデルの1つとして注目されている。好中球は異物侵入という刺激に対してそれを感知し、異物に向かって遊走・接着し、これを貪食・無毒化するという統合された応答を行う。生体の刺激→応答の

ダイナミックな姿が1個の好中球に細胞レベルで集約されており、細胞1個における動態解析に非常にふさわしい材料であると考えられる。

そこで、3つの明るさ（通常明視野域・微弱光域・極微弱光域）において各々ビデオ顕微分析法を確立し、その適用対象として好中球を材料に、細胞レベルでの刺激→応答のダイナミックな姿の映像化と解析を試みた。以下、本法の空間時間分解能及び感度の改善と、本法を用いて初めて得られた好中球の示す細胞動態に関する新知見を報告する。

## [II章] 高分解能明視野ビデオ顕微システムの開発と

### 好中球貪食過程追跡への応用

#### 1. 序論

生きたままの細胞を観察することで細胞内現象や分子動態を探りだそうという様々なアプローチが試みられている。その一例が蛍光ラベル<sup>3)</sup>・金コロイドラベル<sup>4)</sup>等の標識体を用いた局在・動態解析であり、目的とする分子に標識を付すことにより、他の分子と区別・識別することが可能となる。この様な目印をつけて見えるようにする試みに対して、もともとの像のコントラストを高めることにより、見えなかったものを見えるようにする試みとして、位相差・微分干渉法による顕微鏡像のコントラスト増強及びビデオカメラ・画像解析装置を組み合わせた高倍率化・コントラスト増強が挙げられる<sup>1)・5)</sup>。

近年その性能を大きく向上させつつあるビデオカメラ<sup>6)</sup>は、顕微鏡像の解像度を損なうことなく20~30倍の追加拡大を可能とする。さらに画像処理によるコントラスト増強を施すと、分解能に関してはレイリーリミット<sup>7)</sup>\*1を越えてスパローリミット<sup>8)</sup>\*2を適用することができ、顕微鏡の分解能が向上すると同時に微小な対象をヒトの目にも余裕を持ってとらえることが可能となる。

そこで、微分干渉顕微鏡にCCDカメラを装着して20倍の拡大を追加し、さらに画像処理によるコントラスト増強を組み合わせ、これまでは拡大した像においてもヒトの目の分解能の限界(約150 $\mu$ m)に近く、識別困難であった細胞内構造及びその動態を可視化し、その解析が可能な高分解能明視野ビデオ顕微システムを開発した(Fig. 1)。スパローリミットから計算される本システムのx-y方向の空間分解能は160 nm以下となる。また、ビデオ解析の1つの特徴は2次元情報の時間変化を1/30秒という時間分解能で記録できることであるので、好中球の貪食過程におけるタイムコースの追跡にも応用した。

\*注1 どれくらいまで2点が接近した時2点として区別がつかなくなるかがレイリー(Rayleigh)によって定式化され、理想的な(収差のない)対物レンズの



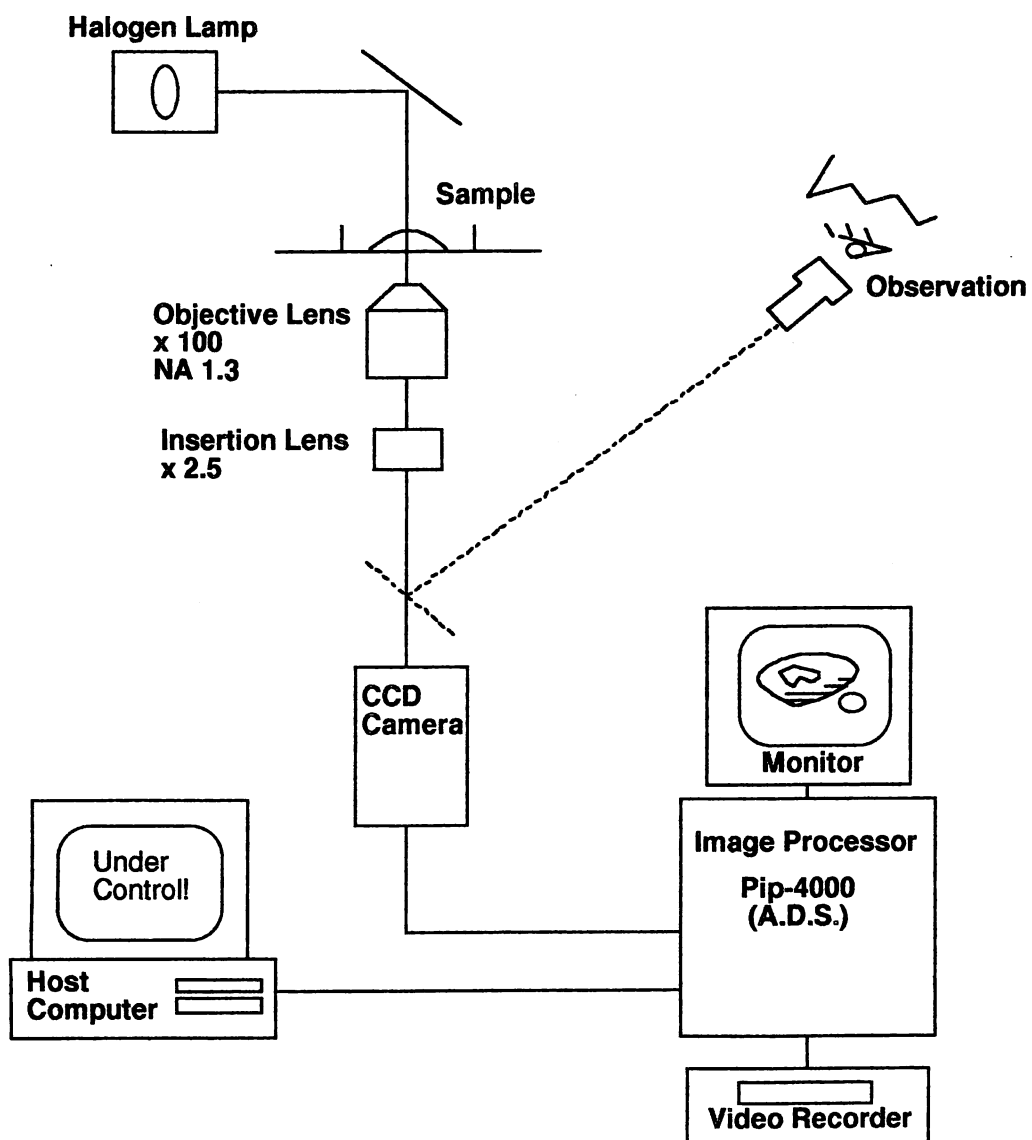


Figure 1. 高分解能明視野ビデオ顕微システムの構成図

分解能 ( $\alpha$ ) は

$$\alpha = \lambda / 2 \cdot NA \text{ として示される。}$$

ただし、 $\lambda$  : 使用する光の波長 (nm)

NA : レンズの開口数                      である。

\*注2 光学顕微鏡で分解できる2点間の間隔は、感度のよいビデオカメラを用いたり画像処理を行うことにより、レイリーの定義した距離を20%までは縮めることが可能となる。これをスパロー (Sparrow) の分解能の限界と呼ぶ。

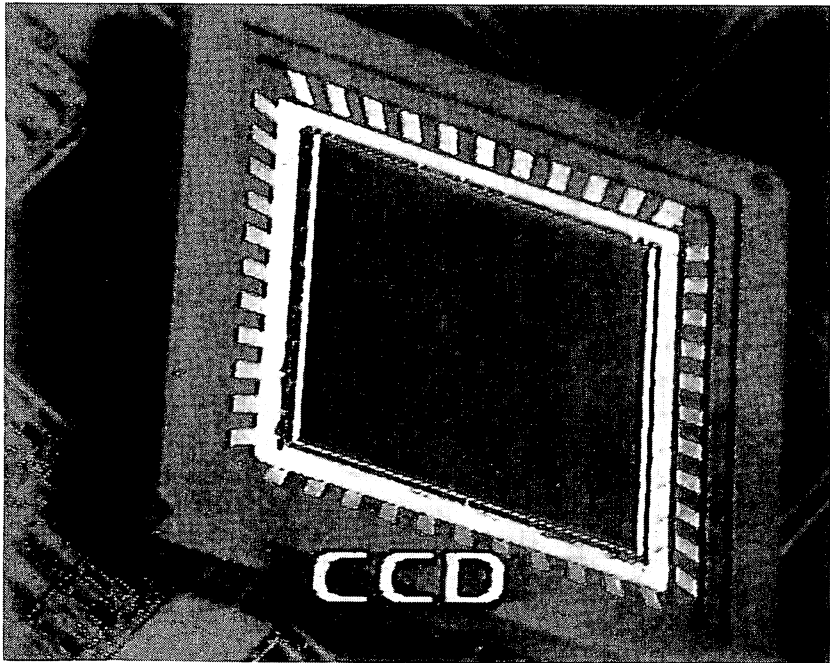
## 2. CCDカメラ

ビデオ検出器としては、従来の撮像管に対し、最近では固体イメージセンサが多用されるようになってきた。Fig. 2に示すCCD (Charge Coupled Device) は、その中で最も汎用されている2次元検出器である。水平510×垂直492の計250920画素の1画素1画素に光が当たると、その時生じた光電子は画素ごとに蓄積され、蓄積が終わると周囲にある出力電極におくられ、信号として取り出される。撮像管に比べ特性が安定しており、残像が少なく、焼き付けも起こりにくいし平面性も高い。最近では、各画素の前にマイクロレンズがパターン化されて付いた高感度型も市販されるようになった。

本研究では、マイクロレンズの付いた1/2インチCCDタイプ (SSC-M350, SONY) を使用した。一般に顕微鏡の面角はこのCCD撮像エリアより大きく、CCD撮像面ではとらえられた小さな画像を、ビデオ画面一杯に拡大していることになる。

## 3. システムの開発及び画像の取得

画像の最初の取り込み口としてZeiss社のAxiovert 135 TV型倒立顕微鏡を用い、対物レンズは、微分干渉観察の可能な100倍のレンズ (Planneo. ×100 pol.) を用いた。このレンズは油浸観察により開口数 (N.A.) が1.3まで上がるので、x-y方向の分解能は210nm ( $\lambda=550\text{nm}$ で計算した値) となる。試料は、まずこの対物レンズで100倍に拡大され、さらに中間変倍レンズで2.5倍に拡大される。この250倍の像がCCDの受光面に入射する。ここでは、SONY社のSSC-M350型CCDカメラを用いたが、これは受光面のサイズが1/2インチと小さいことから、入射した像を拡大す



る能力は高くなり、また受光面の直前に装着されたマイクロレンズにより高感度化が計られている（最低照度0.3 lx.）。受光面に配列した1画素の大きさは16  $\mu\text{m}$ 、これは試料面で0.06  $\mu\text{m}$ に相当する。画素の大きさが光学的解像限界より小さいので、カメラによって解像度を損なうことなく、かつ高感度に光学像が電気的信号に変換され、画像処理装置Pip-4000（A.D.S.社）へと送られる。画像処理装置はホストコンピューターによって制御され、高分解能化のため自作プログラムEP-2（付録参照）を作成し、ホストコンピューターからの操作によりコントラスト増強を行った。これは、ビデオカメラから送られてきたアナログ電気信号を、画像処理装置による0-255の輝度値へのデジタル変換に際して、より広い輝度値に広げるという処理である。その結果、似た様な明るさのため低コントラストであった像が、はっきりと異なる明るさを持つ高コントラストな像に変換され、分解能はさらに向上して170nm以下となる。そのため、より細かいものの識別能力や、より小さいものの検出能の向上が達成された。

こうして得られた画像は再びアナログ変換されてモニター上に現れ、またビデオ録画された。総合倍率として約4900倍の拡大がなされた。録画には高画質を保つため、業務用S-VHSビデオテープレコーダー（AG-7355, Panasonic）とS-VHS方式の録画テープを用いた。このビデオテープレコーダーは1/30秒ごとの駒送りも可能で、録画像の時間分解解析に有用であった。

#### 4. 好中球貪食過程への応用

本ビデオ顕微システムを用いることにより、細胞レベルでの動態解析が可能となる。そこでこの長所を活かし、好中球貪食過程の時間変化の追跡に応用した。また、従来の顕微鏡観察では識別困難であった細胞内微細構造の詳細な観察を試みた。

##### 【実験方法】

付録に示す方法でウサギより調製した細胞懸濁液60  $\mu\text{l}$ をセルチャンバーに入れ、HBSS+（付録参照）100  $\mu\text{l}$ を静かに加えて約3分静置し、細胞がセルチャンバーの底部に落ち着くのを待ち、さらに410  $\mu\text{l}$ のHBSS+を加えて顕微鏡ステージに載せ、酵母の1種であり好中球の貪食実験に最もよく用いられるザイモサン浮遊液30  $\mu\text{l}$ を加えて検鏡を開始した。HBSS+は37°Cに前もって加温された液を用い、また

セルチャンバー上部はカバーガラスをかけて保温と試料の振動防止を計った。まさにザイモサンを捕らえようとする直前からビデオ録画を開始し、完全に食べ込んだ後も2分間程度ビデオ録画を継続した。準備した細胞の観察は30分を目安に新しい細胞と取り替えた。これは30分でほとんど全ての活発な細胞はザイモサンを食べ込んでしまうため、新たに貪食を開始しようとしている細胞を見つけるのは非常に困難なためである。この操作を繰り返し、1個体から調製した細胞につき10例のビデオ録画を行った。新しく別の個体から調製した細胞を用いて同様の操作を繰り返し、10例ずつ計30例についての貪食過程のビデオ録画像を得、次の3つの観点から解析を行った。

- (1) 開口放出を含めた貪食過程のタイムコース
- (2) 最初の開口放出時における偽足の伸長率
- (3) 1個の顆粒における開口放出の時間分解解析

#### 【結果】

一般的に好中球の貪食課程は3段階に分けられる。まず第1段階として、好中球は異物侵入という刺激に対してそれを感知し、走化性により異物に向かって遊走し接着する。さらに第2段階として異物を食べこむ、すなわち食胞が形成される。最後の第3段階として、食胞とリソゾームとの融合が起こり、またNADPHオキシダーゼが活性化されることにより異物の処理・無毒化が行われる。本システムを用いた観察の結果は、貪食過程の第2段階において、異物の認識・偽足の急速な伸長・食胞形成完了というさらに3つの段階が存在することが確認された。また、貪食時の食胞形成に伴う開口放出の瞬間を顆粒のはじける様な像として可視化することが可能となった。

- (1) 開口放出を含めた貪食過程のタイムコース

本システムを用いて、好中球が異物を貪食する様子をとらえた30例についてFig. 3に示す。好中球が異物を捕らえた時を貪食開始点とすると $34 \pm 19$  (平均±標準偏差 (n=30)) 秒後から急速に偽足が伸長し $71 \pm 28$ 秒で偽足が閉鎖し食胞形成が完了した。また、開口放出は偽足伸長の途中 $59 \pm 24$ 秒で開始し、食胞閉鎖後の $97 \pm 30$ 秒で完了した。

- (2) 最初の開口放出時における偽足の伸長率

偽足伸長がどの程度進行した時、1個目の開口放出が起こるかも本法で調べる

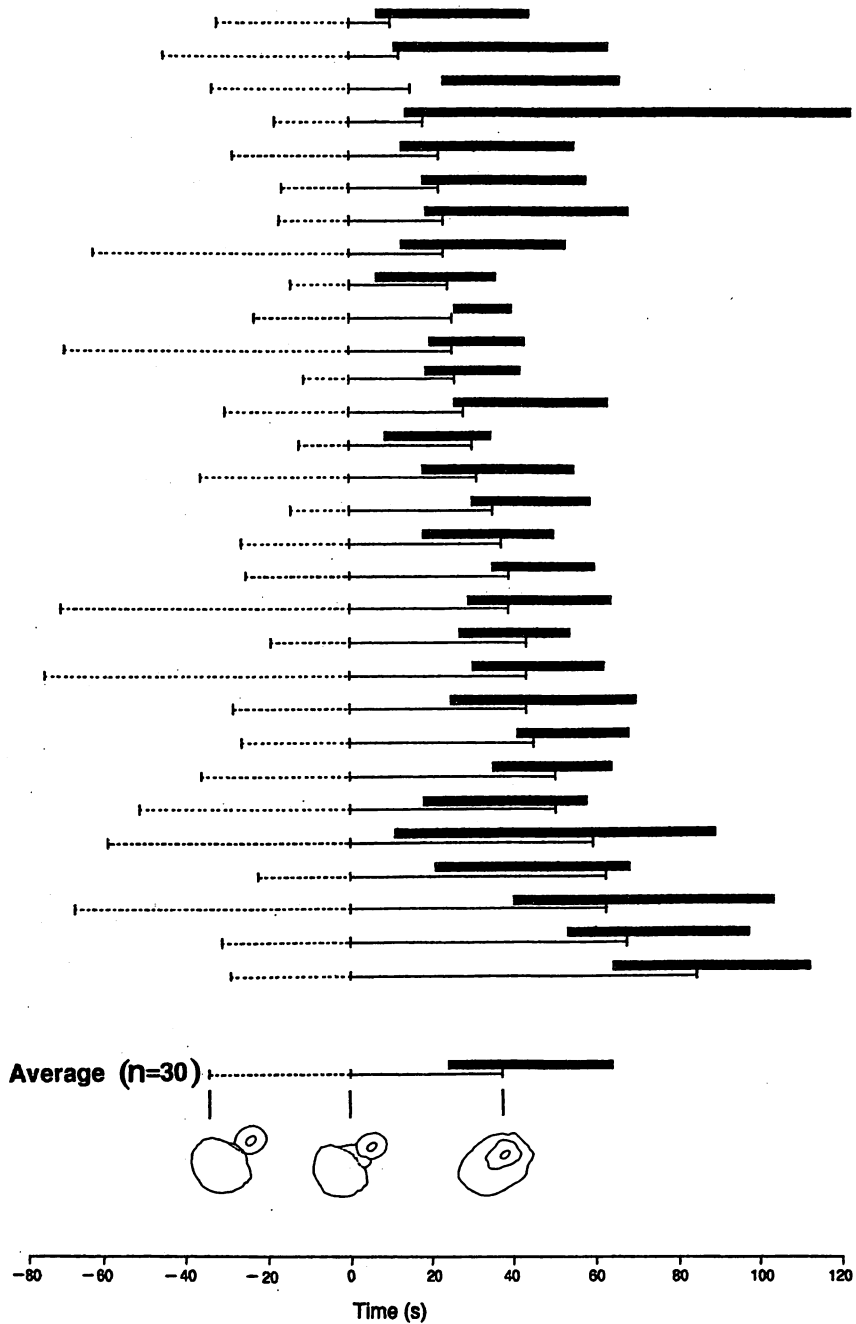


Figure 3. 食食と開口放出過程の時間経過 (30例とそれらの平均を示す)  
 上の模式図は、代表的な3つの時点での好中球の形態を示す。すなわち左からそれぞれザイモサンの認識、食胞形成開始、食胞形成完了の時点を示す。それぞれのグラフは食胞形成開始時にそろえて、上から食胞形成に要した時間の短い順に並べてある。  
 点線：ザイモサンの認識から偽足形成開始までに要した時間  
 実線(細)：食胞形成時間  
 実線(太)：開口放出の認められた時間

ことができ、食べ込んだザイモサンの周長に対して $69 \pm 21\%$ 偽足が取り囲んだ時、開口放出しているという結果が得られた (Fig. 4)。

### (3) 1個の顆粒における開口放出の時間分解解析

開口放出の瞬間の光学像の示す明るさの急激な変化を求めることも可能であり、開口放出の速さについて求めた結果をFig. 5に示す。微分干渉法により形成される明暗のコントラストは物質の屈折率の違いを反映するものであり、開口放出時に観察された明るさの変化は、膜融合の結果生じる顆粒内容物の放出、そしてそのために形成された $\Omega$ 型の平坦化に相当すると考えられる。よって、貪食過程で生じる開口放出は $1/30 \sim 1/15$ 秒という短時間に発生し、 $1/5$ 秒程度でもとの平坦な状態にもどることがわかった。

#### 【考察】

開口放出は貪食過程における機能的最小の構造変化であり、僅かな例外<sup>9), 10)</sup>を除いては、電子顕微鏡像として存在が実証されていたに過ぎない<sup>11), 12), 13)</sup>。しかし、本分析系を用いて開口放出を踏まえた貪食動態の解析が可能となった事により、食胞形成・開口放出のタイムコースを得ることができた (Fig. 3)。このことより、食胞形成すなわち開口放出ではなく、開口放出は貪食時の食胞形成過程の最後の段階に限って観察される現象であることがわかった。さらに異物を認識後、食胞形成の過程で既に開口放出が開始し、しかも各々の顆粒は $1/30 \sim 1/15$ 秒で開口し $1/5$ 秒程度で放出完了という短い時間で内容物を開口放出していることより、好中球は速やかな異物処理機能を果たし得る細胞であることもわかった。

## 5. 差像処理によるミリ秒レベルでの分析---開口放出の瞬間の抽出

高速画像処理技術の1つに差像処理 (SQ: sequential subtraction) がある。これはテレビカメラからの入力を指定された時間経過後の画像から差し引くことにより、その時間内に生じた変化のみを抽出し表示するコマンドであり、その動作は次の式にて表される。

$$V_{o(n)} = V_{i(n+k)} - V_{i(n)} \quad V_{o(n)}: \text{出力画像} \quad V_{i(n)}: \text{入力画像} \\ V_{i(n+k)}: k \text{ フレーム後の入力画像}$$

ここで $k=1$ とおき画像間の減算処理を行うと、最も高い時間分解能すなわちピデ

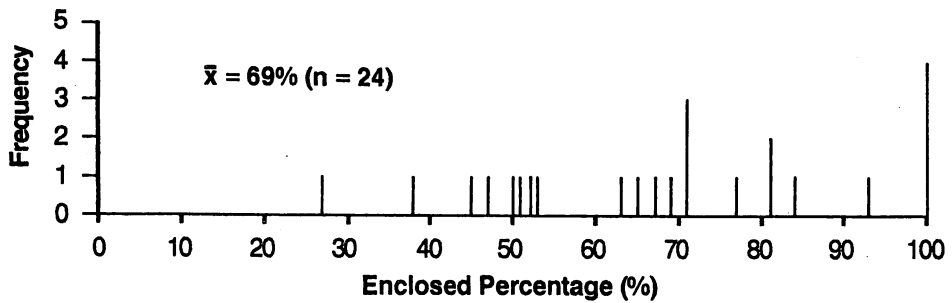


Figure 4. 最初の開口放出が生じた時点における食胞形成の度合い  
 1個目の開口放出開始時における、ザイモサンの周長に対する偽足で取り囲まれた部分の割合を示した。

