

多重蛍光における分光スペクトルからの色素濃度関数の推定

森下壮一郎^{*†} 横田秀夫^{*} 橋口博樹[‡] 姫野龍太郎^{*†} 三島健稔^{*†}

^{*}独立行政法人 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
351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

[†]埼玉大学大学院 理工学研究科
338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保 255

[‡]埼玉大学工学部 情報システム工学科
338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保 255

E-mail: smori@riken.jp, hyokota@riken.jp, hiro@ms.ics.saitama-u.ac.jp,
himeno@riken.jp, mishima@ics.saitama-u.ac.jp

要旨 タンパク質の同定や生体組織の観察のために、多重蛍光染色が広く行われている。多重蛍光の分離には波長フィルタによる特定波長の強度測定や、Linear Unmixing による分光スペクトルからの蛍光強度推定が行われているが、いずれも色素同士の励起波長や蛍光波長が重なり合って相互作用がある場合に適用できない。本稿では、分光スペクトルに独立成分分析を施し、ロジスティック回帰により色素濃度関数を求める手法を提案し、従来法との比較によりその有用性を示す。

1 はじめに

生体形状の観察には、対象組織を蛍光色素でマーキングする蛍光イメージングが有効である。これは、タンパク質の同定や生体組織の観察のために分子生物学の分野などで広く行われているものである。蛍光色素は励起光と異なる波長で蛍光を発するので、フィルタを適切に組み合わせることで染色した組織のみの分布や形状を観察することができる。

現在、蛍光色素合成やマーキング技術の研究の成果により試料の組織をそれぞれ別の蛍光色素で染色する多重蛍光染色が可能となっている。

多重蛍光染色試料の観察には重なり合った蛍光の分離が必要になるが、フィルタによる分離では適切なフィルタの組み合わせが困難である。また、同時に使用した色素の励起や蛍光の波長ピークが近いときには分離できない。

波長ピークが近い蛍光の分離に有効とされている手法に Linear Unmixing がある [1]。これは、蛍光の分光スペクトルを観察し、蛍光色素の蛍光スペクトルへの線形写像から各蛍光色素の蛍光強度を得ようとするものである。この手法はスペクトルの線形結合モデルに立脚している手法であるが、多重蛍光では色素の蛍光が別の色素に吸収されて励起するなどの要因により線形結合モデルが成り立たないことが多いので、適用範囲は限られる。

本稿では、既存の手法では分離が困難な場合にも適用可能な分離手法として、濃度が既知の分光スペクトルを回帰分析することによる色素濃度関数の推定を提案する。

2 理論

2.1 蛍光

蛍光色素は光子を吸収して励起されるが、分子内緩和によりエネルギーが失われ、吸収した光子よりエネルギーが低い光子を発する。これを蛍光と呼ぶ。蛍光は励起光よりエネルギーが低い光、すなわち波長が長い光として観測される。

蛍光は照射光の波長とは異なる波長で観察されるので散乱光や透過光と混ざることがなく、その有無の判別が容易である。

蛍光色素はそれぞれ固有の吸光スペクトル $\varepsilon(\lambda)$ と発光スペクトル $f(\lambda)$ を持つ。吸光スペクトルのピークを励起波長、発光スペクトルのピークを蛍光波長と呼ぶ。

蛍光色素のこのような性質から、励起波長を含むが蛍光波長は含まない光を照射し、蛍光波長のみを観察することで試料における色素の分布のみを観察することができる。

2.2 多重蛍光染色

多重蛍光染色において蛍光の分離を簡単にするためには、色素同士の励起波長や蛍光波長が重ならないように色素を組み合わせる必要がある。

色素 i の吸収スペクトルと発光スペクトルをそれぞれ $\varepsilon_i(\lambda), f_i(\lambda)$ とすると、色素 i の吸収スペクトルと色素 j の発光スペクトルの相互の影響 $r(i, j)$ は次のように計算できる。

$$r(i, j) = \begin{cases} 0, & \text{for } i = j \\ \int \varepsilon_i(\lambda) f_j(\lambda) d\lambda, & \text{for } i \neq j \end{cases} \quad (1)$$

