

フルオロ・イメージアナライザー

小倉 信彦

1. 序

1.1 フルオロ・イメージアナライザーとは

遺伝子の核酸や蛋白などに放射性同位元素 (radio isotope: RI) を標識化合物として用い、電気泳動やクロマトグラフィーあるいは組織切片などにより得られた2次元分布を検出するオートラジオグラフィーが古くからバイオの研究において広く利用されている。そのための画像検出装置のひとつがフルオロ・イメージアナライザーである。図1に画像の一例として、電気泳動により遺伝子が分画された様子を示す。高感度にこのような画像を検出するには遺伝子への標識物としてRIが利用されているが (RI法と呼ぶ)、最近では化学発光や蛍光の試薬が進歩したため、これらの試薬を標識あるいは染色することにより遺伝子を検出する方法 (non-RI法と呼ぶ) も普及してきている¹⁾。

本稿ではRI法と蛍光法に対応できるフルオロ・イメージアナライザーFLA-3000Gを取り上げて、その原理、構造、特性、応用などについて解説する。また今後の技術として、多種類の遺伝子の発現を一度に解析するための高密度蛍光読取り機 (マイクロアレイスキャナー) も現在研究中であるので若干の解説をしてみたい。

1.2 フルオロ・イメージアナライザーFLA-3000Gの特徴

(1) 高感度

RI法: 2次元の放射線検出器であるimaging plate (IP) はX線フィルムに比べ数十倍から千倍の感度を有しているため微弱なRIの検出が可能である²⁾。図2にその特性の一例を示す。

蛍光法: 高感度の蛍光試薬も近年登場し、手法によってはRI法に匹敵する感度が得られることもある。

(2) 定量性

RI法: IPは5桁以上に及ぶ広いダイナミックレンジと良好な感度直線性をもつので、RIの量を正確に定量することができる。

蛍光法: 手法によってはレーザースキャナーの広いダイナミックレンジを生かす蛍光試薬が使える。図3にその特性の一例を示す。

(3) 多様な蛍光手法に対応

青、緑、赤の3色のレーザーを搭載しているため、さまざまな蛍光試薬を検出することができる。読み取りスキャナーの検出面積も23cm×40cmと広く、厚みのあるサンプルも読み取れるので、多様な蛍光手法に対応できる。

2. フルオロ・イメージアナライザーの原理

RIで標識された画像を検出する原理と、蛍光色素で標識あるいは染色された画像を検出する原理はそれぞれ異なるので、別々に解説する。

2.1 RI画像の検出原理

IPは2次元の放射線画像検出器である。その構造は、二価のユーロピウムをドーブした粉末結晶 (BaFBr:Eu²⁺) の蛍光体をプラスチックフィルム上に塗布したものであり (図4)、輝尽発光現象を利用している。つまり、蛍光体がRIで刺激を受けた後、発光波長よりも長い波長の光を照射されると青い光 (PSL光) を発するというものである。図5にIPの発光の仕組み³⁾、図6に励起と発光のスペクトル、図7に放射線画像の記録、読み出し、消去のプロセスを示した。

2.2 蛍光画像検出の原理

蛍光とは、物質が光を吸収して励起状態となった後、元の基底状態に戻る過程で放出される光のことである⁴⁾。蛍光法の中には、DNAの塩基対の間に入り込むと蛍光を発

富士写真フイルム株式会社宮台技術開発センター (〒258-8538 神奈川県足柄上郡開成町宮台 798 番地)
E-mail: ogura@miya.fujifilm.co.jp

