

SCIENCE IMAGING SYSTEMS

# Application Note No. 8

## 基礎編：化学発光検出におけるLASシリーズの特徴

LAS-1000 / LAS-1000plus / LAS-1000C

### はじめに

ルミノ・イメージアナライザーLASシリーズは、富士写真フイルム株式会社から発売された化学発光検出システムです。このLASシリーズには、新開発CCDと大口径カメラレンズを組み合わせて高感度を実現するなどの様々な新規技術が盛り込まれています。この新開発CCDは、130万画素の高精細な画像を得ることができます。さらに、14bitの階調を持った画像を得ることができ、化学発光の定量に威力を発揮します。定量解析を簡単に行うために、画像の周辺と中心の光量ムラを自動的に補正する工夫もされています。

今回は、LASシリーズのハードウェアを中心に、その構造、機能、特長、定量の補正方法を解説します。さらにいっそうよりよい画像を得て頂くために、ウォーミングアップから終了までの流れに沿ったノウハウを紹介します。

### Contents

1. 基本特性
2. カメラシステムによる画像定量の問題点と解決方法
3. よりよい画像を得るためのポイント
4. 参考文献

### Summary

- ・ LASシリーズは、高感度CCDと明るい大きなレンズの組み合わせが特長です。
- ・ LASシリーズは、低ノイズなので長時間露出に最適です。
- ・ LASシリーズは、定量で重要な光学的なムラの補正が簡単操作で行えます。

# 1 基本特性

## (1) 高感度

LASシリーズは、高精細高感度CCDと大口径カメラレンズの組み合わせによる、高感度カメラシステムです。微弱な化学発光の画像が簡単に得られます。

### ■ CCD

LASシステムの中核をなす新開発CCDセンサーは、オーバー1インチサイズの130万画素で4桁に及ぶワイドダイナミックレンジとリニアリティを兼ね備えています。CCDの受光部は、マイクロレンズと呼ばれるミクロンサイズの集光レンズがそれぞれの画素毎に設けられ、微弱な発光対象の高感度イメージングに役立っています。またインターライン型CCDを採用しているため、スマアの少ない高品位画像とムービーカメラのようなリアルタイムライクな焦点合わせを両立しています。

(文献 1), 2) 参照)

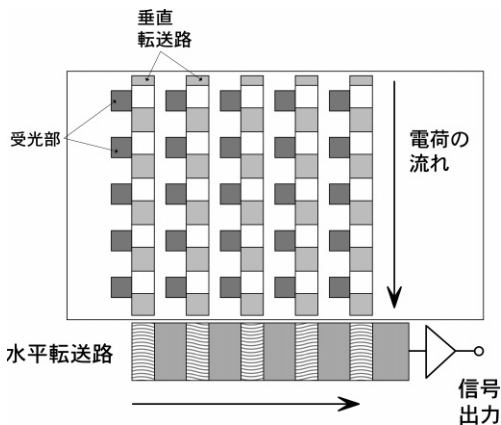


Fig.1-1

### ■ カメラレンズ

この高感度CCDカメラの性能をさらに高めるため、大口径の高感度レンズURF20Lを用意しました。このレンズはFナンバーが0.85におよぶ大変明るいレンズです。このレンズは通常のポートレート用カメラレンズと異なり、数10センチくらいの近距離撮影で性能を発揮できるように専用設計されています。



Fig.1-2

オーバー1インチ

CCDのサイズは受光面の対角線の長さ(対角長)で表示します。16mm映写機のカメラレンズを1インチ用としたため、対角長が、16mmなら1インチ、11mmなら2/3インチ、8mmなら1/2インチというように呼んでいます。(EIAJ規格)

スマア

撮像された画面上で、ある明るい画素が一定方向に尾を引いている状態を指します。CCD上に極端な明暗像があると、その明るい部分の変換された電荷が光のあたっていないはずの隣りの画素にまであふれる場合があります。

Fig.1-1 インターライン型CCD  
光を電子に変換する受光部と、電荷を送る転送部とが独立して機能するタイプのCCDです。受光部と転送部は隣り合っていて、一つの受光部で蓄えられた電荷はすぐ隣の転送部に送られ、順々に次の転送部から次の転送部へと、転送路を伝って電荷が渡されていきます。受光部と転送部が独立しているため、非常に短い時間の露出が可能になります。

