

博士論文

電子増倍 CCD を用いた蛍光相関分光イメージング法の  
研究

松本 将宜

2010年 7月 21日

奈良先端科学技術大学院大学  
情報科学研究科 情報生命科学専攻

本論文は奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科に  
博士(工学) 授与の要件として提出した博士論文である。

松本 将宜

審査委員：

湊 小太郎 教授 (主指導教員)

箱嶋 敏雄 教授 (副指導教員)

杉浦 忠男 准教授 (副指導教員)

# 電子増倍 CCD を用いた蛍光相関分光イメージング法の 研究\*

松本 将宜

## 内容梗概

蛍光相関分光法 (FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy) は光学的に蛍光分子の濃度や拡散係数、分子間相互作用などを非侵襲的に計測する手法であり、生きた細胞における分子動態の測定に広く利用されている。しかし、一般には点検出器を蛍光の検出に用いるため、細胞全体の分子動態の分布を計測するのは困難であった。近年、電子増倍 CCD (Electron-multiplying CCD: EM-CCD) カメラを用いた FCS イメージング法が報告された。この手法では、細胞全体で分子動態の分布を得られ、また各点の蛍光強度データが厳密に同時刻であるため隣接点を比較することが可能である。そこで本研究では、EM-CCD を用いた FCS イメージング装置を開発し、その性能について検証実験を行った。本装置では  $32 \times 32$  画素の画像を  $3\text{ms}/\text{frame}$  の速度で取得し、FCS による解析が可能である。

顕微鏡実験への適用に際して、隣接画素間への移動に対する感度特性を検討したところ、FCS による同時測定ではよく用いられるエバネッセント照明では侵入長  $50 \sim 200\text{nm}$  が等価画素サイズ ( $1 \sim 2\mu\text{m}$ ) より著しく小さいため困難であることが判明した。そこで新たな照明法として臨界角照明法を開発し、その特性を調べた。臨界角照明法では入射光を基板側から臨界角よりやや小さい角度で入射する。試料側へ透過して屈折した光は境界面とほぼ並行に進みエバネッセント場と同様に表面近傍のみを照明する。実験および有限時間領域差分法 (FDTD 法) による解析から、臨界角照明法では、水-ガラス系 (臨界角  $61.7^\circ$ ) で波長  $488\text{nm}$

\*奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 情報生命科学専攻 博士論文, NAIST-IS-DD0661023, 2010 年 7 月 21 日.

のレーザー光を用いた場合、境界面から  $0.5 \sim 2\mu\text{m}$  の領域が照明されることが分かった。本照明では、横方向の移動に対する特性と奥行き方向の移動に対する特性が同程度になり、EM-CCD による FCS イメージングに適することが確認できた。また、 $\theta = 59.5^\circ$  より大きい角度では光の強度は境界面からの距離に対して指数関数的に減衰することも分かり、検証実験により実証した。

キーワード

蛍光相関分光法, 画像処理, FDTD, 照明法, 光学

# Fluorescence Correlation Spectroscopic Microscopy based on Electron Multiplying CCD\*

Masayoshi Matsumoto

## Abstract

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is a widely used tool to detect interactions and to investigate dynamics of molecules in living cells noninvasively. In a conventional FCS, whole-cell information is hardly achieved because single-point detectors are used to detect fluorescence intensity from a molecule due to their high sensibility. Recently several groups have reported about an imaging method of fluorescence correlation spectroscopy imaging method based on an electron-multiplying charge-coupled device (EM-CCD) camera. The advantages of FCS with an EM-CCD are simultaneous detection in whole image and large number of measurement points. In this thesis I developed an imaging FCS apparatus with EM-CCD and tested its capability. With this apparatus I can measure images of  $32 \times 32$  pixels with a frame rate of 3ms/frame.

However, the penetration depth of evanescent field (typically  $50 \sim 200\text{nm}$ ) is too short to investigate transverse movement in a cell, in comparison with the transverse width of detection volume ( $1 \sim 2\mu\text{m}$ ) for FCS imaging. Then I developed a novel illumination method called critical-angle illumination method and

---

\*Doctoral Dissertation, Department of Bioinformatics and Genomics, Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, NAIST-IS-DD0661023, July 21, 2010.

investigated properties of critical-angle illumination. In the critical-angle illumination a Gaussian beam is irradiated on a substrate surface at the angle of slightly smaller than the critical angle. In this case the refracted beam travels along the substrate surface and generates electromagnetic field within a few micrometers on the surface. In case of a water-glass boundary (critical angle:  $61.7^\circ$ ) and a blue laser (488 nm wavelength), the penetration depth of illumination is measured as about  $0.5 \sim 2 \mu\text{m}$  from the boundary. With critical-angle illumination method, the penetration depth is similar to the transverse width of detection volume, and it's capable for EM-CCD based FCS imaging. Through experiments I also confirmed that the illumination decays exponentially in case of larger incident angle than  $59.5^\circ$ .

**Keywords:**

FCS, image processing, FDTD, illumination method, optics

# 目次

1. 緒論	1
2. 研究背景	2
2.1 緒言	2
2.2 蛍光相関分光法	2
2.2.1 原理	2
2.2.2 装置	3
2.2.3 解析方法	3
2.3 エバネッセント照明を用いた蛍光相関分光法	7
2.3.1 エバネッセント場	8
2.3.2 全反射蛍光相関分光法の原理	9
2.3.3 解析方法	10
2.4 空間分解能を持った蛍光相関分光法	11
2.4.1 スキャニング FCS	11
2.4.2 アレイを用いた手法	11
2.4.3 電子増倍 CCD カメラを用いた手法	12
2.5 結言	12
3. 電子増倍 CCD カメラを用いた蛍光相関分光イメージング装置の開発	14
3.1 緒言	14
3.2 装置概要	14
3.3 評価実験	16
3.4 装置の問題点	20
3.4.1 光軸方向における観測領域を制限する手法	20
3.4.2 ノイズ	20
3.4.3 時間分解能	21
3.4.4 空間分解能	21
3.4.5 画素数	22

3.4.6	その他の問題	22
3.5	結言	22
4.	蛍光相関分光イメージングによる異方性解析	23
4.1	緒言	23
4.2	観測領域の形状と感度の関係	23
4.3	EM-CCD を用いた場合	24
4.4	異方性検出に必要な照明深さ	24
4.5	既存手法の問題点	25
4.6	臨界角照明法	25
4.7	結言	27
5.	蛍光相関分光法による臨界角照明の深さの測定	28
5.1	緒言	28
5.2	実験手法	28
5.3	結果	28
5.4	結言	29
6.	時間領域差分法による臨界角照明の深さの分析	31
6.1	緒言	31
6.2	計算条件	31
6.3	結果	31
6.4	結言	32
7.	まとめ	36
	謝辞	38
	参考文献	39
	付録	42

A. 研究業績	42
A.1 査読付学術論文 . . . . .	42
A.2 査読付国際会議発表 . . . . .	42
A.3 査読付国内会議発表 . . . . .	42

## 図目次

1	ガウシアンレーザーを用いた場合の観察領域の模式図 . . . . .	4
2	FCS における自己相関曲線の模式図 . . . . .	6
3	スネルの法則 . . . . .	8
4	臨界角 . . . . .	8
5	EM-CCD を用いた FCS 計測装置 . . . . .	15
6	サンプルの構造 . . . . .	17
7	取得した画像の例 . . . . .	17
8	評価実験結果：濃度 . . . . .	18
9	評価実験結果：マッピング . . . . .	19
10	観測領域の形状および $\tau_D$ の関係 . . . . .	26
11	臨界角照明法の概要図 . . . . .	27
12	臨界角照明による FCS 計測結果 . . . . .	30
13	FDTD による電場強度強度分布の解析結果 (入射角 $60.0^\circ$ ) . . . . .	33
14	FDTD による電場強度強度分布の解析結果 (入射角 $59.5^\circ$ ) . . . . .	34
15	FDTD による電場強度強度分布の解析結果 (入射角 $59.0^\circ$ ) . . . . .	35

## 表目次

1	空間的に拡張した FCS 計測手法の比較 . . . . .	12
2	評価実験に用いたサンプル . . . . .	16

## 1. 緒論

細胞は非常に多くの種類の分子を生命を維持するために用いている。分子は様々な形で生命に影響を与えるが、中でももっとも多様で複雑なのが、複数の分子が移動し、衝突し、結合するなどの相互作用である。そのため、分子間の相互作用を解明することは細胞の生命活動を理解する上で非常に重要な研究テーマとなっている。分子間相互作用を検出するには様々な手法が存在するが、その中に蛍光相関分光法 (FCS) と呼ばれる手法がある。FCS は蛍光分子からの蛍光強度のゆらぎを解析することで、蛍光分子の拡散係数、濃度といった情報を得る技術である。FCS による計測は非侵襲的であるため、生細胞内の分子の動態を計測できる手法として注目されている。

これまでの FCS による計測は感度や速度応答性の良さから点検出器を用いていたため、1点からの情報しか同時に得ることができなかった。そのため、細胞全体を同時に計測するような用途には使用されてこなかった。近年、様々な手法で多数の点における FCS 同時計測手法が提案された。その中に電子増倍 CCD カメラを検出に用いた FCS 計測手法に着目した。この手法では、カメラを検出器に用いることで細胞全体の同時計測が実現可能になる。そこで、電子増倍 CCD カメラを用いた FCS について研究を行った。2章では前提となる蛍光相関分光法の概要および問題点について述べる。3章では本研究で開発した蛍光相関分光イメージング装置について述べる。4章では本装置を用いた隣接画素比較手法についての検討について述べる。その結果、照明方法に工夫を加える必要が発生した。そのため、で新たな照明方法である臨界角照明法を開発した。5、6章では臨界角照明法の特性の調査について述べる。

## 2. 研究背景

### 2.1 緒言

蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy: 以下 FCS と表記する) とは、溶液中の蛍光分子がブラウン運動によってゆらいでいることを利用して分子の数や大きさなどの物理量を測定する手法である [1, 2, 3, 4]。FCS の概念自体はすでに 30 年以上前から知られているが [1]、当時はあまり実用的な手法でなかった。しかし近年の検出器が発達したことと、計算機技術の発展により観測データのデジタル処理が可能となったことにより、FCS は溶液中の分子動態の計測手法として広く使用されるようになってきた。FCS による計測は光学的におこなわれるため、生きた細胞に対して非侵襲的な測定が可能である。そのため FCS の用途は *in vitro* に留まらず、*in vivo* の測定にも広く用いられている。この章では FCS の原理、様々な派生手法、課題について述べる。

### 2.2 蛍光相関分光法

この節では様々な FCS のバリエーションの全体に共通する原理について述べる。そのための例として、最も基本的な計測方法である集光したガウシアンビームを用いた場合の解析手法を扱う。

#### 2.2.1 原理

溶液中を蛍光分子が分布している状態を考える。巨視的には、蛍光分子は溶液中に一様に分布している。しかし蛍光分子は平均 1 個以下から数個しか存在しないような非常に微小な領域だけを観察すると、また異なった様子が見える。溶液中で分子はブラウン運動によって絶えず移動しているため、ある瞬間には平均以上、別の瞬間には平均より少なくなるなど、微小領域内の蛍光分子数は常にゆらいでいる。蛍光分子数のゆらぎに連動して観察される蛍光強度も変化する。FCS とはこの分子数のゆらぎを蛍光強度のゆらぎとして計測し、その時間スペクトルから物性を測定する手法である。