染色に用いた蛍光色素の数を N とすると、色素同士の相互の影響は

$$R = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N r(i, j) \quad (2)$$

となる。このとき、できる限り R が小さくなるような色素の組み合わせが最適である。

実際には、吸収スペクトルや発光スペクトルにはある程度の広がりがあるため、相互の影響を 0 にすることはできない。十分に小さくなるような組み合わせも極めて限られる。

蛍光メカニズムが完全に解明されているわけではないので、相互の影響を考慮した分離手法を構築するのは極めて困難であり、実用上はある程度の誤差を許容せざるを得ない。特に従来手法は、前述したような極めて限定された状況に適用されている。

2.3 定式化

蛍光観察を定式化するために、照射光および観察光をそれぞれ分光できる観察系を考える。この観察系での試料の観察によって得られる分光スペクトル X を、照射波長 λ_I および観察波長 λ_O の関数として次のように表す。

$$X(\lambda_I, \lambda_O) = E(\lambda_I, \lambda_O)S(\lambda_I, \lambda_O) \quad (3)$$

ここに、 E は観察系の光源や光学系、検出器などによって決まる装置関数、 S は試料の特性によって決まる試料関数である。

試料関数 S を試料が散乱させた成分のみを表す S_r と蛍光に由来する成分を表す S_f の和として次のように表す。

$$S(\lambda_I, \lambda_O) = S_r(\lambda_I, \lambda_O) + S_f(\lambda_I, \lambda_O) \quad (4)$$

このうち、 S_r は蛍光を観察する上では不要な成分であり、むしろノイズとされる。しかし、照射光の波長以外で散乱光が観察されることはないので、

$$(S_r(\lambda_I, \lambda_O) = 0 \mid \lambda_I \neq \lambda_O)) \quad (5)$$

となる。したがって、式 (3), (4), (5) より、

$$(X(\lambda_I, \lambda_O) \mid \lambda_I \neq \lambda_O) = S_f(\lambda_I, \lambda_O) \quad (6)$$

となる。すなわち、蛍光を観察するには照射波長と観察波長とが等しくならない場合を考えればよい。

これは蛍光観察の本質であり、以下に述べる従来手法はいずれもこの考え方に基づいている。

2.4 従来手法

フィルタによる波長選択

フィルタによる波長選択を用いた蛍光の分離は、単一色素による染色や、多重染色でも色素同士の励起波長や蛍光波長が十分に大きく異なる場合には簡便な手法である。

照射光側のフィルタの分光透過率を F_I 、観察光側のフィルタの分光透過率を F_O とすると、観測値 X は次の式で表すことができる。

$$X(\lambda_I, \lambda_O) = \iint F_I(\lambda_I) F_O(\lambda_O) E(\lambda_I, \lambda_O) S(\lambda_I, \lambda_O) d\lambda_I d\lambda_O \quad (7)$$

ただし、式 (6) の条件を満たすために、フィルタの組み合わせは F_I と F_O が直交するように、すなわち

$$\int F_I(\lambda) F_O(\lambda) d\lambda = 0$$

となるように選択すべきである。

多重蛍光の場合は、さらに色素の相互影響が少なくなるようにフィルタを選択しなければならない。

ここで、フィルタ F_I, F_O を通して測定される色素 i の蛍光を表す量 Y_i を、

$$Y_i = \iint F_I(\lambda_I) \varepsilon_i(\lambda_I) f_j(\lambda_O) F_O(\lambda_O) d\lambda_I d\lambda_O \quad (8)$$

とすれば、各色素 i について

$$R_i = \frac{\sum_{j|j \neq i}^N Y_j}{Y_i} \quad (9)$$

を計算し、 R_i ができる限り小さくなるようにフィルタの組み合わせを選択すれば良いと考えられる。しかし、常に都合の良いフィルタの組み合わせが得られると限らず、むしろそのような組み合わせは極めて限定される。