Fナンバー

レンズが作る像の明るさを表す指標で、その値が小さいほど像は明るくなることを示します。Fナンバーはそのレンズの焦点距離と有効径(入射瞳径)の比で表されます。

Fig.1-2 URF20L外観図

## (2) 低ノイズ、長時間露出

LASシリーズは、冷却システム、Slow-Scan方式およびメカニカルシャッターによって低ノイズ、長時間露出を可能にしています。

### ■ 冷却システム

高性能冷却システムによって長時間露出でもノイズの少ない画像が得られます。LASシリーズは微弱光を蓄積することによってイメージング感度を高めるため、CCDの暗電流を極限まで下げられるように-30℃まで冷却しています。新開発のペルチエ素子はLASシリーズに最適化設計され、常温環境下での安定した冷却性能を確保しています。

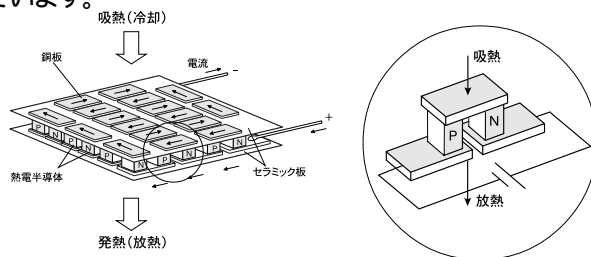


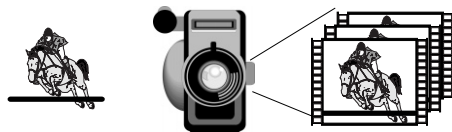
Fig.1-3

LASシリーズは極めてノイズの低い、高品質な画像を得ることができるので、対象画像からダークフレームを差し引くだけの単純な演算で高品質画像が得られます。

### ■ Slow-Scan方式

Slow-Scan方式によって高品質画像が得られます。ムービーカメラと天文観測で使われるような科学計測用CCDカメラの大きな違いは、その読み出し速度にあります。前者はリアルタイムな自然な動きが要求されるため、読み出しを早くする工夫がなされています(Fast-Scan)。一方、後者の計測用は感度を重視し、微弱な光を静止した状態で蓄光し、ノイズを増やさないようにゆっくり読み出します(Slow-Scan)。このため前者は暗い対象には向かないこと、後者は焦点合わせ等の操作性が良くないことが欠点です。LASシリーズは焦点合わせの場合はムービーカメラのようにCCDを早く動作させて操作性を高め、微弱な光の画像化では計測カメラとして蓄積露出したあとの画像品質を損なわないようにゆっくり読み出しています。

ムービーカメラ



科学計測用

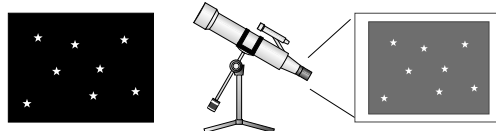


Fig.1-4

### ■ フォーカルプレーン型メカニカルシャッター

レンズ交換可能な一眼レフカメラに多く採用されている、フィルムに近接したシャッター幕が一方向のみにスライド走行して露出時間を決める方式です。この方式の利点は、画面上のどの部分にも均等な露出が得られることです。画像定量を行うレンズ交換型カメラには、フォーカルプレーン型が最適です。LASシリーズは、このフォーカルプレーン型を採用しました。小型パルスモータを使用して、1/100秒の短時間露出から3600秒の長時間露出にいたるまで正確な露出が出来ます。

暗電流

CCDに光が当たらなくても熱によっても電荷として蓄積されるため、長時間にわたる露出を行うとそれがノイズとなって無視できなくなってきます。この暗電流は温度と露出時間の関数なので、CCDを冷やすことによってこの暗電流を低減することができます。

Fig.1-3 ペルチエ素子

熱電素子、サーモジュールなどとも呼ばれています。PN接合の半導体に電流を流すと、その半導体の両端に温度差が現われることを応用したデバイスです。その半導体を2次元アレイ状に並べて直列接続したものが一般的に利用されています。

ダークフレーム

レンズに蓋をかぶせるなどして、光を遮って撮影動作をさせた暗電流だけの画像フレームのことをダークフレームと呼びます。LAS-1000ではダークフレーム撮影を選べば自動的に動作を始めます。画像補正にダークフレームを用いる場合は、対象画像を撮影した時の温度と露出時間の揃ったものが必要です。

Fig.1-4 Fast-Scan方式とSlow-Scan方式

ムービーカメラの場合、1フレームあたりの露出は、10000分の1秒～30分の1秒で、1秒あたりにすると約25～30フレーム撮影します。(Fast-Scan方式)  
科学計測用カメラの場合、1フレームあたりの露出は、数時間まで可変で、1秒あたりにすると約1フレーム撮影の場合もあります。(Slow-Scan方式)

