超高速バイオナノスコープ*

Ultra-high-speed Bionanoscope

江藤剛治**

Takeharu ETOH

Key words bionanoscope, high-speed camera, isis

1. 概要

「超高速バイオナノスコープ」は、時間的にも空間的にもナノオーダーの分解能で生物や生命現象を動画観察するためのビデオ顕微鏡である。具体的には時間分解能が 100 ns (1 000 万コマ/秒相当)、空間分解能が 500 nm 以下を目標にしている。

実際には時空間分解能よりももっと大きな制約がある。微小なものの高速撮影を行う場合には、撮影機器の撮影速度に余裕があっても、感度や照明が不足するために、撮影速度をある程度以上上げることができないことが多い。

例えば、倍率を 10 倍に上げると、同じ運動であっても視野内のみかけの速度は 10 倍となり、撮影速度を 10 倍に上げる必要がある。露光時間が 1/10 になるので、10 倍の感度、もしくは照明が必要になる。また撮像素子の 1 個の画素が見ている面積は、1/100 になるので、そこから反射、もしくは透過してくる光量も 1/100 になる。従って、倍率を 10 倍にすると、1 000 倍の感度または照明強度が必要になる。実際には、光軸方向（深さ方向）にも、焦点深度が浅くなるので、顕微鏡撮影では、倍率を M とすると、 $M^3 \sim M^4$ 倍の感度や照明強度が必要になる。例えば光学顕微鏡の対物レンズの倍率を 100 倍とし、これを M に代入すると、100 万～10 億倍の感度または照明強度が必要になる。「超高速『バイオ』ナノスコープ」の開発においては、この制約が最も大きな課題となる。

最高 100 万コマ/秒の撮影速度を持つビデオカメラは 2001 年に筆者が開発し¹⁾、(株)島津製作所が市販している。また、これを 30 万画素のカラーカメラにしたものは NHK の科学番組やスポーツ番組で使われている。一方、光子計数感度の撮影機器も開発されている。

超高速バイオナノスコープは、(1) この 2 つの条件、すなわち光子計数感度に近い超高感度と超高速を併せ持つビデオカメラと、(2) その性能を最も効率良く発揮させる生物顕微鏡システムからなる。

開発中のカメラの感度は、すでに開発した 100 万コマ/秒のビデオカメラの 100 倍以上になる。このようにカメラの感度を上げるだけでは感度、もしくは光量不足という課題を乗り越えることは不可能である。プロジェクトでは、カメラ、顕微鏡、照明装置、制御装置、観察手段、解析手段を総合的に開発することにより、感度・光量不足という最大の課題を解決するよう努力している。

それでは具体的にどのような撮影対象が考えられるのだろうか？

例えば動物の神経細胞中の信号の伝達速度は 100 m/秒程度といわれている。これを 1 000 万コマ/秒の撮影速度で撮影すると、1 コマで 10 μ m 進む。このように、生体中には超高速ビデオ撮影でなければ観察できない様々の現象が内在しているはずである。

以下では「超高速バイオナノスコープ」の機能と、それを達成するための技術について概説する。

最も重要な開発課題であるカメラの目標性能は表 1 の通りである。

2. PC-ISIS

—光子計数感度に近い感度を持つ超高速撮像素子—

2.1 特徴

カメラの最も重要な要素は目の部分に当たる撮像素子である。開発中の撮像素子は ISIS (後述)、CCM (同左)、裏面照射、冷却という 4 つの技術を組合せたものである。

表 1 カメラの目標性能

撮影速度	1 000 万コマ/秒
撮影枚数	120 枚
画素数	20 万画素
感度	10 フォトン/画素
ダイナミックレンジ	12 ビット
感度波長	350 ～ 650 nm