Linear Unmixing

Linear Unmixing は、分光スペクトルから多重蛍光の分離を行う手法である。照射波長あるいは観測波長を固定し、もう一方を走査してスペクトルを観察する。式を簡略に記述するために、走査した方の波長を単に λ とする。

ここに、 λ は離散波長で、 L 個の値を取るとする。各波長の信号強度を並べた L 次元列ベクトルを x と表す。

染色に用いた蛍光色素の数を N とする。リファレンスとして、色素 i ($i = 1, \dots, N$) のみが蛍光しているスペクトルが L 次元列ベクトル a_i として得られているとする。

混合色素の蛍光スペクトルが、リファレンス a_i の線形結合で表されると仮定すれば、観測スペクトル x のリファレンス a_i に対する相対強度 y_i は、 x の a_i への射影

$$y_i = \frac{a_i^T x}{|a_i|} \quad (10)$$

と計算できる。ここに、 T は転置を表す。

Linear Unmixing による信号分離のために、リファレンス a_i は必ずしも直交している必要はなく、独立であればよい。もちろんピーク波長が重なっていても構わない。

しかしながら、前述したようにこの手法はスペクトルの線形結合モデルに基づいている。すなわち、色素同士の相互作用はないものと見なしている。式 (2) で得られる R が十分に小さくなければこの手法による分離結果は意味がない。

また、使用する色素数が増えるほど R が大きくなる傾向があるため、この手法により正しく分離できる色素数は高々 3 程度であろう。

3 提案手法

3.1 枠組み

前節までで述べたように、従来手法は色素の相互作用を考慮に入れていないため、限定された場合にしか適用できなかった。本稿では、色素の相互作用による影響が少ない手法として、回帰分析による分光スペクトルからの色素濃度関数の推定手法を提案する。

提案手法は、あらかじめ色素濃度が既知のサンプルを用意し、その分光スペクトルから各色素毎の濃度を得る関数 $d(x)$ を回帰分析により求めるものである。

回帰分析では説明変数同士の無相関性が要件として挙げられるが、分光スペクトルは多重共線性が高くこの要件を満たさないため、事前に多変量解析の一手法である独立成分分析 [2] を用いて変数を縮約する。

また、線形回帰モデルでは当てはまりが良くないので、非線形回帰モデルの一つであるロジスティック回帰モデルを適用する。

3.2 独立成分分析による次元圧縮

独立成分分析

独立成分分析 (ICA: Independent Component Analysis) とは、Blind Source Separation を行う手法の一つである。

独立な N 個の信号源 $S = (s_1, \dots, s_N)$ から発信された信号が、混合行列 A によって線形に混合され、 $M (\geq N)$ 個の観測値 $X = (x_1, \dots, x_M)$ が観測されるとすると、このモデルは

$$X = AS \quad (11)$$

と書き表せる。

独立成分分析は、信号源 S と混合行列 A が未知であるとき、信号源の独立性を利用して観測値 X から S, A を推定するものである。

本来、このモデルは蛍光の分光スペクトルには適合しない。単一色素の分光スペクトルを信号源と見なすことはできるが、これらは線形に混合されないからである。しかし、モデルに適合しない観測値に独立成分分析を施せば、それを信号源と見なすことはできないまでも、観測値に含まれる独立な成分が抽出されるという結果に変わりはない。

本稿ではこの性質に着目し、回帰分析のための説明変数同士の相関性を除くために独立成分分析を適用するものである。

分光スペクトルへの適用

Linear Unmixing と同様に、提案手法も照射波長あるいは観測波長を固定し、もう一方を走査して観察したスペクトルを対象とする。走査した方の波長を単に λ とし、離散波長で L 個の値を取るとする。また、混合した蛍光色素の数を N とする。

