

高感度・高速分子イメージングへの展望

瀧口 義浩*・石田 一幸**

New Direction of Molecule Imaging Systems

Yoshihiro TAKIGUCHI* and Kazuyuki ISHIDA**

To realize molecule imaging, detectors have to be combined with a suitable microscope and an illumination system. Once the configuration is setup, the detectors must visualize single photon events without any noise and with a reasonable time frame. We have developed several new detection systems to explore a new direction of high speed, efficient and low noise molecule imaging which investigates molecular dynamics in living cells.

Key words: single molecule, imaging, CCD camera, photon counting, intelligent vision system

生体内における機能分子が生体をどう動かしているのかを解明するため¹⁾,あるいは,基板表面上に配置した新たな機能分子を用いた情報処理への応用²⁾においても,1つ1つの分子を見ながらその挙動を観測し,機能の変化を計測していかなければならない.分子イメージングには,以下にまとめる蛍光色素染色による顕微鏡ベースでの観測と,走査トンネル電子顕微鏡,原子間力顕微鏡,近接場光学顕微鏡などの探針型顕微鏡による直接観測と,ポジトロン放出トモグラフィ(PET)などのようなマーカー技術を介して検出する技術などが含まれている.本稿では,分子の構造を超高解像で観測するためのプローブ顕微鏡技術の最近の状況を眺めながら,二次元画像解析による分子イメージングの新たな展開に関して報告を行う.

1. 分子をみる

走査トンネル電子顕微鏡(STM)と光ファイバー型探針を用いることで,超高解像度のSTM分子イメージング³⁾と単一分子からのトンネル電子励起による発光⁴⁾を検出することが可能であるが,この超高解像STM技術は,生体に直接応用することが困難である.

そこで,高解像度の顕微鏡を用いて,生体中で蛍光マーカーを付加した分子の位置と挙動を観測する.蛍光を用いた分子イメージングには,いくつかの要素技術の発展が不可欠である.高い開口数(NA)を有する顕微鏡,エバネセント照明法,そして得られた分子からの信号を検出する

検出器,さらには得られたデータから必要な生体情報を取り出す画像解析技術⁵⁾である.船津ら^{6,7)}は,エバネセント照明を生体の観測に応用し,1つのブレイクスルーを与えた.さらに,目標の分子を見つけるための蛍光マーカー技術の発展も重要である.自己発光できる緑色蛍光タンパク(GFP)とカドミウム・セレンなどの微小粒子を用いた「量子ドット」発光体による蛍光マーカーの発見と量産により,見たいタンパク分子にこの蛍光マーカーを取り付けることで,単一分子の位置の特定を容易にした.図1には,マウスの細胞をアクリジン・オレンジで染色し,一般の落射照明による顕微鏡観測の場合と,エバネセント照明による観測における画像の差を示した.ここでは,後述の電子打ち込み型のCCDカメラを用いている.図の中央にそれぞれの照明の方法を示している.NAが1.2~1.4程度の液浸型高倍率の顕微鏡において,レンズの中央を通して試料を照明した落射照明では試料全体からの蛍光が映される.これに対し,対物レンズのエッジを通して照明をすることで,プレパラートのガラス面で照明光が全反射をおこし,試料側にエバネセント場が染み出し,この近距離の照明によってプレパラートの近傍の分子のみが観測されている.このエバネセント照明は,分子のさまざまな挙動を明らかにするのに多大な影響を与えた.

2. 高感度画像計測装置

分子イメージングでは,光検出器に求められる性能は,

* 浜松ホトニクス(株)中央研究所(〒434-8601 浜松市平口5000) E-mail: taki@crl.hpk.co.jp

** 浜松ホトニクス(株)システム事業部(〒431-3196 浜松市常光町812)

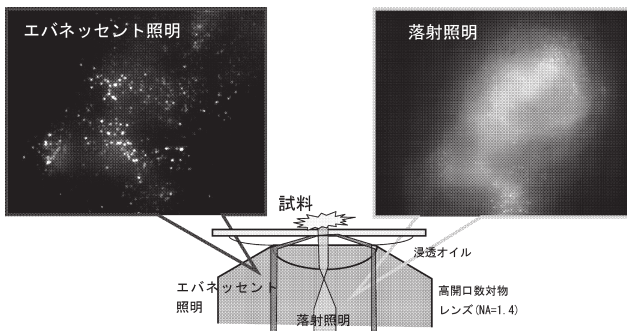


図1 マウスβ細胞株 MIN6 細胞の分泌顆粒を蛍光色素アクリジン・オレンジで染色し、これを筆者らの EB-CCD カメラで観測した。左図は、下図におけるエバネッセント照明における観測。右図は、落射照明における観測。