*原稿受付 平成 18 年 9 月 4 日

**近畿大学理工学部 (東大阪市小若江 3-4-1)

江藤剛治

大阪大学大学院工学研究科 昭和 48 年単位修得退学、工学博士。

研究内容：①高速ビデオカメラの開発、②都市の水問題、③流れの可視化計測、④生物環境タイムカプセル

図1 ISISの構造とパッケージ

2.2 超高速撮影とISIS

超高速撮影はISIS (In-situ Storage Image Sensor, 画素周辺記録型撮像素子) という構造により実現する。各画素が120個のメモリを備えている。全部の画素で一斉に並列で撮影された画像信号を記録することにより超高速連続撮影を実現している。例えば、20万画素であれば、20万並列の記録操作により、通常の撮像素子の20万倍の撮影速度を達成することができる。

ISISの概念を示す図と、実際のセンサをパッケージしたものの写真を図1に示す。大きなフォトダイオードの下から直線的にCCDを延ばし、画像信号メモリとした。CCDメモリの末端にはドレーンを設けている。この組合せと、読み出しCCDを基本的なセットとして平面内にうまくはめ込んだ。うまくはめ込むために、結果的に画素軸(フォトダイオードの中心を結ぶ格子)はCCD軸に対して少し斜めになった。従ってチップを少し回転させてパッケージした。

これらの構造と、実現できた機能との関係を下記に示す。

- (1) 超高速連続撮影：直線CCDという非常に単純で良質のメモリの全画素への組込み
- (2) 高感度：比較的大きな開口率
- (3) 連続上書き機能：ドレーンからの古い信号の連続的な排出
- (4) 正方形格子画素配列：直線CCDメモリに対する斜めの画素配置

超高速撮影においては現象生起と同期した撮影は大きな技術的課題の一つである。上記の連続上書き機能の導入により、現象の生起を検出してから連続撮影操作を止めることができるようになり、現象生起との同期撮影が容易になった。

2001年に開発したISISを備える超高速ビデオカメラによる撮影例を図2に示す。アルコールで湿したガラス面

図2 アルコール薄膜上に落下した濃いグリセリン水溶液の液滴で生じるバスケット (撮影速度20000枚/秒)²⁾

添付CDにて動画が見られます

に、グリセリンの薄い水溶液の液滴を落としたときに発生する網目状王冠の連続画像である²⁾。

2.3 超高感度の実現

超高感度撮影はCCM、裏面照射、冷却の3つの技術の組合せで達成する。

CCM (Charge Carrier Multiplier, 多段衝突イオン化増倍デバイス) は、Hynecekが発明した³⁾。CCDに特徴的に使える超低ノイズの信号増幅機構であり、インパクトロン、EM-CCDなどの名称でこの増幅機構を備えた高感度CCD型撮像素子が市販されている。

この増幅機構を説明する。CCDの各段で、大きな電界を作ることで信号電荷の転送時に電子を加速して2次電子を発生させ、信号を増幅する。電界の調整により増幅率を小さくし、この過程を多段階にわたって繰り返す。このとき信号は近似的に段数に比例して大きくなる(実際には積になる)。一方で、各段に発生するノイズはランダムであるので段数の平方根に比例して大きくなる。従ってSN比は段数の平方根に比例して大きくなる。従ってSN比を改善しながら信号を増幅することができる。

ISIS構造やCCMを表面側に作り込む。裏面から光を当てる。裏面照射により開口率が100%になり量子効率改善される。また可視光だけではなく、紫外線や電子線などの直入による撮影も可能になる。適当なシンチレータなどを乗せれば軟X線や中性子線などを用いた超高速ビデオ撮影も可能になる。

光子計数感度に近い超高感度と、超高速撮影速度を同時に満たす撮像素子なのでPC-ISIS (Photon-Counting ISIS) と名づけた。現在、第1段階の試作が終わり、評価を進めている。

PC-ISISの断面の概念図を図3に示す。

3. 顕微鏡システム

3.1 特徴

顕微鏡については、光や感度不足が大きな課題であるので、基本的に蛍光を使わない無染色細胞観察技術(微分干渉法、位相差観察法、暗視野照明法など)を採用した。これは理化学研究所(宮脇・河野)およびオリンパス(株)

図3 PC-ISISの断面構造

(斎藤ら)が協力して開発している。特徴は、様々な無染色細胞観察に使えること、および空間的分解能を多少犠牲にしても、光の損失を極力小さくしたことである。

とはいえ蛍光観察は非常に重要なので、超高速蛍光撮影の限界を見極めるために、近畿大学(吉田ほか)でもオリンパス(株)と協力して専用の観察システムを構築している。制御装置として重要なものが3点ある。