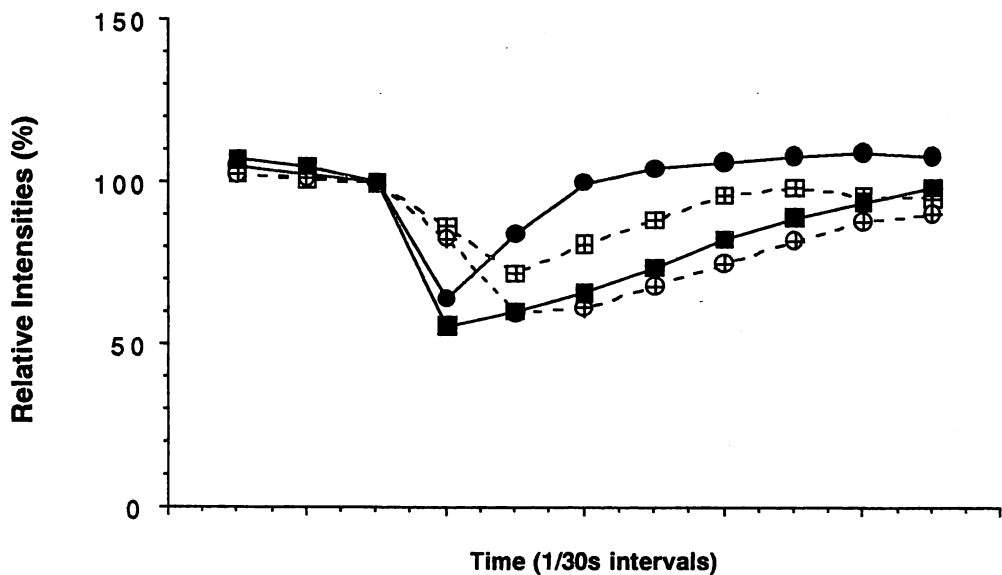


Figure 5. 好中球の食食時における個々の開口放出のタイムコース  
 開口放出を示した顆粒のビデオ画面上での輝度変化を、ビデオ映像の時間分解能でプロットした。代表的4例を示してある。



オ1画面を構成するために必要な1/30秒間に生じた変化分のみを取り出すことが可能となる。Fig. 6が示すように好中球での開口放出は1/30~1/15秒で起こることから、動きのない部分、あるいは1/30秒レベルで考えると低速な変化である顆粒の動き等をこの処理により抹消して均一な背景とし、開口放出の生じた瞬間のみをFig. 7に示すような像として抽出することが可能となる。そこで差像処理を本ビデオ顕微システムに導入し1/30秒レベルの分析を可能とし、好中球貪食過程において通常の録画像からは測定できなかった開口放出頻度・局在解析に応用を試みた。しかしここで得られた開口放出頻度は、ある焦点面でとらえることのできた頻度を数えているに過ぎない。そこでまず、その焦点面にはない顆粒のはじけはどの程度とらえられているのか、すなわち差像処理のz軸方向の可視化能の検討を試みた。次に、好中球貪食過程解析に用いた30例の録画像に対し、Argus-100画像解析装置を介して対応する差像の録画を行い、得られた差像と貪食像を対応させながら、開口放出現象の解析を行った。

#### (1)差像処理法のz軸分解能の検討

焦点面にはない顆粒のはじけをどの程度とらえることができるのか、すなわち差像処理によって計測された開口放出の頻度が、実際に起こった開口放出頻度の総数をどのくらい反映し得るのかを知る目的で、差像処理のz軸方向の可視化能の検討を行った。

##### 【実験方法】

#### ①プログラムの作成

まず、自作のプログラムEP-32(付録参照)を作成し、それに基づいて実験を進めた。その概要は以下の通りである。

- 1)通常の実験と同じ画像強調を行う。
- 2)指定したメモリーへ順次焦点面をずらした像を取得する。---焦点面を変えた顆粒像の取り込み
- 3)カーソル指定域の輝度ヒストグラム・輝度の標準偏差を求める。---焦点度の指標

明暗のコントラストがはっきりしている微分干渉像においてはFig. 7に示す様に、焦点が合っているほど標準偏差は大きくなると考えられ、特にこの値を焦点の合

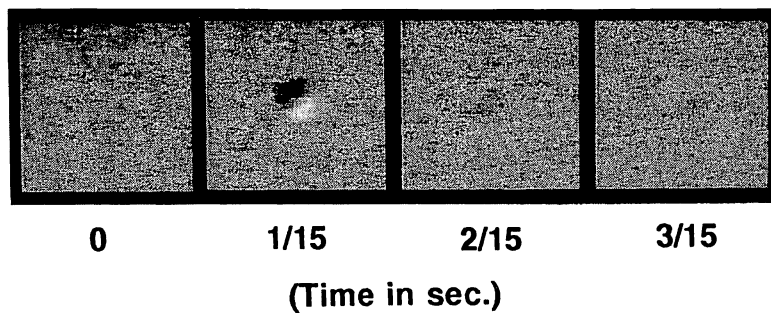


Figure 6. 差像処理によって抽出された1個の開口放出

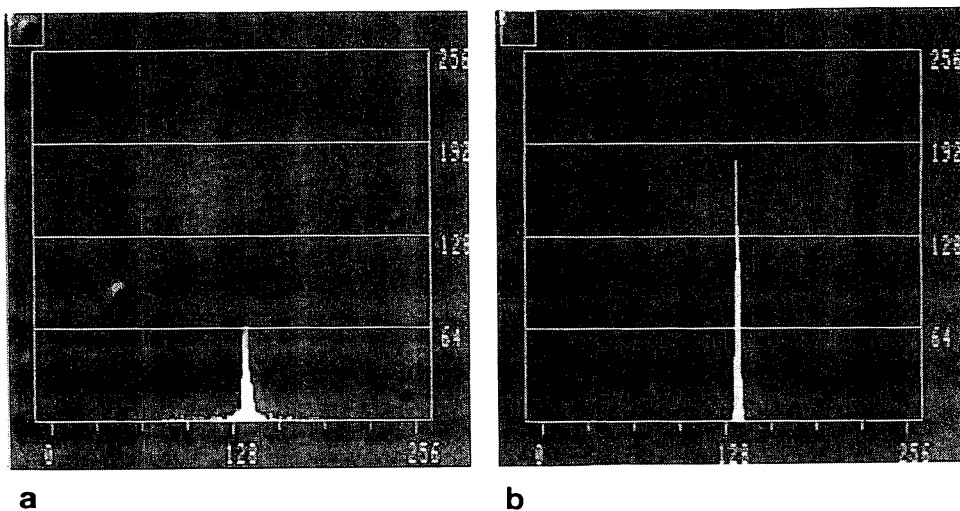


Figure 7. 顆粒の輝度のヒストグラム

左上の四角で囲まれた領域のヒストグラムが示されている。

a: 顆粒に焦点があっている場合

b: 同じ視野で顆粒に焦点があっていない場合

っている程度の指標にした。

4) (指定したメモリーの像) - (コントロール像) = (差像処理像) を求める。

---差像処理

## ②z軸方向の可視化能の検討

標本としては好中球を塗抹し、細胞がこすられてむき出しになった顆粒を利用した。作成したプログラムに従って、焦点面をずらしながら逐次像を取り込んだ。

## ③差像処理によるz軸方向の可視化能の検討

差像処理の効果を評価するために、②と同様に作製した好中球顆粒標本をアクリジンオレンジ (100  $\mu\text{M}$ ) で染色し、励起光を照射することによって熱による人為的顆粒のはじけを引き起こした。この人為的顆粒のはじけを焦点をずらして観察し、明視野像としては検出できない顆粒が、瞬間的にはじけてなくなる現象を差像処理により検出できるかどうかを検討した。 $-3\mu\text{m}$ ずらした位置で励起光を照射して、直接的には観察できない顆粒のはじけを引き起こし、この過程をビデオ録画した。これをもとに、励起光照射前と照射2分後との差像を求めた。

### 【結果】

Fig. 8 及び Fig. 9 に示す様に、顆粒はz軸方向に焦点面から $\pm 2\mu\text{m}$ の範囲でかろうじて観察可能であることがわかった。また50個のザイモサン (ラグビーボール型をしている) の長軸と短軸を計測することにより平均的大きさを求めたところ、長軸 $4.6\mu\text{m}$ 、短軸 $3.8\mu\text{m}$ という結果が得られた。このことは好中球がザイモサンを長軸に添って食べたとき、食胞に隣接した全ての顆粒は見えている、あるいはぼんやりとでもその存在がわかることになる。よって開口放出は食胞に向かって起こる訳であるから、その輝度変化は全て検出されるはずである。これに対して好中球がザイモサンを短軸に添って食べた場合を考える。この方向での食べ込みは確率的には低いと思われるが、焦点面より $2\mu\text{m}$ 以上離れてしまうため検出できない顆粒が一部存在することになる。

差像処理によるz軸方向の可視化能について検討した結果をFig. 10に示す。 $3\mu\text{m}$ ずれると顆粒はぼやけてしまい、通常の観察像において照射前、照射2分後の像の違いを検出することは困難であった (Fig. 10, c, d)。これに対して差像 (Fig. 10, e) はぼやけてはいるが、19個実際にはじけた顆粒のうち15個の同定が可能であった。

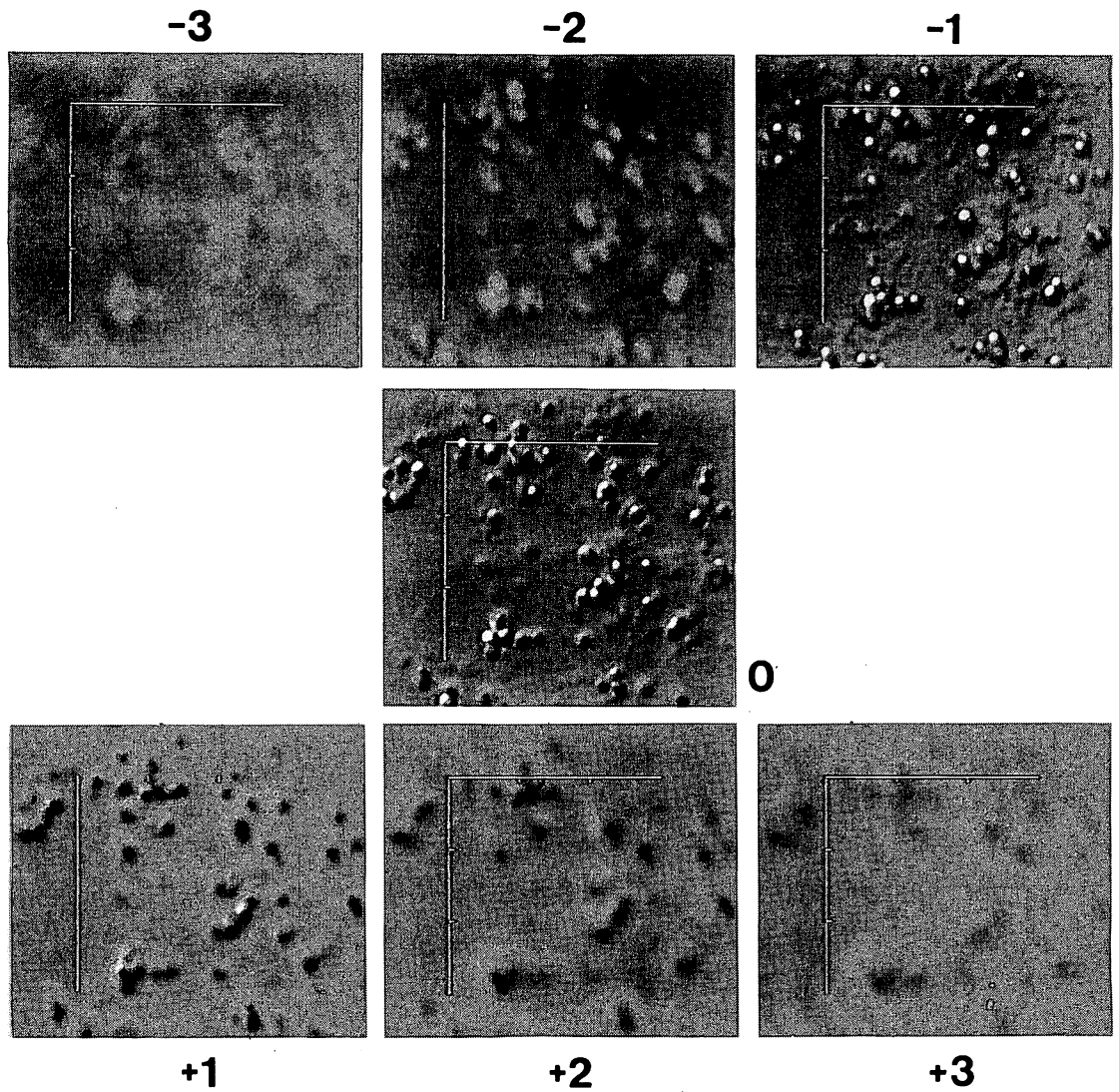


Figure 8. 段階的に焦点を変えたときの顆粒像  
 数字は顆粒に焦点があった面 (= 0  $\mu\text{m}$ ) からのz-軸方向の距離を表す ( $\mu\text{m}$ )

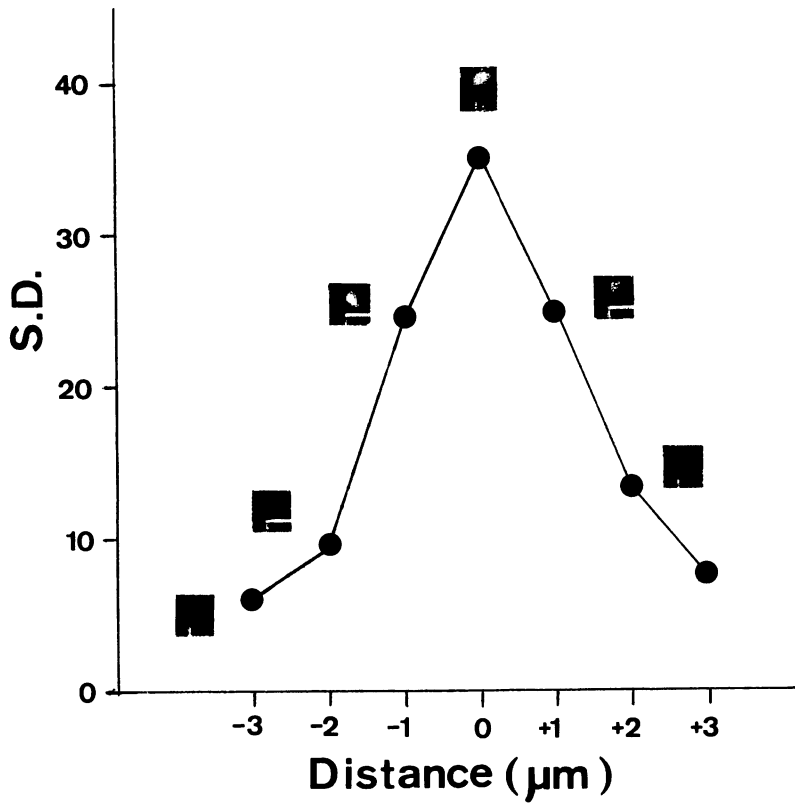
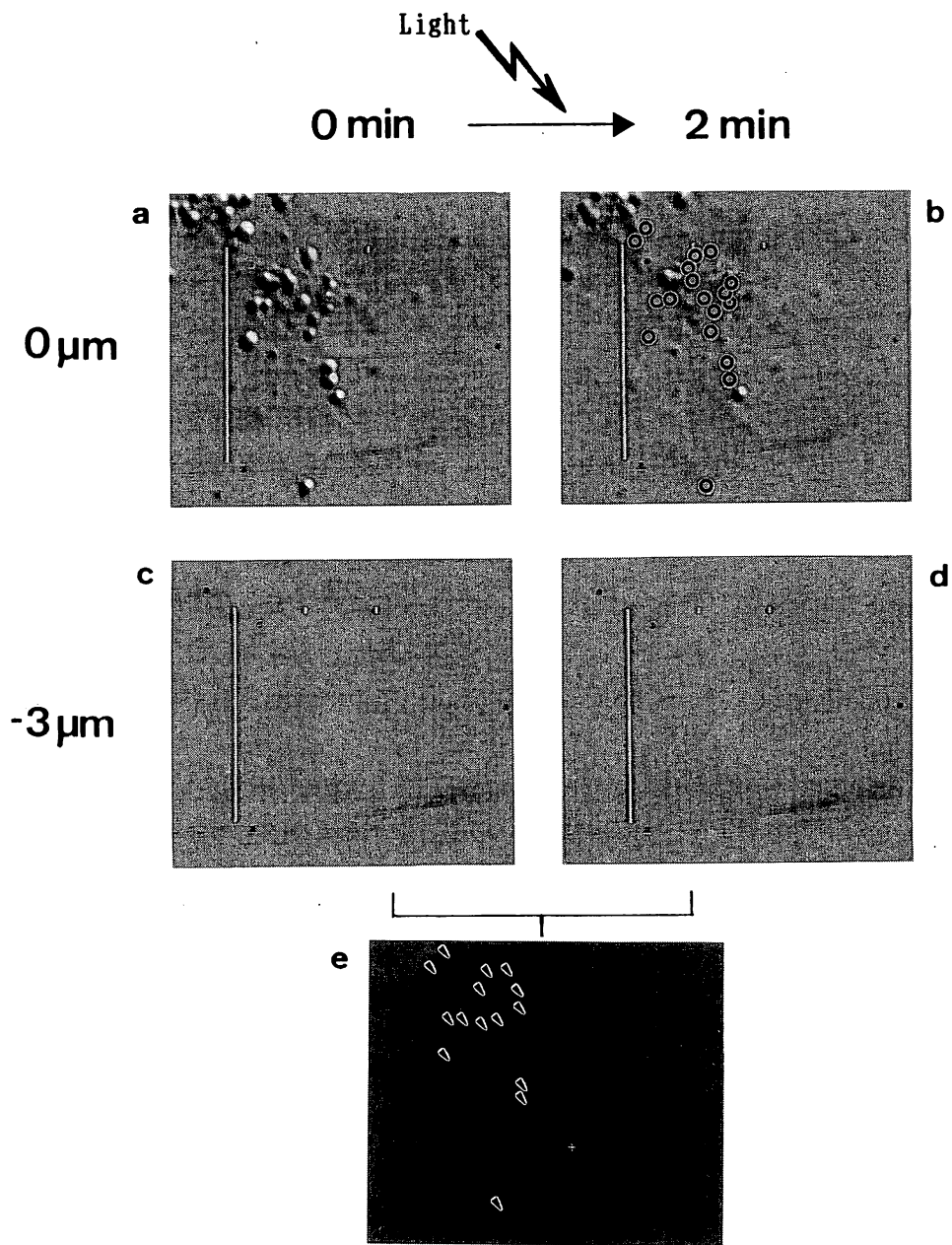


Figure 9. 段階的に焦点を変えたときの1個の顆粒像と標準偏差値 (S.D.)  
 横軸は、顆粒に焦点があった面 (= 0  $\mu\text{m}$ ) からのz-軸方向の距離を表す。  
 観察像に加えてS.D.値から客観的ボケ具合を知ることができる。



Subtracted Image

Figure 10. 焦点面にない顆粒のはじけの差像処理による検出  
 励起光照射前の顆粒像：焦点面からの距離 a: 0 μm c: -3 μm  
 励起光照射後の顆粒像：焦点面からの距離 b: 0 μm d: -3 μm  
 差像： $e = d - c$

- ：実際にはじけた顆粒
- ∨：差像処理により検出された顆粒  
 (励起光は2分間照射した。)

### 【考察】

差像処理を行っても焦点面にない顆粒のはじけのいくつかはとらえることができなかった。しかしこれは2分間に生じた顆粒のはじけ全てを、1回の差像処理によりまとめて解析した結果であると思われる。差像処理により3  $\mu\text{m}$ 離れた位置での顆粒のはじけは検出可能であり、1/30秒間隔で差像処理を行えば、1個1個のはじけを確実にとらえることができることを示す結果が得られた。

以上のことより、平均的ザイモサンの大きさから考えるとその中心に焦点を置いて観察する限りにおいて、開口放出は差像解析によりほぼ100%検出するという結果が得られた。この実験は顆粒の上下に何も存在しない理想的条件での検討であるので、実際には顆粒を立体的に多数含んでいる好中球にそのまま当てはめることはできないのかも知れないが、得られる開口放出頻度は実際に発生した開口放出頻度とかなり近い値であると考えてよいという結果を得ることができた。

### (2)好中球貪食時の食胞形成過程における開口放出現象の頻度及び局在解析

差像処理により、好中球貪食過程で生じる開口放出を抽出することが可能であることがわかったので、開口放出の頻度局在解析に応用した。

#### 【実験方法】

##### ①開口放出の頻度解析

差像をもとに、好中球が1個のザイモサンを貪食した際に生じた開口放出の頻度を30例について求めた。

##### ②開口放出の局在解析

プログラムEP-6(付録参照)を作成し、モニター上の細胞輪郭のトレース及び開口放出の出現した位置とその座標を得た。これをもとに次の2つの観点から解析を行った。

##### 1)好中球の異物認識と最初に起こる開口放出との局在解析

##### 2)偽足伸長に伴う開口放出の局在解析

#### 【結果】

好中球が異物を最初に認識した場所の近傍で1個目の開口放出が起こることがわかった(Fig.11)。また、1個のザイモサン貪食に際して何個の顆粒がはじけるかも測定でき、結果をFig.12に示す。36 $\pm$ 17(平均 $\pm$ 標準偏差(n=30))個の顆

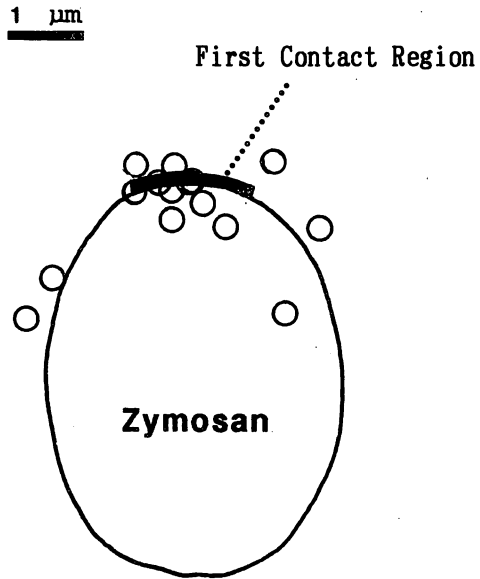


Figure 11. 好中球が最初にザイモサン (Zymosan) を認識した場所と、開口放出が最初に認められた場所との関係  
 貪食過程のビデオ録画 (15例) より、ザイモサンの認識部位と顆粒の位置とを重ね合わせて、開口放出が生じた場所 (丸印) をトレースした。

