



レーザー光励起蛍光の応用

佐藤 俊一・稲場 文男

東北大学電気通信研究所 〒980 仙台市片平 2-1-1

(1985年6月18日受理)

Applications of Laser-Excited Fluorescence

Shunichi SATO and Humio INABA

Research Institute of Electrical Communication, Tohoku University,
2-1-1, Katahira, Sendai 980

1. はじめに

蛍光測定はさまざまな物質の物理的、および化学的特性を明らかにするのに基礎的かつ重要な手段として知られているが、蛍光波長がそれぞれの物質に固有であることからその定量や分布測定に応用することが可能である。その応用技術はあらゆる分野で活用されているが、とくに生命科学・工学や医薬学などの分野に注目した場合、古くから利用されている蛍光顕微鏡や、近年開発の進んでいるフローサイトメトリー^{1,2)}などが知られている。一般に生体に対する光照射の効果はまだ明らかでない点が多いが、とくに紫外光などの過剰な照射はDNAなど生体細胞内の微小成分、構造に大きな損傷を与えるばかりでなく、生体そのものを死に至らしめることが明らかにされており、蛍光の励起光強度はできるだけ弱くする必要がある。蛍光の効率のよい、または選択的励起方法としてはすぐれた単色性と指向性を有するレーザーを用いるのが最も適しており、近年レーザーが医学や生命科学の分野においても盛んに利用されるようになった理由のひとつとなっている。

しかしながら、励起光が弱いほど得られる蛍光強度も弱くなるわけで、したがって同時に高感度な光検出器やSN比の向上のためのエレクトロニクス技術の導入が要求される。有機色素の蛍光波長は一般に近紫外から近赤外域にわたって分布しているが、生体染色に用いられるものは可視域の蛍光を発するものが多い。この領域においては光子計数法を中心とする極微弱光計測技術³⁻⁶⁾が開拓され、そのために用いられている光電子増倍管はき

わめて高感度な光検出器として広く利用されているものである。しかし、生体試料からの蛍光像にはさまざまな重要な生体関連情報が含まれており、それを検出するためには光電子増倍管単独では不可能であり、なんらかの工夫、あるいは他の二次元的光検出器の導入が不可欠となる。

二次元的な蛍光分布像のビデオコンを用いた測定例としては、スパークギャップ電極から生じた金属蒸気中の基底状態のAl原子のレーザー光励起蛍光空間分布があるが⁷⁾、本稿では対象を生体細胞内物質からの蛍光検出に絞り、その蛍光強度分布を画像処理により定量的に解析する方法を中心にして述べる。

2. レーザー光励起蛍光顕微鏡

光学顕微鏡は個々の生体細胞や微小な生体組織に関する貴重な情報を得る手段のひとつであり、電子顕微鏡と比べると拡大倍率は劣るが、生きたままの試料を観察できるという大きな利点がある。蛍光顕微鏡は通常透過型顕微鏡にハロゲンランプや水銀ランプなどの励起光源を付加し、落射方式によって試料に光を照射する方式になっている。しかし、これらのインコヒーレント光源はスペクトル幅が広くて、輝度が低いという難点をもち、その使用範囲にも限界があった。このような問題を解決するとともに、蛍光強度分布を定量的に表示することを目的として、われわれは優れた単色性と高輝度性を有するレーザーを生体内色素の励起光源として用いて、図1に示すような蛍光顕微鏡システムの試作開発を行なった^{8,9)}。