## 2 カメラシステムによる画像定量の問題点と解決方法

### (1) 問題点

一般的にカメラシステムで光量を測定する場合、対象物のどの部分からも同じ光量が出ていたとしてもカメラレンズを通すと結像の中心部と周辺部とでは集光される光量に差が生じます。これを周辺減光と呼びます。またカメラレンズなどの光学系にチリ、ホコリが付着していれば画像品質に影響します。CCD自体にも若干ですが感度のローカリティが存在します。このような理由により、撮影されたままの画像に対して定量を行うには、補正を必要とします。

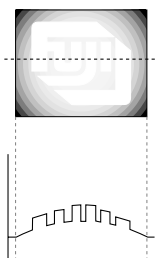
#### 周辺減光

開放絞りのレンズで得られた画像は中心部が明るく、周囲が暗くなります。同じ焦点距離のレンズの場合、Fナンバーの小さな明るいレンズほどこの程度は大きくなる傾向があります。周辺減光の程度を抑えるには像の明るさとひきかえにレンズの絞りを2～3段以上絞ると効果があります。

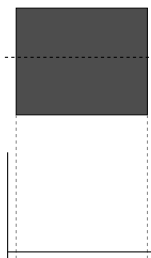
### (2) 解決方法

CCDカメラでは対象画像に対して次のプロセスをたどっていけば、全画面にわたる画像定量が行えるようになります。

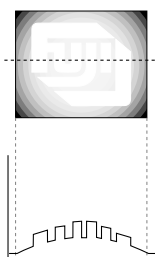
1) 対象を撮影する。



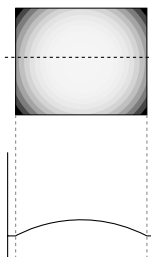
2) 対象画像と同じパラメータを持つダークフレームを取り込む。



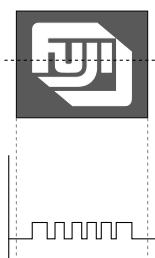
3) 対象画像からそのダークフレームを差し引く。



4) 均一な面光源を撮影し、その画像から同じ露出条件のダークフレームを差し引く。



5) ダークフレームを差し引いた対象画像と、ダークフレームを差し引いた均一面光源の画像の比をとる。



このように、補正された画像はどの画素についても同じ光量分布であれば同じ数値で表現されています。一般的な補正式は、下記の通りです。

$$F_c = (F_r - F_d) / (F_f - F_d)$$

F<sub>c</sub> = 補正された画像  
F<sub>r</sub> = オリジナル画像  
F<sub>f</sub> = 均一面光源の画像  
F<sub>d</sub> = ダークフレーム

こうした補正の結果に精度を求めるなら、撮影システムに広いダイナミックレンジとリニアリティが確保されていなければなりません。LASシリーズは4桁に及ぶ広いダイナミックレンジとリニアリティが備わっています。

化学発光法によるアプリケーションの場合(文献4)参照) LASシリーズでは補正のための専用光源を持たなくても、撮影距離やレンズの絞り値を選べば自動的に補正ができるように、補正データをプリセットしています(当社指定レンズのみ)。もちろん、上に示した補正プロセスは自動的に行われます。

### 3 よりよい画像を得るためのポイント

画像解析の基となるイメージング作業はそのプロセスの中のポイントを押えて行えばより確実に正確な画像データが得られます。

#### ■ウォーミングアップ

LASシステムのウォーミングアップは、電源投入から10分以内で完了します。その間にコンピュータとソフトウェアの立ち上げを済ませ、カメラ周辺の目視確認をしましょう。特にレンズや試料トレーの汚れとレンズフィルタの装着の有無をチェックします。

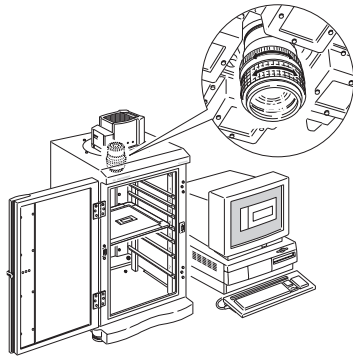


Fig.3-1

#### ■画角の設定

LASシステムは7段階の画角設定が出来るようになっていています。サンプルをトレーの中央部に配置し、読み取りソフトのモードを"Focusing"に変更してください。サンプルが画角の8割に収まるように、フォーカシングモニタを見ながらトレーを差し入れる位置を決めます。

