

生命科学・医学応用のための極微弱発光・蛍光イメージング技術

Imaging Technique of Weak Luminescence and Fluorescence for Application on Life Science and Medicine

小林 正 樹

Masaki Kobayashi

東北工業大学工学部知能エレクトロニクス学科

要 旨 発光・蛍光レポーター遺伝子を利用した遺伝子発現の計測に代表されるように、生命科学における研究ツールとしての光計測・イメージング技術は近年ますますその重要性を増している。

本文では、生体計測のための光イメージング技術として、発光レポーターを用いた遺伝子発現の超高感度リアルタイムイメージング技術と、蛍光ラベルを用いた *in vivo* 生体での生体機能計測を行うための、生体深部蛍光イメージング技術について紹介する。

キーワード：イメージング，画像計測，レポーター遺伝子，蛍光ラベル，フォトンイメージング

1. はじめに

蛍光ラベリング法による生体機能や生理作用の高精度リアルタイムイメージング技術は、生命科学や基礎医学研究において現在必須のアクセシビリティ技術となっている。とくに近年、量子ドットに代表されるような光学特性に優れた蛍光材料の開発の進展により、様々な生理機能を単一分子レベルでトレースしたり、またがん細胞など特定の細胞を特異的に検知したりする技術、あるいは GFP（緑色蛍光タンパク）遺伝子を導入したトランスジェニック動物を使って、遺伝子機能の解析を行う技術などが広く普及している。これはリアルタイムでしかも画像情報として計測することができるという、蛍光法のもつ大きな特長を生かしたものである。また顕微鏡下での観察を可能とし、細胞レベルでの様々な機能発現のメカニズムの解明に寄与するところは極めて大きいといえる。

一方で、ヒトを対象とした生体計測・医用診断に光を用い、その内部の生体情報を画像として得ることは容易ではない。光を情報媒体とすることは、生体への侵襲やその取扱いの簡便さを考えると非常に魅力的ではあるが、顕微鏡レベルで透明な細胞を観察するのは異なり、計測対象が組織レベルになると、生体組織の光散乱特性によりその適用可能な深さは、組織表層に限定される。生理機能や遺伝子機能の観察において、実際にその作用が起こっている「その場」すなわち *in vivo* での解析を求める要求は大きい。生体組織における光散乱により、生体内部で発生した蛍光を生体外で高い解像度

で画像化することはきわめて困難であるといわざるを得ない。

本講座では、まず発光レポーター遺伝子や蛍光レポーター遺伝子を用いた細胞レベルでの顕微鏡観察のための極微弱光イメージング技術について解説する。さらに、光散乱媒質内の光イメージングについて、医用診断を目的としたマクロな対象物の蛍光観察法について筆者らの最近の研究を紹介する。この技術は、生きた状態での生体内部の機能情報の可視化をめざすものであり、基礎医学、生命科学における蛍光法のメリットを臨床医学、創薬産業など非常に広範な生命医科学分野に広げる可能性をもち、将来の強力な計測・診断ツールを提供するものと期待されている。

2. 極微弱発光イメージング技術

シングルフォトンレベルに達する極微弱光レベルでのイメージングに用いられるカメラには、イメージインテンシファイヤによる電子増倍機能をもつ ICCD、超高感度冷却型 CCD、および CCD 内部に電子増倍機構をもつ EMCCD がある。本項では、それぞれのカメラについて極微弱光検出能力の観点から比較解説する。

2.1 イメージインテンシファイヤ型カメラ

通常、ICCD または IICCD (image intensified charge coupled device) と呼ばれる極微弱光検出カメラである。一般的な構成を図 1 に示す。イメージインテンシファイヤ (II) は光電面、マイクロチャンネルプレート (MCP)、蛍光面からなる。一様な光電面に光子が入射すると、光電効果により真空中に光電子を放出する。光電子は位置情報を保持したまま、両端に高電圧が印加された百万本程度の微小チャンネル構造を持つ MCP の一つのチャンネル内に入射し、チャンネル