いま、 M 個の観測点で分光スペクトル $x_j(\lambda)$ ($j = 1, \dots, M$) が得られたとする。各波長の信号強度を並べた L 次元列ベクトルを x_j とし、観測された全分光スペクトルを $X = (x_1, \dots, x_M)$ と表す。

観測スペクトル X を N 個の独立成分ベクトルに分解したものを s_i ($i = 1, \dots, N$) とする。全独立成分を $S = (s_1, \dots, s_N)$ とし、混合行列を A とすると、行列 X は式 (11) のように表される。これを満たすような S, A は、独立成分分析により求められる。

分光スペクトル x が持つ独立成分の強度 $c(x)$ はこの独立成分 S から

$$c(x) = {}^T S x \quad (12)$$

と計算できる。

3.3 ロジスティック回帰による色素濃度関数推定

ロジスティック回帰

ロジスティック回帰は、ノンパラメトリックなデータに適用される回帰分析手法の一つである。

ある事象が発生する確率を p としたとき、そのオッズ比 $p/(1-p)$ の対数をとった $\log\{p/(1-p)\}$ をロジットと呼ぶ。ロジットを N 個の独立変数 χ_i の線形結合で表したものがロジスティックモデルであり、

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = b_0 + b_1\chi_1 + \cdots + b_N\chi_N \quad (13)$$

と書き表される。

式 (13) を変形すると、ロジスティック関数

$$p = \frac{1}{1 + \exp\{-(b_0 + b_1\chi_1 + \cdots + b_N\chi_N)\}} \quad (14)$$

が得られる。パラメータ b_i ($i = 0, \dots, N$) は最尤法により求めることができる。

ロジスティック回帰モデルの本来の意義から p は確率としたが、0 から 1 の値を取り、式 (14) に適合する値であれば p が何を意味する値であっても本質的には構わない。

本稿では、 p を 0 から 1 の値を取る濃度値とし、各色素の濃度値を表す関数についてロジスティック回帰モデルへの当てはめを行う。

色素濃度関数推定

いま、色素の混合比率が既知の m 個の観測値があるとする。その分光スペクトルを $v_k(\lambda)$ ($k = 1, \dots, m$) とし、 L 次元列ベクトル v_k で表し、独立成分の強度を $r_k = c(v_k)$ と計算する。さらに、各観測値における色素 i の濃度を $[0, 1]$ に正規化したものを δ_{ik} と表す。

各色素 i の濃度を決定する濃度関数をロジスティック回帰により求める。まず、各色素 i について、式 (14) のロジスティック関数の係数 b_0, \dots, b_N を最尤法により決定する。なお、 $(\chi_1, \dots, \chi_N) = {}^T r_k$, $p = \delta_{ik}$ とする。

得られた係数をそれぞれ b_{i0}, \dots, b_{iN} とし、ロジスティック関数 $p_i(c)$ を式 (15) と決定する。

$$p_i(c) = \frac{1}{1 + \exp\{-(b_{i0} + b_{i1}c_1 + \cdots + b_{iN}c_N)\}} \quad (15)$$

ここに、 $c = {}^T(c_1, \dots, c_N) = c(x)$ である。

濃度関数 $d_i(x)$ は、 $p_i(c)$ を用いて

$$d_i(x) = p_i(c(x)) \quad (16)$$

とする。

以上の手続きで得られた $d_i(x)$ を用いて、分光スペクトル x を持つ試料における色素 i の濃度を得ることができる。

3.4 精度評価

クロスバリデーション（相互検証法）の一種であるジャックナイフ法を用いて精度評価を行う。これは、データのサンプル数が少ないときに推定用のサンプルと評価用のサンプルとを相互に使い分けて評価を行うものである。