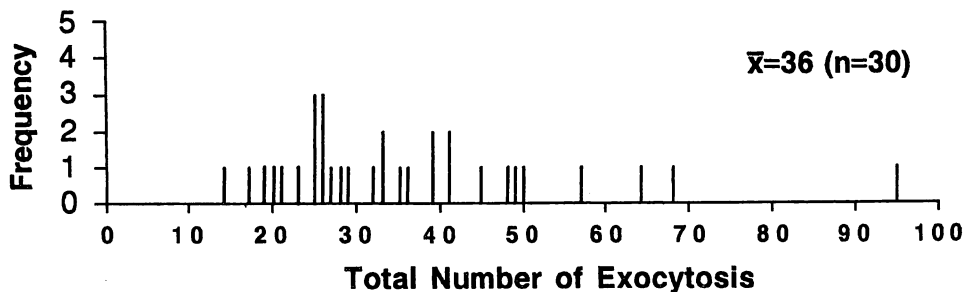


Figure 12. 好中球が1個のザイモサンを貪食する際に見られた開口放出の総数  
 開口放出の頻度は、差像処理像から計測した。



粒が開口放出することがわかった。またそのタイムコースをFig.13に示す。これによると、1個目の開口放出から最初の約25秒間に活発な開口放出現象が観察され、40秒を経過したあたりからその頻度は非常に低下した。さらに、Fig.14に示す様に開口放出は食胞に向かって起こっており、従来貪食に際する顆粒のはじけは細胞膜にではなく食胞膜に向かって起こることが示されているが、ここではより直接的に確認することができた。その出現する場所は、1個目2個目と開口放出が進行するにつれ、しだいに食胞底部から偽足の伸長につれて先端方向へ拡散していく傾向のあることもわかった (Fig. 14)。

#### 【考察】

貪食に際し、好中球は個々の顆粒内容物を速やかに放出すると同時に、食胞形成及び開口放出も短時間に完了した。すなわち、即時型生体防御に関与すると言われるにふさわしい能力を有する細胞であることが確認された。また、顆粒内容物は主に食胞の底部で放出されることから、食胞が閉鎖していなくても内容物を食胞外に失うことなく効率的無毒化が可能であると思われる。

1個目の顆粒のはじける位置は、最初に異物を認識した場所によって限定されていると考えられる。では、タイミングは何によって決まるのだろうか？得られた結果からは2つの事が可能性としてあげられる。まず、偽足伸長が69%の時点で最初の開口放出が起こるという結果から考えられることは、ザイモサン上の抗原とそれに対応する好中球表面膜受容体間の結合量が、ある閾値を越えることができ初めて開口放出刺激を導くのではないかということである。一方、平均的タイムコースに着目した場合、偽足伸長と開口放出の継続時間の長さがほぼ一致し、かつ偽足伸長が開口放出に25秒先行しているという事実気づく。つまり偽足伸長と開口放出とは非常に密接な関係にあり、偽足伸長に伴って生じる抗原・受容体結合後、ある時間の後にその場所で開口放出が発生することが示唆される。偽足伸長が開口放出に先行する約25秒間、開口放出を最終的に引き起こす鍵となる一連の反応の活性化に必要なのではないかと考えられる。

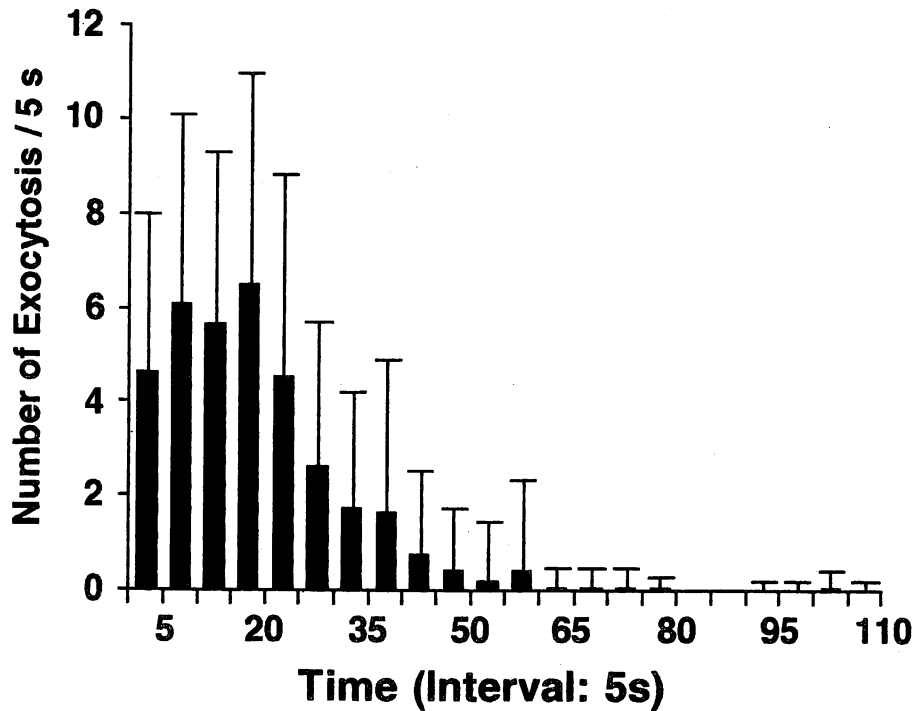


Figure 13. 開口放出の頻度とそのタイムコース

好中球が1個のザイモサンを貪食する際に観察された開口放出の頻度を5秒間隔で累計し、開口放出開始後の時間経過と開口放出の頻度との関係を示した。開口放出の頻度は、差像処理像から計測した。

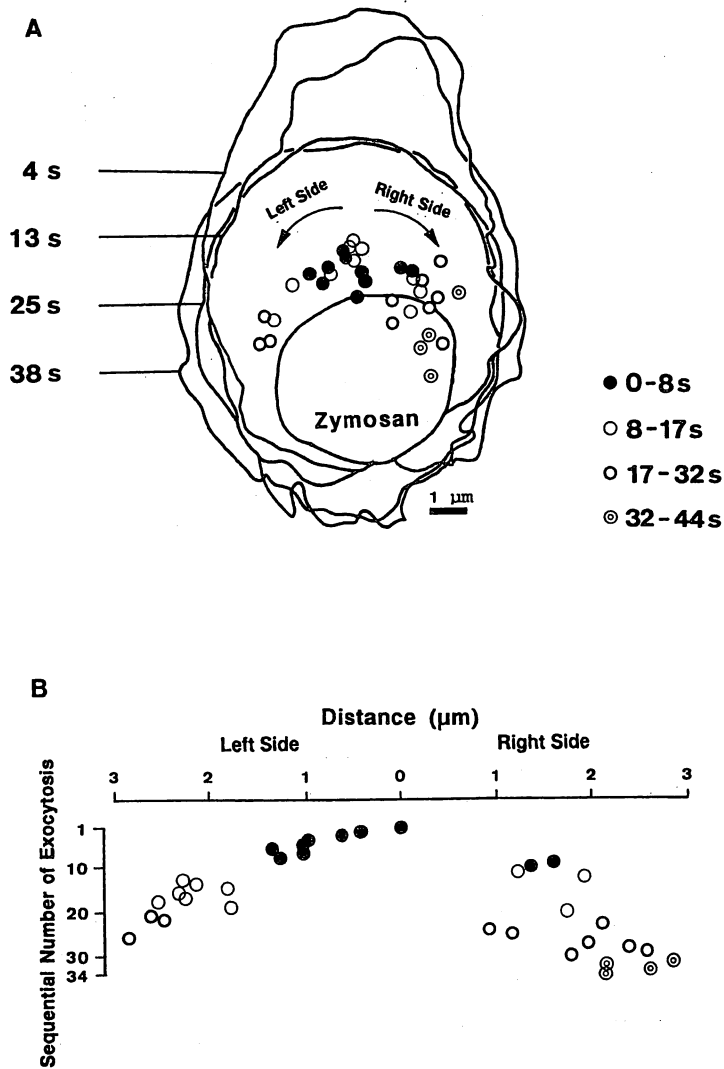


Figure 14. 好中球が1個のザイモサンを食食した際に観察された開口放出の局在性とその時間経過

A: 細胞の輪郭の変化と開口放出が生じた場所の、ビデオ記録により得られたトレース像。偽足が左右に伸長してザイモサン (Zymosan) を取り囲むことにより食胞が形成される。最初の開口放出が生じた時点からの時間経過と、代表的な細胞輪郭のトレースを示す。開口放出の生じた場所は、図の右端に示す4つの時間帯に分けて、それぞれ異なった記号で図中に示した。

B: 開口放出の場所を、最初に生じた開口放出の場所を基準にして、左右それぞれの方向について示した。時間が経過し、偽足が伸長するにつれて、開口放出は食胞の最深部から次第に左右両方向に広がっていった。

## [Ⅲ章] 微弱光観察法の開発と好中球Ca<sup>2+</sup>動態の追跡

### 1. 序論

高感度ビデオカメラを用いる事により微弱光観察が可能となり、主に蛍光観察に威力を発揮している。感度の高いカメラと細胞内Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 動態を追跡できる蛍光色素であるfura-2を用いることによりCa<sup>2+</sup>の秒オーダーでの動態解析が可能となる。そこで、貪食のどの段階に一致した[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の動きがあるのか、また、刺激分泌連関との関与も強く示唆されている[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が、好中球貪食過程で生じる顆粒の開口放出とそのタイミングにおいてどう関係づけられるのか明らかにすることを試みた。

#### (1)高感度ビデオカメラ

代表的なものは撮像管タイプのSIT (silicon intensified target) カメラ (Fig.15) と、CCDカメラにイメージインテンシファイヤーを接続したI-CCD (intensified charge-coupled device) カメラ (Fig.16) である。I-CCDカメラはSITカメラと比べ500nm付近では約10倍の感度もある上に残像が少なく、より微弱な蛍光の高速な変化を解析するのに適している。一方、SITカメラは残像が問題になるが、解像度の高いきれいな像の得られるカメラである。その他冷却CCD (Cooled CCD; C-CCD) カメラも微弱光観察に用いられる。これは、CCDチップ部を冷却して暗電流を減らし、長時間露光を可能にしたカメラで、微弱光でも画質がよい。その反面、画像の読みだしが遅く、時間変化の必要な計測には向いていない。Table1 に主なカメラの特徴について示す。

#### (2)Ca<sup>2+</sup>イメージング法

##### ①蛍光プローブと2波長測光

Ca<sup>2+</sup>を測定するための蛍光試薬は、Tsien等によって精力的に開発されてきた<sup>14)</sup>。これらの試薬は選択的にCa<sup>2+</sup>と反応しその蛍光特性を変化させる。従って、試薬を細胞内に導入し、ある選択された励起及び蛍光波長での蛍光強度を測定することで[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を測定することができる。また、Ca<sup>2+</sup>との反応に波長依存性が存

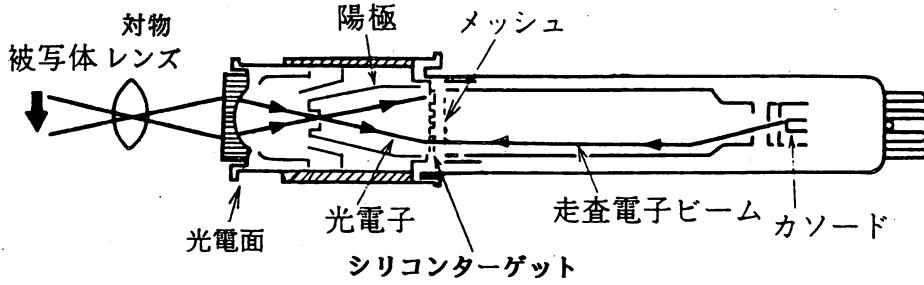


Figure 15. SIT (Silicon Intensified Target) カメラの構造

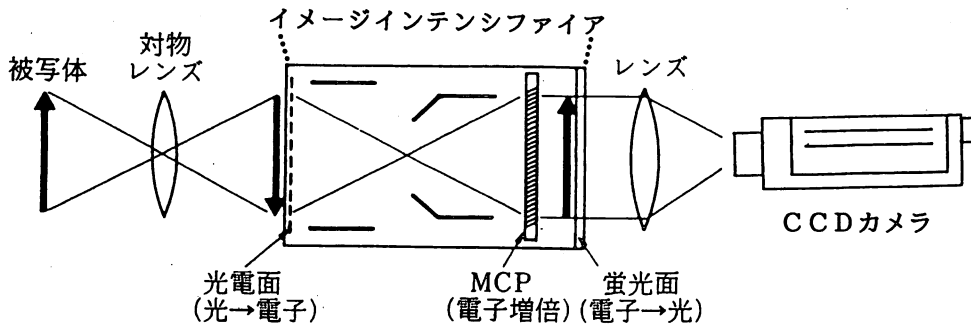


Figure 16. I-CCD (Intensified CCD) カメラの構造

使用撮像素子	特徴	観察波長域 (nm)	水平	*	S/N Minimum値
			中心 解像度 (TV本)	残像 (%)	
明視野観察用	CCD	400-920	570	-	52
微弱光観察用	SIT	400-850	500	7	48
	I-CCD	350-800	450	3	52
極微弱光観察用	I-サチコン	280-650	300	3	--

\* 50ms後の値

ビデオカメラカタログ (浜松ホトニクス) より抜粋

Table 1. ビデオカメラ特性

在する良い例がfura-2であるが、Fig.17,aにfura-2の蛍光発光スペクトルを示す<sup>15)</sup>。Fura-2の励起スペクトルとCa<sup>2+</sup>濃度との関係を見ると、Ca<sup>2+</sup>濃度に依らず蛍光強度が一定になる波長、すなわち等吸収点を360nm付近に持つ。このためCa<sup>2+</sup>濃度に依存して等吸収点より短波長側では蛍光強度が増加し、長波長側では逆に減少するという特徴を示す。よって、各蛍光強度比を求めればCa<sup>2+</sup>変化を感度良く検出できると同時に、励起光の強度・細胞の厚みの変化及び蛍光退色に影響されないCa<sup>2+</sup>が測定可能となる。ここに、2波長測定 of 可能な蛍光色素の利点があるといえる。そこでfura-2を使った測定では、励起波長として340nmと380nmあるいは340nmと360nmの組み合わせが用いられ、340nm/380nmあるいは340nm/360nmという蛍光強度比が求められることが多い。また、発光スペクトルの求められている純粋溶液系とは異なり、タンパク質のコロイド系である細胞では、340nmでの蛍光強度の増加分より、380nmでの減少変化の方が大きく現れることもわかってきており、340nm/360nmではなく380nm/360nmを用いることも感度良い検出として意味があると考えられる。

その他の特徴として、Fura-2は蛍光量子収率が高く、Ca<sup>2+</sup>との解離定数も大きい(224nM (pH7.05, 37°C, 1mM Mg<sup>2+</sup>))ことから、低濃度の使用で測定が行え、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>への影響が少ない。また、細胞内で起こる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>濃度の変化100nM~1μMに対応した蛍光強度変化の感受域を持つという利点もある。

## ② 蛍光プローブの細胞へのロード法

Fura-2 (Fig.17,b) は水溶性であり、細胞膜を通過することができない。そこで、細胞膜透過性になるよう試薬のもつカルボキシル基にアセトキシメチル (AM) 基をエステル結合させたAM誘導体も合わせて開発されている (Fig.17,c)。多くの場合、AM誘導体とのインキュベーションにより細胞へのロードが行われるが、細胞内に取り込まれた後、このAM誘導体のままではCa<sup>2+</sup>と結合できない。しかし、AM基は細胞内に一般的に含まれているエステラーゼによって切り離されるため本来のfura-2にもどり、細胞膜透過性が失われ細胞内に留まると同時にCa<sup>2+</sup>との反応性を回復する。そこで、インキュベーションするだけで多くの細胞に同時にプローブを導入することが可能となっている。

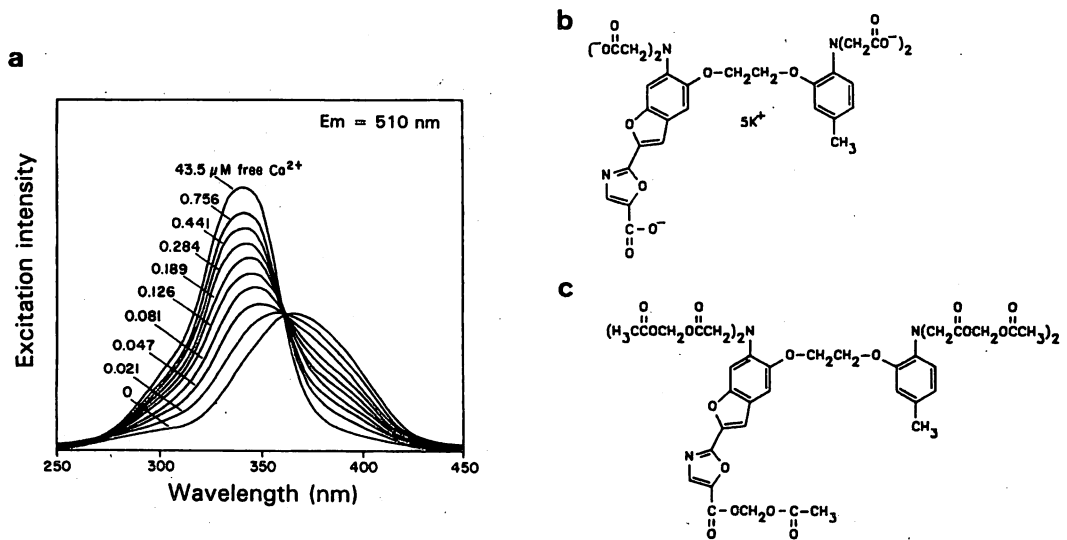


Figure 17.  $\text{Ca}^{2+}$ 測定用蛍光プローブ

a: 発光スペクトル

b: Fura-2の構造式

c: Fura-2 (AM体)の構造式: 細胞膜透過性を有する

## 2. $\text{Ca}^{2+}$ イメージング法の好中球 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態追跡への応用

微弱光検出の可能な高感度カメラ、蛍光プローブ画像処理装置及びイメージングソフトウェアの開発の結集により、検出が可能となった細胞内微量物質の代表例とし $\text{Ca}^{2+}$ が挙げられる。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ は好中球の刺激応答系においてセカンドメッセンジャーとして重要な役割をはたしていると考えられている。例えば、好中球の重要な機能である $\text{O}_2^-$ 産生に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が重要な関わりを持つことが既に示されている<sup>16)・17)</sup>、シングルセルで $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態をとらえた系を用い、ザイモサンに向かう偽足先端と形成された食胞周辺で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が高まっている<sup>18)</sup>、ザイモサンに接触した瞬間に速やかな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の高まりが観察される<sup>19)</sup>、あるいは貪食後の食胞とリソゾーム融合を引き起こすシグナルとして $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が必要である<sup>20)</sup>、といった報告もなされている。しかし、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化が貪食のどの段階で必要なのかという詳細な解析、例えば、顆粒の開口放出現象と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇のタイミングは一致しているのか等の解析はなされていない。

III章で示したビデオ顕微分析法により、好中球の貪食時の食胞形成過程において開口放出現象もふまえた平均的タイムコースを得ることができた。そこで、貪食のどの段階に一致した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の動きがあるのか、特に刺激分泌連関との関与も強く示唆されている $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が好中球貪食課程で生じる顆粒の開口放出とそのタイミングにおいてどう関係づけられるのかを明らかにする目的で2つのシステムを用いて解析を行った。

- (1)市販の $\text{Ca}^{2+}$ イメージングシステムを好中球貪食過程における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態解析に応用し、有用性を検討した。
- (2)明視野像を高倍率高分解能でとらえることにより、貪食過程・開口放出現象を見ながら同時に蛍光像による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態も観察可能な、明視野・蛍光像同時イメージングシステムを用いての検討も行った。



## 【実験方法】

### ① ザイモサンの固定化

セルチャンバーの底面へザイモサンを吸着させ固定化した。すなわち88mg/mlオプソニン化ザイモサン浮遊液を30分間超音波処理して塊をほぐした後、200 $\mu$ lをセルチャンバーに入れた。引き続き200 $\mu$ lのHBSS+を静かに加え、10分以上静置した。この方法により、特に熱処理・乾燥をさせなくても、ザイモサンを充分固定化できた。上澄は使用する直前にとり除いた。

### ② Fura-2ロード方法

2mM Fura-2液 (ストック液)      2 $\mu$ l

1% BSA in HBSS-                      498 $\mu$ l

これら2液を超音波処理30分→ボルテックス1分により充分混和する。

調製した好中球 ( $2.5 \times 10^5$  cells/ml) 50 $\mu$ lを37°Cで10分間予備保温後、fura-2液50 $\mu$ lを加えて37°Cで40分間ロードを行った (最終濃度2 $\mu$ M) \*<sup>1</sup>。この細胞50 $\mu$ lをザイモサンをはり付かせたセルチャンバーに載せ、37°Cに保温したHBSS+ 400 $\mu$ lを静かに加え検鏡を開始した\*<sup>2</sup>。

\*注意点1 好中球はfura-2ロードの困難な細胞としてあげられるが、測定ごとに上記に示す方法で新たにfura-2をロードした好中球を用いる限りにおいて、明るい蛍光像を得ることができた。一般的には、ロードを高めるためにpluonic F 127も用いられるが、好中球では余り効果がなく、逆にpluonic F 127を加えた状態で37°Cに保温すると好中球が凝集してしまうという問題が生じた。むしろ、fura-2を1%BSAを含んだ液で希釈することが、有効濃度を高め効率よいロードを可能とするために最も重要な点であった。

\*注意点2 蛍光物質をロードした細胞に励起光を照射することは、体に巻きついたニクロム線に電流を流すようなもので、細胞にとっては負担が大きく自然な反応を止めてしまう場合も少なくない。そこで、テレビカメラの感度は最大にして蛍光検出に努めた。感度に余裕のあるときはむしろNDフィルター等で励起光強度を落とし、細胞への負担を軽減した。

### (1)市販システムを用いた340nm/380nm蛍光比像による解析

本項ではArgus-100画像解析装置（浜松ホトニクス）を用いCa<sup>2+</sup>イメージングソフトウェア（CA-2; version 3.70）によって、測定を行った。

#### 【システム構成及び画像の取得】

システム構成図をFig.18に示す。340nmと380nmの励起光の切り換えはコンピューターによって制御されているフィルター交換によって行い、それと同期して画像の取得が行われた。ザイモサンを捕らえた直後から340nmと380nmの光で励起したときの蛍光像を、各々2.4秒間隔で約2.5分間、計31画面を取得した。対応する画像間の演算により、蛍光比（340nm/380nm）を算出した。

