

蛍光検出基礎知識 ~ 検出システムのパフォーマンス

Keywords : 解像度、感度、直線性（リニアダイナミックレンジ）、均一性（ユニフォーミティー）

はじめに

画像の精度は、検出するシステムの性能に左右されます。その性能は、解像度、感度などで示されています。これらの用語を正確に把握し、性能を活かした検出と解析を行うことはより精度の高い解析につながる近道となります。本報では、バイオサイエンスの画像検出システムにおいて重要な基準である下記の4つの項目について解説し、アプリケーションにあったパラメーターの選択を検証します。

解像度

感度

直線性（リニアダイナミックレンジ）

均一性（ユニフォーミティー）

この4つは蛍光以外の検出系（たとえば放射性同位体標識の検出等）においても重要なポイントになります。

解像度

データの解像度は、1. 一定単位の長さまたは面でどれだけのデータ数があるかを示す空間解像度、2. 検出されたシグナルの強度をどれだけ細かく分けることができるかを示す階調（振幅数）の2つに依存します。

1. 空間解像度

蛍光検出目的で使用するシステムの場合、空間解像度は一定の単位の長さあるいは面積に対するデータポイントの数で表します。

解像度の基準として、しばしばピクセルが用いられますが、厳密にはピクセルサイズ = 空間解像度ではありません。すなわち、ピクセルサイズが100 μm の画像が必ずしも100 μm の空間解像度をもつわけではありません。ピクセルサイズは通常、対象領域（正方形）の一辺の長さで表され、サンプリング解像度に依存して変化します。サンプリング解像度の一般的基準であるNyquist基準（サンプリングされているシグナルの最高周波数の2倍以上でサンプリングレートを決定）に従えば、画像内で解析できるピクセル（最小対象物）はサンプリング間隔の2倍以上の大きさである必要があります（1）。つまり、100 μm の

サンプルを解析するためには少なくとも50 μm のサンプリング間隔が必要になります。

画像データを精密に解析するためには、より細かいピクセルが必要となります。ただし、ピクセルを細かくし、精密な解析データを得た場合、ファイルサイズが大きくなります。たとえば、ピクセルサイズを1/2にした場合、画像データのファイルサイズは4倍になります（図1a）。

一般的なアガロースゲルの電気泳動解析などでは、検出対象であるバンドの大きさが数mm単位になるため、ピクセルサイズ200 ~ 100 μm で十分な定量解析が可能です。これ以上の解像度を要求しても、測定時間が長くなり、ファイルサイズも大きくなって扱いづらくなるだけで、数値化、定量するうえでは大きな改善が得られません（図1b）。

したがって、目的のサンプルの大きさに適したピクセルサイズで画像を取り込むことが、実験をスムーズに行うためのポイントになります。

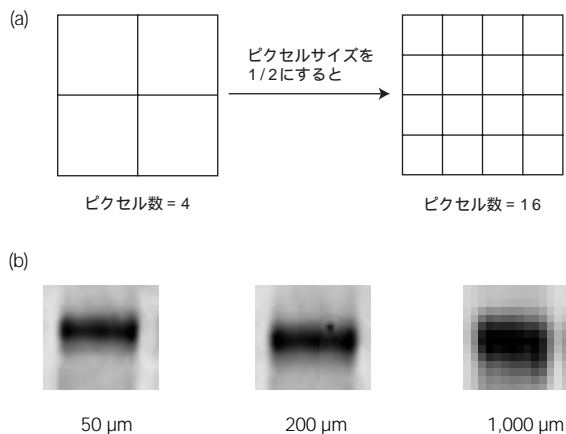


図1. ピクセルサイズとデータ量の関係

- (a) 1ピクセルは通常、対象領域（正方形）の一辺の長さで表示されます。同一面積に対してピクセルサイズを1/2にすると、ピクセル数は全体で4倍になります。ピクセルのサイズが変わっても1ピクセルあたりのデータ量は変わらないため、同一面積のデータサイズはピクセルサイズが1/2で4倍、ピクセルサイズが1/4で16倍になります。
- (b) ピクセルサイズを変えて同一のゲルをスキャンした結果です（イメージの一部を拡大）。

2. 振幅数 (階調)

振幅数 (階調) は画像データがどれだけ細かいシグナル強度の単位で分割されているかを示す基準です。通常、デジタル化された画像データの階調はbit数で表示されます。

