

# 新しいライフサイエンス解析システム ルミノイメージアナライザ LAS-3000 multi color の開発

伊神 盛志\*

## Development of a New Analyzing System for Life Science; “Luminescent Image Analyzer LAS-3000 multi color”

Seishi IKAMI\*

### Abstract

In life science study, various methods to visualize a faint light pattern have been used. Especially, chemiluminescent imaging needs higher sensitivity to detect very low light level that is invisible to the naked eye even in total darkness. In 1997 Fuji Photo Film's first luminescent image analyzer LAS-1000 has been released. Since then, cooled CCD imaging has widely prevailed in life science study and the LAS series has been improved in automatic and easy operation. On September 2002, as second-generation, super sensitive and versatile luminescent image analyzer LAS-3000 was released. Further on June 2004, LAS-3000 multi color had 3 independent LED light sources for the first time in the world. In this paper, LAS-3000 multi color technologies and its applications are presented in detail.

### 1. はじめに

ライフサイエンス研究の分野では、DNA やタンパク質などの生体由来物質への標識に蛍光色素や化学発光基質を使用して、あるいは蛍光を発する性質の遺伝子を発現させるなどして、その発光パターンを画像化することがある。特に、ウェスタンブロットティングと呼ばれるタンパク質の検出手法では、化学発光基質を用いること（以下、化学発光法と呼ぶ）が多い。その発光は暗闇でも肉眼で検知できないほどの微弱な光であるため、多くはX線フィルムへの長時間密着露出で検出されていた。富士写真フィルム（株）は1997年、それら微弱な発光対象を簡単操作でデジタル画像にする高感度な冷却CCDカメラシステム；ルミノ・イメージ・アナライザ（Luminescent Image Analyzer System）LAS-1000を発表した<sup>1)</sup>。以降、この分野では冷却CCD

方式によるイメージングが定着してきたが、さまざまなアプリケーションに応えることと、より高感度でより使いやすい製品を目指した新製品LAS-3000（標準タイプ）を開発し、2002年9月より発売した<sup>2)</sup>。その後、小型で普及タイプのLAS-3000miniを2003年10月に発売、標準タイプはさらに励起光源の波長数を増やし、利用可能な試薬の範囲を広げたLAS-3000 multi colorとして2004年6月よりリニューアル新発売し、多様なニーズに応え続けている。



Photo 1 LAS-3000.

本誌投稿論文（受理2005年1月14日）

- \*富士写真フィルム（株）R&D統括本部  
機器開発生産本部機器商品開発センター  
〒258-8538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798
- \*Equipment Research & Development Center  
Equipment Development and Production Division  
Research & Development Management Headquarters  
Fuji Photo Film Co., Ltd.  
Miyanodai, Kaisei-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa  
258-8538, Japan

## 2. 主な仕様とコンセプト

微弱な光を発している静止した被写体を、コンベンショナルなカメラやフィルムでイメージングするには長時間露出を行う。ライフサイエンス分野では、その感度が高ければ露出時間を短くできるから研究進度を早めることができる。また、粒状が細やかであれば細部の変化や違いをいち早く理解することができる。LAS-3000は高感度と高精細を両立させるため、受光部面積比率の高い当社独自の高感度320万画素エリアセンサ＝スーパーCCDハニカム<sup>3)</sup>を採用した。また、さらなる高感度実現のために専用の大口径フジノンレンズを開発した。従来製品の基本技術の上に透過型UV光源を与え、multi colorモデルはさらに緑と赤のLED励起光源を加えた。特に大きく進化を遂げた点は、従来製品の手動操作部分のほとんどをパーソナルコンピュータ(PC)から行えるようにしたことである。PCとのインターフェースはUSBを採用し、最新のパソコンに対応できるようにしたことが高感度・高精細はもちろんのこと、多用途性とさらなる利便性向上を実現した。いわば、「簡単！きれいな高感度」がLAS-3000の基本コンセプトである。

