

論文 / 著書情報
Article / Book Information

論題(和文)	液晶ディスプレイを利用した蛍光偏光イメージング
著者(和文)	若尾 撰, 真栄城 正寿, 火原 彰秀, 渡慶次 学
出典(和文)	ケミカルエンジニアリング, Vol. 61, No. 1, pp. 12-17
発行日 / Pub. date	2016, 1

液晶ディスプレイを利用した蛍光偏光イメージング

若 尾 撰^{*1}・真栄城 正 寿^{*2}・火 原 彰 秀^{*3}・渡慶次 学^{*4}

Osamu Wakao · Masatoshi Maeki · Akihide Hibara · Manabu Tokeshi

■ ^{*1} 北海道大学大学院総合化学院総合化学専攻 ^{*2} 北海道大学大学院工学研究院応用化学部門 助教 博士(工学)

^{*3} 東京工業大学大学院理工学研究科化学専攻 准教授 博士(工学)

^{*4} 北海道大学大学院工学研究院応用化学部門 教授 博士(工学) ■

1. はじめに

蛍光偏光測定法は、蛍光の偏光成分から、タンパク質-タンパク質間相互作用、タンパク質-DNA 間相互作用、タンパク質-リガンド間相互作用といった、分子間の相互作用や結合状態などの情報を簡便かつ迅速に取得できる有用な方法である^{1,2)}。特に、蛍光偏光測定法を利用した均一系免疫分析法である蛍光偏光免疫分析法(FPIA: Fluorescence Polarization Immunoassay)は、血中薬物の濃度定量などの臨床診断や食品分析などに用いられている^{3,4)}。FPIAは、抗体の固定化が必要なく、サンプル中の免疫反応(抗原-抗体反応)を直接測定できるため、非常に簡便かつ、反応・測定が短時間という特徴を持つ。現在、広く分析法として用いられる、抗体の固定化が必要な不均一系免疫分析法に対して、FPIAはその特徴から多分野での迅速分析に応用が期待される。

従来の蛍光偏光測定法では、励起光の偏光方向に平行な蛍光成分、および垂直な蛍光成分をそれぞれ測定し、偏光度 P を求める。したがって、1サンプルの測定のためには、2回の蛍光成分測定が必要である。そのため、偏光板を回転させて水平、および、垂直偏光成分をそれぞれ測定する、または偏光ビームスプリッターと偏光板を組み合わせる必要があ

る。このような従来法に基づく蛍光偏光測定装置は、その駆動部を組み込むために、装置が大型・高価になり、また原理的に多サンプルの同時測定ができないといった問題が生じる。

そこでわれわれは、従来の蛍光偏光測定法の問題点である、「複雑な光学系が必要」と「多サンプルの同時測定ができない」の2つの課題を解決するために、液晶ディスプレイ(LCD: liquid crystal display)の液晶素子(LC: liquid crystal)とイメージセンサーを利用した新しい測定原理に基づく蛍光偏光イメージングシステムを開発した⁵⁾。LCDは、印加電圧のON-OFF変調により、偏光フィルターを透過する蛍光の偏光面を平行-垂直成分に変調できる。この変調周期と蛍光を測定するイメージセンサーの取り込み周期を同期させて、得られた画像を演算処理することで、蛍光の平行、および、垂直偏光成分の差と和のそれぞれに対応する画像を得ることができ、蛍光偏光度の画像化が可能である。このLCDとイメージセンサーを利用した新しい測定法では、複雑な光学系を必要とせず、1個のサンプルに対して1回の測定で偏光度を取得することができる。また、この方法は、イメージセンサーの視野内の二次元偏光度画像を得ることができるため、視野内に存在する複数のサンプルの偏光度を同時に取得でき

る。実際に、この蛍光偏光イメージングシステムを用いて、生理活性物質の FPIA を行い、多サンプルの同時蛍光偏光測定に世界で初めて成功した⁵⁾。本手法は、原理的に測定視野内の全てのサンプルの蛍光偏光を同時に測定することが可能である。蛍光偏光測定は、FPIA のみならず、広く分子間相互作用の解析に利用できる。したがって、数千の独立した微小チャンバー内のサンプルを測定すれば、それらすべての分子間相互作用の測定が可能であり、創薬分野などでの分子間相互作用のハイスループットスクリーニングやプロファイリングなどへの応用が期待される。