- (1) 画像トリガー
- (2) 撮影条件設定中の照明・撮影・モニタリング制御
- (3) 動く被写体の自動追尾・自動焦点調節機能。

以下、これらについて簡単に説明する。ただし、自動追尾・自動焦点機能については筆者らのプロジェクトでは開発していないので説明は割愛する。

3.2 画像トリガー

画像トリガーは、撮影対象とする現象が生じたことを撮影中の画像から検出し、直後に超高速連続書き撮影を停止するためのトリガー信号を発するシステムである。

具体的には、視野中の指定された領域で瞬間的な輝度の変化を検知して、連続書きを停止する。概念的には極めて単純なシステムである。しかし顕微鏡下の蛍光による生物試料の超高速観察の場合には簡単ではない。また高速度撮影で良く使われる現象発生に伴って発生する音トリガー、電圧や電流変化などの変化を検知する方法などの適用も難しい。これは以下のような理由による。

- (1) 発生するわずかな音や電圧・電流の変化を検出することが難しい。
- (2) 刺激を加えてから現象生起までの時間の予測が難しい。
- (3) 画像トリガーの場合も、光量が少なく、光のショットノイズなどに起因するノイズが大きく、それに比べて検出対象とする信号の変化がわずかなのである。
- (4) 対象とする急激な変化以外に、より低周波の様々の変動がある。
- (5) 照明用のキセノンランプやレーザの高周波の不安定

図4 照明光の変動をキャンセルした画像トリガー
(4 kHz以上の高周波成分を処理)

な変動により画像にわずかなフリッカーが生じる。

- (6) 使用する撮影速度の幅が広い。

従って以下の特徴を持つ画像トリガーを開発した。

- (a) ビームスプリットプリズムで光を分割し、一部を画像トリガーに使う。
- (b) アバランシュフォトダイオード(APD)の採用により、超高感度検出を可能にするとともに、低周波変動成分を除去し、急激な変化のみを検出する。
- (c) 試料を通過する前の照明光と、通過後の画像トリガー用センサへの入射光の相関を計測し、照明光の変動を除去した真の変動をモニタする。
- (d) 撮影開始直前に変動の標準偏差を計算し、その4倍の変化を閾値とすることにより、わずかな変化を検出する。
- (e) 撮影時間間隔内に出力される信号の数で移動平均した信号をモニタすることにより、撮影速度が大きいときには急激な時間変化を、小さいときには比較的ゆっくりした変化を検出する。

項目(b)～(e)の工夫はそれぞれが高感度検出に寄与する。これらの機能の総合により高性能の画像トリガーを開発することができた。

用いたAPDでは4 kHz以下の変動は除去される。従って試作した画像トリガーは4 000枚/秒以上の高速度撮影に対して使用できる。

図4は、上記の項目(b)～(d)の効果を検証したものである。メタルハライドランプで白紙を連続照明しつつ、小さなLEDを点灯した。LEDの点灯による照明強度の変化はごくわずかである。

メタルハライドランプは肉眼では一定の光量に見える

が、APD で高周波成分のみを検出すると、図 4 (a) のように 568.2 Hz で激しく変動している。この周期はランプごとに変わる。LED の点灯は図 4 (b) に矢印で示されている。直流成分は除去されているのでパルス状の信号となっている。これらの 2 個の APD からの信号の相関を計算し、照明光の変動成分をキャンセルすると図 4 (c) が得られる。図には LED を点灯する前の、照明光の変動をキャンセルした変動成分の標準偏差の 4 倍を閾値として示している。小さな LED の点灯によるわずかな光量変化を明確に検出していることがわかる。

3.3 撮影条件設定中の照明・撮影・モニタリング制御

超高速撮影においては、強い光を当てることによって細胞が損傷を受けたり死滅することが大きな問題になる。この点で一般には大きな誤解がある。撮影中の強い照明による露光はほとんど問題にならない。その前段階の、撮影位置や焦点、照明条件などを決めるための撮影条件の設定中の露光量の方がはるかに大きい。これをいかに少なくするかが最大の課題である。

