

微弱な生体発光の測定系の開発

丹治研究室 川田秀斗

2023年3月7日

1. 序論

1.1. 生体発光

生命活動の解明において、生体イメージングはよく用いられる手法である。生体イメージングの中でも生体発光現象は、蛍光等の他の生体イメージング手法に比べてバックグラウンドノイズが少ない手法であるため、有望視されている。

生体発光を生体イメージングに用いる場合、特に高効率で応答性の良いホタルの発光基質(Firefly Luciferin)を用いた Luciferin-Luciferase 反応(L-L 反応)がよく用いられている。ホタルの L-L 反応の発光の中心波長は 560 nm であるが、観測可能な強度を向上させるためには、生体での透過率が最も高い波長 650 nm ~ 900 nm の、生体の窓(NIR window)と呼ばれる波長帯の発光が望ましい。そこで、本学化学生命工学プログラム牧研究室において、発光中心波長が 675 nm である、ホタルの発光基質の類似物質である TokeOni が開発された。

1.2. TokeOni によるネズミの肝臓の発光

TokeOni には特殊な発光現象が確認されている。

L-L 反応においては、発光基質である Luciferin と発光酵素である Luciferase の二つが必要である。そのため、生体イメージングに用いる際には、ウイルスに感染させることや、遺伝子組み換え等を用いることで、あらかじめ生体内に Luciferase を発現させる必要がある。

しかし、TokeOni の場合、Luciferase を発現させていないネズミに注射した際にも、ネズミの肝臓が発光する現象が確認されている。この現象の発光プロセスが解明できれば、より非侵襲な生体イメージング手法の開発につながる事が期待できる。

1.3. 研究の目的

発光プロセスを解明するためには、発光スペクトルを測定することが有効である。しかしながら、TokeOni を用いたネズミの肝臓の発光強度は非常に低いため、通常

の分光器では分光することができない。そのため、微弱光の分光が可能な分光器の開発が必要である。

そこで、本研究ではこのような分光器の開発を目的として、高感度カメラである EMCCD(electron multiplying CCD)カメラを用いた微弱光の測定系を作製し、その特性を評価した。また、作製した測定系を用いて L-L 反応と TokeOni と Luciferase の反応による発光強度の時間変化をそれぞれ測定した。

2. 微弱光測定系のノイズ

本節では測定系で発生するノイズについて検討する。

2.1. EMCCD カメラのノイズ

本研究では撮影機器として EMCCD カメラ (Photometrics 社製 Evolve512)を用いた。EMCCD カメラとは、光子の入射により CCD イメージセンサに蓄えられた光電子を読み出す際に、衝突電離(impact ionization)を用いて増幅する(EM ゲイン)ことにより、高感度イメージングを可能とする CCD カメラである。

EMCCD カメラに由来するノイズとしては、バイアスのゆらぎ、読み出しノイズ、熱ノイズの三種類のノイズが想定される。

ここではそれぞれのノイズについて説明する。

2.1.1. バイアスのゆらぎ

EMCCD カメラでは CCD イメージセンサーの 1 ピクセルに蓄えられた光電子によるアナログ信号をデジタル信号に変換する際、デジタル信号が負の値をとらないようにオフセットとしてバイアスが印加される。このバイアスの値は撮影の 1 フレームごとに変化するため、バイアスのゆらぎがノイズとなる。

2.1.2. 読み出しノイズ

読み出しノイズとは、A/D コンバーターにおいて電子

をデジタル信号に変換する際に発生するノイズであり、CCDの各ピクセルそれぞれに発生するノイズである。読み出しノイズはアナログ信号を読み出す際にのみ発生するため、露光時間に比例しない。また、真値を中心に正規分布するノイズである。読み出しノイズは使用する読み出しポートと読み出し速度によって異なる。本研究で使用した読み出しポートと読み出し速度における読み出しノイズの仕様値は表1の通りである。

表1: Evolve512 の読み出しノイズの仕様値

読み出しポートおよび読み出し速度	読み出しノイズ(RMS値)
1.25 MHz non-EM Port	$6 e^-$

2.1.3. 熱ノイズ

熱ノイズは暗電流(dark current)ともいい、CCD内で熱励起されたキャリアが光電子のようにふるまい、実際には存在しない光子を観測してしまうことによるノイズである。熱ノイズは露光時間に比例して増加し、EMゲインによって増幅されるノイズである。そのため、微弱光の観測において支配的なノイズの一つである。

