

THE IEICE TRANSACTIONS ON INFORMATION AND SYSTEMS (JAPANESE EDITION)

**IEICE** **電子情報通信学会**  
**D** **論文誌** VOL.J92-D NO.6 JUNE  
情報・システム 2009

**情報・システムソサイエティ**

社団法人 **電子情報通信学会**

THE INFORMATION AND SYSTEMS SOCIETY

THE INSTITUTE OF ELECTRONICS, INFORMATION AND COMMUNICATION ENGINEERS

多重蛍光の定量的分析のための独立成分分析による線形性評価に関する研究

森下壮一郎<sup>†,††a)</sup> 横田 秀夫<sup>††b)</sup> 橋口 博樹<sup>†††</sup> 浅間 一<sup>†</sup>  
 姫野龍太郎<sup>††</sup> 三島 健稔<sup>†††,††</sup>

A Study of Linearity Index for Quantitative Analysis of Multicolor Fluorescence with Independent Component Analysis

Soichiro MORISHITA<sup>†,††a)</sup>, Hideo YOKOTA<sup>††b)</sup>, Hiroki HASHIGUCHI<sup>†††</sup>,  
 Hajime ASAMA<sup>†</sup>, Ryutaro HIMENO<sup>††</sup>, and Taketoshi MISHIMA<sup>†††,††</sup>

あらまし 多重蛍光染色試料の観察は生命科学の分野で広く行われており、その分析のための手法として蛍光の線形結合モデルを仮定するものが一般に用いられている。しかしながら多重蛍光では色素の相互作用などによる非線形な強度変化が起き得ることが知られており、定量的な分析のためには多重蛍光の線形性を評価しなければならない。また、検量線法によりその評価を行おうとすると色素濃度が既知でかつ膨大な組合せの試料を測定しなければならず多大な時間を要する。これを解決するために本論文では、測定値の分布の独立成分分析の結果と蛍光色素のリファレンスとの一致度に基づく線形性評価指標を提案する。これにより濃度が既知の試料の測定を行わずに線形性を評価することができる。更に検量線法による結果と比較して本手法の妥当性と有用性を示す。

キーワード 蛍光色素, 蛍光スペクトル, 多重蛍光補正, 線形性指標, 独立成分分析

1. ま え が き

蛍光染色をはじめとする生細胞観察技術の発達と、それに伴う遺伝子解析の研究の進展により、生体試料から得られるデータの量は飛躍的に増大した。これらのデータを計算機を用いて定量的に分析することが現在求められている。また、数ある観察技術のうちでも多重蛍光染色はタンパク質や遺伝子発現の相互作用を知るなどの目的で複数の対象を同時に観察するために用いられるものであり、生物学においては他に代替が考えられないほど重要なものである。しかしながら複

数の蛍光色素を同時に用いると、その相互作用により非線形な蛍光強度の変化が起きることがある。このことが多重蛍光の定量的な測定を困難にしている。

なお、現在主に行われている多重蛍光の分析手法は線形のモデルに基づいている。具体的には、Bagwellらによる蛍光補正手法 [1] や鶴井らによる Linear Unmixing など [2], [3] が挙げられ、いずれも商用の分析装置に採用されている。蛍光の有無を定性的に観察するのみでかまわないのであれば、これらの手法は有用である。また、色素の相互作用が十分に小さいときには線形のモデルを仮定してよいから、これらの手法でも定量的な測定が可能である。

問題点は、線形のモデルを仮定することの妥当性を検証する術がないことにある。

色素の相互作用のメカニズムはまだ明らかになっていないので、測定を行わないままに線形性の有無を予測することはできない。このような場合は一般に検量線法が用いられるが、相互作用が考えられるときにこれを適用するには、あらかじめ使用する色素において考え得る濃度のすべての組合せの試料を作成して測定

<sup>†</sup> 東京大学人工物工学研究センター、柏市  
 RACE, The Univ. of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa-shi, 277-8568 Japan

<sup>††</sup> 理化学研究所生体力学シミュレーション特別研究ユニット、和光市  
 Computational Biomechanics Unit, RIKEN, 2-1 Hiroswa, Wako-shi, 351-0198 Japan

<sup>†††</sup> 埼玉大学大学院理工学研究科、さいたま市  
 Graduate School of Science & Engineering, Saitama Univ., 255 Shimo-Okubo, Sakura-ku, Saitama-shi, 338-8570 Japan  
 a) E-mail: mori@race.u-tokyo.ac.jp

b) E-mail: hyokota@riken.jp

を行わなければならない、多大な時間を要する。線形性の判別は、可能な限り少ない測定で行えることが望ましい。

以上のことから本論文では、検量線法のための測定を行わずとも測定データの分布から多重蛍光の線形性を確認できる手法として、独立成分分析を用いた線形性判別指標を提案する。この手法は、線形性判別のために特に新たな測定を必要としないことが特長である。そして、提案手法の妥当性を検証するために3種の蛍光色素を二つずつ組み合わせた3組の多重蛍光の線形性を検量線法により確認し、その結果と提案手法による判別結果とが一致することを示す。

## 2. 理 論

### 2.1 蛍光色素

蛍光色素は分子構造によって励起されやすい波長や蛍光が強い波長がそれぞれ異なる。この違いが蛍光色素を特徴づけている。また、励起されやすい波長や蛍光が強い波長には一定の幅があり、それぞれ吸収スペクトル、蛍光スペクトルと呼ばれる。更にそのピークは励起波長、蛍光波長と呼ばれる。

蛍光観察の方法には、大きく分けてフローサイトメトリーと共焦点レーザー顕微鏡などの顕微鏡観察による蛍光イメージングとの二つがある。散乱光を取り除き蛍光のみを観察するために、いずれも使用した色素の励起波長近辺の波長をもつ光を照射しながら、その波長の光を遮る光学フィルタを用いて観察を行う。

複数の色素を同時に用いたときも、蛍光のみを観察しようとする点では同様であるが、更に蛍光の分離が必要になる。例えば、蛍光波長が異なる色素を用いたときは、それぞれの波長の光を別々に透過するフィルタを用いて観察する。あるいは励起波長が大きく異なる色素を用いて、それぞれの波長の光を照射して観察することもある。しかしながら蛍光スペクトルには一定の幅があるので、いずれにせよ光学フィルタでは単一色素のみの蛍光を観察することはできない。