サンプル点が n 個あるとき、 $n - 1$ 個のサンプルを回帰分析に用いる。誤差の評価は回帰分析に用いなかったデータにより行う。これを n 回繰り返して誤差の自乗和を取ったものを予測残差 ($PRESS$) と呼ぶ。

$$PRESS = \sum_{k=1}^n (\hat{d}_{ik} - \delta_{ik}) \quad (17)$$

ここに、 \hat{d}_{ik} は k 番目のデータを除いてパラメータの推定を行い、その結果から δ_{ik} を予測した値を表す。

さらにサンプルの分散を用いて $PRESS$ を正規化して 1 との差を取ったものを Q^2 と呼び、これを予測性能の指標とする。

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum_{k=1}^n (\delta_{ik} - \bar{\delta}_i)} \quad (18)$$

ここに、 $\bar{\delta}_i$ は δ_{ik} の平均値を表す。

予測値と実測値が完全に一致しているとき、 $PRESS$ は 0 になるので Q^2 は 1 になる。この値を比較することで手法を定量的に評価できる。

4 実験

提案手法の有用性を検証するために、2 種の蛍光色素の混合溶液を測定した分光スペクトルから各色素の濃度を推定する実験を行った。

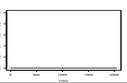
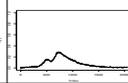
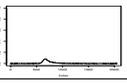
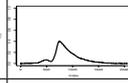
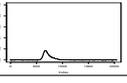
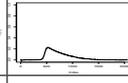
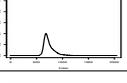
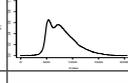
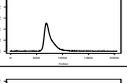
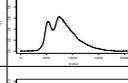
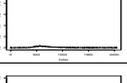
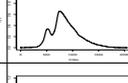
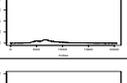
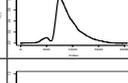
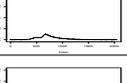
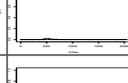
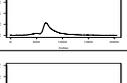
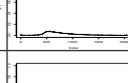
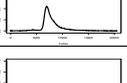
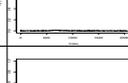
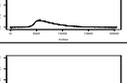
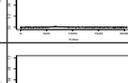
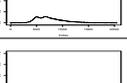
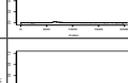
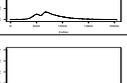
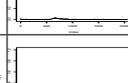
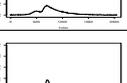
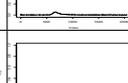
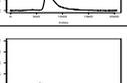
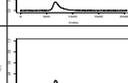
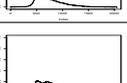
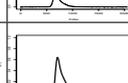
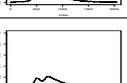
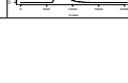
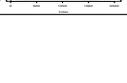
4.1 実験条件

2 種の蛍光色素 (FITC, RITC) の濃度を変えた混合溶液を作成し、その蛍光の分光スペクトルを測定した。実験装置は、光源、キュベットホルダ、ディテクタ、データ取得用 PC からなる。図 1 に概略を示す。なお、各モジュールの主な仕様は表 1 に示す。試料の色素混合比率と測定されたスペクトルは表 2 に示す。色素の濃度は、FITC と RITC をそれぞれ DMSO で溶解させたものの 1000 倍の水溶液の濃度を 1 とし、相対濃度をとったものである。以下、FITC を色素 A、RITC を色素 B と表記する。

表 1 モジュール仕様

モジュール	仕様	モジュール	仕様
光源	6.5W ハロゲン光源	ディテクタ	Ocean Optics 社製 USB2000 スリット幅 10[nm] グレーティング 最良効率 (>30%) 250–800[nm]
光ファイバ	$\phi 1000\mu\text{m}$ 紫外/可視領域用		
試料セル	ガラスセル 光路長 3[mm] 光路幅 10[mm]		

