

1. FLIM イメージング - Image Reconstruction

原理

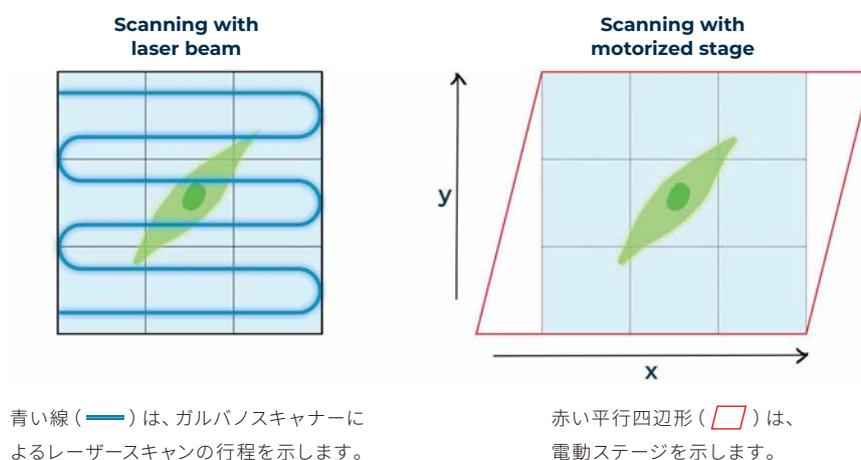
FLIM イメージングは取得した生データから画像を再構成する技術です。このプロセスでは、収集された信号を意味のある視覚的表現に変換するために、複数の重要なコンポーネントが連携して機能します。

まず、レーザー光をスキャンするための、スキャンミラーとフォーカスレンズ、つまりスキャンユニットが組み込まれた顕微鏡システムが必要です (FLIM スターターキットには含まれません)。スキャンユニットは、観察サンプル上のレーザービームの動きをピクセルごとに繊細に制御します。もしくは、モーターステージを使用して pixel-by-pixel のスキャンを実行し、レーザービームを固定したままサンプルの動きを制御する場合があります。

Pixel / Line / Frame の情報が統合されたスキャンクロック信号によって統合された正確な空間情報を収集するためには慎重な制御が必要です。

スキャンシステムの例 (スターターキットには含まれません)

図1: スキャンシステムの例 ※ 説明のため9ピクセル (3×3ピクセル) の画像として簡略化



蛍光色素で染色されたサンプルにレーザーが照射されると蛍光が放出されます。単一光子検出器は発光をとらえ、電気信号を生成します。

位置情報とキャプチャされた信号の両方が [FLIM データ取得カード](#) に送信されます。FLIM データ取得カードは他のコンポーネントと連携して正確な画像再構成を行う重要なモジュールです。

すべてのデータが FLIM データ取得カードに記録され、ソフトウェアに転送されると、スキャン領域のサイズ、実際の画像寸法、ピクセル単位での X、Y オフセットなどの位置パラメータが挿入され、画像が再構成されます。これがサンプル内の蛍光体の分布を画像として見る方法です。

