

多数の細胞の多色・分子振動イメージング法を開発 ～細胞スクリーニングや品質評価の研究を加速～

1. 発表者：

小関 泰之（東京大学大学院工学系研究科電気系工学専攻 准教授）

合田 圭介（東京大学大学院理学系研究科化学専攻 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆高速波長切り替えの可能なレーザー光源を用いて、複数周波数における細胞内分子の分子振動を検出し、マイクロ流体チップ中を流れる細胞を毎秒 140 細胞の速度で多色画像化する技術を開発した。
- ◆本技術で得られた細胞画像に対して深層学習を適用することで、従来必要とする蛍光標識を用いずに、藻類細胞、血液細胞、がん細胞を分類することに成功した。
- ◆本技術は、物質生産効率の高い細胞のスクリーニング、再生医療に向けた細胞品質評価などへの応用展開が期待される。

3. 発表概要：

東京大学大学院工学系研究科電気系工学専攻の小関泰之 准教授、鈴木祐太 元学振特別研究員、小林航也 元修士課程学生、東京大学大学院理学系研究科化学専攻の合田圭介教授、脇坂佳史 元博士課程学生らは、東京大学、科学技術振興機構、名古屋大学、中央大学、がん研究所、筑波大学、理化学研究所、台湾国立交通大学を含む共同研究グループとともに、細胞内生体分子を光学的に検出する誘導ラマン散乱(stimulated Raman scattering, SRS)顕微法(注1)において、高速波長切り替えの可能なレーザー光源を適用することで、4 つの分子振動周波数における SRS 信号を高速に取得する技術を開発しました。また、本技術をマイクロ流体チップによる細胞位置制御技術と組み合わせることにより、1秒あたり最高 140 細胞の多色 SRS 画像を取得し、数千～数万個の細胞内に含まれる脂質や多糖類などを蛍光標識せずに画像化する技術の開発に成功しました。本技術によって多数の細胞の分子振動画像をビッグデータとして取得することが可能になるとともに、人工知能の一種として注目される深層学習を用いることで、微細藻類細胞、血液細胞、がん細胞の多色 SRS 画像を解析し、分類が可能であることを実証しました。本技術によって、膨大な数の細胞のひとつひとつの細胞に含まれる生体分子の無標識画像化が可能になり、物質生産効率の高い細胞のスクリーニング、再生医療に向けた細胞品質評価などへの応用展開が期待されます。本研究は、内閣府総合科学技術・イノベーション会議が主導した革新的研究開発推進プログラム(ImPACT)の合田圭介プログラム・マネージャーの研究開発プログラムの一環として行われたものです。

本研究成果は、2019年7月19日（米国東部夏時間）に *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*（PNAS、米国科学アカデミー紀要）のオンライン版で公開されました。

4. 発表内容：

(1) 研究の背景・先行研究における問題点

生物学、医学、薬学、代謝工学などのさまざまな分野において、多数の多様な細胞ひとつひとつの化学的・形態的特徴を計測することが求められています。そのための技術として、流体

中の細胞を高速撮像するイメージング・フローサイトメトリー（注 2）が注目されています。しかし、イメージング・フローサイトメトリーは生体分子を識別するために蛍光標識を必要とし、蛍光標識に伴う細胞毒性があったり、標識の困難な生体分子が存在するなどの課題がありました。細胞を蛍光標識せず、細胞内分子を光学的に検出することで細胞の化学的・形態的情報を得る手法として、誘導ラマン散乱(SRS)顕微法が知られています。しかし、SRS 顕微法は単一周波数における分子振動情報を得る上では高速であるものの、複数の分子を検出するためにはレーザーの波長を切り替える必要があり、その間に細胞が動いてしまうと計測ができないため、SRS 顕微法をイメージング・フローサイトメトリーへ適用することは困難でした。また、流体中の細胞に対して、複数周波数における分子振動を計測する技術も複数の研究グループから報告されていますが、細胞中の一点での計測にとどまっており、形態的特徴を画像情報として得ることはできていませんでした。

