

# 化学者にもできる レシオメトリック蛍光イメージング

仁子 陽輔

## 1 はじめに

蛍光イメージングは、細胞や組織といった生体試料の構造や機能を、低侵襲的かつ高い時空間分解能で観察できることから、生物学・医学研究などにおいて不可欠な技術となっている。中でも、ここ10年ほどでレシオメトリック蛍光イメージングを駆使した論文を頻繁に見るようになった<sup>1)2)</sup>。本技術を用いることで、細胞の構造を可視化するのみならず、細胞内のpH<sup>3)</sup>、膜極性<sup>4)</sup>、温度<sup>5)</sup>などの定量的な解析が可能になる(次項にて詳述)。2022年以降、Analytical Chemistry (ACS)でも同技術に関連する論文が急速に増えており、キーワード検索に基づけば年間300報を超える勢いである(2015年には約50報、2010年には10報未満であった)。したがって、同技術はもはや本誌の読者諸氏にとっても「知っておいた方がいい」ものなのかもしれない。この「創案と開発」では、本イメージング技術に興味がある化学者、そして査読する側の化学者の双方にとって有益となるような技術情報を提供できたらと思う。

## 2 レシオメトリック蛍光イメージングとは

レシオメトリック蛍光イメージング(以下、レシオイメージング)とは、解析領域中のプローブから放射された蛍光を二つの波長領域(例:500~560 nmの緑(G)チャンネル、570~650 nmの赤(R)チャンネル)で同時に検出し、両チャンネルの輝度比(G/R値)を計算して疑似カラーで画像を生成(レシオ画像)する手法である(図1 a)。例えば、pHが低下するにつれて蛍光波長が長波長シフトするような蛍光プローブがあると(図1 b)、GかRのどちらか一方のチャンネルの蛍光強度を眺めるだけでは、その増減がpHの変化によるものなのか、解析領域中のプローブの濃度変化によるものなのか区別が付きにくく、定量的な議論が困難になる。しかし、G/R値は、同じ画像取得条件であればプローブの濃度やレーザーパワーに影響を受けずに一定となる(ただ

し、蛍光プローブの濃度消光やチャンネル内に輝度飽和が生じている場合は除く)。そのため、あらかじめpHとG/R値の関係についてキャリブレーションを行うことで、試料中の局所的なpHの解析に応用できる(図1 c)。

この例のように、レシオイメージングでは、周囲環境(pH<sup>3)</sup>、誘電率<sup>4)</sup>、粘度<sup>4)</sup>、温度<sup>5)</sup>、イオン濃度<sup>6)</sup>など)に応じて蛍光スペクトルを変化させるような蛍光プローブが使用される。低分子のプローブもあれば<sup>4)</sup>、二種類の色素を組み合わせて環境応答性を実現したマルチ色素型のものや、ナノ粒子型のものも存在する<sup>6)</sup>。

レシオイメージング自体は古くからあるが、なぜ今、活発化したのか? 筆者としては、2010年以降に顕現した論文の再現性クライシスやAI解析の進展などといった背景により、画像データにおける定量性の要求がシビアになったことや、環境応答性プローブの設計指針

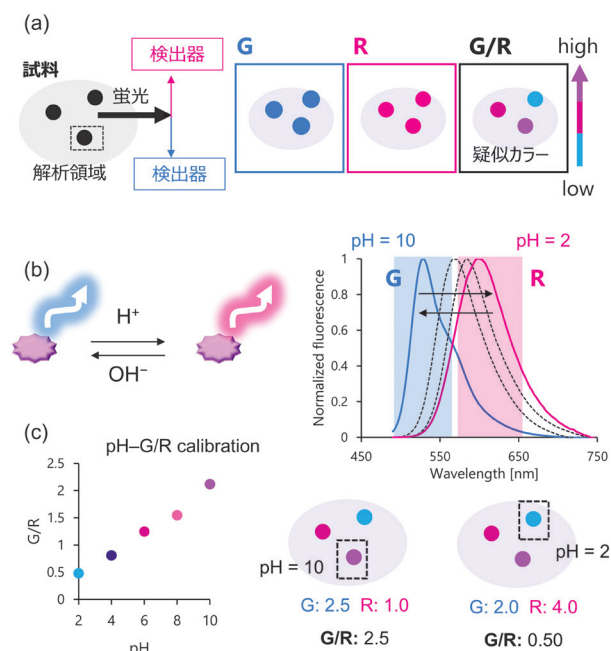


図1 レシオイメージングの概略

(a) 二つの蛍光検出チャンネルからレシオ画像を生成する基本原理。(b) レシオイメージングに適した蛍光プローブの一例(pH応答プローブ)。(c) レシオ画像を用いた定量解析の概念図。