1. FLIM イメージング
2. 蛍光相関分光
3. FLIM フェーザー
4. 時間相関単一光子計数

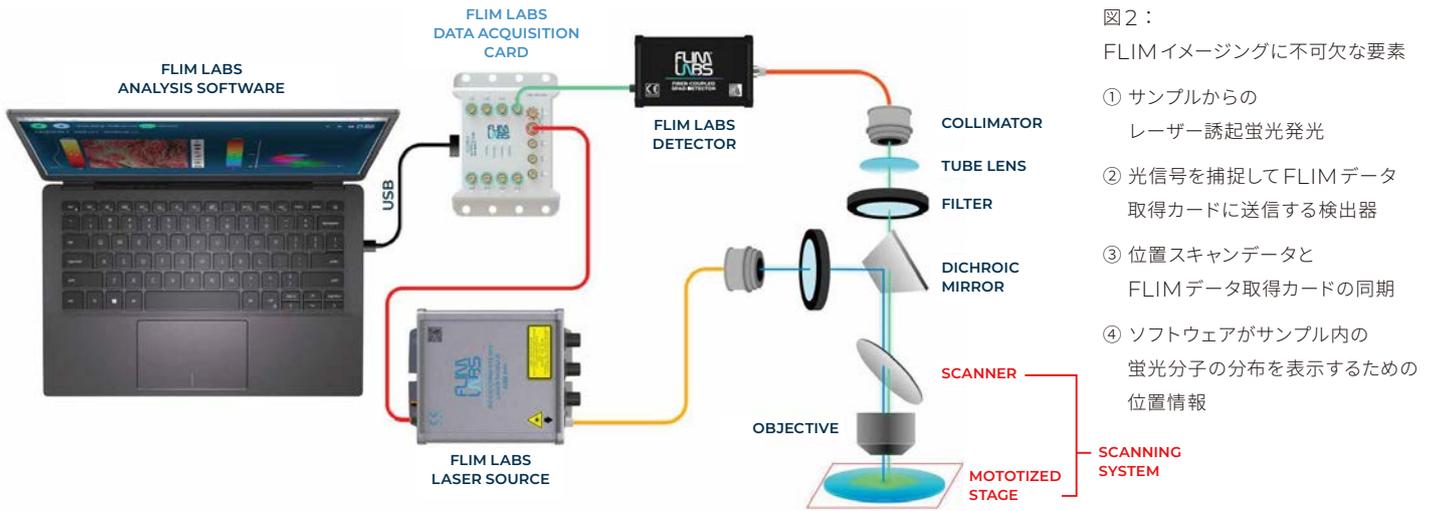


図2：
FLIMイメージングに不可欠な要素

- ① サンプルからのレーザー誘起蛍光発光
- ② 光信号を捕捉してFLIMデータ取得カードに送信する検出器
- ③ 位置スキャンデータとFLIMデータ取得カードの同期
- ④ ソフトウェアがサンプル内の蛍光分子の分布を表示するための位置情報

FLIM LABS 社のFLIMデータ取得カードがFLIMイメージングを強化

FLIM LABS 社のFLIMデータ取得カードは、スキャンシステム、検出器、およびデータ処理ソフトウェアを統合するブリッジとして機能します。この高性能カードは、同期用のさまざまな入力チャンネルを使用して、正確な画像再構成に必要なすべてのデータを受信します。3つの特殊な入力チャンネルにより、正確な位置情報の取得が可能になります。