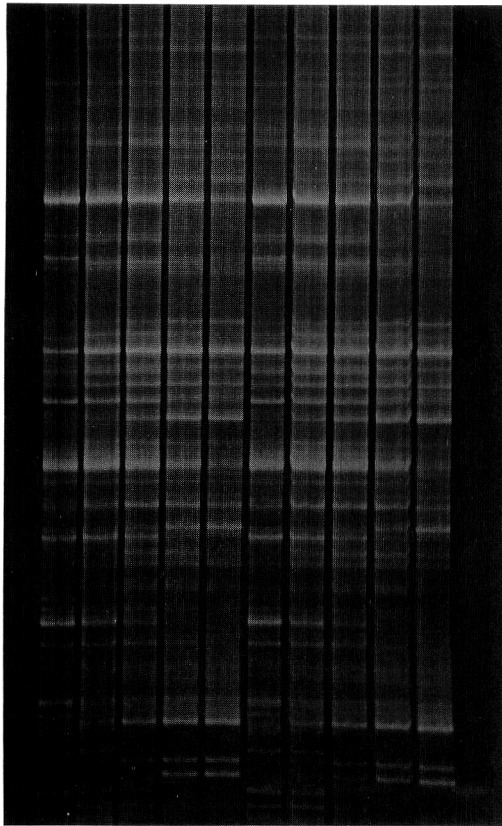


図1 電気泳動画像の一例。

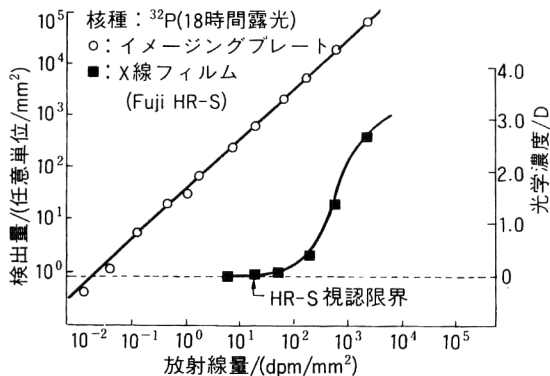


図2 IPとX線フィルムの感度特性比較。

するインターカレート型の試薬を利用する方法や、検出したいDNAと結合しうるDNA断片に蛍光色素を標識する方法などさまざまな方法があるが、いずれにしても検出器としては、その蛍光色素の2次元分布をレーザー光で走査し、長波長側にシフトした蛍光を検出しながら読み取る。

3. フルオロ・イメージアナライザーのシステム構成

図8にFLA-3000Gのシステム構成を示す。IPを読む場合には、磁気を帯びたIPステージに磁性体層をもつIPを張り付け、読み取り機にセットする。一方、蛍光サンプル