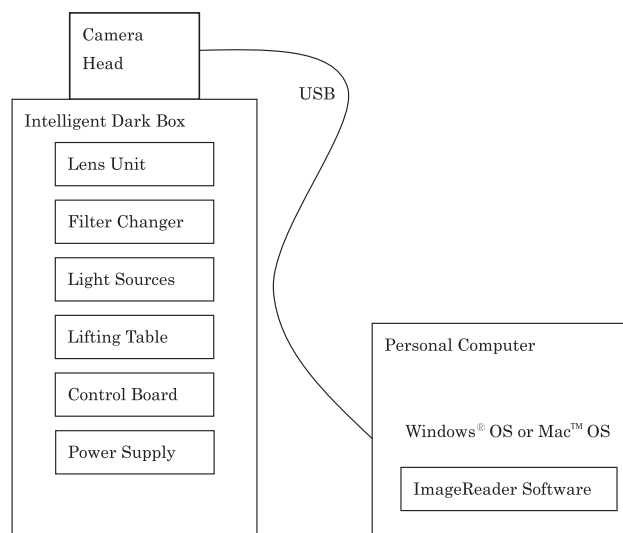


Fig. 1 Schematic Diagram of LAS-3000 system.

Table 1 Main Specification of LAS Series.

項目	LAS-3000 multi color (新型)	LAS-1000plus (従来製品)	特徴
画素数	320万画素 (最大記録画素数 630万画素)	130万画素	解像力の向上
ビニング	128画素まで	4画素まで	感度の向上
カメラレンズFナンバー	0.85	0.85	専用設計、周辺減光比の向上
励起光源	4種	1種	LED 3色の他、透過UV光源を追加
フィルタ数	5種	1種	多様な蛍光色素に対応
自動切替	フォーカシング アイリス フィルタ 被写体サイズ 透過光源⇔落射光源	フォーカシング	自動化・電動化
手動交換	透過光源(UV⇔白色) 落射光源(Blue⇔Green⇔Red)	アイリス フィルタ 被写体サイズ 透過光源⇔落射光源	LAS-1000は光源バリエーション無
本体サイズ (c.m.) W×H×D	51×8.9×4.8	40×9.2×4.2	LAS-1000は制御・電源部が別体 (幅12cm)
PCとの インターフェース	USB1.1	SCSI2、ビデオ信号 (フォーカス専用)	最新のパソコンに対応 接続ケーブル数の削減

### 2.1 システム構成

LAS-3000は、カメラヘッド、カメラレンズ、励起光源と分光フィルタおよび制御・電源部を内蔵したインテリジェントダークボックス、操作ソフトウェア(読み取りソフト)をインストールしたパーソナルコンピュータ(PC)から構成されている。カメラヘッドとインテリジェントダークボックスは、読み取りソフトからの露出時間設定、フォーカス調整、フィルタ選択を始めとするさまざまな動作指示をUSB経由で受け取る。

### 2.2 ユニット詳細

#### 2.2.1 カメラヘッド

一般に、CCDはその温度を低く安定に保つことで、露出時間と温度に依存する暗ノイズ(バイアス性ノイズ)を小さくすることができる。LAS-3000のCCDは対角28mmの大型なCCDで、2段サーモモジュールにより、室温下で-30℃まで冷却して動作させている。これにより、30時間に及ぶ長時間露出が可能になった。冷却動作に伴う放熱は、強制空冷により行っている。

CCDに蓄積された電荷の読み出しは、低速駆動によって画素ごとのばらつきである読み出しノイズ(ランダム性ノイズ)を低減できることから、一般的なビデオカメラよりも低い1MHzで行っている。このことにより、1画素あたり20電子(r.m.s.)以下にノイズを低減している。

蓄積電荷を複数画素まとめて読み出すことでS/Nを向上させる方法(ビニング)が知られるが、LAS-3000は2画素、8画素、32画素、128画素の4段階のビニングが可能である。

#### 2.2.2 カメラレンズ

LAS-3000専用に、球面レンズ9群12枚構成の、焦点距離43mm、Fナンバー0.85の大口径カメラレンズ(FUJINON VRF43LMD)を同時開発した。これは、市販レンズの中で明るいといわれるF1.4のレンズの約2.7倍に相当する明るさである。さらに、そのイメージサークルをCCDの対角長の1.4倍としたことで、周辺減光比は従来製品比2倍以上となった。このことで、撮影画像の中央部と周辺部の質感の差を大幅に改善することができた。