### 2.2.2 装置

蛍光強度の微小なゆらぎを検出するためには、分子数が数個以下になるまで観測領域を限定する手法が必要である。観測領域を限定する手法には様々な方法が考えられるが、一般的にはガウシアンプロファイルをもったレーザーを絞って入射する手法が用いられる。高精度の対物レンズでレーザー光を極限まで絞ると、回折限界によって他の場所に比べて非常に明るい円筒状の領域ができる(図1)。蛍光標識された粒子の溶液に入射すると、この領域内に存在する蛍光分子からの蛍光のみを選択的に観測することが可能である。この円筒の半径はレーザーの波長と同じ程度で約 $0.5\mu\text{m}$ 、長さは約 $2\mu\text{m}$ で大きさは数 fL の大きさになる。アボガド数がおよそ $6 \times 10^{23}$ なので蛍光粒子の濃度を $10^{-8}\text{M}$ とすると1fLの領域には平均6個の粒子が存在する。このように観測領域内の分子数が極めて少ないと、1分子の領域内を出入りが蛍光強度全体に強い影響を与える。また、1分子の出入りのような高速かつ微小な光の変化をとらえるための高感度・高時間分解能な検出器が必要である。検出器にはその感度や時間分解能の良さから光電子増倍管(PMT<sup>1</sup>)やアバランシェフォトダイオード(APD<sup>2</sup>)がよく用いられる。これらは1点からの光を効率よく検出する点検出器であり、単独では空間分解能を持たない。

### 2.2.3 解析方法

蛍光強度のゆらぎには様々な物理量の情報が含まれるが、中でも重要なのは粒子の数および速度である。これらの情報は自己相関数を用いて評価することができる。ある時間 $t$ における蛍光強度を $I(t)$ とすると、自己相関関数は

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t+\tau)F(t) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

で定義される。相関時間 $\tau$ に対して $G(\tau)$ をプロットすると図2のような曲線となる。質量の大きな粒子の場合、蛍光粒子はより遅くしか移動できない(拡散定数が小さい)ため、計測領域を通過するのに要する時間も長くなるので蛍光強度

<sup>1</sup>Photomultiplier Tube

<sup>2</sup>Avalanche Photo-Diode

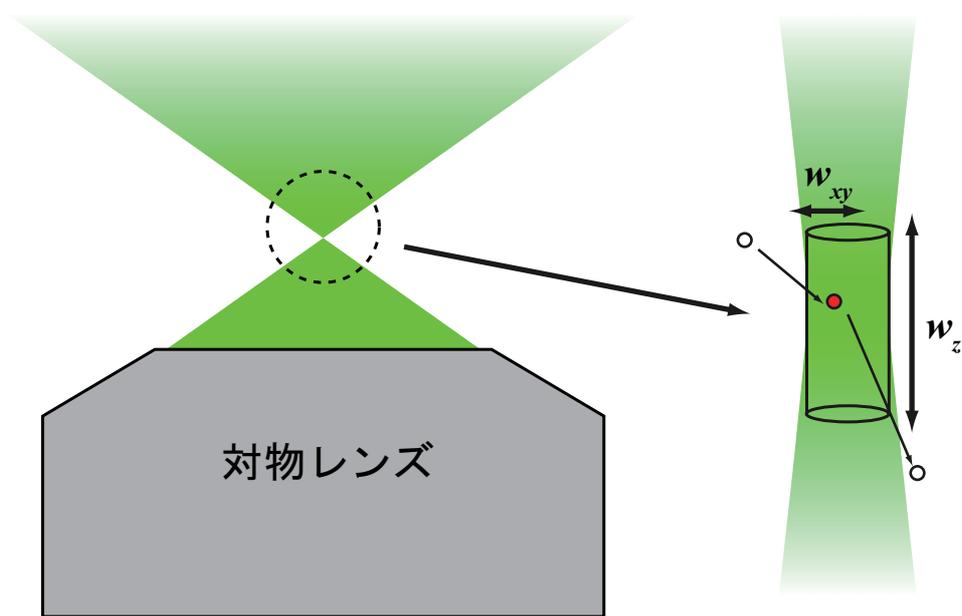


図 1 ガウシアンレーザーを用いた場合の観察領域の模式図

の揺らぎは緩やかになる。これは自己相関関数のグラフ上では相関時間  $\tau$  が長い方向への移動として現わされる (図 2 の (1))。逆に質量が小さいと蛍光強度の変化は激しくなり、グラフは相関時間が短い方向に移動する。また、観測領域内に存在する分子が多くなると、1つの分子の移動が全体の蛍光強度の変化に与える影響は小さくなり、蛍光強度の揺らぎの幅も小さくなる。これは相関の強さが小さくなることに対応する (図 2 の (2))。

検出器によって観測される蛍光強度  $I(t)$  は以下の式で表わされる [5]。

$$I(t) = Q \int_{-\infty}^{\infty} \text{CEF}(\mathbf{r}) I_{exc}(\mathbf{r}) C(\mathbf{r}, t) dV \quad (2)$$

ここで  $Q$  は蛍光分子の励起効率、 $\text{CEF}(\mathbf{r})$  は場所  $\mathbf{r}$  からの蛍光の検出効率<sup>3</sup>、 $I_{exc}(\mathbf{r})$  は励起光の強度、 $C(\mathbf{r}, t)$  は蛍光分子の存在確率である。集光したガウシアンビームを用いた系の場合、

$$\text{CEF}(\mathbf{r}) I_{exc}(\mathbf{r}) = I_0 e^{-2(x^2+y^2)/w_x^2} e^{-2x^2/w_z^2} \quad (3)$$

となる [5]。  $I_0$  は励起光の平均強度である。  $w_x^2$  および  $w_y^2$  は観測領域の X 軸方向と Y 軸方向の大きさであり、集光したビームの半径である。  $w_z^2$  は観測領域の Z 軸方向の大きさであり、集光した領域の軸長である。これらの値を式 (2) に代入して解くと自己相関関数  $G(\tau)$  は

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left( \frac{1}{1 + 4D\tau/w_x^2} \right)^{1/2} \left( \frac{1}{1 + 4D\tau/w_y^2} \right)^{1/2} \left( \frac{1}{1 + 4D\tau/w_z^2} \right)^{1/2} \quad (4)$$

となることがわかっている [4, 5, 6]。ここで  $N$  は観測領域内に存在する蛍光粒子数の平均値で、 $D$  は粒子の並進拡散係数である。

ここで、各方向への拡散時間  $\tau_x, \tau_y, \tau_z$  を導入する。これらはそれぞれ

$$\tau_x = w_x^2/4D, \tau_y = w_y^2/4D, \tau_z = w_z^2/4D \quad (5)$$

と定義される。これらの値を用いて式 (4) を書きなおすと

$$\begin{aligned} G(\tau) - 1 &= \frac{1}{N} \left( \frac{1}{1 + \tau/\tau_x} \right)^{1/2} \left( \frac{1}{1 + \tau/\tau_y} \right)^{1/2} \left( \frac{1}{1 + \tau/\tau_z} \right)^{1/2} \\ &= \frac{1}{N} \left( \frac{\tau_x}{\tau_x + \tau} \right)^{1/2} \left( \frac{\tau_y}{\tau_y + \tau} \right)^{1/2} \left( \frac{\tau_z}{\tau_z + \tau} \right)^{1/2} \end{aligned} \quad (6)$$

<sup>3</sup>Collection Efficiency Function

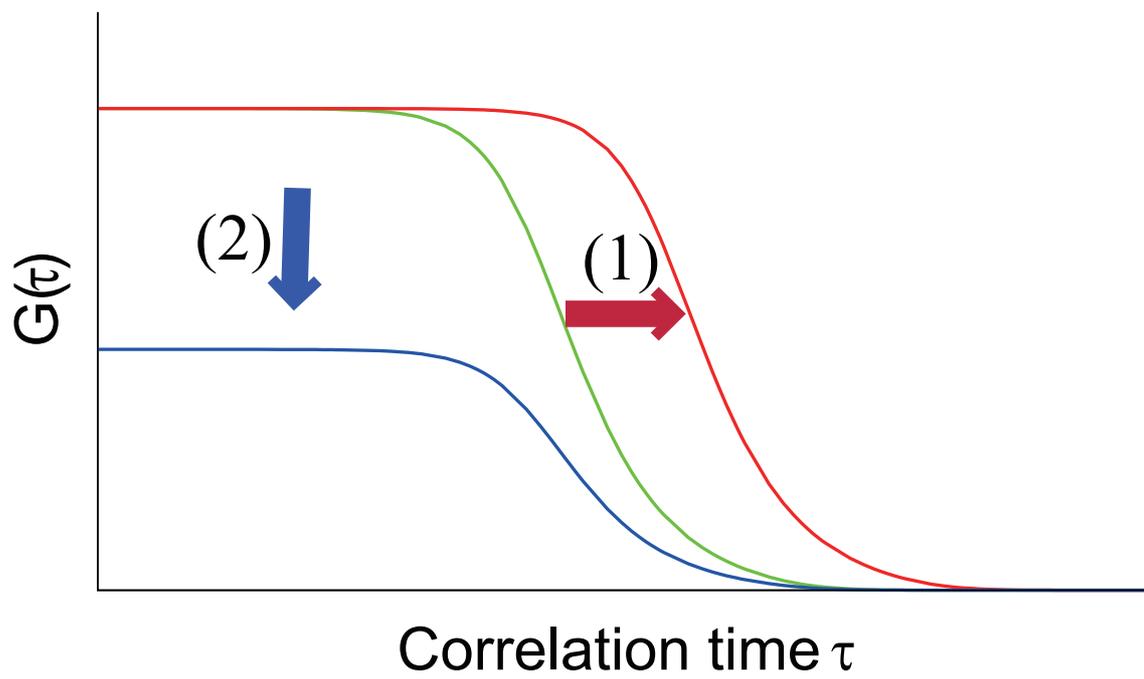


図 2 FCS における自己相関曲線の模式図を示す。(1) は蛍光分子が大きくなったことに、(2) は蛍光分子の濃度が上昇したことに対応する。

となる。さらに  $\tau = 0$  とすると式 (4) は

$$G(0) - 1 = \frac{1}{N} \quad (7)$$

となり、 $y$  切片から蛍光粒子の濃度が知ることができる。また、相関関数  $G(\tau_D)$  が切片  $G(0)$  の半分となる時間  $\tau_D$  は 1 分子が領域内に存在する平均時間である。 $\tau_D$  は

$$G(\tau_D) = \frac{1}{2}(G(0) - 1) + 1 = \frac{1}{2N} + 1 \quad (8)$$

の解であり、

$$\tau_D = \frac{w_{xy}^2}{4D} \quad (9)$$

と近似されることが知られており [5]、これより粒子の並進拡散係数  $D$  が得られる。蛍光粒子が球形であると仮定すると粒子の半径  $r$  はストークス・アインシュタインの式より

$$r = \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta D} \quad (10)$$

と求めることができ、 $D$  から粒子の大きさを調べることができる。 $\kappa_B, \eta, T$  はそれぞれボルツマン定数、溶液の粘性率、絶対温度である。

## 2.3 エバネッセント照明を用いた蛍光相関分光法

前節では絞ったガウシアンレーザーを用いて観測領域を制限した手法について述べた。他にも観測領域を制限する多様な手法が提案、開発されている。代表的なものとしてはカバーガラス上の 50 ~ 200nm のみを照明するエバネッセント場を用いて観測領域を制限する全反射蛍光相関分光法 (TIR-FCS<sup>4</sup>) が挙げられる。この手法はエバネッセント場を用いるため表面のごく近傍の動きのみを効率よく測定できるので、膜タンパクなど動態が表面近傍に限定される場合の測定に適している。

---

<sup>4</sup>Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Microscopy

### 2.3.1 エバネッセント場

屈折率の異なる媒質 I(屈折率  $n_1$ ) と媒質 II(屈折率  $n_2$ ) の間の界面を光が通過すると、光は屈折する。光の入射角を  $\theta_1$ 、屈折角を  $\theta_2$  とするとはスネルの法則により

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (11)$$

の関係が成り立つ (図 2.3.1)。

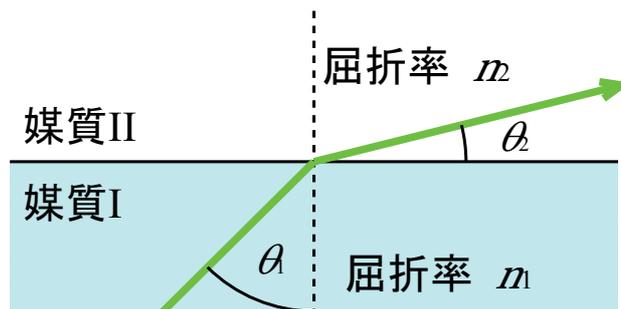


図 3 スネルの法則

屈折率の大きな媒質から小さな媒質へ光が入射している場合 ( $n_1 > n_2$ )、入射角  $\theta_1$  を大きくしていくと、ある角度で屈折角が  $\theta_2 = \pi/2$  と反射面に対して平行になる (図 2.3.1)。このときの角度  $\theta_c$  (12) を臨界角と呼ぶ。