### 2.2 従来手法

光学フィルタによる分離ではなく、測定データの解析により各色素の蛍光を得ることを蛍光補正と呼び、そのための手法が種々提案されている。1977年、フローサイトメトリーにおける二重蛍光の分離がLokenらにより行われた[4]。また、Roedererらは自家蛍光も含む3色の多重蛍光の分離を行った[5]。これは、測定された蛍光の各チャンネルに対する色素ごとの相対的

な寄与率を求めることで蛍光の分離を行うものであり、更にBagwellらはそれに基づき任意の数の多重蛍光を分離する手法についての指針を示した[1]。これらの手法の応用としてBigosらは9種の色素からなる蛍光の分離を行った[6]。しかしこれに必要なパラメータを得るためには、使用する色素に応じて3種のレーザと9種の光学フィルタとを適切に組み合わせる必要があった。現在実用化されているフローサイトメトリーシステムではフィルタの組合せについての難点は解消されているが、データ解析についてはBagwellらが提唱した手法に基づいて行われている[7],[8]。一方、蛍光イメージングにおいては鶴井らが特異値分解に基づく7種の蛍光の分離を行った[2],[3]。これは、Boardmanらにより提案されていた分光スペクトルの分離手法[9]を蛍光画像に応用したものである。

以上に挙げた手法はいずれも蛍光スペクトルの線形結合モデルを仮定している点で共通している。そしてこれらはスペクトルの混合行列の逆行列あるいは一般化逆行列を求める問題に帰着する。その具体的な手続きを次節で述べる。

### 2.3 線形結合モデルに基づく蛍光補正

蛍光色素を $N$ 種用いた多重蛍光の観察をチャンネル数 $L$  ( $\geq N$ )の測定装置により行うとする。蛍光色素の数 $N$ は、実験目的に応じて標識したい対象の数により決まる。

各チャンネルの蛍光強度は、励起光または測定波長、あるいはその両方を切り換えながら計測される。その設定は使用した蛍光色素の励起波長や蛍光波長に応じて選択される。色素 $i$ の蛍光強度を $y_i$ とし、各チャンネルでそれに比例した強さの蛍光が観測されると仮定すると、色素 $i$ の蛍光 $f_i = (f_{i1}, \dots, f_{iL})^T$ は次のように表される。

$$f_i = r_i y_i \quad (1)$$

ここに、 $f_{ij}$ はチャンネル $j$ における色素 $i$ の蛍光、 $r_i = (r_{i1}, \dots, r_{iL})^T$ は各チャンネルに対する色素 $i$ の蛍光の寄与を表すものであり、リファレンスと呼ばれる。これは蛍光色素に固有である。

多重蛍光は各色素の蛍光が線形に重ね合わされたものだと仮定すると、観測値 $x$ は次のように表される。

$$x = Ry \quad (2)$$

ここに、 $x = (x_1, \dots, x_L)^T$ は各チャンネルにおける蛍光強度の観測値、 $y = (y_1, \dots, y_N)^T$ は各蛍光色素の

蛍光強度,  $R = (r_1, \dots, r_N)$  は色素  $i$  のリファレンス  $r_i$  を並べた行列である. 蛍光の補正は, リファレンス行列  $R$  が既知という条件のもとに測定値  $x$  から各色素の蛍光強度  $y$  を推定する問題である. 式 (2) より蛍光強度  $y$  は  $x$  と  $R$  から次のように計算される.

$$y = R^+ x \quad (3)$$

ここに,  $R^+$  は  $R$  の一般化逆行列である. もし  $L$  と  $N$  とが等しければ行列  $R$  は正方行列であり, 更に  $R$  が正則行列であれば容易に逆行列を計算できる. また,  $L$  が  $N$  より大きいときでも,  $R$  のランクが  $N$  であれば特異値分解により一般化逆行列を計算できる. いずれの場合でも, リファレンス  $r_i (i = 1, \dots, N)$  が線形独立であることがこの手法を適用できる条件の一つである. これは色素に応じて測定波長を適切に設定することで満たされる.

#### 2.4 検量線法による線形性検証

前節までで述べた線形結合モデルに基づく多重蛍光補正は, 式 (1) 及び式 (2) に表される二つの線形性を仮定している. 式 (1) はリファレンスに対する単一蛍光の線形性を, 式 (2) は同様にリファレンスに対する多重蛍光の線形性をそれぞれ表している. 本節では, 濃度が既知の試料を用いた検量線法によりこれらの線形性を調べる.

##### 2.4.1 各チャネルに対する単一蛍光の線形性

色素  $i$  のみを用いてその濃度を様々に変えて作成した  $M$  個のサンプルの測定値を  $x_{ik} = (x_{ik1}, \dots, x_{ikL})^T (k = 1, \dots, M)$  とし, そのときの色素濃度を  $c_{ik}$  とする. このデータに検量線法を適用するには, チャネル数  $L$  の測定装置により得られた 1 サンプル当り  $L$  個の測定値  $x_{ik}$  から, 蛍光強度としての一つの値  $y_{ik}$  を決定しなければならない. ここで式 (1) のモデルを仮定すれば, 各チャネルの蛍光強度  $f_{ik}$  は蛍光強度  $y_{ik}$  とリファレンス  $r_i$  を用いた線形結合で表すことができる. 実際にはノイズが含まれるので, 測定値  $x_{ik}$  は次の式で表現できる.

$$x_{ik} = f_{ik} + e_{ik} = r_i y_{ik} + e_{ik} \quad (4)$$

ここに,  $f_{ik} = r_i y_{ik}$  は  $k$  番目の試料の蛍光,  $e_{ik} = (e_{ik1}, \dots, e_{ikL})^T$  は  $x_{ik}$  に含まれるノイズである. このモデルが妥当であるならば, 観測値  $x_{ik}$  から蛍光強度  $y_{ik}$  を得るにはノイズ  $e_{ik}$  をその平均値  $\bar{e}$  で置き換えて次の計算をすればよい.

$$y_{ik} = r_i^+ (x_{ik} - \bar{e}) \quad (5)$$

ここに,  $r_i^+$  は  $r_i$  を  $L$  行 1 列の行列とみなしたときの一般化逆行列である. なお, ノイズの平均値  $\bar{e}$  は, 蛍光色素を含まない試料の測定値から計算する.

