高感度レーザー励起蛍光顕微鏡システムによる 細胞内色素分布の計測

Measurements of Dye Distribution in Biological Cells by High Sensitivity Laser Excited Fluorescence Microscope System

佐藤 俊一^{*}, 稲場 文男^{*,+}, 田口 喜雄^{**}
Shunichi SATO^{*}, Humio INABA^{*,+} and Yoshio TAGUCHI^{**}

^{*}東北大学電気通信研究所

⁺新技術開発事業団稲場生物フォトンプロジェクト

^{**}東北大学医学部第二外科

^{*} Research Institute of Electrical Communication, Tohoku University

⁺ INABA Biophoton Project, Research Development Corporation of Japan

^{**} Second Department of Surgery, Tohoku University School of Medicine

Abstract

Biological measurement and examination with a fluorescence microscope has become important method for spectral analysis of cellular materials in biomedicine and lifescience. By a conventional fluorescence microscope system, however, it is difficult to perform the measurement of weak fluorescence from low fluorescent molecules contained in a single cell, because of the low excitation efficiency and poor sensitivity. To overcome these problems, we have designed and developed an advanced type of digitized fluorescence microscope system using a laser for high radiant and narrowband excitation, and an ultra-high sensitivity image sensor based on the digital image processing technique. In this paper, we report the system configuration and some new results obtained for cultured single biological cells.

医学や生命科学の分野においては蛍光顕微鏡を用いた測定が、生体細胞内成分の分光分析の重要な手段の一つとなっている。しかしながら、従来の蛍光顕微鏡システムでは励起効率や検出系の感度が十分でないため、生体細胞内分子からの微弱な蛍光を測定することが困難であった。これらの難点を解決するため、われわれはデジタルイメージプロセッシング技術をもとに、極めて高輝度のレーザー光と高輝度光検出器を用いた新しい蛍光顕微鏡システムを試作開発した。本論文ではそのシステムの概要と単一生体細胞内の各種色素からの蛍光強度分布の測定結果について述べる。

1. はじめに

医学や生命科学の分野においては、各種の生体構成分子の種類や濃度、分布あるいはそれらの動的挙動を個々の生

体細胞に対して調べることが重要となっている。生体細胞を生きたままで観察する手段の一つとして光学顕微鏡が古くから利用されてきているが、中でも蛍光顕微鏡は

蛍光の分光分析やその強度分布などから発光物質あるいは発光物質と結合した生体構成分子に関する情報を得ることができるため、近年広く使用されている。

一般には有機色素のうち特に吸収係数および蛍光量子収率が高く、褪色が少なく、さらに特定の物質に結合するような色素を利用して、間接的にそれらの分布や濃度の観測が行われている。しかし、pHや濃度、細胞の種類などの実験条件により、色素の選択的結合性や蛍光強度などは変化するのが普通であり、慎重に条件を設定する必要がある。このような難点は測定しようとする生体構成分子自身の蛍光を直接に観察できれば解決されるが、これまでは蛍光顕微鏡に用いられる光源の輝度や蛍光像観測手段の感度が不十分であったためにその実現が難しかった。もしこのような条件を満足するようなシステムが実現されれば、これまで写真撮影では通常数十秒から数分間程度の露光を必要としていた蛍光像観察も短時間で行うことができ、さらに蛍光像の時間的変化を長時間にわたってとらえることも可能となるものと考えられる。

われわれはこのような観点より励起光源にレーザー¹⁻³⁾を、さらに蛍光画像検出器に高感度な撮像媒体を用いた高感度レーザー励起蛍光顕微鏡システム^{4, 5)}の試作開発を進めている。また、このシステムを用いて単一生体細胞内における各種の色素からの蛍光強度分布を定量的に測定することを試みており、本文ではその結果の一部を報告する。

2. 高感度レーザー励起蛍光顕微鏡システムの概要

従来使用されている蛍光顕微鏡ではハロゲンランプや水銀ランプなどの光源から、蛍光を観察する色素の吸収ピーク波長域に対応するスペクトル成分だけを干渉フィルタを用いて取り出して励起光としていた。干渉フィルタとしては半値幅が数nmから数十nmのものを用いることが多いが、この幅は光源であるランプのスペクトル幅と比較すると非常に狭いため、レーザー光ほどの巨大な輝度を得ることは不可能である。

