

生体内微量物質の検出 —蛍光偏光解消顕微鏡の開発—

豊永 修司・中野義太郎

1. 生体微量物質の光学的計測

生体物質（タンパク質・核酸などのさまざまな生理活性物質、病原体）を極微量で検出することは医学生物学のみならず農業・工業分野でも大きな意味がある。そのためにこれまで考案・実用化されている多くの方法の中では、光学的手法が最も一般的である。定量性があり、水溶液中の測定が可能で、高い空間分解能をもち、波長分解により多パラメーターの同時計測が可能な上、細胞等を生かしたまま測定ができるという特徴をもつプローブは光しかないといってよい。

1.1 生体物質光計測の特徴

現在生体物質の計測に使われている手法の多くは、当初分光分析化学の分野で開発されたものである。通常、高感度検出においては、特定の物質に蛍光色素などを標識するという手段が必要である。また、生体用微量物質検出技術の特徴は、光信号が検出器に入射する前段階でさまざまな手段を用いてこれを增幅することである。その手法は多岐にわたるが、大別して、被検出物質自体を増幅するもの、被検出物質に結合するプローブ体を増幅するものの、信号を発生する発色団を増幅するものに分かれる。システム全体の検出感度や精度を上げる場合は、これらの信号増幅法をよく理解しておかないといけない。計測の手順としては、まず測定したい特定の物質を他の物質から分離／抽出し、次にそれらを検出することになる。分離／抽出の手段の中には抗原抗体反応を利用して特定の物質を標識するという手法もあるが、そのほかにも遠心分離法やクロマトグラフィー法、電気泳動法

などがある。その中でも注目を浴びているのが、キャピラリー電気泳動法である。これは内径約 $50\text{ }\mu\text{m}$ の石英ガラス細管の中で電気泳動を行い物質の分離を行う手法である。通常のゲル電気泳動に比べて微量サンプルで測定が可能であり（ナノリットルオーダー）、自動化装置へ展開することが容易であるため盛んに開発が行われている。このキャピラリー電気泳動法において、分離後の検出手法による感度の違いが比較されている。紫外可視域の吸光度法による検出限界は $10^{-13}\sim 10^{-16}\text{ mol}$ 、レーザー励起の蛍光法における検出限界は $10^{-18}\sim 10^{-20}\text{ mol}$ であり、蛍光検出法が最も優れている¹⁾。キャピラリー以外の分離法でも同様な結果が得られると思われる。

1.2 蛍光試薬の使われ方の現状

高感度な蛍光検出法を生細胞での微量物質検出に応用するために、蛍光色素の使われ方の現状を調べてみた。細胞生物学分野の著名な雑誌である、Journal of Cell Biology で 1996 年に刊行された論文を「蛍光」をキーワードとして検索して分類した。論文数は全部で 45 報であった。蛍光色素の使い方としては一般的には 2 種類の方法がある。まず第 1 の使い方は、特定の分子の存在または分布を明らかにするために用いるものである^{2,3)}。論文の件数もタンパク質を標識し、その存在や分布を調べたものが一番多い（23 報）。第 2 の使い方は、蛍光色素の特性（強度、波長、蛍光寿命）が環境によって変化することを利用して、細胞内微環境の検出に使用するものである。この例は Ca イオン濃度や pH の検出である（9 報）。1980 年代に開発された蛍光 Ca イオン濃度指示薬はレシオイメージング法をもたらし、蛍光試薬としては従来なかった定量的な計測を可能にし、瞬く間に世界に広がりその後コンスタントに使用されて