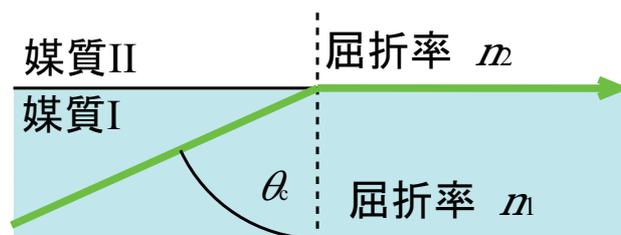


図 4 臨界角

$$\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1) \quad (12)$$

臨界角より  $\theta_1$  を大きくすると屈折角  $\theta_2$  が実数解を持たなくなり、媒質 II 中では光は伝播できなくなる。この時入射した光エネルギーは媒質 I へ帰っていく。こ

の現象を全反射という。全反射状態では境界面の媒質 II 側には強度が指数関数的に減衰する光の場が発生する [7]。この場をエバネッセント場と呼ぶ。エバネッセント場の強度は反射面からの距離  $z$  の関数として表現され、

$$I(z) = I_o \cdot \exp(-z/d) \quad (13)$$

と与えられる。その侵入長  $d$  は場の強度が  $1/e$  になる距離で、屈折率  $n_1, n_2$  と入射光の波長  $\lambda$ , 入射角  $\theta_1$  を用いて)

$$d = \lambda/4\pi(n_1^2 \cdot \sin^2 \theta_1 - n_2^2)^{1/2} \quad (14)$$

と表さる。媒質 I として水溶液 (屈折率  $n_1 = 1.33$ )、媒質 II としてガラス (屈折率  $n_2 = 1.51$ ) を組み合わせた場合  $d$  はおよそ  $50 \sim 200nm$  になる。この組み合わせは細胞を顕微鏡で観察する上で一般的な組み合わせである。エバネッセント場を蛍光顕微鏡法における蛍光励起照明として用いた手法は全反射蛍光顕微鏡 (TIR-FM<sup>5</sup>) と呼ばれる。この手法ではガラス近傍の蛍光分子のみを選択的に蛍光励起してイメージングすることができる。ガラス近傍より離れた場所に存在する蛍光分子は励起されず蛍光を発生させないため、バックグラウンドからのノイズを大きく軽減できる。

そのためこの手法は一分子計測によく用いられている。

### 2.3.2 全反射蛍光相関分光法の原理

照明としてエバネッセント場を用いる場合、光軸方向はごく限られた深さまでしか照明されない。一方、水平方向においてはエバネッセント場はほぼ一様に照明する。そこでピンホールを用いて水平方向の観察領域を制限すると、FCS に使用可能なレベルまで観測領域を制限することが可能となる。。 [8, 9]。この方法を全反射蛍光相関分光法 (TIR-FCS<sup>6</sup>) と呼ぶ。通常の FCS に用いられるガウシアンビームでは光強度が数波長程度の広がりを持つ正規分布に従って減衰するのに対して、エバネッセント場は  $50 \sim 200nm$  の距離で指数関数的に、急激に減衰する。

---

<sup>5</sup>Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy

<sup>6</sup>Total Internal Reflection with Fluorescence Correlation Spectroscopy

このため、観察領域の外部での蛍光励起がより少なくなり、バックグラウンドが低い信号を得ることができる。エバネッセント場の特性から界面近傍での現象の観察によく用いられている [10, 11]。また、本手法の別の利点としては、照明そのものは水平方向に一様に分布している点がある。ガウシアンビームを用いた場合、水平方向にも限られた場所しか照明励起されないため、複数点を同時検出するためには複数本のビームを入射する必要があった。一方、TIR-FCS では複数の検出器とピンホールを組み合わせる、あるいは面上に結像させてカメラで検出するなどの方法で容易に複数点の検出が可能といった利点が存在する。

### 2.3.3 解析方法

エバネッセント場を用いた FCS でも、ガウシアンビームを用いた場合と同様に自己相関関数 (式 1) を用いて解析が行われる。しかし、照明法が異なるため、式 3 の形が大きく異なる。Hassler らの解析 [12] によると、自己相関関数  $G(\tau)$  は以下の形で解かれる。

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{2N} \left(1 + \frac{p}{1-p}\right) e^{-\frac{\tau}{\tau_t}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{xy}}\right)^{-1} \left[ \left(1 - \frac{\tau}{2\tau_z}\right) w\left(i\sqrt{\frac{\tau}{4\tau_z}}\right) + \sqrt{\frac{\tau}{\pi\tau_z}} \right] \quad (15)$$

ここで  $w(x)$  は

$$w(x) \equiv \exp(-x^2) \operatorname{erfc}(ix) \quad (16)$$

で表わされる関数であり、また、 $\tau_{xy}$  および  $\tau_z$  はそれぞれ

$$\tau_{xy} = w_{xy}^2/4D, \tau_z = d^2/4D \quad (17)$$

で表わされ、それぞれ水平方向および光軸方向における分子の観測領域に対する平均通過時間である。 $G(0) - 1$  はガウシアンビームを用いた場合と同様、観測領域内に存在する平均分子数に対応するが、TIR-FCS の場合

$$G(0) - 1 = \frac{1}{2N} \quad (18)$$

となる点が異なっている。これは観測領域が光軸方向においては片方 (境界面側) が閉じていることに由来する。

## 2.4 空間分解能を持った蛍光相関分光法

節 2.2.2 述べたように、通常の FCS では分子からの蛍光を検出するのに APD や PMT といった点検出デバイスを用いる。これらの装置は 1 点のみを計測する装置であるため、通常の FCS では空間的な分布情報は得られない。FCS の計測から空間的な情報が得られるとしたら、細胞内の分子の動態分布が得られ、さらには近傍との蛍光相互相関分光法により分子の拡散の方向が得られる。これにより細胞中の各場所での分子間相互作用を一度に検出し、また細胞内の分子の輸送の様子をより詳しく調べることができる。そこで FCS に空間分解能を与える試みが近年なされている。

### 2.4.1 スキャニング FCS

FCS の観測領域は非常に微小であり、また解析に必要なデータを取得するために要する時間は数 ms ~ 数秒と短時間である。しじで観測領域の場所を移動させて複数回測定することで 2 次元あるいは 3 次元的分布をもった情報を得ることができる。この手法をスキャニング FCS (SFCS<sup>7</sup>) [13, 14, 15, 16] という。SFCS では非常に多数の点を計測することが可能であり、細胞内部や膜表面の [17] の分子動態の分布を明らかにすることができる。しかし、各点での計測データは原理上同時刻ではないため、膜タンパクの移動の場合など動きが非常に低速なケース [18] を除いて隣接した画素を比較し相互相関を取るなどの手法が使用できない。

### 2.4.2 アレイを用いた手法

高感度な CMOS [19] や APD [20, 21] を複数束ねたアレイを利用する手法も開発されている。この手法では複数点からの同時刻の観測データが得られるため、隣接した画素のデータ間の相互相関から分子がどの方向に移動したかの情報を得ることが可能である。しかし、この手法では観測できる点の数がアレイによって制限される。光学系や検出器のサイズによる制限、あるいはコストの問題からアレイの数を無制限に増やすことは不可能である。現実には  $8 \times 8$  個程度が限界となっ

---

<sup>7</sup>Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy

ている。Gösch らの手法では高々 $2 \times 2$ 画素であった。この画素数では細胞全体の複雑な挙動を一度に解析するには不足である。

### 2.4.3 電子増倍 CCD カメラを用いた手法

多点化と同時性を兼ね備えた手法として Burkhardt ら [22] や Kannan[23] らは電子増倍 CCD(EM-CCD<sup>8</sup>) カメラを検出器に用いる手法を提案した。本手法ではアレイを用いた場合と同様に各点における観測データが同時刻のものであるため、隣接した画素のデータ間の相互相関から分子がどの方向に移動したかの情報を得ることが可能である。一方、アレイの場合に問題であった観測領域の数も大幅に増加しており、細胞全体の動態を一度の計測で測定可能である。

表 1 空間的に拡張した FCS 計測手法の特徴、利点および欠点を示す。EM-CCD を用いた FCS では細胞全体を一度に計測可能であり、かつ各点における観測データが同時刻のものであるため相互相関法による比較が可能である。既存のスキャニング FCS およびアレイを持ちいた FCS の利点をあわせもっている。

計測手法	細胞全体のマッピング	同時刻の観測データ
一般的な FCS	×	×
スキャニング FCS		×
アレイを持ちた FCS		
EM-CCD を用いた FCS		

## 2.5 結言

この章では蛍光相関分光法の原理および様々な応用手法について述べてきた。FCS を空間的に拡張する手法の特徴を整理したものが表 1 である。これまで FCS による細胞内分子の動態計測において細胞全体を隈なく、かつ厳密に同時刻に測

<sup>8</sup>Electron Multiplying Charge-Coupled Device

定する手法は存在しなかった。しかし、EM-CCD カメラを用いることでこれらの点が両立可能となる。これにより、細胞内分子の動態解析に非常に役立つと考えられる。そこで次章以降ではEM-CCD を用いた蛍光相関分光イメージングの装置、手法および問題点について述べていく。

## 3. 電子増倍 CCD カメラを用いた蛍光相関分光イメージング装置の開発

### 3.1 緒言

まず EM-CCD を用いた FCS を評価するにあたって装置の開発を行った。本章では装置の概略と評価実験について述べる。

### 3.2 装置概要

開発した EM-CCD ベースの FCS 測定装置の概略図を図 5 に示す。装置の母体となっているのは倒立顕微鏡 (ニコン社 TE2000-U) である。対物レンズには 60 倍の油浸レンズ (ニコン社 PlanApo TIRF, NA 1.45) を用いている。レーザー光はシングルモードファイバーを経由して顕微鏡内に導かれる。照明に用いるレーザーは波長  $\lambda = 488nm$  のアルゴンイオンレーザーか  $\lambda = 532nm$  の  $2\omega$  Nd:YAG レーザーから選択可能である。レーザーは対物レンズを介してカバーガラスに対して斜めに入射される。ファイバーの射出端は一軸ステージ上にこていさされており、ステージの位置を変更することで入射角を調節することが可能である。入射光および散乱光、蛍光はダイクロイックミラーとバンドパスフィルタが入ったフィルターキューブを通過し、分離される。フィルターキューブには励起用フィルター (ニコン社 B2A  $\lambda = 488nm$  用 あるいは G2A  $\lambda = 532nm$  用 ) を用いた。サンプルからの蛍光は EM-CCD カメラ (浜松ホトニクス社 C9100-02) 上に結像し、計測される。この EM-CCD の性能は  $1000(H) \times 1000(V)$  画素で  $35MHz$  の転送レートであり、最高解像度の画像を毎秒 30 フレーム取得できる。計測速度と感度を上げるため、 $16 \times 16$  ハードウェアビニングを使用した。この場合  $16 \times 16$  画素あるいは  $32 \times 32$  画素では  $3ms/frame$ 、 $62 \times 62$  画素では  $4ms/frame$  の速度で画像を取得できる。EM-CCD の画素サイズは  $8.0 \times 8.0 \mu m^2/pixel$  であり、 $16 \times 16$  ビニング時では  $128 \times 128 \mu m^2/pixel$  となる。対物レンズが 60 倍であるので、サンプル上での 1 画素あたりの面積は  $2.1 \times 2.1 \mu m^2/pixel$  となる。制御にはメーカ製のソフトウェア (Aquacosmos、浜松ホトニクス社) を用いた。