が確立されてきたことが大きな要因だと推測している。特に後者は、化学者のイメージング分野への参入障壁を大きく下げることにつながったように感じている。例えば、 $\pi$ 共役系分子に電子ドナー基やアクセプター基を導入したいいわゆる「プッシュ・プル」型色素の多くは、周囲環境の極性（誘電率）に応じた蛍光ソルバトクロミズムを示す。実際、この設計指針にしたがって開発された蛍光プローブは非常に多い<sup>4)</sup>。

### 3 初心者向けの実演

筆者は、2015年くらいからレシオイメージング用プローブの開発に携わってきたが、自身で蛍光顕微鏡を本格的に扱い始めたのは比較的最近である。正直なところ、当初は楽勝だと考えていた（「細胞を染色し、2波長領域で画像取得し、比をとるだけで、定量性がありしかも何となく映えるデータが得られる」とか、ついついそんな甘い考えを抱いてしまうのは恐らく筆者だけではないはずだ）。しかし、いざ自分で実践してみると、なかなか思うようにはいかない。実際、一般の化学者よりは蛍光顕微鏡に馴染みのある生物系研究者であっても、レシオイメージングとなると同様の壁に直面している例は少なくない。近年の蛍光顕微鏡や解析ソフトはUIが高度に洗練されており、専門的な知識がなくとも一定の結果が得られてしまう。その一方で、画像取得条件や画像処理の前提を十分に吟味しないままでも一見もっともらしいレシオ画像が得られてしまうため、かえって画像解析の基本的な注意点が見落とされやすい状況が生じているように思われる。これは、筆者のような非プロこそ、注意を要するところである。そこで以下では、筆者の研究室で実際に行っているレシオイメージングのプロセスを紹介する。我流の部分も多く、イメージングのプロには物足りなさや厳密性に欠ける点があるかもしれないが、その点はどうかご容赦いただきたい。

#### 3.1 画像取得

図2は、筆者らが開発した蛍光プローブを用いてヒト腎がん細胞（Caki-1）を染色して得られた画像である。これらの画像は共焦点レーザー顕微鏡（Nikon AX）により取得した。共焦点レーザー顕微鏡は、Z軸方向に高い空間分解能を有し、断層画像の取得に適しているためレシオイメージングに広く用いられている。これらの画像は、1024×1024ピクセル（0.173  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ）で構成されており、各ピクセルには背景光と蛍光シグナルの総和である輝度値が割り当てられている。

ここで使用された蛍光プローブは上述したプッシュ・プル型色素であり、周囲極性が高いほど蛍光が長波長側へシフトする。細胞膜（コレステロール、飽和脂質リッチ）のような低極性環境下ではGチャンネル（図2a）での信号が強くなり、逆に小胞体膜（不飽和脂質リッチ）

のような高極性環境下ではRチャンネル（図2b）の信号が強くなる。図2cおよび図2dは、それぞれGおよびRチャンネルを合成した画像とその拡大画像であり、これらを概観するだけでも、「細胞膜付近はGが強い、すなわち極性が低い」といった定性的な考察が可能である。