（株）分子バイオホトニクス研究所第 1 研究室（〒434 浜北市平口 5000）
E-mail: nakanoy@lmbp.co.jp

いる。GFP (green fluorescence protein) に関する論文も多い (9報)。GFPはクラゲの一種から分離された天然のタンパク質 (分子量2万6千)で、このタンパク質の中の特定のアミノ酸残基が細胞内で自発的に環構造を形成し蛍光発色団を形成するといわれている⁴⁾。この蛍光タンパク質がよく用いられている理由は、細胞を固定せず (殺さず) に特定のタンパク質の存在や分布および動態を検出することができるからである。通常は、検出したいタンパク質の遺伝子にこのGFPの遺伝子を融合することによって、蛍光標識したタンパク質が細胞内でつくりだされ、検出することができる。GFPは単に特定のタンパク質を追跡するためだけでなく、遺伝子が翻訳されているかどうか調べるために用いる。蛍光色素別の分類では、歴史の古い fluorescein や rhodamine, Texas Red 系の色素が大半を占める。蛍光色素の特性としては、長波長励起が可能で、量子収率が高く、蛍光寿命が長いものが期待されているが、その進歩はゆるやかなようである。

1.3 生体微量物質計測の現状と問題点

ここ数年の間に研究レベルでは單一分子の検出が可能であることが示されている。特に柳田の研究グループの蛍光標識法による運動性タンパク質の検出の成果には著しいものがある⁵⁾。他にも最近ではエバネセント波照明法によるポリアクリリアミドゲル中の單一色素分子の自由運動の計測⁶⁾、コンフォーカル顕微鏡法による單一色素の蛍光寿命の測定や⁷⁾、近接場光学顕微鏡による一対の分子間の蛍光エネルギー移動検出が報告されている⁸⁾。

これまでの蛍光標識法による單一分子検出の成功においては、ノイズの低減が大きく貢献している。そのためには、光学装置系から発生するノイズを低下させるとともに、観測領域を極限まで狭める必要があった。これは前述のエバネセント波照明法、コンフォーカル顕微鏡法、近接場光学顕微鏡法に共通していえることである。しかしこれらは濃度の観点からみると、それほど高感度な手法とはいえない。例えば多量の試料から一部をサンプリングして元の試料の濃度を推定する場合について考えてみる。観測領域の容積はこの3手法の中では最も大きいと思われるエバネセント波照射の場合でも、 10^{-12} l程度である ($100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ nm}$)。そこで1観測領域当たりの測定を仮に1/3秒で行ったとするとき、時間で観測できる容積 (サンプリング容積) は 10^{-8} l程度である。一方測定の精度を確保するためにはそのサンプリング容積に含まれる分子数として最低1000個は必

要である⁹⁾。このときの濃度を計算すると 10^{11} 分子/lであり、それほど超高感度とはいえない。この理由は観測領域が小さく、観測時間が限られているからである。

もうひとつの問題点は標識法である。これまでの單一分子の検出は、あらかじめ多量に用意した被検出物質に色素を結合し精製して、限られた条件でそのうちの1個を検出したということに過ぎない。これだけでは、例え採血中に1個の病原体 (抗原) が存在するかどうかを検出することはできない。そのためには多量の抗体を混入し、その中で1個だけ生成した抗原-抗体複合体を何らかの方法でより分けて検出しなければいけない。そのためには、効率よく複合体を形成する抗体の開発、効率よく複合体だけを分離する技術が必要となる。

以上をまとめると、抗体などを蛍光標識したプローブを使用して單一分子レベルの測定を行う場合は、1) 生体試料由来の被検出物質以外の夾雑物による妨害を防ぐこと、2) 非特異的結合、遊離プローブの中で本来の検出物質だけを分離すること、3) 観測領域を大きくし十分なスループットを得ることが課題である。

2. 分子バイオホトニクス研究所の取り組み

分子バイオホトニクス研究所は前述したような問題点を考慮しながら生体微量物質の2次元検出法の開発に取り組んでいる。まず蛍光観察法において微量な物質を観察するためには、光学ノイズの低減が有効であるので、筆者らのグループでも蛍光用対物レンズのノイズの低減を取り組んだ。手法はいたって簡単で、自家蛍光のなるべく少ない硝種を使用するとともに自家蛍光量の少ないロットを選別して組み立てた。その結果、UV励起 (365 nm)において従来の対物レンズに対して自家蛍光量を約1/10に低減することに成功した。