〒982-8577 仙台市太白区八木山香澄町 35-1
TEL: 022-305-3211; FAX: 022-305-3202
E-mail: masaki@tohtech.ac.jp
2008年6月16日受付

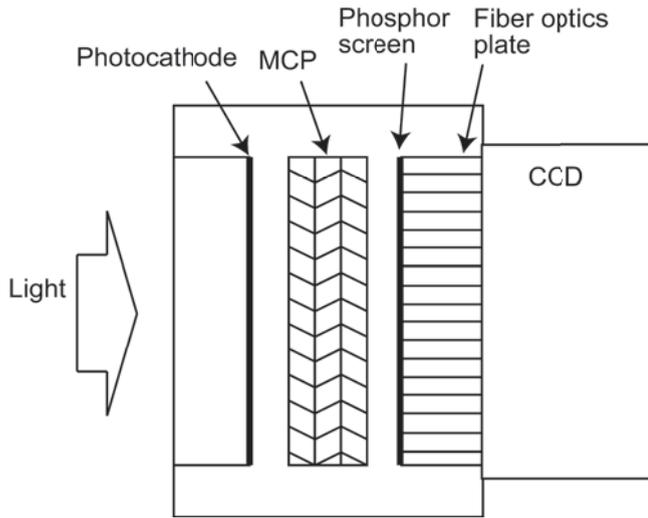


図1 ICCD カメラの構造

ル内壁に電子が衝突する際の電子衝撃効果による2次電子放出を繰り返し約100～1000倍に増倍される。MCPから射出した電子群パルスは、電子管内で更に加速されながら一様な蛍光面に入射する。蛍光面で電子衝突により再発光することで、入射光子に対応した光の輝点に変換される。蛍光面はファイバーオプティクスプレートによりCCDに結合されており、CCD画像データをリアルタイム（フレームレート）で読み出しそのままフレームメモリー上で積算蓄積することにより画像化することができる。フォトンカウンティング（光子計数）画像を得る場合には、CCDで撮像した輝点の重心を検出し、その位置でデジタル的にパルス数を積算する。イメージンシファイヤ型カメラには、蛍光面を用いて再発光させる代わりに、MCPから出力した電子群パルスを直接、一様な抵抗層からなるレジスティブアノードや位置検出素子（PSD）に入射させ、入射位置を演算により求め、入射位置に対応したフレームメモリーにおいてパルス数を2次元的に計数する2次元フォトンカウンティング専用カメラもある。ICCDは、MCPゲインをコントロールすることによりアナログ領域からデジタル（フォトンカウンティング）領域まで幅広い強度ダイナミックレンジを有するという特徴がある。ICCDの光検出特性は、光電面材料の分光感度特性により決まるが、外部光電効果を利用した電子管であるため、その量子効率は半導体光検出素子のような内部光電効果型に比べて低い。I.I.の光電面材料開発の進歩にあわせ、I.I.を第1世代（gen I）から第4世代（gen IV）に分類した呼称が用いられることがある。最も広く普及しているのがgen IIであるが、光電面材料にマルチアルカリ金属が用いられており、その量子効率は可視域で最大でも20%程度である。それに対してgen III, gen IVはGaAs光電面をもちその量子効率は50%に達する。しかも分光感度特性は可視域でほぼフラットという優れた特徴を有する。

I.I.型カメラの解像度は主にMCPマイクロチャンネルの

サイズ、ピッチで決まるが、小さいもので6μm程度である。また、ICCDはMCPへの印加電圧を高速制御することによりnsオーダーの高速シャッターとして動作させ、高速ゲートカメラとして時間分解イメージングに利用することができる。蛍光寿命イメージングはその重要なアプリケーションのひとつである。