#### 【結果】

得られた蛍光像（340nm励起像）・画像演算により求められた蛍光比（340nm/380nm）及び平均的蛍光比のタイムコースをFig. 19に示した。好中球の貪食課程で急速な蛍光比の増加、すなわち[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の高まりが観察され、数回の緩やかなオシレーションの後、再びバックグランドレベルにまで低下した。340nmの蛍光像から細胞の形、偽足の伸長や閉鎖等をたどることができるので、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の変化する時点での細胞動態と合わせ観察した。その結果、偽足伸長の開始に一致した[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の高まりが観察され、偽足が閉じ食胞形成が完了する頃にはほぼバックグランドレベルにまで低下することが明らかになった。バックグランドレベルの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は250-300nMであり、蛍光比最大値レベルでは400-900nM（平均的には600nM）であった。なお、fura-2は好中球の核に多少局在する傾向もみられた。

### (2)同時イメージングシステムを用いた380nm/360nm蛍光比像による解析

従来は蛍光観察のために明視野像が得られず、細胞内微細構造との関連をつけることが困難であった。ここでは寺川により先行開発され<sup>22)</sup>、当教室でも製作を試みている同時イメージングシステムを利用した（Fig.20）。このシステムにより、明視野像を高分解能にとらえることにより、貪食過程・開口放出現象を観察することが可能で、さらに蛍光像による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>動態の同時観察が可能となった。これを、貪食及び開口放出現象と[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>動態との直接的追跡に応用した。

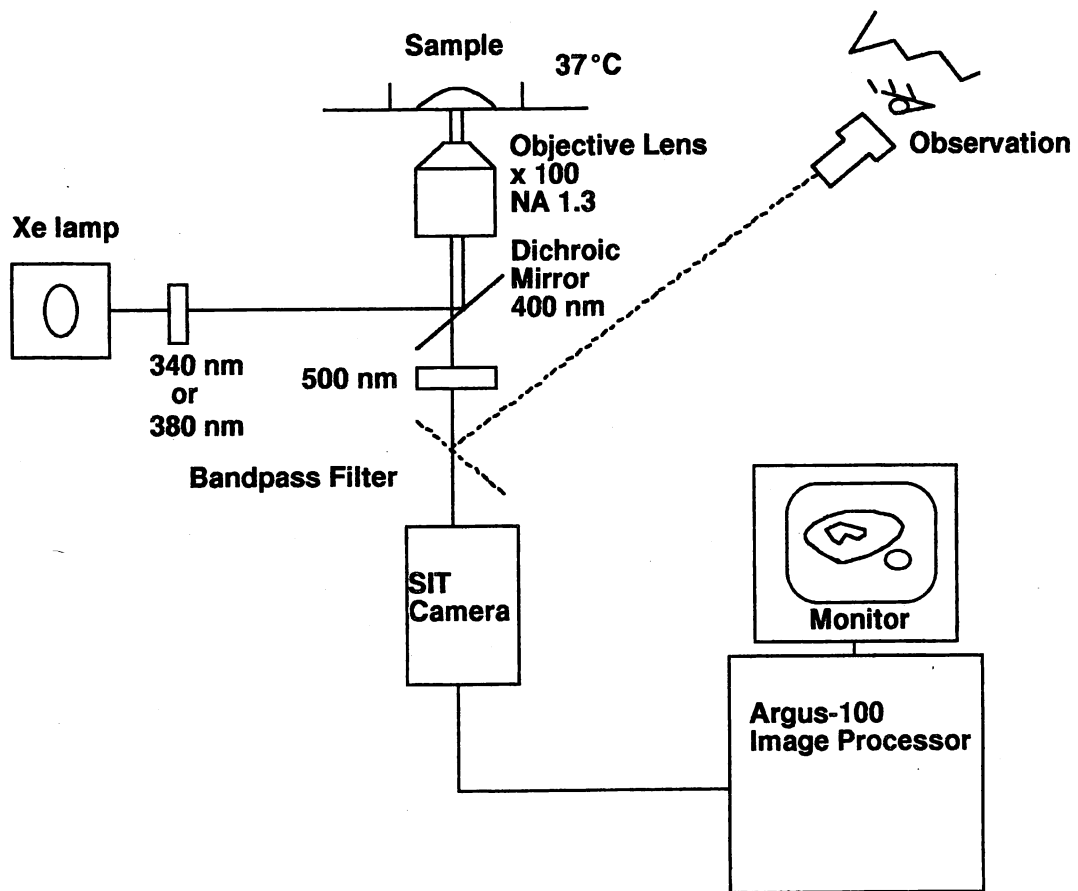


Figure 18.  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングシステム (Argus-100, Hamamatsu Photonics)の構成図

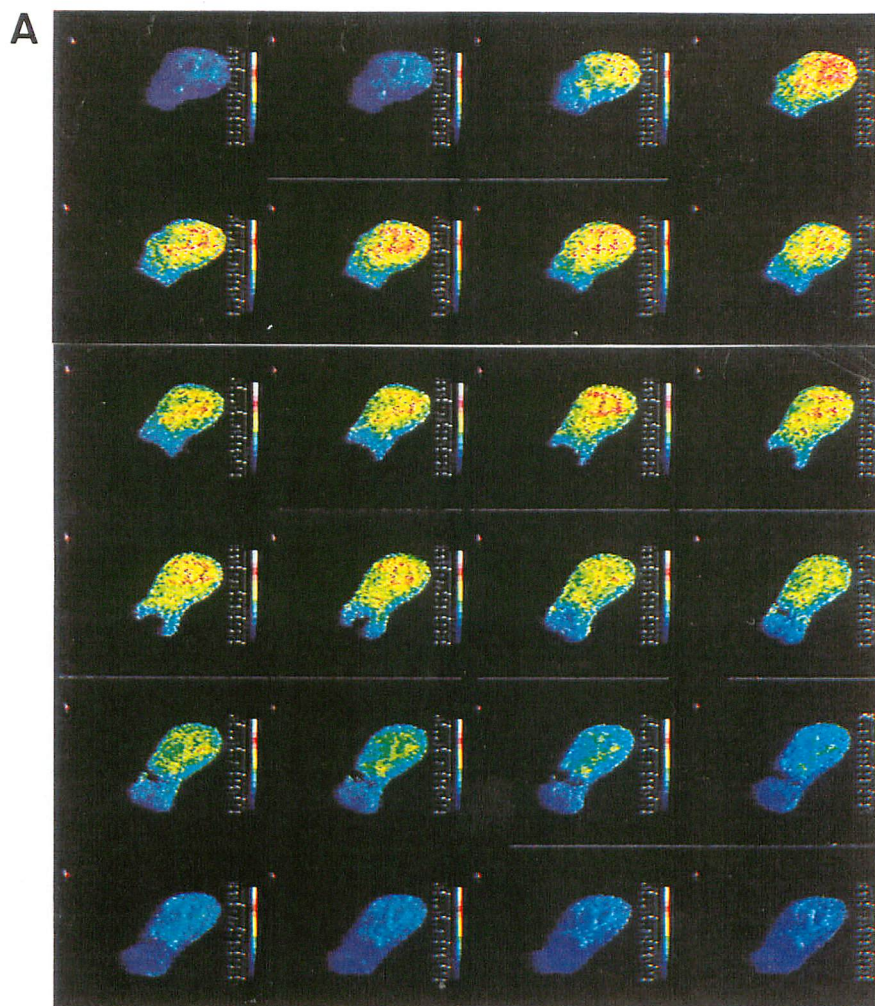


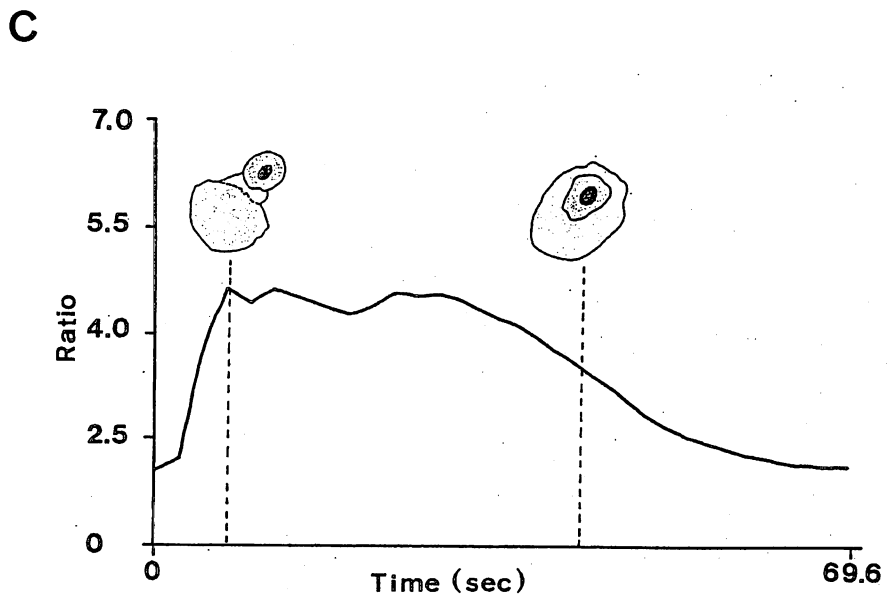
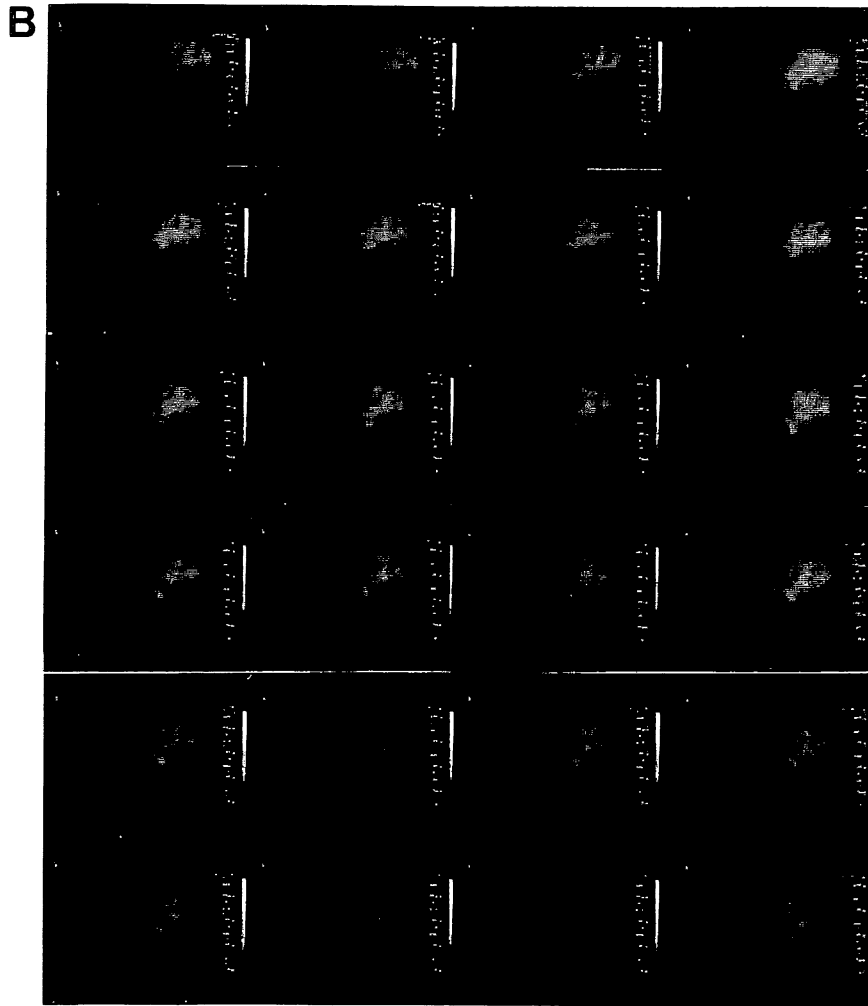
Figure 19. 好中球がザイモサンを捕食する過程での細胞内カルシウム濃度変化を示すビデオ録画像

A: Fura-2の蛍光比像 (340nm/380nm)

B: 340nm励起によるfura-2蛍光像

C: 平均的蛍光比のタイムコース

連続写真の時間間隔はA、B共に2.4秒で、Aでは明るい色調が高い $[Ca^{2+}]_i$ を示す。



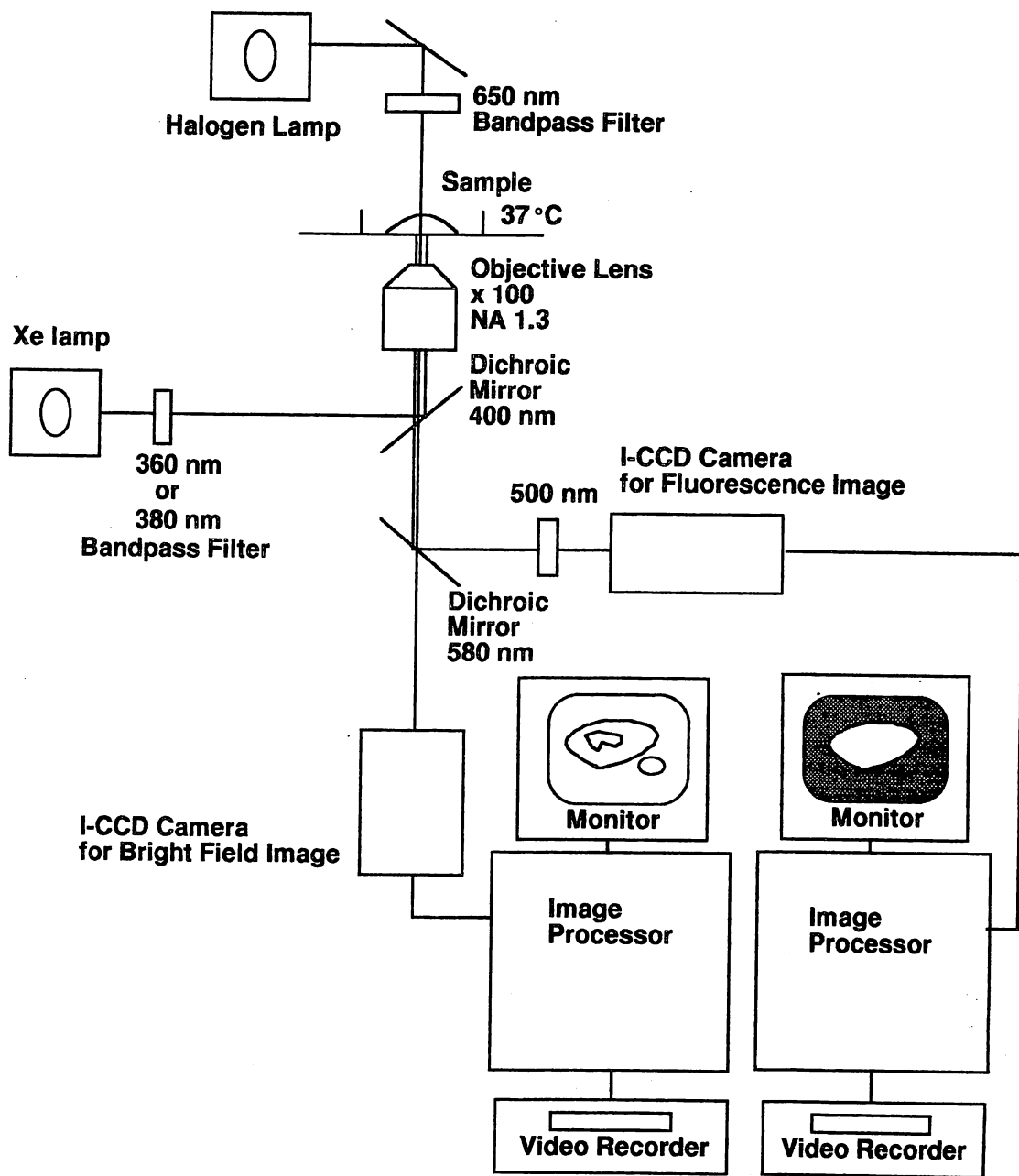


Figure 20. 蛍光像と明視野像の同時イメージングシステムの構成図

### 【システム構成及び画像の取得】

顕微鏡は、Zeiss社のAxiovert 35型を用い、対物レンズは微分干渉の可能な100倍のレンズ (Planneo.  $\times 100$  pol.) を用いた。中間変倍レンズは2.5倍を使用した。本システムの特徴は、2つのカメラへ光を分岐する行路切り変え部にダイクロイックミラーを用いたことにあり、これによって同時イメージングが可能となっている。ここで用いられているダイクロイックミラーは、580nmより短い波長の光は反射し、長い波長の光のみ透過させるという特性を持つ。 $\text{Ca}^{2+}$ に依存してfura-2の発する蛍光は500nm付近の光である。そこで明視野観察用として長い波長、例えば650nmの光を用いれば、行路切り変え部のダイクロイックミラーによって500nmの蛍光は反射され650nmの明視野光は直進して互いにその強度を失うことなく2つに分けられ、別々のカメラで独立した映像としてモニター上に現れる。2台のカメラは共にI-CCDを用いているが、蛍光をとらえるカメラは青色域に、明視野光をとらえるカメラは赤色域に高い感度特性をもつものを選択し、分岐された各々の光をより高感度にとらえる工夫もしている。通常の明視野観察には、光量が充分あるのでCCDカメラが用いられる。しかし、ここでは650nm付近の光のみで微分干渉像を形成するため光が微弱となるので、蛍光用だけでなく、明視野用にもI-CCDカメラを使用した。

そこで本システムを用いて先の方法と同様に準備した細胞を検鏡し、ザイモサンを捕らえた直後から380nmと360nmの光で励起したときの蛍光像を約1.4秒間隔で交互に取得し、同時に得られている明視野像観察により食胞形成及び開口放出が終了するまで継続してビデオ録画を行った。明視野像における高コントラストを得るための微分干渉法を並立させると、340nmの光の透過度が著しく低下してしまうため、代りに360nmの光を使用した。得られた蛍光像を、高速画像処理装置 (Argus-100) のプログラム (CA-1及びコントロールプログラム) により380nm/360nmの蛍光強度比を算出した。これにより開口放出現象もとらえた食胞過程の明視野像と、それに対応する2.8秒間隔の蛍光比像を得ることができた。

### 【結果】

Fig. 21に明視野像及び対応する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 依存蛍光比像を示す。市販のシステムで得られたのと同じ結果が確認され、偽足伸長と一致した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の高まりがみられた。本法ではさらに、開口放出像も同時に観察可能なことより、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 低下後

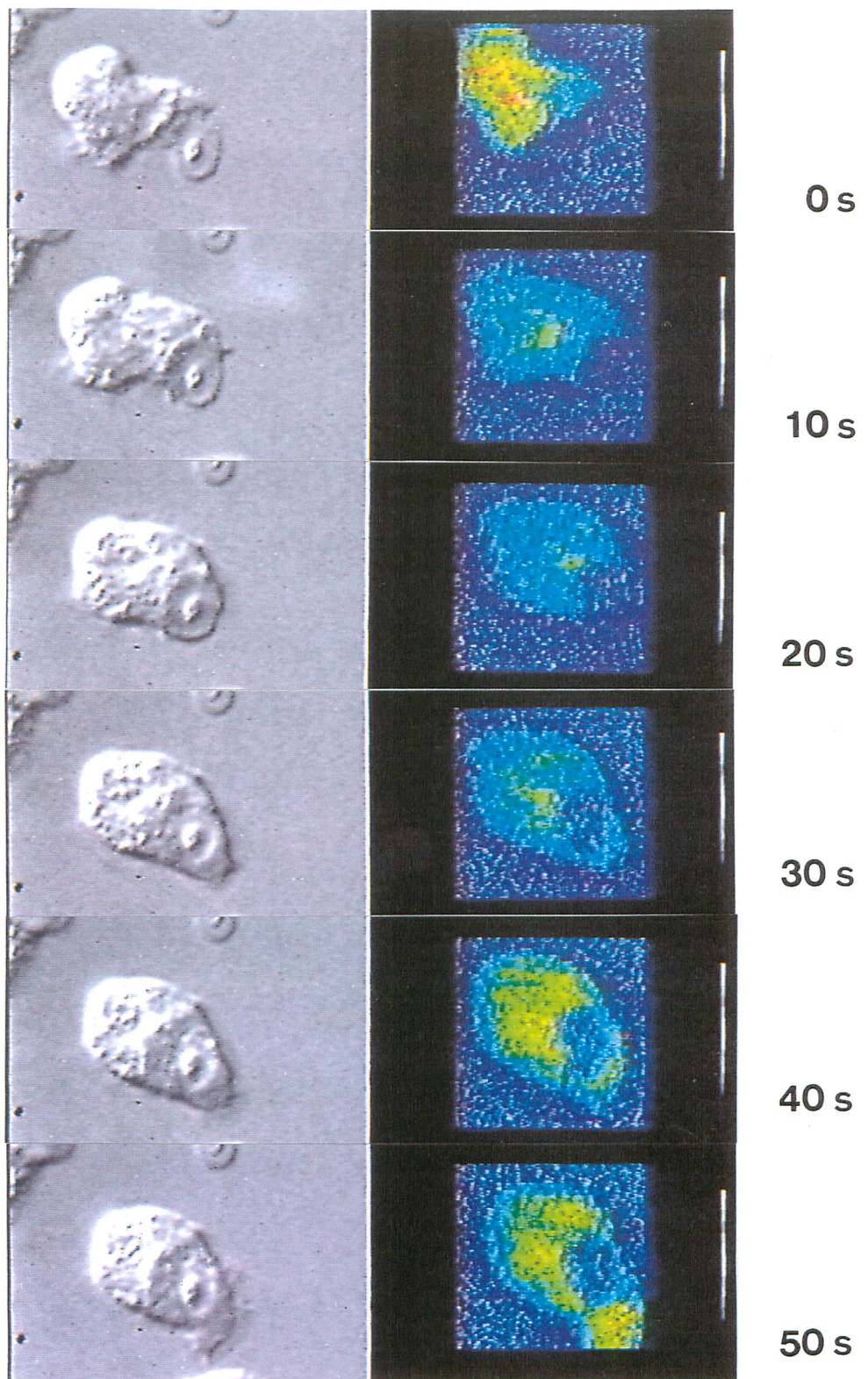


Figure 21. 好中球がザイモサンを捕食する過程を示すビデオ録画像  
 同時イメージングシステムにより得られた明視野像を左に、fura-2蛍光比像  
 (380nm/360nm)を右に示す。蛍光比像では色調が暗いほど、 $[Ca^{2+}]_i$ が高い  
 ことを示す。



も開口放出は継続することがわかった。すなわち、 $[Ca^{2+}]_i$ の高まりは偽足の伸長・閉じという食胞形成に良く一致したタイミングで細胞全体に観察され、開口放出のタイミングや局在とは一致していなかった。