次に前述の問題点の一部を解決できる可能性のある手法として時間分解蛍光観察法を採用した。この方法はパルス励起光を試料に照射し、高時間分解能をもつ光検出器で試料の蛍光を観察し、蛍光寿命程度の時間オーダーの応答を測定するものである。生体分子間の相互作用などで生じる蛍光寿命の変化を測定することによって、従来にないさまざまな情報が得られるとともに夾雑物による妨害を防いだり、遊離プローブや非特異的結合プローブ由来のノイズと特異的結合プローブによる信号の分離が可能になる。

2.1 時間分解蛍光検出システム

分子バイオホトニクス研究所において構築した主な時間分解蛍光検出システムには、次のような方式がある。

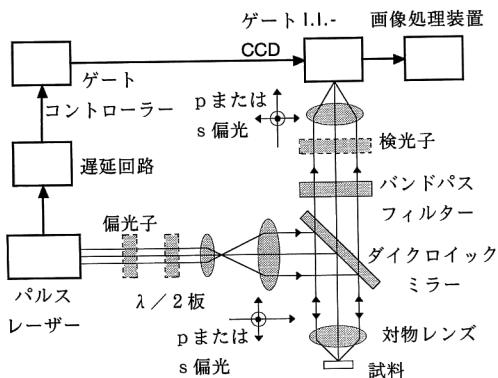


図1 時間分解蛍光顕微鏡（時間分解蛍光偏光解消顕微鏡）の装置構成。点線部分は、時間分解蛍光偏光解消顕微鏡の場合を示す。

- 1) 時間相関单一光子計数システム
- 2) ストリークカメラシステム
- 3) 時間ゲート法による時間分解計測システム

まず、時間相関单一光子計数システムは、蛍光寿命を測定するためのもっとも標準的な装置である¹⁰⁾。サブナノ秒の時間分解能があり、高い信号対雑音比と1:10⁴以上の高ダイナミックレンジを実現できる。

ストリークカメラシステムは、時間相関单一光子計数システムと同じく蛍光寿命を測定するための装置である。時間相関单一光子計数システムが、測定に専門的な知識と経験を要するのに対して、ストリークカメラシステムは素人でも比較的簡単に測定できるシステムである。数ピコ秒の時間分解能と多チャネルの同時計測という利点をもつ一方、感度が低くダイナミックレンジが小さいということから従来はそれほど使われていなかつた。しかし、最近ではストリーク管の改良および2次元光子計数法の導入により、時間相関单一光子計数システムと同等あるいはそれ以上の性能が実現されている¹¹⁾。

3番目の時間ゲート法による時間分解計測システムについては少し詳しく述べる。前二者がポイント測定であるのに対して、これは2次元的な時間分解測定が可能である。したがって、図1に示すように蛍光顕微鏡と組み合わせた構成となり、例えば蛍光標識細胞の2次元的な蛍光寿命マッピングが可能となる。筆者らの研究室では、光源としてモード同期チタンサファイアレーザー（スペクトラ・フィジックス社製 Tsunami：パルス幅約2 ps、最大繰り返し周波数80 MHz、コヒーレント社製 Mira 900：パルス幅約200 fs、最大繰り返し周波数76 MHz）の第2高調波を使用している。このパルス光をレーザー導入光学系により顕微鏡（ニコン製

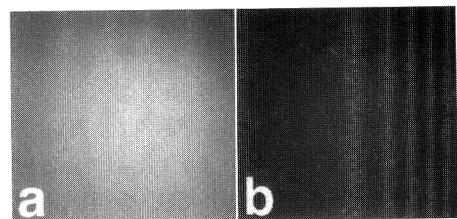


図2 モデルサンプルによる時間分解蛍光画像。a：定常観察像、b：時間分解観察像。

TMD 300、カールツァイス製アキシオプラン）に導入する。パルス励起により試料で生じた蛍光は、対物レンズ等を通して、ゲート機能を有するイメージインテンシファイア（ゲート I.I.）の光電面に結像され光電子像に変換される。光電子像は、ゲートがオンの状態ではマイクロチャネルプレート（MCP）に入射し、電子増倍され蛍光面に当たって再び光学像となる。しかし、ゲートがオフの状態では、光電子は MCP に到達することができず、蛍光面には何も生じない。このゲートは、パルス光源からのトリガー信号に同期して一定の遅延時刻に一定の時間幅で動作する。ゲート I.I. の蛍光面にできた蛍光像は、CCD カメラで読み出され画像処理装置において解析される。ゲート I.I. は、浜松ホトニクス製で最小ゲート幅は 500 ps、最大繰り返し周波数は 100 kHz である。