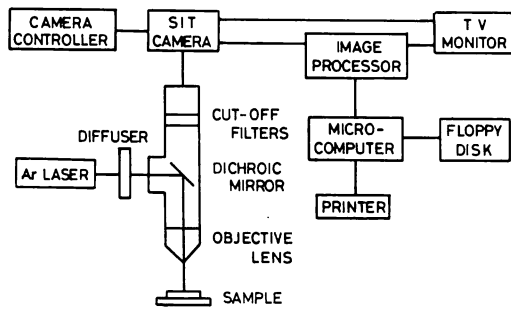


図 1 レーザー光励起蛍光顕微鏡システムのブロック図

ここでは Ar レーザーを用いているが、励起波長はおのおのの蛍光物質の吸収最大ピーク波長付近にあることが望ましく、また生体内に多数の蛍光物質が存在する場合にも対処できるように波長可変な色素レーザーなどに置き換えることも可能である。本システムは単一の生体細胞内にあるか、あるいは外部から取り込んだ色素類からの蛍光強度分布の測定を目的としており、従来の蛍光顕微鏡と同様励起光を試料上に均一に照射する方法をとっている。そのためガウス型の強度分布を有するレーザー光に対しては、ダイクロイックミラーの前面に拡散板を置いてレーザー光を一様に散乱させ、できるだけ均一な強度分布を得るようにしてある。試料からの光には蛍光の他に散乱光が混じっているが、その波長成分はレーザー光と同一であるため、カットオフフィルターを使用して十分除去し、コントラストのよい画像を得ることが可能である。また測定する蛍光の波長範囲は適当な干渉フィルターなどを用いて選択している。

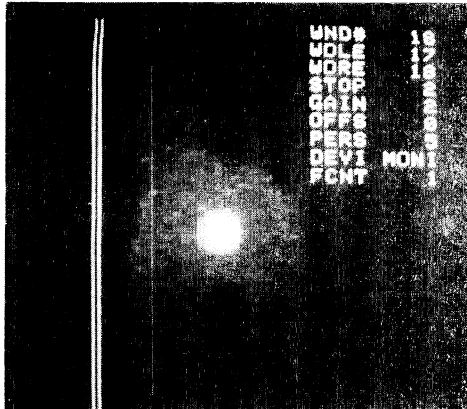
前述のように生体試料を扱う場合には励起光強度をなるべく弱くすることが望ましいため、光検出系をできるだけ高感度にする必要がある。人間の眼は 1 秒間に数十から 100 個程度の光子検出能力をもっているが、蓄積能力が低いため蛍光像を正確に記憶することは不可能である。また、写真撮影の場合には高感度なフィルムが開発されているが、微弱光測定には不十分であり、蛍光強度を定量的に把握できないという難点もある。そこで高感度 TV カメラを二次元光検出器として使用する試みが近年行なわれているが^{10,11)}、本システムでは微弱な蛍光検出だけでなく、さらにその強度分布を画像的に処理し定量的解析や表示ができるようにした。そのために TV カメラには高感度な SIT (silicon intensifier target; 浜松ホトニクス HTV-C 1000-18) カメラを用いている。これは光電面から発生した電子を二次元 pn 接合ダイオードアレイ構成のシリコンターゲットに向けて電氣的に

加速し、ターゲット内に多数の電子・正孔対を発生させることにより利得を高めるもので、その値は 10^3 以上に達する。入力画像はこのようにしてターゲット内に電荷像として蓄積され、これを低速電子線で走査することにより信号が取り出されるが、入射光強度と電荷量がほぼ比例するため定量的な信号強度が得られ、種々の画像処理が容易になる。この測定系では一画面の走査に要する時間は約 1/60 秒であり、画像の SN 比を高めるために画像信号を積算処理しても約 1 秒でコントラストのよい像を得ることができる。この方法により、通常写真撮影にインコヒーレント光源を用いた場合に数十秒から数分間の時間を要していたのに対し、照射および測定時間を大幅に短縮することが可能である。また、実験の結果単一細胞の照射面上でのレーザー光強度は数 mW/cm^2 で十分であることが認められ、生体試料に対する損傷も最小限に押えられることが明らかとなった。

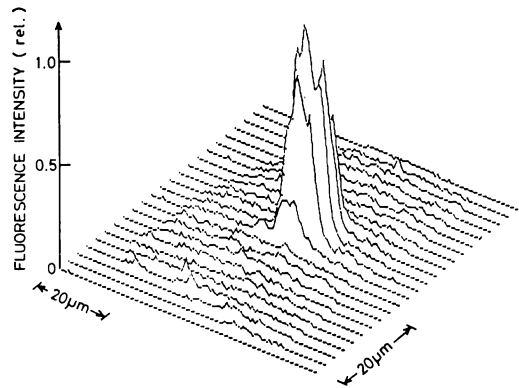
画像処理は大量のデータの高速演算処理や記憶が必要なため大容量メモリを備えたコンピュータの利用が不可欠であり、いままではミニコンピュータ以上の規模のものがよく使われてきた。しかし、最近ではマイクロコンピュータの性能が向上し、科学計測の分野でも広汎に利用されるようになってきている。本システムにおいてもイメージプロセッサからのデータ転送とその画像処理にマイクロコンピュータを使用している。SIT カメラによりとらえられた画像は、イメージプロセッサにより縦 256、横 64 の画素に分割され、おのおの画素に対する発光強度が内部のフレームメモリーに記憶される。マイクロコンピュータへのデータ転送はウィンドウと呼ばれる縦 256、横 1 画素分の解析窓ごとに行なっている。インターフェースには RS-232 C を用いているため、全画像データの転送には約 5 分程度要しているが、他の適当な高速処理装置を利用すれば数秒程度に短縮することが可能である。