なお本論文では, 数ベクトル空間  $\mathcal{R}^L$  における  $x_{ik}$  の分布を評価することでモデルの妥当性を判断する. このモデルによれば, リファレンス  $r_i$  が与えられているとき  $f_{ik}$  は数ベクトル空間  $\mathcal{R}^L$  で表現されているものの, その分布は  $y_{ik}$  一つの変数で厳密に表すことができる. 一般に, 蛍光強度  $f_{ik}$  の分散はノイズ  $e_{ik}$  の分散に対して十分に大きいので, 観測値  $x_{ik}$  の分布も同様に一変数で十分に表現できる. このモデルに対する  $x_{ik}$  の分布の適合性は,  $x_{ik}$  に主成分分析を施してその第 1 主成分の寄与率を見ることで評価できる. これが十分に大きければ, 第 1 固有ベクトルをリファレンスとすることで  $x_{ik}$  の分布は一変数で十分に表されるからである.

なお, ここまでの分析はサンプルの濃度を考慮しなくてもかまわない. すなわち測定値の蛍光強度に対する線形性は, 濃度が未知のデータでもその分布のみで評価できる. このことは後に述べる線形性評価指標においても重要になる.

##### 2.4.2 回帰式への当てはめ

次に検量線を得るために, 以上の手続きにより得られた蛍光強度  $y_{ik}$  と色素濃度とを線形回帰モデルに当てはめる. このモデルは次のように表される.

$$y_{ik} = \beta_{i0} + \beta_{i1} c_{ik} + \varepsilon_{ik}$$

ここに,  $\beta_{i0}, \beta_{i1}$  は母回帰係数,  $\varepsilon_{ik}$  は誤差である. 実測値を用いた最小二乗法により回帰係数  $b_{i0}, b_{i1}$  を決定し, 検量線を示す関数を次のように定義する.

$$c_i(y_i) = (y_i - b_{i0})/b_{i1}$$

この関数の予測性能の評価規準として, 本論文では相互検証法で用いられることが多い  $Q^2$  値を採用する. この値を得るには次の計算を行う.

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{k=1}^M (c_{ik} - \hat{c}_{ik})^2}{\sum_{k=1}^M (c_{ik} - \bar{c}_i)^2} \quad (6)$$

ここに,  $\hat{c}_{ik}$  は  $c_{ik}$  の予測値,  $\bar{c}_i$  は  $c_{ik}$  の平均である. 右辺第 2 項は, 元のデータの分散の大小にかかわらず予測性能を評価するために評価残差の分散を実測値の分散で正規化したものである. 残差の分散が 0 ならば  $Q^2$  は 1 になり残差が大きくなるほど  $Q^2$  は小さくなる.

### 2.4.3 複数の蛍光の重ね合わせの線形性

多種の色素  $i$  ( $i = 1, \dots, N$ ) を用いてそれらの濃度を様々に変えて作成した  $M$  個のサンプルの測定値を  $\mathbf{x}_k = (x_{k1}, \dots, x_{kL})^T$  ( $k = 1, \dots, M$ ) とする。あらかじめ測定された単一蛍光の測定値から、2.4.1 で示した手続きにより既にリファレンス  $R$  が得られているとすれば、式 (3) と式 (5) から  $\mathbf{x}_k$  における各色素の蛍光強度  $\mathbf{y}_k = (y_{1k}, \dots, y_{Nk})^T$  は次のように計算できる。

$$\mathbf{y}_k = R^+(\mathbf{x}_k - \bar{\mathbf{e}})$$

以上により得られた蛍光強度の推定値を用いて上記の色素濃度関数  $c_i(\cdot)$  の予測性能を評価すれば、複数の蛍光の重ね合わせの線形性を調べることができる。

## 3. 線形性評価指標の提案

前章までの手続きにより、検量線法により多重蛍光の線形性を確認することは可能である。しかしながら、実際にこれを行うには多大な時間を要する。なぜなら、あらかじめ使用する色素において考え得る濃度のすべての組み合わせの試料を作成して測定を行わなければならないからである。このときに必要になるサンプル数は、色素数  $N$  及び濃度の段階数  $m$  に対して  $m^N$  である。例えば 2 種の蛍光色素について 10 段階で濃度を変えた測定では 100 サンプルを必要とし、色素数を増やせば更に膨大な数になる。

この問題を解決するために本章では、2.4.1 で述べた手法のように、計測値の分布のみから色素濃度やその混合比率が未知である試料の線形性を評価する手法を提案する。以下にその手続きを述べる。

### 3.1 独立成分分析

測定値の分布を評価するための手法として本論文では独立成分分析を採用する。独立成分分析 (ICA: Independent Component Analysis) とは、ブラインド信号分離 (Blind Source Separation) を行う手法の一つである [10]~[12]。

独立な  $N$  個の信号源から長さ  $M$  だけ発信された信号  $S = (\mathbf{s}_1, \dots, \mathbf{s}_N)^T$  が、混合行列  $A$  ( $L \times N$  行列) によって線形に混合され、チャンネル数  $L$  で長さ  $M$  の観測値  $X = (\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_M)$  が観測されるとすると、このモデルは次のように書き表せる。

$$X = AS \quad (7)$$

ここに、 $\mathbf{s}_i = (s_{1i}, \dots, s_{Mi})^T$  ( $i = 1, \dots, N$ ) である。

ICA は、信号源  $S$  と混合行列  $A$  とが未知であるとき、信号源の独立性を仮定し、それを手掛りにして観測値  $X$  から  $A$ ,  $S$  を推定するものである。

### 3.2 多重蛍光分析への独立成分分析の適用

式 (7) の  $A$ ,  $S$  をそれぞれ  $R$ ,  $Y$  とすれば、これをスペクトルの線形結合モデルを表す式とみなすことができる。色素の数  $N$  を独立成分の数とすると、リファレンス  $R$  が混合行列  $A$ 、蛍光強度  $Y$  が信号源  $S$  に対応する。