アイリスは開放とF2.8の2段階で、それぞれ微弱光収録とデジタイズに対応させている。光学的な歪曲はCCDから読み出した後、固有データを使ってPC側で補正処理を行っている。この結果、出力画像の歪曲は1%未満となり、精確な等倍プリントを可能にした。また、フォーカシングとアイリスはそれぞれパルスモータで動作し、そのパルス数をインテリジェントダークボックスの制御部に記憶させておく。これにより、前回撮影条件を呼び出すだけで、フォーカス調整をせずに合焦した画像を収録することができる。

### 2.2.3 インテリジェントダークボックス

撮影試料をセットする暗箱（インテリジェントダークボックス；以下、IDX）は励起光源、蛍光フィルタ切替装置、電源および制御基板を内蔵する。さらに、被写体サイズの設定を撮影距離（結像面であるCCD受光部から被写体までの距離；共役長）の調節で行うように試料台を電動で上下させる機構を備えている。特に、励起光源を試料台と一体化させたことで、撮影距離の違いによる照度の分布変化を解決している。また、設置場所が狭いなどの制約の多い実験室に置けるように、基板・機構部分およびサービスポートをIDXの正面と右側面部に集中させたことで、壁を背にしたコンパクトな設置が可能になった。試料が直接接触する試料トレイは、従来製品と同様に自家蛍光が少なく洗浄の容易な黒色テフロンコーティングを施している。

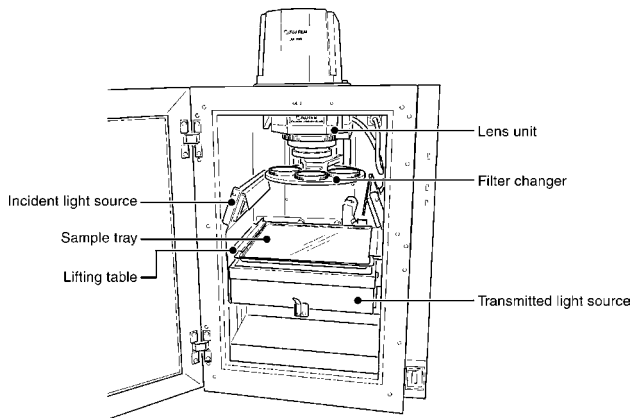


Fig. 2 Inside view of IDX.

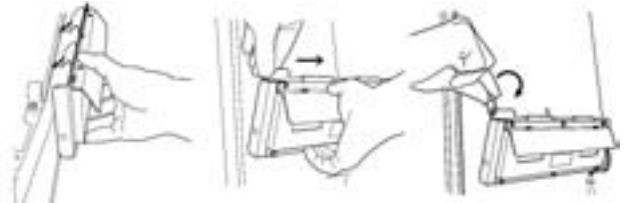
### 2.2.4 落射照明

LAS-3000の落射照明は励起波長ごとに対称な2個のユニット1組で構成されている（Fig. 2, Fig. 5）。その各ユニットの中央に、フォーカシングとデジタイズを目的とするカクテルLED光源を、そして、その両サイドに励起用の各波長のLED光源を配した。レンズへの直入射を防ぐバイザーは、S/N比の高い蛍光画像を得るこ

とに貢献している。また、光源自身が試料の蛍光像に影響を与えることのないように、すべて、蛍光体を含まないLEDを用いている。

#### a. 着脱の容易化

2002年9月発売当時の標準モデルは、主波長460nmの固定式青色LED光源を搭載していたが、multi colorモデルから520nmと630nmの2種を追加した。このため、すべての光源ユニットを簡単に交換できるように着脱の容易な仕組みに変更した。



1. Hook the hanger. 2. Slide in to the arrow direction. 3. Lower the latch.

Fig. 3 3 easy actions to install the light source unit.