3. 生体細胞内色素からの蛍光強度分布

このシステムを用いた測定結果の一例として、図 2 にプロピジウムアイオダイド (propidium iodide; PI) とフローレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate; FITC) で二重染色したヒトの子宮頸部扁平上皮細胞からの蛍光強度分布の測定結果を示す¹²⁾。PI は DNA と結合して波長約 680 nm 付近の赤色領域に蛍光のピークを有するのに対し、FITC はアミノ基との反応性が強く、波長約 520 nm 付近の緑色の蛍光を発する。この両者の色素はいずれも 480~490nm 付近に吸収ピー



(a) フレームメモリに蓄えられた蛍光画像のTVモニタ表示



(b) 三次元グラフィック表示

図2 二重染色した子宮頸部扁平上皮細胞からの Ar レーザー光照射による蛍光強度分布

クをもっているため、その励起には 488 nm の Ar レーザー光を用いることができる。このように二重染色法は 2 種類の色素の染色部分と蛍光波長の相違を利用した単一生体細胞内の相対的なタンパク量や DNA 量の測定手段として有用なものであり、子宮ガンの大部分を占める子宮頸部ガンの早期診断への応用が検討されているものである。なお、測定の際にはエチルアルコールで細胞を固定した後、色素濃度をともに 0.05 mg/ml として二重染色を施した。

図 2 (a) はフレームメモリ内に蓄えられた蛍光画像データを TV モニタに表示したものである。中央のとくに明るい部分が PI からの赤色の蛍光であり、その周辺部分は FITC からの緑色の蛍光を示している。図 2 (b) はこのこの画像データをマイクロコンピュータに転送し画像処理により蛍光強度分布を二次元的にグラフィック表示した結果である。これより蛍光強度は核の部分でとくに強く、その周囲の細胞質の部分では、全体的に弱いことが明瞭に認められる。

一般にガン化した細胞は核の形状が異なっている以外に、含有 DNA 量が増えていることがある。したがってその場合には DNA と結合した PI からの蛍光量も正常細胞と比べると大きい。本システムでは個々の細胞全体、あるいは必要な内部領域からの蛍光強度を積算するような演算処理を比較的容易に行なうことができるため、PI と FITC からの蛍光強度を比較することによってガン細胞か否かの判定を行なうことも十分可能であると考えられる。

一方、近年悪性腫瘍の早期診断・治療法のひとつとして世界的に注目を集めているものにレーザー光化学診

断・治療法がある¹³⁾。Photoradiation therapy (PRT) と呼ばれているこの方法は、選択的に腫瘍親和性を有する有機色素を静脈注射により体内に投与した後、ガンの疑いのある部位にレーザー光を照射して生じる蛍光より腫瘍の位置やその大きさなどを診断した上で、さらに光化学効果により腫瘍を壊死させるものである。PRT に用いられるレーザーはレーザーメスなどに比べて一般に十分低出力のものでよいが、その作用機序についてはまだ明らかでない点が多い。そこでわれわれはその解明のための一環として、上述のレーザー光励起蛍光顕微鏡により、PRT に利用されている有機色素によるガン細胞内の蛍光強度分布を測定した。現在ヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) が臨床的にも各所で使用されているが、これはさまざまなポルフィリン類の混合物であるため、ここでは単独の構成物質であるヘマトポルフィリン二塩