#### 【考察】

上記2つのシステムの応用として、好中球貪食過程における $[Ca^{2+}]_i$ 動態を追跡したところ、新たに偽足伸長に一致した $[Ca^{2+}]_i$ の高まりが起こることが明らかとなった。また、先に求めた貪食時食胞形成過程の平均的タイムコースから考えて、開口放出が起こるタイミングや局在とここで観察された $[Ca^{2+}]_i$ とは一致しない。同時イメージングシステムを用いた結果からも、 $[Ca^{2+}]_i$ の高まりは食胞形成に良く一致したタイミングで起こり、開口放出のタイミングや局在と一致しないことが直接的に確認された。 $[Ca^{2+}]_i$ は、貪食過程の偽足伸長にではなくその後の食胞とリソゾーム融合を引き起こすシグナルとして重要である<sup>20)</sup>と言う報告もあるが、ここで得られた結果は、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が偽足伸長時によく一致しており、細胞運動に関与する分子の活性化への寄与が示唆された<sup>23)</sup>。ここで観察された $[Ca^{2+}]_i$ の高まりは、形態的变化としては食胞形成とよく一致したタイミングで観察されたが、貪食時に生じるNADPHオキシダーゼ系の活性化への関与も当然考えられ、現段階では最終的にどういう機能に結びつくかは不明である。また同時に、本項で観察された $[Ca^{2+}]_i$ の高まりは開口放出の局在やタイミングを説明するには不十分であることから、逆に開口放出には、他のより直接的な分子の関与が必須であることも示唆された。

他方では、ザイモサンに接触した瞬間3.2秒以内に急速な $[Ca^{2+}]_i$ の高まりが観察されるという報告もあるが<sup>19)</sup>、このような高速な変化をとらえることはできなかった。これは技術的には、本システムの時間分解能が秒オーダーであり高速な像の取り込みが行えないことに起因する。また一方で、ザイモサンに接触するあたりから励起光を照射すると細胞が食べ込みを途中でやめてしまうことも多く、偽足伸長の手前あたりから蛍光測定にはいることが多いという実験的操作のため、ごく初期の高速な高まりを見逃している可能性も考えられる。検量線より求めた $[Ca^{2+}]_i$ のベースラインが一般的に言われる100nMよりもかなり高くなっているのはそのためかも知れない。

$[Ca^{2+}]_i$ の関与が強く示唆されてきた刺激分泌連関において、好中球貪食過程に

おける顆粒の開口放出現象と $[Ca^{2+}]_i$ の間には直接的関与のないことを、市販及び開口放出をとらえながら $[Ca^{2+}]_i$ 動態を同時に追跡可能な2つのシステムを利用することにより、直接的証明を得ることができた。

## [IV章] 極微弱光観察法の開発と好中球の生成する活性酸素分析

### 1. 序論

光の強度が非常に弱くなるにつれて、光は粒子（フォトン）としての性質を顕著に表し、光電圧・光電流で計測するよりもフォトン1つ1つを計測した方がS/N比の上で有利であり、このフォトンカウンティング撮像により、化学発光の様な極微弱光の画像化も可能となる<sup>24)</sup>。そこで顕微鏡に超高感度ビデオカメラを装着した化学発光ビデオ顕微システムを構築し（Fig.22）、好中球の刺激→応答系から生じる活性酸素の局在・定量解析を試みた。

#### (1) 超高感度ビデオカメラ（フォトンカウンティングカメラ）

現在市販されている中で最も感度が高いビデオカメラであり、1個のフォトンの検出が可能であることからフォトンカウンティングカメラとも呼ばれる。ここでは VIMカメラ C2400-20（浜松ホトニクス）を使用した。このカメラはFig.23に示す様に、2つの主要な部分、すなわち、信号増幅部であるイメージンシファイアと後続の撮像管タイプのカメラとから構成されている。基本的には、I-CCDカメラ（Fig.16）と同様の構成になっているが、イメージンシファイア部分に2段のマイクロチャネルプレート（MCP）が用いられ、高感度化が計られている。入射した光の強度に応じて光電面から飛び出した電子は、MCP 1段当りに1900 Vの高電圧が印加されていることにより、約100万倍も増幅され、2次元的ひろがりを持ったまま蛍光面にあたり、ここに増幅像を作り出す、これを後続のカメラがとらえ画像が形成される。2段のMCPを用いることで、フォトンによる信号には十分な増幅がかかるのに対して、ノイズは増幅されず、信号をノイズから区別して取り出すことが可能となる。また、1個のフォトンMCPで増幅される程その広がりが大きくなるので、逆に解像度は低下する。

#### (2) フォトンカウンティングイメージング法

VIMカメラを使用し、フォトン1個1個をとらえて積算することにより、極微弱光の画像化が可能となる。VIMカメラで微弱光をとらえた場合、モニター上にはポ

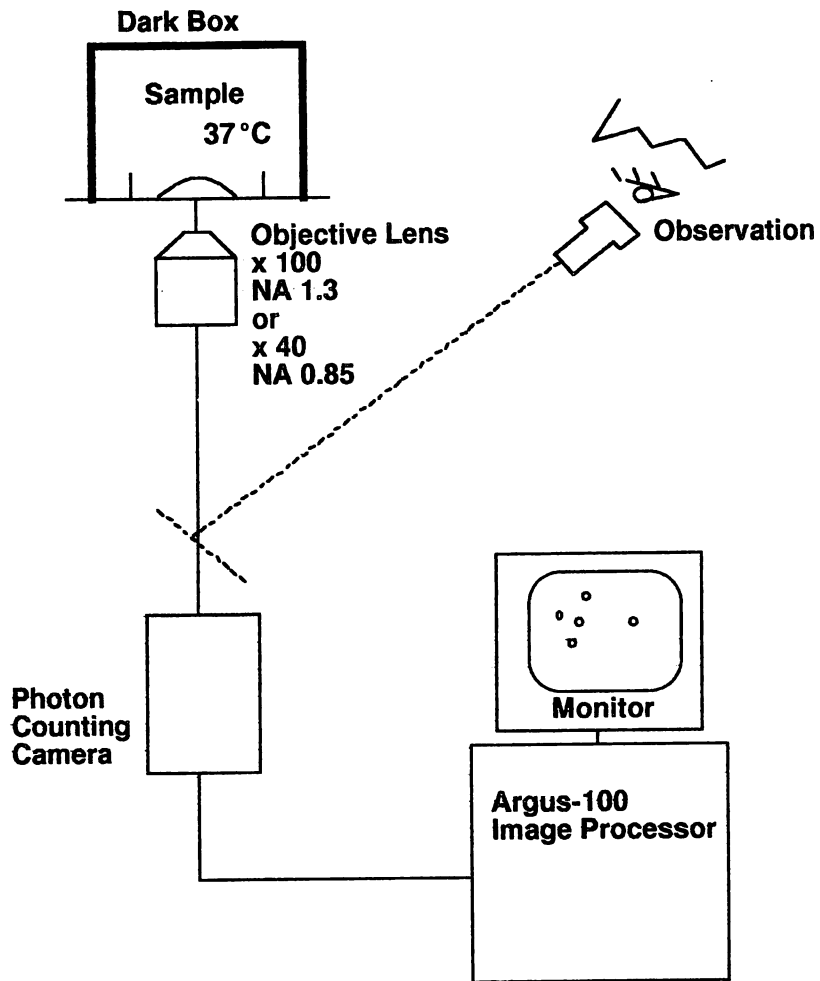


Figure 22. 化学発光ビデオ顕微システムの構成図

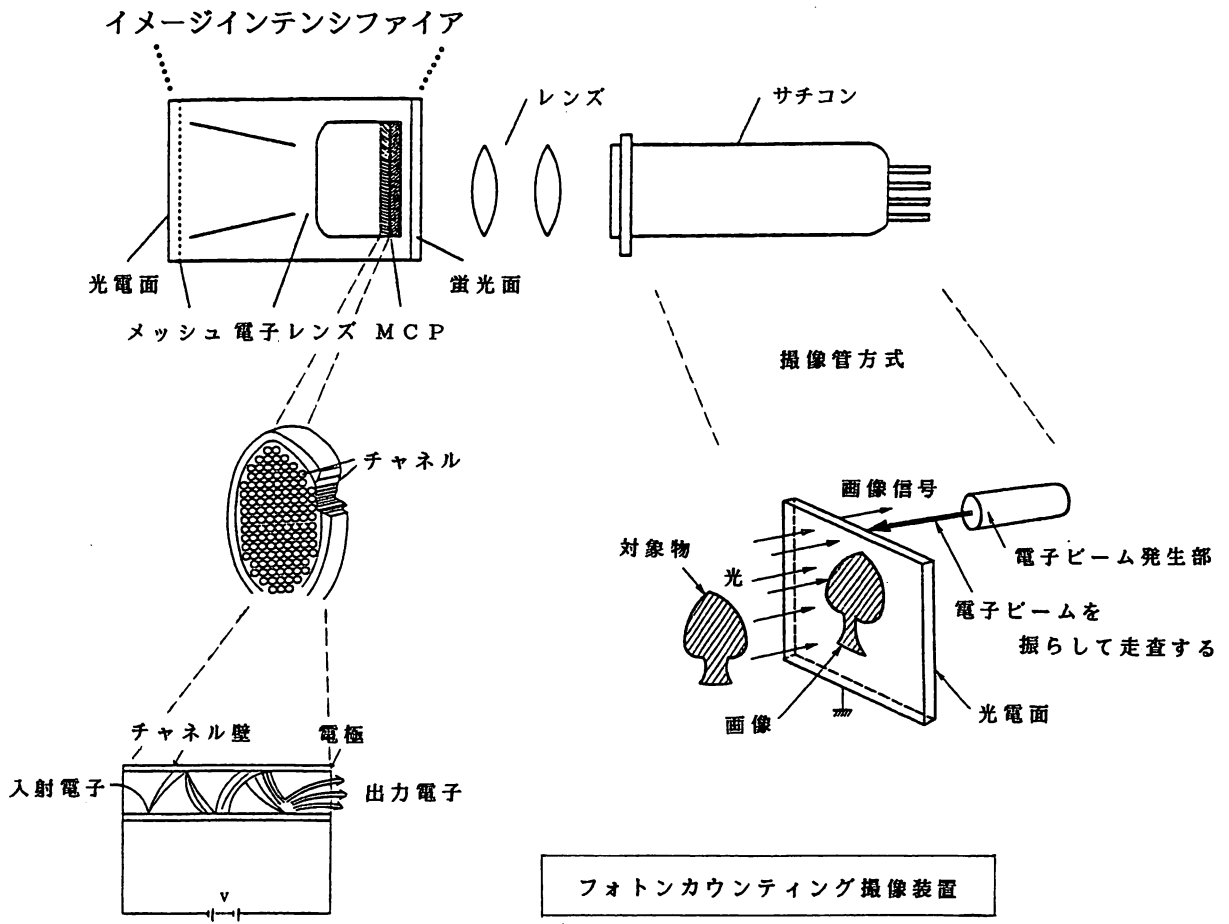


Figure 23. フォトンカウンティングカメラ (VIMカメラ) の構造

ツボツとスポット像が出現する (Fig.24, a)。この生像を処理し、フォトンとノイズをある一定のレベル (カメラによって決まった値: ディスクリミネータレベル) で切り分け2値化を行い (Fig.24, b, c)、この2値化画像を画像メモリに蓄積していくことにより画像が形成される。この処理によりノイズが消去され、あるレベル以上の信号すなわちフォトンだけを取り出すことができる。

### (3) フォトンカウンティングイメージング法の好中球活性酸素生成系への応用

超高感度カメラと画像処理システムを組み合わせることにより、肉眼ではほとんど識別できない発光を光の最小単位であるフォトンとしてとらえ、1つ1つを2次的に検出して映像化することが可能となり、極微弱光や発光を利用して生体内の微量な分子の動態を追跡する試みも可能となってきた<sup>25), 26)</sup>。一方、これまで動態解析を試みる応用例として扱ってきた好中球が食作用によって異物を細胞内にとり入れ分解処理することにより生体防衛の役割を果たしていることは述べてきた通りである。この過程において好中球は種々の活性酸素を生成し<sup>27)</sup>、これが直接・間接的に異物の無毒化に重要な役割を果たしていることが知られ、現にこの活性酸素産生に遺伝的異常を示す慢性肉芽腫症の患者においては、重篤な感染を繰り返すことが知られている。また一方、単離された好中球も生体内におけるのと同様に、異物の貪食及び種々の刺激物質により活性化されて活性酸素を生成することが知られている<sup>28)</sup>。この系に適当な化学発光物質を共存させると、生成した活性酸素の存在を化学発光という光として効率よくあるいは特異的に検出することが可能であり<sup>29), 30)</sup>、さらに、生じた極微弱光すなわちフォトンにはフォトンカウンティング撮像により映像化することができることから、生成した活性酸素の局在及び定量解析が可能となると考えた。そこで、以下の様に2種類の化学発光物質を用いた化学発光顕微分析システムを開発し、好中球刺激→応答系から生じる活性酸素の局在・定量解析を試みた。

①ルミノール依存性化学発光検出---好中球貪食過程で生成する次亜塩素酸 (HOCl) の検出

②MCLA依存性化学発光検出---好中球刺激系で生成するの $O_2^-$ 検出及び定量解析

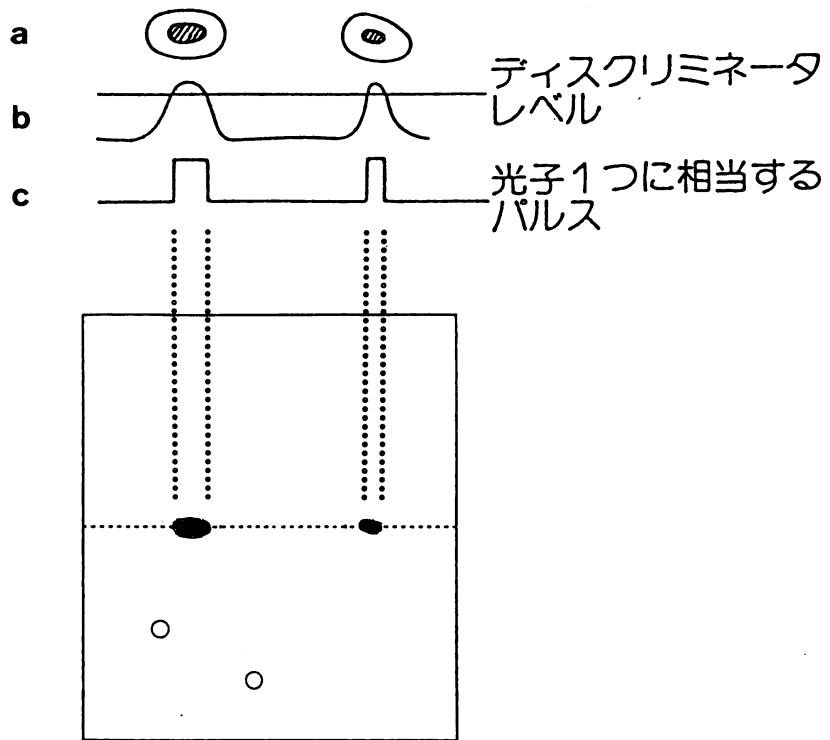


Figure 24. フォトンカウンティングイメージング法  
 aはVIMカメラでとらえられた生像を示す。この画像の輝度を示したのがbである。この生像は、光子より発生した輝点とノイズより発生した輝点とが含まれている。この画像をディスクリミネータレベル（光子とノイズとを切り分けられる輝度レベル）で2値化を行い、光子部分のみを取り出すとcの様になりこれがモニター上に現れる。

## 2. システムの開発及び画像の取得

システムの構成をFig.22に示す。顕微鏡はNikon社のDIAPHOTO-TMDを用いた。対物レンズは蛍光観察用の100倍または40倍のもの (Fluor×100, N.A.1.3; Fluor×40, N.A.0.85) を用いて光路に存在するフィルター類を取り除き、わずかな光をできるだけ効率よく取得し、操作は可能な限りの暗室で行うことによりノイズの除去に努めS/N比の向上を計った。試料から発された光は、VIMカメラで増幅されかつ電気信号に変換される。このカメラは、印加電圧をかけなければ通常のサチコンとして機能し、II章で用いたCCDカメラと同等の感度を持つので明視野像の取得も可能であり、広い感度域を有する。しかし逆に入射光量と設定感度との調節を非常に慎重に行わなければならない、特に化学発光検出のように最大感度で用いるときには、光を過剰にいれないよう注意深い操作が必要であった。1個のフォトンには2段のMCPを通過することにより、蛍光面上で約50 $\mu$ mの広がりを持つ。さらに、フォトンカウンティングイメージング処理を、Arugs-100画像解析装置 (Control Program, Photon Counting mode) で行うことにより、1個のフォトンにはモニター上で25画素の広がりと輝度値1を持ったスポット像として出力される。

## 3. ルミノール依存性化学発光検出---好中球貪食過程で生成するHOClの検出

好中球が異物を貪食する際に生成するスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) や過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) は、好中球のもつアズール顆粒の内容物の1つであるミエロペルオキシダーゼ (MPO) が開口放出されることにより強力な殺菌作用を有する次亜鉛素酸 (HOCl) へ変換される。この系に、化学発光物質の1つであり高感度検出に最も利用されてきているルミノールを共存させることにより生じる化学発光は①MPO欠損症患者の好中球では検出できない、②カタラーゼ・アジ化ナトリウムにより抑制される、③ルミノールは中性緩衝液中では $O_2^-$ との反応性は極めて低く、 $ClO^-$  (HOCl) が強力な酸化剤となるという理由から、HOClをとらえたものであると考えられている<sup>31), 32)</sup>。そこで化学発光ビデオ顕微システムを用いて、好中球貪食過程において生じる活性酸素を、ルミノール依存性化学発光として検出することを試みた。

### 【実験方法】

細胞懸濁液20 $\mu$ lをセルチャンバー\*1に入れて顕微鏡ステージにセットし、約5



分静置後あらかじめ加温しておいた反応液（最終濃度300-900 $\mu$ g/mlザイモサン・最終濃度10 $\mu$ g/mlルミノール・HBSS+）\*2を300 $\mu$ l静かに加える。

\*注意点1 セルチャンバーの底面のカバーガラスはここでは特に無蛍光のものを使用した。文献によっては 24時間暗所保存したガラス器具を化学発光測定に用いているが<sup>33)</sup>、ここでは特に行わなかった。

\*注意点2 ザイモサンを含んだHBSS+液はあらかじめ37°Cに保温した。しかし、ルミノールは光照射や酸化の影響を受けやすいので、氷上で遮光して保存し、使用直前に加え反応液として用いた。

#### (1)化学発光の検出

ザイモサンの濃度300・600・900 $\mu$ g/mlにおいて、反応液を加えてから2-6・7-11・12-16・17-21分の化学発光測定を行った。得られたフォトン像を各々4分間蓄積し、1画面上の総カウントを求めた。

#### (2)化学発光の細胞内局在解析

ザイモサン300 $\mu$ g/mlを含む反応液を静かに加えた後、検鏡を開始した。まさにザイモサンを捕らえようとする直前から化学発光測定を2分間行い、2分間の発光蓄積像及び2分後の明視野像を記録した。その後、食食過程2分間における化学発光蓄積像と、2分後の明視野像を重ね合わせ処理することにより、化学発光の局在解析を行った。

##### 【結果】

Fig.25に示す様に化学発光はザイモサン濃度に依存して観察された。ザイモサンを加えてから7-16分間に特に強い発光が生じた。また、局在解析の結果を Fig.26に示す。発光像は細胞の存在する場所と一致していたが、さらに拡大観察を行うと、細胞の中でも食胞の局在にほぼ一致した強い発光が観察された。

##### 【考察】

化学発光ビデオ顕微システムを用い、食食過程で生じる活性酸素のうちHOC1を、ルミノールを利用して増強させた化学発光として高感度に検出することができた。

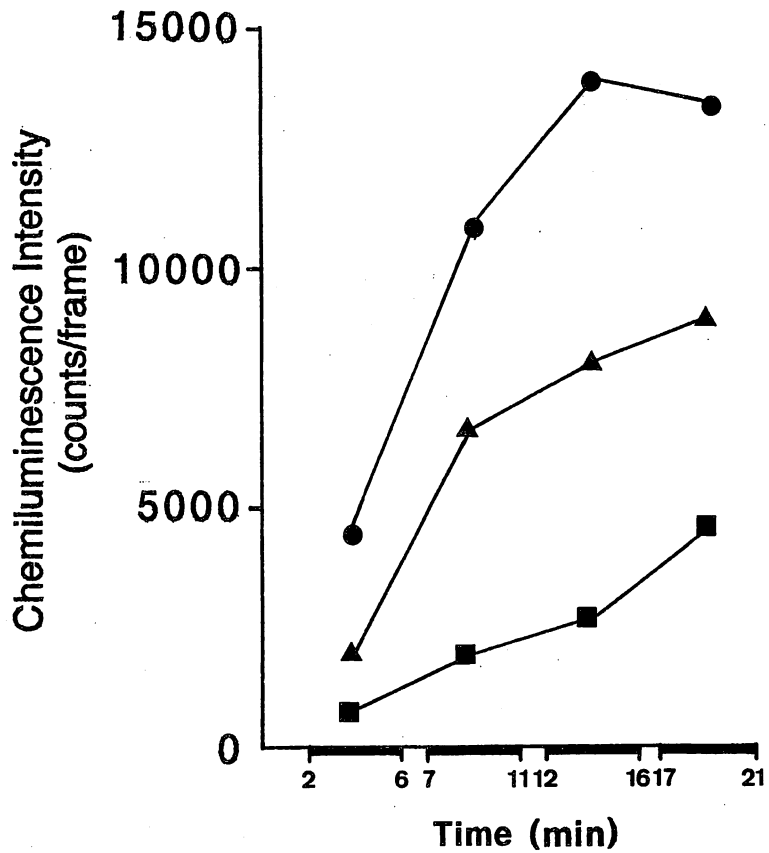


Figure 25. 好中球がザイモサンを取り込む際に認められる化学発光の変化  
 化学発光は4分間蓄積され、画像処理装置により計算処理することにより  
 カウントの総量を得た。加えたザイモサンの量は、300 (■)、600 (▲)、  
 900 (●)  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

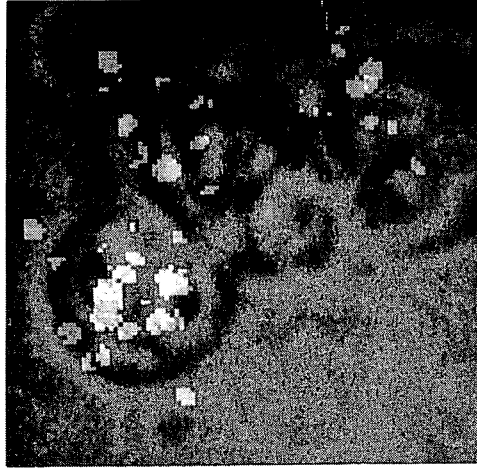


Figure 26. ザイモサンを捕食した後の好中球のビデオ画像。明視野像と化学発光像を重ね合わせて表示してある。図中の白い点は、活性酸素により生じたフォトンの局在を示すが、それは食胞の位置とよく一致している。

