

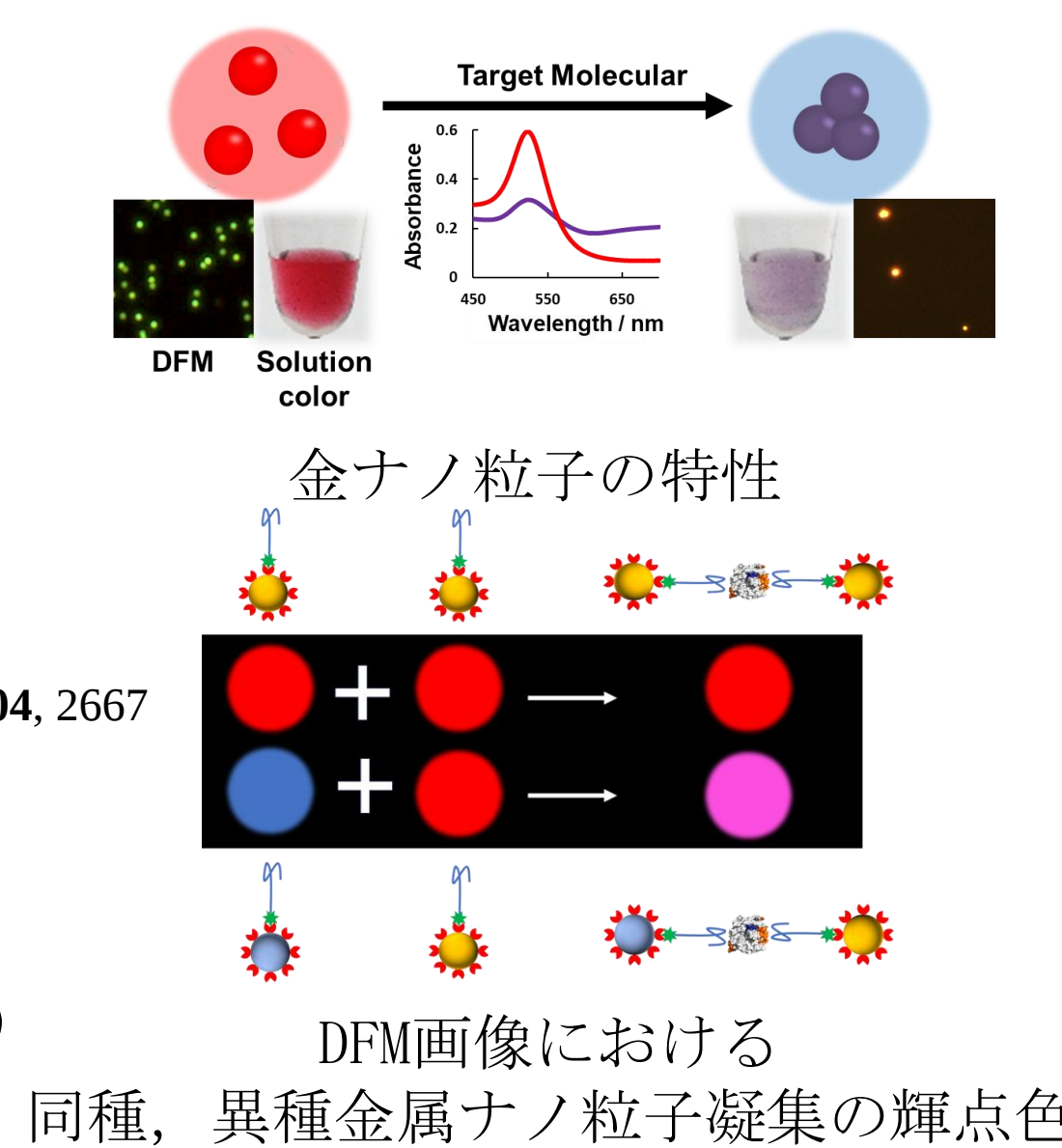
異種金属ナノ粒子の架橋型複合体の 暗視野顕微鏡観察を用いた標的分子検出

和泉諒祐¹, 平尾元², 朝日剛², 前田瑞夫³, 田中拓男³, 横田秀夫³, 座古保^{1,2,3}

1.愛媛大理 2.愛媛大院理工 3.理研

Introduction

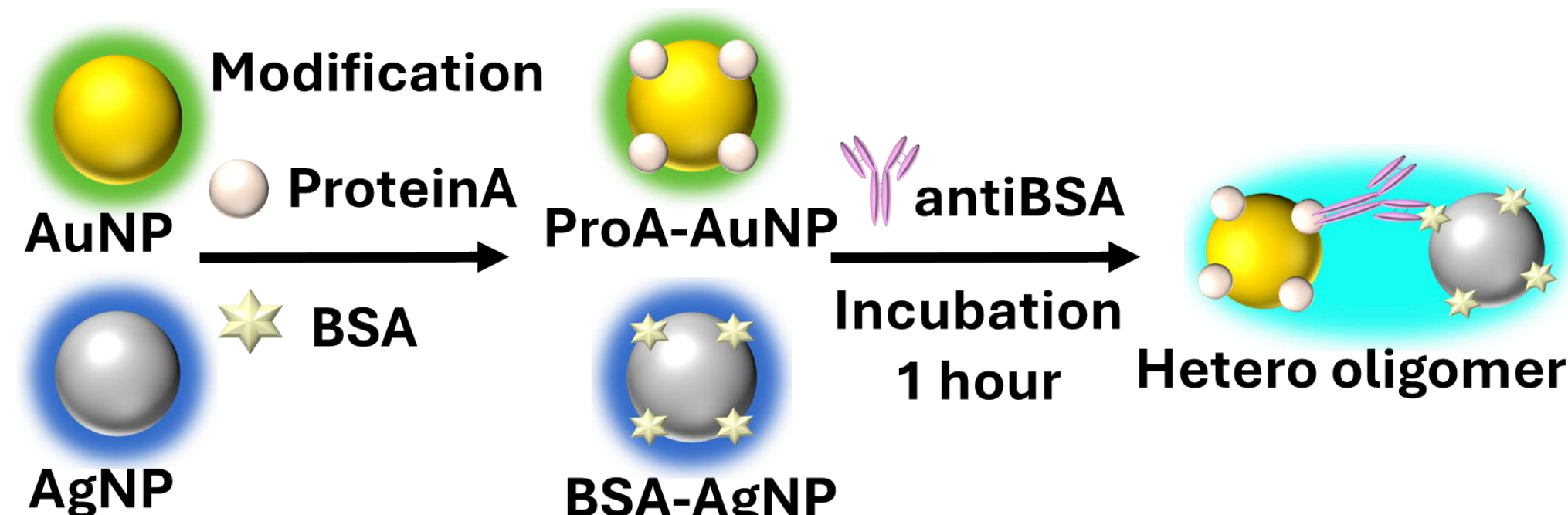
- 近年, 金などの金属ナノ粒子の複合体形成を用いた標的分子センサーが開発されている。金ナノ粒子は分散状態と凝集状態とで異なる溶液色を呈する。また, 複合体形成を評価するために暗視野顕微鏡(DFM)を用いることで標的分子を高感度に検出できることが報告されている[1]。 [1] Yano *et al.*, *Anal. Sci.* (2019), 35, 685
- しかし, 凝集体形成の1種である, 金属ナノ粒子同士で標的分子を挟み込む架橋型凝集においては, 標的分子サイズが大きく, 粒子間距離が一定以上はなれる場合, 金属ナノ粒子複合体(Hetero oligomer)の輝点色は, モノマー輝点色とほとんど変わらないことが懸念されており, 標的分子の検出が困難であった[2]。 [2] Reinhard *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2007), 104, 2667
それに対して本研究室では異なる輝点色を持つ金ナノ粒子(AuNP)と銀ナノ粒子(AgNP)の表面にDNAアプタマーを修飾し, それぞれのナノ粒子を標的分子を仲介した架橋型凝集をすることによる標的分子検出を提案してきた[3]。 [3] 平尾ら 第83回分析化学討論会 (2023)
- 当研究室で行ってきた分析手法では輝点色変化で判断してきた。しかしながら輝点色のみではhetero oligomerと非特異的凝集の区別が困難であるなどの問題があった。



Purpose

新たな系としてProteinA, 牛血清アルブミン(BSA)を修飾したAuNP, AgNPを用いたBSA抗体検出を行った。特に機械学習の再検討を行い, 輝点分類によるBSA抗体検出を試みた。