多重蛍光が線形結合モデルに従うのであれば、独立成分分析により既知のリファレンス  $R$  に対応する  $A$  が得られ、これらは一致するはずである。逆に線形結合モデルに従わないのであれば、 $A$  は  $R$  と異なるものになるであろう。したがって、これらの一致度を測ることのできる色素の組合せにおける混合スペクトルの線形性を確認することができると考えられる。

なお、この問題に独立成分分析を適用するためには各色素の蛍光強度  $\mathbf{y}_i$  の独立性と非正規性が問題となる。独立性は染色した対象の分布に依存するが、測定の前にそれが明らかになっていることは極めてまれであり、まずは独立性を仮定して分析せざるを得ない。もっとも多重蛍光では各色素で別の対象を標識するので、この仮定は多くの場合で妥当である。少なくとも多重蛍光が線形であるという仮定よりは容認しやすいだろう。なお、仮に独立成分分析の結果に影響を及ぼすほどの相関があった場合、多重蛍光の線形性を仮定できるにもかかわらず線形性がないと判定されてしまうが、これはその逆、すなわち線形性は仮定できないにもかかわらず線形性があると判定されることに比べれば許される誤りである。また、非正規性は染色した対象の濃度分布に依存するが、蛍光強度の分布はポアソン分布に従うことが一般に知られており、仮に濃度分布が正規分布であったとしても観察される蛍光強度においてはその正規性は失われている。

以上のことから、独立成分分析によりリファレンスが推定できるか否かは、主に多重蛍光の線形性が成り立つか否かに依存すると考えられる。

### 3.3 混合行列とリファレンスの一致度

本論文では、リファレンス行列  $R$  と混合行列  $A$  との一致度  $\gamma$  を、 $R$  の各列を基底ベクトルとする空間への  $A$  の写像を用いて定義する。

信号源の独立性が仮定できるとき、観測値  $X$  は混合行列  $A$  の各列  $\mathbf{a}_i$  ( $i = 1, \dots, N$ ) の張る空間  $\mathcal{R}^N$  に分布する。すなわち  $\mathbf{a}_i$  はベクトル空間  $\mathcal{R}^L$  において

観測値  $X$  が分布する空間の基底ベクトルである。一方、スペクトルの線形結合モデルが成り立つとき、観測値  $X$  は同様にリファレンス  $R$  により張られる空間  $\mathcal{R}^N$  に分布する。ここで、 $A$  と  $R$  とが一致するならば、行列  $R$  による  $\mathbf{a}$  の写像はそれぞれリファレンス  $R$  により張られる空間  $\mathcal{R}^N$  の基底と一致する。ノルムが正規化されていれば、これは行列  $R$  による  $A$  の写像が単位行列になることと等価である。すなわち、 $A$  の写像の対角成分がすべて 1 であるか否かを見ることにより一致度を測ることができる。

しかしながら、実際には独立成分分析は信号源の数とその独立性以外を仮定しないので、独立成分の符号や分散（強さ）、及び順番を規定することはできない。このあいまい性に依存しないように一致度を測る必要がある。

以下にその手続きを述べる。まず、行列  $R$  による  $A$  の写像を列ごとに正規化した行列  $\hat{A} = (\hat{\mathbf{a}}_1, \dots, \hat{\mathbf{a}}_N)$  の各列を次のように計算する。

$$\hat{\mathbf{a}}_i \propto R^+ \mathbf{a}_i \quad (8)$$

ここに、記号  $\propto$  は、左辺のノルムが 1 になるように右辺を正規化して代入することを表す。このとき  $\hat{A}$  の対角成分  $\hat{a}_{ii}$  は、行列  $R$  を基底とする空間における  $\mathbf{r}_i$  と  $\mathbf{a}_i$  との相関値を意味する。この値はノルムを正規化しなくとも  $[-1, 1]$  の値をとる。

そして、行列  $R$  と  $A$  との一致度を  $\hat{A}$  の対角成分の積の絶対値として次のように計算する。

$$\gamma(R, A) = \left| \prod_{i=1}^N \hat{a}_{ii} \right| \quad (9)$$

式 (9) の計算により、行列  $R$  と  $A$  の各列の相関が全体に高いときは 1 に近い値が得られ、一つでも相関値が低いものがあるときは小さい値になる。相関値は強度によらない量であり、絶対値は符号によらない量であるので、このように一致度を計算することで強度及び符号のあいまい性の問題は解決される。なお順番のあいまい性は、行列  $R$  と  $A$  の各列のすべての組合せについて一致度を計算してその最大値を採用することで解決される。具体的には、集合  $U = \{1, \dots, N\}$  の要素の順列組合せの集合を  $U^{(N)}$  とし、 $u \in U^{(N)}$  の示す順に行列  $A = (\mathbf{a}_1, \dots, \mathbf{a}_N)$  の列ベクトルを並べ換えた行列を  $A_u$  として、式 (9)、(10) を用いて最大の一貫度  $\Gamma$  を次のように計算する。

$$\Gamma = \max_u \gamma(R, A_u) \quad (10)$$

もし線形性があるならば、すべての相関値が 1 に十分近くなるような  $A_u$  が存在し、そのとき  $\gamma$  が最大になる。線形性がないならば、すべての相関値が 1 に十分近くなるような  $A_u$  は存在しない。したがって相関値の積である  $\gamma$  が最大になる  $A_u$  を選んだとしてもそれは 1 に十分近い値にはならない。このように計算して得られた指標  $\Gamma$  は、多重蛍光の線形結合モデルに対する適合度を表していると考えられる。本論文ではこれを線形性評価指標とする。

#### 4. 線形性検証実験

本章では、提案手法の有用性を検証するために行った実験について述べる。まず、線形結合モデルが仮定できる場合とできない場合とを想定したシミュレーションによる数値実験を行い、提案手法の有効性を確認する。次に各色素の濃度と混合比率とを変えた試料の蛍光スペクトルを測定し、使用した色素の組合せにおける多重蛍光の線形性を検量線法により確認する。そしてその結果を用いて提案手法による線形性判定の有用性を検証する。