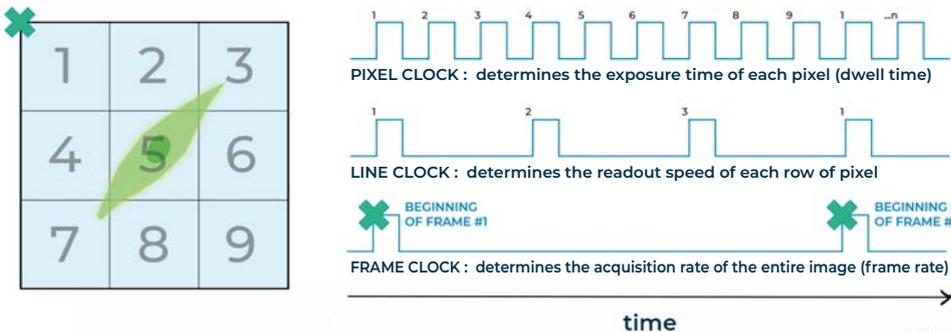


図3：
3つの特殊な入力チャンネル

- ref 1: FRAME / SCAN CLOCK同期
- ref 2: LINE CLOCK同期
- ref 3: PIXEL CLOCK同期

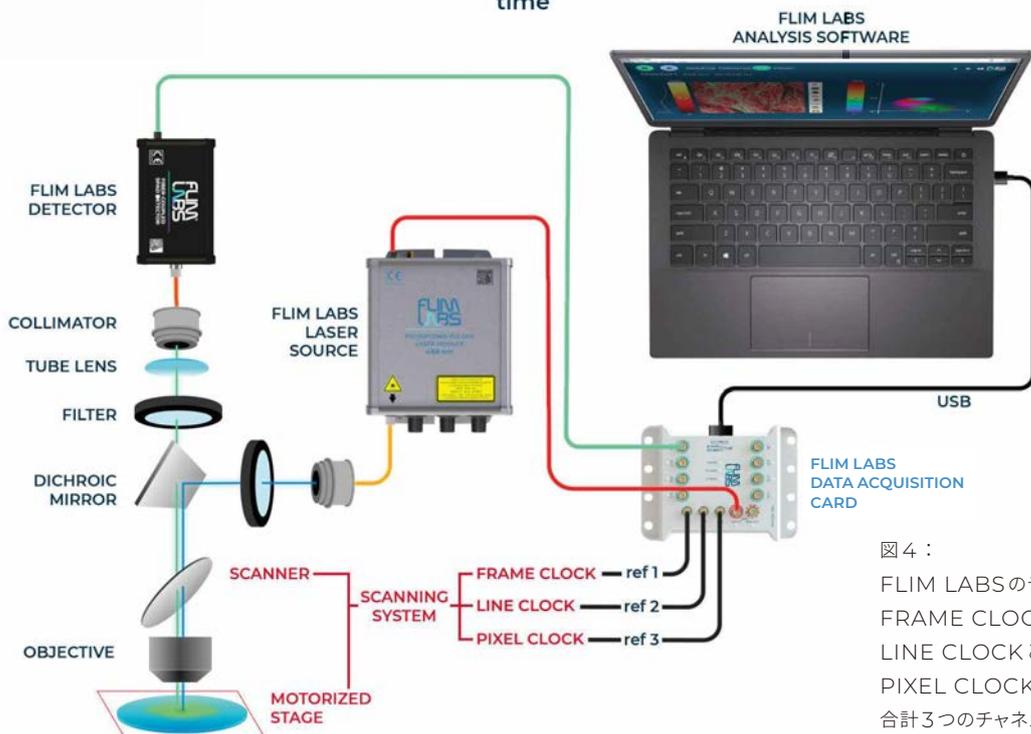


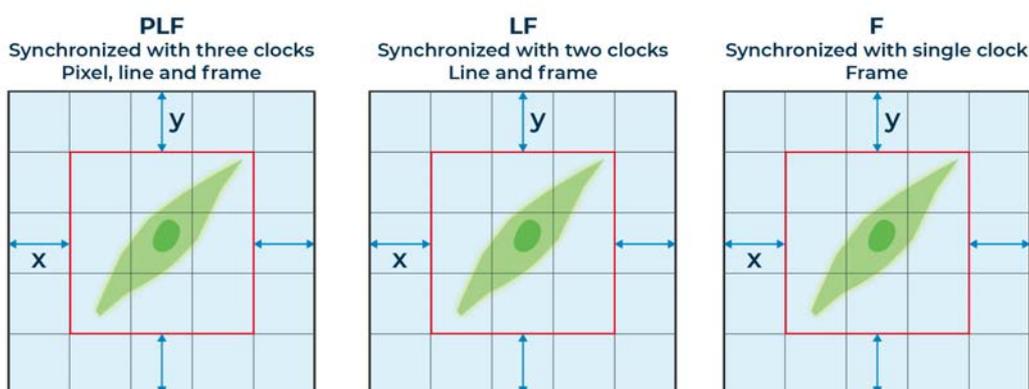
図4：
FLIM LABSのデータ取得カードには、FRAME CLOCKと同期するref 1、LINE CLOCKと同期するref 2、PIXEL CLOCKと同期するref 3、の合計3つのチャンネルがあります。

データ取得カードは精度が良いので、忠実な画像の再構成を保証します。

同期信号を1つしか利用できない場合でも、付属のソフトウェアがシームレスに課題を克服します。FRAME / SCAN CLOCKのみ (図5:F)、またはLINE CLOCKと併用して (図5:LF)、ソフトウェアは画像を再構成します。ピクセルの滞留時間を他の位置パラメータ (スキャン領域のサイズ、実際の画像寸法、ピクセル単位の X、Y オフセット) と組み込むことで、ソフトウェアはさまざまな実験設定に合わせて調整され、すべての研究者がFLIMイメージングを利用できるようになります。