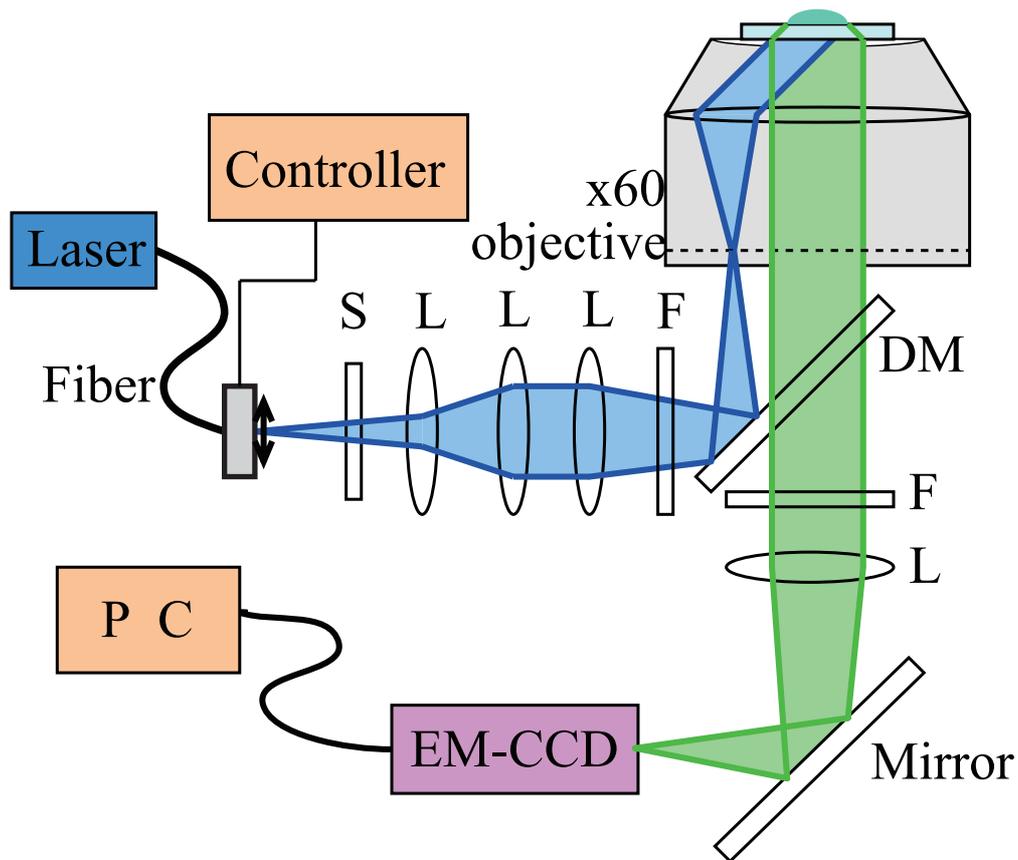


図 5 EM-CCD ベースの FCS 装置の概略図を示す。S: シャッター、L: レンズ、DM: ダイクロイックミラー、F: バンドパスフィルター、M: ミラー

### 3.3 評価実験

開発した装置の評価をおこなうため、濃度および粒径が既知の蛍光粒子の溶液を利用して評価実験を行った。サンプルには直径 100nm の赤色蛍光粒子 (Duke Scientific 社 R100) を利用した。正しくの濃度が測定できることを示すために、3種類の濃度の異なるサンプルを利用した。その構成を表 2 に示す。光軸方向における観測領域の大きさを限定するため、サンプルは図 6 のように 2 枚のカバーガラスで挟み込んだ状態で計測した。この際、高さを調節するために直径  $3\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズ (日新 EM 社) を 10000 倍に希釈して混入した。これによりカバーガラス間の距離は  $3\mu\text{m}$  となる。

表 2 使用したサンプル DW: 超純水; PS: ポリスチレンビーズ溶液 (100 倍希釈)

濃度	R100	DW	PS
1/1	396 $\mu\text{L}$	0 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
1/4	100 $\mu\text{L}$	296 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
1/16	25 $\mu\text{L}$	371 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$

観測領域の水平方向への大きさは、EM-CCD の画素、ビニング倍率および対物レンズの倍率から  $2.1 \times 2.1 \mu\text{m}$  となる。光軸方向は、カバーガラスによるサンドイッチ構造のため  $3\mu\text{m}$  である。よって観測領域の体積は  $13 \text{ fL/voxel}$  となる。 $16 \times 16 \text{ pixel}$  の画像を  $3\text{ms/frame}$  で 16384 枚 (約 50 秒) 取得した。取得した画像の例を図 7 に示す。画像の中心部 (座標 (7,7)) において計算した自己相関関数を図 8(a) に示す。また、それより求めた観測領域内の粒子数  $N$  と濃度の関係を図 8(b) に示す。濃度が測定できることが示された。

図 3.3 では、EM-CCD 上の異なった 9 点における自己相関関数の計算結果を示している。サンプル溶液は画像上のすべての点で均一であるため、各点における計算結果は同じになることが見込まれる。また、結果もそのようになっている。この結果、EM-CCD 上のすべての点で計測が可能であることが示された。

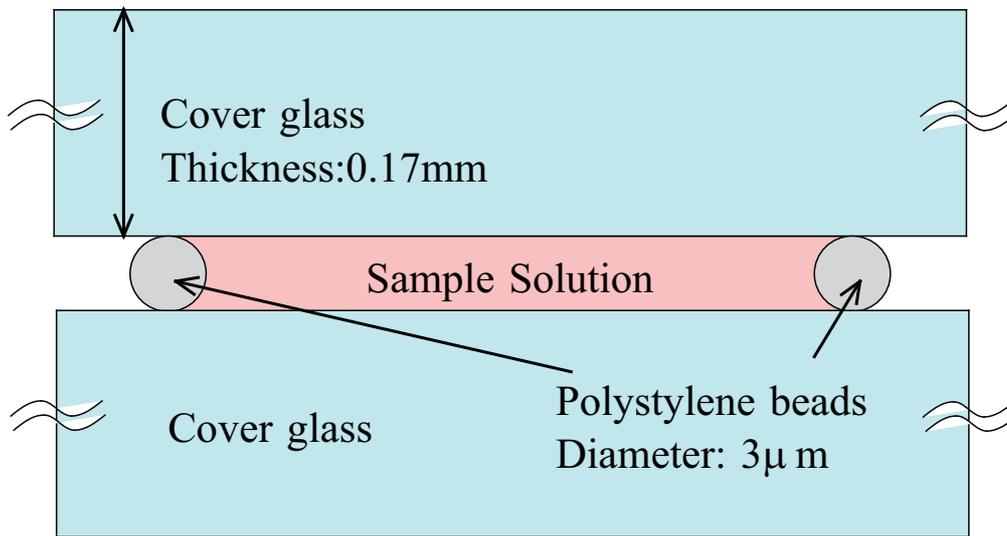


図 6 サンプルは図のようにカバーガラス 2 枚で挟み込んだ。ポリスチレンビーズによりカバーガラス間の間隔は  $3\mu\text{m}$  となる。

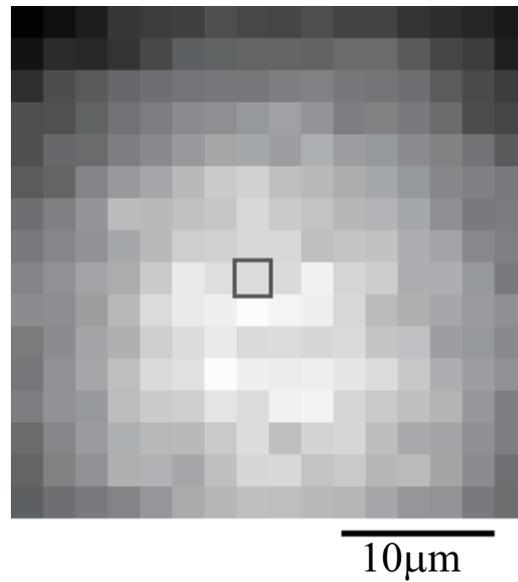


図 7 計測した画像の例。

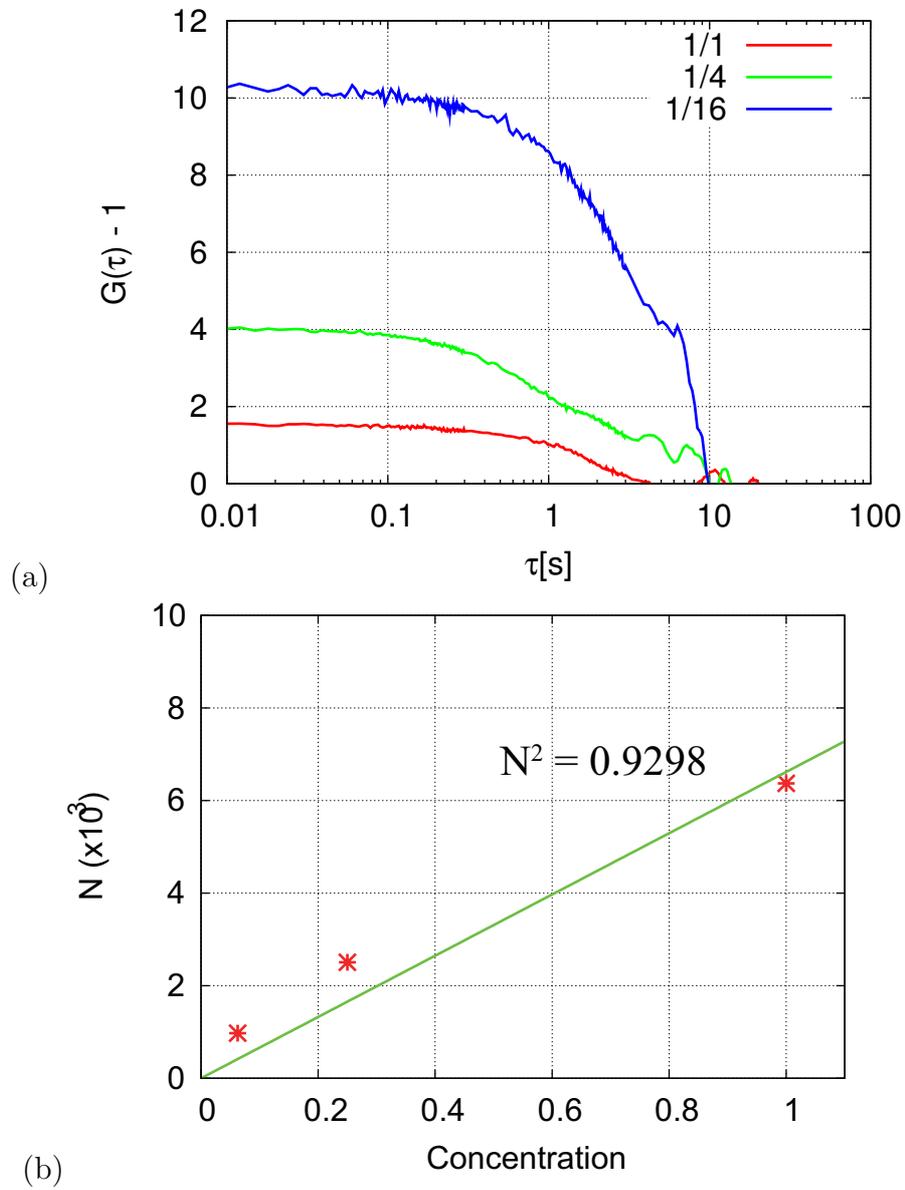
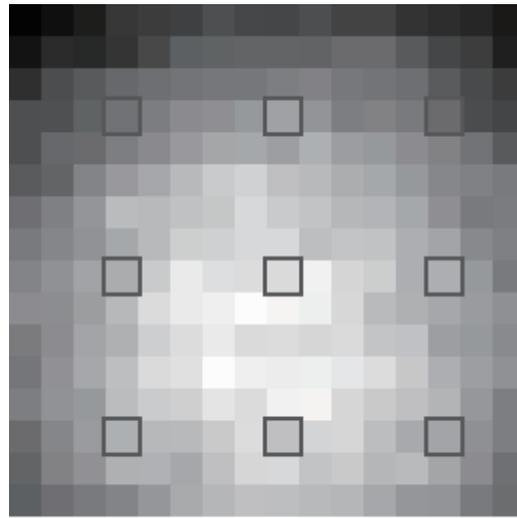