バイオサイエンスの分野では多くの場合、階調が8~16 bitの画像データが用いられます。bitは二進法なので、1 bit = 2階調、8 bit = 256(2⁸)階調、16 bit = 65,536 (2¹⁶) 階調になります (図2)。

感度 (検出限界)

感度 (検出限界) はその機器により検出できるシグナルの最小値を示します。

感度の高いシステムは微量サンプル検出に有用です。ただし、バイオサイエンス分野での画像解析の場合、サンプルの支持体やバッファー、埃が原因となるバックグラウンドなどの要因により機器本来の感度を維持することは困難です。このため、実

際の画像解析の感度基準として、S/N比 (シグナル/ノイズ比) がよく用いられます。得られたシグナルからバックグラウンドノイズを差し引いた本来検出したいサンプルシグナルが、バックグラウンドシグナルのばらつきの何倍になるのかを算出した数値です。S/N比が高いほど計測データとしては信頼度が高くなります。

直線性 (リニアダイナミックレンジ)

直線性とは、サンプルに対応するシステムのシグナル応答が順序正しく正確に行われた結果、定量的データの使用可能な範囲がどれくらいあるかを示すものです。リニアダイナミックレンジが広ければ、シグナルの強弱によらず一度に検出できる範囲が拡大します。

現在使用されている蛍光色素自体の持つダイナミックレンジは10⁴~10⁵が一般的です。レーザースキャナーは10⁴~10⁵の範囲の直線性を持っており、ほとんどすべての蛍光色素自体のダイナミックレンジを機器の測定範囲内に納めることができます。

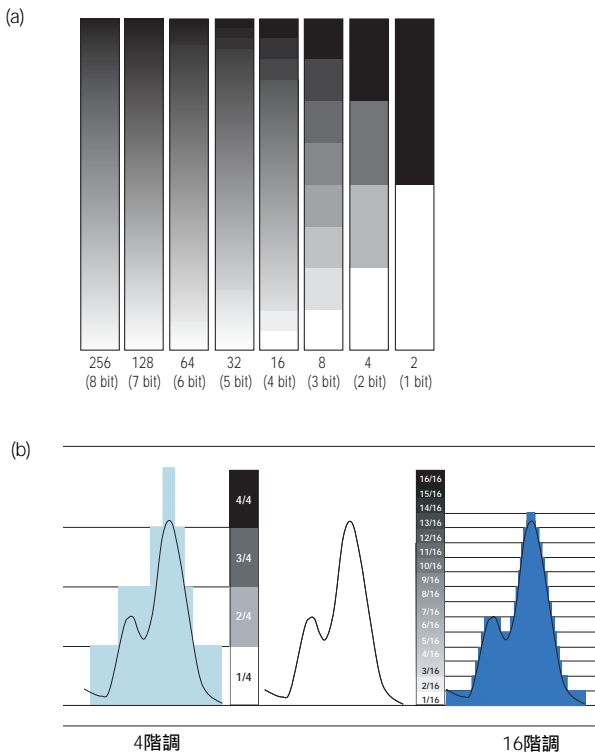


図2. 階調数の変更

- (a) 白色から黒色まで一定の濃度変化を異なる階調数で表示しました。図は左から256(8 bit)、128(7 bit)、64(6 bit)、32(5 bit)、16(4 bit)、8(3 bit)、4(2 bit)、2(1 bit)。階調数が多いほど、より細かい濃度の分類が可能になり、一定色調に対する分解能が高くなります。
- (b) 異なる階調でプロット (中央) を表示しました。階調が低いと (左) 表示がかなり粗くなり、図中央の波形が正確に検出できなくなります。階調を細かくしていくと、波形を描くことができます (右)