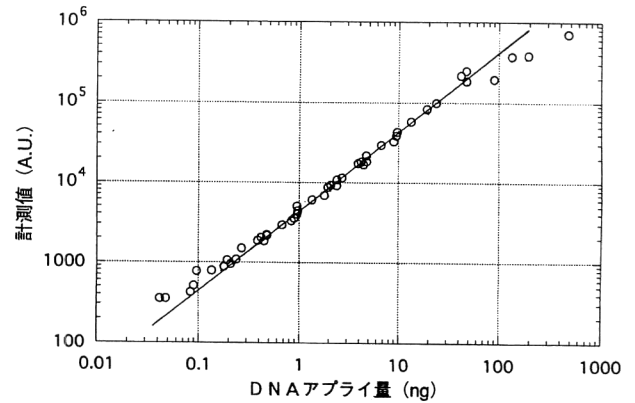


図3 蛍光法の感度特性の一例、SYBR™Green Iの蛍光試薬で染色した電気泳動ゲルをFLA-3000で検出しその量を測定した。

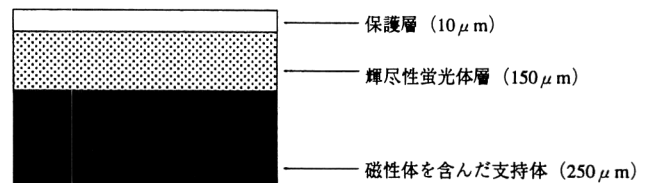


図4 IPの代表的な断面構造。

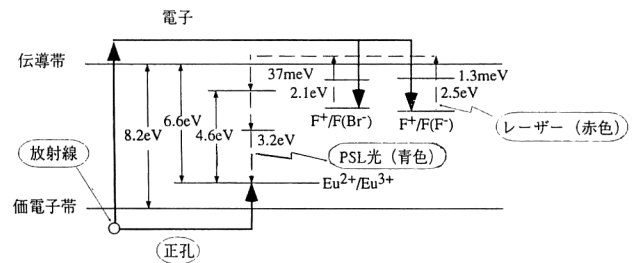


図5 BaFX:Eu²⁺輝尽性蛍光体の発光メカニズム。放射線が照射されると、電子と正孔が発生し、電子はF⁺センターに捕獲される。その後レーザーを当てると、捕獲された電子は伝導体を経由して、正孔と再結合する。そのときにPSL光が放射される。

ルを読む場合には、透明のガラスステージにサンプルを載せて読み取り機にセットする。読み取られたデジタル画像はパソコンに転送される。

3.1 レーザー光源

蛍光サンプルの中にはゲルやマイクロプレート等いずれも厚みが数mm以上もあるサンプルが存在する。LEDのような光源も世の中では蛍光画像検出装置に使われているが、指向性が悪いため解像度と感度の点で十分な画像が得られない。FLA-3000Gでは指向性の良い光源である赤、緑、青の3本のレーザーを搭載することにより、多様な蛍光手法に対応している。赤色の光源には $\lambda=633\text{ nm}$ のHeNeレーザーを搭載しており、IPと赤励起の蛍光色素を読み取る際に使われる。青色、緑色光源には富士写真フ

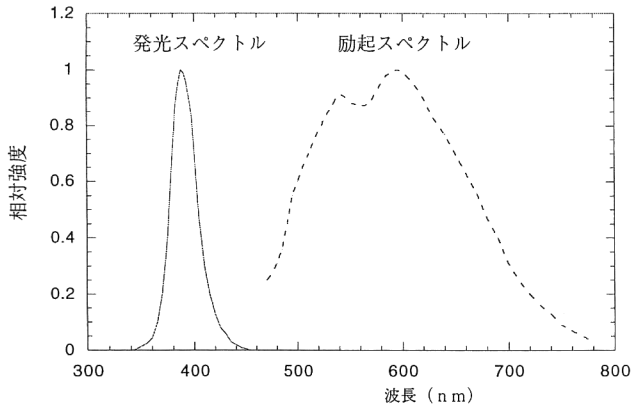


図6 BaFBr:Eu²⁺ 輝尽性蛍光体のスペクトル。

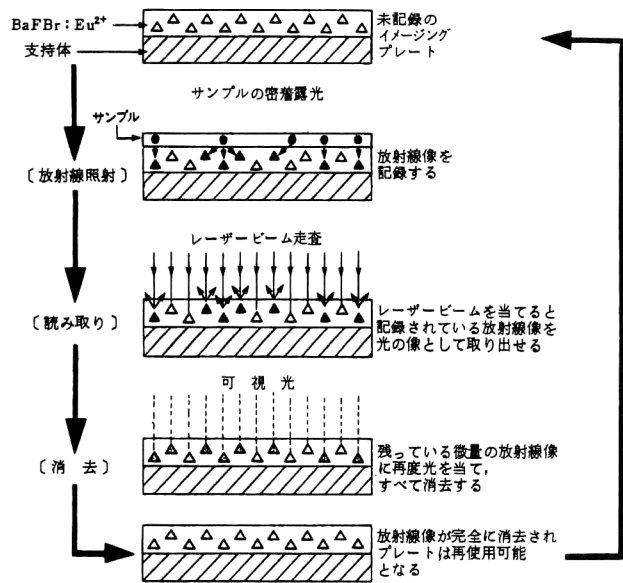


図7 IPの放射線検出原理。

イルムが開発した $\lambda = 473 \text{ nm}$ の青色固体レーザーと $\lambda = 532 \text{ nm}$ の緑色固体レーザーを搭載しており、蛍光色素を読み取る際に使われる。