図 8 EM-CCD を用いた蛍光相関分光イメージング装置の評価実験結果。(a) 座標 (7,7) における各濃度での自己相関関数曲線。(b) 自己相関曲線から求めた観測領域内の分子数  $N$  と濃度の関係図。



10 $\mu$ m

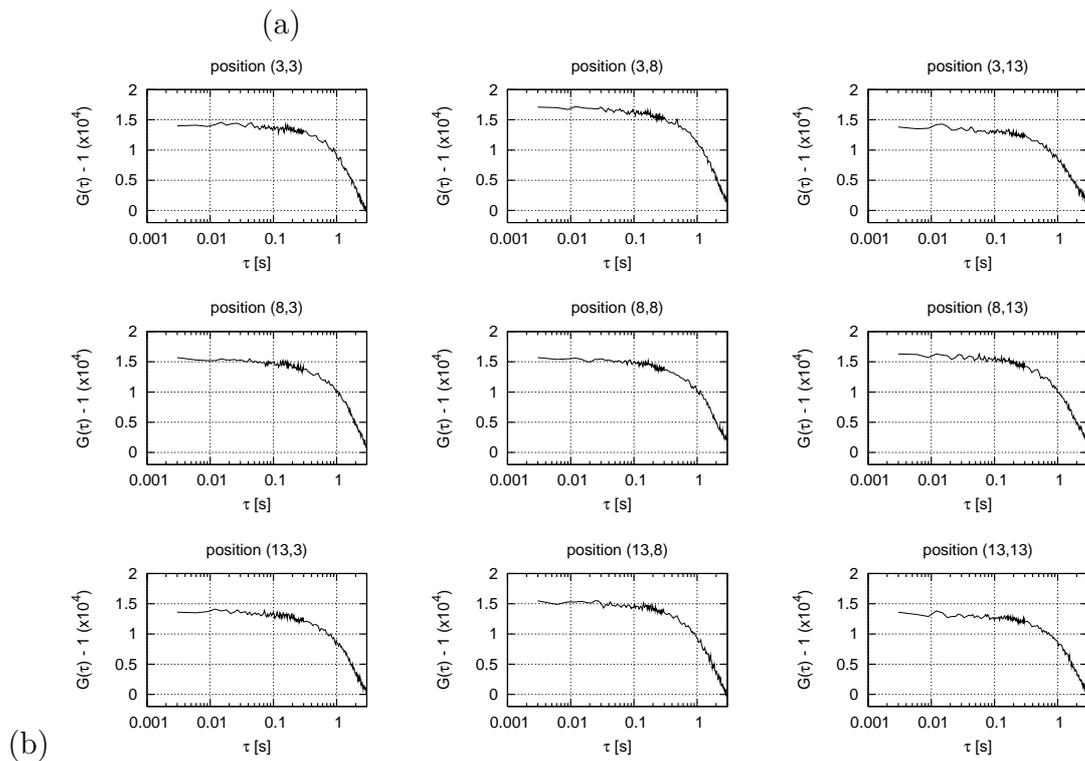


図 9 画像上の複数点における自己相関関数曲線の取得例。

(a) 比較に使用した場所。

(b) 各点における自己相関関数曲線を示す。

### 3.4 装置の問題点

前節まででは開発した EM-CCD を用いた蛍光相関分光イメージング装置とその評価実験について述べた。本装置では  $32 \times 32$  画素の画像を  $3\text{ms}/\text{frame}$  の速度で取得し、それぞれの点で FCS による解析を行うことができることが分かった。一方で本装置における問題点、限界などについても判明したのでここで述べる。

#### 3.4.1 光軸方向における観測領域を制限する手法

FCS の計測を行うためには観測領域を制限する必要があることはすでに述べた。本装置を用いた場合、水平方向については観測領域の大きさは EM-CCD の画素サイズによって限定される一方、光軸方向についてはそのままでは無制限である。これを限定するために本章の実験ではサンプル側で制限する手法を用いた。しかし、細胞など生体サンプルを用いた実験ではサンプル側での制限は困難である。そこで、照明法などで光軸方向の観測領域の制限を行う必要がある。本装置で容易に実現でき、かつ光軸方向の制限を行える照明法としては節 2.3 で述べたエバネッセント照明が挙げられる。しかし、エバネッセント照明にはさらなる問題点が存在している。これについては次章以降で詳しく述べる。

#### 3.4.2 ノイズ

既に述べたように、通常の FCS では蛍光のゆらぎを検出するのに APD や PMT を用いる。その理由の一つにはこれらの装置は一分子の出入りによる微小な蛍光強度の変化を高感度、高 S/N 比<sup>9</sup>で観測できるからである。本装置では APD や PMT に換えて EM-CCD を用いるため、量子効率の低さとノイズが大きな問題となった。本実験では EM-CCD で発生するノイズの中でも読み出し時に発生する熱雑音の影響を少しでも軽減するために複数画素を纏めて 1 画素として読みだすハードウェアビニングを最大限利用している。また、励起光の強度を大きくして蛍光強度を大きくする必要があったが、そのため蛍光色素の褪色や熱によるダメージの問題が発生しうる。

---

<sup>9</sup>signal to noise ratio

### 3.4.3 時間分解能

EM-CCD による FCS において最も大きな欠点は時間分解能の低さである。蛍光強度のゆらぎの速さ  $\tau_D$  より十分に速い間隔でデータを取得する必要がある。APD や PMT では数 10ms 間隔という超高速でデータを取得できたが、本装置では高々数 ms 間隔でしか取得できない。時間分解能が非常に遅いため、計測の条件を揺らぎが遅くなるような状態で計測する必要がある。揺らぎの速度は蛍光分子が領域内に存在する平均時間  $\tau_D$  で表わされる。 $\tau_D$  は式 (9) と (10) から

$$\tau_D = \frac{3\pi r\eta w^2}{2\kappa_B T} \quad (19)$$

となる。式に出てくる変数のなかで実験系あるいは実験対象によって大きく変化するものは分子の半径  $r$  と観測領域の大きさ  $w$ 、粘性抵抗率  $\eta$  である。特に観測領域は 2 乗の効率で揺らぎの速度に影響を与える。そのため観測領域を大きくすれば揺らぎの速度は大きく低下する。

### 3.4.4 空間分解能

前節で述べたように、時間分解能が劣る本装置では、大きく重い粒子を計測対象とする、粘性率が大きい観測対象である、あるいは観測領域を大きくした状態での計測するといった工夫が必要である。本論文の実験では、観測領域を  $2.1 \times 2.1 \mu\text{m}$  という大きさに設定した。これは既存の FCS 手法における観測領域の幅 (およそ 500nm) に比べて数倍であり、光学顕微鏡における分解能限界 (波長  $\lambda = 488\text{nm}$ 、対物レンズの開口数  $NA = 1.45$  の場合 205nm) の 10 倍という大きさである。真核細胞の大きさはおよそ  $5 \sim 100 \mu\text{m}$  であるため、この分解能では測定が困難であると考えられる。ただし、粘性が大きい場合などの理由で分子の拡散係数が小さい場合、より小さな観測領域でも測定が可能である。細胞内液は一般に水より粘性率が高く拡散係数は小さくなり、測定が容易になる。低速な能動輸送も本装置で測定可能であると思われる。また、膜上における流動は水中にくらべ非常に低速であるため、高分解能で測定可能である可能性が高い。

### 3.4.5 画素数

EM-CCD の時間分解能はデータ読み出し速度（本装置では 35Mhz/pixel）および読み出しライン数により制限される。読み出しライン数を増やせば時間分解能は著しく低下する。そのため、利用できるライン数を下げる必要があり、一度に測定できる画素数が減少する。画素数  $32 \times 32$  pixel では 346frame/s (2.9ms/frame)、 $62 \times 62$  pixel では 262 frame/s (3.8ms/frame) の速度で読み出せるが、 $250 \times 250$  では 101frame/sec (9.9ms/frame)、最高画素数である  $1000 \times 1000$  では 30.1frame/sec (33ms/frame) と非常に遅い速度でしか読み出せない。そのため、実用となるのは  $62 \times 62$  pixel までである。アレイを用いた場合に比べると非常に多くの点を計測できるが、細胞の形状を認識するには不十分である。

### 3.4.6 その他の問題

画素数が少ないため鮮明な像が得られないので、焦点を合わせる作業が非常に難しい。

## 3.5 結言

本章では、開発した EM-CCD を用いた蛍光相関分光イメージング装置とその評価実験および限界点について述べた。本装置では  $32 \times 32$  画素の画像を 3ms/frame の速度で取得し、それぞれの点で FCS による解析を行うことができる。次章以降ではこの章で述べなかった照明法による光軸方向の制限の問題点についての詳細と、EM-CCD による同時多点計測の利点を生かした隣接画素比較方法について述べる。

## 4. 蛍光相関分光イメージングによる異方性解析

### 4.1 緒言

この章ではEM-CCDの特性を生かした隣接画素比較による水平方向に特化した動き検出手法の検討について述べる。EM-CCDによる計測では各画素からの計測データが完全に同時刻のものである。そのため、蛍光相互相関分光法 (FCCS<sup>10</sup>) による比較によ隣接画素方向への移動を検出可能であると考えられる。

### 4.2 観測領域の形状と感度の関係

観測領域の形状も特定方向の動きの検出に影響を与える。もし観測領域の形状が、ある方向だけ薄い扁平な形状であるとする。蛍光強度の揺らぎは蛍光分子が観測領域からの出入りのすることによって発生するが、扁平な観測領域では薄くなっている方向への出入り回数が圧倒的となり、観測結果はその方向の動きに支配される。この場合、薄い方向の動きの場合を特異的に検出できるが、他方でそれ以外の方向における計測は不可能となる。なぜなら、自己相関関数  $G(\tau)$  から導かれる拡散時間  $\tau_D$  は、図2上でも示されているように  $G(\tau)$  が切片の半分になるときの  $\tau$  であり、 $G(\tau_D) - 1 = \frac{1}{2}(G(0) - 1)$  の解である。 $G(\tau)$  は溶液中での測定の場合、式(6)から

$$\left(\frac{\tau}{\tau_x + \tau}\right)^{1/2} \left(\frac{\tau}{\tau_y + \tau}\right)^{1/2} \left(\frac{\tau}{\tau_z + \tau}\right)^{1/2} = \frac{1}{2} \quad (20)$$

の解となる。両辺を二乗し逆数をとると、この関数は

$$\left(\frac{1}{\tau_x} \tau_d + 1\right) \left(\frac{1}{\tau_y} \tau_d + 1\right) \left(\frac{1}{\tau_z} \tau_d + 1\right) = 4 \quad (21)$$

となる。もし、特定の方向、仮にZ軸方向に扁平な形状であった場合、 $w_x, w_y \gg w_z$  なので  $\tau_x, \tau_y \gg \tau_z$  となり、

$$\frac{1}{\tau_x}, \frac{1}{\tau_y} \ll \frac{1}{\tau_z} \quad (22)$$

<sup>10</sup>Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy

となるため、式 (21) は

$$\left(\frac{1}{\tau_z}\tau_d + 1\right) = 4 \quad (23)$$

となる。これは Z 軸方向以外の要素が解に影響を与えておらず、その方向の動きを検出できないことを意味している。これらの条件を整理すると、ある特定の方向の動きのみを検出したい場合、

1. 観測領域の形状が、計測したい方向のみが薄い扁平状である。
2. もしくは、以下の条件を両方満たしている。
  - (a) 計測したい方向の動きの方向に同時刻における観測データが存在する。
  - (b) 観測領域の形状が、計測したい方向以外の方向が薄い形状にはなっていない。

という条件が必要となる。

### 4.3 EM-CCD を用いた場合

この節では EM-CCD を用いた FCS 計測で特定方向の動きを検出できるか検討する。EM-CCD から得られる画像は水平方向にのみ分布をもつ 2 次元のデータであるため、前節の条件 2(a) を満たすのは水平方向のみである。そこで、ここでは水平方向の動き検出についてのみ検討する。EM-CCD の画素は正方形であるため、条件 1 は満たさない。そのため、条件 2b から観測領域が光軸方向に薄すぎると異方性検出が不可能となる。

