

単一光子検出器の進歩から 恩恵を受ける蛍光顕微鏡

リチャード・K・P・ベニンガー、デイビッド・W・ピストン

光子計数モードで使用する光検出器は理想的な信号対雑音比特性(ショット雑音によって制限を受ける)を提供する。最先端の単一光子計数検出器を市販の顕微鏡システムに組み込み、生細胞イメージングにおける蛍光信号の検出感度を向上させた。

生細胞、組織、全生命体内における生体分子の相互作用とダイナミクスの研究(生体内画像)は最近10年間に急激に増加した。現在、生体内顕微鏡法は生きた生命体内の特定の蛋白質、脂質、細胞全体の動力学を研究する神経科学、免疫学、発生生物学などで広く使われている。利用拡大の理由は遺伝子符号化可能な緑色蛍光蛋白質の開発と改良にある。しかし、高速で超高感度の共焦点顕微鏡(LFWJ 2007年8月号

p.16またはwww.laserfocusworld.com/articles/312439を参照)と2光子顕微鏡(LFWJ 2007年4月号 p.34またはwww.laserfocusworld.com/articles/283869を参照)の開発も重要な役割を果たした。

レーザ走査共焦点顕微鏡と2光子顕微鏡の中心的なコンポーネントの一つは光子検出器である。光子検出の感度は、速度と解像度を適切に制限しさえすれば、特定の生物学的機能の研究を可能にする。一般に、生体試料から放

出される蛍光信号のレベルは励起強度に比して数桁低い上に、励起光は光退色や光毒性などの損傷効果为了避免するために低レベルに抑えなければならない。結果として、高感度光子検出器の開発が現在の蛍光顕微鏡を前進させる中心的課題になった。

検出オプション

最先端の光子検出器は高い光子検出効率、高速応答ならびに読取り、低い雑音レベル、低いバックグラウンドレベルが要求されるが、最も重要なことは信頼性が極めて高いことだ。一般に、広視野顕微鏡では電荷結合素子(CCD)が使われているが、レーザ走査顕微鏡で最も広範に利用されている光子検出デバイスは光電子増倍管(PMT:LFWJ 2008年5月号 p.40またはwww.laserfocusworld.com/articles/322034を参照)である。

ほぼすべての商用顕微鏡において、PMTは、レーザが画像の単一画素上を走査される時間(画素ドウェル時間)内の出力電流を積分する、「電流積分」モードで動作する。積分された電流は電圧に変換され、試料の画素から収集された光子数に比例する8または16ビットのデジタル数(DN)へとデジタル化される(図1)。

