

液晶マルチスポット照明を用いた蛍光偏光計測法の開発

○大阪大学大学院 林 照剛、三好隆志、高谷裕浩

本研究は、液晶素子を利用した高密度マルチスポット偏光照明技術により、ハイスループット蛍光偏光測定を実現し、糖鎖タンパク質、抗原抗体などの分子間相互作用を測定可能な、マルチスポット蛍光偏光測定システムを開発することを目的としている。本報では、同システムの基本構成およびマルチスポット照明光学系の試作結果について述べる。

1. 緒言

蛍光偏光法^{1,2)}は、現在、化学物質のスクリーニング解析に主に利用されており、2.5-100 μ l程度の少量のサンプルで、96~1536種類のサンプルを同時に解析することができる²⁾。同手法は、糖鎖タンパク質や抗原抗体などの生体分子における分子間相互作用を、測定分子のブラウン運動量の変化として測定可能であり、生体分子の機能解明に大きな役割を果たしている。

蛍光偏光法による蛍光偏光度測定装置としては、コロナ電気(株)のMTP-2000FPをはじめとして、数多くの装置が市販されており、DNA-タンパク質の結合性解析等、バイオ、創薬、臨床などの分野で幅広く活用されている。しかしながら、ポストゲノム研究における多様な生体分子のスクリーニング解析分野では、多数のサンプルを解析するために、蛍光偏光測定解析の解析速度のさらなる向上が求められている。

本研究は、蛍光偏光法によって解析する検出スポットの集積度を >1Mspot/cm²に向上させ、さらに多数点の同時検出を実現することで、従来手法に比べて大幅な高速解析を実現し、解析効率および精度の向上を実現することを目指している。

本報では、液晶素子を用いた偏光可変制御型高密度マルチスポット照明光学系の設計および偏光照明実験の結果について述べる。

2. 蛍光偏光測定法^{1, 2)}

蛍光偏光法は、蛍光色素でラベルかされた分子(抗原)が、抗体と結合することによって分子サイズが大きくなり、ブラウン運動による回転運動量が減少するために、同分子が偏光された場合に、蛍光励起光の偏光方向と同一平面内に偏光が維持されるが、抗原が抗体と結合しない場合には、ブラウン運動が大きく蛍光の偏光が解消されるという現象に基づいて、分子間の相互作用を測定する方法である。

偏光解消を測定するためには、下記に定義されるPを求める。

$$P = (I_1 - I_2) / (I_1 + I_2) \quad (1) \quad I_1: \text{入射励起光に平行な偏光成分}$$

$$I_2: \text{入射励起光に垂直な偏光成分}$$

3. 実験装置の概要

本実験装置は、液晶素子を用いたマルチスポット照明光学系部分と、高感度 CCD カメラを受光部に持つマルチスポット蛍

光偏光検出部分から構成される。本実験装置では、光源として波長 488nm の Ar⁺レーザ(コヒーレント(株) I-304C)、液晶素子として、Sony(株)製: 2.0cm (0.79型) マイクロレンズ搭載白黒液晶パネル、表示ドット数: 1028 (H) × 772 (V)、画素サイズ: 15.6 × 15.6 μ m]、受光部には冷却 CCD カメラ (BITRAN(株)製 BS-40L) を用いている。

まず、出射光線のビーム径(ϕ 1.5mm)をコリメータを用いて 6mm まで拡大し、液晶面全体を照明する。液晶素子を透過する光は、液晶素子接続された PC から入力される情報に応じてその偏光面の制御が可能であり、さらに液晶素子に付随するマイクロレンズによって、画素数と等しいマトリクス状のマルチスポット照明を形成する。形成されたマルチスポット照明は、リレーレンズ光学系によって伝送され、試料配置面において偏光方向を制御可能なマルチスポット照明が実現する。

試料面状の蛍光励起照明は、液晶素子によって 90° 回転させられるため、CCD カメラの前に偏光子を配置し、蛍光励起照明の偏光方向を 90° 回転させることによって、入射励起光に平行な偏光成分を持つ蛍光信号 I₁ および垂直な偏光成分を持つ蛍光信号 I₂ を測定することができる。