(2) 研究内容

本研究では、発表者らが開発してきた誘導ラマン散乱(SRS)顕微法を、高速性を保ちつつ多色化することで、細胞内の生体分子の複数周波数の分子振動を直接光で計測して画像化する、SRS イメージング・フローサイトメトリーを開発しました。本技術の模式図を図 1A に示します。高速波長切り替え可能なパルス光（ストークス光）と、固定波長のパルス光（ポンプ光）を同期させて使用します。ストークス光とポンプ光の出力光を合波し、走査ミラーによってビーム走査を行ったのちに、マイクロ流体デバイス中のマイクロ流路内部に集光します。また、細胞をマイクロ流路に導入し、ピエゾ素子によって音響定在波を発生させることで細胞位置を流路中心に収束させます。細胞が集光部を通過する際、集光点に存在する生体分子の分子振動周波数が、ポンプ光とストークス光の光周波数の差と等しいとき、SRS が生じ、ポンプ光に強度変化が生じます。この強度変化を検出することで、集光点に所望の分子がどれだけ存在するかを計測します。高速波長切替えストークス光を用いることで、210 ナノ秒の短時間に 4 つの分子振動周波数における SRS 信号を取得することが可能となりました。この信号取得速度は、従来の 3 色以上の SRS 顕微鏡と比較して 10 倍以上高速であり、波長切り替え時間内における細胞の動きを無視できるとともに、細胞の画像情報を取得することが可能です。具体的には、細胞が集光部を通過しながら、細胞の流れに直交する方向に集光点を走査することで、細胞の 2 次元情報を取得します。

本技術の要となる高速波長切り替えパルス光源の構成を図 1B に示します。はじめに、広帯域な光スペクトルを有する光パルス列を発生し、これに時間ゲートを施して 8 個の光パルスごとに 2 つの光パルスのみを抽出します。この光パルスを回折格子に入射して波長ごとに進行方向を変化させ、所望の 4 つの波長成分を抽出します。抽出した光パルスに対して、異なる長さの光ファイバーを伝搬させることで異なる時間遅延を与えて、ファラデーミラーで折り返し、回折格子で再び合波します。このようにして、2 パルスごとに波長が異なる光パルスを発生します。図 1C に示すように、高速波長切り替えパルス光源、ポンプ光源、SRS フローサイトメーターを光学除震台に設置し、統合しました。

SRS イメージング・フローサイトメトリーを用いることで、毎秒 2 センチメートルの高速流体中の物体に対して、4 つの分子振動周波数に対応する SRS 画像を取得することができます。図 2A に、3 種類の樹脂粒子の 4 つの分子振動周波数における SRS 画像を示します。分子振動周波数ごとの信号強度が樹脂材料によって異なることが見て取れます。図 2B に示すように、分子振動周波数ごとの信号強度は、各材料の分子振動スペクトルとよく一致することが確認で

きます。この分子振動スペクトルの違いを用いることで、図 2C に示すように、3 種類の画像に分離し、カラー画像化することができます。

本手法の生物学・医学への応用可能性を示すために、本技術を用いて、微細藻類細胞、ヒト由来血液細胞、ヒトがん細胞のイメージングを行い、最高毎秒 140 細胞のスループット（注 3）で多数の細胞(N~10,000)を無標識計測することに成功しました（図 3A、C）。さらに、得られた画像に対して深層学習を施した結果、異なる培養条件の微細藻類を分類したり、ヒトがん細胞、ヒト白血球を分類することに成功しました。分類精度として、微細藻類で 99%以上、ヒト細胞で 93%以上の値が得られています。また、深層学習で得られる特徴量を 2 次元平面に表した t 分布型確率的近傍埋め込み(t-SNE)プロット（注 4）を図 3B、D に示します。細胞種ごとに特徴量空間で集団を形成している様子が見て取れます。これは、画像情報から分類に必要な特徴を抽出できたことを表しています。

(3) 今後の展開

今回開発した細胞計測手法は、以下のように様々な応用が考えられます。(a) 細胞による物質生産における生産性評価。例えば、細胞ひとつひとつに含まれる特定の生体分子の量や空間分布を詳細に解析することで、生産性向上の手がかりが得られると期待されます。(b) 再生医療用の細胞の品質管理。特に、蛍光標識を用いることなく、多数の細胞のひとつひとつの細胞の分化状態を調べることができれば、再生医療にとって有用な技術になると期待されます。(c) がん細胞の研究。従来のがん細胞マーカーによる計測に加えて、本手法を用いてがん細胞を計測することで、細胞内部の脂質の不飽和度（注 5）や代謝活動など、分子振動を検出することで初めて得られる生体分子情報の計測が可能となり、がん細胞に関する知見が深められることが期待されます。

さらに、本技術を細胞分取技術（注 6）と組み合わせることができれば、本技術で特定の性質を有する細胞を見出し、その細胞に関する詳細な生化学的解析を行うことができるようになり、本技術の応用可能性が大きく広がることが期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*」

