

## 蛍光検出用語集2（蛍光検出基礎知識 ～ より）

milestoneでは、これまで蛍光画像解析基礎講座と題して蛍光画像解析に関する基本的な知識・考え方をご紹介してまいりました。今回は、蛍光検出用語集1につづき、これまでの基礎講座の中から蛍光画像解析のポイントとなる用語をまとめてご紹介します。

### 用語一覧

励起光源 (excitation source) .....	1
集光部位 (light collection optics) .....	1
フラットフィールド補正 (flatfield compensation) .....	1
ガルバノミラー (galvanometer mirror) .....	1
ブリーディング現象 (bleeding) .....	1
開口数 (NA; Numerical Aperture) .....	2
収差 (aberration) .....	2
CCD (Charged Coupled Device) .....	2
空間解像度 (spatial resolution) .....	2
ピクセル (pixel) .....	2
振幅数 (階調; digital resolution) .....	2
リニアダイナミックレンジ (LDR; linear dynamic range、直線性) ...	3
均一性 (uniformity) .....	3
感度 (LOD; Limit of Detection、検出限界) .	3
S/N比 (シグナル/ノイズ比) .....	3
バックグラウンドノイズ (background noise) .....	3
スパイクノイズ (spike noise) .....	4

### 励起光源 (excitation source)

蛍光物質に当てる励起光の光源を示します。通常、蛍光を検出するには単一波長の光源（励起光）が用いられます。その他の波長の光が含まれると、目的以外の物質が励起されてバック

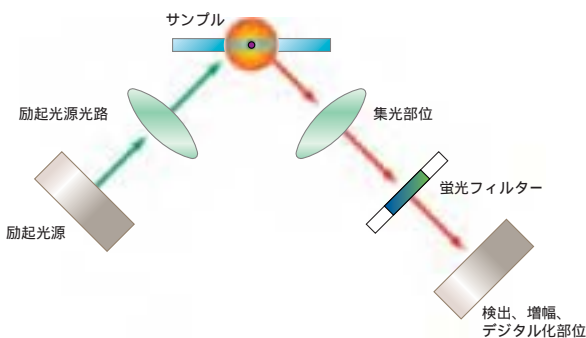


図1. 典型的な蛍光検出システムの概略図

励起光源から発せられた光が光路を通し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して検出部位に到達します。

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困難になります（図1）。

### 集光部位 (light collection optics)

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一方向に集光します。このため、集光部位で効率的に集光することが重要です。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ます。レンズは通常ズーム機能を持っているため、サンプルの大きさが異なっても検出部位の位置を動かさずに検出を行うことができます。

### フラットフィールド補正 (flatfield compensation)

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。画像が大きくなるにつれてサンプルの端からの光がレンズの中心から遠くなるのが原因です。このようなレンズの問題を改善するために、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。

### ガルバノミラー (galvanometer mirror)

蛍光スキャナーの取り込み方式の一つがガルバノミラーを用いた方式です。この方式では、モーターのついたミラー（ガルバノミラー）によりレーザーを左右に素早く振って励起を行います。サンプルの蛍光が放出される真下に集光シリンダーや光ファイバー束を設置し、各ピクセル位置情報にかかわらず集光します（図2）。

### ブリーディング現象 (bleeding)

ガルバノミラーを用いた励起方式は非常に効率の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、画像を取り込む際にその強いシグナルに起因する影が生じる場合があります。これをブリーディング現象と呼びます。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。

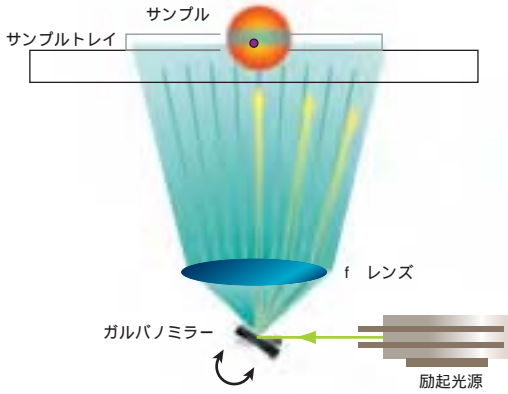


図2. ガルバノミラー方式の模式図

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レーザーを照射します。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。