MCP増倍率が十分なとき、雑音は光電流および暗電流のショット雑音が支配的になる。増倍率 $10^5 \sim 10^6$ 程度を仮定しフォトンカウンティングモードでこのカメラを用いたとすると、増倍率ゆらぎの雑音への寄与は一般に考慮しなくてよいため、その1画素におけるS/N比は、

$$\frac{S}{N} = \frac{\eta \langle N_p \rangle}{\sqrt{\eta \langle N_p \rangle + \langle N_d \rangle}} \sqrt{T} \quad (1)$$

で与えられる。ここで、 $\langle N_p \rangle$ は単位時間当りの1画素への入射平均フォトン数、 $\langle N_d \rangle$ は単位時間当りの画素平均暗電流パルス数、 T はフレームメモリー上での蓄積時間、 η は光電面量子効率である。雑音と同等な信号レベルとなる入射光強度を最小検出可能光強度 P_{min} とすると、 $\eta \langle N_p \rangle \ll \langle N_d \rangle$ の条件にて、

$$P_{min} = \sqrt{\frac{\langle N_d \rangle}{T}} \frac{hc}{\eta \lambda} \quad (2)$$

となる。ここで、 h, c, λ はそれぞれプランク定数、光速、波長である。暗電流の主要因は室温では光電面からの熱電子放出によるものであり、 $-20 \sim -40^\circ\text{C}$ 程度までは冷却がその低減に効果的である。

2.2 冷却 CCD カメラ

CCDには、インターライン型とフレームトランスファー型があるが、極微弱光計測に用いられるCCDは、スピードより明るさを優先するため開口率の高いフレームトランスファー型が用いられる。前項で述べたICCDとは異なり、CCDは画素において電荷を蓄積しなければならないため、高い時間分解能を必要とするアプリケーションには不向きである。したがって科学計測用の高感度CCDは一般に機械式シャッターを用いたフルフレームトランスファー型CCDが用いられる。シャッターは電荷転送中の露光を防ぐために必要である。

極微弱光計測用CCDチップは、背面照射型と呼ばれる構造を持つ（図2）。これは電荷転送を制御するためにCCDの各画素の表面に設置されているポリシリコン電極の光吸収を避け、量子効率低下を防ぐため、基板を薄くして電極の影響を受けない背面から光を入射する構造を持つ。これにより量子効率は90%以上となり、その点ではICCDに比べ圧倒的に有利である。

CCDの雑音には、光電流および暗電流のショット雑音の他に、電荷を読み出す際のアンプ雑音を考慮しなければならない。S/N比は、

$$\frac{S}{N} = \frac{\eta \langle N_p \rangle T}{\sqrt{(\eta \langle N_p \rangle + \langle N_d \rangle) T + N_r^2}} \quad (3)$$