少ない同期信号でのFLIMイメージング

図5



Synchronization and insertion scanning spatial data that are needed for image reconstruction

	PLF	LF	F
SCANNING SPATIAL PARAMETERS NEEDED FOR FLIM LABS' ANALYSIS SOFTWARE			
the pixel dwell time (μs -ms)		✓	✓
the scanned area size (5x5 pixel)	✓	✓	✓
the image size (3x3 pixel)	✓	✓	✓
the X, Y offsets (2 pixels on each direction)	✓	✓	✓

2. 蛍光相関分光 - FCS, Fluorescence Correlation Spectroscopy

蛍光相関分光法 (FCS) は、分子ダイナミクスの研究と定量化のためのテクニックです。その名の通りFCSは、蛍光分子が観察対象の内と外に拡散するときに出される**蛍光変動の時間相関**の分析に基づいています。観察サンプルの内外で起こる蛍光分子の連続的な変動をから、サンプル内の1つまたは複数の種の個々の特性を決定できるため、これは単一分子技術 (single-molecule technique) と見なされます^{※1}。

蛍光変動の振幅と周波数分布を決定するために、**時間依存強度 $F(t)$** を統計的に分析します。FCS統計分析では、遅延時間 T の範囲で $F(t)$ と $F(t+T)$ の相関関係を計算します。調査対象の蛍光分子のさまざまな情報を含む**自己相関関数 $G(T)$** は、その計算結果です^{※2}。

参考文献 ※1 J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, 2006.

※2 L. Yu et al., "A Comprehensive Review of Fluorescence Correlation Spectroscopy," Front. Phys., vol. 9, no. April, pp. 1-21, 2021.

1. FLIM イメージング
2. 蛍光相関分光
3. FLIM フェーザー
4. 時間相関単一光子計数

FCSは共焦点システムで使われることが多く、その場合、観察ボリュームは、焦点を絞ったレーザービームで達成可能な最小の回折限界スポットになります。測定中、回折限界スポットは、取得中ずっと固定位置に維持されます。このような共焦点顕微鏡システムでは、FLIM LABS社の製品を使用してFCSを実行できます。

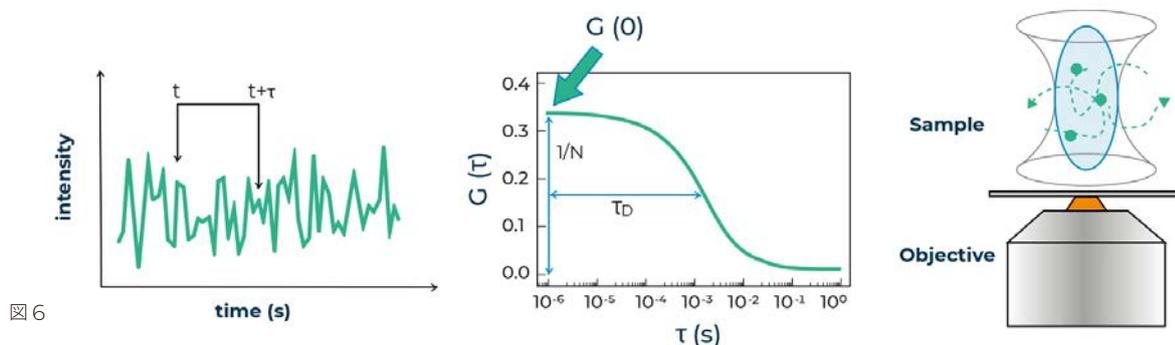


図6

相関曲線 $G(0)$ の振幅は、観測ボリューム内の蛍光分子の平均数 N に反比例します。つまり、 $G(0) \sim 1/N$ です。さらに、相関曲線の幅 T_D は、分子が焦点のウエストを横方向に拡散する平均時間を表します。

FLIMデータ取得カードを使用すると、ユーザーは時間の経過に伴う蛍光変動信号を高速に取得できます。自己相関曲線は簡単に計算でき、その結果を最終的なFLIM測定と統合できます。