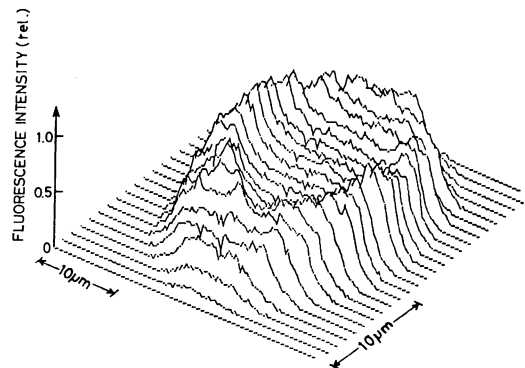


図3 ヘマトポルフィリン二塩酸塩 (Hp₂HCl) を取り込んだ TE-2 食道ガン培養細胞からの蛍光強度分布の三次元グラフィック表示

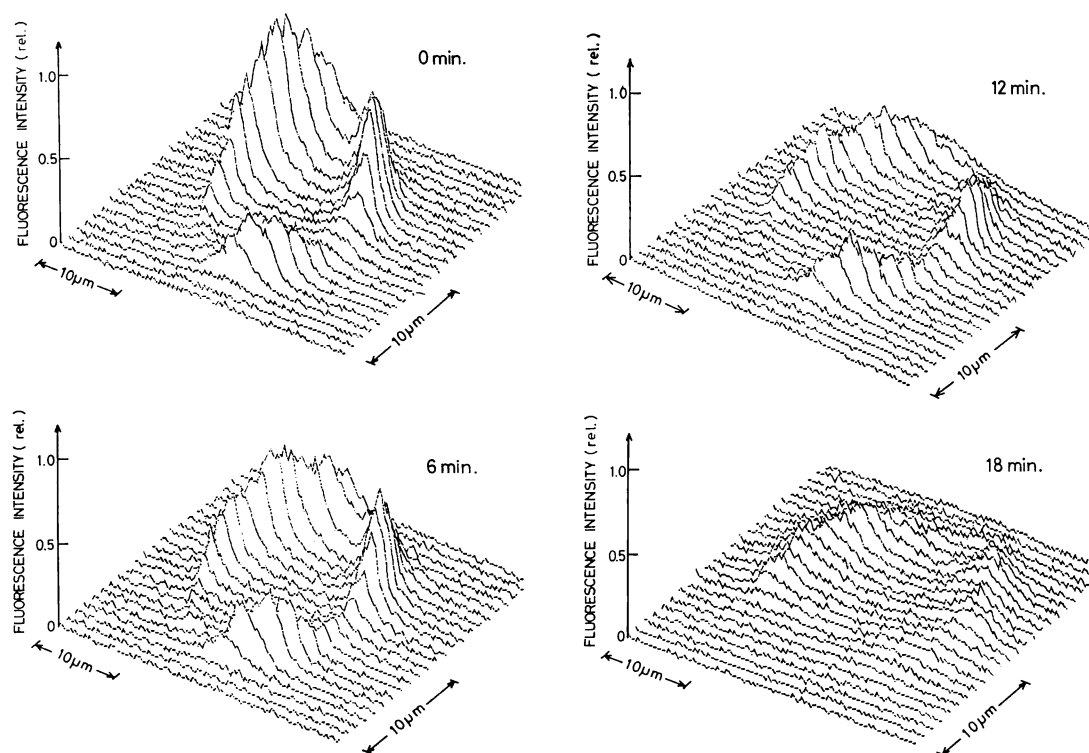


図4 フェオホーバイド a を取り込んだ TE-2 食道ガン培養細胞からの蛍光強度分布の経時変化の三次元グラフィック表示 (Ar レーザー連続照射開始後 6 分間隔の測定)

酸塩 (Hp. 2 HCl) を濃度 1×10^{-4} mol/l の PBS 溶液中にて 1 時間 37°C で培養して細胞に取り込ませて測定を行なった。図 3 はヒト由来の TE-2 食道ガン培養細胞についての測定例を示すものである^{14,15)}。図より Hp. 2 HCl からの蛍光強度は細胞の中央付近で弱いが、周辺部分では強いことがわかる。このことは Hp. 2 HCl は主として細胞質の部分によく取り込まれていることを示すもので、NH1K 3025 の細胞周期に伴う体積の増加とヘマトポルフィンフリーベース含有量の増大との関係からこの色素の取込みの部位を細胞質と推定した Christensen ら¹⁶⁾の結果ともよく一致している。なお HpD を用いた場合にも図 3 と同様の結果が得られており^{14,15)}悪性腫瘍細胞中に取り込まれたヘマトポルフィン類による光化学効果は主として細胞質で生じているものと判断される。

