

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12909

研究課題名(和文) 蛍光画像サイトメトリーによる高速腸内細菌叢プロファイリングとディスバイオーシス予測

研究課題名(英文) Rapid microbiota profiling and dysbiosis prediction by fluorescence imaging cytometry

研究代表者

太田 禎生(Ota, Sadao)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・客員研究員

研究者番号：70731214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、最終的には細菌叢解析から個体や環境動態評価・予測を目指すべく、複雑で大量の1細菌集団を光学的に高速プロファイリングする技術群を提案・開発・実証しました。具体的には、マイクロ流体による細菌の底壁面三次元整列技術を開発し、新規光学技術と組み合わせることにより、高速蛍光ハイコンテンツ・フローサイトメトリー(蛍光イメージング・自家蛍光スペクトル)を開発し、細菌分類実証を行いました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細菌叢解析から個体や環境動態評価・予測を目指すべく、複雑で大量の1細菌集団を光学的に高速プロファイリングする技術群を提案・開発・実証しました。具体的には、マイクロ流体による細菌の底壁面三次元整列技術を開発し、新規光学技術と組み合わせることにより、高速蛍光ハイコンテンツ・フローサイトメトリー(蛍光イメージング・自家蛍光スペクトル)を開発し、細菌分類実証を行いました。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a series of high-speed optical technologies that profile a complex and large number of bacterial populations with an ultimate goal of evaluating and predicting individual and environmental microbiota dynamics from the bacterial single cell analysis. Specifically, by combining a newly designed microfluidic technology that align the stream of bacteria at the bottom wall of channel in the three-dimensional space, we developed a new high-speed fluorescent high-content flow cytometry (fluorescence imaging / autofluorescence spectrum) and demonstrated the classification of bacterial species and strains.

研究分野：光工学、マイクロ流体工学、バイオ工学

キーワード：フローサイトメトリー 1細胞解析 腸内細菌 環境細菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内には100兆個を超える腸内細菌が存在し、池や土壌には無数の環境細菌に満ち溢れています。腸内細菌はヒトの健康維持と疾患形成の鍵因子と見なされていますが、作用原理は明らかになっていません。また環境細菌も、バイオフィーム形成などの動態を含め、未知な点は多く、重要な研究対象です。困難は、このような細菌の多くが難培養であり、その遺伝子組成や生体機能を解析できないことにありました。近年になり、培養/難培養に拘らず細菌叢の遺伝子配列を総体として読み取るメタゲノム解析が開発され、基礎科学だけでなく医療・健康産業応用にも巨大な可能性が大きく注目されています。しかし遺伝情報と個体レベルでの機能・代謝発現情報の間には大きなギャップが存在し、臨床応用においても塩基配列解読コストは、金銭面・時間面共に大きいという課題があります。一方の一細菌解析技術ではFACS(Fluorescence Activated Cell Sorter)等の分子標識法が主流ですが、大量で複雑な細菌叢を解析・分類するには、数少ない分子標識の情報量だけでは不十分です。また、分子標識できないような細菌叢の変化を捉えるには、方法がありません。そのため、一細菌レベルから遺伝・個体レベルに渡る腸内細菌叢の構成・働きを統合的に理解に資するような、安価で高速かつ汎用的な自動多次元データ計測・解析方法が求められてきました。

2. 研究の目的

本研究では、複雑で大量な細菌叢に対し、安価で高速かつ汎用的な自動多次元データ計測を行って個体や環境データとの迅速統合解析や動態予測を目指すべく、高速蛍光ハイコンテツ・フローサイトメトリーを新開発し、複雑で大量の細菌画像プロファイリングによる1細菌動態解析することを目的としました。

3. 研究の方法

(1) 蛍光イメージングサイトメトリー
まず、流路中を流れる細菌を可視化するための新規高速光イメージング機構と、細菌を効率的よく整列するためのマイクロ流体工学技術を組み合わせ、高解像度蛍光イメージングサイトメトリー技術の開発および実証と、細菌蛍光標識プロトコルの確立を進めました。

(2) 自家蛍光スペクトル認識型サイトメトリー

さらに、標識を要さない、新たな一細菌分類蛍光スペクトルサイトメトリー技術を考案し、開発を進めました。本方法は、各細菌が含有する多様な分子の差異から、それぞれユニークな細菌種によって特異的に有する自家蛍光スペクトルに注目し、これを

効果的に計測するための光学系並びにマイクロ流体系を構築しました。

4. 研究成果

まず流路中の三次元空間において、微小な細菌を整列させるためのマイクロ流体技術機構を開発しました。具体的には、細菌などサンプル流の流れる流路を、両側からより流路高さの大きな二つの流路二より、三次元的に挟み込むようなデザインを、PDMS(ポリジメチルキサン)デバイスに対してソフトリソグラフィ法を適用し、加工製作しました(図1左側)。本法においては三次元モールドが必要となりますが、これはSU-8ネガティブレジストを用いて、多層構造を作製しました。整列機構が無い場合、細菌は流路中をランダムに分散されて流れます(図1右側上図)。本機構を用いた結果、細菌は流路の底面付近において、三次元的にフォーカスされた形で整列される事が確認されました(図1右側下図)。