で与えられる。 N_r はアンプ読み出し雑音（電子数rms）で

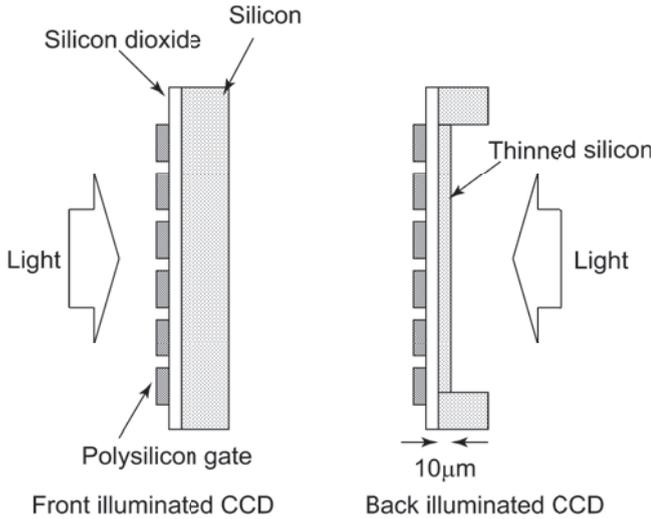


図2 通常の前面照射型 (front illuminated) CCD と背面照射型 (back illuminated) CCD の構造の比較

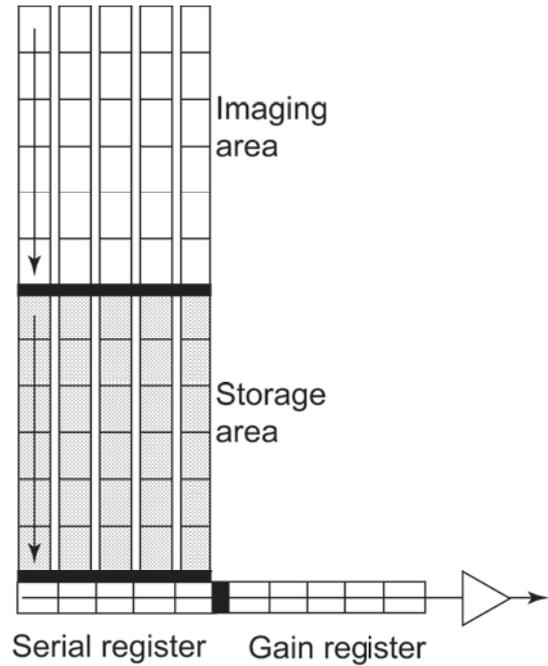


図3 EMCCD の構造

ある. 前項と同様にして最小検出可能光強度は,

$$P_{min} = \sqrt{\frac{\langle N_d \rangle}{T} + \frac{N_r^2}{T^2}} \frac{hc}{\eta\lambda} = \frac{hc\sqrt{\langle N_d \rangle T + N_r^2}}{\eta\lambda T} \quad (4)$$

で与えられる. 蓄積時間 T が十分長く, $\langle N_d \rangle T \gg N_r^2$ の条件の下では, ICCD と同様

$$P_{min} = \sqrt{\frac{\langle N_d \rangle}{T}} \frac{hc}{\eta\lambda} \quad (5)$$

となる.

CCD の場合も暗電流は冷却により低減することができる. 極微弱光検出用の場合冷却は必須であり, 一般的には真空封じりもしくは真空ポンプによる定期的な排気環境下で, 電子冷却などの方法により -100°C 近傍まで冷却する. CCD は読み出し雑音が無視できるほどに信号を長時間蓄積した場合においてのみ, 式 (5) のように量子効率が高い分だけ ICCD に対して優位となる. したがって高い時間分解能が求められる計測には原理的に不向きである. これは CCD 素子自体では信号の増幅ができないため, 読み出し雑音を越えるレベルになるまで素子内で電子の蓄積を行うことが必要となることによる. また読み出し雑音は読み出し速度に依存するため, 低速で読み出す必要がある. 2048×2048 pixel の CCD の場合, 画像読み出しだけで数十秒以上かかる場合もある. このような従来の CCD の問題点を克服し, CCD 自体に増倍機能を付加した EMCCD (electron multiplying CCD) が近年開発され普及が進み, 時間分解能が要求される微弱光計測において広く用いられるようになってきた.

2.3 EMCCD カメラ^{1,2)}

EMCCD は通常の CCD の電荷転送用シリアルレジスタと読み出しアンプの間に増倍レジスタをもつ CCD である (図3). 増倍レジスタ部では, 高電界による衝突電離により

電子増倍し, 数 100 段のレジスタにより多段増倍することで最大数千倍のゲインを持つ. これにより, 高時間分解計測においても電荷信号が読み出し雑音を越え, 高い SN 比で計測することができる. しかも, ICCD に対し高い量子効率とフラットで広い分光感度特性という CCD の優れた特長を兼ね備えた撮像素子である. EMCCD の SN 比は, 電子増倍率とその増倍率ゆらぎを考慮して,

$$\frac{S}{N} = \frac{\eta \langle N_p \rangle M T}{\sqrt{(\eta \langle N_p \rangle + \langle N_d \rangle) F^2 M^2 T + N_r^2}} = \frac{\eta \langle N_p \rangle \sqrt{T}}{\sqrt{(\eta \langle N_p \rangle + \langle N_d \rangle) F^2 + N_r^2 / M^2 T}} \quad (6)$$