2. 蛍光偏光イメージングシステムの構築

2.1 蛍光偏光イメージング原理

われわれは、市販の LCD の LC 層とイメージセンサーを利用した新しい測定原理に基づく蛍光偏光測定法を着想した。ツイストネマチックモードの表示モードを持つノーマリーホワイト方式 LCD は主に、配向膜により 90° 配向の捻れた LC 層と、液晶を挟む互いに直交する二枚の偏光フィルター、バックライトにより構成される。LC 層に対し電圧無印加時は、一枚目の偏光フィルターを透過したバックライトは、LC 層により偏光が 90° 捻れ、二枚目の偏光フィルターを透過する。一方で、電圧印加時には、液晶分子が一方方向に配列するため、一枚目の偏光フィルターを透過したバックライトは、直交する二枚目の偏光フィルターによって遮断される。LCD はこの印加電圧と透過光の原理に基づき、表示映像を切り替える。ここで、LCD を分解し、一枚目の偏光フィルターを除いた場合を図 1 に示す。この場合、電圧無印加時には、上述と同様に、LC 層によって 90° 捻れた偏光が二枚目の偏光フィルターを透過する。しかし、電圧印加時でも、二枚目の偏光フィルターをバックライトは透過することが可能になる。このとき、図 1 に示すように、電圧無

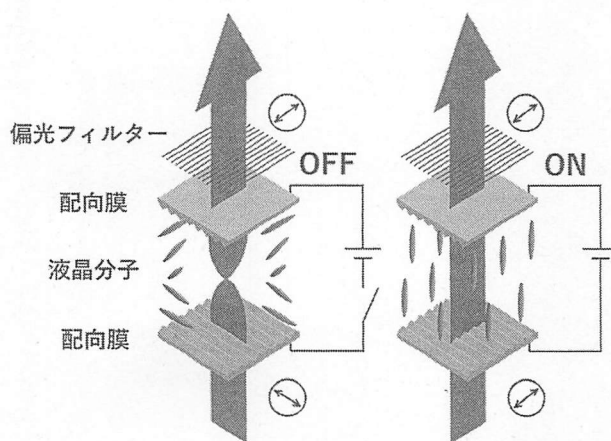


図 1 液晶層 (LC 層) への印加電圧による偏光方向の制御方法。電圧無印加時は、偏光フィルターと垂直な偏光が透過し、電圧印加時は、偏光フィルターと平行な偏光が透過する

印加時では、LC 層により偏光が 90° 捻れるために、出口偏光フィルターを基準にして垂直な偏光をもつバックライトが透過することになる。一方で、電圧印加時には、偏光を維持したまま LC 層を透過するために、偏光フィルターと平行な偏光をもつバックライトが透過する。つまり、LC 層への印加電圧を ON と OFF とに切り替えることで、LC 層入射前の偏光成分について、二枚目の偏光フィルターを透過する光の偏光を選択することが可能になる。

この原理の下で、サンプルの蛍光をバックライトのかわりに用いる蛍光偏光イメージングを着想した。偏光フィルターを透過するサンプルの蛍光偏光は、図 1 に示すように印加電圧により制御される。偏光フィルターと励起光の偏光面を平行にした場合、透過する蛍光は、励起光の偏光面に対し、それぞれ電圧印加時では平行な偏光 (I_{\parallel})、電圧無印加時では垂直な偏光 (I_{\perp}) をもつ。ここで、偏光フィルターを透過する蛍光 (I_{\parallel} や I_{\perp}) を、印加電圧の ON-OFF 変調により特定周波数 $f(\text{Hz})$ で変調する (図 2 A)。この蛍光を CCD や CMOS などのイメージセンサーによって周波数 $4f(\text{Hz})$ で同期検出すると、1 変調周期に対して 4 枚の画像を取得することになる (図 2 B)。交流成分画像 (AC 画像, 図 2 C) と