### 4.4 異方性検出に必要な照明深さ

EM-CCD による測定では観測領域の水平方向の幅  $w_{xy}$  は CCD の画素サイズおよび対物レンズにより決定され、 $1 \sim 2\mu\text{m}$  である。また、光軸方向の厚み  $\tau_z$  は照明に依存する。つまり、照明の侵入長が深い必要がある。ここで、具体的にどの程度の照明の侵入長が必要であるのかを計算により調べた。直径 50nm(拡散係

数  $D = 4.90 \times 10^{-12} m^2/s$  の粒子が拡散している様子を想定した。粒子の濃度は次に述べる観測領域内の平均分子数が 1 になるように (常に  $N = 1$ ) 想定した。幅  $w_{xy}$ 、深さ  $w_z$  の表面上の観測領域を想定し、式 15 を用いて  $G(\tau_D) = 1.5$  となる  $\tau_D$  を求めた。計算には Microsoft Excel 2007 のマクロ機能を用いた。結果を図 10 に示す。観測領域の水平方向の幅  $w_{xy}$ 、光軸方向の厚み  $w_z$  および粒子の平均滞在時間  $\tau_D$  との関係図を示す。同一の  $w_z$  に対して  $w_{xy}$  を変化させても  $\tau_D$  が変化しない場合、 $\tau_D$  は光軸方向の動き支配され、水平方向への感度を失う。逆に線形に変化する場合は  $\tau_D$  は水平方向の動き支配され、光軸方向への感度を失う。つまり水平方向の動きを検出するためにはグラフが最低でも水平でない、できれば線形に変化している範囲内の観測領域形状を用いる必要がある。水平方向の幅 ( $w_{xy}$ ) は  $1 \sim 2 \mu m$  であるので、図 10 から観測領域の厚みは最低でも  $300 nm$  以上、できれば  $1 \mu m$  あることが必要である。

#### 4.5 既存手法の問題点

これまで EM-CCD など複数点を同時に観測する手法ではエバネッセント照明が用いられてきたが、エバネッセント照明の場合、2 章で述べたように厚みは  $50 \sim 200 nm$  しかない。前節で述べたように水平方向の動きを検出するためには観測領域の厚みが最低でも  $300 nm$  以上必要である。そのため、エバネッセント照明は EM-CCD を用いた FCS による水平方向の動き検出に用いるのは困難である。

#### 4.6 臨界角照明法

以上に述べた問題点を解決すべく、新しい照明法を考案した。エバネッセント照明法では入射光が全反射するように境界面に対して深い角度で斜めに入射する。ここで入射角を全反射をおこす臨界角  $\theta_{crit}$  より小さくすると入射光はどのような振る舞いをするか考察する。入射光は境界面を通過し屈折して入射角  $\theta$  より大きな角度  $\varphi$  で進む。 $\theta$  を  $\theta_{crit}$  に近づけると  $\varphi$  も大きくなり屈折光は境界面とほぼ平行に進む。この状態では屈折光はエバネッセント場と同様に表面近傍のみを照明している。この様子を図 11 に示す。照明の深さは角度  $\varphi$  (入射角  $\theta$  に依存する) と

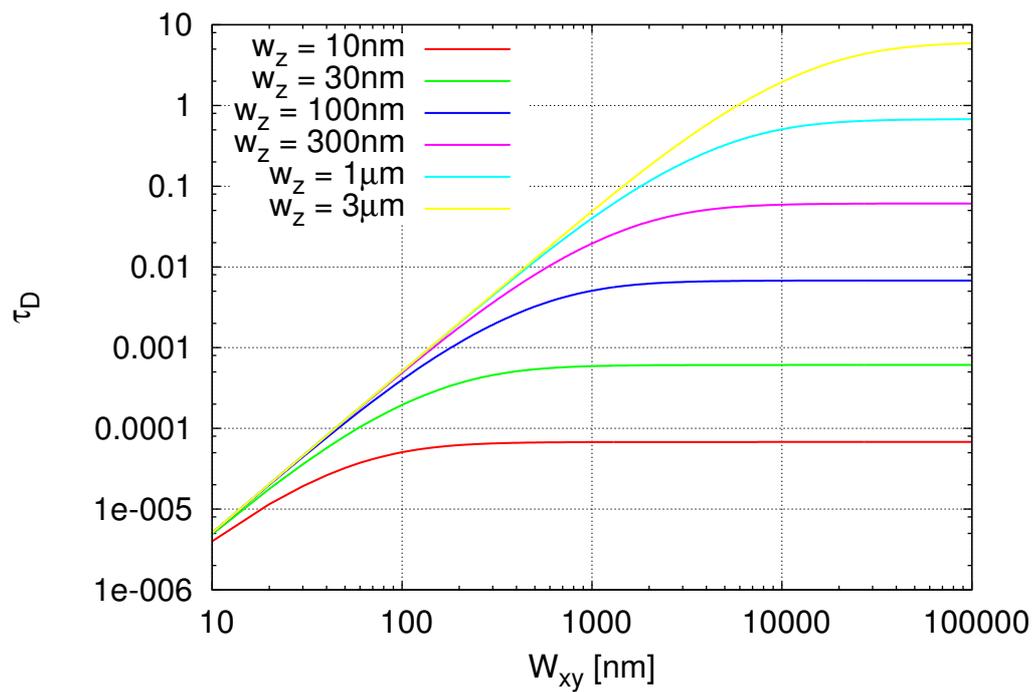


図 10 観測領域の水平方向の幅  $w_{xy}$ 、光軸方向の厚み  $w_z$  および粒子の平均滞在時間  $\tau_D$  との関係図を示す。同一の  $w_z$  に対して  $w_{xy}$  を変化させても  $\tau_D$  が変化しない場合、 $\tau_D$  は光軸方向の動き支配され、水平方向への感度を失う。逆に線形に変化する場合は  $\tau_D$  は水平方向の動き支配され、光軸方向への感度を失う。

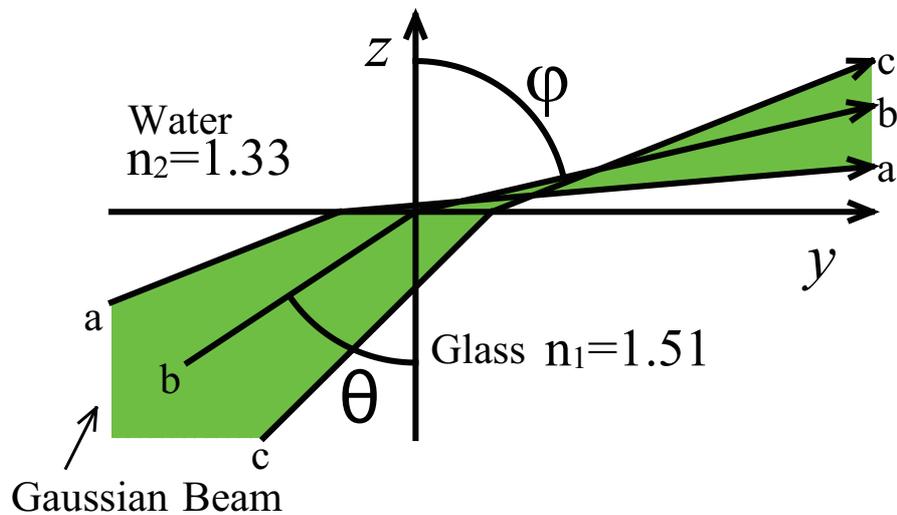


図 11 臨界角照明法の概要を示す。入射角  $\theta$  を臨界角  $\theta_{crit}$  より少し小さな角度にすることで入射光は屈折し、境界面とほぼ平行に進んで表面近傍のみを照明する。

座標  $x$  に依存していると考察され、 $\theta$  を調節することにより深さを調節できると考えた。この深さはエバネッセント照明よりは大きくなると思われる。また、屈折光は角度  $\phi$  と斜めに進むため、その照明深さは場所により大きく異なることが予測された。これを軽減するため、光を絞りながら入射することを考案した。図 11 のように絞りながら入射することで、系の外側側 ( $a - a'$ ) では角度が大きくなり、内側 ( $c - c'$ ) では小さくなるため場所による差を軽減できると考える。この新しい照明手法を「臨界角照明法」と名付けた。

#### 4.7 結言

本章では、EM-CCD を用いた FCS によって水平方向の動きを検出する方法について述べた。その中で既存の手法であるエバネッセント照明法を用いることは困難であることを示し、それに代わる新たな照明法として「臨界角照明法」を提案した。臨界角照明法は全く新規の手法であり、その特性等は未知である。そこで、次章以降ではその特性の調査について述べる。

## 5. 蛍光相関分光法による臨界角照明の深さの測定

### 5.1 緒言

臨界角照明法は新たに開発した手法であり、その特性等は全くの未知である。FCSの解析手法は照明方法に依存しており、その特性を把握、確認しないと利用できない。そこで実験および数値解析によりその特性の解明を行った。本章ではその中で実験による臨界角照明の特性の調査について述べる。

### 5.2 実験手法

実験には本論文で開発した EM-CCD を用いた FCS イメージング装置を用いた。前節で FCS による解析には照明方法に関する情報が不可欠であると記したが、例外的に式 18 を用いた解析では観測領域形状や照明に依存せず、観測領域内の分子数  $N$  を求めることができる。そこで濃度が既知の蛍光粒子溶液を計測し、観測領域内の分子  $N$  を通じて観測領域の形状、すなわち臨界角照明の深さを求めた。サンプルには直径 100nm の赤色蛍光粒子 (Duke Scientific 社 R100) を 100 倍希釈したものを利用した。サンプル粒子は水中 (屈折率 1.33) に拡散させ、カバーガラス上 (屈折率 1.51) に載せて測定した。カバーガラスとのサンプルとの境界面 (臨界角  $61.7^\circ$ ) で屈折し、臨界角照明を発生させる、計測は解像度  $32 \times 32$ 、画素サイズ  $2.1 \times 2.1 \mu\text{m}$  (サンプル上) で行い、入射角を変化させながらそれぞれの角度で 4096 枚画像を取得し、解析を行った。

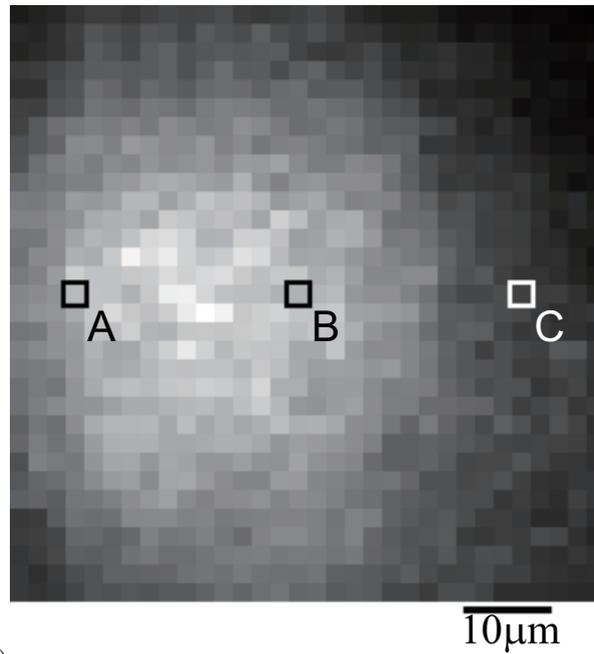
### 5.3 結果

図 12(a) に計測により得られた画像例を示す。光は図上 A から C の方向に斜めに入射している。臨界角照明では場所により照明明るさにムラが生じていることが確認できる。図 12(a) 上の 3 点 (A,B,C) について式 18 から粒子数  $N$  および観測領域の深さ  $w_z$  をもとめ、それぞれの入射角に対してプロットした結果を図 12(b) に示す。入射角を臨界角に近づけるにつれ、照明が到達する深さ  $w_z$  が小さくな