画像取得の際には、対物レンズやピンホールの選択に

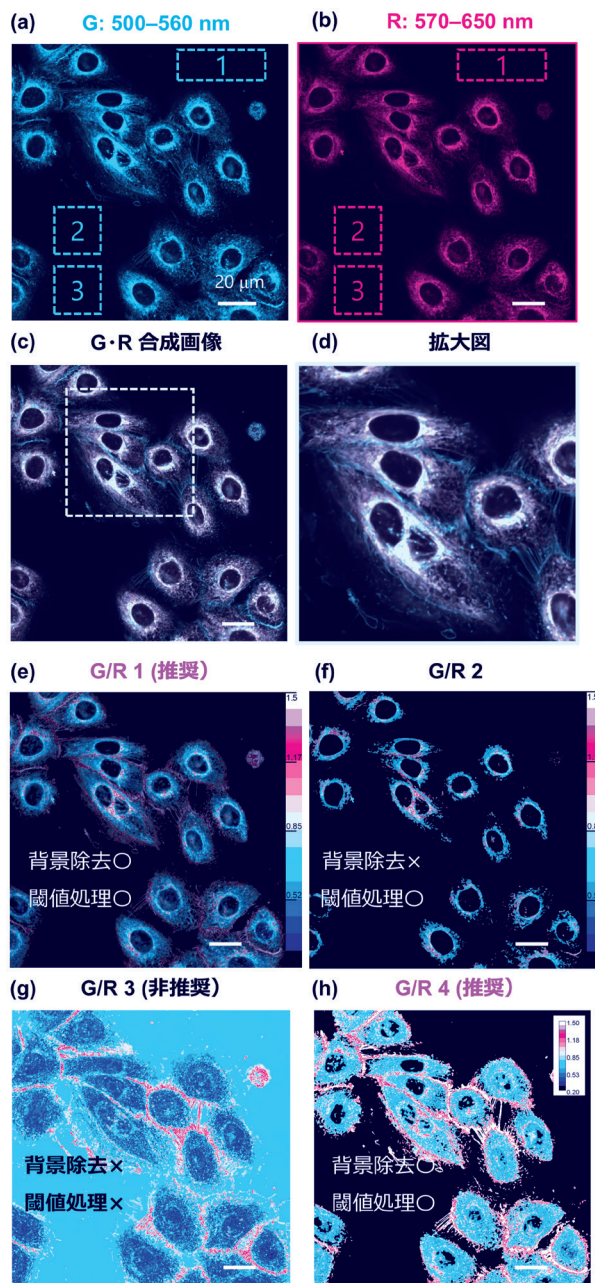


図2 レシオ画像生成の実演

プッシュ・プル型蛍光プローブで染色されたCaki-1細胞の共焦点顕微鏡画像。(a) Gチャンネル、(b) Rチャンネル像。点線で示した領域が細胞外領域。(c) GおよびRチャンネルの合成画像と(d) その拡大画像。(e) 背景除去および閾値処理を行って生成したレシオ画像（推奨）。(f) 背景除去を行わず、閾値処理のみを施して生成したレシオ画像。(g) 背景除去および閾値処理のいずれも行わずに生成したレシオ画像。(h) (f) と同一条件で生成したレシオ画像（推奨）。(g) および(h) のレシオ画像は、いずれもFijiの標準機能のみを用いて生成。

加え、ゲイン（検出器感度）やレーザーパワーを設定する必要があるが、顕微鏡操作に不慣れな研究者にとってはこの段階で判断に迷うことが多い。ゲインとレーザーパワーはいずれも増大させることで蛍光シグナルの強度を高めることができるが、ゲインを過度に上げるとノイズの増大を招き、レーザーパワーを過度に上げると蛍光プローブの褪色が加速する。筆者らの場合は、まずゲインを中程度に設定する。多くの顕微鏡では、ノイズや直線性の観点から推奨されるゲインの上限が示されているため、それを一つの目安とした。この状態でレーザーパワーをあげ、GもしくはRのいずれかの信号が飽和した時点で、もう一方のチャンネルについてもゲインをあげ、両チャンネルともに意図的に飽和させた。その後、レーザーパワーを適切な範囲に落とし、両チャンネルとも信号が飽和一步手前になるよう調節した。こうすることで、両チャンネルでの信号強度を可能な限り高く保ちつつ、一方の信号が過度に弱くなる状況を避けることができ、結果としてG/R値がおむね0~2程度の範囲に収まる。なお、これは両チャンネルとも同じレーザーパワーで画像取得する場合を想定した方法であり、これしか方法がないわけではないことに留意されたい。

### 3.2 画像処理

得られた画像データは、ImageJを基盤として開発されたオープンソースの画像解析ソフトであるFijiを用いて解析した<sup>7)</sup>。画像データの拡張子は顕微鏡メーカーによって異なるが、多くの場合、Fiji上で問題なく扱うことができる。解析に先だって、得られた画像はまず16-bitから32-bit (float形式)に変換し、TIFF画像として保存した。16-bit画像ではピクセル強度が整数として扱われるため、G/Rのような比を計算すると、小数点以下の情報が保持されない。このため、浮動小数点数を扱うことができる32-bitへの変換が必要となる。

以下に、上記のTIFF画像からレシオ画像を得るための画像処理手順を示す。Fijiの具体的な操作方法については、関係書籍やインターネット上に数多くの情報が存在するため、ここでは割愛する。また、これはオープンソースソフトの利点の一つであるが、操作方法に関する疑問の多くは生成AIの活用によって容易に解決できる。

