

## 蛍光検出基礎知識 ～ 蛍光検出システム

Key words: 励起光源、レーザー、光路、集光、蛍光フィルター、検出、増幅、PMT、CCD

はじめに

ライフサイエンス分野の研究で用いる蛍光検出システムは大きく分けてカメラタイプとスキャナータイプに分けられます(表1)。カメラタイプとスキャナータイプでは性質が異なるために得意とするアプリケーションも異なります。ここでは、それぞれのシステムの構成および性質の違いについてご紹介します。

システムの構成

典型的な蛍光検出システムの概略図を図1に示します。すべての蛍光検出システムには次の要素によって成り立っています。

- 励起光源 : 蛍光を励起させる光を発する
- 集光部位 : レンズなどを用いて蛍光を集める
- 蛍光フィルター : 励起光やバックグラウンドを取り除く
- 検出、増幅、デジタル化部位 : 蛍光を検出し、解析可能なデジタルデータに変換する

励起光源

通常、蛍光を検出する際には単一波長の光源(励起光)が用いられます。よけいな波長の光を含むと目的以外の物質が励起されてバックグラウンド上昇の原因となり、高解像度の画像を得ることが難しくなるからです。

蛍光検出システムには光源としてランプやレーザーなどが搭載されています。ランプにはUVランプやキセノンランプなどが

表1.カメラタイプとスキャナータイプの違い

	スキャナータイプ	カメラタイプ
励起	レーザー	ランプ
検出	PMT	CCD
露光時間	一定	可変
解像度	固定	サンプルサイズに依存

あります。ランプは広い波長域をもつ光を四方八方に発します。そのため、フィルターを用いて単色光を作り出します。

一方、レーザーは単色(一波長)の光が一方向に発せられます(図2)。そのため、単体で光源として用いることができます。レーザーから発せられる光はエネルギー密度が大きいため高解像度の画像を得ることができます。

ランプは、主に蛍光光度計やカメラタイプの検出システムで用いられています。蛍光スキャナーは励起光源にレーザー光を採用しています。

集光部位

放出された蛍光は四方八方に散乱しますが、一般的な検出システムではサンプルの一方向から集光します。このため、集光部位で効率的に集光することが重要となります。

カメラタイプのシステムではサンプルから発生した蛍光を集光するためにレンズが用いられています。レンズは通常ズーム機能を持っているため異なる大きさのサンプルも同じ位置で検出

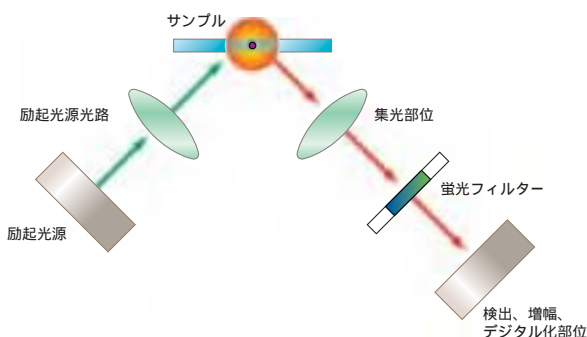


図1. 典型的な蛍光検出システムの概略図

励起光源から発せられた光が光路を通ってサンプルに照射されます。サンプルが励起され、発せられた光はレンズ等の集光部位、蛍光フィルターを通じて検出部位に到達します。

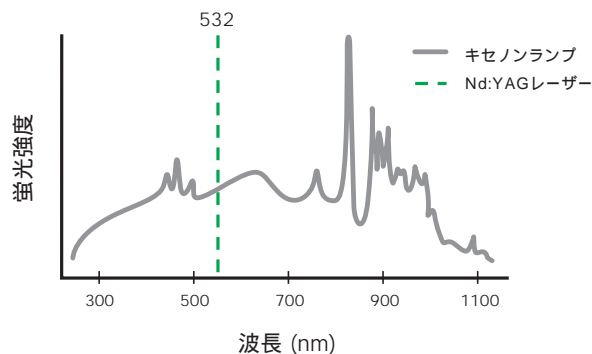


図2. キセノンランプとNd:YAGレーザーの波長スペクトル

キセノンランプは広い波長域にわたって光を発するのに対し、Nd:YAGレーザーは単波長の光を発します。

を行うことができます。取り込む画像のサイズが大きくなるほどレンズの中心と外側での入射角度の違いによる影響を受けやすくなります。サンプルの端からの光は画像が大きくなればなるほどレンズの中心から遠くなるからです(1)。このようなレンズの問題を改善するため、最近のCCDカメラシステムではソフトウェアのフラットフィールド補正機能によりサンプルシグナルの均一化が行われています。