（PNAS、米国科学アカデミー紀要 オンライン版：7月15日の週）

論文タイトル：Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering

著者： Yuta Suzuki, Koya Kobayashi, Yoshifumi Wakisaka, Dinghuan Deng, Shunji Tanaka, Chun-Jung Huang, Cheng Lei, Hanqin Liu, Yasuhiro Fujiwaki, Sangwook Lee, Akihiro Isozaki, Yusuke Kasai, Takeshi Hayakawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, Kenichi Koizumi, Hiroshi Tezuka, Mary Inaba, Kei Hiraki, Takuro Ito, Misa Hase, Satoshi Matsusaka, Kiyotaka Shiba, Kanako Suga, Masako Nishikawa, Masahiro Jona, Yutaka Yatomi, YalikulYaxiaer, Yo Tanaka, Takeaki Sugimura, Nao Nitta, Keisuke Goda, and Yasuyuki Ozeki*

DOI 番号：10.1073/pnas.1902322116

アブストラクト URL：www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1902322116

6. 問い合わせ先：

<研究に関すること>

東京大学 大学院工学系研究科電気系工学専攻

准教授 小関 泰之 (オゼキ ヤスユキ)
〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

東京大学 大学院理学系研究科化学専攻
教授 合田 圭介 (ゴウダ ケイスケ)
〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

<報道担当>

東京大学 大学院工学系研究科・工学部 広報室

東京大学 大学院理学系研究科・理学部 広報室

7. 用語解説：

注1 誘導ラマン散乱(SRS)

光周波数が異なる 2 つの光と分子の相互作用のひとつ。2 つの光のうち高周波側の光はポンプ光、低周波側の光はストークス光と呼ばれる。ポンプ光とストークス光の光周波数の差が、分子構造で決まる分子振動周波数と一致するとき、ポンプ光が減衰し、ストークス光が増幅される。これらの効果を SRS と呼ぶ。近年、顕微鏡下で SRS を検出することで試料の分子振動情報をもとに画像化を行う SRS 顕微法の研究が盛んに進められている。

注2 イメージング・フローサイトメトリー

多数の細胞を流路中に流し、細胞ひとつひとつの顕微鏡画像を高速に取得し、細胞の計測を行う手法。透過像や蛍光画像を高速取得することで得られる大量の画像から、細胞内の生体分子の空間分布や細胞間相互作用などを調べることができる。

注3 スループット

単位時間あたりに計測する細胞の数。細胞は流路中に等間隔で流れるわけではなく、確率的に流路に導入される点に注意が必要である。本研究での最高のスループットである毎秒 140 細胞の条件において、細胞間距離の平均値は[毎秒 2 cm]/[毎秒 140 細胞] = 0.14 mm であるが、実際の細胞間距離はこの値より狭い場合も広い場合もある。本研究では計測した細胞数と計測時間からスループットを算出した。

注4 t 分布型確率的近傍埋め込み(t-SNE)プロット

t-SNE は多次元のデータから低次元の特徴量を抽出する方式であり、t-SNE の結果を散布図として表したものを t-SNE プロットという。本研究では深層学習が出力する多次元データに t-SNE 処理を施し、高次元での特徴をある程度保持したまま 2 次元平面上に各細胞集団の分布を表示している。t-SNE プロットは細胞集団の識別における分離度を視覚的に表現する上で便利である。

注5 不飽和度

脂質の炭化水素鎖に含まれる二重結合の数を不飽和度といい、脂質の性質は不飽和度によって大きく変化する。また、細胞種や細胞の状態によって、細胞内脂質の不飽和

度が異なることが知られている。SRS 顕微法は不飽和度の計測手段として注目されている。

注 6 細胞分取技術

不均一な細胞集団のうち、特異的な性質（表現形）を有する細胞のみを分離する技術。分取した細胞に対して、細胞内代謝物、タンパク、遺伝子等の解析を行うことで、特定の表現形の細胞のみの生物学的性質を詳細に調べることができる。