2.2. 暗箱内の残留光子

本測定系では実験系外からの光子の入射を避けるために暗箱を用いるが、暗箱を用いてもすべての光子を遮光できるわけではない。そのため、不完全な遮光によってカメラのセンサーに入射した光子はノイズとなる。暗箱の残留光子は露光時間に比例して増加し、EMゲインによって増幅されるノイズである。そのため、熱ノイズと同様に、微弱光の測定において支配的なノイズの一つである。

3. 実験

3.1. EMCCDカメラの特性評価

3.1.1. バイアスのゆらぎおよび読み出しノイズの測定

EMCCDカメラのバイアスのゆらぎおよび読み出しノイズは露光時間に比例しないため、カメラの受光面に蓋をし、露光時間0sで撮影することで測定できる。ここでは、100フレームの画像から、これら二種類のノイズを評価した。

バイアスは、撮影した各フレームについて、式(1)のように、全ピクセルの平均値をとることで求めることができる。

$$bias = \frac{1}{n_{pixel}} \sum_{i=1}^{n_{pixel}} S_i \quad (1)$$

ここで、 $bias$ は各フレームのバイアスの値、 n_{pixel} は1

フレーム中の総ピクセル数、 S_i は各ピクセルの16bitのデータの読み値である。このようにして求めた、バイアスのフレーム毎の変化は図1の通りである。また、このときのバイアスは 494 ± 3 ADUであった。

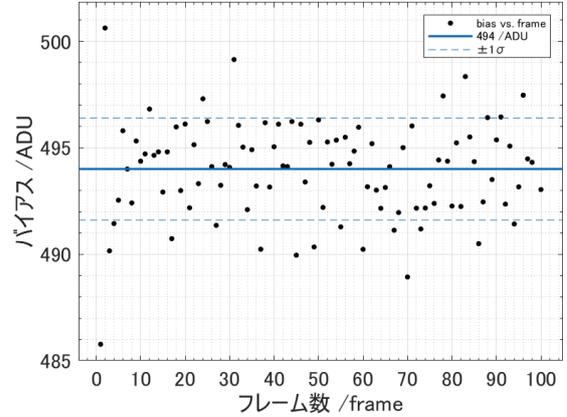


図1: 各フレームのバイアスの変化

また、読み出しノイズの大きさは撮影したデータについて式(2)のような計算により見積もることが出来る。

$$N_r = \sqrt{\frac{1}{n_{pixel} \times n_{frame}} \sum_{j=1}^{n_{frame}} \sum_{i=1}^{n_{pixel}} (S_i - \bar{S})^2} \quad (2)$$

ここで、 N_r は読み出しノイズの大きさ、 n_{frame} は撮影したフレーム数、 \bar{S} は各フレームのピクセルあたりの読み値の平均値である。

撮影した画像について、式(2)を用いて計算した読み出しノイズの大きさは $12.03 e^-$ であった。

3.1.2. 熱ノイズの測定

熱ノイズは露光時間に比例するノイズであるため、露光時間を1s、10s、100sと変化させて撮影を行うことで測定した。撮影したデータにはバイアスのゆらぎおよび読み出しノイズが含まれている。

まず、バイアスのゆらぎの影響を見積もるために、各ピクセルの読み値からそのピクセルが属するフレームの平均値(バイアス)を減算した。

さらに読み出しノイズの影響を排除するために、(各ピクセルの読み値)-(そのフレームの平均値)のヒストグラムを作製した(図2)。

読み出しノイズは真値を中心に正規分布するため、ヒストグラムの0付近に存在する大きなピーク除去することで、読み出しノイズの影響を排除することができると考えられる。そこで、ピークのすそである+60 ADUを閾値に設定し、閾値より大きい値を持つピクセルのデータを合算した後に全ピクセルで平均値をとり、熱ノイズの値を計算した。得られた熱ノイズの測定値を、横軸露光