### 開口数 (NA ; Numerical Aperture)

開口数はレンズの光学特性を示す指標として広く用いられているパラメーターです。開口数とは光学系に収差が無い場合の集光限界を示す値で、下記のように定義されます。

$$A = N \sin(\theta)$$

= 光軸上の像からレンズの有効径をのぞき込んだ半角  
N = 媒体の屈折率 (空気中の場合、N = 1)

励起光により発せられた蛍光を効率よく集光するためには大きな開口数 (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し、大きなNAであれば解像度・シグナル強度ともに高くなります (図3)。

### 収差 (aberration)

レンズや鏡により屈折した光を集束させる場合、厳密にはレンズによる歪みが生じています。これを収差と呼びます。バイオサイエンスで用いられるカメラタイプ画像解析装置の場合、多くの場合球面を持つレンズが使われるため球面収差が生じます。球面収差の場合、レンズの辺縁に近くを通る光は中央を通る光よりもレンズに近い点で焦点を結び、辺縁と中央の光の屈折率の違いは像を歪めます。これをディストーション(歪曲収差)と呼びます。

### CCD (Charged Coupled Device)

画像収集のために用いられる感光性チップのことです。CCDはアナログセンサーであり、取り込んだアナログ信号はコンバーターを用いてデジタル信号に変換されます。

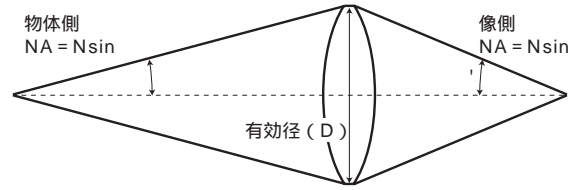


図3. NAの定義 (文献2より)

### 空間解像度 (spatial resolution)

蛍光を検出するシステムで用いられ、解像度を示します。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されます。解像度の基準としてピクセルサイズが用いられますが、厳密にはピクセルサイズ = 空間解像度ではありません。

### ピクセル (pixel)

デジタル画像を構成する最小単位を示します。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。ピクセルサイズを小さくして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。例えば、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4)。

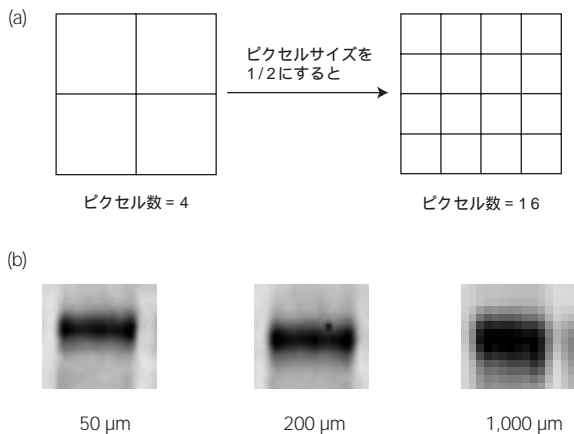
### 振幅数 (階調 ; digital resolution)

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5)。

### リニアダイナミックレンジ

(LDR ; linear dynamic range、直線性)

定量性のあるデータの範囲を示します。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 $10^2 \sim 10^4$ が一般的です。レーザースキャナーは $10^4 \sim 10^5$ の範囲のリニアダイナミックレンジを持っており、ほとんどすべての蛍光色素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4. 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）。