8. 添付資料：

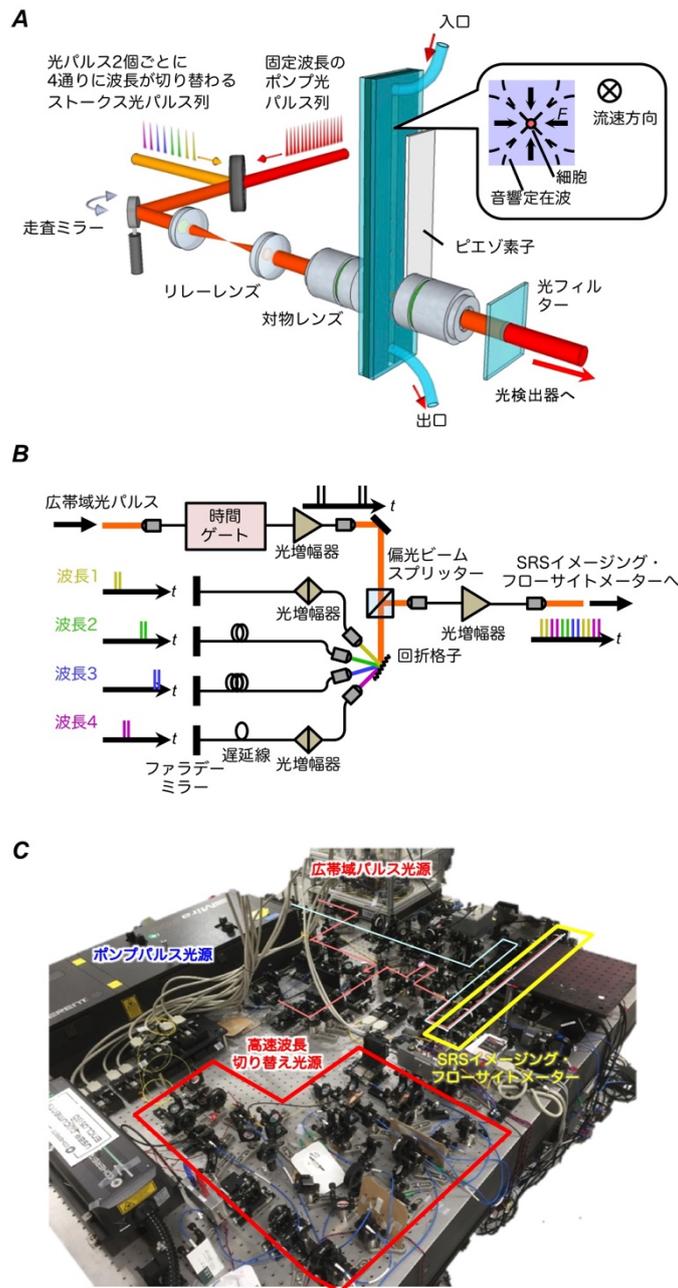


図1 誘導ラマン散乱(SRS)イメージング・フローサイトメトリーの構成。A: 全体構成図。B: 高速波長切り替え光源の構成図。光パルス列に時間ゲートを施し、回折格子で分光して4つの波長成分を抽出する。長さの異なる光ファイバーからなる複数の遅延線を用いて、波長ごとに異なる時間遅延を与えたのちに合成することで波長切り替えパルスを生成する。C: 実験系の外観。

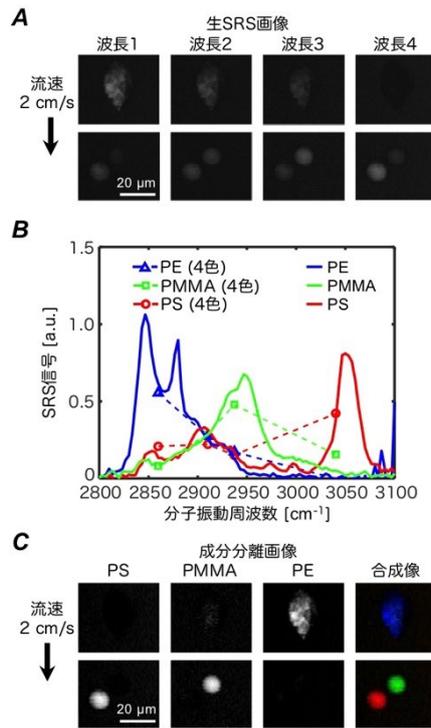


図2 SRS イメージング・フローサイトメトリーによる4色分子振動イメージング結果。A: 4色SRS画像。B: SRS信号強度と各材料の分子振動スペクトル(実線)の比較。PE: ポリエチレン、PMMA: アクリル、PS: ポリスチレン。C: Aの成分分離画像およびカラー合成画像。