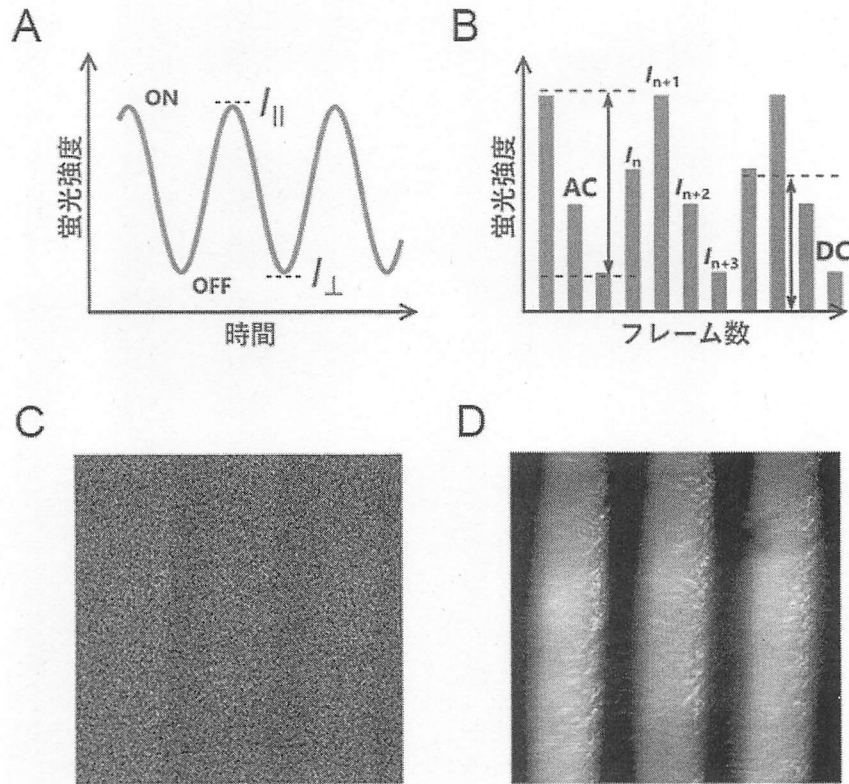


図2 イメージセンサーによる蛍光偏光のイメージング方法. (A) 特定周波数 f Hz で変調された蛍光偏光 ($I_{||}$ と I_{\perp}). (B) $4f$ Hz で同期検出された蛍光偏光の蛍光強度ヒストグラム. (C) 式(1)によって演算された AC 画像. (D) 式(2)によって演算された DC 画像

直流成分画像 (DC 画像, 図 2 D) は, それぞれ各画像の蛍光強度から式(1), および式(2)によって, これら 4 枚の画像を画像演算することで得られる.

$$AC = \sqrt{(I_n - I_{n+2})^2 + (I_{n+1} - I_{n+3})^2}$$

$$= \frac{\sqrt{2}T}{2\pi} (I_{||} - I_{\perp}) \quad (1)$$

$$DC = \frac{I_n + I_{n+1} + I_{n+2} + I_{n+3}}{4} = \frac{T}{8} (I_{||} + I_{\perp}) \quad (2)$$

ここで, I_n, I_{n+1}, I_{n+2} , および I_{n+3} は, 四半周期 ($T/4$) での積算蛍光強度である. これら式(1), および式(2)は, 位相オフセットと無関係であり, またトリガー開始位置に無関係に取得できる. さらに, イメージセンサーの位相とも無関係である. この式(1), および式(2)を用いることで, 蛍光偏光免疫分析における指標である偏光度 P は次の式(3)のように, AC 画像と DC 画像から算出することができる.

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} = \frac{\pi}{4\sqrt{2}} \frac{AC}{DC} \quad (3)$$

つまり, 蛍光強度の強弱に関わらず, 免疫測定に必要な偏光度をイメージセンサーの各ピクセルから得ることができる. まとめて, LCD の LC 層とイメージセンサーを利用することで蛍光偏光イメージングが可能になり, そのシステムを構築すれば, 免疫分析に応用できると考えられる.

2.2 蛍光偏光免疫分析法

蛍光偏光測定法は, 蛍光の偏光成分から, 測定対象が存在しているマイクロ環境 (粘度や配向など) や分子間の相互作用や結合状態などの情報を取得できる方法である. 蛍光偏光測定法を利用した免疫反応測定法である FPIA は, 分析の標的分子と蛍光色素標識標的物質 (トレーサー) を抗体に対して競合的に結合させる均一系競合イムノアッセイである. この方法は, 分離や洗浄, 抗体の固定化操作なしに, 標的物質の濃度定量を行えるため,