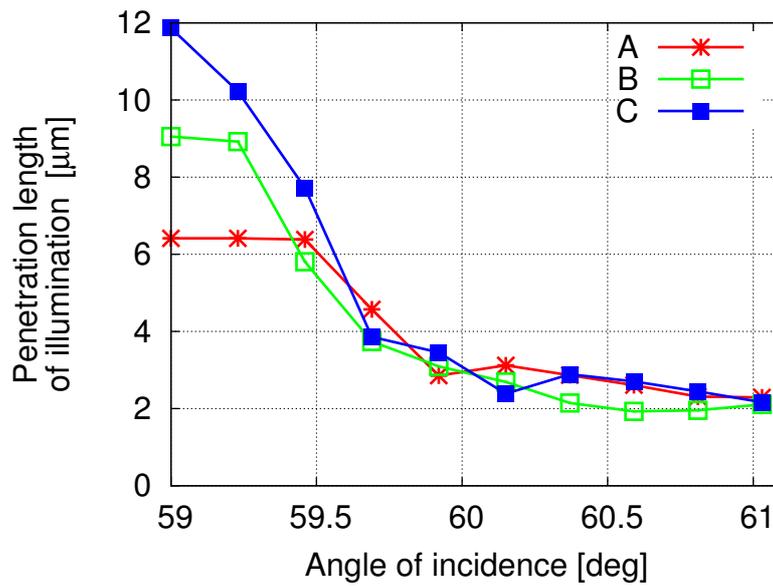
ることが判明した。また、場所による照明の深さの差は、入射角  $59.5^\circ$  以上ではごくわずかであることも判明した。

## 5.4 結言

この章では臨界角照明法の特徴について実験により調査した。臨界角照明法の特徴として入射角を臨界角に近づけるにつれ、照明が到達する深さ  $w_z$  が小さくなることが判明した。これにより入射角を調整することにより  $w_z$  を調節できる。また、斜めに入射することにより場所により照明が到達する深さに差が生じることが懸念されたが、実験の結果入射角を臨界角に近づける(水 - ガラス系の場合  $59.5^\circ$  以上) ことにより軽減できることも分かった。この実験結果を確かなものとするため、臨界角照明法の数値解析によるシミュレーションを行い、結果が一致することを確認したので次章にて述べる。



(a)



(b)

図 12 (a) EM-CCD を用いた FCS イメージング装置に臨界角照明法を用いた画像の例。これは入射角  $59.4^\circ$  による臨界角照明により撮像したものである。図上の点 A-C において観測領域内の分子数  $N$  から照明深さ  $w_z$  を測定した。(b) 図 (a) 上の 3 点 A-C で求めた照明深さと入射角との関係図。

## 6. 時間領域差分法による臨界角照明の深さの分析

### 6.1 緒言

この章では臨界角照明法における電場分布の数値解析について述べる。

解析手法には時間領域差分法 [24, 25](FDTD<sup>11</sup>) を用いた。FDTD とはマクスウェルの方程式を空間および時間領域での差分方程式に展開したものをを用いて空間上の電磁波の解析を行う手法である。FDTD ではまず空間を微小立方体 (セル) に分割する。そしてすべてのセルに対して差分方程式を適用して電磁波の空間および時間的伝搬を数値解析する [25]。

### 6.2 計算条件

解析には市販のソフトウェア (Sim3d.MAX、米 Nonlinear Control Strategies Inc 社) を用いた。入射光には波長 488nm、半値全幅 20  $\mu\text{m}$  のガウシアンレーザーを仮定した。また入射光は収束しながら入射すると仮定した。その際の収束角は 1.4° である。光はカバーガラス (屈折率  $n_1 = 1.51$ ) から水 ( $n_1 = 1.33$ ) へ入射していると仮定した。この条件では臨界角は 61.7° である。FDTD の計算におけるセルサイズは 50nm とし、入射角 60.0°、59.5°、59.0° の 3 条件について電場強度の空間的分布を計算した。

### 6.3 結果

図 13 ~ 15 にそれぞれの角度における臨界角照明の電場強度の分布についての計算結果を示す。各図 (a) の下部で縞模様の部分は入射波と反射波の合成による定在波である。各図 (a) では入射光は境界面を超えたのち屈折して境界面近傍のみを照明している様子がわかる。また、その深さは入射角が臨界角を離れるにつれて大きくなっている。各図 (b) では入射光の進行方向 (x 軸) に沿った各点 ( $x = -10 \mu\text{m}$ ,  $x = 0 \mu\text{m}$ ,  $x = +10 \mu\text{m}$ ) における照明強度の深さ方向と電場強度との関

---

<sup>11</sup>Finite Difference Time Domain method

係をグラフ上の点で示す。この結果、x 軸上の場所による入射光の深さの差は入射角が臨界角に近づくにつれ軽減されることが分かった。特に入射角  $60.0^\circ$  ではほぼ等しくなる。また、各図 (b) 上の実線は電場強度が深さに対して指数関数的に減少するとみなして近似したものである。入射角  $59.0$  の場合を除き、指数関数でよく近似できている。一方、入射角  $59.0$  では指数関数から大きく離れ、入射光のプロファイルであるガウシアン分布に近づく。

[p] [p]

## 6.4 結言

この章では臨界角照明の振る舞いについての FDTD によるシミュレーションを述べた。結果、図 13 ~ 15 で解るように境界面から  $0.5 \sim 2\mu\text{m}$  が照明されることが分かった。また、その深さは入射角  $\theta$  により変化することも分かった。これらの結果は初期の考察および実験結果 (図 12) と一致する。また、臨界角に近い状態では場所による深さの差異は小さいことも分かった。この結果も実験結果 (図 12) と一致し、臨界角照明がより利用しやすいことを示す。また、臨界角に近い状態では、光強度は境界面からの距離に対して指数関数的に減衰することも分かった。これはエバネッセント照明と同様であり、その理論が容易に応用可能であることを意味する。

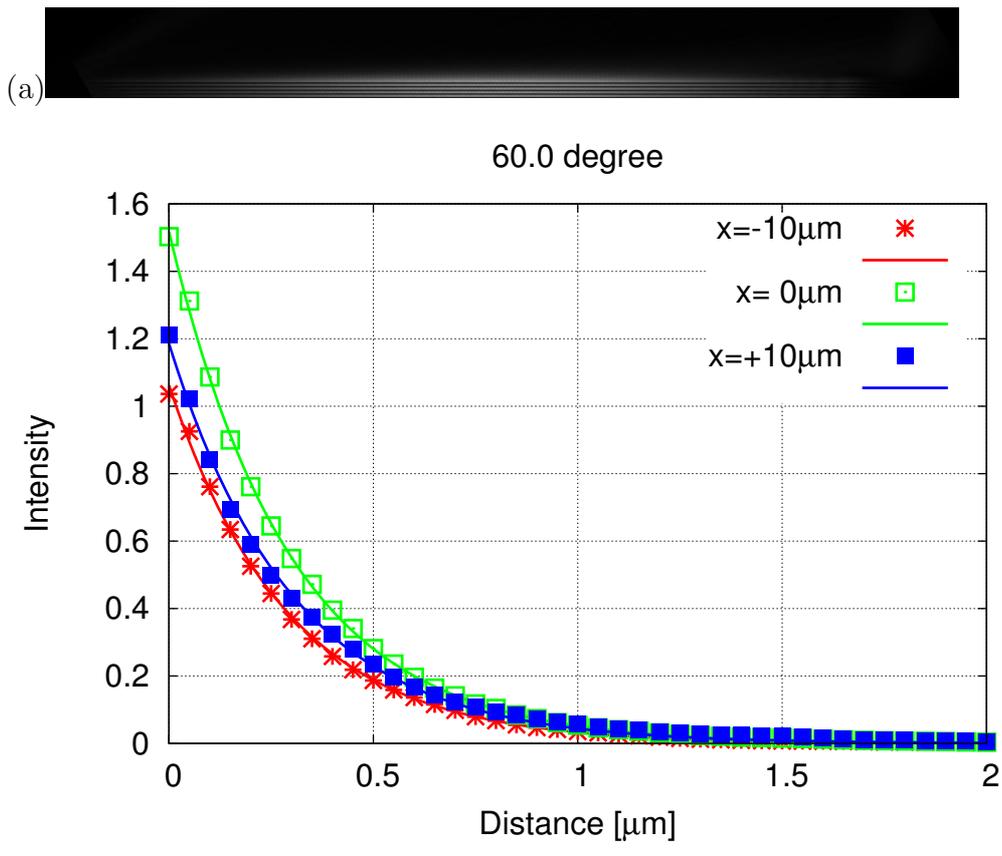


図 13 FDTD による電場強度強度分布の解析結果 (入射角  $60.0^\circ$ )

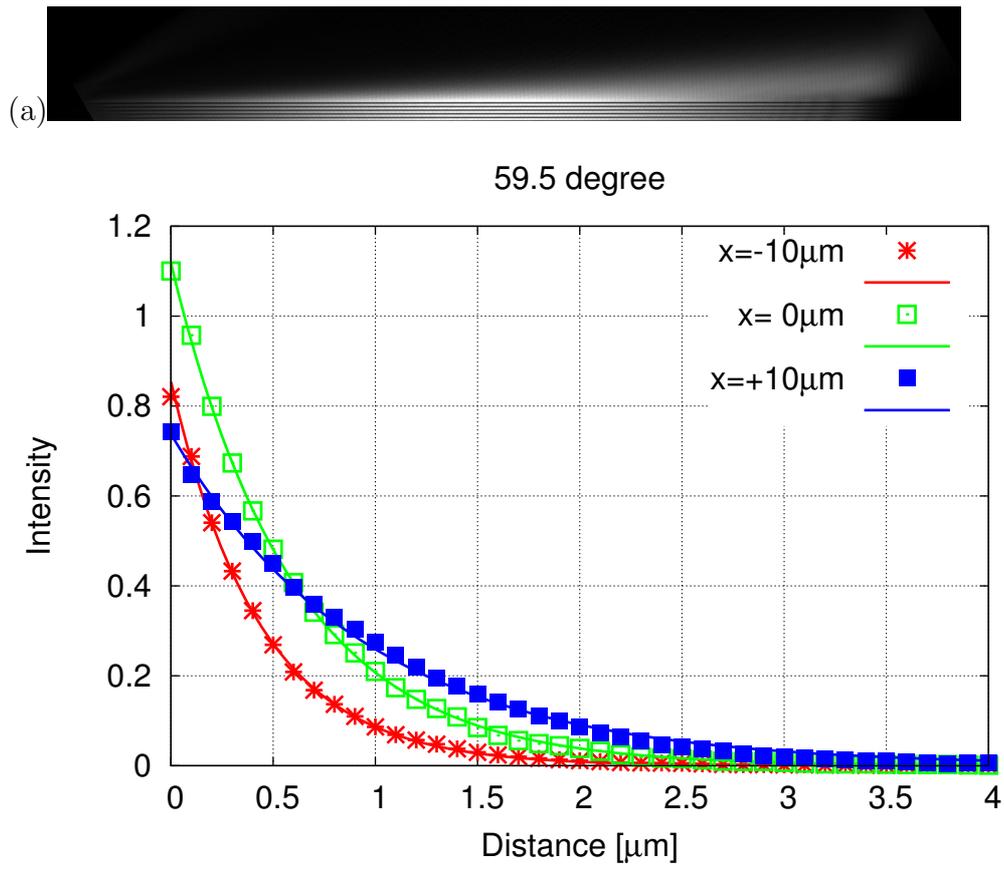


図 14 FDTD による電場強度強度分布の解析結果 (入射角  $59.5^\circ$ )