表 2 実験に用いた色素の混合比率

No.	希釈倍率		濃度比率		スペクトル	No.	希釈倍率		濃度比率		スペクトル
	A	B	A	B			A	B	A	B	
1	—	—	0	0		19	×2000	×4000	0.5	0.25	
2	—	×16000	0	0.0625		20	×2000	×2000	0.5	0.5	
3	—	×8000	0	0.125		21	×1000	—	1	0	
4	—	×4000	0	0.25		22	×1000	×16000	1	0.0625	
5	—	×2000	0	0.5		23	×1000	×8000	1	0.125	
6	×8000	—	0.125	0		24	×1000	×4000	1	0.25	
7	×8000	×16000	0.125	0.0625		25	×1000	×2000	1	0.5	
8	×8000	×8000	0.125	0.125		26	×10000	—	0.1	0	
9	×8000	×4000	0.125	0.25		27	×6000	—	0.167	0	
10	×8000	×2000	0.125	0.5		28	—	×100000	0	0.01	
11	×4000	—	0.25	0		29	—	×80000	0	0.0125	
12	×4000	×16000	0.25	0.0625		30	—	×60000	0	0.0167	
13	×4000	×8000	0.25	0.125		31	—	×40000	0	0.025	
14	×4000	×4000	0.25	0.25		32	—	×20000	0	0.05	
15	×4000	×2000	0.25	0.5		33	—	×10000	0	0.1	
16	×2000	—	0.5	0		34	—	×6000	0	0.167	
17	×2000	×16000	0.5	0.0625		35	—	×1000	0	1	
18	×2000	×8000	0.5	0.125							

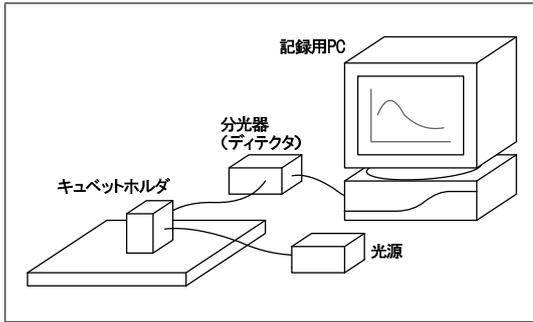


図 1 測定装置概略

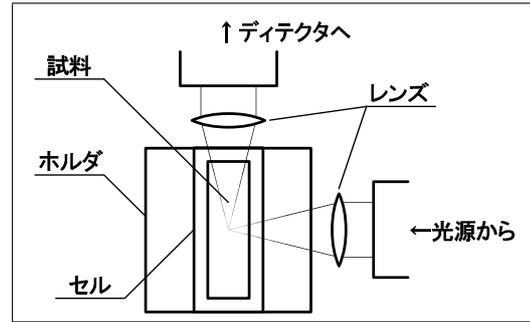


図 2 ホルダ上面図

光源からの光は、光ファイバーによりキュベットホルダに導かれ、試料セルに満たされた試料に照射される。蛍光のみを観察するため、観察光は、照射光の光軸に対し直角の方向に配置された光ファイバーによりディテクタに導かれる。観察光はディテクタ内部の分光器により分光され、各波長の強度が測定される。測定値はディテクタに接続されているPCに蓄積される。なお、図2に示すとおりキュベットホルダにはレンズが装着されており、照射光および観察光は共に試料セルの中央部で集光する。

照射光が分光されないため観測光には照射光が必ず含まれることになり、厳密にはこの観測系は蛍光の分離に必要な式(6)の条件を満たさない。しかし、蒸留水のみを観察したスペクトル(表2: No.1)を見ると、散乱光として観測されるはずである光源のスペクトルが確認できない。これは、色素の蛍光やディテクタのノイズと比して溶媒の散乱光は微弱であることを示している。また、色素の散乱光についても、それを示す特徴的なスペクトルは確認されなかった。したがって、本実験においては観測波長は照射波長を含むことによる散乱光の影響は無視できると考えられる。

4.2 分光スペクトルの次元圧縮

図3は、表2のスペクトルに独立成分分析を施して2本の独立成分を抽出し、 x, y 軸にそれぞれ独立成分の強度 c_1, c_2 をとって平面上にプロットしたものである。さらに色素Aの等濃度線を破線で、色素Bの等濃度線を点線でそれぞれ描いた。