青色、緑色固体レーザーは第二高調波発生 (second harmonic generation: SHG) を用いた固体レーザーであり、1) SHG 結晶として独自開発した MgO-LiNbO_3 反転ドメイン結晶 (periodically poled bulk MgO-LiNbO_3 crystal: 以下 PPMGLN と略す) を用いたこと、2) 固体レーザー共振器内にビーム制御素子としてエタロンを挿入して単一縦モード化したことによりこれまでにない出力安定性、低ノイズ化、小型化を図ったことが最大の特徴である。例として青色 SHG 固体レーザーの構造を図9に示す⁵⁾。 $\lambda = 809 \text{ nm}$ の半導体レーザーの光をレンズで Nd:YAG 結晶内に集光し、 $\lambda = 946 \text{ nm}$ の基本波をレーザー発振させ、PPMGLN によって波長変換し、 $\lambda = 473 \text{ nm}$ の青色 SH 光を発生させる。この PPMGLN は強誘電体結

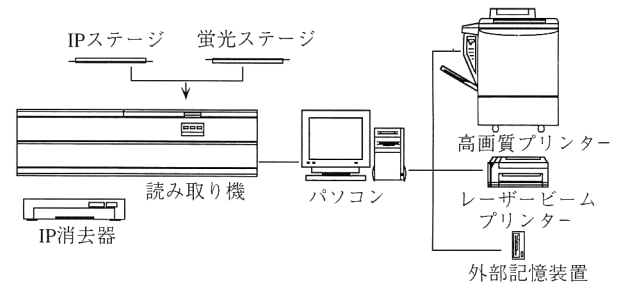


図8 FLA-3000G システム構成図。

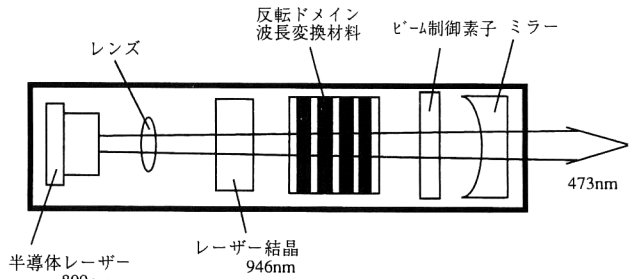


図9 青色 SHG レーザー概略構造。

晶の自発分極の方向をコヒーレント長の2倍の周期で変化させたもので、基本波と SH 波の位相速度差を補償して擬似的に位相整合ができるものであり⁶⁾、従来から用いられていた KNbO_3 結晶に対して高変換効率、広い温度安定性、ビーム品質にすぐれる SHG 結晶である。

3.2 レーザースキャナー

図10にレーザースキャナーの概略を示す。ポリゴンミラーと $f\theta$ レンズにより、サンプル上のレーザービームを一定の速度で走査している。ポリゴンミラーは IP の $1 \mu\text{s}$ という蛍光寿命に合わせて数百 rpm の低速度で回転する。ポリゴンミラーの各面での反射率のばらつきは画像ではラインごとのむらとなって現れるため、厳しい管理がなされる。サンプル上でのビーム径は約 $50 \mu\text{m}$ になるように、ビームエキスパンダーで調整されている。

IP からの PSL 光あるいは蛍光サンプルからの蛍光は、集光ガイドと呼ばれるアクリル製の板の端面から入射し、ガイド内を全反射しながら光電子増倍管 (PMT) に導かれる。世の中の画像読み取りスキャナーには、集光ガイドの代わりにバンドル状の光ファイバーを用いられるものもあるが、PSL 光の集光効率が極端に悪くなり結果として検出感度が悪化するため、本スキャナーには集光効率の良い集光ガイドを使用している。

PMT の前には励起光をカットするための色ガラスフィルターが数種類配置されており、サンプルによって最適なフィルターを選択する。蛍光サンプルを読み取る場合には色ガラスフィルターとしてシャープカットフィルターを用