##### 4.1 シミュレーションによる検証実験

###### 4.1.1 蛍光色素

代表的な蛍光色素である Alexa-488, Alexa-532, FITC の 3 種の蛍光色素を二つずつ組み合わせて二重蛍光観察を行ったと想定して、シミュレーションによる提案手法の検証実験を行った。以下、Alexa-488 と Alexa-532 との組合せをセット A, Alexa-488 と FITC との組合せをセット B, Alexa-532 と FITC との組合せをセット C と呼ぶ。

蛍光スペクトル及び吸光スペクトルは、各蛍光色素の仕様としてカタログに記載されている値を用いた (図 1)。それぞれの吸光スペクトル及び蛍光スペクトルのグラフを図に示す。セット A (Alexa-488 と Alexa-532) 及びセット C (Alexa-532 と FITC) とでは蛍光スペクトルのピークが互いに異なるが、セット B (Alexa-488 と FITC) ではピークがほぼ一致している。一方で、吸光スペクトルと蛍光スペクトルとの関係を見ると、セット A 及びセット C とでは互いの吸光スペクトルと蛍光スペクトルとの重なりが大きくなるが、セット B ではそれが小さい。

吸光スペクトルと蛍光スペクトルとの重なりにより生じるとされる相互作用に Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) と呼ばれるものがあり、それが起き得る場合とそうでない場合との比較を行う

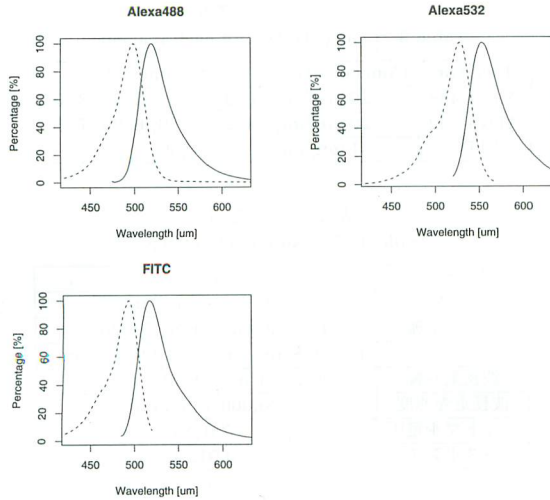


図 1 各色素の吸収スペクトル（破線）と蛍光スペクトル（実線）

Fig.1 Absorbance spectrum and fluorescence spectrum of each reagent.

ことが、この色素の組合せを選んだ理由である。FRET については実測値を用いた実験についての議論で詳述する。

測定値として 10 段階に濃度を変化させて組み合わせた 100 サンプルがあると仮定し、蛍光強度は濃度に比例するものとしてそれぞれを線形に重ね合わせた場合と、非線形の重ね合わせが起きた場合とでそれぞれ得られると想定される測定値を計算により求めた。

線形に重ね合わせた場合の測定値は式 (4) により計算した。非線形の重ね合わせは、二つの色素の互いの吸収スペクトルと蛍光スペクトルについて、吸収スペクトルが重なった分については蛍光強度を増し、蛍光スペクトルが重なった分については蛍光強度を減らすことにより行った。具体的には相互作用により変化した蛍光強度  $\hat{y}_{ik}$  を式 (4) により計算した。

$$\hat{y}k_i = y_{ik} - \sum_{j=1|j \neq i}^N y_{ik} \mathbf{q}_j^T \mathbf{r}_i + \sum_{j=1|j \neq i}^N y_{jk} \mathbf{q}_i^T \mathbf{r}_j \quad (11)$$

ここに、 $\mathbf{q}_i$  は色素  $i$  の波長の吸収スペクトルである。各要素の波長はリファレンス  $\mathbf{r}$  の各要素の波長に対応するものとする。更に、蛍光とノイズの平均強度の比が 20:1 になる程度の一様分布の乱数によるノイズ  $e_k$  を生成し、これらの線形和を測定値  $X$  とみなした。

表 1 線形に重ね合わせた場合の混合行列とリファレンスの一致度  $\gamma$

Table 1 Coincidence rate  $\gamma$  between independent component and reference.

	Set. A	Set. B	Set. C
Max. ( $\Gamma$ )	<b>0.999</b>	<b>0.995</b>	<b>0.999</b>
	0.000	0.003	0.000

表 2 非線形に重ね合わせた場合の混合行列とリファレンスの一致度  $\gamma$

Table 2 Coincidence rate  $\gamma$  between independent component and reference.

	Set. A	Set. B	Set. C
Max. ( $\Gamma$ )	<b>0.937</b>	<b>0.993</b>	<b>0.513</b>
	0.062	0.007	<b>0.265</b>

#### 4.1.2 アルゴリズムの検討

独立成分分析には様々なアルゴリズムが提案されている。本論文では不動点法を用いた高速なアルゴリズムである FastICA を採用した。高次のノイズが含まれる場合は、JADE [13] 等の他のアルゴリズムの方が適切であるが、本論文で扱うデータにおいて混入するノイズのうち一番影響が大きいと思われるのは CCD やフォトマルの暗電流によるものであり、これは露光時間を十分に長くすることにより信号に対して影響を十分に小さくできる。なお、アルゴリズムの適用には統計処理言語 R [14] を用いた。

#### 4.1.3 シミュレーション結果

提案手法により線形性指標を求めた結果を表 1、表 2 に示す。一致度  $\gamma$  は、二つの色素による順列組み合わせの数だけ計算される。表には計算された値の両方を小数点以下第 4 位を切り捨てたものを示し、そのうち最大のものを上段に記載した。実際に線形性を見るために使われるのは上段の値のみである。

線形に重ね合わせた場合は、すべて 1 に極めて近い値が得られた。ただしセット B は他の二つに比べて微少ながら値が小さい。これは、セット B においては色素同士の蛍光スペクトルのピークが近接しているため、ノイズの影響をより強く受けるからであると考えられる。しかしながら、セット B においても  $10^{-2}$  のオーダーで 1 に近い値がえられており、これをもって線形であるとみなしてもかまわないであろう。

非線形に重ね合わせた場合では、セット C の値が小さいことは明白である。セット A は 1 に近い値ではあるが、上記の線形に重ね合わせた場合と比較すると明らかに小さい。セット B は、上記の線形の場合とほぼ同程度である。しかしながら、セット B は前述のとおり

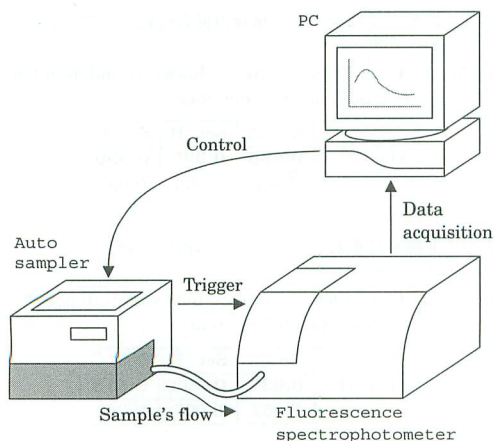


図 2 システムの概略図  
Fig.2 Overview of measurement system.