#### b. 励起光の単色化

LEDを平面的に多数を配置することで、薄型で広範囲に均一照射可能な光源を作ることができるが、スペクトル分布に広がりがあるため、特に、発光波長中心より長波長側の光は蛍光検出の際のノイズとなる。そこで、それぞれのLED光源に、波長中心付近より長波長側をカットする光学フィルタを与えた。Fig. 4にそれぞれのLED光源の分光スペクトルを示す。

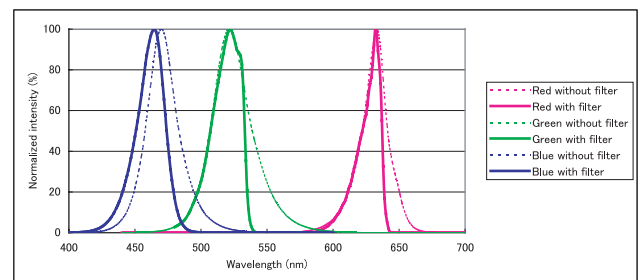


Fig. 4 Excitation light source spectra

The light source consists of an LED combined with an appropriate filter which cuts the longer wavelength side of the spectrum to avoid the overlapping with the detected fluorescence.

#### c. 照明ムラと光パワーの向上

まず、青色LED光源について、試料台中央のマイクロプレートのサイズに相当する14cm×9cmのエリアの照明ムラを10%程度に収めつつ、試料上の光パワーを上げられるようにシミュレーションを行った（Fig. 5, Fig. 6）。最後に、実系で検証した結果、ムラは10%以内に収まり、光パワーも試料台中央のマイクロプレートサイズ内で20.3 μW/cm<sup>2</sup>となった。緑と赤のユニッ

トについても同様に進めた。なお、各ユニット中央部はフォーカス調整とデジタイズ収録に使用するRGB 3色を配したカクテルLED光源であるが、これもシミュレーションを参考にLED配置を決定した。

Fig. 6の左右の図はそれぞれ試料台全体の光パワー分布を表現している。検討開始当時（右図）に比べ、LEDの数と配置を再検討した左図では、ムラを抑えたまま光パワーを約50%向上できる結果が得られた。

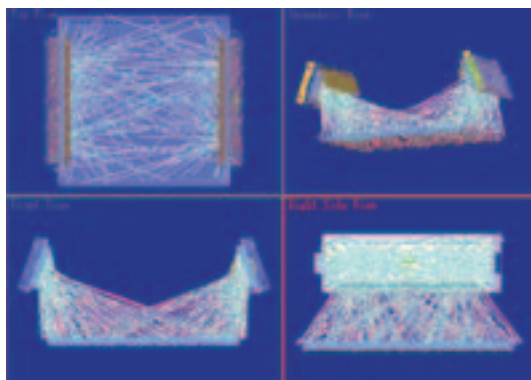


Fig. 5 Simulation result for ray tracing (Blue LED unit).

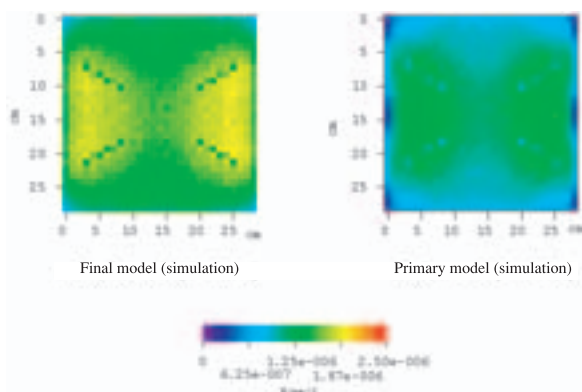


Fig. 6 Simulation result for light intensity localization (Blue LED unit).

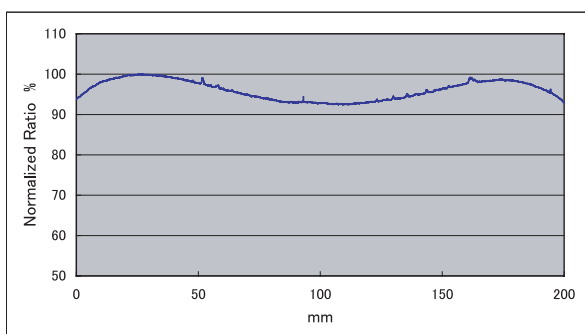


Fig. 7 Measurement result for light intensity localization (Blue LED unit).