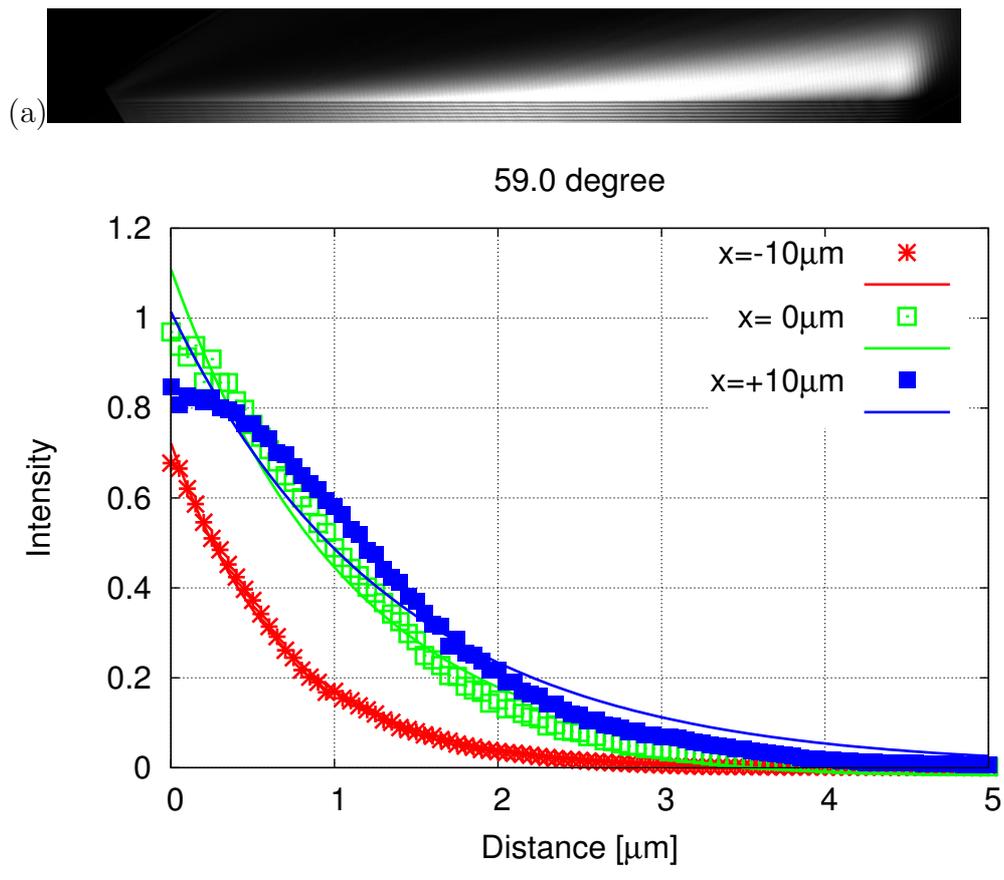


図 15 FDTD による電場強度強度分布の解析結果 (入射角  $59.0^\circ$ )

## 7. まとめ

本研究では EM-CCD を用いた蛍光相関分光イメージング装置を開発した。本装置では解像度  $32 \times 32$  pixel では  $3\text{ms}/\text{frame}$ 、解像度  $64 \times 64$  pixel では  $4\text{ms}/\text{frame}$  の速度で連続した画像を取得し、FCS による解析を行うことが可能である。本手法の利点としては

- APD や CMOS アレイに比して極めて多数の点を同時観測可能であり、細胞全体を隈なく観察できる。
- スキャニング FCS と異なり、それぞれの画素からの観測データが厳密に同時刻のものであるため、相互相関法などを用いた比較が可能である。

といった点がある。

また、特に 2 番目の利点を生かして隣接画素間の比較により分子の水平方向の動きのみを検出する方法について検討を行った。しかし、既存の照明手法であるエバネッセント照明法を用いて観測した場合、侵入長が画素サイズより著しく小さいため、いびつな形状の観測領域となり、水平方向の動き計測が困難であることが判明した。

この問題を解決するために、新たな照明方法である臨界角照明法を開発し、その特性を FDTD によるシミュレーション、FCS による実験双方から検証した。以下の点については双方の結果が一致し、その特性が確認された。

- 入射角を変更することにより侵入長を調節可能である。
- 斜めに入射するため場所により侵入長に差が生じる。
- しかし、入射角を臨界角に近づける (水 - ガラス系 (臨界角  $61.6^\circ$ ) の場合、入射角  $59.5^\circ$  以上) とその差は軽微となる。

また、FDTD による解析結果から、水 - ガラス系の場合入射角  $59.5^\circ$  以上だと生じる光の場の強度は境界面からの距離に対して指数関数的に減衰することが分かった。入射角  $59.5^\circ$  以上だと場所による侵入長の差異が小さくなることと合わせると、入射角  $59.5^\circ$  以上の場合のみを臨界角照明法と再定義することにより、以下の特徴をもった照明法であるとみなせる。

- 入射角を変更することにより侵入長を調節可能である。
- ほぼ均一に照明可能である。
- 境界面からの距離に対して指数関数的に減衰する。
- エバネッセント照明より深くまで到達する。

上記のうち最後の点を除くと、この特徴はエバネッセント照明の特徴と一致する。つまり臨界角照明法はエバネッセント照明の拡張として利用することが臨界角照明法を用いた蛍光相関分光イメージングは TIR-FCS の理論を援用することが可能である。一方で  $1\mu\text{m}$  と非常に深くまで到達し、立方体に近い形状の観測領域を実現できる。これは図 10 から考察すると水平方向によく感度を持った観測領域の形状であり、水平方向の動き検出を可能にする。

さらに、臨界角照明法がエバネッセント照明と侵入長を除いて特徴が一致するという事は、臨界角照明法がエバネッセント照明法の拡張として利用可能であることを意味する。これにより臨界角照明法はエバネッセント照明のもつ様々な応用例に利用可能である。

## 謝辞

指導教官である湊小太郎教授には、生命機能計測学講座において研究環境を提供して頂き、心より感謝しております。本研究を進めるにあたり、多数の貴重なご指摘およびご意見を賜うことができ、心より感謝しております。また箱嶋 敏雄教授には、審査委員を担当して頂き、異なる視野から本研究の議論を活発にできたことを感謝しております。本研究室の杉浦忠男准教授には、本研究に関連する様々な先端技術を指導して頂いただけでなく、本研究に必要な実験手法や論文の校正などにおいても重要な助言を賜うことができ、感謝しております。本研究室の助教である佐藤哲大先生および中尾恵先生のおかげで研修室生活や研究を円滑に進めることができたことを感謝しております。最後に湊研究室の学生の皆様には、日常の研究生活において多大な助言を頂きましたことを感謝します。

## 参考文献

- [1] Douglas Magde, Elliot Elson, and W. W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters*, 29(11):705–708, 1972.
- [2] 金城 政孝. 細胞内生体高分子相互作用の解析をめざす蛍光相関分光法, pages 126–131. 羊土社, 2003.
- [3] Nancy L. Thompson. *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, volume 1, pages 337–378. Plenum Publishing Corporation, 1991.
- [4] 金城政孝 and 内貴猛. 蛍光相関分光法による細胞内物質輸送測定法の開発. *電子科学研究*, 6:37–41, 1998.
- [5] Jerker Widengren and Ülo Mets. *Conceptual Basis of Fluorescence Correlation Spectroscopy and Related Techniques as Tools in Bioscience*, pages 69–120. Wiley-vch, 2002.
- [6] Masataka Kinjo and Rudolf Rigler. Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 23:1795–1799, 1995.
- [7] 大坪順次. 光入門. コロナ社, 2002.
- [8] Nancy L. Thompson, Thomas P. Burghardt, and Daniel Axelrod. Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 33:435–454, 1981.
- [9] Tammy E. Starr and Nancy L. Thompson. Total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy: Combined surface reaction and solution diffusion. *Biophysical Journal*, 80:1565–1584, 2001.

- [10] Alena M. Lieto, Randall C. Cush, and Nancy L. Thompson. Ligand-receptor kinetics measured by total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 85:3294–3302, 2003.
- [11] Karla S. McCain and Joel M. Harris. Total internal reflection - correlation spectroscopy study of molecular transport in thin sol-gel films. *Analytical Chemistry*, 75:3616–3624, 2003.
- [12] Kai Hassler, Tiemo Anhut, Rudolf Rigler, Michael Gösch, and Theo Lasser. High count-rates with total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 88:L01–L03, 2005.
- [13] M. Weissman, H. Schindler, and G. Feher. Determination of molecular weights by fluctuation spectroscopy: Application to dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(8):2776–2780, 1976.
- [14] N. P. Petersen. Scanning fluorescence correlation spectroscopy i. theory and simulation of aggregation measurements. *Biophysical Journal*, 49:809–815, 1986.
- [15] N. P. Petersen, D. C. Johnson, and M. J. Schlesinger. Scanning fluorescence correlation spectroscopy ii. application of virus glycoprotein aggregation. *Biophysical Journal*, 49:817–820, 1986.
- [16] Y. Chen J. P. Skinner and J. D. Müller. Position-sensitive scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 89:1288–1301, 2005.
- [17] V. Buschmann Y. Xiao and K. D. Weston. Scanning fluorescence correlation spectroscopy: A tool for probing microsecond dynamics of surface-bound fluorescent species. *Analytical Chemistry*, 77:36–46, 2005.
- [18] J. Ries and P. Schwille. Studying slow membrane dynamics with continuous wave scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 91:1915–1924, 2006.

- [19] Michael Gösch, Alexandre Serov, Tiemo Anhut, Theo Lasser, Alexis Rochas, Pierre-André Besse, Radivoje S. Popovic, Hans Blom, and Rudolf Rigler. Parallel single molecule detection with a fully integrated single-photon  $2 \times 2$  cmos detector array. *J. Biomed. Opt.*, 9(5):913–921, 2004.
- [20] Hans Blom, Mathias Johanson, Anna-Sara Hedman, Lisolotte Lundberg, Anders Hanning, Sverker Hård, and Rudolf Rigler. Parallel fluorescence detection of single biomolecules in microarrays by a diffractive-optical-designed  $2 \times 2$  fan-out element. *Appl. Opt.*, 41(16):3336–3342, 2002.
- [21] Michael Gösch, Hans Blom, Sylvain Anderegg, Kerstin Korn, Per Thyberg, Mona Wells, Theo Lasser, and Rudolf Rigler. Parallel dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy using diffractive optical elements. *J. Biomed. Opt.*, 10(5):054008, 2005.
- [22] Markus Burkhardt and Petra Schwill. Electron multiplying ccd based detection for spatially resolved fluorescence correlation spectroscopy. *Optics Express*, 14(12):5013–5020, 2006.
- [23] Balakrishnan Kannan, Jia Yi Har, Ping Liu, Ichiro Maruyama, Jeak Ling Ding, and Thorsten Wohland. Electron multiplying charge-coupled device camera based fluorescence correlation spectroscopy. *Anal. Chem.*, 78:3444–3451, 2006.
- [24] Allen Taflove and Susan C. Hagness, editors. *computational electrodynamics*. Artech House, 3 edition, 2005.
- [25] 橋本 修, editor. 実践 *FDTD* 時間領域差分法. 森北出版, 2006.

# 付録

## A. 研究業績

### A.1 査読付学術論文

- Masayoshi Matsumoto, Tadao Sugiura, Kotaro Minato, “ Illumination by Near-Critical-Angle Incidence for Imaging Fluorescence Correlation Spectroscopy with Electron-Multiplying Charge-Coupled Device Camera, ” Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 49, No. 6, pp. 060208-1 to 060208-3 (2010)

### A.2 査読付国際会議発表

- Masayoshi Matsumoto, Tadao Sugiura and Kotaro Minato, “ Spatially resolved fluorescence correlation spectroscopy based on electron multiplying CCD, ” proceedings of SPIE Vol. 6630, pp 663017-1 to 663017-8 (München, Germany, June, 2007)
- Masayoshi Matsumoto, Tadao Sugiura and Kotaro Minato, “ Critical-Angle Illumination for Fluorescence Correlation Spectroscopy with Electron-Multiplying CCD Camera, ” Program and Abstract Book Focus on Microscopy 2008, p. 72, (Awaji, Hyogo, Japan, April, 2008)

### A.3 査読付国内会議発表

- 松本 将宜, 杉浦 忠男, 湊 小太郎, “ EMCCD 空間分解能を持つ蛍光相関分光法の開発 ”, 第 54 回応用物理学関係連合講演会, 2007 年 3 月
- 松本 将宜, 杉浦 忠男, 湊 小太郎, “ EMCCD を用いた蛍光相関分光法のための臨界角照明法の開発 ”, 第 68 回応用物理学会学術講演会, 2007 年 9 月

- 松本 将宜, 杉浦 忠男, 湊 小太郎, “ 臨界角証明法を用いた EM-CCD ベース蛍光相関分光イメージング ”, 日本分子イメージング学会学術集会, 2008 年 5 月