また蛍光顕微鏡の利点の一つとして、発光物質のないところでは蛍光が観測されないはずであるから、理想的にはバックグラウンドがなく、コントラストの極めて高い蛍光像が得られるということが挙げられる。落射型の蛍光顕微鏡では励起光スペクトル選択用の干渉フィルタや、励起光を反射し、かつ蛍光を透過させる特性を持つダイクロイックミラー、さらに励起光の波長成分をカットしたり、観察する蛍光の波長を選択するカットオフフィルタなどが用いられるが、理想的なスペクトル特性を持つ

フィルタの製作は難しく、不必要な波長の光もわずかながら光検出系に混入してしまう。特に幅広い励起光はバックグラウンドとして蛍光像全体のコントラストを低下させる原因となる。これに対して、励起光源にレーザー光のように波長幅が極めて狭い単色性に優れた光源を用いれば、通常のランプと干渉フィルタとを用いた場合に比べ、容易にしかも十分に励起光の波長成分を除去することが可能となる。

さらに色素レーザーのように波長同調の可能なレーザーを用いれば、励起波長を蛍光物質の吸収ピーク波長に合せることができるため、効率のよい励起が行え、試料に照射する励起光量を低減することができる。

以上のような観点から、われわれはFig.1に示すように励起光源としてレーザーを用いた高感度・高速多元画像処理方式蛍光顕微鏡システムを試作開発した。レーザーとしてはArレーザーやエキシマレーザー励起色素レーザーなどを用いている。レーザー光の空間的強度分布の不均一性のほかに、優れたコヒーレンス性に起因する干渉縞のために、そのままレーザー光を試料に照射することはできない。そのためレーザー光を一度拡散板を通すことにより試料上にできるだけ均一に照射されるようにしている。試料からの蛍光像はレーザー光の波長成分を除去するカットオフフィルタを透過した後に、まずイメージインテンシファイアの光電面に入射し、ここで電子に変換された後、電子レンズによって加速されて、マイクロチャンネルプレート上に結像される。これらの電子はマイクロチャンネルプレートで増幅された後蛍光面で再び光に変換されることにより、約 10^4 程度に増幅される。

イメージインテンシファイアによって増強された像は肉眼で観察することもできるが、後述するような画像信号処理を行うためにこの像をさらにTVカメラでとらえる必要がある。イメージインテンシファイアからの像が十分明るい場合にはビジコンやCCDなどでもよいが、本システムではより高感度なSITカメラ(浜松ホトニクスC2400-08)を用いている。SITカメラは撮像管にSilicon Intensifier Targetを用いたもので、ビジコンと比べ約2桁ほど感度が高い。このため光検出系の増倍率は約 10^7 以上になるものと見積られ、試料からの蛍光強度が極めて微弱な場合においてもコントラストの高い蛍光像を得ることが可能となり、標識色素以外の比較的蛍光強度の弱い生体構成物質の蛍光像をも観測できるようになった。なお、イメージインテンシファイアを使用することにより、SITカメラ単独で使用する場合と比較して検出感度が600倍程度向上し、通常は光子計数法を

Fig.1 高感度レーザー励起蛍光顕微鏡システムのブロック図

必要とする微弱な画像をも計測できるようになった。このシステムでは一画面の情報を1/30秒で取り込むことができるが、画像のSN比を高めるために画像信号の積算処理を行なうようにしている。

SITカメラからのビデオ信号はイメージプロセッサへ送られる。ここで信号は8ビットのAD変換器によってデジタル信号となり、内部の512×512の画素数をもつフレームメモリに記憶される。フレームメモリの一画素当たりの輝度階調は16ビットであり、AD変換器の階調に対して2倍となっている。これは蛍光強度が弱い場合にはSITカメラからの1フレーム分の画素信号では十分なSN比をもった蛍光像を得ることが難しいため、複数個のフレームにわたって画像信号を積算できるようにするためである。フレームメモリに記憶された蛍光画像は同時にTVモニター上に映し出すことができ、顕微鏡を直接覗かなくても蛍光像を観測することができる。またイメージプロセッサの備えている二値化などの簡単な処理を施した画像も映し出される。

