

高感度cDNAマイクロアレイ解析用キャピラリーガス比例計数管の実用化開発

●門叶 冬樹

山形大学理学部物理学科

＜研究の目的と進め方＞

「生物にはどのような遺伝子があるのか」については、ゲノムプロジェクトとして世界的に行われてきた。今後は、これら遺伝子が「いつ、どこで、どれだけ発現しているか」を調べることが疾病の診断や予防法の開発、環境問題対策の研究開発を飛躍的に進歩させる手段として期待されている。特に、この「ポストゲノム研究」で中心となるのは、遺伝病の克服、多因子病の治療や予防、一遺伝子多型（SNPs）を解析して個人差を知りその人の体質にあった薬を創り出す「ゲノム創薬」といった医療分野である。

DNAチップおよびcDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現研究は、これら「ポストゲノム研究」において最も注目されている手法の一つである。DNAチップやcDNAマイクロアレイを用いた解析方法の主流は、2種類の蛍光物質でラベルされたDNAをハイブリダイズし、そこからの蛍光強度を検出する方法である。この装置のスキナーに要求される性能として、サイズが数10 μm で間隔100 μm 程度に配列されているスポットからの蛍光量を、定量的に識別できることが強く求められている。本研究の目的は、山形大学が独自に開発を進めてきた新素材キャピラリープレート検出器をCCDカメラや光電子増倍管を用いたcDNAマイクロアレイスキナーと比較して100倍の感度と高速処理系および幅広いダイナミックレンジを持つcDNAマイクロアレイ解析用光検出器として開発することである。

図1に、CGPCを用いたcDNAマイクロアレイスキナー装置の概念図を示す。マイクロアレイ上にラベルされた蛍光色素(Cy3またはCy5)への励起レーザー照射によって生じる蛍光は光電面へ入射し光電子へと変換される。この光電子は、光電面とキャピラリープレート上面に形成された電場によってキャピラリー管内に入射する。キャピラリー管内には、104V/cmを超える電場が形成されており、管内に入射した1個の光電子は約2000倍の電子増殖を起こし、それに付随して約1000個の励起発光光子が光増幅をキャピラリー管内で起こす。この励起発光光子をキャピラリー下段に設けた光センサーで取得する。この2000発の電子と1000発の励起発光光子数は観測するのに十分な量であり、たった1個の光電子でさえも検出が期待できる。従って、極めて発現率の低い遺伝子に対するcDNAマイクロアレイ解析にも十分に対応することができる。また、キャピラリーからの出力電子と発光励起光子数は、励起レーザー照射によるプローブからの蛍光光子数に比例するため、極めて直線性のよい2000以上のダイナミックレンジを得ることができる。さらに、本開発で使用するキャピラリー管の間隔は120 μm であることから、通常用いられるcDNAマイクロアレイスポット(スポットサイズが数10 μm で間隔が100 μm 程度)に対応してプレートを配置することにより、スポット周りに偶発的に生じるバックグラウンドを抑えることが可能になり、極めて信号対雑音比の高いスキナーの実現が期待できる。そこで、本システムの実用化に向けて、1) キャピラリ

ープレートのマイクロパターンガス検出器としての特性、2) 可視光に感度を持つガスの選択、3) アルカリ光電面とガス中との安定化のための研究を進めた。

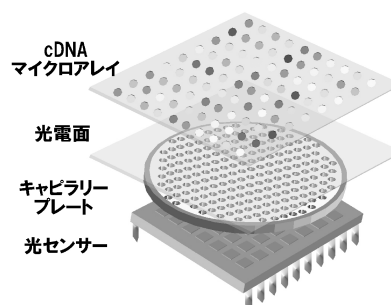


図1. CP ガス検出器を用いた cDNA マイクロアレイ スキナー装置の概念図

＜研究開始時の研究計画＞

本研究で開発を行うキャピラリープレート（CP）ガス検出器は、図1に示したように1)バイアルカリ光電面、2)キャピラリープレート（CP）ガス検出器、3)信号読み出し部の3つの主構成部を持つハイブリッドタイプのシステムである。バイアルカリ光電面とCPガス検出器はともにガス中に置かれ、電子信号を取得する場合は、CPの極近傍へ設置する。光信号を信号読み出しとして使う場合は、CPガス検出器と分離して設置できるためのノイズの支配的な環境下でのオペレーションに適している。

以上のシステムを開発するための研究を以下の計画にそって行った。

- 1) キャピラリープレートのマイクロパターンガス検出器としての特性
- 2) 使用ガスの選択化の研究
- 3) アルカリ光電面のガス中における化学的・物理的特性の研究
- 4) 信号読み出し部の基礎開発