3. FLIMフェーザー - FLIM-Phasors

FLIM画像に含まれる情報は、フェーザー解析を導入することで簡単に処理できます。この方法では、寿命分布のグラフ表示(フェーザープロット)が可能です。実際、FLIMフェーザープロットの解釈は簡単で、FLIMとフェーザーの組み合わせにより、同じFLIM画像内の異なる寿命集団を簡単に分離できます^{※3}。

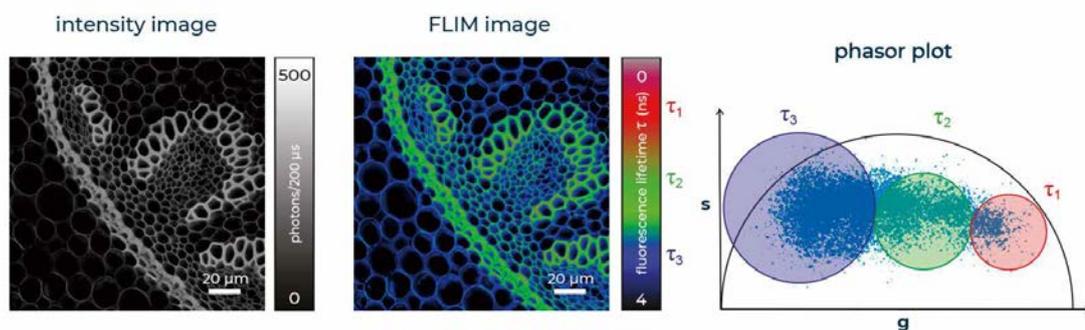


図7 convallaria majalis

フェーザープロット図は、それぞれ異なる寿命値を表す3つの円(赤が τ_1 、緑が τ_2 、青が τ_3)を持つ誇張されたFLIMフェーザー解析の例を示しています。

円は視覚的にわかりやすくするためにサイズが異なり、 τ_1 が最も小さく、次に τ_2 、 τ_3 と続きます。

それぞれの種は正確なフェーザー(いわゆる「指紋」)に関連付けられているため、異なる寿命を持つ異なる蛍光体を区別することができます。フェーザープロットのベースにある幾何学的動作原理を使用して、異なる寿命値(点の雲)が半円上に分布し、「最長」の寿命はプロットの左側にあり、「最短」の寿命はプロットの右側にあります。

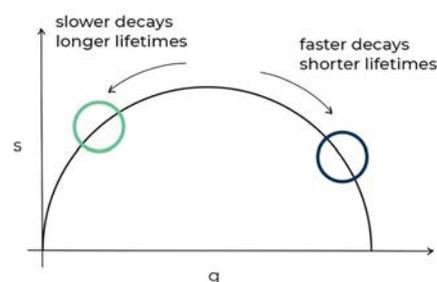


図8

さらに、指紋の雲が正確に半円上にあれば、蛍光信号は**単一の指数関数的減衰で記述できる**ことを意味しますが、雲が半円領域内であれば、寿命は異なる値の重ね合わせになります。したがって**FLIM フェーザー**アプローチは、調査中のサンプルの蛍光寿命指紋の解釈に非常に簡単です*4。

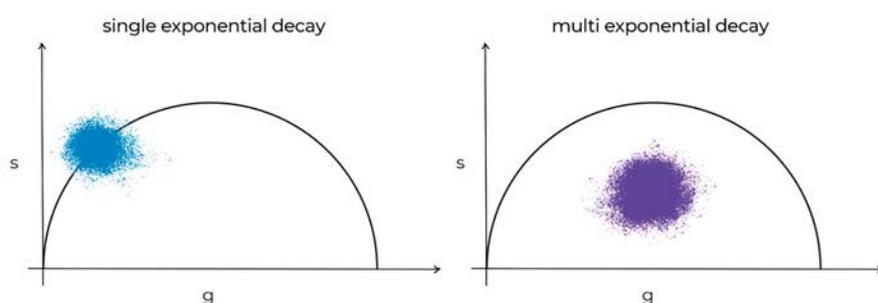


図9

FLIM LABS 社のソフトウェア **FLIM STUDIO** は、**カスタマイズされたサークレット**と組み合わせた FLIM フェーザー手法により、特定の領域における**蛍光寿命**分析を可能にします。