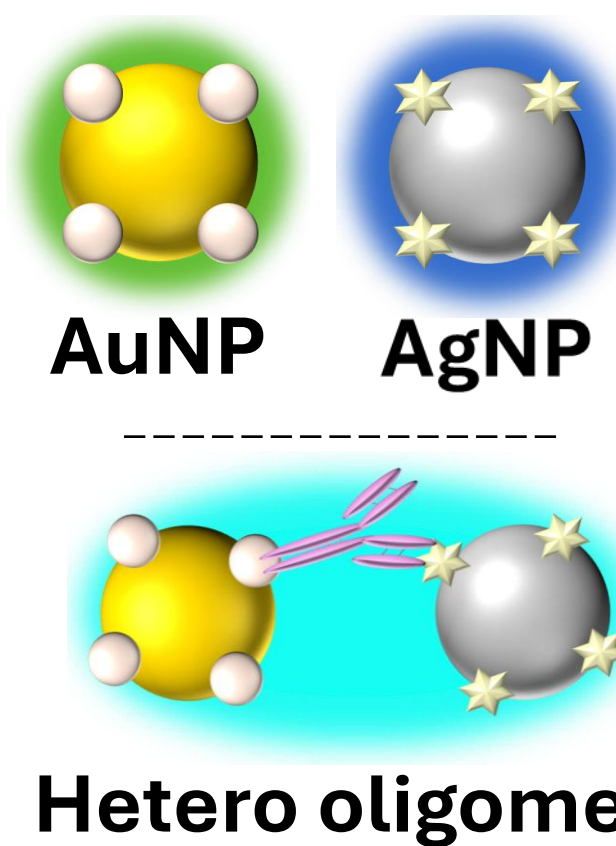
< 標的分子検出のためのHetero oligomer形成 >



AuNP(緑)とAgNP(青)の色が混ざった色(空色)を持つ輝点の取得を期待

Method

< 機械学習を用いた分析 >



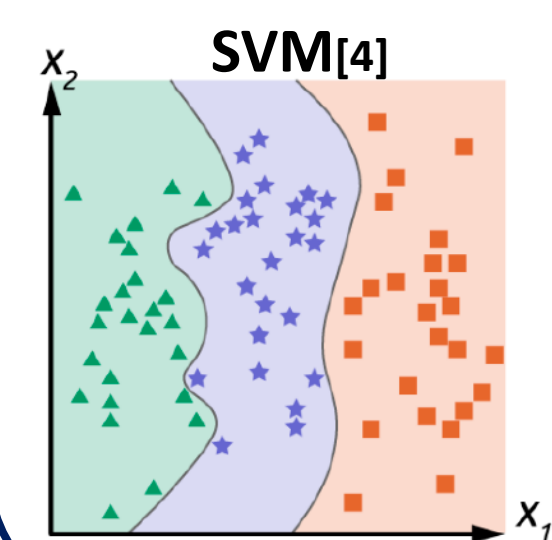
Acquisition of data
RGB
Intensity
Area



Classification by machine learning (SVM, RF)

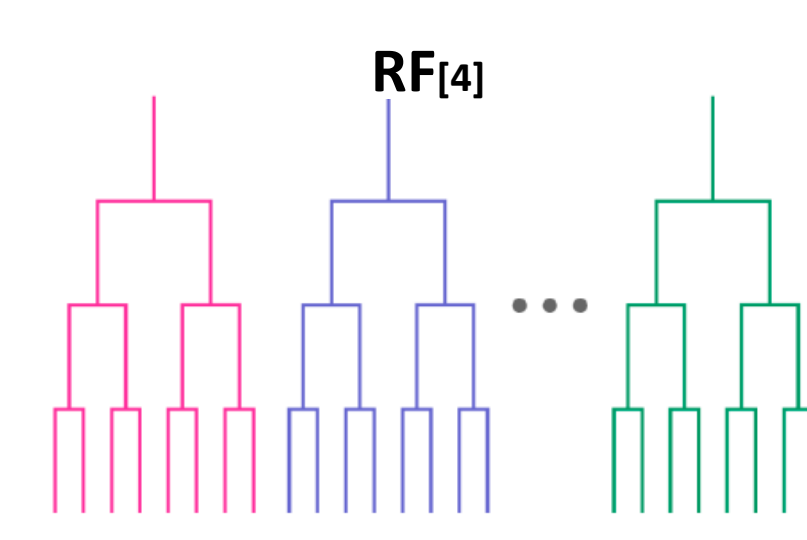
分析手法

- 観察した輝点をImage Jを用いてRGB, Intensity, Area値のデータを取得
- これらの値に基づいて教師データを用いて各輝点に分類
- 分類された数値を基にHetero oligomerの割合を算出