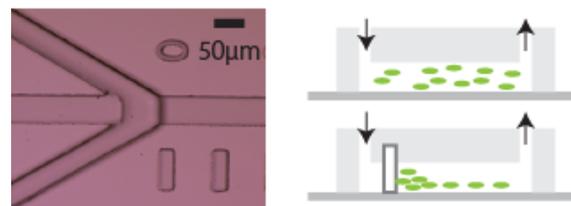


図1 細菌の流路内三次元フォーカスのための三次元マイクロ流体デバイス

三次元フォーカス自体、再現性の高い計測を実現するために重要です。さらに本手法には特に細菌光計測に対して、二つの大きなメリットがあります。一つ目は、細菌の位置が対物レンズに近づくため、比較的開口数の大きな倍率の高い対物レンズを用いる事ができると言う点です。これにより、あまり明るく無い細胞や細菌の信号をより効率的に(明るく)計測する事ができます。二つ目は、後述の(図3)ピンホールを光学系に用いて励起光焦点以外からの信号以外を蹴る事により、バックグラウンドのノイズを効果的に除去する事ができます。透明度が高いとされるPDMSでも自家蛍光バックグラウンドを発するため、このノイズ除去機構は、微弱な細胞蛍光標識をイメージングしたり、自家蛍光を高感度に検出したりする上で重要な機能開発となりました。

(1) 蛍光イメージングサイトメトリー
上記のマイクロ流体デバイスを用い、まず動的ゴーストイメージング機構を、微小な細菌イメージングに応用しました。本法では、まず流路中に、回折格子を用いて発生させた静的な構造照明パターンを投影します。そこ観察対象が流れて通過することにより、照明パターンの空間強弱パターンが、観察対象内の蛍光分子からの時間発光パターンに変換され(圧縮センシングを行なっ

ているのでデータ圧縮も行われている) (図 2A)、1 画素高感度素子によりその総量を高速検出します (図 2B)。そして、静的な構造照明の空間分布を知っておくと、元の対象物画像が読み出せるという仕組みです (図 2C)。本手法を用い、高解像度の対物レンズ (40 倍) を用いて、DAPI により核酸を染色された細菌 (*Escherichia coli*) をイメージングしました (図 2D)。

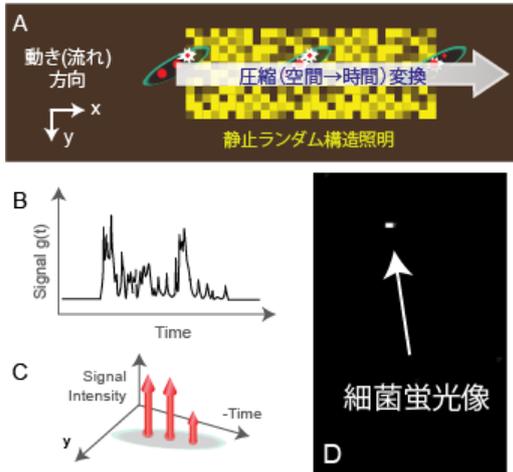


図 2 動的ゴーストイメージング手法を適用した高解像度細菌高速蛍光イメージング

マイクロ流体整列機構を用いる事により、動的ゴーストイメージングの比較的高倍率な細菌イメージングに初めて成功しました。しかし一方で、一般に細菌顕微イメージングで用いられるさらなる高倍率のレンズを用いて流体中を流れる粒子をイメージングする事は、対物レンズの作動距離などの問題から容易ではありませんでした。さらに、整列の度合いなどからボケも発生するため、蛍光イメージによる機械学習プロファイリングも、容易ではないと考察されました。さらには抗体染色をした際には蛍光信号の対ノイズ比が十分ではなく、この課題を解消するには高価な回折素子の作製が必要でした。

(2) 自家蛍光スペクトル認識型サイトメトリー

蛍光標識を用いたイメージングサイトメトリーは、抗体抗原反応などを用いた高い特異性と形態データの融合が大きな利点です。一方で、既知標識の組み合わせに分類や形態データ計測が、規定されているという側面もありました。上記研究の中で、太田らは、細菌が蛍光標識されておらずとも、強い自家蛍光を発する事に注目しました。自家蛍光のスペクトルは、細菌ごとの内容物により異なり、例え同じ細菌種であっても環境などによって変化します。細菌の種類や内在的状態を、非標識に高速かつ高精度に評価できる可能性があります、これを