＜研究期間の成果＞

- 1) キャピラリープレートのマイクロパターンガス検出器としての特性

専用ガスチェンバー内にCPガス検出器を設置し、アルゴン混合ガスを封入し、5.9keVのX線及び約5MeVの α 線を入射させて、ガスチェンバー内で生じる電子数比を約1000倍に変化させ、ガス検出器としての感度とダイナミックレンジ特性を調べた。その結果、約1000倍のエネルギー比を持つX線および α 線に対して本検出器は安定に動作した。また、各々のイベントに対するCCDの光量分布を比較したところ、その光量比も約1000倍の値を示し、高光量部での線形性が保たれており、ダイナミックレンジが1000でも安定に動作することを示した。更に、エネルギーの異なったX線をチェンバーに入射させて、それぞれ約110,230,320,850個の電子をガス中で生じさせて電子数と検出器からの出力関係を調べた。以上の結果から、光、電荷それぞれの出力信号がガス内に生じる電子数に線形で比例していることを示した。

続いて、高感度CPガス検出器の開発試験を行った。これまでの開発から1枚のプレートをを用いたCPガス検出器において、電子増幅度約10000まで検出器が安定に動作する事がわかっている。さらに、電子増殖率を上げて検出器を動作させることにより超微弱光に対して高い感度で動作することが期待できる。また、高い信号増幅率は、電荷信号による信号処理を可能とするため、より高い時間分解能を持つ検出器開発に有効となる。そこで、10000を超える高い電子増幅率下での安定動作を目指して、2枚のキャピラリープレートを用いた2段階電子増幅方式のCPガス検出器の開発試験を行った。図2に2段階電子増幅方式CPガス検出器において得られた印加電圧と電子増幅度の関係を示す。この結果から、2段階電子増幅方式によって20000以上の電子増幅を容易に得ることが可能となり、細胞サンプルから放出されたたった1個の光子を検出するために十分な像倍率であることが確認出来た。以上の結果から、発現率、発生率の極めて低い遺伝子解析への応用が期待できることを示した。以上の成果を、論文1, 2として報告した。

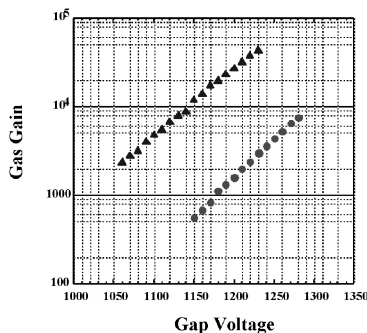


図2. 2段階増幅型CGPCのアノード印加電圧と電子増幅度の関係。▲が2段階増幅、●が1段階増幅。2段階増幅により、約20倍のガス増幅度を得ることが出来る。

2) 使用ガス選択の研究

これまでにCPガス検出器にガスはアルゴン+メタン+トリメチルアミン ($\text{Ar}+\text{CH}_4+\text{TMA}$) の混合ガスであった。この混合ガスは、トリメチルアミンは、アルゴンの励起発光波長128nmを290nmにシフトする役割を担っている。しかし、この290nmの光は紫外領域にあるため読み出しを行う時に特殊な光学系および装置が必要となり、本研究で行うイメージング開発には適さない。そこで、テトラフルオロメタン (CF_4 ガス) をCPガス検出器の混合ガスとして充填し、光励起発光型ガス検出器の開発を行った。

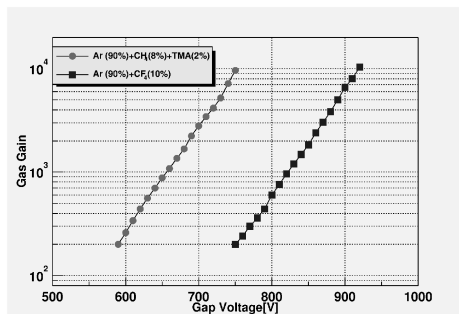


図3. $\text{Ar}+\text{CF}_4$ 混合ガス1気圧のキャピラリープレート間の印加電圧に対する電子増幅度の関係。TMA 混合ガス(ピンク)の電子増幅度も示す。

図3に $\text{Ar}+\text{CF}_4$ 混合ガス1気圧を封入したCPガス検出器のキャピラリープレート間の印加電圧に対する電子増

幅度の関係を示す。電子増幅度は印加電圧に対して指数関数的に上昇し、ガス比例計数管としての動作が確認できた。 $\text{Ar}(90\%)+\text{CH}_4(8\%)+\text{TMA}(2\%)$ 混合ガス1気圧を充填したときのガス増幅度と比べて同じガス増幅度を得るのに約170V高い印加電圧を必要とした。これは、トリメチルアミンガスがArガスに対してペニングガスの役割を果たしているためである。