Fig. 7にシミュレーション結果を反映して試作した光源のムらのプロファイルを示す。得られた画像の縦方向100mmを平均し、最大値を100%として表示した。

グラフの横軸の100mm表示が画像の中央部に相当する。タイタープレートの長辺に相当する領域（グラフ上の30mm～170mmに相当）で、10%以内のムラに収まっている。

## 2.2.5 透過照明

白色LEDによる白色光源と、インバータ点灯のUV管による主波長312nmのUV光源の2種を用意した。これらも落射光源と同じようにユニットで差し替えが可能で、銀染色ゲルには白色光源、エチジウムブロマイド染色ゲルにはUV光源というように、目的に合わせて使用する。

## 2.2.6 蛍光検出フィルタとフィルタ切替装置

フィルタは代表的なアプリケーションに合わせて専用に5種用意した。大口径レンズの被写体側に接続するため、φ74mmの大サイズとし、M77ねじ込み枠に収めた。

Table 2 Fluorescent Detection Filters for LAS-3000.

Filter name	Specification	Typical specimen
Y515Di	515nm long pass and near IR short pass	SYBR® Green
510DF10	510nm bandpass, FWHM 10nm	GFP
575DF20	575nm bandpass, FWHM 20nm	Cy™ 3
605DF40	605nm bandpass, FWHM 40nm	Ethidium Bromide
R670	670nm long pass	Cy™ 5

フィルタ切替装置は、5つまでの専用フィルタが取り付け可能なホイール状フレームを持っている。そのフレームをカメラレンズの直前で回転させ、そのひとつのフィルタが選択されると、ホイール状フレームごとカメラレンズに圧接する動作を行う。これらは、すべてPC側からの操作で行い、ユーザはフィルタに手を触れることなく交換することができる。フィルタの取り替えやレンズの着脱時は、PCからの操作によりホイール状フレームを大きく下方に退避させることで交換作業を容易にした。

## 2.2.7 読み取りソフト (ImageReader)

ユーザの接触がもっとも多い操作ソフトウェア（読み取りソフト）は、従来製品で好評だった固定設定ですぐに使い始められる「Lite」と、ユーザカスタマイズの可能な「Pro」とをひとつのソフトウェアに集約し、GUI上のボタン一つで切り替えられる設計として利便性の向上を図った。



Fig. 8 LAS-3000 ImageReader GUI.



撮影動作は、1枚撮り、繰り返し撮り機能のほかに、多重露出を行う「Increment」モードと、露出時間を16枚分までさまざまに設定して連続撮りする「Program」モードを用意した。「Increment」は微弱で露出の程度がわからないときなどに、「Program」はタイムコースなどの把握に使うことができる。「Increment」モードの特長は、発光像が徐々に現れていく途中経過をPCのモニターを通して観察でき、ユーザが任意に露出を止められる点である。これは、現像するまで結果のわからないフィルム法に対する大きな利点であり、フィルム露出の過不足による撮り直しや、その撮り直しによって発光が減衰してしまった試料を再作成しなければならないといった無駄を避けることができる。

もう一つの方法として、微弱な発光対象を4秒間、プレ露出を行い、その画像の濃度ヒストグラムの上限、下限から適切な画像濃度とするに足る露出時間を自動計算して、その露出時間で本撮影する「Auto」も用意した。これは、発光時間の長い試料に対して有効である。

露出が完了してカメラヘッドから送られた画像信号は、バックグラウンド補正、シェーディング補正、光学歪曲補正の各画像補正処理が加わり、画像濃度のヒストグラムから計算した適切なコントラストを与えられて、出力画像として表示される。

## 2.2.8 アクセサリ

従来製品と同様に、LAS-3000にも“ノンパララックストレイ”を用意した。Fig. 9 (a) に示すように、通常のカメラレンズで普通に撮影した場合は周辺部のウェルの底部が十分に写らない。一方、Fig. 9 (b)のように光路の中途にフレネルレンズを入れて撮影すると、凸レンズの性質により周辺部ほど光軸側に屈折角が大きくなるため、周辺のウェルも中心部と同じように底面まで写すことができる。このように、ノンパララックストレイは、厚みを持つタイタープレートのどのウェルも同じように写すことのできる便利なツールである。

