

氏名	森下 壮一郎
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記号番号	博理工乙第 182 号
学位授与年月日	平成 21 年 9 月 18 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	多重蛍光染色試料の定量的分析に関する研究—線形性判別と色素濃度推定—
論文審査委員	委員長 教授 三島 健稔 委員 教授 池口 徹 委員 教授 大澤 裕 委員 准教授 吉川 宣一

論文の内容の要旨

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各色素が発する蛍光が重なり合ってしまう、それぞれを峻別できない。また、蛍光強度は一般に色素濃度に対して線形であるとされているが、色素同士の相互作用により蛍光強度の非線形な変化が起きることもある。これらが多重蛍光の定量的な測定を困難にしている。

現在主に行われている多重蛍光の分析手法は蛍光の重なりの問題のみを扱っており、色素同士の相互作用を考慮しないモデルに基づいている。すなわち各色素由来の蛍光がそれぞれの濃度に対して線形であることを前提としている。具体的には、Bagwell らによる蛍光補正手法や鶴井らによる Linear Unmixing などが挙げられ、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構わないのであれば、これらの手法は有用であり、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に基づく手法でも定量的な測定が可能である。しかしながら色素の相互作用のメカニズムは完全には明らかになっていないので、色素の特性から線形性の有無を予測することはできない。そして多重蛍光の線形性は未だ十分に検証されていないために、現状では定量的な分析を行うことはできないのである。

本論文は以上の背景のもと、線形性の有無に関わらず多重蛍光の分析を定量的かつ効率的に行う手法の確立を目的として、次の 3 つの研究を遂行したものである。

まず、多重蛍光の非線形性を確認するために、複数の色素の濃度を設定した範囲で組み合わせて分光スペクトルを測定するシステムを構築して、濃度が既知の試料を用いた検量線法による線形性の評価を行った。試料には典型的な蛍光色素として Alexa-488, Alexa-532, FITC の 3 種を選択し、まず単一蛍光の線形性について確認したところ、いずれの色素の蛍光も濃度に対して線形であった。このことから、もし多重蛍光が線形に重ね合わされるならば従来手法でも定量的な分析が可能であることが言える。さらにこれらの色素を 2 つずつ組み合わせた 3 組について測定を行い、多重蛍光の線形性を評価した。蛍光色素の吸光スペク

トルと蛍光スペクトルの関係から、FITC と Alexa-488 の組み合わせでは色素の相互作用が小さく多重蛍光でも線形になるが、他の組み合わせでは非線形になると予想された。しかしながら、実際には Alexa-488 と Alexa-532 の組み合わせでは線形であったが、他の組み合わせで非線形であった。本研究で実施したような色素濃度を組み合わせた測定をすることなくこの結果を事前に予想することはできない。すなわち線形性の有無を知ることはできないから、線形であれば定量的な分析が可能であると言っても、既存手法による分析は定性的なものに過ぎないことが分かった。

次に、線形性の有無に応じた手法の選択により分析を効率よく行うために、測定データの分布から多重蛍光の線形性を確認できるものとして、独立成分分析を用いた線形性判別指標を見出した。これは、独立成分分析が線形モデルに基づいて観測データから信号源とその混合行列を推定する手法であることに着目したものである。多重蛍光の分離の問題においてもともと混合行列は既知であるので、独立成分分析により推定されたものと、これとの整合性を評価することで観測データの分布が線形モデルに従うか否かを判定できる。そして、この指標の妥当性を検証するために、計算機で簡単なシミュレーションをした上で実測データに適用して、検量線法による線形性評価の結果とこの指標による結果とが一致することを確認した。これにより事前に使用する色素濃度が既知の多重蛍光の測定をすることなく線形性を評価できるようになった。すなわち定量的分析について既存手法の適用可能性を判定できるようになった。

最後に、非線形性が現れる色素の組み合わせでも定量的分析を可能とするための非線形回帰分析に基づく蛍光補正手法を考案した。これはロジスティック回帰モデルに基づき回帰分析を行い色素濃度を推定するものであった。なお、分光スペクトルは共線性が強く、これを直接に説明変数にして回帰分析を施すことはできないので、前述の独立成分分析により得られた独立成分を説明変数とした。そしてこの手法の有用性を検証するために予測誤差を用いた評価を行い、非線形の場合でも定量的な分析が可能になることを示した。

以上により、多重蛍光染色試料の観察において、本研究で見出された線形性判別指標により線形性の有無を判別し、線形性がある場合では従来手法による定量的かつ効率的な分析を行い、線形性がない場合でも網羅的な測定をした上で本研究の手法を適用することで定量的な分析を行うことが可能になった。

論文の審査結果の要旨

学位論文審査委員会は、当該学位請求論文に関わる公聴会を平成 21 年 7 月 31 日に開催し、引き続き審査会を開催した。その発表を含む学位請求論文の審査結果について以下に要約する。

本研究は、分子生物学などの分野においてその代替手法は考えられないとさえ言われる蛍光染色分析技術について、従来曖昧のままに放置されていた適用条件を明確にし、更に多重蛍光染色分析の定量的測定法を実現した研究であり、本論文は 6 章と謝辞及び文献により構成されている。