と表される. ここで M は増倍率, F は増倍過程での増倍率ゆらぎによる过剩雑音指数であり, したがって最小検出可能光強度は

$$P_{min} = \sqrt{\frac{\langle N_d \rangle F^2}{T} + \frac{N_r^2}{M^2 T^2}} \frac{hc}{\eta\lambda} = \frac{hc}{\eta\lambda T M} \sqrt{\langle N_d \rangle T F^2 M^2 + N_r^2} \quad (7)$$

となる. 十分高い増倍率の場合, 蓄積時間 T が小さくても $\langle N_d \rangle T M^2 \gg N_r^2$ の条件の下では,

$$P_{min} = F \sqrt{\frac{\langle N_d \rangle}{T}} \frac{hc}{\eta\lambda} \quad (8)$$

となり, 最小検出可能光強度は式 (2) と比較すると ICCD のその F 倍となる. したがって ICCD および EMCCD の量子効率と过剩雑音指数との間に $F < \frac{\eta_{EMCCD}}{\eta_{ICCD}}$ の関係が成立する場合, EMCCD の方が有利となる. 実際に, 増倍率 M に対する F の特性は $M > 20$ では一定になり $F \cong 2$ に近づくことが知られている. 観測波長にもよるが, 分光感度特性の

ピークにおける量子効率が $\eta_{EMCCD} > 90\%$ であるとする $\eta_{ICCD} > 64\%$ が求められ、これは前述の gen III 光電面でも困難な値である。ICCD をアナログモードで動作させる場合、1パルスイベントが複数の CCD 画素にまたがることになるため、結果的に空間的に平滑化され、解像度は劣化するがフォトンカウンティングモードあるいは EMCCD より一見画像コントラストが優れているかのような画像が得られる。しかし、アナログモードでは、式 (2) において MCP の過剰雑音指数を考慮しなければならず、MCP の過剰雑音指数が EMCCD と同程度であるとする、空間分解能を同等にして比較したとき、量子効率が高い分だけ EMCCD が実際には有利になる。そのほか、I.I. 入射面および出射面での光反射による損失などを考慮すると総合的には窓の少ない EMCCD の方が有利となる場合が多い。ただし、目的とする波長や時間分解能などアプリケーション毎にその条件は異なるため用途に合わせた選択が必要となる。とくに高時間分解能（高速ゲート機能）が要求される蛍光寿命イメージングなどのアプリケーションは ICCD でなければ対応することができない。逆に、時間分解能が必要とされず、長時間露光が可能な場合は、EMCCD よりも CCD の方が有利となる。また、EMCCD 読み出し雑音には、増倍レジスタでのクロック誘導電荷 (CIC; clocking induced charge) といったゲインをもたない CCD にはない雑音が付加されることも考慮しなければならない。

2.4 発光レポーター遺伝子による細胞レベルでの遺伝子発現イメージング

発光レポーターを用いた遺伝子発現計測には、生物発光 (ルシフェラーゼ) 遺伝子と蛍光 (GFP; 緑色蛍光タンパクなど) 遺伝子を用いる方法がある。一般に極微量検出には生物発光の方が有利である。蛍光計測の場合、励起光強度を強くすることにより蛍光強度も強くなるが、同時に生体の自家蛍光強度も強くなることから、蛍光による検出限界はバックグラウンドとなる自家蛍光強度のショット雑音で決定される。したがって、蛍光を用いて微量検出を行う場合は、なるべく自家蛍光強度の低い励起波長を選び、かつその自家蛍光強度が検出素子暗電流に比べて十分に小さいという条件が求められる。このようなことから、極微弱光イメージングカメラのようにシングルフォトンレベルの検出感度を有する場合は、生物発光レポーターを用いる方が有利となる。