#### 均一性（uniformity）

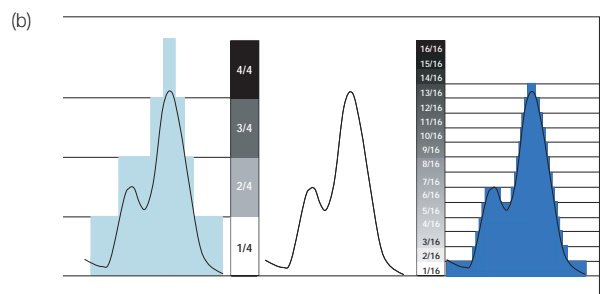
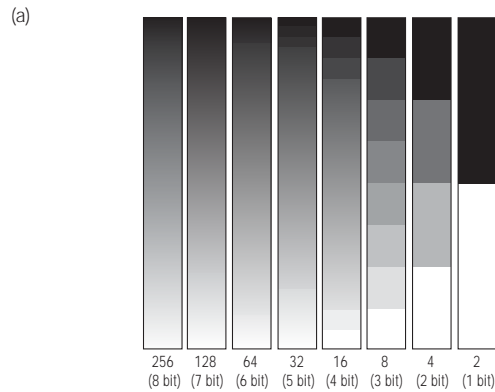
均一性は、画像解析の測定範囲全域において定量性のある信頼できるデータを得るために重要です。画像取込みの際、測定域内において一定のシグナルが基底範囲内のばらつきにて取り込めることを示します。

#### 感度（LOD；Limit of Detection、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、埃が原因のバックグラウンドなどにより機器本来の感度を維持することは困難です。

#### S/N比（signal / noise）

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。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。そのため、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。



**図5. 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）

#### バックグラウンドノイズ（background noise）

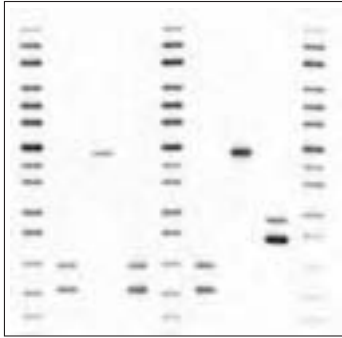
サンプルの支持体やバッファー、埃、夾雑物などに由来する蛍光をバックグラウンドノイズといいます。ほとんどの画像解析ソフトウェアでは測定時にバックグラウンド補正を行うことを推奨しています。バックグラウンドの性質は使用する蛍光試薬やサンプルの支持体（ゲル、メンブレン、マイクロタイタープレート等）、サンプル自体の性質等、さまざまな要因により変化が、通常下記のように分類することができます（図6）。

画像全体に均一なバックグラウンド（図6a）

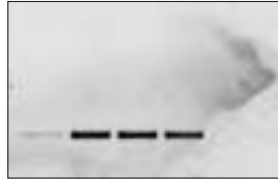
画像の一部に不均一なバックグラウンド（図6b）

スパイクノイズあるいはあるピクセルに限り高いシグナル強度を持ったバックグラウンド（図6c）

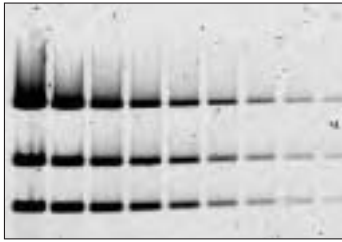
レーン毎に異なるバックグラウンド（図6d）



(a) 均一



(b) 不均一



(c) スパイクノイズ



(d) レーン毎に不均一

### スパイクノイズ (spike noise)

スパイクノイズとは2～3ピクセルのみに現れたノイズを示します。スパイクノイズは、微細なホコリや飛沫などに由来するほか、何らかの原因により検出された電気的なノイズにより現れることもあります。

### 参考文献

- 1) 岸川利郎 (2002), 『ユーザーエンジニアのための光学入門』 オプトロニクス社
- 2) 永田信一 (2002), 『図解 レンズがわかる本』 日本実業出版社
- 3) 宮島龍興 (1987), 『物理小事典 第3版』 三省堂
- 4) 『Fluorescence Imaging 蛍光画像解析のすべて』 GE Healthcare. Code Number 72-HB03-01, 2001

図6. バックグラウンドの分類

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073  
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン  
TEL : 03-5331-9336 FAX : 03-5331-9370  
e-mail : Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。