色素Aの等濃度線は横に延びる傾向が見られた。これは、 c_2 が等しいときは色素Aの濃度がほぼ等しいということであり、強度 c_2 が色素Aの濃度を大まかに表す量になっていると考えることができる。一方、色素Bの等濃度線は縦に延びる傾向が見られ、同様に強度 c_1 が色素Bの濃度を大まかに表す量になっていると考えられる。

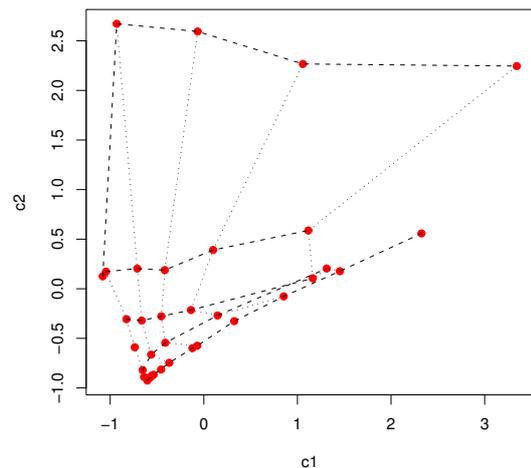


図 3 次元圧縮後の空間における検量線

しかしながら、独立成分の強度と色素濃度の関係が明らかではないので、独立成分の強度を変数として回帰分析による色素濃度関数の推定を行う必要がある。

4.3 回帰分析による色素濃度関数推定

図 4, 5 は提案手法により得られた $d_i(x)$ の回帰曲面と、測定値のプロットである。 x, y 軸にそれぞれ c_1, c_2 を、 z 軸に $p_i(c)$ をとった。裸眼立体視を可能にするために、視差に合わせて投影角を変えたグラフを並べて図示した。交差法によるステレオ視により立体像が浮かび上がる。

測定値は回帰曲面によく一致しており、ロジスティック回帰モデルはこの問題に適合するモデルであることが分かる。

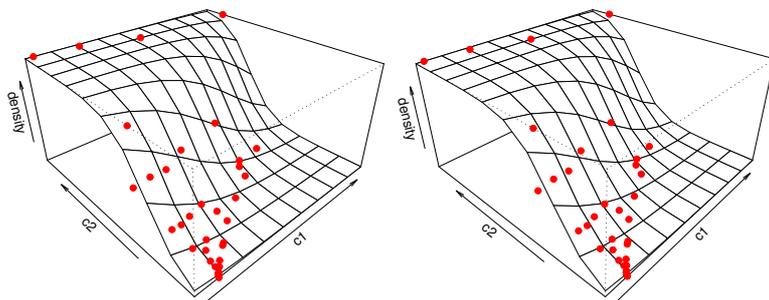


図 4 色素 A の回帰曲面と測定値 (ステレオ視 : 交差法)

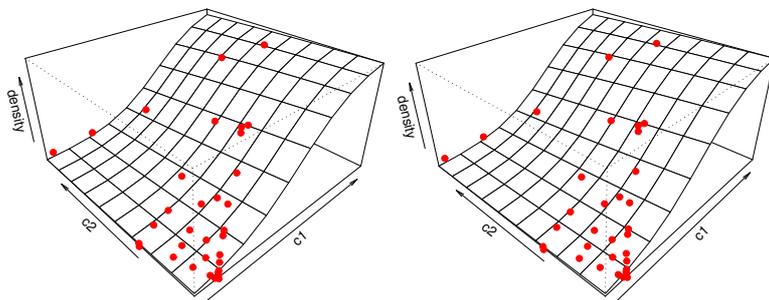


図 5 色素 B の回帰曲面と測定値 (ステレオ視 : 交差法)