とくに高い時間分解能が要求されない遺伝子発現計測においては、式 (5) で示したように十分な蓄積を行うことで冷却 CCD の方が有利となる場合も多い³⁾。これに対して、遺伝子発現計測ではないが、蛍光ラベルによる単分子蛍光計測のように高い時間分解能が要求されるような計測においては EMCCD を選択すべきである。

3. in vivo マクロイメージングのための蛍光断層画像計測技術^{4,5)}

顕微鏡下で行われている蛍光ラベリングによる遺伝子機能や生理作用の観察を、生きたマクロな生体で実現することが

できれば、蛍光ラベル法の医用蛍光診断への応用の道が大きく開かれる。生体内で発現した蛍光レポーター遺伝子や生体に投与した蛍光ラベル剤の生体内分布を生体の外から非侵襲イメージングする技術は、光の安全性や手軽さを考えると非常に魅力的である。しかしながら、光散乱媒質であり不透明な生体の内部蛍光を生体の外から画像としてとらえることは容易ではない。散乱媒質である生体内部を光で透視あるいは断層撮影する技術を一般に光 CT (computed tomography) と称するが、上述のアプリケーションを目的とした研究も種々進められており、例えば生体の光散乱特性を考慮し、点拡がり関数から逆問題を解く方法や、変調分光法などによる蛍光 CT が報告されている。本節では、光と超音波を組み合わせる散乱媒質内部の蛍光発光特性を計測する方法について紹介する。超音波と光の相互作用を利用して空間選択的に蛍光分布情報を得るこの手法は、超音波タグ蛍光断層イメージング法と呼ばれる。まだ基礎研究の段階であるが、生体を模擬した試料による実験での見積りによると、空間分解能 1 mm にておよそ 30 mm 程度の深度でのイメージングの可能性が推定されている。

3.1 計測原理と方法

生体に蛍光励起用レーザー光の照射と同時に集束超音波を照射する。散乱媒質内部で発生した蛍光は超音波音場により強度変調される。これは生体組織内に照射された超音波音場が、媒質の屈折率や散乱係数などの光学特性の不均衡を誘起し、超音波が進行波の場合、音圧の時間的な変化に依存した光強度の変化をもたらすことによる。蛍光発生源と超音波焦点が近いほど変調蛍光信号が大きくなることから、焦点を空間走査することにより蛍光分布を計測することができる。媒質中に蛍光物質が局在する場合、励起光や発生した蛍光は強度変調を受け、超音波焦点と蛍光体の位置が一致したときその信号は最大となる。

このような原理に基づいて、摘出した生体組織により基礎実験を行うための超音波タグ蛍光断層イメージングシステムのブロック図を図 4 に示す。CW レーザー光を、蒸留水を満たしたアクリル水槽に入射し、レーザー光軸と直交するよう配置した共振周波数 1 MHz の水中用トランスデューサにより集束超音波を照射する。集束超音波焦点におけるビーム幅は 3 mm、焦点距離は 46.5 mm である。アクリル水槽は 3 軸自動ステージ (X 軸: 入射レーザー光軸方向, Y 軸: 超音波伝搬方向, Z 軸: 高さ方向) 上に設置した。測定用生体試料はアクリル容器内に入れ、その容器は水槽に触れない様にして外部から固定した。トランスデューサ設置水槽のみを 3 軸移動することにより、超音波焦点が測定試料内部を走査することができる。各点において、変調蛍光信号をバンドパス干渉フィルタを装着した光電子増倍管により検出し、スペクトラムアナライザで検波した。