次に、ゲート I.I. を使った時間分解蛍光観察の例を示す。図2は時間分解計測を行うことによるコントラストの増大を示したものである。この場合モデル試料として蛍光色素溶液中に包埋した蛍光ビーズを用いた。蛍光色素は NK 85（日本感光色素）でその蛍光寿命は 46 ps、蛍光ビーズ（Polyscience 社）は直径約 6 μm で蛍光寿命は 5.5 ns である。図2a は連続光照射時の図で、コントラストが悪い。一方図2b はパルス励起後遅延 1 ns でゲートを開き画像を取得したものである。このように、夾雑物（蛍光色素溶液）と被測定対象物質（蛍光ビーズ）の蛍光寿命が異なる場合にはコントラストが増大して対象をはっきり捉えることができる。

2.2 時間分解蛍光偏光解消顕微鏡の開発

2.2.1 蛍光偏光解消イメージングによる BF 分離

次に、遊離プローブと特異的結合プローブの分離を目的とした時間分解蛍光観察法の応用例を示す。前述したように、細胞内の微量物質である核酸やタンパク質などの検出を蛍光標識プローブ法で行う場合問題となるのが、検出した核酸やタンパク質などのターゲットに結合した蛍光プローブ(B)と、結合していないフリーな蛍

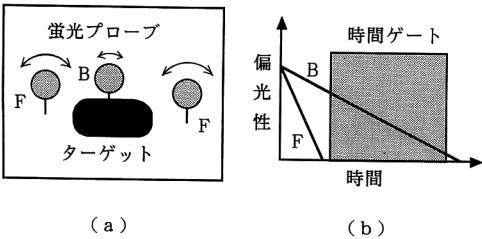


図3 蛍光偏光解消法によるBF分離。B:ターゲットに結合した蛍光プローブ、F:フリーな蛍光プローブ。

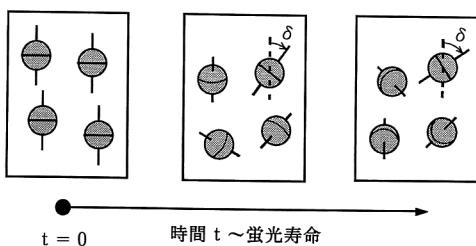


図4 蛍光偏光解消法の原理。

光プローブ(F)の分離、いわゆるBF分離である(図3)。この問題点を解決する手段として開発を進めてきたのがここで報告する時間分解蛍光偏光解消顕微鏡である。

蛍光偏光解消法の原理^{3,12,13)}は、F. Perrinによって1926年に提案された古い技術である。基本的には、分子の回転ブラウン運動を高感度に検出できる方法であり、試料の操作が比較的少なく、生体試料をより自然に近い状態で観察できるという利点をもっている¹⁴⁾。

蛍光偏光解消法の原理について説明する。まず簡単のため時刻 $t=0$ で一定の方向に分子軸をもつ蛍光分子が選択的に励起された場合を考える(図4)。それぞれの分子は、時間の経過とともに熱運動(回転ブラウン運動)により分子軸が乱れていく。個々の分子の分子軸は、発生する蛍光の偏光方位に対応しているから、回転ブラウン運動の時定数が蛍光寿命程度であれば、個々の分子から発生する蛍光の偏光方位は乱れ、全体として検出される蛍光の偏光性が低下する(偏光性が解消する)。したがって、逆に偏光性的低下の度合いから蛍光寿命を時間基準として分子の回転ブラウン運動を知ることができる。実際の溶液中にランダムに分散しているような蛍光分子の選択的励起は、直線偏光励起により行う。すなわち、励起光の偏光方位と平行に近い分子軸をもつ蛍光分子ほど選択的に励起されることになる。