続いて、 $\text{Ar}+\text{CF}_4$ 混合ガスからの発光特性を、マイクロフォーカスX線源からX線を本検出器に入射させ、CPガス検出器からの発光をツェルニターナ型分光器で解析することにより調べた。

図4に、アルゴン (Ar) とテトラフルオロメタン (CF_4 ガス) 1気圧をCPガス検出器に封入したときの発光特性を示す。混合ガスからの励起発光が、可視光から赤外光領域の波長領域にかけて分布し、ピーク波長が約620nmにあることがわかった。本結果は、2000年にポルトガルのフラガ博士らが球型の比例計数管で測定した結果と良く一致する。この混合ガス選択のための特性試験により、CPガス検出器の光増殖機能によって得られる励起発光波長を従来の290nmから620nmの可視光—赤外波長側へシフトできた。この波長領域は、CCDの検出感度に最も適した領域であることから、汎用型のCCDをCPガス検出器からの信号読み出し装置として使うことができ、安価なシステム構築が期待できる。

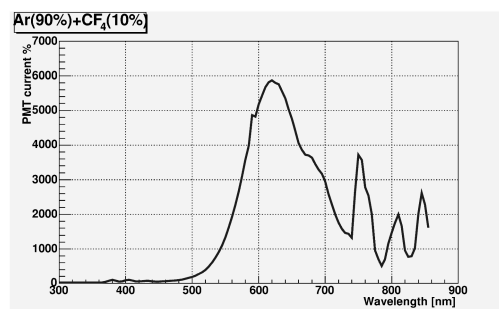


図4. $\text{Ar}+\text{CF}_4$ 混合ガス1気圧をCPガス検出器に封入したときの発光特性。X線発生装置からのX線を照射し、ツェルニターナ型分光器で測定した。

CPガス検出器のイメージング性能を評価するため、アルゴン (Ar) とテトラフルオロメタン (CF_4 ガス) の混合ガスを用いた場合の撮像性能試験を、マイクロフォーカスX線源からのX線、高エネルギー加速器研究機構の放射光、大型放射光施設からの放射光施設を用いて行った。図5に撮像試験のためのセットアップを示す。単一イベントの評価試験には、イメージインテンシファイドを使用し、位置分解能の性能評価試験には冷却型低ノイズCCDカメラを使用した。

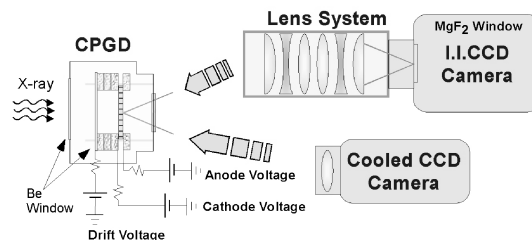


図5. $\text{Ar}+\text{CF}_4$ 混合ガスを用いた場合のCPガス検出器撮像性能試験のセットアップ。CPガス検出器、光学系、CCD (IICCD) カメラより構成されている。

図6に、 $\text{Ar}(90\%)+\text{CF}_4(10\%)$ 1気圧を充填したCPガス検出器にマイクロフォーカスX線ビームを入射させた

時の撮像試験結果を示す。図6左上は、X線透過イメージで右上図はアリの透過イメージ（右上）、左下図はテストチャートイメージで、15keVのX線1発に生じた光電子のイメージを右下に示した。Ar+CF₄混合ガスを充填したCPガス検出器において、優れた撮像能力と最高で50 μ mの位置分解能を達成することができた。X線撮像における本結果は、cDNAマイクロアレイのスポット周りに偶発的に生じるバックグラウンドを抑えるための目標値50mmと達する一性能であり、スキャナーとしての性能を十分持つことがわかった。

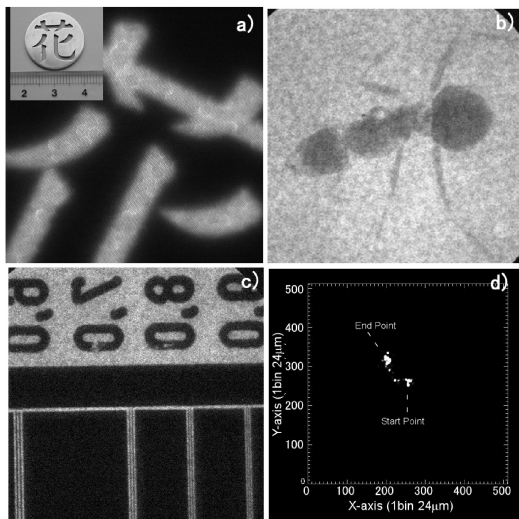


図6. Ar (90%) + CF₄ (10%) 1気圧を充填したCPガス検出器にマイクロフォーガスX線ビームを入射させたときのX線透過イメージ（左上）、アリの透過イメージ（右上）、テストチャートイメージ（左下）、15keVのX線1発によって生じた光電子のイメージ。