以上述べてきたような構成のシステムでも、試料からの微弱な蛍光像を高感度でとらえ、さらにSN比の良好な画像を得ることができるが、その画像データに対してさまざまな画像処理を施したり、保存したりすることも

必要である。本システムで用いたイメージプロセッサは2画面分のメモリ容量をもっているが、これでは不十分であるためマイクロコンピュータを介してフロッピーディスクあるいはハードディスクに記憶するような構成にした。イメージプロセッサとマイクロコンピュータ間のデータ転送にはGP-IBインターフェースを用いているが、DMA転送などの方式をとっていないこともあり一画面全体の512キロバイトのデータを転送するのに約16秒間要している。これをさらにフロッピーディスクあるいはハードディスクに転送するわけであるが、容量および転送速度の点から本システムでは主にハードディスクを用いている。この過程に要する時間は約8秒間であり、全体で約24秒間でデータ保存を行うことができた。用いたハードディスクの容量は20メガバイトであるので約40画面分を保存できることになる。以上のことから、フレーム積算に要する時間も含め約34秒ごとに40回連続して蛍光画像をとらえることが可能となった。

これらの蛍光画像データを保存するのに必要な制御プログラムのフローチャートをFig.2(a)に示す。まずインターフェースやメモリイメージプロセッサをマイクロコンピュータ制御するために必要な初期化を行い、次に蛍光画像の積算を行った後、ハードディスクへ転送して

Fig.2 高感度レーザー励起蛍光顕微鏡システム制御用プログラムのフローチャート (a) 蛍光画像の取込および保存、(b) データ処理および表示

終了する。

蛍光画像に必要なデータ処理としてはスムージング処理や画像間での減算処理などが挙げられる。このうちスムージング処理は空間分解能の低下を招くものの、フレーム積算を行っても十分なSN比の画像を得られない場合に必要となる。また減算処理は、例えば条件を変えて測定を行った蛍光画像の差異を調べる際に有効で、われわれは測定する蛍光波長による画像の変化⁶⁾や、あるいは蛍光強度分布の時間的な変化を調べる場合に用いている。

これらの処理はマイクロコンピュータによって行われるが、その結果はCRT上に表示される。表示方法としては主にワイヤフレームによる3次元表示を用いているが、場合によってはデータの値に応じた色別表示をすることもできるようになっている。データ処理および表示のために作成したプログラムのフローチャートを Fig.2 (b) に示す。データの保存されているハードディスクからデータを転送し、必要に応じてスムージング処理や減算処理を行った後にその結果をCRT上に表示する。

Fig.3 ヘマトポルフィリン誘導体 (HpD) を取込んだ HeLa 子宮ガン培養細胞からの蛍光強度分布の 3 次元グラフィック表示の一例 (ヘマトポルフィリン誘導体濃度: $50 \mu\text{g/ml}$)

3. 細胞内色素からの蛍光強度分布計測

3.1 ヘマトポルフィリン誘導体

試作したシステムを用いて単一の生体細胞からの蛍光強度分布を測定した結果の一例を Fig. 3 に示す⁶⁾。使用した細胞は HeLa 子宮ガン培養細胞で、これを濃度が $50 \mu\text{g/ml}$ のヘマトポルフィリン誘導体 (HpD)⁷⁾ の PBS 溶液中にて 37°C で一時間培養してこの誘導体を細胞内部に取込ませた。図から明らかなように蛍光強度は細胞の周辺部分で強く、中央付近で弱い。この結果からヘマトポルフィリン誘導体は細胞質に比較的良好に取込まれているものと推察される。また波長 488.0nm の Ar レーザー光の照射強度は約 $70 \mu\text{W/cm}^2$ と非常に弱いですが、図のようにコントラストの優れた蛍光像が得られている。先に試作したシステム¹⁻³⁾においては照射強度は数 mW/cm^2 程度であったのに比べ、本システムの感度が大きく向上していることがわかる。