第 1 章は、序論と題して研究の背景、目的および本論文の構成などについて述べている。すなわち、蛍光色素の光学的特性とその応用、その環境依存性、多重蛍光染色とクロストークの問題とその対応の歴史的経緯について詳述し、多重蛍光の定量的な分析手法開発の重要性を明確にしている。

第 2 章は多重蛍光分析と題し、多重蛍光染色試料の観察、蛍光観察の定式化、多重蛍光分析などについて述べている。すなわち、先ず蛍光観察を定式化し、散乱光や透過光を除去し蛍光のみを観察する手法などについて述べ、次いで多重蛍光の線形結合モデルの立脚している線形性の検証は未だなされていないと指摘している。

第 3 章は多重蛍光の線形性の確認と題して、申請者の自作した自動分注装置により得た試料を用いて各チャンネルに対する単一蛍光の線形性、濃度に対する単一蛍光の蛍光強度の線形性、および複数の蛍光の重ね合わせの線形性について実測し、単一蛍光の場合の線形性を検証し確認したが、多重蛍光の場合は必ずしも線形性は認められないとしている。

第 4 章は多重蛍光の線形性評価指標と題して、蛍光スペクトルのみから色素濃度やその混合比が未知の試料の線形性を判定する指標を導入し、シミュレーション実験によりその妥当性を検証したとしている。この指標によりモデル選択の妥当性を容易に判定できること、および簡単化されたにも拘らず前章の実験と同等の結果を得られることを述べている。

第 5 章は非線形な多重蛍光の定量分析と題して、第 4 章の手法により非線形であると判定された場合に適用できる色素濃度推定法を示している。これは非線形回帰モデルを用いた回帰分析によるもので、実測値による評価の結果、線形モデルを仮定できない場合に於いても SN 比に対して十分の推定精度を得られることを確認できたこと、またこの手法は線形モデルに適用した場合も従来手法と同等の予測精度を得たことを示している。

第 6 章は結論である。申請者は、多重蛍光の定量的分析を可能とするために、

1. 色素濃度の組み合わせを網羅的に測定する自動装置を作成したこと
2. 濃度が既知の試料を用いた検量線法により、多重蛍光は線形性を前提できる場合と非線形の場合があることを明らかにしたこと
3. 蛍光スペクトルから多重蛍光の線形性を確認できる独立成分分析を用いた線形性判別指標を導入し、シミュレーションと実測値による計算により、その有用性を示したこと
4. 非線形回帰分析に基づく蛍光補正手法を考案し、非線形の場合でも定量的な分析が可能になったこと

を以って結論としている。

以上に加えるに、謝辞と付録（自動分注装置の精度および精度向上）並びに参考文献が付されている。

蛍光染料が特定の物質や色素の存在を示すマーカーとして、また現象生起の有無のプロープとして用いら

れるに至り、例えば遺伝子の発現プロセス、カリウムイオンやカルシウムイオン濃度の可視化と神経伝達のメカニズムなどを知る手掛かりが得られるなど、広く生物学・医学の先端的研究分野では必須の技術となっていることは周知の通りである。

しかし、蛍光染色が顕微鏡下の観察を容易にし、人間の高度なパターン認識能力による定性的な解釈の範囲で十分役立っていたこと、およびその解決の困難さのために、多重蛍光染色のクロストーク問題などは、Loken、Roederer、Bagwell、Bigos 等の先駆的研究に於いても放置されていたのである。

申請者はこの難問に対して、まず色素濃度の組み合わせを網羅的に測定する自動装置を作成し、濃度が既知の試料の検量線法を用いて多重蛍光は線形、非線形のいずれの場合もあることを検証している。次に、独立成分分析を用いて蛍光スペクトルから多重蛍光の線形性判別指標を導入することに成功している。そして、シミュレーションと実測値による計算により同指標の有用性を明らかにした。これによって多大の労力を要する色素濃度の組み合わせを網羅的に測定することなく多重蛍光の線形性を評価する途が拓かれ、同時に既存手法の適用範囲も明らかにできることを示した。

更に、非線形回帰分析に基づき、非線形性を持つ色素の組み合わせに対して定量的分析を可能とする蛍光補正手法を考案している。これは、独立成分分析とロジスティック回帰モデルを用いた回帰分析により分光スペクトルから色素濃度を推定する関数を得ることによって実現したのである。

以上を要するに、本研究は曖昧のまま線形モデルを仮定していた蛍光染色分析に線形性判別指標を導入し、更に非線形モデルに対応する実効ある手法を考案したのである。

これにより、人間の高度のパターン認識能力と忍耐力とに依存していた定性的蛍光染色分析を定量的に扱うことを可能とし、情報処理装置による大量のデータ取得と安定した定量的処理への途を拓いたのであって、生物・医学の分野をはじめ、理工学の広範の分野にもたらす貢献は計り知れないものがある。

この他、申請者は、パターン認識とその応用に関する学術誌論文6（内欧文4）編、IEEE等の国際会議論文13編、その他の刊行物37編、特許出願3（内米国1）件を数えるとともに、東京大学助教や学会の幹事として活発な研究教育活動を行っている。

以上により、当学位審査委員会は全員一致して博士(工学)の学位を授与するに値するものと判断し、合格とした。