り蛍光スペクトルと吸光スペクトルとの重なりが小さいので、相互作用も小さくなり蛍光がほぼ線形に重ね合わされたものと考えられる。したがって、以上の結果はいずれもこの予備実験の枠組みの中では妥当な結果である。また、以上の結果から  $10^{-2}$  のオーダーが線形性の判定基準として妥当であるといえる。

4.2 蛍光スペクトルの測定

次に、実際に蛍光色素を混合して作製したサンプルの実測値による確認を行う。

4.2.1 実験装置

スペクトルの計測には、分光蛍光光度計（日立 F-4500）及びオートサンプラー（日立 AS-3000）と、制御用 PC とで構築された自動計測システムを用いた（図 2）。なお、オートサンプラーは蛍光の褪色を防ぐために特別に遮光が施されたものである。

オートサンプラーは、フローセルに試料を流入すると分光蛍光光度計にトリガをかける。分光蛍光光度計はそれを受け測定を開始する。測定が終了すると、流路は 99.5%のエタノールで洗浄され、更に純水ですすぎが行われる。以上の手続きが自動で行われる。

4.2.2 蛍光色素

前述の Alexa-488, Alexa-532, FITC (fluorescein) の 3 種の蛍光色素を二つずつ組み合わせ、それぞれの濃度比率を変えた混合試料のスペクトルを測定した。各色素の濃度を表 3 に、測定条件を表 4 に示す。

4.3 単一色素のときの線形性

まず、シミュレーションにおいては前提としていた単一色素のスペクトルの線形性を確認する。各色素の濃度を 10 段階に変化させて作成した試料のスペクトル

表 3 各色素の濃度  
Table 3 Concentration of each reagent.

Reagent	Concentration	Volume ratio
Alexa-488	20 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0/20, 1/20, 2/20, 3/20,
Alexa-532	20 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	4/20, 5/20, 6/20, 7/20,
FITC	1 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	8/20, 9/20

表 4 測定条件  
Table 4 Measurement settings.

パラメータ	設定
光源	150 W xenon lamp
スリット幅	Ex: 5.0 [nm], Em: 5.0 [nm]
	Ex: 488 [nm], Em: 510 to 560 [nm]
波長刻み幅	Ex: 5.0 [nm], Em: 5.0 [nm]
波長走査速度	30,000 [nm/min]
フォトマル電圧	700 [V]
レスポンス	0.01 [s]

表 5 各色素の主成分分析結果の累積寄与率  
Table 5 Cumulative proportion values of PCA for each reagent.

	1	2	3	4	...
Alexa-488	0.997	0.999	0.999	1.000	...
Alexa-532	0.917	0.971	0.988	0.988	...
FITC	0.997	0.999	0.999	1.000	...

ルを主成分分析して得られた累積寄与率を表 5 に示す。これを見ると、Alexa-488 と FITC は第 1 主成分のみでほぼ 1 (100%) に達している。すなわち、この二つの色素のスペクトルは 1 変量で十分に説明される。一方、Alexa-532 では第 4 主成分まででほぼ 1 に達するが、第 1 主成分だけでも寄与率が 0.917 に達している。本実験では照射光の波長を 488 nm に設定しているため、励起波長が 532 nm 近辺である Alexa-532 の蛍光強度が弱くノイズの影響を受けやすいことを考慮すれば、Alexa-532 のスペクトルも 1 変量で説明できると考えることは妥当であろう。

以上の結果を踏まえて、各色素の色素濃度を説明変数、蛍光強度（スペクトルの第一主成分）を被説明変数として回帰分析を施した結果を図 3 に示す。測定値はほぼ回帰直線に沿っており、線型モデルに従っているとみなすことは妥当である。

4.4 多重染色のときの線形性

前節で得られた結果を踏まえて、複数の色素を用いたときのスペクトルの線形性を検証する。

図 4, 図 5, 図 6 に各色素の組合せにおけるスペクトルからの濃度の推定値を示す。横軸が真の色素濃度であり、縦軸が推定値である。推定値の分布は Tukey の箱ひげ図と呼ばれる方式で表した。線分は中央値を



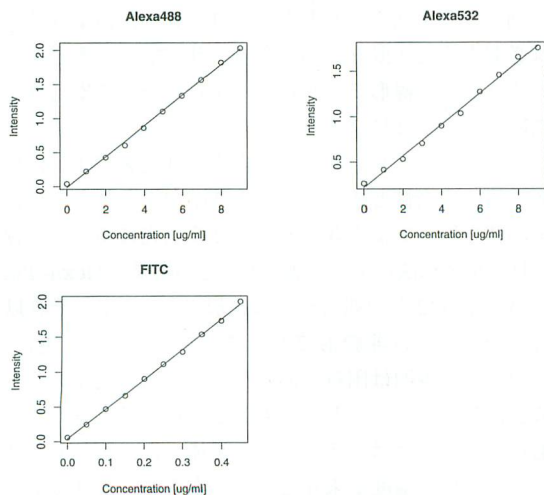


図3 単一色素の蛍光の回帰分析結果  
Fig.3 Regression line of single reagent's fluorescence.

