

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657112

研究課題名(和文) 20色同時イメージングを目指す新規蛍光顕微鏡法の開発

研究課題名(英文) A development of novel fluorescence microscopy toward 20 color simultaneous imaging.

研究代表者

尾崎 裕一(Ozaki, Yuichi)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：70345114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、従来のリニアアンミキシングの問題点を克服し、各蛍光色素のリファレンスペクトルを必要としない多色蛍光顕微鏡法の開発を行った。新規ブラインドアンミキシングアルゴリズムの開発により、分光を用いたスペクトルイメージングと色素の退色時系列を取得する撮影法からサンプルに含まれる全ての蛍光スペクトルを精度よく分離できることをコンピュータシミュレーションで示した。またレーザー स्कаниング顕微鏡をベースに高速でスペクトル画像を取得する顕微鏡システムの開発を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have developed a novel polychromatic fluorescence microscopy to overcome the difficulty of linear-unmixing technique that prerequisite reference spectra. I have developed a blind unmixing algorithm, and shown that the algorithm can decompose all fluorescence spectra accurately from a fading sequence of spectral images. I also developed a high speed spectral imaging microscope system on the basis of laser scanning microscope.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、生物物理学

キーワード：バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

蛍光顕微鏡法の多色化は共同的に働く細胞内コンポーネントを解析する上で極めて重要である。この目的のために様々な蛍光色素や蛍光タンパクが開発されつつあるが、これを観察するための蛍光顕微鏡法としては6色程度が上限であり、4色以上の同時イメージングを実用的に行う例は極めてまれである。従来、多色蛍光イメージングは、励起波長と蛍光フィルタを慎重に選び、蛍光波長のオーバーラップがないような蛍光色素の組み合わせを用いることで実現される。この手法では6色程度が限界であり、実用的には4色までが良く用いられる。ライブイメージングのように、蛍光波長のオーバーラップが避けられない場合には、分光を用いたスペクトルイメージングにより混合した蛍光を取得し、事前に用意した単染色のリファレンスサンプルの蛍光スペクトルを利用して数値的に分離するリニアアンミキシングが用いられるが、現状ではさほど普及しているとはいえない。この理由は主に以下の3点が挙げられる。

- 1、蛍光波長は温度や pH などの環境要因により微妙に変動するため、リファレンスサンプルと多重染色サンプルの蛍光スペクトルが同一である保証はなく、また変動を検出する手段もない。
- 2、自家蛍光は多数の自家蛍光成分の混合であるため、個々の自家蛍光成分のリファレンスサンプルを用意することができない。
- 3、6色以上の多色ともなると、リファレンスサンプルを用意する手間が無視できない。

2. 研究の目的

本研究計画は10色以上、最大で20色程度のマルチカラー蛍光イメージングを実現することを目指す。特にリニアアンミキシングにおける上記の問題点を踏まえ、可用性を考慮して以下の条件を課す。

- 1、既存の蛍光色素や蛍光タンパクをそのまま利用できること。
- 2、既存の共焦点顕微鏡に分光器を付加しただけの比較的単純な光学系を用いること。
- 3、定量解析に足る十分な定量性と再現性を備えること。
- 4、サンプル調整などの実験操作が通常の蛍光顕微鏡法に較べて過度に煩雑にならないこと。

一方で高い時間分解能を得るためには特殊な検出系が必要となるため、本研究計画には含めない。上記の条件を満たすため、リファレンスサンプルを必要としない蛍光スペクトルの分離アルゴリズム(ブラインドアンミキシング)を開発する。また、当初は計測対象として固定標本を用い、蛍光色素でラベルした抗体を用いた免疫蛍光染色のマルチカラーイメージングを目指す。