1画面約100個の細胞を用いた総カウントとしての検出はもとより、1個の細胞における検出及び局在解析も可能であることがわかった。これまで、貪食過程をルミノール依存性化学発光として同様の系でとらえた場合、細胞の辺縁に一致した発光がとらえられたという報告がなされているが<sup>26)</sup>、ここではさらに食胞の局在に一致する強い発光が見られるという結果が得られた。すなわち、 $H_2O_2$ が存在しかつMPOが放出されて生成する強力な殺菌作用をもつHOClが、食胞という限局された場に生成されることを生きた細胞を用いて示し得た結果である。さらにⅢ章に関連する事柄として、MPOが食胞内に確かに放出されたこと、すなわち貪食過程で食胞へ向かう開口放出が確かに行われることを、生きた細胞レベルで示すことができた。

#### 4. MCLA依存性化学発光検出---好中球刺激系で生成する $O_2^-$ の検出

好中球においては、異物貪食の他に好中球の膜表面に存在する受容体に作用する薬物・イオノフォア及びプロテインキナーゼC活性化物質など非常に多くの可溶性物質によってNADPHオキシダーゼが活性化され、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) を産生することが知られている<sup>28)</sup>。この中で、phorbol myristate acetate (PMA) と $Ca^{2+}$ イオノフォアであるA23187との組み合わせという強力な刺激によって生じる $O_2^-$ をルミノールで検出したという報告は既になされている<sup>35)</sup>。しかしこの系はPMAによって産生された $O_2^-$ が、A23187による脱顆粒によって放出されたMPOによってHOClに変換された結果生じる化学発光を検出している。そこでもっと直接的に $O_2^-$ を捕らえるために、本研究ではウミホタルルシフェリン誘導体であるMCLAを化学発光物質として選択した。一般に化学発光試薬は活性酸素種に対する特異性が低く、特定の活性酸素種のみをとらえることが困難であった。その中でMCLAは $O_2^-$ に対して高い特異性を持つことが知られており<sup>36)</sup>、この研究目的に適した試薬であると考えられる。MCLAは $O_2^-$ に対する高い特異性を示すかわら、実際には一重項酸素 ( $^1O_2$ ) とも反応して同様の経路で発光する可能性のあることが知られている<sup>37)</sup>。しかし好中球の食殺菌という系においてはpH条件などを考慮すると $^1O_2$ 生成は期待されず、MCLAを用いてとらえられる発光はここでは $O_2^-$ を特異的に反映していると考えられる。

一方、刺激としてサイトカラシンE (Cyto E) とコンカナバリンA (Con A) と

を併用した。好中球をある刺激物質で前処理しておき、次に異なった刺激物質で処理すると、前処理しない場合に比べて $O_2^-$ 生成の程度が著しく増加することが知られ、priming効果と呼ばれている<sup>38)</sup>。Cyto EとCon Aとの組み合わせは初期に見つかったpriming効果の一例であり、この増強効果は好中球の機能検査の高感度化に応用しうる現象として報告されている<sup>39)</sup>。そこで、化学発光ビデオ顕微システムを用いて、Cyto EとCon Aとのpriming効果を検出することを試みた。従来 $O_2^-$ の検出は懸濁系でチトクロームC法による検出・定量が行われ<sup>40)</sup>、また同様の懸濁系が化学発光法でも検出されている<sup>30)</sup>。これらの方法と比較した場合、本分析法においては2次元検出が可能という利点があるが、検出感度はどうなのか検討を行った。さらにMCLAを化学発光物質として用いる場合には $O_2^-$ を特異的に検出できることより、 $O_2^-$ の定量解析も試みた。 $O_2^-$ それ自体は溶液系での寿命は短く、また生細胞系で生成される $O_2^-$ の場合は酵素反応による代謝系も駆動されるので正確な定量は困難であることが予想されるが、本分析法の検出感度を知る上での1つの評価目安を知るためと、細胞レベルでの $O_2^-$ 産生量を求めうる可能性を追求して定量解析を行った。

#### (1) Cyto EとCon Aとの併用による増強効果 (priming 効果) の検出

MCLAを用いた化学発光顕微システムを用いて、好中球の産生する $O_2^-$ を検出することが可能かどうか検討を進めた。

##### 【実験方法】

細胞懸濁液 $10\mu\text{l}$ をセルチャンバーに入れて顕微鏡ステージにセットし、約5分静置後、予備加温しておいたCyto E  $10\mu\text{l}$  (最終濃度 $1.25\mu\text{M}$ ) を加え、3.5分間前処理を行った。引き続き、予備加温した反応液 ( $1.25\mu\text{M}$  Cyto E・ $100\mu\text{g/ml}$  Con A・ $20\mu\text{M}$  MCLA・ $100\mu\text{g/ml}$  DETAPAC\*<sup>1</sup>を各々最終濃度として含むHBSS+)  $580\mu\text{l}$ を静かに加えた後、2-4・6-8・10-12・14-16・18-20・22-24分 (各2分間) の化学発光測定を行った。また、 $1.25\mu\text{M}$  Cyto E及び $100\mu\text{g/ml}$  Con A各単独刺激の場合については、3.5分間の前処理をHBSS+  $10\mu\text{l}$ を加えて行い、同じ濃度のCyto EあるいはCon AとMCLA及びDETAPACを含むHBSS+  $580\mu\text{l}$ を加えた後、同様の測定を行った。

\*注意点1 DETAPACを添加することにより $O_2^-$ の検出を効率よく行うことを試みた。これは文献<sup>4,2)</sup>でマクロファージ浮遊液からの $O_2^-$ をMCLAを化学発光試薬として測定する際に用いられていることより引用した。筆者は、好中球をCyto EとCon Aとで刺激する系においてはDETAPACが存在することにより発光カウントが1.5~2倍に高まることを確認しており、DETAPACを用いることは効率のよい $O_2^-$ 検出に役立っている。何故DETAPACを用いると高いカウントが得られるかという理由については金属類によって触媒される $O_2^-$ の不均化を、DETAが金属類をキレートすることにより抑制するため、 $O_2^-$ の寿命が長くなるためであろうと推測される。このことは、逆にルミノール発光系にDETAPACを添加するとその発光が抑制されたという結果を得ていることにも符合する。

#### 【結果と考察】

Fig.27が示す様に、Cyto EとCon Aの併用による $O_2^-$ 産生の増強作用（priming 効果）を検出することができた。Cyto E、Con A 単独では顕著な発光ピークは観察されない濃度において併用により著しい発光強度の増加が観察された。この増強は10-20分をピークに20-24分まではその高いレベルが維持された。調製された細胞によりタイムコースは多少異なり、ピークやその後の低下が顕著かつ迅速に観察されることもあった。データは示していないが、30分を過ぎるとかなりバックグラウンドに近い発光強度に低下した。ここでは1画面あたりの総カウントを示しているが、1画面には各々の場合において約300個の細胞が存在していた。従来 $O_2^-$ 検出系では、チトクロームC法では $10^6$ 個<sup>40)</sup>、化学発光法では $10^5 \sim 10^6$ 個<sup>30)</sup>の細胞を用いた測定が行われているが、本分析系では300個の細胞で十分検出が可能であった。

#### (2)化学発光の2次元検出

ルミノールに依存した化学発光は、先に示した様に限局したものであった。そこでMCLAについても2次元的局在を検討した。

#### 【実験方法】

細胞懸濁液 $10\mu l$ をセルチャンバーに載せて顕微鏡ステージにセットし、約5分静置後、予備加温しておいたCyto E  $10\mu l$ （最終濃度 $5\mu M$ ）を加え、3.5分間前

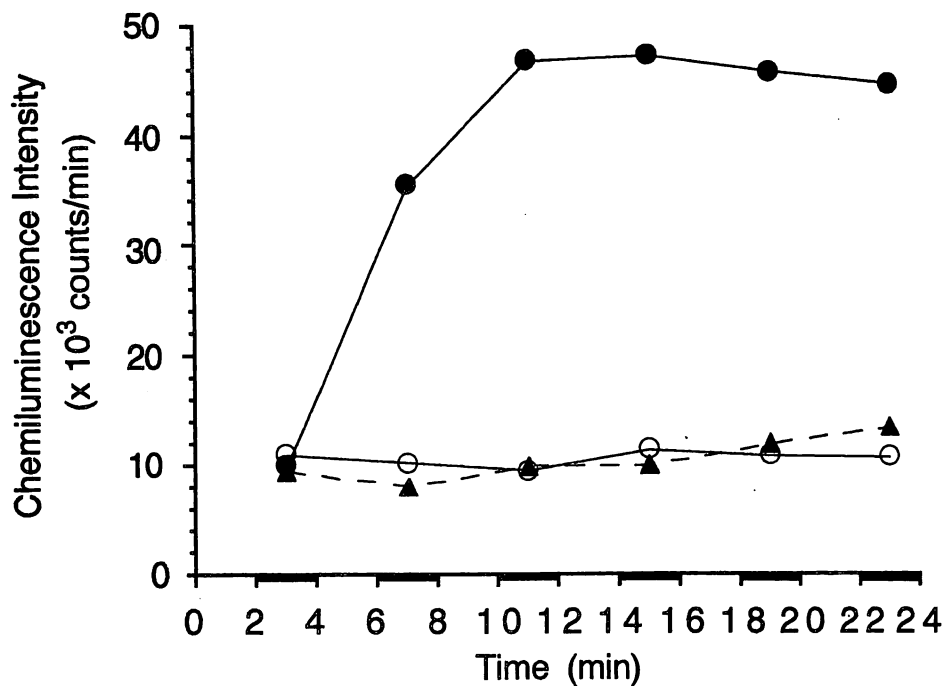


Figure 27. 化学発光ビデオ顕微システムにより測定されたCyto EとCon Aの相乗効果

○: 1.25  $\mu\text{g/ml}$  Cyto E    ▲: 100  $\mu\text{g/ml}$  Con A

●: 1.25  $\mu\text{g/ml}$  Cyto E と 100  $\mu\text{g/ml}$  Con A

2分おきに2分間(2-4, 6-8, 10-12, 14-16, 18-20, 22-24分)の画像蓄積を行い、Argus-100画像処理装置により計算した検出フォトンの総カウントをプロットした。いずれの実験においても、視野内の細胞数は約300個であった。

処理を行った。引き続き予備加温した反応液（5  $\mu$ M Cyto E・100  $\mu$ g/ml Con A・20  $\mu$ M MCLA・100  $\mu$ g/ml DETAPACを各々最終濃度として含むHBSS+）580  $\mu$ Mを静かに加えた後、1-5分（4分間）の化学発光測定を行った。測定後速やかに明視野像を取得した。細胞の存在しないバックグラウンドの発光を測定するため細胞懸濁液のかわりにHBSS+ 10  $\mu$ lを用い、全く同じ操作で化学発光測定を行った。

任意の細胞を中心として同じ面積を切り出し、その面積内の発光強度を求めた。また、その50枚の画像を重ね合わせた。細胞の存在しないバックグラウンドについても任意の場所について細胞の場合と同じ面積を切り出し、同様に50画像を重ね合わせた。得られた2つの重ね合わせ像の発光分布・強度を比較した。また得られた発光強度の値を細胞の存在する場所としない場所についてt-検定（ウェルチ検定）を用い、2つの平均発光強度（n=50）が有意に異なるかを検定した。

#### 【結果と考察】

1個1個の細胞からの発光は微弱であり散在的であった。MCLAは純水中では安定であるが、リン酸緩衝液中では酸化されて微弱発光する。この発光は一種の自動酸化であり、液中に存在する微量金属がその開始剤となっているものと考えられている。すなわち、MCLAはHBSS+系ではバックグラウンドが高くなるという欠点を持つ。そこでここで得られている発光が確かに細胞に由来するものなのか、単にバックグラウンドを見ているだけであるかを区別する目的で、各々50枚の画像の重ね合わせを行い比較を行った。

Fig.28が示すように、細胞の存在しない場所では発光は微弱であったのに対し、細胞及びその周辺ではバックグラウンドとははっきり区別される発光が観察された。

#### (3) $O_2^-$ 特異的化学発光であることの確認

細胞懸濁液10  $\mu$ lをセルチャンバーに入れて顕微鏡ステージにセットし、約5分静置後、予備加温しておいたCyto E 10  $\mu$ l（最終濃度5  $\mu$ M）を加え、3.5分間前処理を行う。引き続き予備加温した反応液（5  $\mu$ M Cyto E・100  $\mu$ g/ml Con A・20  $\mu$ M MCLA・100  $\mu$ g/ml DETAPACを各々最終濃度として含むHBSS+）580  $\mu$ lを静かに加えた後、2-4・6-8・10-12・14-16・18-20分（各2分間）の化学発光測定を行った。この反応液に178.5units/ml SODを添加して同様の測定を行った。また、無刺激系のバックグラウンドの発光測定として前処理液・反応液からCyto EとCon Aを



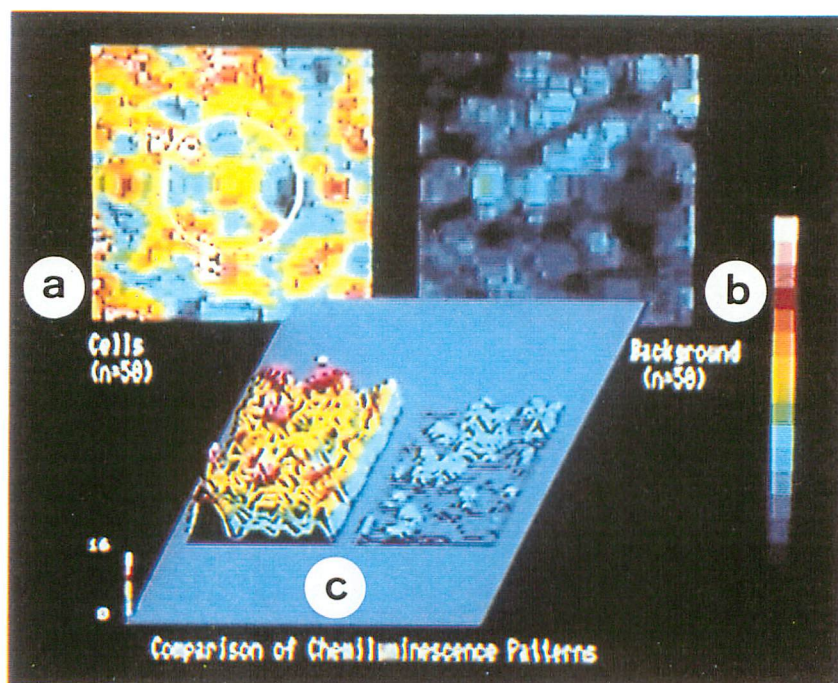


Figure 28.  $5\mu\text{g/ml}$  Cyto Eと $100\mu\text{g/ml}$  Con A刺激により検出された好中球の化学発光と、MCLAの自動酸化によるバックグラウンド発光との比較

- a: 細胞の存在する領域の発光像を50枚の画像について重ね合わせたもので、細胞の位置とだいたいの大きさは白円で示されている。
  - b: 細胞の存在しない領域を同様に50枚重ね合わせたもので、MCLAの自動酸化レベルに相当する。
  - c: aとbの画像輝度を3次元表示したものの。
- 細胞由来の化学発光 (a) の総カウントは、バックグラウンド発光 (b) の総カウントより有意に高かった ( $p < 0.01$ ,  $n = 50$ ) 。

除いて同様の測定を行った。

#### 【結果と考察】

Fig.29が示すように、Cyto EとCon Aの併用により高い化学発光活性が観察された。ここにSODを添加するとその発光が無刺激の場合にみられるバックグラウンドレベルにまで低下した。このことは観察された発光がほぼ $O_2^-$ に由来するものであり、MCLA 依存性化学発光が $O_2^-$ 特異的であることを示す結果である。なお、1画面約170個の細胞が存在していた。

#### 【まとめ】

化学発光物質としてMCLAを用いたビデオ顕微分析法により、好中球の産生する $O_2^-$ を検出できることがわかった。従来法よりもわずかに1/1000の細胞数で検出が可能であった。また、各々の系から得られたカウントを比較した結果、本法は477倍高感度であり、かつ $O_2^-$ に対する特異性が高いという利点もある。また2次元検出が可能であり、好中球の貪食過程での活性酸素生成をルミノールを用いて検出した場合とは対照的に、細胞及び周囲に分散した発光が観察された。これは $O_2^-$ 生成が好中球細胞膜に存在するNADPHオキシターゼにより生成され細胞外に向かって放出されるためであると考えられる。

本分析系では1コの細胞からの発光検出も可能ではあるが、MCLAはバックグラウンドレベルが高いので、1画面100~300個程度の細胞で測定する方が十分なS/N比が得られ正確な検出ができる。MCLAはこのバックグラウンドが高いという欠点のために鮮明な画像を捕らえにくい向きはあるが、好中球を可溶性物質で刺激する系において、まず生成する $O_2^-$ を特異的に検出し、かつ無毒・量子効率においてもルミノールより優れていることより、最適な化学発光試薬であるといえる。

### 5. MCLA依存性化学発光検出--- $O_2^-$ の定量解析

MCLAを化学発光物質として用いることにより好中球刺激系で生成する $O_2^-$ を特異的に感度よく検出可能であることが確認されたので、ここで得ている発光カウントが実際にはどれだけの $O_2^-$ に対応するのか定量解析を試みた。そのために吸光度計 (UV-180, 島津製作所) を用いるチトクロームC法<sup>43)</sup>、ルミネッセンスリーダー (BLR-301, アロカ) を用いた化学発光法<sup>44)</sup> 及び化学発光ビデオ顕微法 (Argus-100, 浜松ホトニクス) という3つの系を用い比較検討した。

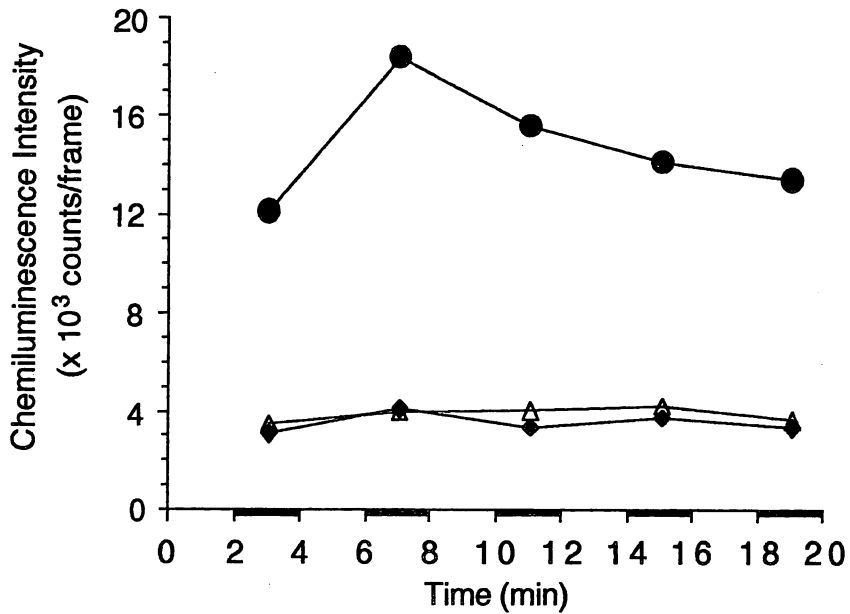


Figure 29. 5 $\mu$ g/ml Cyto E と 100 $\mu$ g/ml Con A刺激により生じた好中球の化学発光に対するSODの効果

●: Cyto EとCon Aによる化学発光。

◆: 178.5units/mlのSODを添加した場合。化学発光は抑制されている。

△: 刺激剤が含まれていないコントロール実験。

2分おきに2分間(2-4, 6-8, 10-12, 14-16, 18-20分)の測定を行った。いずれの実験においても、視野内の細胞数は約170個であった。

化学発光顕微分析法は $O_2^-$ 定量が可能なチトクロームC法と直接比較することにより検量線を作成することは不可能である。なぜなら、顕微鏡の対物レンズを通して溶液系で産生する $O_2^-$ に依存した発光を検出しようとする、焦点面に近いほどその寄与が大きく、焦点深度をはずれた光は対物レンズに入射する割合が小さくなる。そのため、焦点面に存在する細胞からの発光の検量線としてこの系を用いると、細胞からの発光を常に過大評価してしまうことになる。そこで、ルミネッセンスリーダーによる化学発光法をチトクロームC法と化学発光ビデオ顕微分析法の仲立ちとして利用した。すなわち、チトクロームC法とルミネッセンスリーダーを用いた化学発光法とで、等しいキサンチン-キサンチンオキシダーゼによる $O_2^-$ 生成を比較することにより、ルミネッセンスリーダーで得られる化学発光カウントを $O_2^-$ 量に換算する事ができる。一方、同じMCLA依存性化学発光系をルミネッセンスリーダーとビデオ顕微システムとで検出した場合には、同じ細胞を同様に刺激した同じ $O_2^-$ 産生に基づく発光を検出している訳であるから、等しい細胞数当たり産生する $O_2^-$ 量は等しいはずで、ここで用いた2つの系より得られるカウントを等しいと置くことができる。一方、ルミネッセンスリーダーで得られるカウントは検量線から $O_2^-$ 量に換算できるので、化学発光ビデオ顕微分析法の1カウントに相当する $O_2^-$ 量を計算上求めることができる。以上の方針に基づいて、定量系の検討を行った (Fig.30)。

#### 【実験方法及び結果】

##### (1)検量線の作成

チトクロームC法---43 $\mu$ Mヒポキサンチン、40 $\mu$ MフェリチトクロームCを含む  
HBSS+ (全1ml)

化学発光法---43 $\mu$ Mヒポキサンチン、20 $\mu$ M MCLAを含むHBSS+ (600 $\mu$ l)

各々に $2.5-75 \times 10^{-4}$  units/mlのキサンチンオキシダーゼ (6濃度) を加えることにより反応を開始した。反応液はあらかじめ $37^\circ\text{C}$ に加温したものをを用いた。チトクロームC法に基づき550nmの還元 ( $e_{\text{max}}=2.11 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) を吸光度計 (UV-180、島津製作所) で計測し、得られた初速度及びルミネッセンスリーダー (BLR-301、アロカ) により得られた最大カウントを各キサンチンオキシダーゼ濃度に対して求めた。6例の平均値より検量線を作成し、ルミネッセンスリーダーのカ