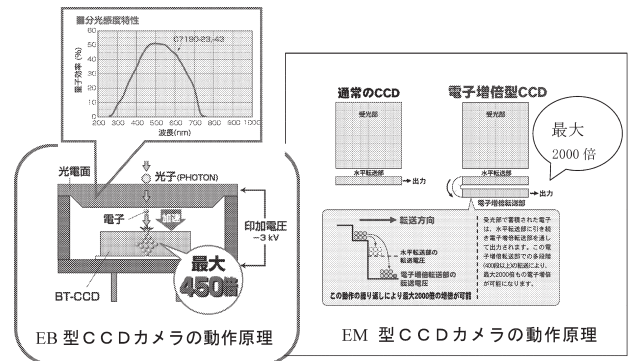


図2 電子打ち込み (EB) 型とその光電面感度および電子増倍 (EM) 型 CCD カメラの動作原理図。

高い量子効率 (光を電子に光電変換する効率) と、画面全体にわたる低雑音性能、さらには高速の読み出し速度である。筆者らは、このような検出技術への要求に対し、古くからある光電子増倍管の技術と固体素子の技術の融合を図り、新たな検出器の展開を目指している。

2.1 EB と EM 型 CCD カメラ

図2には、電子打ち込み型 (electron bombardment: EB) と電子増倍型 (electron multiply: EM) CCD カメラの動作原理を示している (浜松ホトニクス株式会社ホームページ参照: <http://jp.hamamatsu.com/>)。まず、左の図が、光電面と CCD カメラ・チップを真空容器に封入した EB-CCD である。光電面に入射する微弱な光を光電子に変換し真空中に放出させ、これを光電面と CCD チップの間に印加した高電圧で加速する。3 kV 程度の電圧で加速された電子は、背面照射 (BT) 型の CCD チップに入射し、短距離で 3 keV のエネルギーを放出し、1 個の光電子に対して最大平均 450 個の二次電子を生成する。この増倍された電子は拡散によって CCD の画素に入り、画像情報として逐次読み出しされることになる。その際、光電面の波長感度を選択することによって、さまざまな蛍光波長に対応は可能である。ここでは、ガリウム・ヒ素・リンからなる半導体光電面を用いた場合の波長感度分布も示している。500 nm の緑の領域が最も量子効率が高い光電面であり、入射した 2 個の光子のうち 1 個は電子に変換できる 50% の量子効率を達成している。

一方、EM-CCD カメラは、図2の右に示したように、CCD の電気信号出力部位に電子を増倍する構造を追加している。およそ 400 段の電子増倍構造部を有しており、1 段では、電子の増倍は 1~2% 程度しかないものの、400 段の増倍部を設けることで、最大 2000 倍の増倍率に達する。この固体電子増倍過程においては、通常のトランジスタによる増幅と異なり、増幅雑音が非常に低いことが特徴で

ある。この EM-CCD カメラでは、固体素子であることのメリットとして、入射光量に対する広い計測ダイナミックレンジを達成し、焼き付きもおこらないという特徴がある。さらには、感度の空間均一性も高く、1000×1000 の高解像度素子なども準備されている。

さて、図2に示した素子はいずれも CCD カメラであり、その動作原理から、電気信号の転送速度には制限があり、1 秒間に 30 フレーム画像以下の転送速度となっている。分子イメージングにおいて、分子の挙動が高速である場合には、この CCD カメラの観測速度が律則になる。

2.2 インテリジェント・ビジョン・システム

浜松ホトニクスでは、光コンピューターあるいはロボットの目として機能するインテリジェント・ビジョン (I.V.) システムの開発を、東京大学と共同で進めている。I.V.-システムは、個々の画素から並列に信号を取り出し、カメラ内の演算機能によりリアルタイムに演算を行うという並列読み出し・並列演算処理機能内蔵型の素子であり、画像を一度にコンピューターに取り込み、膨大な情報量をもつ高速画像をカメラ内演算機能で処理して、結果のみを出力することができる素子である。この I.V.-システムでは、1 画素を 3 分割して、そのうちの 2 つの信号出力を画像の縦方向と横方向の積算輝度プロファイル解析用に用いている⁸⁾。その結果、どの部分が輝度として高いのかを毎秒 1600 フレームの速度で解析でき、その輝度分布に合わせて画像の部分読み出し (全体像から局所を切り出して、その部分のみの画像計測を行う方法) を行い、より高速な画像のトラッキングを可能としている。例えば、512×512 画素の全画素読み出しモードでは 250 fps のフレーム転送速度であるが、128×128 画素の部分読み出しモードでは 2400 fps の速度が実現されており、読み出し位置を 1 フレームごとに制御できる。その高速性から、すでにロボットの目としての応用に成功し、ロボットのもつ高速な機械的