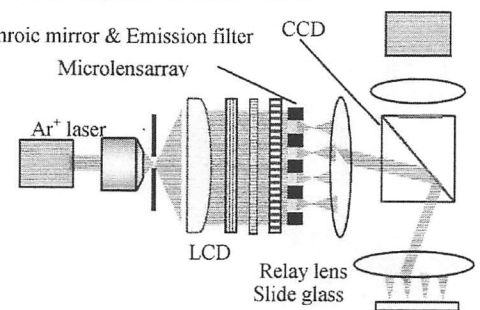


Fig. 1 Schematic of multispot fluorescence detection system

4. マルチスポット照明光学系

本節では Fig.2 に示すマルチスポット照明評価光学系を用いて、偏光可変制御型マルチスポット照明光学系の光学特性を評価した。まずマイクロレンズの集光特性を評価するため、カメラレンズと CCD カメラからなる顕微鏡光学系を用いて、マイクロレンズ焦点近傍付近のマルチスポット照明像を撮影した。Fig.3 に示すマルチスポット照明像は、マイクロレンズ焦点近傍の照明光像を 500 μ m の範囲で、顕微鏡光学系を前後に移動させて撮影している。Fig.2 の光軸の進行方向を正と定義して各デフォーカス位置(-300 μ m, -200 μ m, -100 μ m, 0 μ m, 100 μ m, 200 μ m)での照明光の様子を示す。

Fig.3 の各スポット照明の中心の間隔は液晶のドットサイズ

と同じ $15.6\mu\text{m}$ であり、スポットサイズは、基準測定位置から $-300\mu\text{m}$ デフォーカスした点で $7.6\pm 0.6\mu\text{m}$ 、基準測定点であるフォーカス位置では $4.2\pm 0.6\mu\text{m}$ であり、各デフォーカス位置のビーム直径から計算される各画素に設置されているマイクロレンズの開口径 NA は、0.01 であることがわかる。また焦点位置から $-100\mu\text{m}$ デフォーカスした位置では、平均スポットサイズは $4.2\pm 0.4\mu\text{m}$ となり、照度誤差を 20% まで許容すれば焦点深度 $100\mu\text{m}$ のマルチスポット照明光学系が構築可能であることを実験的に検証した。

さらに、マルチスポット照明光学系における偏光制御実験の結果を Fig.4 に示す。本報で提案するマルチスポット偏光可変制御光学系では、液晶に出力する 255 階調(8bit)の画像の表示階調を 255 から 0 へと変化させることによって、液晶を透過する直線偏光の偏光方向を 0° から 90° まで変化させ、複数スポットの偏光方向を同時に制御することができる。この時、Fig.2 の CCD カメラの前に液晶入射前の直線偏光方向成分を透過するように偏光子を配置し、各階調毎に偏光照明像を撮像した結果を Fig.4 に示す。Fig.4 から $15.6\mu\text{m}$ 間隔で配置された直径 $4\mu\text{m}$ のマルチスポット照明における各スポット毎の偏光制御が可能であることが確認できる。また、フォーカス位置に置い