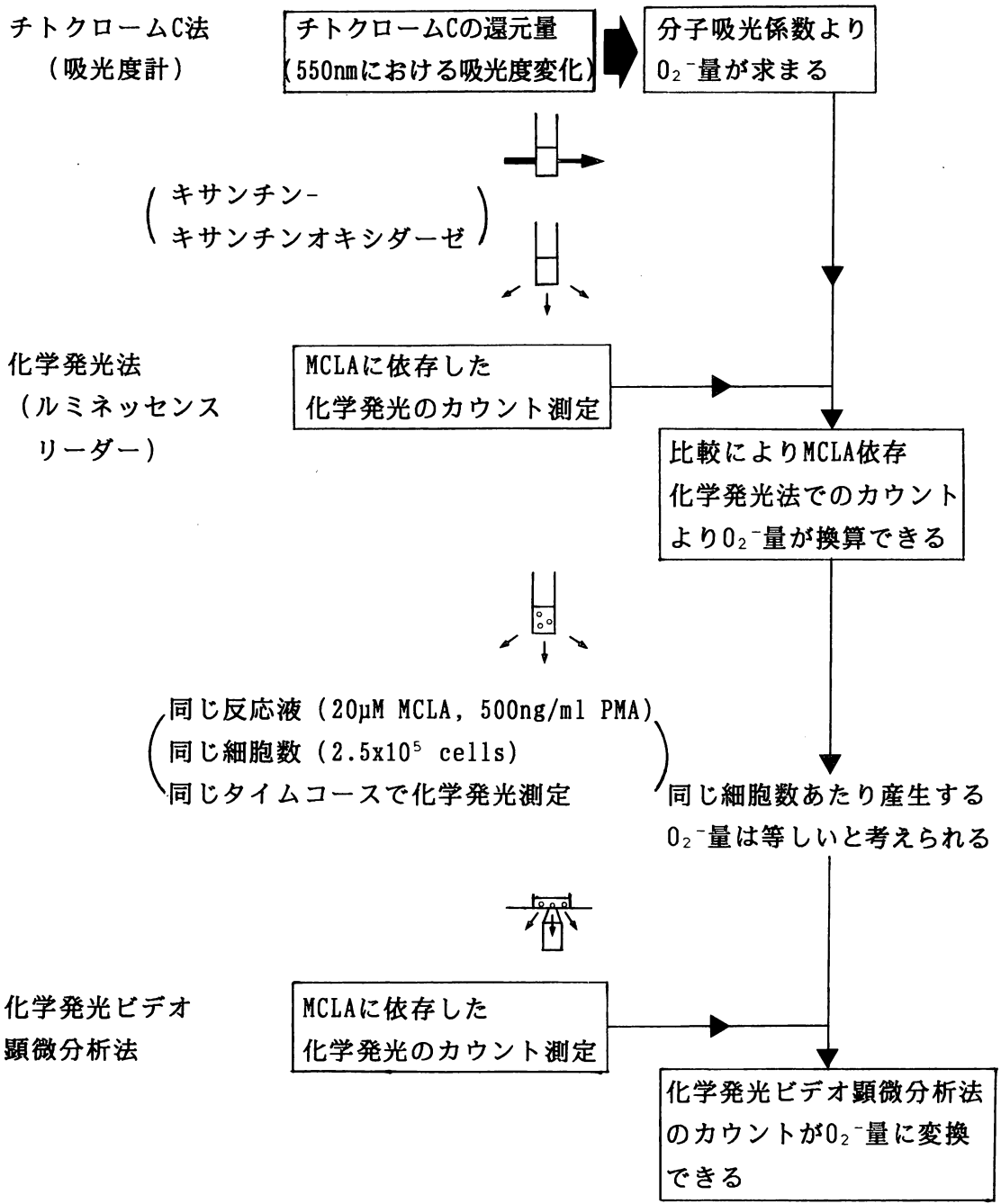


Figure 30. 化学発光ビデオ顕微システムから得られる  
1カウントに相当する $O_2^-$ 量を求めるための過程

ウントから $O_2^-$ を求める検量線を求めた (Fig.31)。

### (2) 2つの装置 (ルミネッセンスリーダーとビデオ顕微システム) を用いた化学発光法による $O_2^-$ 検出

ルミネッセンスリーダー系---好中球 $2.5 \times 10^5$  cellsとMCLA  $20 \mu M$ を含むHBSS+ (全  $600 \mu l$ ) にPMA  $500 ng/ml$  ( $12 \mu l$ ) を加え測定を開始した。

化学発光ビデオ顕微システム系---好中球 $2.5 \times 10^5$  cellsをセルチャンバーに入れしばらく静置後MCLA  $20 \mu M$ を含むHBSS+ (全 $600 \mu l$ ) にPMA  $500 ng/ml$  ( $12 \mu l$ ) を加え測定を開始した。

HBSS+は $37^\circ C$ で予備加温したものを、測定も $37^\circ C$ で行った。PMA添加後2-4・6-8・10-12・14-16・18-20・22-24分 (各2分間) の各カウントの積分値を測定した。また、コントロール実験としてはSOD  $178.5 units/ml$ を反応液に添加した。2つの装置で常に平行して例の実験を行い計12分間に生じた $O_2^-$ の総量の平均値を求めた。ルミネッセンスリーダーのカウントを先に作成した検量線から $O_2^-$ 量に換算し、化学発光ビデオ顕微システムにおいて求められた同じ細胞数当たりのカウントを等しいとおくことにより、本システム1カウントに相当する $O_2^-$ 量を算出した (Fig.32)。その結果、本システム1カウントは $35.5 amol$ に相当するという値を得た。

### (3) 好中球の生成する $O_2^-$ の定量解析

Fig.26に得られた結果をもとに1カウントは $35.5 amol$ であることより、1個の細胞当たり生成する $O_2^-$ 量を算出した結果をFig.33及びTable 2に示す。好中球をCyto E ( $5 \mu g/ml$ ) とCon A ( $100 \mu g/m$ ) とを併用して刺激した場合、最も活性化された6-8分の2分間に $3.0 fmol$ の $O_2^-$ を産生し、2-4・6-8・10-12・14-16・18-20分計10分間に $11.3 fmol$ の $O_2^-$ を産生するという結果が得られた。

#### 【考察】

定量解析の結果より、本システムが $amol$ オーダーの $O_2^-$ を検出可能な感度を有することが明らかとなった。ここで得られた1個の細胞当たりの $O_2^-$ 産生量はあくまで

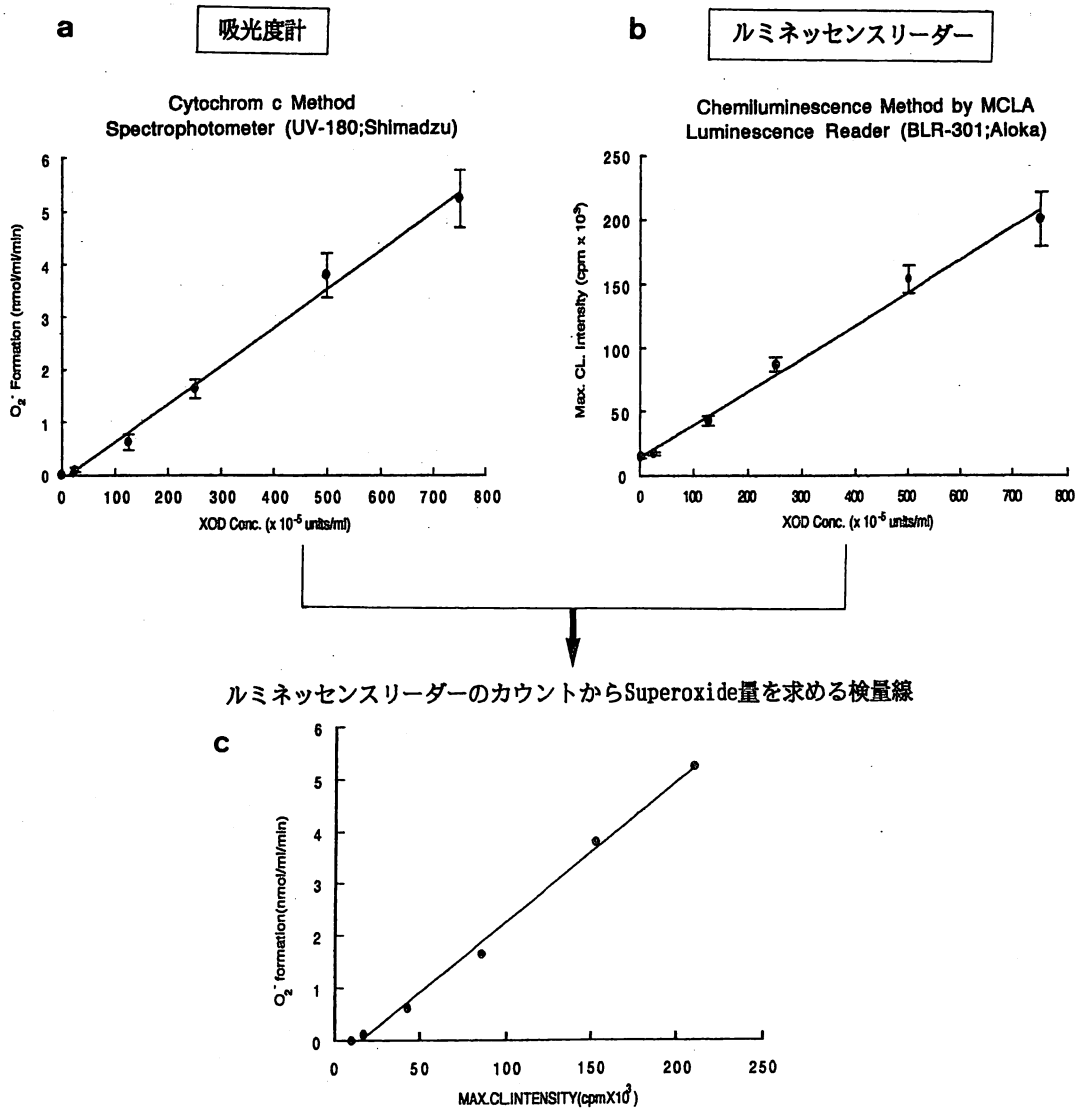


Figure 31. ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ(XOD)反応によって生じた  $O_2^-$  を、チトクロームCの還元反応 (a) とMCLA依存性の化学発光 (b) とで検出し、両者を関係づけるために作成した検量線 (c)

Superoxide Detection by MCLA-dependent Chemiluminescence  
in Two Different Systems

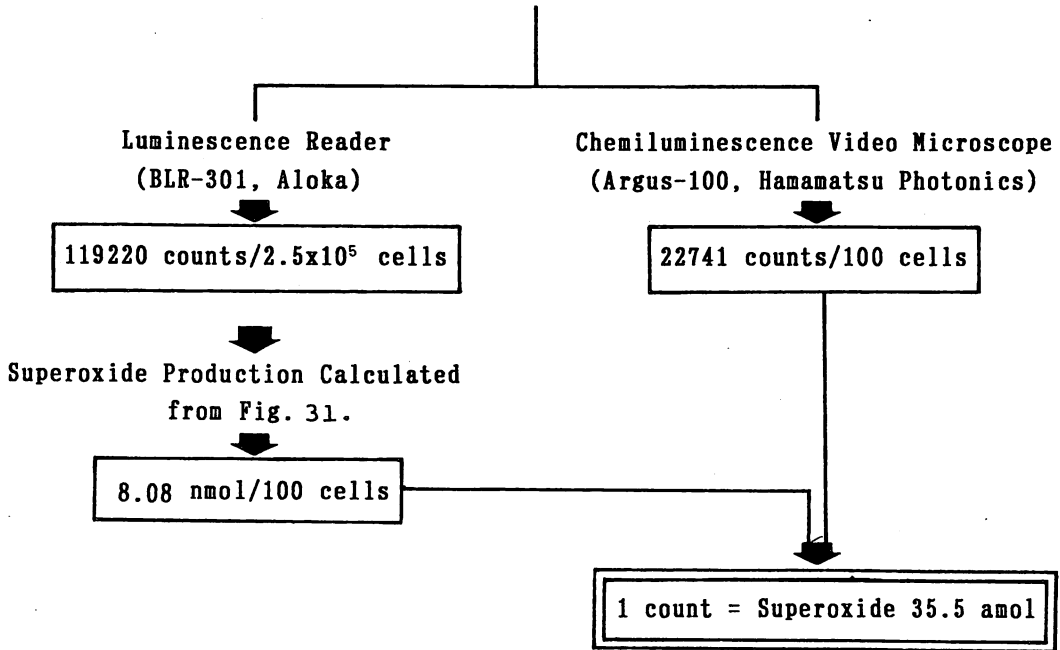


Figure 32. 同じ細胞系から産生される $O_2^-$ を、2つのMCLA依存性化学発光系（ルミネッセンスリーダー系とビデオ顕微システム）とで検出し、それらの値を比較することによって、化学発光ビデオ顕微システムから得られるカウントに相当する $O_2^-$ を算出した。



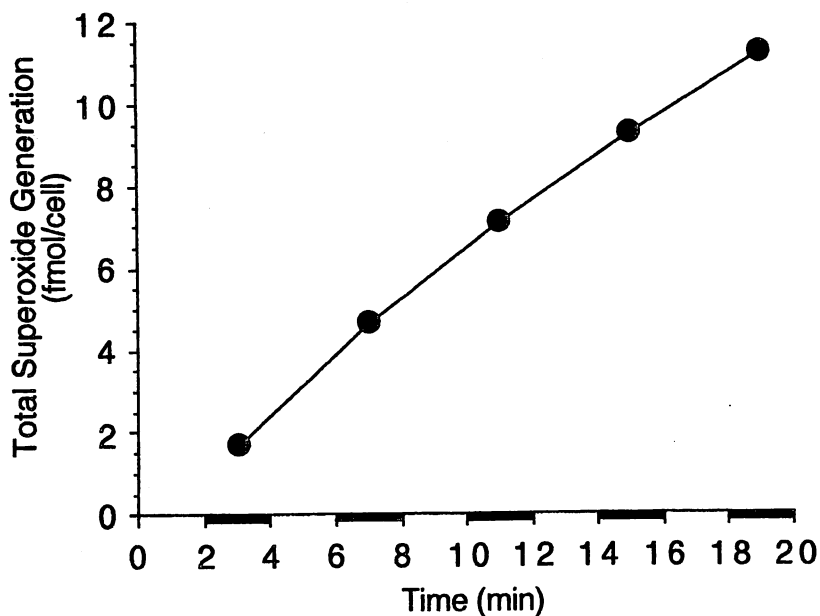


Figure 33. 5  $\mu\text{g/ml}$  Cyto E と 100  $\mu\text{g/ml}$  Con A刺激により1個の好中球から産生される $\text{O}_2^-$ のタイムコース  
2分おきに2分間 (2-4, 6-8, 10-12, 14-16, 18-20分) の測定を行った。

Total  $\text{O}_2^-$  Generation by a Single Neutrophil  
Detected by Chemiluminescence Video Microscopy

Time (min)	Superoxide Production (fmol/cell)
2-4	1.7
6-8	3.0
10-12	2.4
14-16	2.1
18-20	2.0
Total	11.3 for 10 min

Note. Values were expressed as means of four experiments.

Table 2. 5  $\mu\text{g/ml}$  Cyto E と 100  $\mu\text{g/ml}$  Con A刺激により1個の好中球から産生される $\text{O}_2^-$ 量

平均値であり実際に細胞レベルでの検出とは言えないが、しかし従来 $10^4$ - $10^7$ 個の細胞を用いて得られた結果と比べると、初めて細胞レベルで $O_2^-$ 産生量が評価できた。

今後、細胞レベルでの $O_2^-$ の局在及び定量解析を可能とするためには、 $O_2^-$ 特異性が高くバックグラウンドの問題にならない化学発光試薬の開発とビデオカメラの向上が必要である。

## 《まとめ》

「生きている細胞 1 個における動態解析」を目的とし、高分解能あるいは高感度検出の可能なビデオ顕微システムを開発・構築し、好中球を材料に細胞現象の映像化と解析法を検討した。

### 1. 高分解能明視野ビデオ顕微システム

本ビデオ顕微分析法を細胞動態解析に応用した場合、ビデオレート1/30秒を時間分解能とし高い空間解像度での解析が可能である。x-y方向の空間分解能は160  $\mu\text{m}$ 以下であり、z軸方向は約1  $\mu\text{m}$ である。さらに差像処理を施すことにより微小な明るさの変化を抽出することが可能となり、顕微鏡の可視化能を向上させることができた。本システムの応用の一例として開口放出現象を明確にとらえることが可能となった。その結果、好中球の貪食過程において、起こることは知られながら曖昧模糊としていた開口放出現象の時間空間解析を行い、明確な位置づけを行うことができた。

### 2. 微弱光観察システム

SITカメラは感度も高く分解能にも優れていた。このカメラは残像性が問題にされる。しかし、秒オーダーの時間分解能での微弱光観察には残像性も問題にならないので、SITカメラが最適であると考えられる。本システムを貪食過程における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態解析に応用したところ、ここで観察される $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の高まりは、偽足伸長という細胞運動に関与する分子の活性化への寄与が示唆され、開口放出のタイミング・局在を直接的に証明できる因子ではないことが明かとなった。

### 3. 化学発光ビデオ顕微システム

超高感度カメラを用いたフォトンカウンティング撮像により、化学発光という極微弱光の画像化が可能となった。局在解析を行うためには、明るさに応じた蓄積時間が必要であるし、1フォトンが25画素を占めてしまうという解像度も問題にはなるが、 $\text{amol}$ オーダーの検出が可能であるという高感度性を有することが明かとなった。本システムを貪食過程に応用することにより、生成する活性酸素のうち $\text{HOCl}$ に基づくルミノール依存性化学発光検出を、高感度・高分解能に行なうことが可能となり、1細胞における存在様式に関する知見を得ることができた。また、可溶性刺激剤により好中球の産生する $\text{O}_2^-$ 量を細胞レベルで評価することができた。

《引用文献》

1. Inoue, S. (1981) *J. Cell Biol.*, 89, 346-356.
2. Hayakawa, T. (1992) In: "Image Analysis in Biology" (D.-P. Haeder, ed., CRC Press), pp. 75-86.
3. 柳田敏雄 (1991) In "限界を超える顕微鏡 見えないものを見る" (宝谷、木下編 学会出版センター), pp. 17-30.
4. 楠見明弘 (1992) 日本薬学会第112年会講演要旨集 1, pp. 186-187.
5. Allen, R. D. and Allen, N. S. (1982) *J. Microsc.*, 129, 3-17.
6. 早川毅 (1991) In "限界を超える顕微鏡 見えないものを見る" (宝谷、木下編 学会出版センター), pp. 91-104.
7. ファインマン物理学II (1992) 富山小太郎訳 岩波書店 pp. 49-51.
8. 浜松医科大学メディカルホトニクスワークショップテキスト (1992), pp. 16-18, 97-98.
9. Terakawa, S. and Suzuki, Y. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 176, 466-472.
10. Terakawa, S., Fan, J.-H., Kumakura, K. and Ohara-Imaizumi, M. (1991) *Neurosci. Lett.*, 123, 82-86.
11. Bainton, D. F. (1973) *J. Cell Biol.*, 58, 249-264.
12. Zucker-Franklin, D. and Hirsch, J. G. (1964) *J. Exp. Med.*, 120, 569-575.
13. Pryzwansky, K. B., MacRae, E. K., Spitznagel, J. K. and Cooney, M. H. (1979) *Cell*, 18, 1025-1033.
14. Gryniewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 3440-3450.
15. Haugland, R. P. (1992) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc., USA, pp. 113-128.
16. Murata, T., Sullivan, J. A., Sawyer, D. W. and Mandell, G. L. (1987) *Infect. Immun.*, 55, 1784-1791.
17. Sklar, L. A. and Oades, Z. G. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 11468-11475.
18. Lew, D. P. Andersson, T., Hed, J., Di Virgilio, F., Pozzan, T. and

- Stendahl, O. (1985) *Nature*, 315, 509-511.
19. Sawyer, D. W., Sullivan, J. A. and Mandell, G. L. (1985) *Science*, 230, 663-665.
20. Jaconi, M. E. E., Lew, D. P., Carpentier, J.-L., Magnusson, K. E., Sjoegren, M. and Stendahl, O. (1990) *J. Cell Biol.*, 110, 1555-1564.
21. Strehler, E. E., Mahdavi, V., Periasamy, M. and Nadal-Ginard, B. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 468-471.
22. 寺川進 (1992) 第1回日本バイオイメージング学会学術講演要旨集, pp. 36-37.
23. Downey, G. P., Chan, C. K., Trudel, S. and Grinstein, S. (1990) *J. Cell Biol.*, 110, 1975-1982.
24. 浜松医科大学メディカルホトニクスワークショップテキスト, pp 120-126 (1992).
25. Suematsu, M., Oshio, C., Kataoka, T., Suzuki, M., Miura, S. and Tsuchiya, M. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 1106-1110.
26. Suematsu, M., Kurose, I., Asako, H., Miura, S. and Tsuchiya M. (1989) *J. Biochem.*, 106, 355-360.
27. 中村三千男 (1990) In: "白血球と生体防御" (水上、柿本、竹重編, 講談社), pp. 96-104.
28. 石橋貞彦, 岡村直樹 (1990) *J. Act. Oxyg. Free Rad.*, 1, 171-181.
29. Allen, R. C. and Loose, L. L. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69, 245-252.
30. Nishida, A., Kimura, H., Nakano, M. and Goto, T. (1989) *Clin. Chimi. Acta*, 179, 177-182.
31. Jaconi, M. E. E., Lew, D. P., Carpentier, J. -L., Magnusson, K. E., Sjogren, M. and Stendahl, O. (1990) *J. Cell Biol.*, 110, 1555-1564.
32. Brestel, E. P. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126, 482-488.
33. DeChatelet, L. R., Long, G. D., Shirley, Bass, S. D., Thomas, M. J., Henderson, F. W. and Cohen, M. S. (1982) *J. Immunol.*, 129, 1589-1593.
35. Suematsu, M., Oshio, C., Miura, S., Suzuki, M., Houzawa, S. and

- Tsuchiya, T. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155, 106-111.
36. Nishida, A., Kimura, H., Nakano, M. and Goto, T. (1989) *Clin. Chemi. Acta.*, 179, 177-182.
37. Sugioka, K., Sawada, H. and Nadano, M. (1988). Proceedings for the 4th Biennial General Meeting of the Society for Free Radical Research. pp. 899-903.
38. Pabst, M. J. and Johnston, R. B. Jr. (1980) *J. Exp. Med.*, 151, 101-114.
39. Nakagawara, A., Nabi, B. Z. F. and Minakami, S. (1977) *Clin. Chimi. Acta.*, 74, 173-176.
40. Nakagawara, A., Shibata, Y., Takeshige, K. and Minakami, S. (1976) *Exp. Cell Res.*, 101, 225-234.
42. 中野稔・吉川敏一(編) 活性酸素と発光 日本医学館 pp. 65-69. (1990).
43. McCord, J. M. and Fridorich, I. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055.
44. Nakano, M., Sugioka, K., Ushijima, Y. and Goto, T. (1986) *Anal. Biochem.*, 159, 363-369.
45. 日本生化学会編 生化学実験講座8 血液下 pp. 679-681. 東京化学同人. (1987).
46. Wardlan, A. C. and Pillemer, L. (1956) *J. Exp. Med.*, 103, 553-575.