参考文献 ※3 Digman MA, Caiolfa VR, Zamai M, Gratton E, The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis. Biophys J. 2008 Jan 15;94(2):L14-6.
doi: [10.1529/biophysj.107.120154](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120154)
Epub 2007 Nov 2. PMID: 17981902; PMCID: PMC2157251

※4 Digmann MA, Gratton E, The phasor approach to fluorescence lifetime imaging: Exploiting phasor linear properties (2012)
<https://escholarship.org/uc/item/5g279175>

※5 Vallmitjana A, Torrado B, Gratton E, Phasor-based image segmentation: machine learning clustering techniques. Biomed Opt Express. 2021 May 17;12(6):3410-3422.
doi: [10.1364/BOE.422766](https://doi.org/10.1364/BOE.422766)
PMID: 34221668; PMCID: PMC8221971

4. 時間相関単一光子計数 - TCSPC

時間相関単一光子計数法 (TCSPC) は、時間分解分光法や蛍光寿命イメージング分析の分野で高精度かつ広く利用されている技術です*6。TCSPCは、サンプルから放出された個々の光子を検出し、光子の到着とレーザーパルス間の時間間隔を正確に測定することによって機能します*7 (図 10)。

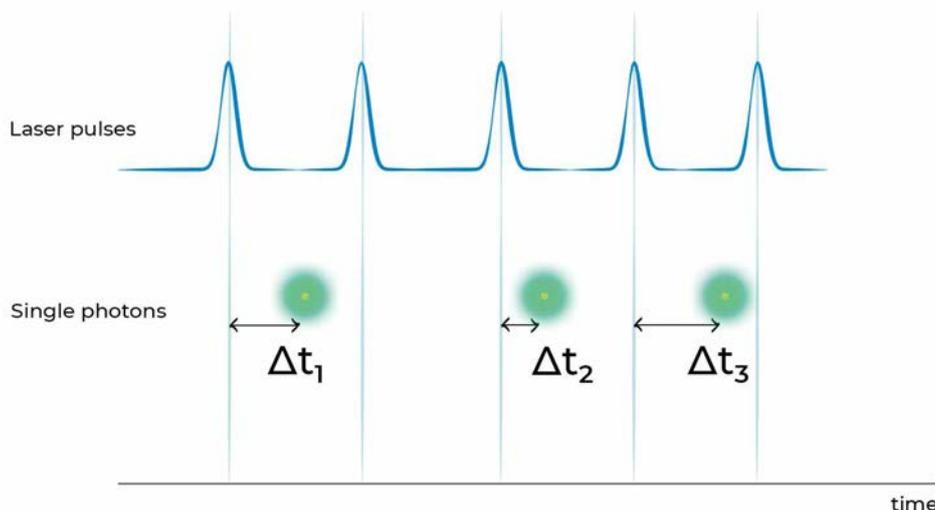


図10：TCSPCの原理

1. FLIM イメージング
2. 蛍光相関分光
3. FLIM フェーザー
4. 時間相関単一光子計数

この技術により、研究者は蛍光体の蛍光寿命を非常に正確に測定することができ、分子のダイナミクス・相互作用・環境変化についての考察を可能にします^{※8}。光子の到着時間と電子信号を相関させることで、TCSPCは蛍光減衰カーブをつくり、これをさらに分析することでサンプルの特性に関する定量的な情報を抽出できます^{※9} (図 11)。