この検出モードは、中～高レベルの

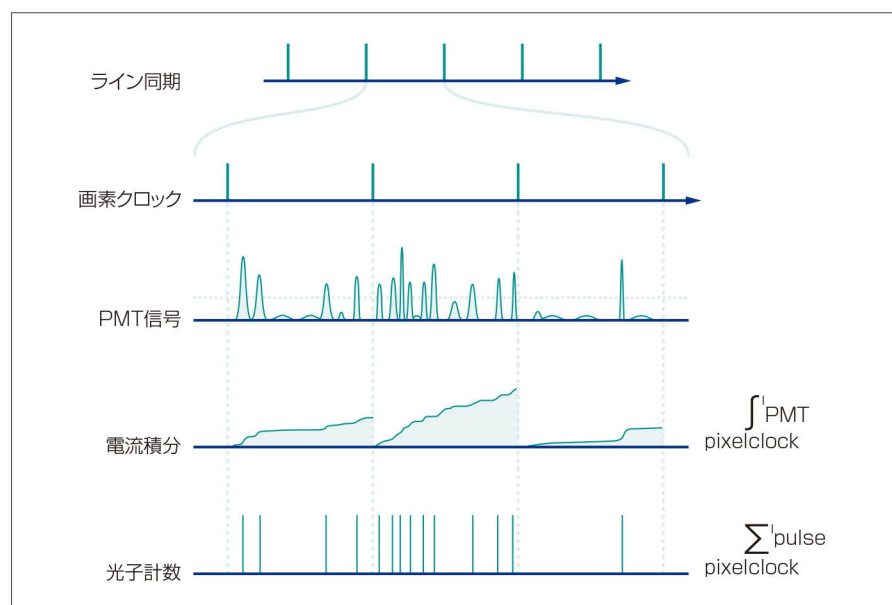


図1 レーザ走査顕微鏡では、データは電流積分または光子計数のいずれかによって収集される。各線(画素列)はライン同期信号によって定義される。一つの画素が走査される周期(一般に画素時計によって定義された数マイクロ秒)の間に、各入射光子はPMT信号において電流パルスを発生するであろう。その電流が積分されると、暗イベント並びにパルス振幅変動は出力信号における雑音増大をもたらす。一方、光子計数では、パルスが識別され(点線上に上昇)、成形され、続いて計数されるならば、いかなる余分な雑音も導入されない。(資料提供:バンデルビルト大学)

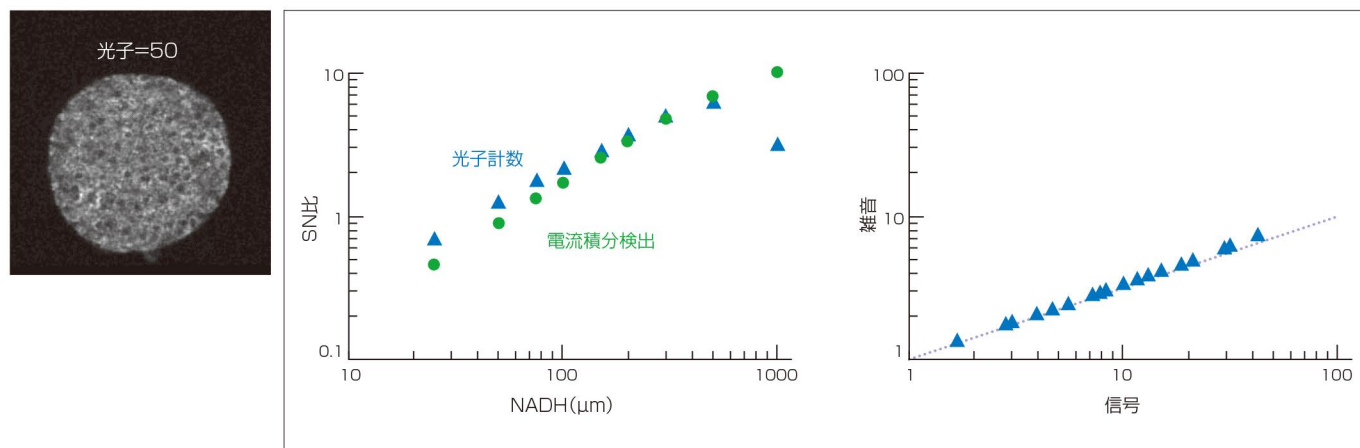


図2 内因性NADHを含む膵臓内分泌組織のサンプルは、自社製の光子計数検出システムを使って取得された(左)。溶液中の外因性NADHの濃度を変えることによって、蛍光体濃度の関数としてのSN比(中央)が光子計数(青い三角)と電流積分検出(緑色の丸)を使用して定量化された。下の数の付帯的な光子と一致しているより低い濃度で、光子計数検出は優れたSN比を提供する。様々な入射光子レベルでの光子計数検出におけるSNプロット(右)は、光子計数がショット雑音限界(点線)であることを証明している。(資料提供:バンデルビルト大学)

光子束に適しているが、低い信号レベルの場合には大きな雑音が増幅とデジタル化によって導入される。低レベルの光子束では、利得を高める必要があるが、同時に雑音も大きく増強され、得られる電流パルスの変動幅が拡大し、アフタパルスが発生する。熱電子も光陰極やダイノード列で発生し、雑音に関係する高い暗信号を生じる。

単一光子計数(SPC)またはパルス計数は、PMTなどの光子検出デバイスで利用できるもう一つの検出方式である。光子計数PMTは、一般に、熱生成された暗電子イベント数を減らすために冷却される。高帯域エレクトロニクスや高い利得はバックグラウンド電流から十分に分離された緊密に分布する電流パルスが発生する。次いで、各電流パルスが識別/計数されることで、検出された光子の絶対数が求まり、電流積分モードで導入された余分の暗信号と雑音が除去される。この信号の雑音は高効率で制限されたショット雑音であり、明確なポアソン雑音統計で記述できる。