蛍光の偏光性を特徴づける量としては、一般に異方性

比 r が用いられ次式で定義される。

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (1)$$

ここで I_{\parallel} は励起光の偏光方位に平行な蛍光偏光成分の強度、 I_{\perp} は励起光の偏光方位に垂直な蛍光偏光成分の強度である。いま溶液中で自由回転している球状の蛍光分子を時刻 $t=0$ で直線偏光のパルス光によりデルタ関数的に励起する場合を考える。この場合の異方性比 r の時間変化は次式で与えられる。

$$r(t) = r_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\theta}\right) \quad (2)$$

$$\frac{1}{\theta} = \frac{kT}{v\eta} \quad (3)$$

ここで、 θ は回転相関時間と呼ばれ、溶液の絶対温度 T と粘度 η および蛍光分子の体積 v で決まる量である。 k はボルツマン定数である。他方、パルス光励起ではなく一定の強度で連続的に励起する場合つまり定常光励起の場合、異方性比 r は次式で与えられる。

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\theta}} \quad (4)$$

ここで、 τ は蛍光分子の蛍光寿命である。

そこで、次にフリーな蛍光プローブ(Fプローブ)とターゲットに結合した蛍光プローブ(Bプローブ)を考える。両者は束縛状態が異なることから、FプローブはBプローブに比べて速い回転ブラウン運動をすると考えられる(図3a)。よって蛍光の偏光性を測定すると、パルス光励起の場合は、FプローブがBプローブに比べて速く偏光性が低下し(図3b)、定常光励起の場合は、FプローブがBプローブに比べて低い偏光性の値をとる。したがって、偏光解消の度合いを測定することにより、BプローブとFプローブの分離が可能となる。

この蛍光偏光解消法を顕微鏡下に応用すれば、2次元的な偏光解消度測定により空間的なBF分離が可能となる。偏光解消画像の取得により、通常の蛍光画像では区別できない蛍光プローブがターゲットに結合した領域(B領域)と結合していないフリーな領域(F領域)を区別できるようになるはずである。

さらに、筆者らは、時間分解蛍光偏光解消イメージングによるBF分離を検討した。すなわち、2次元的な光検出器である撮像素子をパルス励起光に同期してゲート動作させ、フリーな蛍光プローブの偏光性が十分解消してからゲートを開いて蛍光を受光し偏光性を測定することにより(図3b)、偏光解消画像のコントラスト(空間的なBF分離能)が定常光励起による偏光解消測定に

比べて向上するのではないかと考えた。

2.2.2 装置構成および測定手順

図1に装置構成を示す。光源としては、モード同期チャンサファイアレーザーの第二高調波を使用した。レーザーからのパルス光が、偏光子（グランレーザーブリズム）および1/2波長板（フレネルロム1/2波長板）を通過後、顕微鏡に導入される点と、試料からの蛍光が検光子を通過後ゲートI.I.へ入射する点が前述の時間分解蛍光顕微鏡装置と異なる。検光子は回転式のシート状偏光板で、励起光の偏光方位に平行な蛍光偏光成分または垂直な蛍光偏光成分を透過する。

測定は、次の手順で行った。ゲートI.I.のゲートオン時刻を適切な時刻に設定し、一定のゲート時間幅で試料からの蛍光を互いに直交する偏光方位（p方位とs方位）で受光する。このとき、装置の偏光応答補正を行うため、励起はp偏光とs偏光で行い、それぞれの励起について互いに直交する偏光方位で蛍光を受光する。測定される画像データは合計4個 ($I_{pp}(x, y)$, $I_{ps}(x, y)$, $I_{ss}(x, y)$) となる。ここに、 (x, y) は各画素の座標である。得られた画像データは、画像解析ソフトを用いて次式により装置の偏光応答補正因子（G因子と呼ばれる）および異方性比 $r(x, y)$ を計算する。

$$r(x, y) = \frac{I_{pp}(x, y) - GI_{ps}(x, y)}{I_{pp}(x, y) + 2GI_{ps}(x, y)} \quad (5)$$

$$G = \sqrt{\frac{I_{pp}(x, y)}{I_{ps}(x, y)} \cdot \frac{I_{sp}(x, y)}{I_{ss}(x, y)}} \quad (6)$$