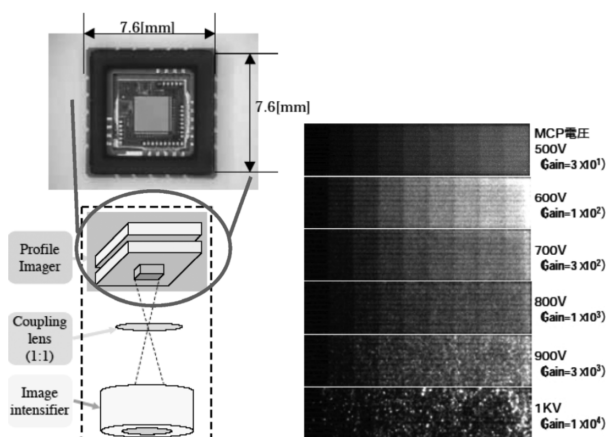


図3 画像増倍管とインテリジェント・ビジョン・システムを用いた高速画像化装置。

なアクチュエーターの速度に合わせた画像処理を可能としている⁹⁾ (「ビジョンチップ応用の新展開」)。時速 160 km の野球のボールをバットで打ち返すことも可能なほどの、ボールの認識とその軌跡解析性能を誇っている。

当社は、この I.V.-システムを画像増倍管 (I.I.) と組み合わせることで、微弱な発光対象の高速トラッキングを達成しようと考えている¹⁰⁾。

図 3 には、I.I. と I.V.-システムをレンズ結合した微弱光の画像化装置の構成を示している。この系を用いて、I.I. における電子増倍部であるマイクロ・チャンネル・プレートへの印加電圧を調整して電子増倍率 (ゲイン) を変えたときの、グレースケール像の様子を図の右に示した。ゲインが高い領域では、光子の統計ゆらぎである量子雑音が支配的になってくるのがわかる。このような高感度な I.I. の特徴と、I.V.-システムの特徴である高速性を併用することで、例えば、図 3 の下に示した高速で移動する車のおもちゃのナンバープレートのトラッキングなどを容易に観測できることをデモしている。分子の高速な移動のトラッキン

グや高速フォトンカウンティング応用が可能になるものと思われる。

以上のように、分子イメージングは、多くの新たな技術と素晴らしいひらめきによる手法の開拓によって、生体機能や情報処理のための分子観測とそのダイナミクスの解明に力を発揮しつつある。生体分子のダイナミクスのひとつであるエネルギー移動の機構も、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法と最近開発を進めた冷却型 3 管式の CCD とを組み合わせることで、明らかになりつつある。生体は何億もの細胞が共同作業することで一定の生命活動を保っているが、その細胞内の分子も生命活動を実際に担う重要なパーツであり、その動きを詳細に、かつ高速に認識することで、生命活動そのものの可視化ができるはずである。筆者らの光検出技術は、微力ではあるが、その解明に役立てれば幸いである。検出器の高感度化、高速化、高解像度化の努力は、これからもさらに続けていくつもりである。

文 献

- 1) H. R. Herschmen: Science, **302** (2003) 605.
- 2) T. Yokoyama, S. Yokoyama, T. Kamikado, Y. Okuno and S. Mashiko: Nature, **413** (2001) 619.
- 3) T. Yokoyama, T. Kamikado, S. Yokoyama and S. Mashiko: J. Chem. Phys., **121** (2004) 11993.
- 4) T. Yokoyama and Y. Takiguchi: Surf. Sci., **1163** (2001) 482-485.
- 5) A. Yildiz, M. Tomishige, R. D. Vale and P. R. Selvin: Science, **300** (2003) 2061.
- 6) 船津高志: 応用物理学会誌, **72** (2003) 727.
- 7) 船津高志, 上野太郎: 光学, **34** (2005) 500.
- 8) 松井克宜, 杉山行信, 井堀 篤, 豊田晴義, 向坂直久, 水野誠一郎: 第 10 回画像センシングシンポジウム講演予稿集, D-2 (2004) p. 241.
- 9) 石川正俊, 小室 孝: 電子情報通信学会技術研究報告, ICD2003-43 (2003) pp. 1-6.
- 10) 豊田晴義, 宅見宗則, 向坂直久, 中村和浩, 杉山行信, 水野誠一郎: 光学シンポジウム講演予稿集 (講演番号 9) (2005).

(2005 年 11 月 22 日受理)