光子計数の利点は明白だが、蛍光顕微鏡におけるその利用は限定的であった。主要な制限は、光子がPMTモジュ

ールや検出エレクトロニクスで計数される速度である。一つの電流パルスが発生、識別、カウントする間に入射した他の光子はカウントされない。したがって、最大計数率は、単一光子の計数に要する時間(不感時間)に関係する。最大計数率は不感時間にほぼ反比例する。しかし、光子は時間内にランダムに到達するため、低光子束であっても2個以上の光子が不感時間内に入射する可能性は高い。入射光子数がカウントされた光子数に比例する検出の線形性は最大計数率の10%以内で達成される。従来、この限界は1MHz未満であった。典型的な生体画像取得の時間1秒と512×512ピクセルでは、1画素あたりの最大計数は約4に制限されることになる。しかし、最近数年の間、このアプローチを改善する新しい技術が顕微鏡応用で大いに注目された。

光子計数法の改良

最近開発された光子計数PMTモジュールは現在数十メガヘルツ(MHz)の最高計数率をもっている。例えば、浜松ホトニクス製のH7421-50モジュールは50MHzの最高計数率が20nsのパルス

解像度で得られる。これは、高輝度の蛍光生体試料で予測される光子レベルさえもはるかに超える。

もう一つの開発はフィールド・プログラマブル・ゲートアレイ(FPGA)である。これは、1チップにプログラムされたフレキシブルロジックによって、レーザ励起が試料の単一ピクセル上を走査する数マイクロ秒間に電流パルスを識別、カウント、読出す高速動作を可能にする。これらのFPGAデバイスはトランジスタロジック(TTL)またはエミッタ結合ロジック(ECL)として数十メガヘルツで動作する能力をもつ。このことは典型的な画像サイズと速度において1ピクセルあたり最高数百の光子を処理する高速光子計数顕微鏡検出器を開発するためのビルディングブロックがすでに入手可能であることを意味する。

最近、米バンデルビルト大学のわれわれの研究グループは2光子顕微鏡における増強された検出器感度を提供する簡単な光子計数デバイスを実証できたと報告した。浜松ホトニクスのH7421シリーズの光子計数PMTモジュールを使うことによって、自分たちで組立

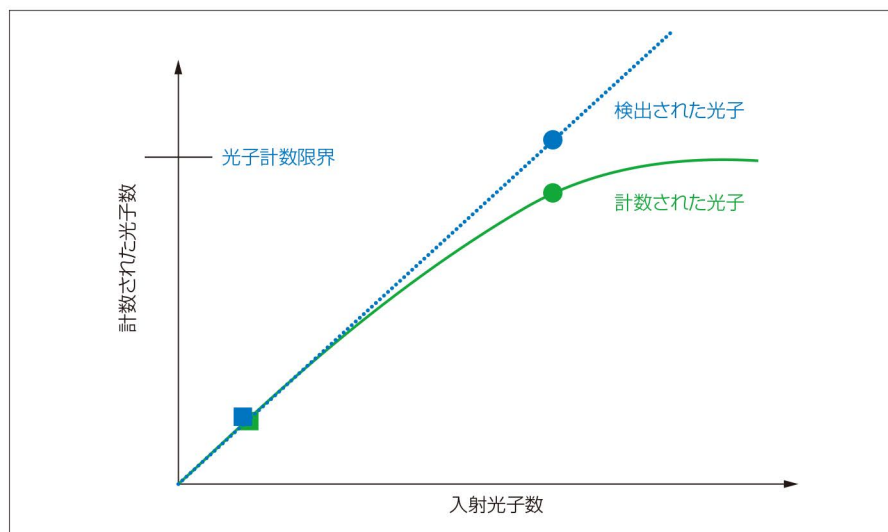


図3 ルックアップテーブルを使用することで光子計数検出のダイナミックレンジを拡張することができる。入射光子の数が少ないときには、検出された光子数（青い四角）は計数された光子数（緑色の四角）にほぼ等しい。入射光子数が増加すると、計数された光子数（緑色の丸）は検出された光子数（青い丸）よりも少なくなる。検出器特性の評価と光子計数統計の利用によって、光子計数効率（緑色の線）を計算し、ルックアップテーブルを使って入射光子数（青い点線）に関連づけることができる。これは光子計数限界まで可能であり、最新検出器では約50MHzに及ぶ。（資料提供：バンデルビルト大学）