時間によって図3にプロットし、直線でフィッティングした。

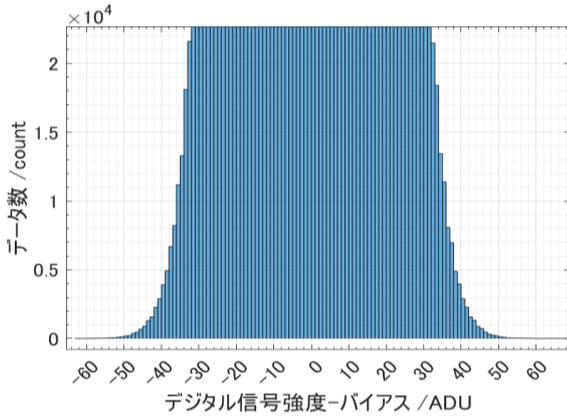


図2:露光時間1sのヒストグラム

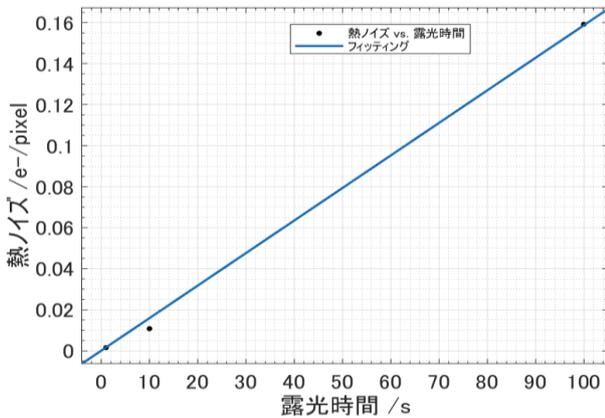


図3: 熱ノイズの値

近似直線の傾きから求めた熱ノイズを仕様値と共に表2にまとめた。表2から、熱ノイズの測定値はおおむね仕様値と一致していることが分かった。

表2: 熱ノイズの使用値および測定値

仕様値	測定値
$0.001 e^-/\text{pixel} \cdot \text{s}$	$0.0016 \pm 0.0001 e^-/\text{pixel} \cdot \text{s}$

3.2. 暗箱の作製と特性評価

3.2.1. 暗箱の作製

前述の通り、暗箱内の残留光子は、EMCCD カメラの熱ノイズとともに、微弱光の測定において支配的なノイズとなる。熱ノイズは使用するカメラの特性で決まり、それ以下に低減させることはできないため、暗箱の作製においては、暗箱の残留光子束の大きさがカメラの熱ノイズと同程度以下であるという条件を課した。実際に作製した暗箱の外観は図4の通りである。



図4: 暗箱の外観

3.2.2. 暗箱内の残留光子束の測定

暗箱内の残留光子束の大きさを測定するために、カメラの開口部にレンズを取り付け、カメラ受光部の手前に設置されたアイリスを全開にした。作製した暗箱上に遮光用ゴム加工布を2重に重ねて被せることで、部材間の隙間から入る漏れ光を遮断した。

露光時間を10s、20s、40s、60s、100sに変化させて100フレームずつ撮影した。得られたデータを全フレーム全ピクセルで平均化したのち、露光時間を横軸にとってプロットし、直線でフィッティングした(図5)。

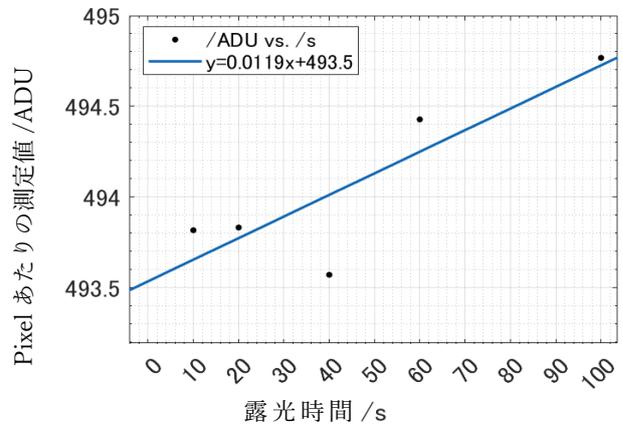


図5: 暗箱の残留光子束

図5の直線の傾きは熱ノイズと暗箱の残留光子束の合計であり、その測定値は $0.012 \pm 0.007 e^-/\text{pixel} \cdot \text{s}$ であった。熱ノイズの測定値は $0.0016 \pm 0.0001 e^-/\text{pixel} \cdot \text{s}$ であったため、暗箱の残留光子束の大きさは $0.010 \pm 0.007 e^-/\text{pixel} \cdot \text{s}$ と見積もられた。これは熱ノイズの約6倍の値となっており、暗箱の遮光を改善する必要があることが分かった。