スキャナーシステムの集光方法は励起方式によって変わります。モーターのついたミラー(ガルバノミラー)を用いたタイプではレーザーを左右に素早く振って励起を行います(図3)。集光シリンダーや光ファイバー束をサンプルの蛍光が放出される真下に設置し、各ピクセル位置情報にかかわらず集光します。効率是非常に良いシステムですが、一部に非常に強いシグナルが存在すると、その強いシグナルに起因するブリーディング現象により隣接するサンプルエリアの蛍光シグナルの数値化を正確に行うことができなくなります(図4)。

そこで最近では励起光源自体を前後左右に動かす方式が使われています。この方法の場合、蛍光を一点一点直接集光するため前述のブリーディング現象を起こしません(図5)。

励起光により発せられた蛍光を効率よく集光する為には大きな開口数(NA)を持つレンズが必要です。NAはレンズが集光できる光の垂体の角度と直接関係するので、大きなNAであれば解像度・シグナル強度とも高くなります(2)。また、この方

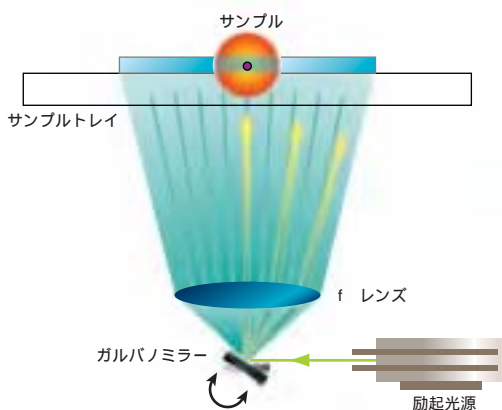


図3. ガルバノミラー方式の模式図

モーターのついたミラーの角度を変えて横方向に励起光を照射します。また、ガルバノミラー部を縦方向に動かすかサンプル自体を縦方向に動かすことで全域に照射します。f レンズはサンプルにレーザーがあたる角度の差を最小限に抑えます。

式では厚みの薄いサンプルの蛍光を検出する際に共焦点の光学系を利用することができます(図6)。この構造では焦点からはずれたバックグラウンドとなるシグナルやノイズを排除し、必要なサンプル光のみを集光することにより感度を上げることができます。

#### 蛍光フィルター

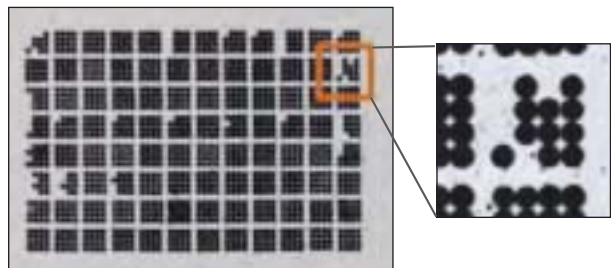
サンプル以外からの反射あるいは散乱レーザー光を完全に排除するために集光路に蛍光フィルターを挿入します。また、目的に応じてカットオフフィルターやバンドパスフィルターを使用することで、サンプルの蛍光を効率よく検出することができます(3)。

#### 検出、増幅、デジタル化部位

蛍光の検出と数値化にはCCD(Charge-coupled device)あるいは光電子増倍管(Photo Multiplier Tube:PMT)が使用されます。どちらも蛍光物質から放出された光子エネルギーを電子エネルギーに変換し、測定可能なシグナルが作り出されます。

CCDは主にカメラタイプで用いられます(図7)。平面上に整列したCCD素子ごとに光エネルギーを取り込み、電子に変換します。変換される電子量は取り込み(露出)時間中に発せられた光子量の積で示されます。したがって露出時間を変化させることで検出感度を上げることができます。また、CCDの冷