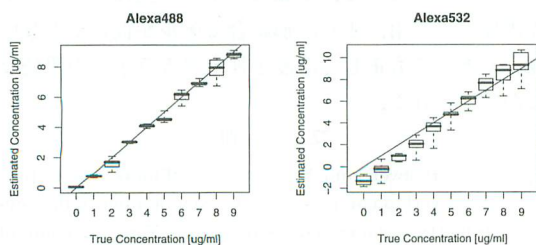


図4 セット A における真の色素濃度と推定値  
Fig.4 Comparison between measured value and estimated one. (Alexa-488 and Alexa-532)

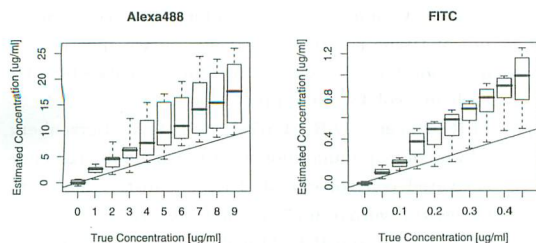


図5 セット B における真の色素濃度と推定値  
Fig.5 Comparison between measured value and estimated one. (Alexa-488 and FITC)

表す。箱は上端が第1四分位数、下端が第3四分位数を表し、ひげは最大値と最小値を表す。更に傾き1の原点を通る直線で推定値がとるべき値を示した。

セット A における推定値は真値とよく一致しているが、セット B 及び C における推定値は真値と大きく異なるものとなっている。これは  $Q^2$  値を比較しても明らかである。表 6 にそれぞれの組合せにおける各色素

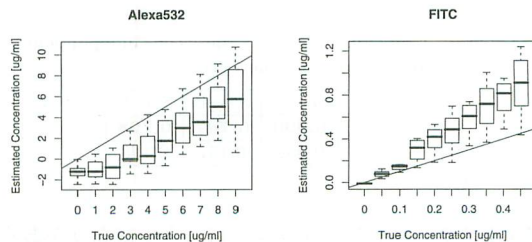


図6 セット C における真の色素濃度と推定値  
Fig.6 Comparison between measured value and estimated one. (Alexa-532 and FITC)

表6 それぞれのセットにおける  $Q^2$  値  
Table 6 Comparison table of  $Q^2$ -values each set.

Set	Dye	$Q^2$
A	Alexa-488	0.987
	Alexa-532	0.861
B	Alexa-488	-4.20
	FITC	-4.33
C	Alexa-532	-3.02
	FITC	-0.302

濃度の推定値の  $Q^2$  値を示す。セット A については1に近い値であるが、セット B 及び C では負の値になっている。この結果から、線形モデルに基づく補正手法はセット A (Alexa-488 と Alexa-532 の組合せ) については真値に近い推定が行われるが、セット B 及び C (Alexa-488 と FITC 及び Alexa-532 と FITC との組合せ) には適用できないことが確認された。

#### 4.5 多重蛍光の非線形性に関する考察

前節の実験により、単一蛍光は線形性が認められたが、多重蛍光では必ずしも線形性は成り立たないことが確認された。この非線形性は色素の相互作用によるものであると考えられるが、説明は極めて困難である。代表的な蛍光色素の相互作用として前述した FRET があるが、この現象は FRET では説明できない。その理由として次の三つが挙げられる。

- (1) FRET が起きる条件には分子の配向や分子間距離などの要素があり、必ず起きるとは限らない。
- (2) Alexa-488 と FITC とは FRET が起きる関係にはない。

(3) Alexa-532 と FITC との間では FRET が起き得るが、観測結果は予想される結果と逆である。

以下、詳細を述べる。FRET は、2 種の色素間でエネルギー移動が起きることで片方の色素の蛍光が弱まりもう片方の色素の蛍光は強くなる現象である。このときエネルギーを失う方をドナー、受け取る方をアクセプタと呼ぶ。FRET はドナーの蛍光スペクトルと

表 7 混合行列とリファレンスの一致度  $\gamma$   
Table 7 Coincidence rate  $\gamma$  between independent component and reference.

	Set. A	Set. B	Set. C
Max. ( $\Gamma$ )	<b>0.996</b>	<b>0.747</b>	<b>0.798</b>
	0.002	0.157	0.123

アクセプタの吸光スペクトルとに大きく重なりがあるときに起きる。Alexa-488 と Alexa-532 との組合せでは、Alexa-488 がドナー、Alexa-532 がアクセプタとなって FRET が起き得る。しかし観測結果を見る限り相互の影響はないように見える。もっとも前述のように FRET は必ず起きるとは限らないので、この組合せでは FRET は起きなかったと解釈することはできる。Alexa-488 と FITC との組合せでは、互いに吸光スペクトルと蛍光スペクトルとが似た特性をもっており、FRET におけるドナーとアクセプタの関係になることはない。また、この組合せの観測結果では互いに蛍光が強まっており、これが FRET によるものであるとは考えられない。一方、Alexa-532 と FITC とでは FITC がドナー、Alexa-532 がアクセプタとなって FRET が起き得る。したがって FITC の蛍光が弱まり Alexa-532 の蛍光が強まるはずであるが、実際に観測されるのはその逆の現象である。

上記のように、多重蛍光の相互作用は FRET のみに着目したとしても説明できないことがある。他の要素を考慮すると更に問題が複雑になり、実際としてはその有無を測定の前に知ることはできない。

#### 4.6 線形性評価指標による線形性の判定

色素の各セットで式 (9) に基づき算出した混合行列とリファレンスの一致度  $\gamma$  を表 7 に示す。前述のシミュレーションの結果と同様、一致度  $\gamma$  として計算されるすべての値を示しているが、実際に用いられるのは最大値  $\Gamma$  のみである。

セット A ではほぼ 1 とみなせる高い一致度を示している。この結果はシミュレーションにより得られた  $10^{-2}$  程度という基準にも合致する。一方、セット B 及び C では 0.8 を超えない程度にとどまっている。すなわち、セット A の場合の蛍光スペクトルは線形モデルに従うが、セット B 及び C の場合は必ずしも従わないことが分かる。これは検量線法で確認した線形性についての判定結果と合致している。

## 5. む す び

本論文では、測定値の分布から多重蛍光の線形性を

評価できる手法を提案した。これにより、検量線法には必要な濃度が既知である多量のサンプルの測定をすることなく、線形モデルによる定量的分析の妥当性を判断できるようになる。