ヘマトポルフィリン誘導体のように極めて強い光化学効果⁸⁾を示すような色素からの蛍光強度分布を測定する際には、測定中に細胞の状態が大きく変化してしまうのを避けるために励起光強度をできるだけ小さくし、かつ測定時間を短縮しなければならない。このことは通常写真撮影などでは極めて難しかったが、本システムによりレーザー光を 1 分間程度連続照射しても、得られる蛍光強度や細胞の形状などに光化学効果によると思われる変化が認められないほど、照射光強度を低減できることが明らかになった。

3.2 制ガン剤

ヘマトポルフィリン誘導体の吸収係数は蛍光プローブとして用いられている色素類とはほぼ同程度の大きさを持っており、褪色の進捗は早いですが、得られる蛍光強度は比較的強い。これに対して制ガン剤は一般に光の吸収係数

Fig.4 PBS 溶液中におけるアドリアマイシンの吸収および蛍光スペクトル (アドリアマイシン： 5×10^{-5} mol/l)

Fig.5 アドリアマイシンを取込んだ MCF7 乳ガン培養細胞からの蛍光強度分布の 3 次元グラフィック表示の一例 (アドリアマイシン濃度： 5×10^{-5} mol/l)

が小さいため、観測に十分な光量の蛍光を得ることが難しく、その測定例はこれまでほとんど報告されていない。そこで本システムを用いてガンの化学療法に頻用されているアドリアマイシン(adriamycin)とテトラヒドロピラニルアドリアマイシンハイドロクロライド (tetrahydropyranyl adriamycin hydrochloride: THP) を取込んだ単一の生体細胞からの蛍光強度分布の測定を試みた^{4, 5)}。

Fig.4 に PBS 溶液中のアドリアマイシンの吸収および蛍光スペクトルを示す。吸収のピークは約 490nm にあるが、吸収係数はヘマトポルフィリン誘導体などと比較すると 2 桁ほど小さい。なおここでは示していないが、THP もほぼ同様のスペクトル特性を有している。Fig.5 はアドリアマイシンを取込んだ MCF7 乳ガン培養細胞から得られた蛍光強度分布の 3 次元グラフィック表示の一例を示すものである。測定に際して、培養ガン細胞はアドリアマイシンの濃度が 5×10^{-5} mol/l の PBS 溶液

Fig.6 THP を取込んだ HeLa 子宮ガン培養細胞からの蛍光強度分布の 3 次元グラフィック表示の一例 (THP 濃度： 5×10^{-5} mol/l)

中で 37°C にて約 1 時間培養している。波長 488.0nm の Ar レーザー光の照射強度は約 $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ である。図より蛍光強度は細胞周辺で強いことが明瞭に認められ、ヘマトポルフィリン誘導体とほぼ同様の分布を有していることがわかる。

測定はこのほか HeLa 子宮ガン培養細胞と TE-2 食道ガン培養細胞についても行い、同じ傾向の結果が得られた^{4, 5)}。さらに THP についても測定を行ったところ、MCF7 乳ガン培養細胞と TE-2 食道ガン培養細胞については類似の結果であったが、HeLa 子宮ガン培養細胞については Fig.6 に示すようにほかの細胞とは異なる強度分布が得られた⁴⁾。すなわち蛍光強度の強い部分が点状に存在していることが認められ、THP はこの培養ガン細胞中において局在化していることを示すものと考えられる。

Fig.7 は THP を取込んだ HeLa 子宮ガン培養細胞に連続的に波長 488.0nm の Ar レーザー光を照射した場合の蛍光強度分布の 34 秒ごとの経時変化の 3 次元グラフィック表示である。レーザー光強度は $800 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ で、THP 濃度が 5×10^{-5} mol/l の PBS 溶液中で 1 時間 37°C で培養した細胞を用いている。Fig.6 と同様に蛍光強度の強い部分が点状に分布していることが認められ、また蛍光強度が時間とともに弱くなり、その範囲がやや広がっていくことがわかる。