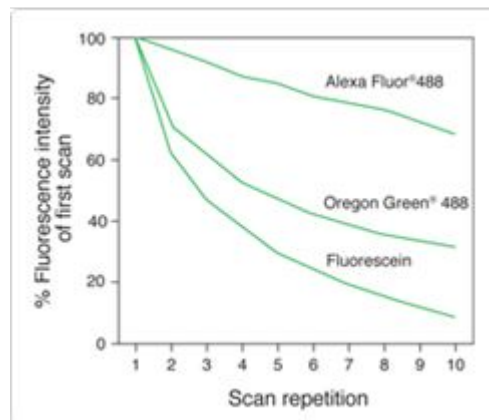
3. 研究の方法

(1) スペクトルイメージングと色素の退色時系列に基づくブラインドアンミキシングアルゴリズムの開発

ケモメトリクス分野では多数の励起波長に対する混合試料の蛍光スペクトルの情報から各試料のスペクトルと混合比を求めるブラインドアンミキシングが実用化されている。実際、生細胞に対して励起に340-490nmの9点、蛍光47チャンネルを用い、15から20種程度の蛍光色素を同定可能であるとの報告がある。しかし、これらは点の情報であり、空間解像度をもたない。そこでレーザー走査顕微鏡との組み合わせが必要となるが、必要な励起波長の数だけレーザー光源を用意するのは現実的ではない。また可変波長レーザーは高価なうえ可変波長域が狭く、可視域をカバーするには複数のレーザーが必要である。加えてビームスプリッター/バリアフィルタにも可変性が必要となり、汎用品での対応は困難である。

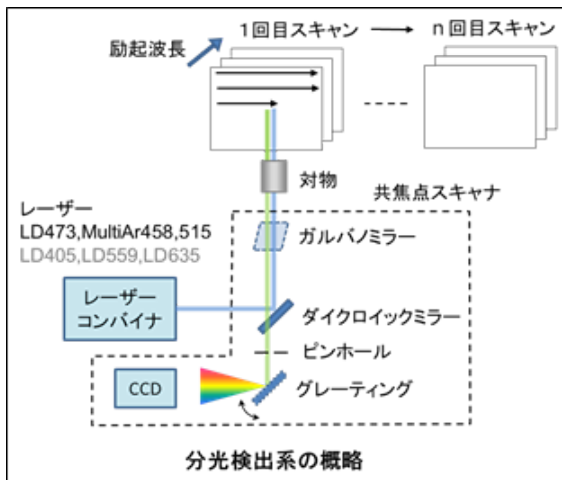
そこで本研究計画では、励起波長は4点程度とし、代わりに蛍光色素の退色速度の違いを利用する。蛍光色素の蛍光強度は励起時間とともに減衰するが、一般にその減衰曲線は励起時間に対する対数曲線となり、その退色時定数は色素によって固有の値をとることが知られている(図)。このことは、混合された蛍光色素の退色時系列に含まれる各蛍光色素由来の成分が時間に対して非線形に変化することを意味し、異なる退色時定数を持つ蛍光色素の退色曲線は線形独立となる。この特性と各蛍光色素の蛍光スペクトルの線形独立性を利用すれば、前述のケモメトリクスで用いられるブラインドアンミキシングアルゴリズムが適当できると考えられる。

そこで、少数の励起波長に対して繰り返しスペクトルイメージングを行い、蛍光色素が退色していく時系列を取得する操作をコンピュータシミュレーション上で再現し、この情報に対してブラインドアンミキシングを適用して各色素のスペクトルと退色速度を同時に推定し、さらにこのスペクトルを用いてリニアアンミキシングを行い、混色のない各色素成分のみからなる画像を抽出することを試みる。



(2) 上記アルゴリズムを実装する顕微鏡システムの開発

既存の共焦点顕微鏡をベースに分光検出系の構築を行う。光学系の構成は通常のレーザー走査顕微鏡の出力ポートにイメージング分光器を付加したものを予定している(図)。蛍光分光の検出にはある程度の素子数が必要となることから、通常よく用いられるPMTではなく高速CCDカメラを用いる。これは素子数、読み出し速度、入出力応答の線形性、S/N比を検討した結果である。ダイクロイックミラーにはシャープエッジフィルタないしはラマンノッチフィルタを利用する。前述の通り、理論的にはスペクトルイメージングと退色時系列の情報から混合された蛍光色素の蛍光スペクトル、退色時系列、各色素の相対的混合比が推定可能であると期待されるが、実際の顕微鏡画像には様々なノイズや収差が含まれることが予想される。したがって当初は1励起4色程度で分光画像を取得し、アルゴリズムの可用性の検証と必要な改良を行う。また適宜必要に応じて光学系のバリデーションと改良を行う。



(3) 上記顕微鏡システムを用いた多色イメージングの実証

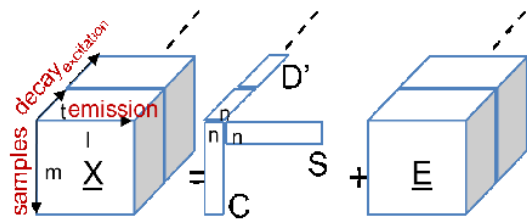
計測手法の開発と並行して観察に用いる蛍光色素の蛍光強度、スペクトル、退色時定数の測定を行い、多重染色に適した蛍光色素の選定を行う。また、免疫染色に用いる抗体の選定とバリデーションを行う。これらの結果から適切な蛍光色素と抗体の組み合わせを見出し、さらに、無染色サンプルを対象に自家蛍光成分の分離同定を試みる。また、可能であれば本提案手法を多色ライブイメージングに応用する方法を検討する。