例えば、100 万コマ/秒で撮影するとき、1 コマ当たりの撮影時間は $1\mu\text{s}$ であるから、1 000 コマ連続撮影しても 10 ms しかかからない。一方、撮影条件の設定には最低 10 分、場合によっては 1 日以上かかることもある。この間の露光時間を減らすためには、1 秒間に 1 回、(1/100 万) 秒だけ照明し、撮影された画像を 1 秒間モニタ上に表示し、それを見ながら撮影条件を設定すれば、例え撮影条件の設定に 1 時間かかっても、合計の露光時間はわずかに 3.6 ms ($3600\mu\text{s}$) にしかならない。

当然、 $1\mu\text{s}$ で 1 コマ撮影するためには強い照明が必要になる。これにより細胞が損傷を起こしたり、即死したりするのではないかという懸念がある。

幸い、ミシガン大学の Petty 教授は 50 ns (2 000 万コマ/秒相当) の強い紫外パルスレーザ照明により蛍光撮影しても、生きたまま観察できることを示している⁴⁾。

ただし良い映像を得るためには、できるだけ多くの光子が必要である。このためには、どの程度の照明までであれば、細胞の致命的損傷または機能障害を避けることができるかについて基礎的な情報を定量的に表示しておくことが重要である。

3.4 そのほかの開発課題

そのほか、超高速バイオナノ観察を実用化するための様々の技術を並行して開発している。例えば、超高速撮影に適した蛍光蛋白の探索、動き回る微生物を、水と屈折率の近いガラスの中に作った細い水路 (マイクロチャンネル) の中を泳がせて、撮影位置や焦点合わせを容易にする方法、暗視野照明により撮影される多数の粒子画像の自動追跡技術などを開発している。

図 5 は、マイクロチャンネルと、撮影したミドリムシの画像の例である。1 枚の静止画ではわかりにくい、動画では、鞭毛の動きや、ミドリムシの体内の動きなどが明瞭に観察できる。

図 5 ミドリムシの遊泳 (河野・宮脇 (理研))

添付 CD にて動画が見られます

4. お わ り に

「超高速バイオナノスコープによる撮影で何が解明されると期待されるか?」という質問を受けることがある。現時点でそれに答えることはできない。これまでの高速度ビデオカメラより約 100 倍高速で、しかも超高感度である。桁違いに高性能の観察機器であるから、これまで誰も知らなかったものの発見に使われる。新しい現象が発見されれば、その分野での利用が急激に広がる。

筆者らは 1991 年に 4 500 枚/秒の当時世界最高速のビデオカメラを開発した。これは筆者らの実験室における流れの観察のために開発した。その後、Photron FASTCAM、KODAK HS4540 の名称で世界中で使われ、広い分野の科学技術の発展に寄与した。とくに自動車のエンジン開発では無くてはならない観察手段として使われ、燃費の向上、排ガスの清浄化などを通じて地球環境問題の改善にも大きく貢献した。

「超高速バイオナノスコープ」についても、今の段階で想定できる具体的な適用例をはるかに超える大きな成果をもたらすものと期待している。

このプロジェクトは(独)科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業により進めている。

参 考 文 献

- 1) T. Goji Etoh, et al, A CCD Image Sensor of 1,000,000 fps for Continuous Image Capturing of More Than 100 Consecutive Frames, ISSCC 2002, Digest of Technical Papers, **45** (2002) 46-47, 443.
- 2) S. T. Thoroddsen, T. Goji Etoh and K. Takehara, Crown breakup by Marangoni instability, J. Fluid Mechanics, **557** (2006) 63.
- 3) J. Hynccek, CCM-A new low-noise charge carrier multiplier suitable for detection of charge in small pixel CCD, IEEE Trans. Electron Devices, **39** (1992) 1972.
- 4) Howard R. Petty, high-speed fluorescence microscopy of cell signaling, Proc. of SPIE, Vol. 5580, 26th International Congress on High-Speed Photography and Photonics, (2004) 81.