まず、シミュレーションによる検証実験により、提案手法の妥当性と線形性判定の基準が得られた。更に実測値を用いてまず 3 セットの 2 重蛍光についての線形性を検量線法により評価した。その結果、Alexa-488 と Alexa-532 との組合せでは線形であったが、それ以外の組合せでは非線形であることを確認した。更に、この結果の説明は困難であり、色素の励起波長や蛍光波長が分かっていたとしても測定の前に多重蛍光の線形性を知ることはできないことを述べた。そして、サンプルの色素濃度が未知として提案手法により線形性を評価したところ、検量線法によるものと同等の結果を得た。すなわち、提案手法の有用性が示された。

今後の課題として、本論文で示した指標のスペクトル画像への適用、また線形結合モデルが仮定できない場合であっても正しく濃度を推定できる手法の開発などが挙げられる。

## 文 献

- [1] C.B. Bagwell and E.G. Adams, "Fluorescence spectral overlap compensation for any number of flow cytometry parameters," *Annals New York Academy of Science*, vol.677, pp.167-184, 1993.
- [2] 鶴井博理, "画像分光による超多色蛍光イメージング法," *Cytometry Research*, vol.9, no.2, pp.1-7, 1999.
- [3] H. Tsurui, H. Nishimura, S. Hattori, S. Hirose, and K. Okumura, "Seven-color fluorescence imaging of tissue samples based on fourier spectroscopy and singular value decomposition," *J. Histochem Cytochem.*, vol.48, no.5, pp.653-662, 2000.
- [4] M.R. Loken, D.R. Parks, and L.A. Herzenberg, "Two-color immunofluorescence using a fluorescence-activated cell sorter," *J. Histochemistry and Cytochemistry*, vol.25, no.7, pp.899-907, 1977.
- [5] M. Roederer and R.F. Murphy, "Cell-by-cell autofluorescence correction for low signal-to-noise systems: Application to epidermal growth factor endocytosis by 3T3 fibroblasts," *Cytometry*, vol.7, pp.558-565, 1986.
- [6] M. Bigos, N. Baumgarth, G. Jager, O. Herman, T. Nozaki, R. Stovel, D. Parks, and L. Herzenberg, "Nine color eleven parameter immunophenotyping using three laser flow cytometry," *Cytometry*, vol.36, no.1, pp.36-45, 1999.
- [7] M. Roederer, "Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats," *Cytometry*, vol.45, no.3, pp.194-205, 2001.
- [8] J. Tung, D. Parks, W. Moore, L. Herzenberg, and L.

Herzenberg, "New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data," *Clinical Immunology*, vol.110, no.3, pp.277-283, 2004.

- [9] J.W. Boardman, "Inversion of imaging spectrometry data using singular value decomposition," *Proc. 1989 International Geoscience and Remote Sensing Symposium (IGARSS'89)*, vol.4, Vancouver, British Columbia, the 12th Canadian Symposium on Remote Sensing, pp.2069-2072, 1989.
- [10] A. Hyvärinen and E. Oja, "A fast fixed-point algorithm for independent component analysis," *Neural Comput.*, vol.9, no.7, pp.1483-1492, 1997.
- [11] T.-W. Lee, A.J. Bell, and R. Orglmeister, "Blind source separation of real-world signals," *Proc. ICNN*, Houston, USA, 1997.
- [12] H. Park, H. Jung, T. Lee, and S. Lee, "Subband-based blind signal separation for noisy speech recognition," *Electron. Lett.*, vol.35, no.23, pp.2011-2012, 1999.
- [13] J.-F. Cardoso and A. Souloumiac, "Jacobi angles for simultaneous diagonalization," *SIAM J. Matrix Anal. Appl.*, vol.17, no.1, pp.161-164, 1996.
- [14] R Development Core Team, "R: A language and environment for statistical computing," in *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria, 2008. ISBN 3-900051-07-0.

(平成 20 年 7 月 1 日受付, 12 月 16 日再受付)



森下 壮一郎

2001 埼玉大・工学。2003 同大学院理工学研究科博士前期課程了。2005 年 11 月埼玉大学大学院理工学研究科博士後期課程中退。2005 年 12 月東京大学人工物工学研究センター価値創成イニシアティブ(住友商事) 寄付研究部門助手。2008 年 4 月同

部門特任助教。



横田 秀夫

1993 日本大学大学院農学研究科修士課程了。同年, 財団法人神奈川科学技術アカデミー樋口「極限メカトロニクス」プロジェクト研究員。1997 財団法人神奈川科学技術アカデミー先進メカトロニクス開発チーム研究員。1999 より理化学研究所。現在 VCAD システム研究プログラム生物研究基盤構築チーム・チームリーダー並びに同研究所生体力学シミュレーション特別研究ユニット兼務北海道大学大学院人間機械システムデザイン専攻客員助教授。博士(工学)。



橋口 博樹

1991 九大・理卒。1993 同大学院総合理工学研究科修士課程了。同年日立製作所入社。東京理科大学工学部助手, 新情報処理開発機構主任研究員, 目白大学経営学部専任講師を経て, 現在, 埼玉大学大学院理工学研究科講師。



浅間 一 (正員)

1984 東京大学大学院工学系研究科修士課程了。1986 理化学研究所化学工学研究室研究員補。同研究所研究員。副主任研究員を経て, 2002 年 9 月分散適応ロボティクス研究ユニットリーダー。2002 年 11 月東京大学人工物工学研究センター教授。日本機械学会フェロー。IEEE, 日本ロボット学会, 計測自動制御学会, 日本機械学会等各会員。工博(東京大学)。



畑野龍太郎

1977 京大・電気系学科学卒, 1979 同大学院修士課程了。1979 日産自動車入社。1997 から理化学研究所。現在情報基盤センター長, 兼 基幹研究所先端計算科学領域生体シミュレーション研究グループ生体シミュレーション研究チームチームリーダー, 次世代スーパーコンピュータ開発実施本部開発グループ・グループディレクタ。東京大学大学院客員教授。工博。



三島 健稔 (正員)

1968 明大・工学。1973 同大学院工学研究科博士課程了。工業技術院電子技術総合研究所主任研究官, 城西国際大学教授を経て, 現在埼玉大学大学院理工学研究科教授。理化学研究所客員研究員兼任。東京大学人工物工学研究センター客員研究員併任。

工博。