Fig.7 に示されたような経時変化は同様な実験をヘマトポルフィリン誘導体などを用いて行った際にも顕著にみられ、これは強い光化学効果によって生体細胞が不活性化していく過程に対応していることが見出されている。一般に制ガン剤に対する光の作用については、これまでほとんど検討されておらず、Fig.7 にみられるような現象がどのような効果によって生じたものなのかは今後さ

(1)照射直後

(6)照射開始 2 分50秒後

(2)照射開始34秒後

(7)照射開始 3 分24秒後

(3)照射開始 1 分 8 秒後

(8)照射開始 3 分58秒後

(4)照射開始 1 分42秒後

(9)照射開始 4 分32秒後

(5)照射開始 2 分16秒後

(10)照射開始 5 分 6 秒後

Fig.7 Arレーザー光連続照射のもとで THP を取込んだ HeLa 子宮がん培養細胞からの蛍光強度の経時変化の 3 次元グラフィック表示 (THP 濃度 : 5×10^{-5} mol/l)

(11)照射開始 5分40秒後

(16)照射開始 8分30秒後

(12)照射開始 6分14秒後

(17)照射開始 9分4秒後

(13)照射開始 6分48秒後

(18)照射開始 9分38秒後

(14)照射開始 7分22秒後

(19)照射開始 10分12秒後

(15)照射開始 7分56秒後

(20)照射開始 10分46秒後

Fig.7 (続き)

さまざまな点から検討しなければならない問題であるが、少なくとも光照射によって発生したことはたしかであり、照射光がおおよそ1000 lux程度の可視光であることは、光化学効果が一部寄与していることの可能性を示唆しているものと思われる。

4. おわりに

以上われわれが新たに試作開発した高感度・高速多元画像処理方式レーザー励起蛍光顕微鏡システムについて、ハードウェアの概要と若干の応用例を述べた。本システムの特徴として次のような点が挙げられる。

- 1) レーザー光を励起光として用いたことで、光源の高輝度化と励起効率の改善が達成され、波長選択および励起光スペクトル除去が容易となった。
- 2) イメージインテンシファイアおよびSITカメラを用いた蛍光検出系の高感度化により、光感受性の強い分子だけでなく、強度の極めて微弱な分子からの蛍光像を生きたままの状態の単一生体細胞から検出することが可能になった。
- 3) フレームメモリやマイクロコンピュータの使用により微弱な蛍光像をさらに高いSN比でとらえることができ、またさまざまな画像の高速多元処理を行うことができる。

本システムによりこれまで実現の難しかった制ガン剤などからの蛍光像を細胞自体に損傷を与えることなく、短時間で定量的に測定することが可能となった。画像処理部分については現在のところはごく基本的な機能のみにとどまっているが、今後大容量、高速かつ多機能なメモリやデジタル信号処理法の採用などにより、さらに高速な情報処理の実現が望めるものと期待される。

なお本研究の一部は文部省科学研究費補助金、特定研究(1)No.62111005 および試験研究(1)No.62850072 によるものである。

文献

- 1) 佐藤俊一, 稲場文男: 分光研究, 32 (1983) 341.
- 2) 佐藤俊一, 稲場文男: 光学, 14 (1985) 270.
- 3) S. Sato, H. Ito, H. Inaba, Y. Taguchi and M. Kasai: Opt. Quantum Electron., 18 (1986) 81.
- 4) 佐藤俊一, 佐藤学, 稲場文男, 木村道夫, 植木浜一, 田口喜雄: 日本レーザー医学会誌, 7(4) (1987) 21.
- 5) 佐藤俊一, 稲場文男: 光学, 17 (1988) 220.
- 6) 佐藤学, 佐藤俊一, 稲場文男, 田口喜雄, 葛西森夫: 医用電子と生体工学 24(特別号) (1986) 550.
- 7) Y. Hayata and T.J. Dougherty (Eds.): Lasers and Hematoporphyrin Derivative in Cancer (Igaku-Shoin, Tokyo, 1983).
- 8) 佐藤俊一, 稲場文男: 日本臨床, 45 (1987) 762.