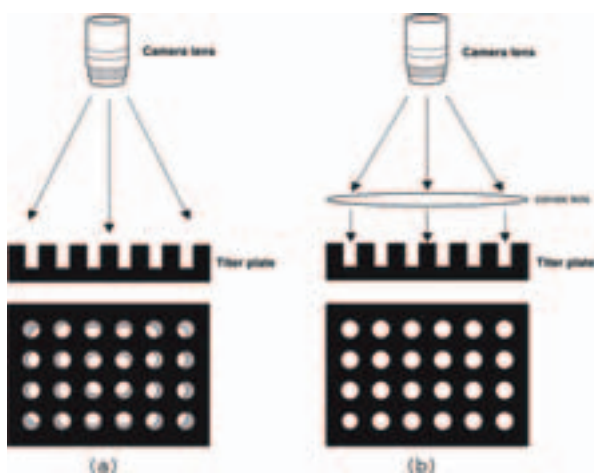


Fig. 9 Theoretical explanation of non-parallax tray.

## 2.2.9 バリエーションモデル (mini / UVmini)

化学発光専用機のLAS-3000mini、化学発光法とエチジウムブロマイド蛍光検出兼用のLAS-3000UVminiの2機種は標準モデルから励起光源と電動機構を省略した普及モデルである。制御基板と電源は、IDXとは別のケースに収め、カメラレンズのフォーカスとアイリスは手動操作できるようにツマミを追加した。



Photo 2 Variation models: LAS-3000mini & LAS-3000UVmini  
LAS-3000UVmini has the expansion bay for common light source on the market.

## 3. 実例

LAS-3000で撮影された画像を3例取り上げる。ここでの画像定量ならびに画像重ね合わせは、当社製品の画像解析ソフトウェア“Multi Gauge ver.3.0”を用いた。

### 3.1 化学発光法

Fig. 10に、ルミノール系の発光基質による検出比較事例（データ：当社I&I事業本部 ライフサイエンスグループ カスタマーサポート）を示す。LAS-3000（◆）、フィルム（▲）共、2分間の露出を行った。LAS-3000はアプライ量の少ない部分についても同程度に写し出すことができている、フィルムと同等の感度を有することを確認できた。また、フィルムで濃度的に飽和している領域においても、LAS-3000は直線性を失わずに対応しており、フィルムよりも広い範囲にわたって良好に定量できることがわかる。

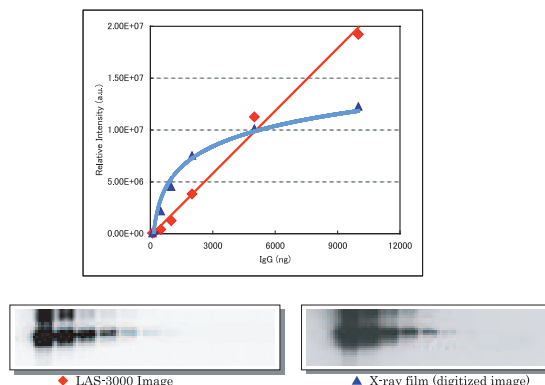


Fig. 10 Comparison of LAS-3000 and X-ray film images in chemiluminescent detection.

### 3.2 蛍光法

SYPRO Ruby はタンパクすべてを染色し、Pro-Q Diamond はリン酸化タンパクのみを染色して蛍光発光する性質を利用して、青色励起光源でSYPRO Ruby を励起した蛍光画像（青で表現）と、緑色励起光源でPro-Q Diamond を励起した蛍光画像（緑で表現）を重ね合わせた（Fig. 11）。特異的なタンパクの泳動バンドを、励起光を切り替えることによって識別できている。

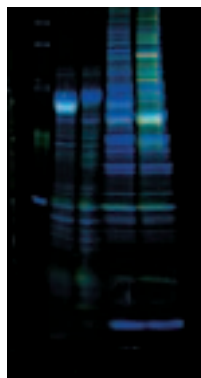


Fig. 11 Overlaid image of phosphorylated proteins stained by Pro-Q™ Diamond and SYPRO® Ruby. (Data courtesy of Dr. Atsuhiko Ishida, Department of Biochemistry I, Asahikawa Medical College.)