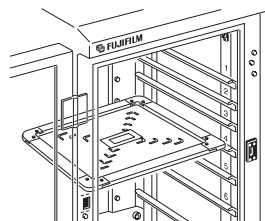


Fig.3-2

#### ■焦点合わせ

カメライメージングの第一の決め手は焦点合わせです。LAS-1000では、焦点合わせをする時に被写界深度を考慮して必ず絞りを開放 (URF20Lでは、 $F=0.85$ ) にして調整します。化学発光の場合はメンブレンサンプルが主ですから、名刺のような文字の書かれている紙をトレーにおいて、焦点合わせの目安にするとよいでしょう。

注: LAS-1000 / LAS-1000Cのみ必要な操作です。

レンズフィルタの装着  
化学発光の撮影を目的とする場合、レンズフィルタは全て取り外してください。例えば蛍光用フィルタが装着されていると化学発光のスペクトルがカットされるため、化学発光の検出ができません。逆に蛍光サンプルの撮影時にフィルタ装着を忘れると蛍光イメージングを台無しにしてしまいます。

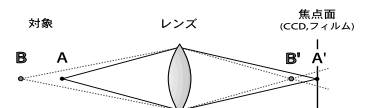
注: LAS-1000 / LAS-1000Cのみ必要な操作です。

#### 被写界深度

レンズの絞り値が大きいほど焦点の合う範囲が広がります。しかし、光の量はその分犠牲になって、像は暗くなってしまいます。一方、絞りを開放にすると焦点の合う範囲が非常に狭くなるので正確なピントの位置がわかりやすくなります。

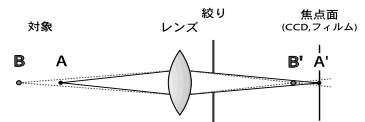
下図は点Aが点A'に正しく結像している状態 (ピントが合っている) を表わしています。

#### 絞り開放の場合



Bの像は焦点面より前で結像するので焦点面ではぼけて見え、Aのみにピントの合った画像が得られます。

#### 絞りを入れた場合



Bの像はやはりAよりレンズ寄りのところで結像しますが、焦点面でのぼけ具合は、絞り開放の場合よりたいへん小さくなります。

したがって、AとBにピントの合った画像になります。

Aより先レンズに近い側の点についても同様です。この場合の結像点は焦点面より先上図の右方になります。

## ■ 露出時間の設定

まずはフィルム露出に要した時間を基本に設定し、撮影します。LASシリーズの高感度レンズタイプでフィルム露出より短い時間でのイメージングも可能ですが、CCDカメラによる露出においても、ある程度の光量が確保されなければ粒状（画像のなめらかさ）が低下してざらつき感のある画像になってしまいます。高感度イメージングを大切にすることは絞りを開放側にしてより多くの光が結像できるようにします。動的観察を必要としないアプリケーションでは、十分に露出時間をかけることが、正確なイメージングを得るために重要なことです。

LAS-1000plusでは露光時間の自動設定が可能です。

## ■ イメージング作業の終了時

正常なプロセスを踏んでシステムを終了させることは、次回のイメージング品質を保つ上で大切なことです。取り扱い説明書の指示に従ってソフトウェアを終了後、カメラコントローラーのスイッチを切ります。正しい手順に従ってシステムを終了させれば、LASシリーズの品質を保つことができます。



Fig.3-3

## 4 参考文献

---

- 1) 二宮輝雄, 長谷川伸, 和久井孝太郎, 撮像工学; コロナ社 (1975)
- 2) 塚本哲男, 固体撮像デバイスの基礎; オーム社 (1987)
- 3) Blouke, M. M., Charge-Coupled Devices and Solid State Optical Sensors, *SPIE*; Vol.1242, (1990)
- 4) Karger, A. E., et al., Digital chemiluminescence imaging of DNA sequencing blots using a charge-coupled device camera, *Nucleic Acids Research*; Vol.20, No.24, 6657-6665 (1992)

著者・編集

三浦 研二

伊神 盛志

長島 眞喜子

今井 千織

(富士写真フィルム)

1997年 9月発行

---

 **FUJIFILM**

富士写真フィルム株式会社

●本書についてのお問い合わせは

東京本社 ■ 機器事業部 サイエンス・システム

〒106-8620 東京都港区西麻布2-26-30 TEL (03)3406-2201

FAX (03)3406-2158

E-mail : [sginfo@tokyo.fujifilm.co.jp](mailto:sginfo@tokyo.fujifilm.co.jp)