計測できるフローサイトメトリー機構はありませんでした。

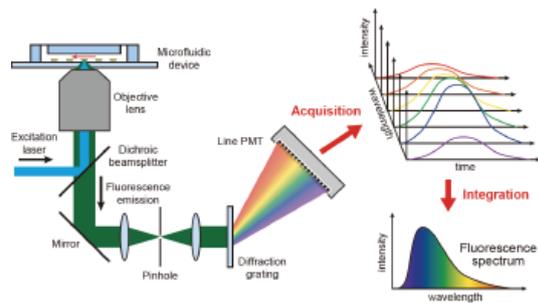


図 3 マイクロ流体自家蛍光スペクトル計測解析型細菌高速アナライザー

自家蛍光信号は微弱であるため、効果的に高い信号対ノイズ比を得る必要があります。しかしマイクロ流路を形成する材料の多くが自家蛍光を持ってしまったため、大きなノイズ源となってきました。ここにおいて、私達はマイクロ流体による粒子整列機構を用いて細菌をチャンネル底面に近づけ (PDMS で作られた天井から距離を離し)、光学的な共役面にピンホールを用いる事により、PDMS の強い自家蛍光ノイズを除去しました (図 3 左)。そしてピンホールを通り抜けた細菌由来の自家蛍光を、グレーティング素子を用いて分光し、これをマルチチャンネルのリニアアノード型光電子増倍管 (PMT: Photomultiplier Tube、浜松ホトニクス社製) を用いて、高速かつ高感度なスペクトル測定系を構築しました。入力信号に対してトリガーをかけて個々の細菌を認識し、細菌を単位に各チャンネルの信号を時間方向に積分し、波長ごとの蛍光総量を得ました (図 3 右下)。励起波長は 405nm の一色、信号処理は、ナショナルインスツルメント社製の DAQ ボードを介し、Lab View を用いて行われました。

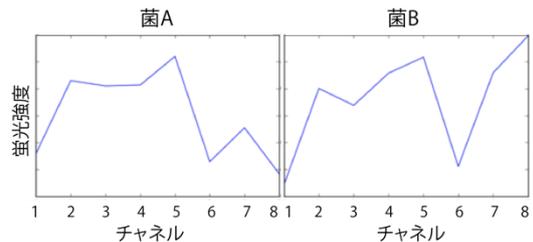


図 4 8ch のリニア・アノード PMT による自家蛍光スペクトル測定

本融合計測機構により、図 4 のように、マイクロ流路中を流れる細菌の自家蛍光スペクトルを計測することに成功し、自家蛍光スペクトル認識型フローサイトメトリーを実現しました。スループットは数千-数万細菌毎秒を計測することができます。異なる菌種を送液し、代表的なスペクトルを 8 チャンネル PMT で記録すると、菌種によって特徴的なスペクトルが、ラベルフリー (非蛍光標識) で高速計測・類別できる事を実証しました。

そしてさらに、16チャンネルPMTを採用し、自家蛍光スペクトルのより広い波長帯を、より細かく捉えることに成功しました。

図5に示すのは、ある菌種のワイルドタイプ(WT)、遺伝子改変を与えた同じ種の別の株二種類の、自家蛍光スペクトルを同時にプロットしたものです。図4に比べると似通っていますが、差異は見られる事が分かります。

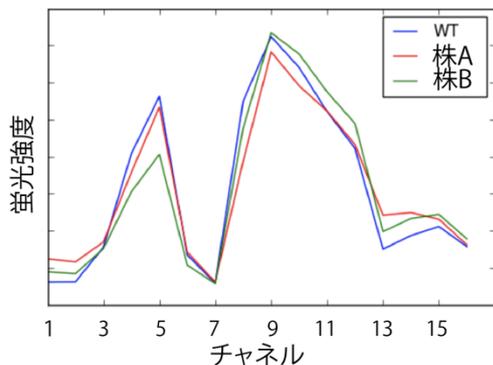


図5 励起光2波長における、16chのリニア・アノードPMTによる自家蛍光スペクトル測定

最後に、この小さな差異を判別するために、機械学習による分類を適用しました。具体的には、Support Vector Machine (SVM)法を用い、WTと株A、WTと株B、株Aと株Bの比較を行い、それぞれに対して、Accuracyで0.60, 0.69, 0.70という値を得ています。現在は信号対ノイズ比の改善すべき点が残っており、それ故の実験誤差が大きく判別結果に影響してしまっている状態であるため、今後のさらなる実験系の改善で、大きな判別精度の向上が期待されます。

本研究では、複雑で大量な細菌叢に対し、安価で高速かつ汎用的な高速蛍光ハイコンテンツ・フローサイトメトリーを目指し、高速・蛍光イメージングサイトメトリー並びに自家蛍光スペクトル認識型サイトメトリーを開発しました。特に後者においては、計測した蛍光スペクトルに対して機械学習分類を適用し、細菌種をラベルフリーで分類することに成功しており、細菌の種だけでなく、遺伝子発現や環境を反映した株レベルまで分類することができており、さらに生死の判定も行えています。腸内細菌や環境細菌のプロファイリングを開始しようとしており、1細胞計測技術による環境判定という新基軸を構築できる事を、今後も目指します。ハイスループットかつ高精度・網羅的な基盤技術として、産学に広範な影響を与える技術群になると期待されます。

5. 主な発表論文等
[雑誌論文] (計0件)
投稿準備中
[学会発表] (計0件)
発表準備中
[図書] (計0件)
[産業財産権]
○出願状況 (計0件)
出願準備中
○取得状況 (計0件)
[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
太田禎生 (OTA, Sadao)
東京大学・大学院工学系研究科・客員研究員

研究者番号 : 70731214