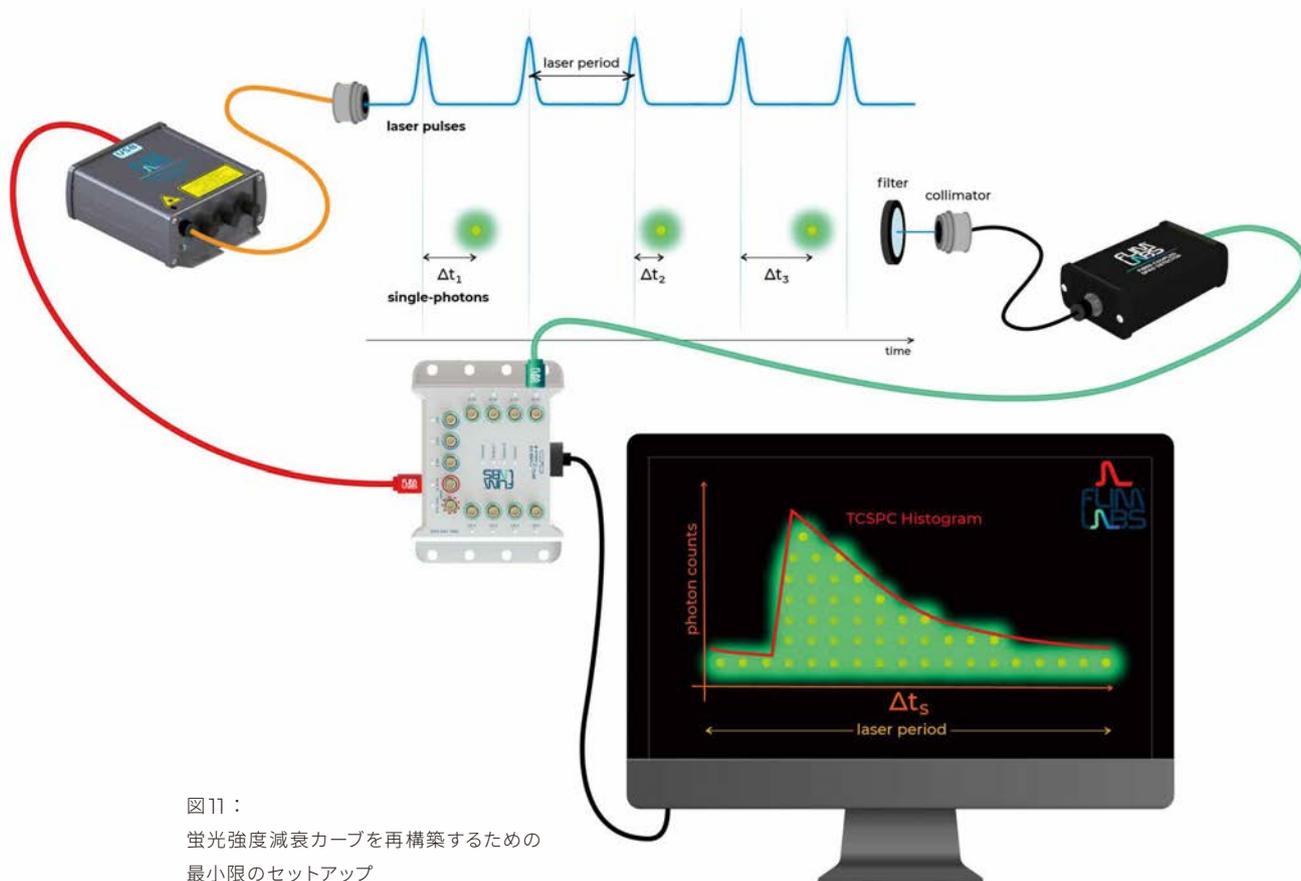


図11：
蛍光強度減衰カーブを再構築するための
最小限のセットアップ

TCSPCは、その感度、時間分解能、汎用性により、生物物理学、化学、材料科学など、さまざまな科学分野で欠かせないツールとなっています。

- 参考文献 ※6 Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer; 2006. DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4
 ※7 Becker W. Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques. Springer; 2005. DOI: 10.1007/b137512
 ※8 Gratton E, Jameson DM, Hall RD. Multifrequency Phase Fluorometry. Springer; 1987. DOI: 10.1007/978-1-4684-5207-1
 ※9 Valeur B, Berberan-Santos MN. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Wiley-VCH; 2012. DOI: 10.1002/9783527651137

この資料の出典元



URL : www.flimlabs.com (FLIM LABS社のホームページ)

お問合せ先



株式会社オプトサイエンス 営業部
 TEL : 03-3356-1064
 email : info@optoscience.com
 所在地 : 〒160-0014 東京都新宿区内藤町1番地 内藤町ビルディング(東京本社)

URL : <https://www.optoscience.com/our-vendors/flimlabs/> (オプトサイエンスWebトップ > FLIM LABS社のページ)