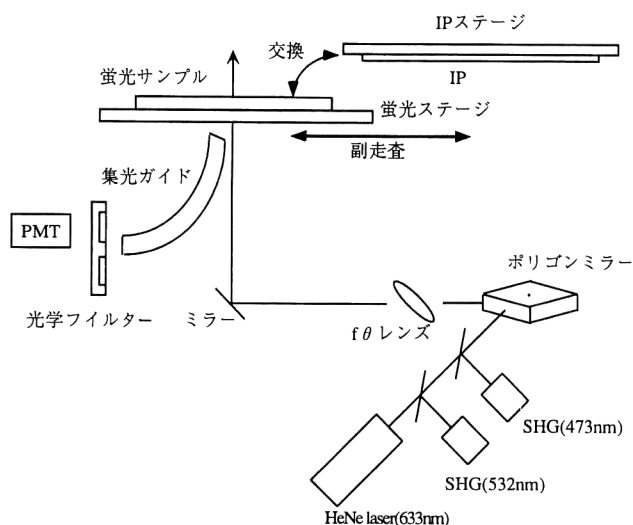


図10 FLA-3000Gの光学スキャナー。

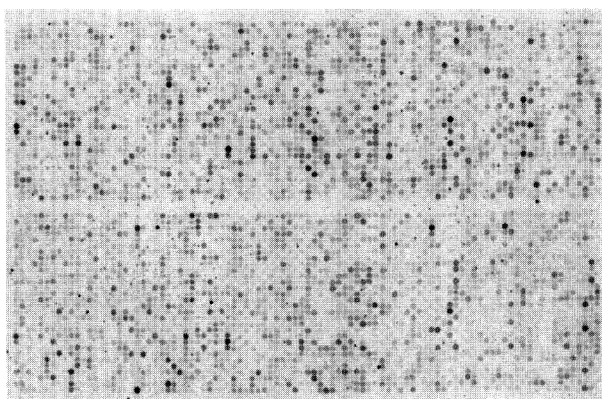


図11 マクロアレイ法によるRI画像。

いているが、励起光を吸収すると強い蛍光を発するものもあり、それが画像ノイズとなり、検出感を悪化させる結果となってしまう。特に光を吸収するような光学部材の選定および設計には十分な配慮が必要である。

4. フルオロ・イメージアナライザーの応用

Differential display (DD) 法⁷⁾と呼ばれる手法で取得した画像を図1に示す。電気泳動したゲルをSYBR™ Green Iの蛍光色素を用い染色し、FLA-3000 Gで読み取った画像である。画像の縦方向には、電気泳動によって分子量の異なる遺伝子が泳動バンドとして分離されており、隣り合ったレーンでの発現遺伝子の差異を見つけることにより、生物機能を解析することができる。

マクロアレイ法⁸⁾と呼ばれる一度に多種類の発現遺伝子を解析する手法の画像の例を図11に示す。数百～数千種類のcDNAを数百μmから2mm間隔にスポットしたメンブレンフィルター上に、検体から発現したmRNAを調

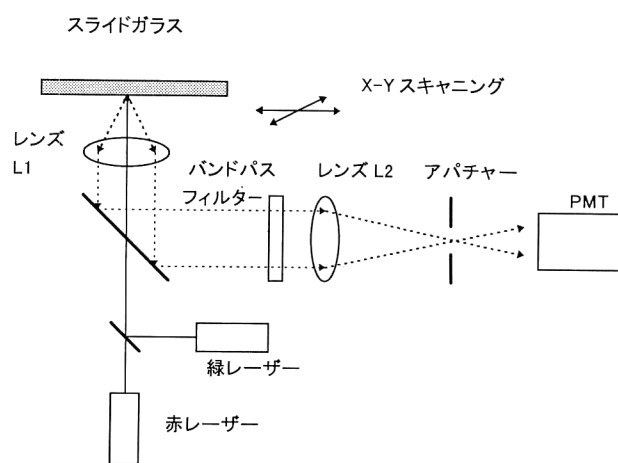


図12 マイクロアレイスキャナー。

整した後RIを標識したものを振り掛ける。メンブレンフィルター上のcDNAと二本鎖の遺伝子構造を組んだ(ハイブリダイズと呼ぶ)遺伝子だけがIPによりRI画像として検出される。遺伝子の中には微量な量しか発現しないこともあるので、FLA-3000 Gのような高感度のRI検出器が必要とされている。