た光子計数検出器で、低レベルの蛍光でも電流積分モードで動作する商用顕微鏡PMTよりも高い信号対雑音（SN）レベルが得られることを定量的に証明した（図2）⁽¹⁾。一つのサンプル顕微鏡画像で、SN比を内因性蛍光酵素の共同因子NADHについて濃度を変えて行った。この内因性蛍光のイメージングは細胞の代謝活動アッセイで日常的に使われているものであり、増強された感度が生物学関連の応用で達成されることを実証できた。われわれの解析は、すべての蛍光イメージング応用における基本的雑音限界であるショット雑音で信号が制限されていることも示した。われわれの検出器は、商用顕微鏡PMT検出器に存在する精密光学設計と部品を組入れることによってさらに改善されるであろう。

これらのより新しい光子計数モジュールとFPGAデバイスで可能な最高50MHzの最大の計数率にもかかわらず、パルス計数線形性は1~2MHzに制限

されたままである。パルスパイルアップ統計は既知であり、その範囲は参照テーブルの利用で拡張可能である（図3）。検出システムの計数率限界を評価すれば、計数された光子数を厳密に明確な方法で入射光子数に関連づけ、検出器のダイナミックレンジを計数率限界まで拡張することができる。もちろん、計数率限界に近づくにつれSN比は低下するだろう。

光子計数検出にFPGA論理回路を適用することの利点がマサチューセッツ工科大学（MIT）のピーター・ソー研究所における研究で実証された⁽²⁾。特注

の光子計数カードはそれぞれ約30MHzの最高計数率と1MHz計数率までの線形性をもつ16の並列チャンネルの識別と計数を可能にする。次いで、マルチアノードPMTユニットは、蛍光放射がマルチアノードPMTユニットを横切って分散するハイパースペクトルイメージングを実行するために、この光子計数カードと統合された。

いくつかのより新しい顕微鏡システムはマルチアノード光子検出システムに対する規定値化を開始している。例えば、独カール・ツァイス社のLSM710共焦点顕微鏡はマルチチャンネルPMTハイパースペクトル検出器（キューサ検出器）を蛍光波長に応じて使用し、試料からの蛍光が蛍光波長に従って多重PMT検出器ユニット間に分配される。多重並列30MHz識別／計数システムはこの種のシステムにとって特に魅力的になるであろうし、さらに検出感度を高めるに違いない。

ここ数年間の生細胞イメージングと生体内顕微鏡観察の利用拡大が、蛍光顕微鏡における光子検出器の感度の継続的向上を動機づけている⁽³⁾。こうした証拠は、光子計数検出を商用顕微鏡システムに組み込む技術がいまや入手可能であることを示唆している。われわれは、顕微鏡メーカーが、この技術を次世代顕微鏡に組み込むことを開始し、生細胞顕微鏡に新天地を開くことを期待している。

謝辞

著者らは、NIH助成R01-DK53434とP20-GM72048ならびに国防総省医学自由電子レーザプログラムからの資金援助に謝意を表したい。

参考文献

- (1) R.K.P. Benninger et al., Optics Lett. 33(24) p. 2895 (Dec. 15, 2008).
- (2) C. Buehler et al., J. Fluorescence 15, p. 41 (2005).
- (3) R.K.P. Benninger et al., Rev. Physiology, Bio chemistry and Pharmacology 160, p. 71 (April 2008).

著者紹介

リチャード・K・P・ベニンガー（Richard K.P.Benninger）はバンデルビルト大学メディカルセンターの研究員、デイビッド・W・ピストン（David W.Piston）は同センターの分子生理学・生物物理学部門の教授である。e-mail: dave.piston@vanderbilt.edu