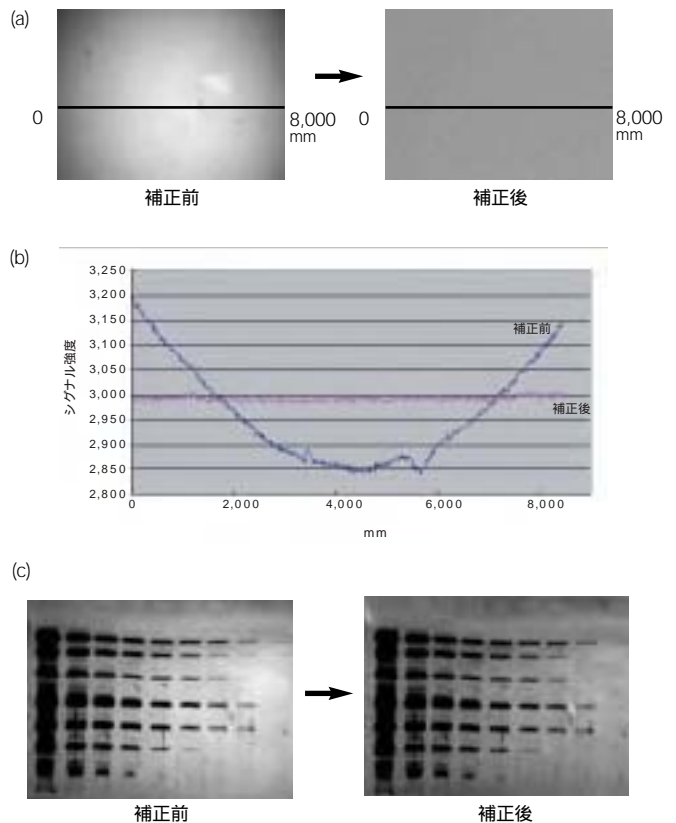


図3. ソフトウェアによる画像補正

- (a) レンズの収差により、サンプル中央部位が端よりも明るく検出されます。ソフトウェア上で補正しシグナル強度を一定にすることができます。
- (b) (a)をグラフ化したもの。補正前後のイメージについて0~8,000 mmの範囲でシグナル強度の違いをプロットしました。
- (c) 実際にゲルイメージを補正した場合の例。

均一性 (ユニフォーミティー)

均一性は、画像解析の測定範囲全域において定量性のある信頼できるデータを得るために重要です。画像解析を行う際に一回の画像取込みで、一定のシグナルがどの測定域内でも基底の範囲内のばらつきをもって画像が取り込めることを示します。

CCDカメラの場合、構造上、レンズによる収差が避けられないため、サンプルの中央部分と外周部にシグナルの強度にムラが出ます。最近のCCDカメラタイプの検出システムではこの歪みをソフトウェアにより補正する機能が多く用いられています(図3)。

また、蛍光スキャナーの場合、従来のレーザーを振って励起光をサンプルに照射する方式(図4)では画像データの均一性を得るのにレーザーを振る範囲の横幅を20 cm程度に抑える必要がありました。最近のスキャナーではスキャンヘッド可動方式が用いられているため、取込み範囲も大きくすることができ、かつ、検出範囲のどのエリアにおいても、均一性の高いデータを取得することが可能です(図5)。

参考文献

1. Sokkg, D.A. *et al.*, *Principles of Instrumental Analysis*, Harcourt Brace, Philadelphia, 108 (1998)

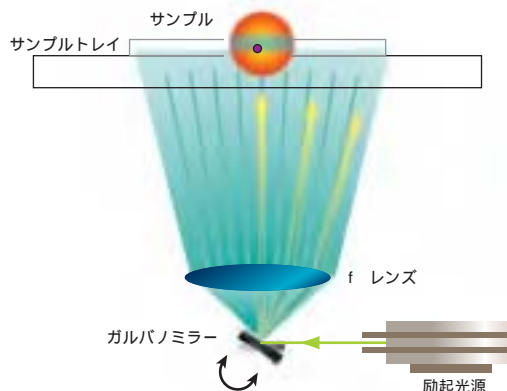


図4. 従来の蛍光スキャナー(ガルバノミラー方式)のメカニズム

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。

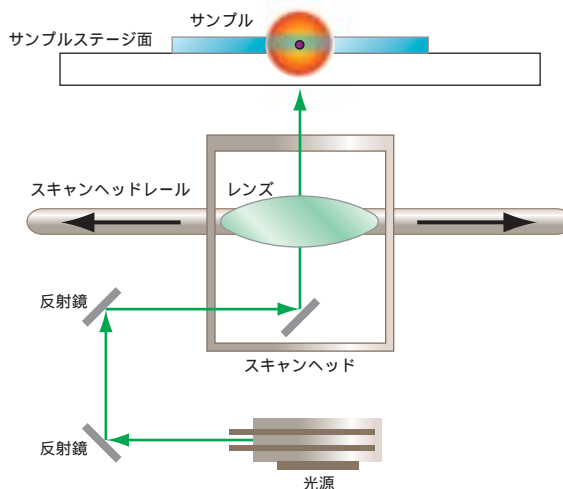


図5. 励起光源を前後左右に動かす励起方法*

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。

* 蛍光検出システムの詳細については、バイオダイレクトメール9月号で紹介した蛍光検出基礎知識 をご参照ください。