次に図 4 にフェオホーバイド a を取り込んだ TE-2 食道ガン培養細胞に Ar レーザー光を連続的に照射した場合の経時変化として、6 分間隔で測定した蛍光強度分布の三次元グラフィック表示を示す^{17,18)}。この場合も色素濃度 1×10^{-4} mol/l の PBS 溶液中で 1 時間 37°C で培養した細胞を測定に用いた。この有機色素はクロロフィル

a の分解生成物であり、最近ガン細胞に対して顕著な光化学効果を生じることが明らかにされている¹⁹⁾。図より蛍光強度は核の部分では弱いですが、Hp. 2 HCl や HpD に比べると、フェオホーバイド a のほうが細胞膜に近い細胞質の部分で強く、急峻な変化を生じていることが明らかに認められる。また時間とともに蛍光強度が減少し、その分布が広がり示しており、ガン細胞が内部で発生した光化学効果によりしだいに膨潤し、破壊されてゆく様子がわかる。

このように照射光に対してきわめて感受性の高い有機色素などの物質からの蛍光ならびにその空間分布を測定する場合には、測定時間を十分に短くしないと必要な情報や的確な結果を得ることが困難であることがわかるが、これに対しわれわれが開発した蛍光顕微鏡装置はレーザー光などにより光化学反応が進行するような系の発光分布の時間分解測定手段として実用上有効であることが明らかである。

4. 三次元発光分布解析

生体細胞をはじめ、光学顕微鏡で観察しようとするほとんどすべての試料は厳密には三次元構造をもっている

のであるが、通常は肉眼や写真、あるいは TV カメラなどを用いて二次元的な像情報のみをとらえているのであって、深さ方向に関する情報は失われている。試料の二次元的な情報や知見は、顕微鏡の焦点面を適宜ずらしてゆき、それぞれの面内での画像を記録すれば、結果的には得られたことになると考えられるが、おのおのの画像は非焦点面からのぼけた像が複雑に重なり合っているため、直接には正確な三次元構造や分布を知ることがきわめて困難である。しかしながら、光学系の点像関数が既知であればフーリエ結像論に従って、焦点面をずらして得られる多数個の観測画像からそれぞれの焦点面においてぼけた像の重ね合せのない画像を電子計算機によって導出することが可能である。

このような考えにもとづく試みの一つとして、Agard²⁰⁾は DNA を選択的に染色する Hoechst 33258 を利用して蛍光測定からショウジョウバエ細胞の染色体の三次元構造を求めている。これは概念的には、図 5 のように測定試料または対物レンズの位置を順次ずらして試料に対して焦点面を多数個設定し、おのおの二次元的画像をデジタル的に記録し、数値計算によって立体的像を再構成しようとするものである。彼らの場合は顕微鏡のステージを 1 μm 間隔でずらし、写真撮影によって合計 30 個の蛍光画像を得た後デジタイザーによってこれらの画像の強度分布をデジタル化している。しかしながら、そのような数値計算は非常に煩雑で長時間を要するため、適当な近似を導入して²¹⁾ある程度ぼけを取り除くとともに、計算時間の軽減を図っている。この実験では細胞試料の励起にレーザー光は用いていないが、このような再構成の手法にもとづく三次元情報の導出はレーザー光励起蛍光像に対しても応用が可能であり、今後のハードウェアならびにソフトウェアの両面にわたる積極的な研究

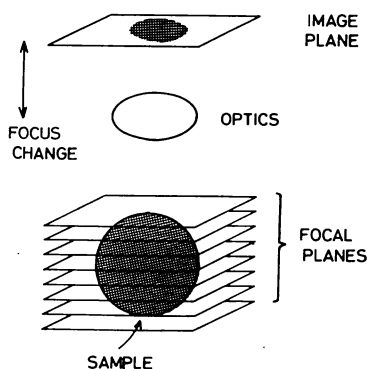


図 5 試料の三次元的情報を二次元画像から再構成するための焦点面の設定方法

開発により、高感度で高速な画像処理システムが実現されるものと期待される。

5. おわりに

レーザー光励起蛍光現象の画像計測への応用は最近の興味深い研究開発課題の一つであるが、具体的な報告や成果はまだあまり見当たらないようである。そのため本文では生体細胞の内部に取り込まれた各種の有機色素からの蛍光像の検出とその表示技術について筆者らの行なった実験結果を中心に述べてきた。とくに近年開発の進んでいる高感度 TV カメラで微弱な蛍光像を短時間でとらえ、マイクロコンピュータを用いて画像処理を施すことにより、新しい貴重な各種の情報の定量的な測定・解析が可能であることを示した。