簡便性かつ迅速性に優れた方法である。直線偏光させた励起光をトレーサー分子に照射した時、励起光と平行方向の双極子を持つ蛍光原子団(フルオロフォア)のみが選択的に励起される。抗体と非結合なフリーのトレーサーは、フルオロフォアの励起状態において高速に回転運動するため、ランダムな偏光を持つ蛍光を発する。一方で、トレーサーが抗体と結合した場合(トレーサー-抗体複合体)、フルオロフォアの励起状態において回転運動が比較的抑制されるため、偏った偏光を持つ蛍光を発する。FPIAにおいてこの蛍光偏光の指標となる偏光度 P は、トレーサー-抗体複合体の量に依存することになる。トレーサー濃度、抗体濃度を一定にした系において、標的物質の濃度が増加すると、偏光度 P はトレーサー-抗体複合体の量の減少と共に減少する。反対に、標的物質の濃度が減少すると、偏光度 P はトレーサー-抗体複合体の量の増加により増加する。本手法では、偏光度 P は式(3)から求められる。

2.3 多サンプル同時測定用PDMS-ガラスマイクロ流体デバイスの作製

上述のように、LCDとイメージセンサーを利用することで蛍光偏光イメージングが可能になるため、イメージセンサーの視野内の全てのサンプルの蛍光偏光を同時測定することが可能である。そこで本システムを多サンプル同時FPIAに応用するため、多サンプル同時測定用PDMS-ガラスマイクロ流体デバイスを作製した。PDMS-ガラスマイクロ流体デバイスは、標準的なソフトリソグラフィ技術⁶⁾を用いて作製した。作製したマイクロ流体デバイスは5本の独立したマイクロチャネルを持ち、各マイクロチャネルの幅は $300\ \mu\text{m}$ 、深さ $110\ \mu\text{m}$ 、またチャネル間の長さは $300\ \mu\text{m}$ である。後述のように構築したシステムでは、5倍の対物レンズ(NA 0.13)を用いて測定を行い、イメージセンサーの視野内に3本のマイクロチャネルが収

まる。

2.4 同期検出システムの構築

市販のツイストネマチックモードの表示モードを持つノーマリーホワイト方式LCDは、図1に示すように分解し、LC層と一枚の偏光フィルターのみを用いた。図3に構築したシステムの概略図を示す。偏光された $488\ \text{nm}$ 半導体レーザーを励起光として用いた。NDフィルターでレーザー強度を調整し、ミラーで反射させることでマイクロ流体デバイス内のサンプルに照射した。サンプルから生じる蛍光は、5倍の対物レンズ(NA 0.13)で取得し、凸レンズを用いてLC層に集光した。その後、干渉フィルターによって励起光をカットし、蛍光のみをCCDイメージセンサーによって取得した。LC層への印加電圧のON-OFF変調は、パーソナルコンピューター(PC1)を用いて行った。PC画面上に白から黒が $3\ \text{Hz}$ で段階的に変化するグレースケール動画をつくり、それをLCD上に映すことでLC層の印加電圧を $3\ \text{Hz}$ で変調した。CCDイメージセンサーによる蛍光偏光のサンプリング周期は、ファンクションジェネレーター(FG)によって $12\ \text{Hz}$ に変調した。CCDイメージセンサーによる蛍光偏光のイ

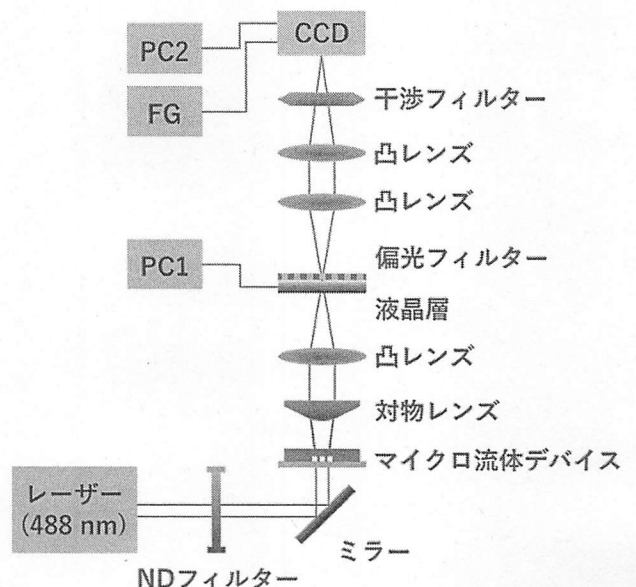


図3 構築した蛍光偏光イメージングシステムの概略図

メージング, および偏光度 P の画像演算は, パーソナルコンピューター(PC2)を用いて, 自作ソフトウェア, およびフリーソフト ImageJ によってそれぞれ行った.