その他IPの利用分野は幅広く、X線結晶構造解析、中性子ラジオグラフィ、半導体欠陥解析、電子顕微鏡応用システムなどに利用されている⁹⁾。

5. 今後の技術動向

前述したようにRIを標識することにより検出するマクロアレイ法に対し、蛍光色素を標識することにより発現遺伝子を検出するマイクロアレイ法が最近注目されている¹⁰⁾。数千種類のcDNAを数百μmの間隔で高密度にスポットしたスライドガラス上に細胞から発現した遺伝子をハイブリダイズさせる。遺伝子にはあらかじめ蛍光色素を標識しているため、レーザースキャナーにより発現した遺伝子の種類とその量を検出することができる。図12にレーザースキャナーの構成を示す。スキャナーには、532nmと635nmのレーザーが搭載され、2種類の蛍光色素で標識された2種類の細胞からの発現遺伝子の分布を読み取ることができる。光源から出たレーザー光は高N.A.のレンズL1に入射し、スライドガラス表面において約5μmのビームに絞られ、蛍光色素を励起する。発光した蛍光は、レンズL1で集光されPMTに向かう。PMTの前にはバンドパスフィルターが配置され、励起光をカットするとともに他方の色素からの蛍光をカットする。また、レンズL2によりスライドガラス面の像をアパチャー面に結像する共焦点光学系を採用しているため、周囲からの迷光をカットし、ノイズの少ない鮮明な画像が得られる。

6. 結 び

遺伝子の発現解析においてはレーザーキャナーによる検出技術が多く使われている。特にマクロアレイ法やマイクロアレイ法では今後さらに数多くの遺伝子が微量にスポットされることが予測され、高解像度で高感度の検出器が望まれており、そのための光学技術への期待は大きい。高性能 IP、高感度蛍光色素、高出力レーザー光源、精密レーザーキャニング技術を融合させ、遺伝子研究の発展にこれからも貢献していきたい。

文 献

- 1) A. Chrambach, M. J. Dunn and B. J. Radola: *Electronic Imaging of Electrophoretic Gels and Blots. Advances in Electrophoresis, Volume 6.* (VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1993)
- 2) 森 信文, 宮原諄二: “イメージングプレート; 広がる放射線検出器としての応用”, *ぶんせき*, **6** (1991) 411-416.
- 3) Y. Iwabuchi, N. Mori, K. Takahashi, T. Matsuda and S. Shionoya: “Mechanism of photostimulated luminescence process in BaFBr:Eu²⁺ phosphors,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, **33** (1994) 178-185.
- 4) 西川泰治, 平木敬三: 蛍光・りん光分析法 (共立出版株式会社, 1989) pp. 1-48.
- 5) 原田明憲, 岡崎洋二, 神山宏二: “MgO-LiNbO₃ ドメイン反転バルク SHG 結晶を用いた青, 緑色固体レーザーの特性”, *レーザー研究*, **26** (1998) 861-866.
- 6) 栗村 直: “第二高調波発生と分極反転”, *固体物理*, **29** (1994) 75-82.
- 7) P. Liang and A. B. Pardee: “Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction,” *Science*, **257** (1992) 967-971.
- 8) B. R. Jordan: “Large-scale expression measurement by hybridization methods: From high-density membranes to DNA chips,” *J. Biochem.*, **124** (1998) 251-258.
- 9) 宮原諄二: “イメージング・プレート—新しい二次元センサーとその応用”, *固体物理*, **21** (1986) 172-180.
- 10) 田代康介, 牟田 滋, 久原 哲: “マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析”, *実験医学*, **17** (1999) 61-65.

(1999年6月11日受理)