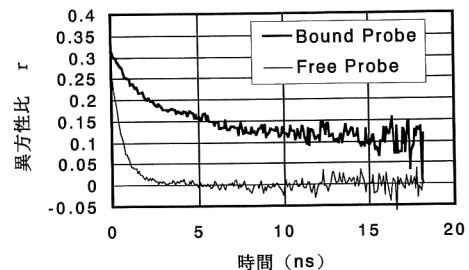


図5 モデル試料の蛍光異方性減衰曲線。

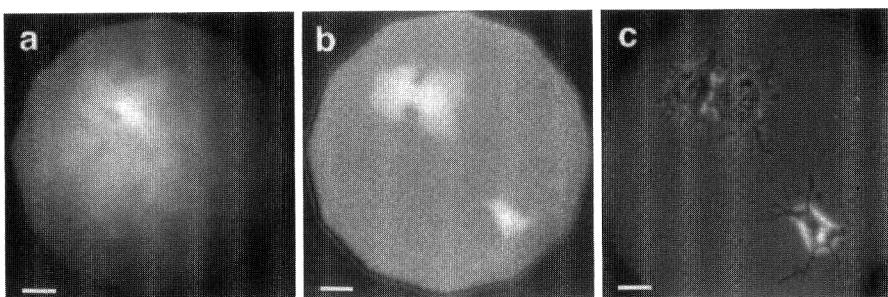


図6 モデル試料の顕微鏡観察画像。バーは $20 \mu\text{m}$ のスケール。a: 蛍光画像, b: 偏光解消画像(定常光測定), c: 位相差観察画像。

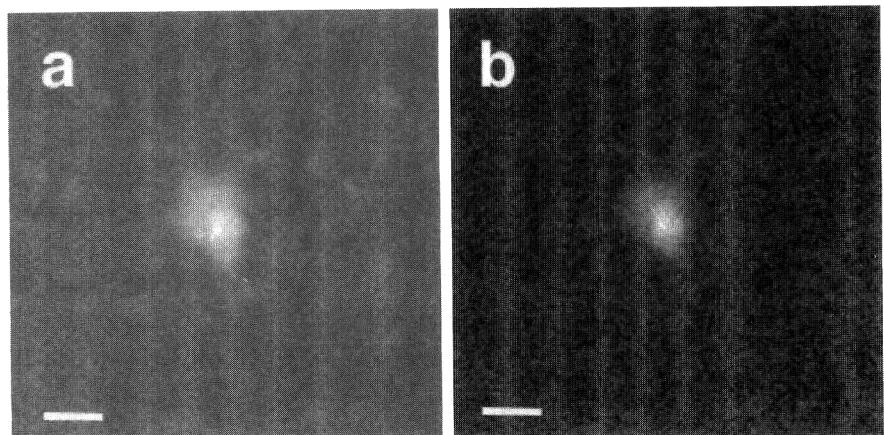


図7 モデル試料の偏光解消画像。バーは $20 \mu\text{m}$ のスケール。a: 定常光測定による偏光解消画像, b: 時間分解測定による偏光解消画像。

2.2.3 モデル試料による検証

蛍光偏光解消イメージングによる空間的なBF分離を検証するためにモデル実験を行った。最適なモデル試料の条件は、蛍光プローブがフリーな領域とターゲットに結合した領域の偏光解消度の差が大きく、2つの空間領域を別の観察手段により容易に同定でき、蛍光ができるだけ明るいということである。以上3つの条件を満足するモデル試料として、筆者らはHDAF染色NG細胞を選択した。すなわち、蛍光プローブとして細胞膜に特異的に結合する色素HDAF[5-(N-hexadecanoyl)aminofluorescein]を用い、ターゲットとしては神経様のNG細胞(NG108-15)を用いた。蛍光プローブが細胞膜に導入されたNG細胞の周囲を蛍光プローブの溶液で浸し、細胞領域をB領域、まわりをF領域として設定した。