#### 3.2.1 背景およびノイズの評価

図2で使用されている蛍光プローブは細胞外では無発光である。そのため、細胞外領域のピクセルに割り当てられた輝度値は、蛍光シグナルとは無関係な背景光に由来するとみなすことができる。そこで、複数の細胞外領域から、ピクセル数を考慮して、背景光の加重平均値（バックグラウンド： $B$ ）とプールされた標準偏差（ノイズ： $N$ ）を求める。図2で言うと、点線で囲った部分が細胞外領域であり、例えばGチャンネルでは $B$ および

$N$ はそれぞれ51, 1.7と算出された。

#### 3.2.2 背景除去

$B$ の一部を残すように減算処理を行う。図2を例にすると、GおよびRチャンネルの各ピクセルから45程度減算することで10%程度の $B$ を残した。背景光の成分を完全に除去しようとするとは過補正となる場合があるため注意が必要である。

#### 3.2.3 閾値処理（解析ピクセルの選別）

シグナルバックグラウンド比 ( $S/B$ )  $> 20$ 、かつシグナルノイズ比 ( $S/N$ )  $> 50$ を満たすよう、一定値未満の輝度をもつピクセルを解析対象外領域 (NaN)として指定する。図2を例にすると、上記の背景除去後はGおよびRチャンネルのいずれにおいても背景光強度が5程度になる。したがって、輝度値が110未満のピクセルをNaNとすれば、 $S/B > 20$ かつ $S/N > 50$ が満たされる（※ピクセルの輝度値から $B$ を引いた値が $S$ である）。

#### 3.2.4 レシオ画像の生成

上記のような背景除去と閾値処理をして得られた画像を基にG/R値を算出し、ヒートマップとして疑似カラー表示した画像を生成する（図2e）。

手順3.2.3において $S/B > 20$ 、 $S/N > 50$ としているのは、レシオ解析の信頼性を担保するためである。 $S/B$ の値が低すぎる場合、ピクセルに割り当てられた輝度値に占める背景成分の寄与が大きくなり、その結果、G/R値が1に近づく方向へ圧縮される。GおよびRいずれにおいても $S/B$ が20あれば、背景成分がピクセル輝度値の約5%以下になり、G/R値に与えるバイアスは5%以下程度に抑えられるとみなすことができる。一方、G/R値のゆらぎは各チャンネルの $S/N$ に依存する。両チャンネルのノイズが独立であると仮定すると、誤差伝搬の近似により、G/R値の相対誤差は次式で表される。

$$\frac{\sigma_{G/R}}{G/R} = \sqrt{\left(\frac{1}{S/N_G}\right)^2 + \left(\frac{1}{S/N_R}\right)^2}$$

ここで、 $\sigma_{G/R}$ はG/R値の標準偏差、 $S/N_G$ 、および $S/N_R$ はそれぞれGおよびRチャンネルにおける $S/N$ を指す。両チャンネルとも $S/N$ が50であれば相対誤差は2.8%程度となり、G/R値が1.0, 1.5のピクセルにおいて絶対誤差はそれぞれ $\pm 0.028$ ,  $\pm 0.042$ となり、G/R値の0.1程度の変化をおおむね有意とみなすことが可能となる。なお、 $S/B > 20$ 、 $S/N > 50$ というのは、あくまで筆者らの研究室における目安である。後述するように、多くの論文ではこの点が十分に記載されていないため、この目安が高水準なのかどうかについては客観的に判断しかねるところがある。間違いなく言えるのは、使

用している顕微鏡 (PMT, 対物レンズなど) や蛍光プローブ (輝度: モル吸光係数  $\times$  蛍光量子収率) の性能次第で, 適用できる  $S/B$  および  $S/N$  が大きく変わるということ, また, 観察したい現象や蛍光プローブの色調変化特性によって, 要求される  $G/R$  値の相対誤差レベルが変わってくるということである. さらに注意したいのは,  $S/N$  を稼ぐために閾値処理を過度に適用すると,  $G/R$  分布が歪む可能性がある点である (例えば,  $G/R$  が高いピクセルが低輝度域に集中し, 閾値処理により除外された場合など). 正確な  $G/R$  値を求めるのか, 分布を評価するのに応じて, 閾値設定は柔軟に設定する必要がある.

なお, 画像取得におけるアベレーシングや, 画像処理段階における平滑化・メディアンフィルタなど, ノイズを低減する処理を加えることもある. 前者は比較的問題なく適用できることが多いが, 後者は定量解析を目的とする場合には慎重な適用が求められる. これらの処理は空間的に近接したピクセルの情報を混合する操作であり, 局所的な輝度比の差異が平均化する効果をもつ. その結果,  $G/R$  値の分布が人工的に狭まり, 定量的なばらつきが過少評価される可能性がある.