### 3.3 デジタイズ

発光メンブレン試料に標準試料としての染色マーカーが添えられている場合、X線フィルム法ではオリジナル試料に発光パターンの写った現像済フィルムを直接重ねて標準試料と検出試料との関係を調べていた。LAS-3000 ならば、発光パターンの撮影完了後、白色光を照射して染色マーカーの画像も収録し、電子データである2つの画像をディスプレイ上で重ねればよいだけだから、画像検討をすぐに行える上、データの保存も容易である。LAS-3000 ImageReader LITE（読み取りソフト）はこの2回の画像収録を1回の撮影スタート操作で自動的に行うことができる。

Fig. 12 に染色マーカーとマウス IgG のウェスタンブロットティングの重ね合わせ例（データ：当社 I&I 事業本部 ライフサイエンスグループ カスタマーサポート）を示した。モノクロ画像はメンブレンと標準マーカーを示し、擬似カラー部分は ECL™ による発光パターンである。

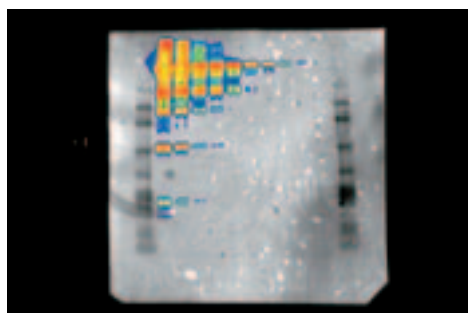


Fig. 12 Overlaid image of prestained protein molecular weight marker and mouse IgG western blotting using ECL™.

## 4. まとめ

スーパー CCD ハニカムを冷却・スロースキャンして、高感度・高精度で低ノイズな画像を出力できる冷却 CCD カメラを開発した。これをベースに、大口径レンズと多種類の励起光源、分光フィルタを新開発し、操作の自動化・容易化を押し進め、新しいライフサイエンス研究用画像解析システム LAS-3000 multi color を開発した。化学発光法で、X線フィルム密着露出同等の感度と、フィルム法ではなしえなかった広範囲の定量を可能にした。さらに、蛍光法では、透過 UV 光源のほかに、交換容易な LED 落射励起光源を3種開発し、多重染色などの多様なアプリケーションに対応できるようになった。また、多重露出やプログラム撮影モードを加え、多用途性と使いやすさを実現した。このような高性能は、メンブレンやゲルの試料撮影はもとより、ドーピング検査<sup>4)</sup> や、マウスなどの生物を生きたままでもイメージング<sup>5)</sup> する方面への応用など、ライフサイエンス研究のさまざまな場面でその発展と進歩に大いに貢献することを期待している。

### 参考文献

- 1) 三浦 研二, 伊神 盛志, 長島 眞喜子, 今井 千織. 基礎編:化学発光検出における LAS シリーズの特徴. 富士フィルム サイエンスシステム アプリケーションノート, No.8 (1997).
- 2) 三浦 研二, 長島 眞喜子, 林 真由美. 基礎編:LAS-3000 の基本性能. 富士フィルム サイエンスシステム アプリケーションノート, No.22 (2003).
- 3) Tetsuo Yamada; Katsumi Ikeda; Yong-Gwan Kim; Hideki Wakoh; Tetsuo Toma; Tomohiro Sakamoto; Kazuaki Ogawa; Eiichi Okamoto; Kazuyuki Masukane; Kazuya Oda; Masafumi Inuiya. A Progressive Scan CCD Image Sensor for DSC Applications. IEEE Journal of Solid-State Circuits. **35** (12), 2044-2054 (2000).
- 4) Francoise Lasne. Double-blotting : a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. Journal of Immunological Methods. **253**, 125-131 (2001).
- 5) Min Kyung So; Joo Hyun Kang; June-Key Chung; Yong Jin Lee; Jae Hoon Shin; Kwang Il Kim; Jae Min Jeong; Dong Soo Lee; Myung Chul Lee. In Vivo Imaging of Retinoic Acid Receptor Activity using a Sodium/Iodide Symporter and Luciferase Dual Imaging Reporter Gene. Journal of Molecular Image. **3** (3), 1-9 (2004).

(本報告中にある“スーパー CCD ハニカム”, “フジノン”, “FUJINON” は、富士写真フィルム(株)の商標です。また、他のブランド名または製品名は各社の商標もしくは登録商標です。)