まず、顕微鏡下で検出器としてマイクロチャネルプレート内蔵型光電子増倍管を使用し、時間相関单一光子計数法により、HDAF溶液およびHDAF染色NG細胞についてそれぞれ得られた異方性比 r の減衰曲線を図5に示す。細線がHDAF溶液領域(蛍光プローブがフリーな状態)の異方性減衰曲線であり、太線がHDAF染色NG細胞領域(蛍光プローブがターゲットに結合している状態)の異方性減衰曲線である。FプローブがBプローブに比べて速く偏光解消を起こしていることがわかる。

次に、モデル試料を通常の蛍光画像で観察したのが図6aである。B領域とF領域の差が明確でない。そこで、モデル試料を偏光解消画像(定常光測定)で観察すると図6bに示すようにF領域とB領域が明確に区別できる。図6cで示すように別の観察手段である位相差顕微鏡で観察すると、偏光性(異方性比 r)の高い領域が細胞の領域に対応していることが確認できる。

最後に、時間分解により偏光解消画像を測定した結果を示す。図7aが定常光測定による偏光解消画像で、図7bが時間分解測定による偏光解消画像である。B領域とF領域のコントラストが時間分解測定することにより向上していることがわかる。

以上のように筆者らは、より微量な物質をより生体に近い状態で観察する手段を構築するために、蛍光の時間分解・波長分解および偏光の利用などさまざまな手法

を用いて、研究を進めている。その中でも蛍光偏光解消イメージングにおいては、モデル実験により空間的なBF分離が可能であることが確認できた。今後装置のS/Nを向上させれば、より微量な試料(ターゲット)に対して、蛍光偏光解消イメージングによるBF分離が可能となるであろう。

図2は、石田雅之氏、城下昌久氏の提供によるものです。菅隆之氏には試料を提供していただきました。松本浩幸氏、阿部聰氏には本文をまとめる上で貴重なご意見をいただきました。

文 献

- D. R. Baker: *Capillary Electrophoresis* (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995) p. 113.
- J. R. Lakowicz: *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Plenum Press, New York, 1983).
- 木下一彦、御橋廣真: 蛍光測定—生物科学への応用(学会出版センター, 1985).
- D. C. Prasher: "Using GFP to see the light," *Trends Genet.*, **11** (1995) 320-323.
- T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito and T. Yanagida: "Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution," *Nature*, **374** (1995) 555-559.
- R. M. Dickson, D. J. Norris, Y.-L. Tzeng and W. E. Moerner: "Three-dimensional imaging of single molecules solvated in pores of poly(acrylamide) gels," *Science*, **274** (1996) 966-969.
- L. Edman, Ü. Mets and R. Rigler: "Conformational transitions monitored for single molecules in solution," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** (1996) 6710-6715.
- T. Ha, TH. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin and S. Weiss: "Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** (1996) 6264-6268.
- D. Y. Chen and N. J. Dovichi: "Single-molecule detection in capillary electrophoresis: Molecular shot noise as a fundamental limit to chemical analysis," *Anal. Chem.*, **68** (1996) 690-696.
- D. V. O'Connor, D. Phillips著、平山 鋭、原 清明訳: ナノ・ピコ秒の蛍光測定と解析法(学会出版センター, 1988).
- 小石 結: "2次元光子計数ピコ秒蛍光寿命測定装置", 電気学会光・量子デバイス研究会資料(1993).
- F. Perrin: "Polarization de la lumiere de fluorescence. Vil moyenne de molecules dans l'estat excite," *J. Phys. Radium*, **7** (1926) 390-401.
- G. Weber: "Rotational Brownian motion and polarization of the fluorescence of solutions," *Adv. Protein Chem.*, **8** (1953) 415-459.
- 峰野純一: "蛍光偏光法による分子間相互作用の解析", 蛋白質核酸酵素, **42** (1997) 77-81.

(1997年4月30日受理)