もう一点, 重要な点として, 画像取得の際には蛍光ビーズのような基準物質を用いて都度  $G/R$  値を算出しておくことが推奨される. 全く同じ条件で同じ試料をイメージングした場合でも, 検出器の経年劣化などを原因として, 得られる  $G/R$  値が変化してしまうことがある. このような場合, 基準物質の  $G/R$  値を用いて補正することで, 過去に取得した  $G/R$  値を再現することが可能となる. これは, ゲイン設定を変更した場合や, 異なる顕微鏡で得られたデータを比較する際にも極めて重要である.

ちなみに, 背景除去をせず, 閾値処理のみでレシオ画像を生成したのが図 2f である.  $G$  および  $R$  チャネルの双方において, 輝度値が 550 未満のピクセルを  $\text{NaN}$  とすることで  $S/N > 50$  が満たされるようにしているが,  $S/B > 20$  は保証されていない. また, 図 2e と比較すると, 解析領域が少なくなってしまうのがわかる.

さらに, 筆者のように自分で画像解析を行った経験がない人は, 図 2a および図 2b の TIFF 画像からいきなりレシオ画像を生成しようとして, カオスな結果を得たことがあるかもしれない (図 2g). 閾値処理を行わず, 細胞外など輝度が低いピクセルまで割り算に使ってしまうと,  $G/R$  値が極端な値を示し著しく不適切なレシオ画像になってしまうことも多い.

また, 図 2e および図 2f は, 実は特別なプラグイン (詳細は引用文献 3 のサポートページに記載) を用いて

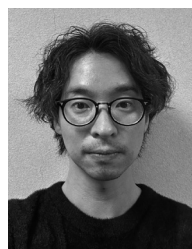
生成した画像となっているが, 同様のレシオ画像は Fiji の標準機能でも作成可能である (図 2h). 図 2e と図 2h は同一の処理に基づくものであり, 科学的には同等のデータである. ただし, 図 2e (および図 2f) は,  $G/R$  値を色で表現しつつ, 元の輝度が低いピクセルほど暗く表示されるよう設計されており, 視覚的な可読性を高めるための表示上の工夫にすぎない.

#### 4 イメージング結果を査読する化学者へ

筆者の研究室では, 上記の画像処理プロセスを理解し, 運用できるようになるまでそれなりの時間を要した. 言い訳に聞こえるかもしれないが, これはレシオイメージングを実施している論文, 少なくとも化学系の論文の多くにおいて, これらの処理プロセスが十分に記載されていないことが一因であると考えている. 例えば, 背景光やノイズの定義, 背景光除去や閾値設定の方法, さらに平滑化などの前処理の有無といった点が明示されていない場合, 査読者の立場から見ても, 当該データの定量性や再現性を判断することは困難であろう. 特に,  $S/B$  や  $S/N$  は定量性に最も深く関与する重要な指標であるが, それらについて具体的に言及している論文は (恥ずかしながら, 筆者が過去に発表したものも含め) 非常に少ないのが現状である. 読者諸氏が本技術に関連する論文を査読する機会があった際には, こうした点が適切に記載されているか, 一度意識してみてくださいれば幸いです.

#### 文 献

- 1) A. S. Klymchenko : *Acc. Chem. Res.*, **56**, 1 (2023).
- 2) M. K. Goshisht, N. Tripathi, G. K. Patra, M. Chaskar : *Chem. Sci.*, **14**, 5842 (2023).
- 3) S. Michelis, L. Danglot, R. Vauchelles, A. S. Klymchenko, M. Collot : *Anal. Chem.*, **94**, 5996, (2022).
- 4) A. S. Klymchenko : *Acc. Chem. Res.*, **50**, 366 (2017).
- 5) H. Alto, A. Matsumoto, J. Ikenouchi, G. Konishi : *J. Am. Chem. Soc.*, **147**, 9953 (2025).
- 6) M. H. Lee, J. S. Kim, J. L. Sessler : *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 4185 (2015).
- 7) J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona : *Nat. Methods.*, **9**, 676 (2012).



仁子 陽輔 (NIKO Yosuke)

高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門 (〒780-8520 高知県高知市曙町 2-5-1). 東京工業大学大学院理工学研究科有機・高分子物質専攻博士課程. 博士 (工学). 《現在の研究テーマ》 *In vivo* イメージングに資する新規蛍光プローブの創成. 《趣味》 W リーグ観戦.

E-mail : y.niko@kochi-u.ac.jp