交差法

交差法とは、右目で左の画像を、左目で右の画像を見ることでステレオ視を行うものである。

具体的には、30cm ほど離して図を眺めながら自分の鼻を見るつもりで「寄り目」にしていき、左右の図が重なりあって見えるようにする。

このとき、3つの図が横に並んでいるように見えるので、中央の図に注目すると立体像として紙面から浮かび上がって見えるはずである。

4.4 予測精度の算出および疑似画像による可視化

手法の定量的な評価を行うために、提案手法と従来手法それぞれの予測性能の指標 Q^2 を算出した。その結果を表 3 に示す。

表 3 従来手法と提案手法による Q^2 値

手法	Q^2 (色素 A)	Q^2 (色素 B)
ピーク検出	0.523	0.526
Linear Unmixing	0.503	-0.071
ICA+線形回帰	0.460	0.832
ICA+ロジスティック回帰	0.752	0.875

さらに、擬似的に生成した蛍光画像を、従来法および提案手法を用いて分離した結果を表 a (巻頭カラー) に示す。緑が色素 A、橙が色素 B の推定色素濃度を表す画像である。

擬似的な蛍光画像の生成手順は次の通りである。

1. 色素 A と色素 B の濃度を示すものとしてそれぞれ独立な画像を生成する。
2. それらを重ね合わせ、一画素毎に濃度比を持つ画像を生成する。
3. 表 2 を元に画素毎に対応するスペクトルを決定する。
4. それを未知のものに見なして各手法を用いて画素毎に濃度推定を行う
5. 推定された濃度を元に各色素の濃度画像を再構成する

その推定結果から作成した画像は、実際には色素濃度を表す濃淡画像であるが、見やすさのためにカラー化している。

4.5 考察

前節で得られた結果を考察する。

ピーク検出は、蛍光波長の強度を蛍光の強さと見なすものでフィルタによる波長選択に相当する。色素 A の結果は全体に暗く、これは色素 A の蛍光が色素 B に吸収されてしまっているからであると考えられる。また、色素 B の結果を見ると色素 A の蛍光と分離がなされていないことが分かる。

Linear Unmixing ではピーク検出よりも低い Q^2 値になってしまった。これは、本実験での色素の組み合わせはスペクトルの線形結合モデルには合わないものであったことを示している。このような場合に Linear Unmixing を適用しても、その結果は全く信頼できない。

独立成分分析した結果に線形回帰を施した場合、色素 B では比較的高い判別性能が得られた。これは 4.2 節で考察したように、独立成分の一つが色素 B の濃度を示す指標となったことが理由としてあげられるだろう。

独立成分分析した結果にロジスティック回帰を施した結果が一番良い予測性能を達成している。これは、独立成分分析で得られた説明変数と濃度の関係にロジスティック回帰モデルが適合することを示していると考えられる。

5 おわりに

本稿では、多重蛍光分離手法の枠組みを示し、従来手法の問題点を指摘した。特に、分光スペクトルを分析することからフィルタによる波長選択よりも有用とされている Linear Unmixing は、色素の相互作用により適用できる色素の組み合わせが限られることを示した。そして色素の相互作用に依存しない蛍光強度の推定手法として、独立成分分析とロジスティック回帰による濃度関数の推定手法を提案した。

提案手法の有用性を確認するために、色素の混合溶液のスペクトルを測定してそれを元に濃度を推定する実験を行い、提案手法は従来手法は適用できない場合においても高い予測精度が得られることを示した。

今後の課題として、濃度関数のパラメータ決定に必要なデータ数についての検討などが挙げられる。

参考文献

- [1] 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*, 9(2), pp.1-7, 1999.
- [2] A. Hyvärinen, et al.: “Independent component analysis: algorithms and applications,” *Neural Networks* 13, pp.411-430, 2000.
- [3] 清水秀人 他: “独立成分分析を用いた肌の色素成分分離計測法による美白剤効果の測定,” *Digital Biocolor Journal*, No.2, pp.4.1-4.6, 2001.
- [4] 森下壮一郎, 横田秀夫, 橋口博樹, 姫野龍太郎, 三島健稔: “独立成分分析とロジスティック回帰による多重蛍光からの色素濃度推定,” *電子情報通信学会 2004 年ソサイエティ大会講演論文集*, A-2-12(CD-ROM), Sep. pp.21-24, 2004.