3.2 蛍光断層画像

市販のブタモモ肉を用いた模擬試料による実験例を示す。測定にはほぼ均質な筋肉部を 40×40×80 mm に成形したもの

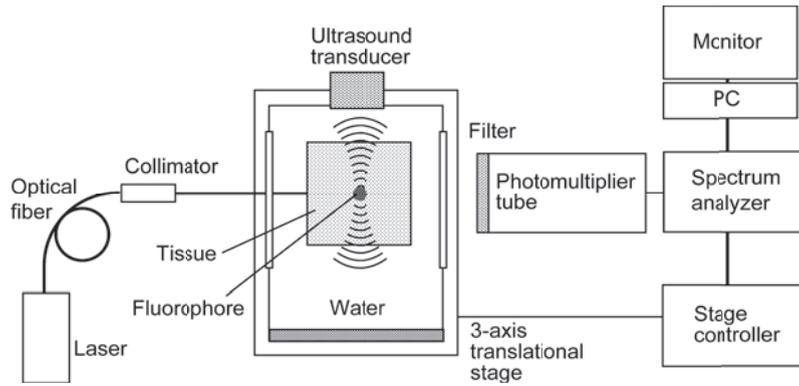


図4 超音波タグ蛍光断層イメージングシステムのブロック図

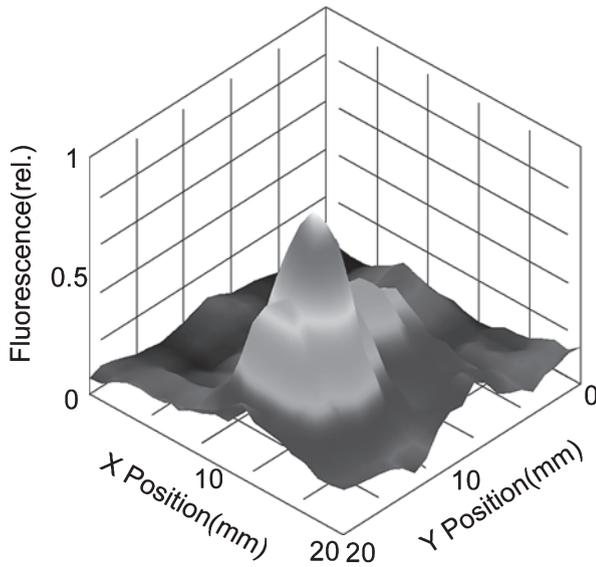


図5 ブタ肉に埋め込んだ蛍光体の蛍光断層画像計測例

を用いた。その中央部には近赤外蛍光微粒子を混合したアガロースを、直径3 mm 高さ5 mm の円柱形に成形して包埋した。光源には波長726 nm のTi:Sapphire レーザーを用いた。図5は試料中心部を20×20 mm の範囲で1 mm の分解能で計測した断層画像を示したものである。画像中央部に蛍光強度が高い部位が局在していることがわかる。実際に測定後に試料を切断して内部を観察したところ、設計通りの位置に蛍

光体が埋設されていることを確認した。ピークの幅から、蛍光体サイズ程度の分解能でその位置が検出されていることがわかる。

4. おわりに

本稿前半では、発光、蛍光による微量画像分析のための極微弱光イメージング高感度カメラについて、感度の比較を中心に解説した。顕微鏡レベルでの光イメージングにおいては、各種カメラの特徴を理解した上で、観測波長、時間分解能など用途に最適なカメラを選択するのが重要である。後半では、まだ研究レベルではあるが、蛍光ラベリングによる生体機能計測のための生体蛍光断層イメージングの新しい技術について紹介した。現在、実用化に向けた研究開発が行われており、新しい画像診断装置としての今後の研究の進展が待たれる。

文 献

- 1) Denvir, D.J. and Conroy, E.: *Proc. SPIE*, 4796, 167-174 (2002)
- 2) Robbins, M.S. and Hadwen, B.J.: *IEEE Trans. Electron Devices*, 50, 1227-1232 (2003)
- 3) Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M. and Okamura, H.: *Science*, 302, 1408-1412 (2003)
- 4) Kobayashi, M., Mizumoto, T., Shibuya, Y., Enomoto, M. and Takeda, M.: *Appl. Phys. Lett.*, 89, 181102 (2006)
- 5) Kobayashi, M., Mizumoto, T., Trinh, Q.D. and Takeda, M.: *Proc. SPIE*, 6633, 663306-1-5 (2007)