3. 蛍光偏光の測定: 多サンプル同時 FPIA

実際に生理活性物質の FPIA を行い, 本システムの分子間相互作用解析ツールとしての性能を評価した. 分子間相互作用のモデルサンプルとして, 生理活性物質であるプロスタグランジン E2 (PGE2) を用いて FPIA を行った. PGE2 は, 血管拡張作用⁷⁾, 炎症誘発作用および抗炎症作用^{8,9)}, および睡眠-覚醒調節¹⁰⁾ などに関与する脂質メディエーターである. 本実験は, システム評価であるため, 簡略化のために標的物質である PGE2 と, トレーサーであるフルオレセイン標識 PGE2, 抗 PGE2 抗体をマイクロチューブで混合後, マイクロ流体デバイスのマイクロチャンネルに導入した. 5 倍の対物レンズ (NA 0.13) を用いると, イメージセンサーの視野内には 3 本のマイクロチャンネルのみが収まる. まず, コントロール, 12.5, 25.0 ng/mL の PGE2 濃度のサンプルを測定し, 次に, コントロール, 50, 100 ng/mL の PGE2 濃度のサンプルを測定し, コントロールの値によって補正した.

本システムによってイメージングされた, 典型的な偏光度 P 画像を図 4 A に示す. 偏光度 P 画像から, 3 本のマイクロチャンネルが同一画像に同時に取得できることがわかる. つまり本システムを用いることで, 多サンプルの偏光度 P を同時に取得できることが示された. 実際に, 偏光度 P 画像の各マイクロチャンネル部分の輝度値を読み取り, PGE2 濃度に対してプロットすると, 図 4 B に示すような PGE2 の検量線が得られた. FPIA の原理で予想されるように, PGE2 濃度の増加と共に蛍光偏光がランダムになり偏光度 P が減少した.

従来法である, 1 cm キュベットを用いた単一サンプル測定システム (FP-715, 日本分光株式会社) の結果と比較すると, FPIA において, 本システムが市販装置と同等の感度を有していることを確認した. つまり, われわれが開発した蛍光偏光イメージングシステムは, 従来法と同様の性能を持つことがわかる. しかし, われわれが開発した蛍光偏光イメージングシステムは, LCD と CCD イメージセンサーを用いることで, 複雑な駆動部なしに蛍光偏光イメージングが可能であり, 同時に多数のサンプルの測定が可能であった. この結果は, 多サンプル同時 FPIA 測定の世界で初めての例である. 現状で, 本システムの誤

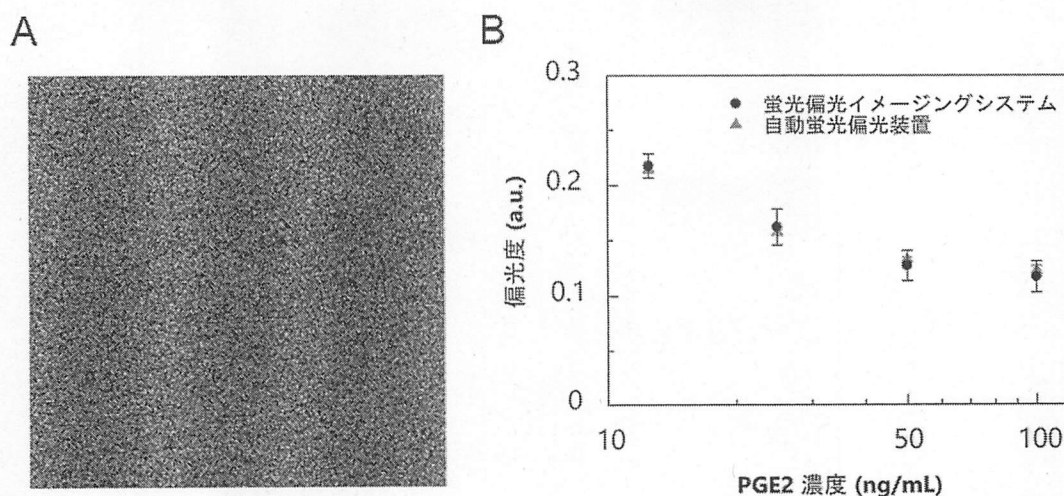


図 4 多サンプル同時 FPIA の結果. (A) 偏光度 P 画像. (B) マイクロチャンネルの輝度値を読み取り, PGE2 濃度に対してプロットした検量線(参考文献 5 の Figure 8 より転載)