4. 研究成果

(1) スペクトルイメージングと色素の退色時系列に基づくブラインドアンミキシングアルゴリズムの開発

多重蛍光染色サンプルが与えられたとき、サンプル各点の蛍光スペクトルとその退色時系列から、染色に用いた各蛍光色素のスペクトル及び退色の時系列、並びに各点にお

ける蛍光色素の混合比を計算するアルゴリズムの開発に成功した。以下にその概略を示す。

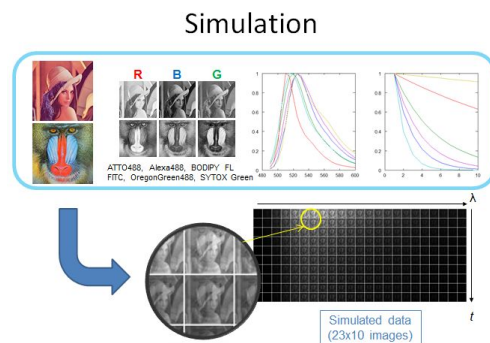


$$x_{m,t,t} = \sum_n D'_{t,n} S_{t,n} C_{m,n} + e_{m,t,t}$$

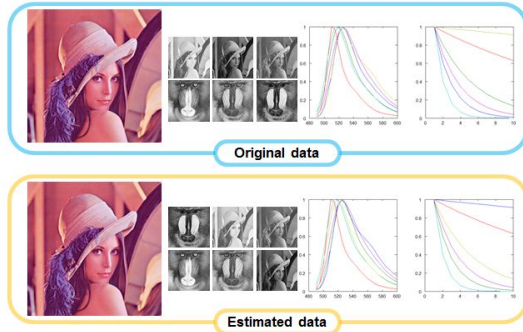
n種類の蛍光色素が混合されたサンプルを考える。ある励起波長におけるm個のサンプルの1個の異なる蛍光波長を繰り返しt回取得したとすると、各蛍光色素の濃度をC、蛍光スペクトルをS、退色時系列をDとして混合蛍光スペクトルのサンプル毎の時系列Xは上式のようにかける。これはPARAFACモデルと呼ばれ、D、S、Cそれぞれについてみれば上式は線型方程式であるから、Xを既知とすればD、S、Cは定数倍を除いて一意に定まる。実際、このようなD、S、Cは交互最小二乗法を用いて計算することができる。PARAFACモデルが一意な解をもつためには各色素のスペクトルと退色曲線がそれぞれ線形独立であることを要するが、退色は蛍光色素のおよそ普遍的な性質であり、生物試料の標識に用いられる蛍光色素からスペクトルと退色時定数の異なる複数の色素を選択することは容易である。

多色励起に対しては同時に各色素の励起波長ごとの吸光係数も同時に推定する必要がある。前述のように、退色曲線の推定はノンパラメトリックに行うため、必ずしも対数減衰することを要しない。そこで退色時系列に励起波長毎の吸光係数を掛けたベクトルを励起波長の数だけ付加したベクトルを考え、退色カーブと吸光係数を同時に推定する。退色カーブと吸光係数がそれぞれ線形独立ならば前記ベクトルも線形独立とみなせる。

さらに、コンピュータシミュレーションを用いて上記観測条件を再現する仮想データを作り、実際にアルゴリズムを適用して多重蛍光染色サンプルの分解が可能であることを示した。以下にその実施例を示す。



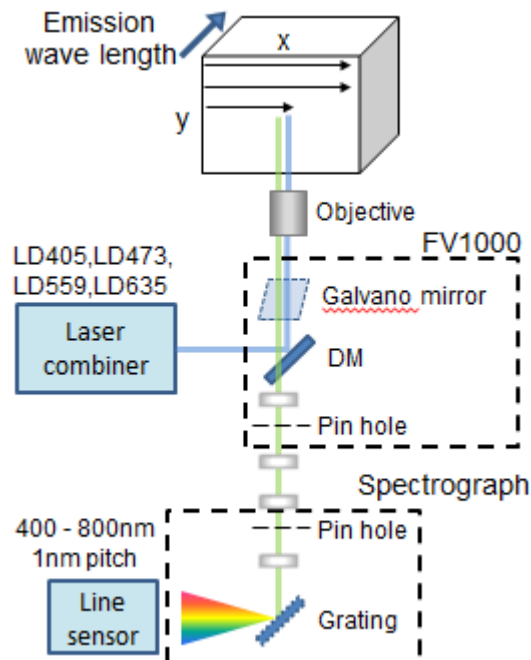
## Result



図は6枚の異なる画像に対してそれぞれ異なる蛍光スペクトルと退色時定数を持つ蛍光色素で染色したと仮定して、その混合スペクトル・退色時系列を生成し、これを入力としてアルゴリズムを適用し、元画像を復元したものである。