時間的および空間的なコヒーレント特性の優れた高輝度のレーザー光を用いれば、一般に効率よく選択的に蛍光を励起することができるが、その場合でも生体細胞内物質などに対しては強い蛍光は望めない。そのため特定の生体物質と選択的に結合し、しかも蛍光量子収率の高い有機色素を用いた間接的な空間分布測定や画像の定量化はきわめて有用な手法であり、それに呼応して励起光学系や検出系の改善を含めたより高感度で、空間ならびに時間の両面にわたる高分解能な計測技術の研究開発は今後生命科学、とくに細胞生物学やバイオテクノロジーにおいてきわめて重要な課題であると考えられる。さらにそこでは高度な画像処理技術を縦横自在に駆使して、必要な二次元ないし三次元的情報の定量、可視化が必須であり、それに伴う新しい豊富な知見と目覚ましい波及効果を大いに期待したいものである。

文 献

- 1) 野口義夫: O plus E, No. 13 (1980) 49.
- 2) 野口義夫: 電子技術総合研究所集報, 44 (1980) 160.
- 3) H. Inaba, Y. Shimizu and Y. Tsuji: Jpn. J. Appl. Phys., 14, Suppl. 14-1 (1975) 23.
- 4) 清水慶昭, 遠保宏, 稲場文男: 光学, 4 (1975) 105.
- 5) 稲場文男: O plus E, No. 12 (1980) 78.
- 6) 稲場文男: 光学, 12 (1983) 166.
- 7) R. A. Dougal, P. F. Williams and D. C. Pease: Rev. Sci. Instrum., 54 (1983) 572.
- 8) 佐藤俊一, 菊地 奨, 伊藤弘昌, 稲場文男, 赤石 隆, 田口喜雄, 葛西森夫: 電子通信学会技術研究報告, 83(58), OQE 83-31 (1983) 83.
- 9) 佐藤俊一, 稲場文男: 応用物理, 53 (1984) 113.
- 10) M. C. Willingham and I. Pastan: Cell, 13 (1978) 501.
- 11) G. T. Reynolds and D. T. Taylor: Bioscience, 30 (1980) 586.
- 12) 佐藤俊一, 稲場文男: 分光研究, 32 (1983) 341.
- 13) たとえば T. J. Dougherty: Lasers and Hematoporphyrin Derivative in Cancer, eds. Y. Hayata and T. J.

Dougherty (Igaku-shoin, Tokyo, 1983) 参照.

- 14) 佐藤俊一, 伊藤弘昌, 稲場文男, 田口喜雄, 葛西森夫: 医用電子と生体工学, **22**, 大会特別号 (1984) 794.
- 15) S. Sato, S. Kikuchi, H. Ito, H. Inaba, Y. Taguchi and M. Kasai: *ICO-13 Conference Digest*, Sapporo (1984) p. 264.
- 16) T. Christensen, J. Moan, E. Wibe and R. Oftebro: *Br. J. Cancer*, **39** (1979) 64.
- 17) S. Kikuchi, S. Sato, H. Ito, H. Inaba, S. Kimura, T. Akaishi, Y. Taguchi and M. Kasai: *J. Jpn. Soc. Laser Med.*, **4** (1984) 57.
- 18) 稲場文男, 佐藤俊一, 伊藤弘昌, 木村修一, 田口喜雄, 葛西森夫: 医用電子と生体工学, **22**, 大会特別号 (1984) 796.
- 19) S. Takahashi, S. Sato, H. Ito, H. Inaba, S. Kimura, T. Akaishi, Y. Taguchi and M. Kasai: *J. Jpn. Soc. Laser Med.*, **4** (1984) 99.
- 20) D. A. Agard and J. W. Sedat: *Nature*, **302** (1983) 676.
- 21) D. A. Agard: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **13** (1984) 191.