差は、従来法よりも大きいですが、これはシステム光学系(LC層, レンズ, フィルター等), マイクロ流体デバイス, イメージセンサーの取り込みアルゴリズムなどの最適化により向上可能である。本実験では, 3本のマイクロチャンネルから同時FPIAを行ったが, システムの最適化と, マイクロ流体デバイスのデザインを変更することで, より多くのサンプルの同時FPIAが可能である。これは, 創薬分野などにおけるハイスループットスクリーニングや分子間相互作用のプロファイルにおいて非常に魅力的な特徴をもつツールといえるだろう。

4. おわりに

本システムは, 市販の液晶ディスプレイの液晶層を用いるだけで複雑な光学系が必要なく, 多サンプル同時免疫分析ができる極めて有用な方法である。また, 本システムは, LED光源やCMOSセンサー, 液晶駆動電気系統など, 集積可能な部材から構成可能である。そのため, システム全体の小型化・低コスト化が容易であり, さらに, マイクロ流体デバイスと組み合わせて多サンプル同時測定が可能である。これらの利点は, 創薬分野などにおけるタンパク質-タンパク質間相互作用解析やタンパク質-DNA分子間相互作用解析において, 非常に魅力的な特徴といえる。

従来の分析法による相互作用解析は, 測定操作が煩雑, 比較的大量の試料が必要, 測定結果を得るまでに長時間必要, 高価などの問題点がある。これらの問題点の解決を目的としたマイクロ流体デバイスベースのハイスループット分子間相互作用解析の1つに, スタンフォード大学のQuake教授らが取り組んでいる, 蛍光異方性に基づく方法がある¹¹⁾。

る¹¹⁾。しかし, 蛍光異方性は原理的に, 蛍光偏光度に比べ感度が劣る。また, マイクロ流体デバイスの観察に顕微鏡ベースの測定装置を用いており, 本研究のように測定システム全体の小型化・低コスト化は難しい。われわれが開発した蛍光偏光イメージングシステムとマイクロ流体デバイスの組み合わせは, 多サンプルの分子間相互作用スクリーニング解析への応用が可能であり, 多サンプル同時反応・解析, 試料量(数nL)の大幅低減, システム全体の小型化・低価格化によって, 相互作用解析の大幅な低コスト化を実現できるだろう。この相互作用解析ツールは, 創薬ターゲット探索や生命機能の解明など, 産業応用から基礎科学までの広い領域の研究に大きく貢献すると期待される。

参考文献

- 1) Lea, W. A.; Simeonov, A. *Expert Opin. Drug Discovery*, 2012, **6**, 17-32.
- 2) Jameson, D. M.; Ross, J. A. *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2685-2708.
- 3) Smith, D. S.; Eremin, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **391**, 1499-1507.
- 4) Routledge, P. A.; Hutchings, A. D. In *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*, 4th ed.; Wild, D.; John, R.; Sheehan, C.; Binder, S.; He, J., Eds.; Elsevier: Oxford, U.K., 2013; pp 945-962.
- 5) Wakao, O.; Fujii, Y.; Maeki, M.; Ishida, A.; Tani, H.; Hibara, A.; Tokeshi, M. *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 9647-9652.
- 6) McDonald, J. C.; Whitesides, G. M. *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 491-499.
- 7) Richardson, P. D. I.; Withrington, P. G. *Br. J. Pharmacol.*, 1976, **57**, 581-588.
- 8) Raud, J.; Dahlén, S.-E.; Sydbom, A.; Lindbom, L.; Hedqvist, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, **85**, 2315-2319.
- 9) Christman, J. W.; Abdolrasulinia, R.; Shepherd, V. L.; Rinaldo, J. E. *Prostaglandins*, 1991, **41**, 251-262.
- 10) Hayashi, O. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 14593-14596.
- 11) Cheow, L. F.; Viswanatha, R.; Chin, C.-S.; Jennifer, N.; Jones, R. C.; Guccione, E.; Quake, S. R.; Burkholder, W. F. *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 9901-9908.