以上の結果は、2004年10月にIEEEの国際会議、2005年3月物理学会、応用物理学会、2005年6月のフランス・ボーンでの光検出器会議、2005年10月IEEE国際会議で発表し、3編の査読付き論文として投稿した（審査中）。

3) アルカリ光電面のガス中の研究

CPガス検出器に光電面を装着しガスを封入して、可視光領域に感度を持つ新しい光検出器を開発するために、ガス中での光電面作成の技術提携共を浜松ホトニクスと2003年度から行い、共同開発を開始した。

4) 信号読み出し部の基礎開発

これまでのCPガス検出器を用いた光イメージング方法は、CPからの電子・光増殖に伴う発光をレンズ光学系とイメージインテンシファイドCCDカメラを用いたシステムによって観測するものであった。本システムを用いた開発を続ける中で、現在のレンズ光学系における光損失が本システムの高感度性能を劣化させる一つの要因となることがわかった。この問題は、1つのキャピラリー管で発生した光子が光学系の開口率によって透過率0.5%以下に制限されるため、増殖された光の大部分を読み出し系に導く前に損失することに起因している。そこで、光学系で光量を減らすことなくCP内での発光を高感度に撮像できるデバイスの開発を本研究でおこなった。まず、CPガス検出器からの励起発光をファイバーオプティクスプレート（FOP）を介して光検出器に導く方法を考案した。コンピュータシミュレーションを用いて、光学系の透過率を調べたところ、FOPの光収集効率は、約20%程度と見積もられ、従来の光学系と比較して約40倍の

光増量が期待できることを示した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

キャピラリープレートガス検出器は、フランスのシャルバック博士が1992年にノーベル物理学賞を受賞した研究（「素粒子実験用の多線式比例計数箱の開発」）の発展型として世界の各研究機関で開発が続けられているマイクロパターンガス検出器の一つに位置づけられている。本CPガス検出器は、従来のガス位置検出器と比べて、位置分解能の向上と高計数率下での動作が期待出来るため、世界的に注目を集めている二次元ピクセル型のガス検出器である。

本研究で開発を進めているガスを用いた可視光に感度のある光検出器は、高精度な位置分解能を持つ高感度な光増幅デバイスとして応用が可能である。また、検出器内部にガスを封入しているため、高圧化・高磁場環境での光検出器として、その安定動作が期待されている。このガス光電子増倍管の開発は、今まさに世界の主な物理研究機関で進められており、新しく、ホットな技術開発の一つである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

Ar (90%) + CF₄ (10%) 1気圧の混合ガスをを用いた本検出器の開発の際、光増殖のための印加電圧が従来使用しているアルゴン+メタン+トリメチルアミン混合ガスにくらべて200V以上高い印加電圧を必要とした。そのため、検出器で使用する絶縁体の耐圧を超える結果となり、検出器内部の構造の改良および絶縁体の材料を変えて問題を克服した。

研究期間中行った光電面とガス検出器のかみ合わせ試験の最初の段階において、ガラス部とガス導入部の間で真空状態が悪くなり、光電面のアルカリ金属が酸化してしまった。この原因調査に多くの時間を費やした。そして、真空漏れ対策および高真空システムと高純度ガス封入システムの導入を行い、真空問題を克服した。

以上で述べた光電面開発の基礎開発に時間を費やしたため、Cy3,Cy5からの蛍光を電子に効率よく変換するための光電面開発を行うことが本研究期間内ではできなかった。

〈今後の課題〉

我々が本公募研究で開発を行ったCPガス検出器の成果を基に、「ガスを封入した新しいタイプの光検出器（ガス光増倍管）」の研究を行い、高感度、高位置分解能、高時間分解能を有するコンパクトで安価な新しい光センサーの開発を進める。

本検出器は、電子・光増殖をガス中で動作させるため、高磁場や外部電場の影響を受け難く、外部からの衝撃にも強い、また大面積化(最大、10cmx10cm)も比較的容易であることから、従来の光電子増倍管やCCDカメラでは使用できなかった環境下での幅広い応用も期待できる。今後は、本光センサーの科学、産業、家庭など各分野への応用・普及につなげたいと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 0305121543
H. Sakurai, S. Gunji, F. Tokanai, T. Maeda, N. Ujiie, N. Saito "Photoelectron Track Image of Capillary Gas Proportional Counter", Nucl. Instr. and Meth. A, 505, pp219-222, 2003.
- 0404081624
H. Sakurai, S. Gunji, F. Tokanai, T. Maeda, N. Ujiie, N. Saitoh, "Characteristics of an X-ray Imaging Detector with Double Capillary Plates", Nucl. Instr. and Meth. A, 513, pp282-286, 2003.