3.3. 測定可能な発光の条件

測定した測定系のノイズは表4の通りである。

表 4: 測定系のノイズ

バイアス	読み出しノイズ	熱ノイズ	残留光子束
494 ± 3 ADU	12.03 e ⁻	0.0016 ± 0.0001 e ⁻ /pixel · s	0.010 ± 0.007 e ⁻ / pixel · s

表 4 より、現状で測定可能な発光の条件は、発光の光子数が 12.03 e⁻/pixel 以上かつ 0.012 e⁻/pixel · s 以上であることがわかった。

3.4. 試料発光の測定

作製した測定系を用いてホタルの発光基質である D-Luciferin および類似物質である TokeOni を Luciferase と混合した試料の発光の時間変化を測定した。

カメラの受光部にレンズを取り付け、試料発光を露光時間 60 s で 30 フレーム撮影した(図 6)。

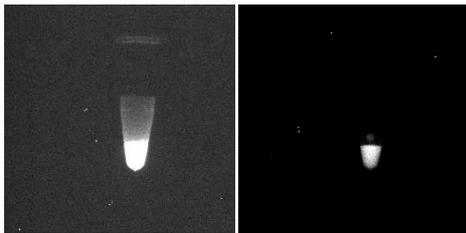


図 6: Luciferin の発光(左)と TokeOni と Luciferase の混合試料の発光(右)

撮影したデータについて、各フレーム毎にバイアスと熱ノイズおよび残留光子数を引いた後に平均値を計算した。計算した値について、時刻を横軸にとって図 7 にプロットし、式(3)の関数を用いてフィッティングを行った。

$$\sum (S_i - bias) - (熱ノイズ + 残留光子束) = A_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (3)$$

ここで、 A_0 は発光強度の初期値、 t は時刻、 τ は発光の時定数である。

発光強度の初期値と時定数は表 3 の通りである。

表 3: 試料発光の測定値

	D-Luciferin	TokeOni
A_0	$(6.3 \pm 0.2) \times 10^4$	$(7.3 \pm 0.2) \times 10^3$
τ	460 ± 10 s	2900 ± 300 s

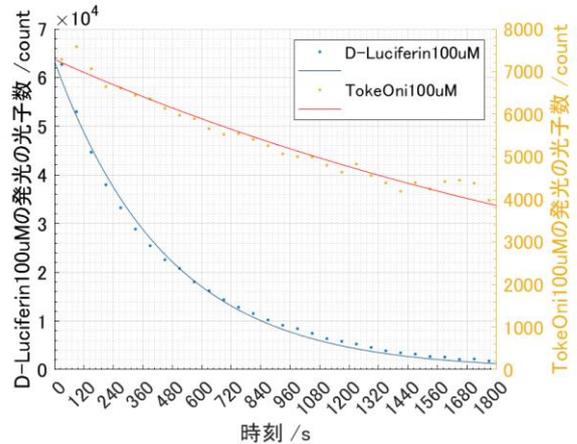


図 7: D-Luciferin および TokeOni と Luciferase の混合試料の発光

TokeOni の発光の時定数は Luciferin の約 6.3 倍であり、50 分程度であった。

4. まとめと今後の展望

4.1. まとめ

本研究では、微弱な生体発光の測定系の開発と評価を行った。

はじめに、EMCCD カメラに由来する、バイアスのゆらぎ、読み出しノイズ、熱ノイズの三種類のノイズの測定を行った。

次に、実験系外からの入射光子を遮断するための暗箱を作製し、暗箱内の残留光子束の大きさを測定した。

最後に、D-Luciferin および TokeOni と Luciferase の混合試料の発光強度の時間変化を測定した。

4.2. 今後の展望

今後の展望としては、暗箱の残留光子束の大きさが熱ノイズと同程度となるように暗箱を改良し、改良した測定系を用いて生きたネズミの肝臓の発光を測定する予定である。

参考文献

[1] Ralph, W., A clear vision for *in vivo* imaging, *Nature Bio.*2001, 19, 316-317

[2] Evolve512 manual

[3] Evolve512 datasheet