《付録 1》

試薬及び細胞調製法

1. 試薬

(1)細胞調製用試薬

Conray	日本薬局方イオタラム酸ナトリウム注射液 コンレイ400注 66.8% w/v% (20ml アンブル) 第一製薬
Dextran	白血球分離用特製試薬デキストラン (高分子) M.W.208000 ナカライテスク
Ficoll	フィコール (M.W.400000) ナカライテスク

(2)細胞刺激剤

Con A	CONCAVALIN A From Canavalia ensiformis (Jack Bean) Type IV SIGMA CHEMICAL CO. 1mg/ml HBSS+ をフリーザー保存
PMA	PHORBOL 12-MYRISTATE 13-ACETATE SIGMA CHEMICAL CO. 1mg/ml DMSO をフリーザー保存
Cyto E	CYTOCHALASIN E From Aspergillus clavatus SIGMA CHEMICAL CO. 2mg/ml DMSO をフリーザー保存
ザイモサン	ZYMOSAN A From Saccharomyces cerevisiae SIGMA CHEMICAL CO.

(3)O<sub>2</sub><sup>-</sup>定量用試薬

チトクロームC	CYTOCHROME C Type III From Horse Heart SIGMA CHEMICAL CO.
ヒポキサンチン	Hypoxanthine 和光純薬工業
XOD	Xanthin-Oxidase from cow milk Boeringer Mannheim GmbH
SOD	SUPEROXIDE DISMUTASE From Bovine Erythrocytes SIGMA CHEMICAL CO.

#### (4)化学発光試薬

ルミノール	Luminol 半井化学薬品 100 $\mu$ g/ml HBSS+ ディープフリーザー保存
MCLA	2-methyl-6[p-methoxyphenyl]3,7-dihydroimidazo[1,2-a]- pyrazin-3-One 東京化成工業 50 $\mu$ g/ml HBSS+ をディープフリーザー保存

#### (5)[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>測定用蛍光試薬

Fura-2 AM	Acetoxymethyl fura-2 同仁化学 1mM in DMSO をフリーザー保存
-----------	---------------------------------------------------

#### (6)キレート試薬

DETAPAC	Diethylenetriamine-pentaacetic acid 東京化成工業
---------	--------------------------------------------

#### (7)セルチャンバー

顕微鏡上で細胞を観察する場合は、フレキシバームディスク (Flexiperm-Disc, Heraeus Biotechnology) をカバーガラス (MATSUNAMI MICRO COVER GLASS 45mmx 45mm) に吸着させてセルチャンバーとして用いた。化学発光実験には同じサイズで無蛍光のカバーガラスを用いた。

## 2. 各種溶液

### (1)デキストラン液

3.0gのデキストランを0.9% NaCl溶液で溶かし100mlとした。

### (2)Ficoll-Conray液

Ficoll液 9% Ficoll水溶液

Conray液 33.4% Conray水溶液

上記2液の比重を測定しておく。用時混合することにより、比重1.078の液を3.4 ml用意し、細胞調製に用いた。



(3)HBSS: ハングス液 (Hanks' balanced salt solution)

HBSS+: グルコース	0.5 g
NaCl	4.0 g
KCl	200 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	23.8 mg
CaCl <sub>2</sub>	70 mg
MgSO <sub>4</sub>	48.9 mg
NaHCO <sub>3</sub>	約 175 mg

蒸留水を加えて500mlにした。(NaHCO<sub>3</sub>でpH7.5に合わせる)

HBSS-: 上記処方のうちCaCl<sub>2</sub>を除いた液。

### 3. 細胞調製法<sup>4,5)</sup>

ウサギ耳静脈より用途に応じて5-13mlの血液(ヘパリン処理)を採取した\*1。同容量のデキストラン液と穏やかに混和後注射筒に移し、針を上に向けて立て、25分間室温静置した。分離した上清をチューブに移し、150×g (=1200rpm)で10分間遠心を行った(himac CR 5B2, HITACHI)。遠心後上清を取り除き、キムワイプでチューブ壁を軽く拭き取り、沈殿を0.9%NaCl溶液に懸濁させた(約1ml)。混入した赤血球を取り除くために溶血を行った。あらかじめ水冷しておいた蒸留水10mlと細胞懸濁液を速やかに加えて混和し(30秒間で行う)、さらに1.8%NaClを10ml加えて混和し、浸透圧を生理的レベルにもどした。5分間氷上に静置後、駒込ピペットで上清を蓋付き遠心チューブに移し、150×gで10分間遠心を行った。遠心後チューブの底に白い沈殿(白血球成分)を得た。上清を取り除き、この沈殿を穏やかに0.9% NaClに懸濁し(約1ml)、Ficoll-Conray液の上に界面を乱さない様に重層する。500×g (=2200rpm)で15分間遠心によりリンパ・単球と好中球を分離した。上清と共にリンパ・単球を除き、チューブ壁をキムワイプで拭き取った。チューブの底の沈殿を少量(0.5-1ml)のHBSS+に懸濁させ、好中球成分を得た。これをエッペンドルフチューブ(1.5mlサイズのもの)に移し、HBSS-で2回遠心により洗浄を行った(チビタン, MILLIPORE)。適量のHBSS-に懸濁し水

上保存した\*2,\*3。

続いて細胞数を計測した。調製した好中球懸濁液20 $\mu$ lとチュルク液 (Turk Solution, 和光純薬) 180 $\mu$ lを混和し、この液約20 $\mu$ lをトーマの計算盤 (Depth 1/10mm, 1/400 sqmm, EKDS) に取り、顕微鏡下で全マス目 (=1mm<sup>2</sup>) 中の細胞数 (好中球数とそれ以外の細胞数) を計測した。この値をもとに希釈を行い、 $2.5 \times 10^6$  cells/mlの好中球懸濁液を調製し、これを原液として実験を行った。また、収率も計算した。

\*注意1 ウサギの耳をアルコール綿で清浄した後キシレンで軽く拭くと、血管が怒張して採血が容易になる。また、これにより軽い急性炎症を誘発する効果もあるので、多少収量が上がる。しかし、血液中の血球数を計測するような場合には適さない。

\*注意2 参考にした文献では、1回目の遠心から後の操作は全て4 $^{\circ}$ Cで行うように記されているが、冷却することにより血小板が凝集するため、白血球画分に混入してくる。これを防ぐため、遠心操作は全て20-23 $^{\circ}$ Cで行った。

\*注意3 好中球は活性化されやすい細胞であるから、ガラス器具の使用は避け、ポリ製のチューブ・駒込等を用いて、穏やかな操作を心がけた。活性化を避ける意味で細胞調製はCa<sup>2+</sup>を含まないHBSS-を用いた。本来はグルコースも除いた方が好ましいと思われるが、細胞の失活が早いようであったので、ここでは常にグルコースを含む液を用いた。

#### 4. オブソニン化ザイモサンの調製法<sup>46)</sup>

ザイモサンA 40mgをペロナル緩衝液 (20mM, pH7.40) 10mlに懸濁し100分間加熱沸騰後、室温下で冷却した後1900 $\times$ gで10分間遠心した。沈殿のザイモサンに対してウサギ血漿を4ml加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後同様に遠心し上清を捨てた。HBSS+を用いて2回遠心・洗浄を繰り返した。オブソニン化ザイモサンは20mg/mlとなるようにHBSS+で懸濁後分注し、フリーザー保存した。

《付録 2》

作成したプログラムのリストを示す。

【EP2：顕微鏡像を輝度強調により高コントラスト化するためのプログラム】

```
100 '   SAVE "EP2.BAS"
110 '
115 SCREEN 3
120 ISET IFC:ISET REN
130 CMD DELIM=0
140 PRINT @8; " CIP"
150 PRINT @8; " SNC,C"
160 PRINT @8; " SME,GR1"
170 PRINT @8; " SDE,1"
180 PRINT @8; " LIN,100,100,400,100"
190 PRINT @8; " LIN,100,100,100,400"
200 PRINT @8; " LIN,200,100,200,107"
210 PRINT @8; " LIN,300,100,300,107"
220 PRINT @8; " LIN,100,200,107,200"
230 PRINT @8; " LIN,100,300,107,300"
240 CM$=" DIM,ADC"
250 PRINT @8; CM$
260 INPUT "DISPLAYING RAW IMAGE. OK"; A$
270 IF A$="" GOTO 280 ELSE 240
280 CM$=" VIN,R1"
290 PRINT @8; CM$
300 PRINT @8; " DIM,R1"
320 GOSUB *MS
340 CM$=" DCS,100,100,"+STR$(X-100)+" ,"+STR$(Y-100)+" ,1"
350 PRINT @8; CM$
360 PRINT @8; " HGM,0"
```

```

370 INPUT "LOWER LIMIT=" ;A$
380 INPUT "UPPER LIMIT=" ;B$
390 PRINT @8;"IME,9,A,"+A$+",10,"+B$+",245"
401 PRINT @8;"DLT,A"
402 PRINT @8;"CIM,ALL"
403 PRINT @8;"DIM,ADC"
404 ON KEY GOSUB *TI: KEY (1) ON
410 '
420 *MS
430 MOUSE 0
440 MOUSE 1,,1
450 ON MOUSE(2) GOSUB *MS2
460 MOUSE(2) ON
470 X=MOUSE(0): Y=MOUSE(1)
480 LOCATE 10,11: PRINT "X=" ;X
490 LOCATE 10,12: PRINT "Y=" ;Y
500 CM$="DCS,"+STR$(X)+"," +STR$(Y)+",1,1"
510 PRINT @8; CM$
520 GOTO 470
530 RETURN
540 GOTO 470
550 '
560 *MS2
570 RETURN 530
580 '
590 *TI
600 INPUT"ANY COMMENT";A$
610 PRINT @8; "PRT,2,2"
615 PRINT @8; A$
620 RETURN 403

```

【EP32：差像処理法のz軸分解能の検討を行うためのプログラム】

```
10 ' SAVE "EP32.BAS"
20 '
30 SCREEN 3
40 ISET IFC:ISET REN
50 DIM HGMD#(256)
60 CMD DELIM=0
70 PRINT @8; "CIP"
80 PRINT @8; "SNC,C"
90 PRINT @8; "IME,1,A,0,50,255,0"
100 PRINT @8; "VIN,R7"
110 PRINT @8; "IME,0,A"
120 PRINT @8; "SME,GR1"
130 PRINT @8; "SDE,1"
140 PRINT @8; "LIN,100,100,400,100"
150 PRINT @8; "LIN,100,100,100,400"
160 PRINT @8; "LIN,200,100,200,107"
170 PRINT @8; "LIN,300,100,300,107"
180 PRINT @8; "LIN,100,200,107,200"
190 PRINT @8; "LIN,100,300,107,300"
200 CM$="DIM,ADC"
210 PRINT @8; CM$
220 INPUT "DISPLAYING RAW IMAGE. OK"; A$
230 IF A$="" GOTO 240 ELSE 200
240 CM$="VIN,R1"
250 PRINT @8; CM$
260 PRINT @8; "DIM,R1"
280 GOSUB *MS
300 CM$="DCS,100,100,"+STR$(X-100)+" ,"+STR$(Y-100)+" ,1"
310 PRINT @8; CM$
```

```

320 PRINT @8; "HGM,0"
330 INPUT "LOWER LIMIT=" ;A$
340 INPUT "UPPER LIMIT=" ;B$
350 PRINT @8;"IME,9,A," +A$+" ,10," +B$+" ,245"
360 PRINT @8;"DLT,A"
370 PRINT @8;"CIM,ALL"
380 PRINT @8;"DIM,ADC"
390 PRINT @8; "LIN,100,100,400,100"
400 PRINT @8; "LIN,100,100,100,400"
410 PRINT @8; "LIN,200,100,200,107"
420 PRINT @8; "LIN,300,100,300,107"
430 PRINT @8; "LIN,100,200,107,200"
440 PRINT @8; "LIN,100,300,107,300"
450 INPUT "DISPLAYING INTENSIFIED IMAGE. OK"; A$
460 IF A$=" " GOTO 470 ELSE 380
470 INPUT "WHICH FRAME MEMORY(R8 FOR BACKGROUND,R7 OCCUPIED)"; N$
480 CM$="VIN," +N$
490 PRINT @8; CM$
500 PRINT @8; "DIM," +N$
520 GOSUB *MS3
540 CM$="DCS,100,100," +STR$(X-100)+" ," +STR$(Y-100)+" ,1"
550 PRINT @8; CM$
560 PRINT @8; "HGM,0"
570 INPUT "DISPLAYING HISTOGRAM. OK"; A$
580 IF A$=" " THEN ELSE 570
590 GOSUB *GHG
600 INPUT "NEXT IMAGE (Y)/ SUBTRACTION (N)"; A$
610 IF A$="N" THEN GOSUB *CAL
620 PRINT @8;"CIM,ALL"
630 CLS

```

```
640 GOTO 380
650 '
660 *MS
670 MOUSE 0
680 MOUSE 1,,1
690 ON MOUSE(2) GOSUB *MS2
700 MOUSE(2) ON
710 X=MOUSE(0): Y=MOUSE(1)
720 LOCATE 10,11: PRINT "X=";X
730 LOCATE 10,12: PRINT "Y=";Y
740 CM$="DCS,"+STR$(X)+" ,"+STR$(Y)+" ,1,1"
750 PRINT @8; CM$
760 GOTO 710
770 RETURN
780 '
790 *MS2
800 RETURN 770
810 '
830 *MS3
840 MOUSE 1,,1
850 ON MOUSE(2) GOSUB *MS4
860 MOUSE(2) ON
870 X=MOUSE(0): Y=MOUSE(1)
880 LOCATE 10,11: PRINT "X=";X
890 LOCATE 10,12: PRINT "Y=";Y
900 CM$="DCS,"+STR$(X)+" ,"+STR$(Y)+" ,1,1"
910 PRINT @8; CM$
920 GOTO 870
930 RETURN
940 '
```

```

950 *MS4
960 RETURN 930
970 '
980 *GHG
990 PRINT @8; " GHG"
1000 RBYTE &H3F,&H20,&H48;DL%,DM%,DH%
1010 P=0: Q=0: S=0
1020 HGMD#(0)=DL%+DM%*256+DH%*256*256
1030 FOR I=1 TO 255
1040 RBYTE ;DL%,DM%,DH%
1050 HGMD#(I)=DL%+DM%*256+DH%*256*256
1060 P=P+HGMD#(I)*I: Q=Q+HGMD#(I)
1070 NEXT I
1080 FOR I=1 TO 255
1090 S=S+(I-P/Q)^2*HGMD#(I)
1100 NEXT I: V=S/Q
1110 RBYTE ;CR%,LF%
1120 PRINT " TOTAL PIXEL NO.=",Q
1130 PRINT " TOTAL INTENSITY=",P
1140 PRINT " MEAN INTENSITY=",P/Q
1150 PRINT " S.D. INTENSITY=",SQR(V)
1160 INPUT " INTENSITY DATA";A$
1170 IF A$="" THEN ELSE 1270
1180 FOR I=0 TO 255: PRINT I;"=";HGMD#(I),: NEXT I
1190 INPUT " DATA SAVE (Y/N)";A$
1200 IF A$="Y" THEN ELSE 1270
1210 INPUT " FILE NAME";B$
1220 OPEN "C:"+B$ FOR OUTPUT AS #1
1230 FOR I=0 TO 255
1240 PRINT #1, I;"=";HGMD#(I);

```



```
1250 NEXT I
1260 CLOSE #1
1270 RETURN
1280 '
1290 *CAL
1300 INPUT "WHICH FRAME MEMORY TO BE SUBTRACTED";A$
1310 PRINT @8; "CIM,ALL"
1320 PRINT @8; "DIM,"+A$
1330 CM$="FAD,R7,"+A$
1340 PRINT @8; CM$
1350 CM$="FSB,R8,"+A$
1360 PRINT @8; CM$
1370 CM$="DIM,"+A$
1380 PRINT @8; CM$
1460 GOSUB *MS3
1480 CM$="DCS,100,100,"+STR$(X-100)+"," +STR$(Y-100)+",1"
1490 PRINT @8; CM$
1500 INPUT "HISTGRAM (Y/N)";D$
1510 IF D$="N" THEN GOTO 1540
1520 PRINT @8; "HGM,0"
1540 INPUT "NEXT FRAME ,Y/N";B$
1550 IF B$="Y" THEN GOTO 1300
1560 RETURN
```

【EP6：細胞の輪郭や開口放出の生じた位置をトレースするためのプログラム】

```
1000 ' SAVE "EP6.BAS"
1010 ISET IFC: ISET REN
1020 SCREEN 3,0,0,1: COLOR 7,0,0,7,2
1030 CONSOLE 0,25,0,1: CLS 3
1040 DIM X(1000),Y(1000)
1050 GOSUB *INIT
1060 GOSUB *MAIN
1070 END
1080 '
1090 *INIT
1100 MOUSE 0: CLS 3
1110 GOSUB *MASK
1120 MOUSE 1,,1
1130 CMD DELIM=0
1140 LINE (1,1)-(639,399),7,B
1150 PRINT @8; "CIP"
1160 PRINT @8; "SNC,C"
1170 PRINT @8; "DIM,ADC"
1180 RETURN
1190 '
1200 *MAIN
1210 EX=1
1220 NP=1
1230 ON MOUSE (2) GOSUB *ZYMS: MOUSE (2) ON
1240 ON MOUSE (3) GOSUB *EXO: MOUSE (3) ON
1250 ON KEY GOSUB *ER,*EN,*ES
1260 FOR I=1 TO 3
1270 KEY (I) ON
1280 NEXT I
```

```

1290 K$=INKEY$
1300 XP=MOUSE(0)-8: WP=INT(1.2075*XP): YP=MOUSE(1)-8: YQ=INT(1.2075*YP)
1310 CM$="DCS,"+STR$(WP)+", "+STR$(YQ)+",1,1"
1320 PRINT @8; CM$
1330 IF K$="" THEN GOTO 1290
1340 RETURN
1350 '
1360 *ES
1370 INPUT " FILE NAME: ";NF$
1380 OPEN "B:¥"+NF$ FOR OUTPUT AS #1
1390 PRINT #1, NP-1
1400 FOR I=1 TO NP-1
1410 PRINT #1, X(I),Y(I)
1420 NEXT I
1430 CLOSE #1
1440 RETURN
1450 '
1460 *EXO
1470 IF EX>0 THEN GOTO 1560
1480 X=MOUSE(0)-8: Y=MOUSE(1)-8
1490 MOUSE 1,,0
1500 CIRCLE (X,Y),6,0,,,F
1510 MOUSE 1,,1
1520 INPUT" ERASE OK (Y/N)";A$
1530 IF A$="Y" THEN CLS 1 ELSE GOTO 1480
1540 EX=EX*(-1)
1550 GOTO 1610
1560 X=MOUSE(0)-8: Y=MOUSE(1)-8
1570 CIRCLE (X,Y),2
1580 X(NP)=X: Y(NP)=Y

```

```

1590 LOCATE 55,NP: PRINT "I=";NP;" X=";X(NP);" Y=";Y(NP),"
1600 NP=NP+1
1610 RETURN
1620 '
1630 *ZYMS
1640 IF EX>0 THEN GOTO 1750
1650 MOUSE 1,,0
1660 M$=INKEY$
1670 X=MOUSE(0)-8: Y=MOUSE(1)-8
1680 CIRCLE (X,Y),11,0,,,F
1690 IF M$="" THEN GOTO 1650
1700 INPUT"ERASE OK (Y/N)";A$
1710 IF A$="Y" THEN CLS 1 ELSE GOTO 1650
1720 EX=EX*(-1)
1730 MOUSE 1,,1
1740 GOTO 1840
1750 X=0: Y=0
1760 IF MOUSE(2,1)=1 THEN ELSE GOTO 1840
1770 X0=X: Y0=Y
1780 X=MOUSE(0)-8: W=INT(1.2075*X): Y=MOUSE(1)-8: Q=INT(1.2075*Y)
1790 CM$="DCS,"+STR$(W)+", "+STR$(Q)+",1,1"
1800 PRINT @8; CM$
1810 IF X0=0 AND Y0=0 THEN GOTO 1760
1820 LINE (X0,Y0)-(X,Y)
1830 GOTO 1760
1840 RETURN
1850 '
1860 *MASK
1870 X$=CHR$(&H1)+CHR$(&H0)
1880 FOR I=1 TO 6: X$=X$+CHR$(&H1)+CHR$(&H0): NEXT I

```

```
1890 X$=X$+CHR$(&HFF)+CHR$(&HFE)
1900 FOR I=1 TO 7: X$=X$+CHR$(&H1)+CHR$(&HO): NEXT I
1910 MOUSE 2,15,15,X$
1920 COLOR=(4,&HFFF)
1930 RETURN
1940 '
1950 *ER
1960 EX=EX*(-1)
1970 RETURN
1980 *EN
1990 INPUT "NEXT IMAGE";A$
2000 IF A$="-" THEN GOTO 1050
2010 RETURN
```

## 《謝辞》

本研究を遂行するにあたり、終始御懇切な御指導、御鞭撻を賜りました広島大学医学部総合薬学科薬品分析学講座 升島努教授に心から感謝致します。

また、終始御指導、有益な御助言をいただきました、本学科薬品資源学講座 杉山政則教授に深く感謝致します。

さらに、画像解析の魅力を聞き見せて下さいました、浜松医科大学光量子医学センター 寺川進教授に心から感謝致します。

また、公私に渡りお世話になりました、升島研究室の小澤光一郎、田村恵子、池田佳代諸先生に深く感謝致します。そして、一緒に研究を進めた河野慎一、小林秀行、河合江理子、児玉由香諸氏を始め、升島研究室で過ごした3年間に、日々の生活時間を共有した学生の皆様の暖かさ、優しさ、厳しさの全てに心から感謝致します。

本研究は、様々な企業の方々の御協力を得て可能となりました。ビデオカメラ・画像解析装置の構造や使用方法について詳細に渡り情報を御提供下さいました浜松ホトニクスK.K.内山茂、杉山範和、杉山浩史諸氏、顕微鏡の構造・原理・構成部品についての数多くの情報を御提供下さいましたオリンパスK.K.内藤正幸氏、カール ツァイスK.K.土田善啓氏に深く感謝致します。

そして、博士課程における特別研究員制度により研究・生活両面において経済的に御支援をいただきました、日本学術振興会に心からお礼申し上げます。私が博士課程後期における円滑な研究生活を送ることができたのは、ひとえに本制度のおかげであり深く感謝致しております。

最後に、これまで歩んできた過程の中で数々の御指導をいただきました諸先生方に深くお礼申し上げます。

平成5年9月 洲崎悦子