#### a) 共焦点光学系システムを用いて検出



#### b) ガルバノミラー方式を用いて検出

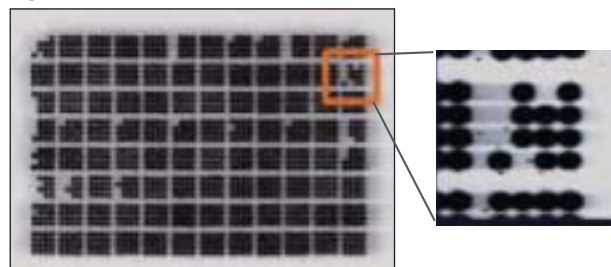


図4. ブリーディング現象

マクロアレイのメンブレンを検出した画像を示します。

a) 共焦点の光学系を用いた場合。スポットの境界線が鮮明です。

b) ガルバノミラーを用いた場合。蛍光の強い部分に影響され、筋状の線が検出されています。

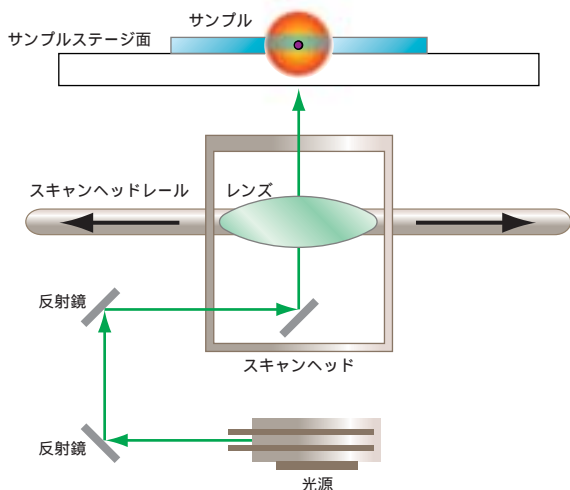


図5. 励起光源を前後左右に動かさず励起方法

スキャンヘッド可動式システムと呼ばれ、ミラーとレンズを含むスキャンヘッド部が前後左右に動くことでサンプルの全域に励起光を照射します。

却機能は電気的なノイズを減少させ、検出感度を改善することができます。

PMTは主にスキャナータイプのシステムに採用されています。PMTに取り込まれた光は $10^6 \sim 10^7$ 倍に増幅されます。これにより光子の数に比例した電気信号を測定することができます。一般的な蛍光スキャナーで使用されているPMTで使用可能な波長域は300～700 nmです。

参考文献

1. Smith, W. J., in *Modern Optical Engineering*, McGraw-Hill, Boston, MA, pp.135-139
2. Smith, W. J., in *Modern Optical Engineering*, McGraw-Hill, Boston, MA, pp.142-145
3. 蛍光アプリケーション 蛍光検出の基礎知識 , GE Healthcare, code number 71-2116-91, 2003

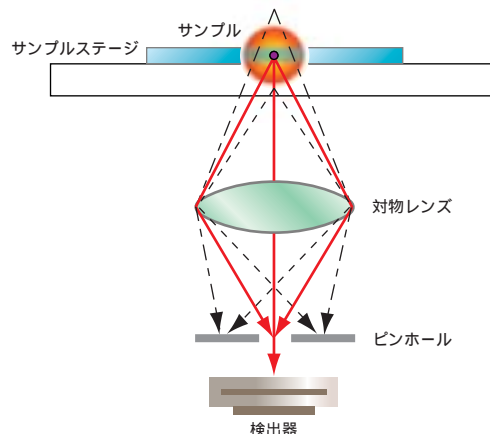


図6. 共焦点光学系の模式図

サンプル光は対物レンズにより集光され、共焦点に設置されたピンホールを通ります。焦点から発せられるサンプル光( ——— )は狭いピンホールを通り検出装置に集められます。焦点以外から発せられる光( - - - - )はピンホールによって排除されます。

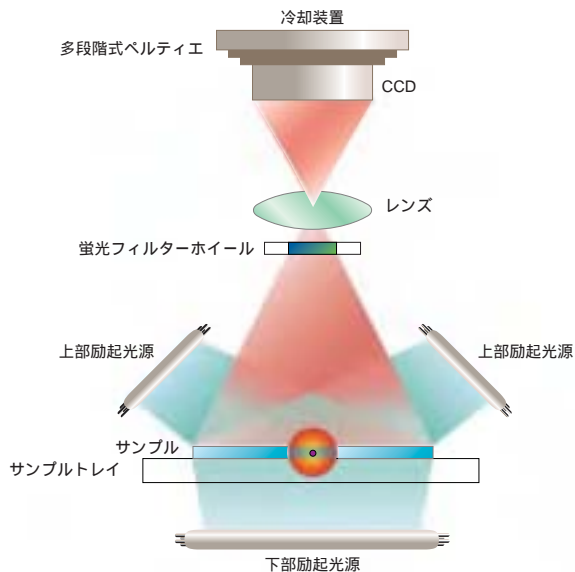


図7. カメラタイプのシステム模式図

サンプル上部あるいは下部から励起光を照射して、発せられた蛍光はレンズを通して集光され、CCDで検出されます。レンズを上下に動かすことで焦点を合わせます。