シミュレーションの結果、各蛍光色素のスペクトル・退色時系列の推定には必ずしも画像を構成する画素全てを用いる必要はなく、数百点程度をサンプリングすれば十分であることが分かった。更に、一度スペクトルを推定すれば、得られたスペクトルを用いてリニアアンミキシングを行うことで1枚の蛍光スペクトル画像から元画像を復元できることが分かった。このことから、撮影方法を工夫することで実用的な多色ライブイメージングが実現可能であることが示された。

### (2) 上記アルゴリズムを実装する顕微鏡システムの開発



スペクトルイメージングを高速で行う顕微鏡システムの光学設計を行った。既存のレーザースキャン顕微鏡をベースとし、蛍光検出部にイメージング分光器設置することでスペクトルイメージングを可能とした。予備

実験により、検出器として CCD カメラや CMOS カメラを用いても十分な感度が得られることが分かったため、高速な撮影が行える CMOS ラインセンサカメラを検出器として採用した。CMOS 素子は PMT や EM-CCD に比べて過飽和入力に対して強いため、ダイクロイックミラー・吸収フィルタに狭帯域ノッチフィルタを用いる必要はない。そこでミラーには 80% 透過のハーフミラー、吸収フィルタはなしとした。

当初計画にあった固定標本を対象とした蛍光スペクトル・退色時系列を実用的な時間で計測すること、並びにこの手法を応用した多重蛍光標識サンプルのライブイメージングを実現するための要求スペックを検討し、顕微鏡システムの制御、画像取得および解析を行うためのソフトウェア設計を行った。当システムは通常の単色顕微鏡システムに比べ、およそ 1000 倍程度のデータ量及び 10 倍以上のデータレートを要求するため、既存の画像取得ソフトウェアの流用は適当ではないとの判断のもと、新規に高速大容量画像取得・可視化ソフトウェアの開発に着手した。データ量が非常に多いため、1 枚の蛍光スペクトル画像を取得するにあたっては画像全体をコンピュータのメモリ上に保存することは現実的ではなく、画像を取得しながら同時に可視化と外部記憶装置への保存を行う。また外部記憶装置の転送速度が律速となるため、画像をリアルタイムで可逆圧縮しながら  $x$ 、 $y$ 、 $z$  の 3 次元画像を 1 つのファイルに保存することとした。この結果、平成 25 年度末現在、当顕微鏡システムの開発状況は 8 割から 9 割程度と当初計画での想定より大幅に遅れており、申請者の発案した蛍光スペクトル・退色時系列に基づく多重蛍光顕微鏡法の実証には至っていない。

### (3) 上記顕微鏡システムを用いた多色イメージングの実証

多重免疫蛍光染色を実現するには通常広く用いられる間接蛍光抗体法は、1 次抗体の多くがラビットまたはマウス由来であることから現実的ではない。そこで 1 次抗体を直接蛍光標識する方法を検討した。しかし、前述の顕微鏡システムの開発が難航したため実際の観察条件での評価が行えず、十分な評価は行っていない。多重染色に用いる蛍光色素の評価についても同様である。

### (4) 今後の展望

実用的な蛍光顕微鏡法の多色化が実現すれば、従来は一面的あるいは断片的にしか捉えられなかった現象を多面的に捉え、解析することが可能になる。このような同次多変数による解析は、多数のコンポーネントが複雑に関連しあう生命システムの解明に必須の技術である。このためにも現在の顕微鏡システムの研究開発を継続し、早期の多重免疫蛍光顕微鏡法の実現を目指す。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

尾崎 裕二、超多重蛍光顕微鏡法の開発、  
定量生物の会第5回年会、2012年11月  
23日～2012年11月25日、東京大学生産  
技術研究所

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：多重蛍光画像の画像解析のための装置、  
システム、  
方法、およびプログラム  
発明者：尾崎 裕二、上田 昌弘  
権利者：独立行政法人理化学研究所  
種類：特許  
番号：特願2012 84643  
出願年月日：2012年4月3日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 裕一(OZAKI Yuichi)

独立行政法人理化学研究所・生命システム  
研究センター・研究員

研究者番号：70345114