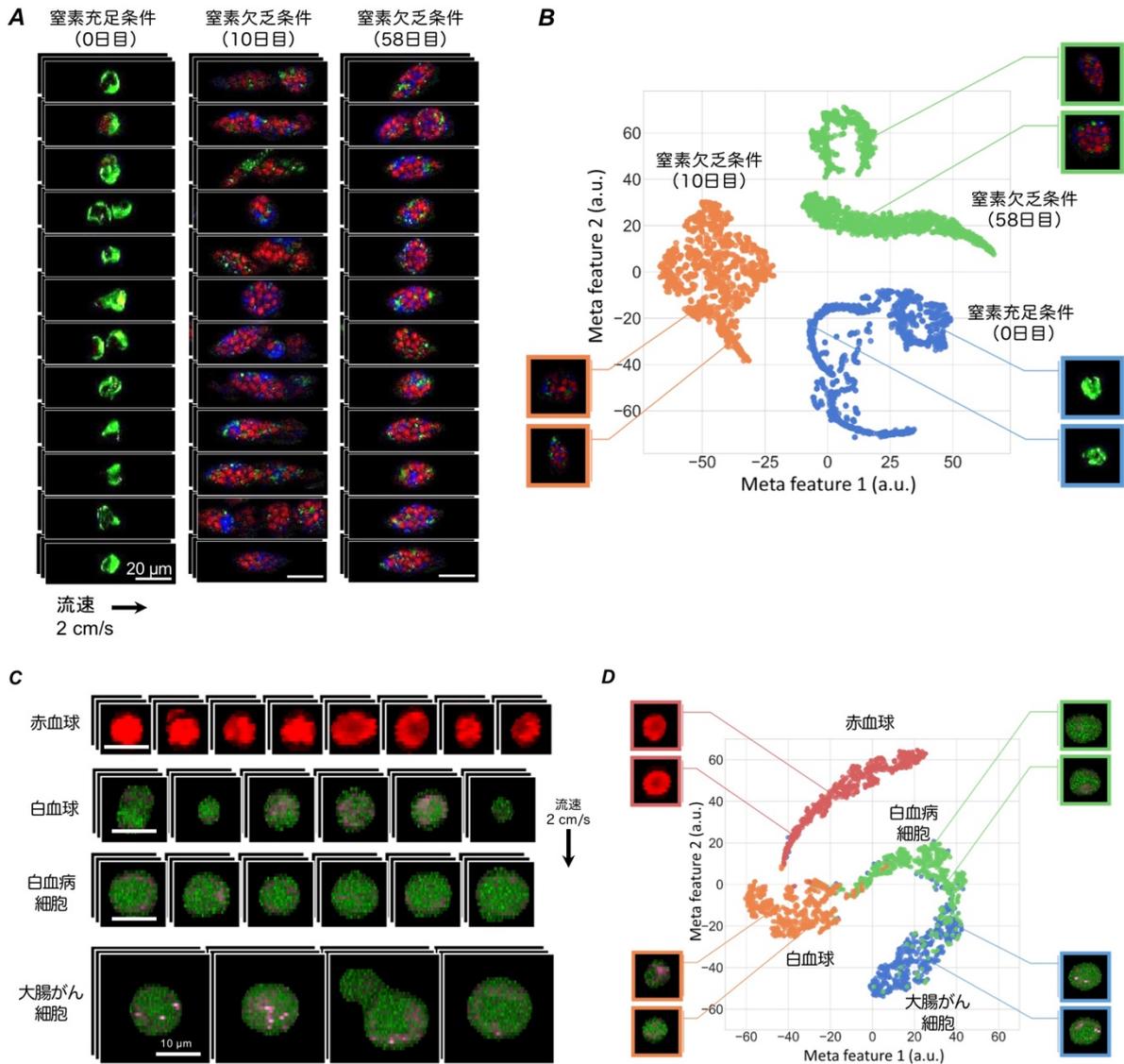


図3 SRSイメージング・フローサイトメトリーによる細胞計測結果。A: 微細藻類ユーグレナグラシリスのSRSカラー合成画像。培養条件を窒素充足条件(0日目)、窒素欠乏条件(10日目)、窒素欠乏条件(58日目)の3通りとした。赤:多糖類、青:脂質、緑:葉緑素。B: 深層学習により抽出した微細藻類のSRS画像の特徴の2次元t-SNEプロット。各条件の細胞が特徴空間で集団を形成する様子が見てとれる。C: 赤血球、白血球、白血病細胞、大腸がん細胞のSRS画像。赤血球は赤色で表示し、それ以外の細胞は緑:細胞質、赤:脂質で表示した。D: 深層学習により抽出した血球およびがん細胞画像の特徴の2次元t-SNEプロット。各細胞が特徴空間で集団を形成する様子が見てとれる。(カラー画像が必要な場合は、小関宛にお問い合わせください。)