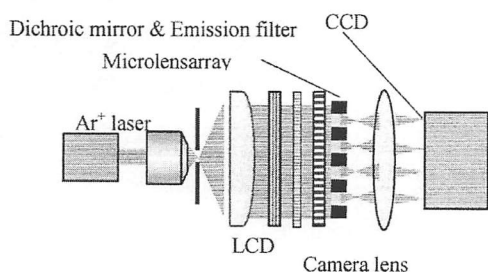


Fig.2 Experimental set-up

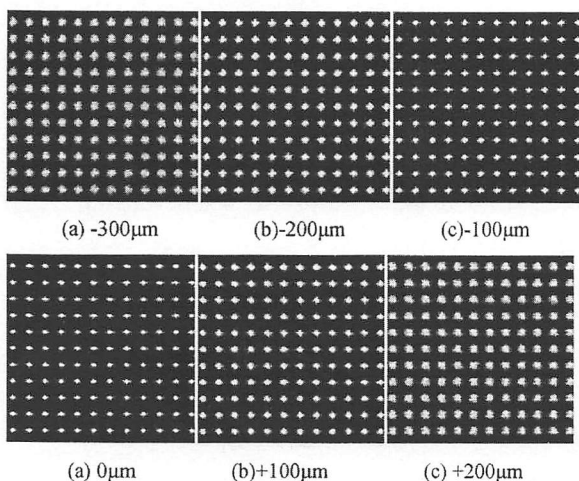


Fig.3 Multispot Irradiation with varying defocus length

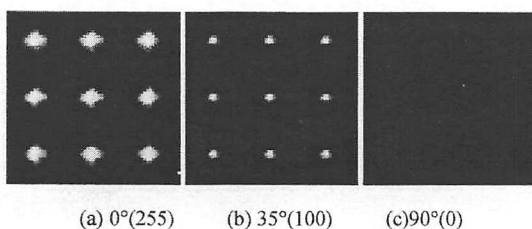


Fig.4 Multispot Irradiation with varying polarization direction

ては、隣接する照明スポットからの迷光によるノイズはほとんど発生しておらず、選択領域のみを正確に照明することも確認できる。このことから、本報で構築した偏光可変制御型高密度マルチスポット照明光学系は、高集積ウェルチップの蛍光励起照明方法として、必要な要件を満たしていると考えられる。

5. リレーレンズ光学系

今回構築したマルチスポット照明光学系では、マルチスポット照明の焦点面と液晶素子間の距離が $100\mu\text{m}$ 以下と狭く、照明装置として考えた場合、その作動距離が非常に小さい。そこで、Fig.1 に示すように等倍のリレーレンズ光学系をマルチスポット照明光学系の後ろに構築し、照明装置の作動距離を広げる。その際、試料照明を行う面に伝送されるマルチスポット照明のスポットサイズやスポット間隔等に影響を与えないよう下図に示すレイトレーシング解析⁴⁾によって、リレーレンズ光学系の収差解析を行い、リレーレンズ光学系の収差の影響が抑えられるようにリレーレンズ光学系の仕様を決定した。

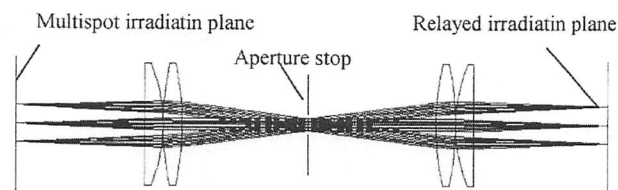


Fig.5 Relay lens optical system

6. 結 言

本報では、ハイスループット蛍光偏光度測定システムの構築を目指し、同システムの主要構成要素となる可変偏光制御型マルチスポット照明光学系を構築し、その照明特性を評価した。

- (1) ビーム直径 $4.2\mu\text{m}$ 、ビーム間隔 $15.6\mu\text{m}$ のマルチスポット照明光学系を構築した。
- (2) 同照明光学系によって $0.4\text{Mspot}/\text{cm}^2$ の高密度マルチスポット照明が可能であることを実験的に検証した。
- (3) 同照明光学系によって $0^\circ \sim 90^\circ$ までの直線偏光照明の偏光方向制御が各点で独立制御できることを実験的に確認した。
- (4) 高集積ウェルプレートの照明に備えて、マルチスポット照明光学系にリレーレンズ光学系を加えて、長作動距離のマルチスポット照明光学系を構築した。

今後は、マルチスポット蛍光信号の検出光学系を構築し、マルチスポット蛍光信号の同時計測技術に関する検討を行っていく予定である。

参 考 文 献

- 1) Perrin, F. (1926) Polarisation de la lumiere de fluorescence vie moyenne des molecules dans letat excite. *J. Phys. Rad.* **1**, 390-401
- 2) 例えば木下一彦、御橋廣真編、日本分光学会測定法シリーズ3、蛍光分析学会出版センタ
- 3) Thomas J. Kowski and Jinzi J. Wu, Fluorescence Polarization is a Useful Technology for Reagent Reduction in Assay Miniaturization, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2000, 3, 437-444
- 4) 例えば松居吉哉、レンズ設計法、光学技術シリーズ1、共立出版