サポートベクターマシン(SVM)

- グループ間の間隔が最大となるような場所に境界線を引き, 分類, 回帰を行う
- 線形, 非線形で分離可能なデータを処理できる



ランダムフォレスト(RF)

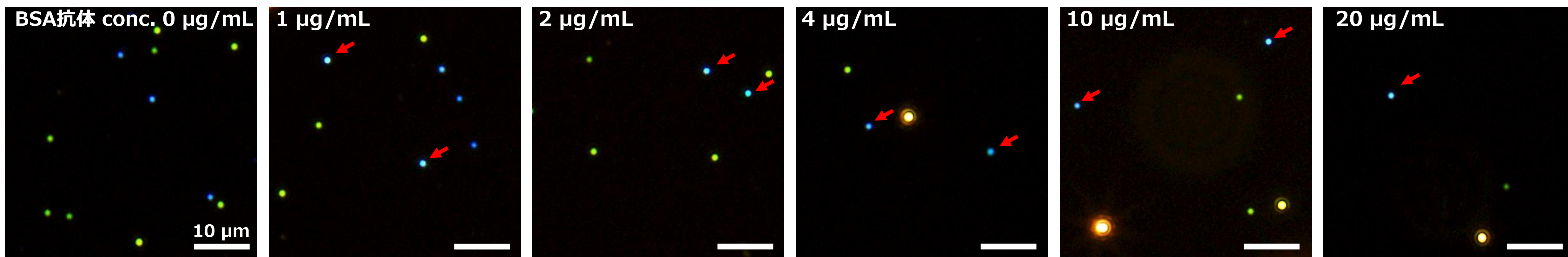
- 複数の決定木を合わせたアンサンブル手法
- 決定木生成のための特徴量をランダムに選択(過学習にくい)

[4]Kenneth E *et al.*, *Sensors.* (2021), 21, 5519

Result

< DFM観察 >

DFM画像における
粒子の輝点色



BSA抗体の濃度増加に伴い, Hetero oligomer輝点形成を観察

< 機械学習を用いた分析に向けた条件検討 >

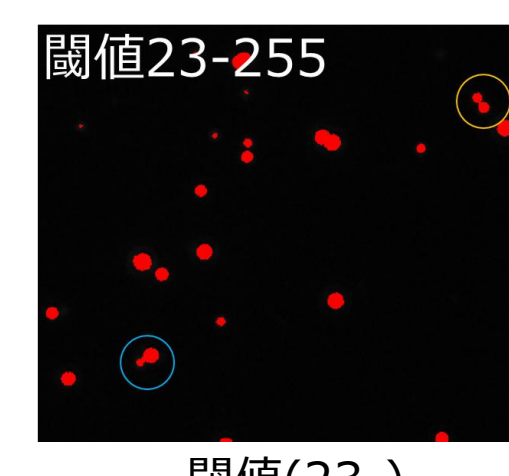
輝点抽出のための輝度の閾値設定

問題点: 誤った閾値設定による誤解析

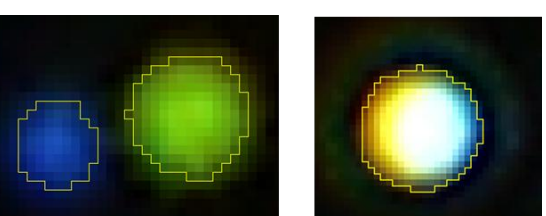
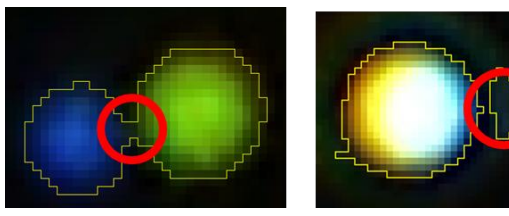
大津の二値化法*で決定

*ヒストグラム内で分けたある2つのクラスの分散度が最大となるような値を閾値として定める手法[5]

[5]N.Otsu, *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.* (1979), 9, 62



大津の二値化により決定した閾値(43-)

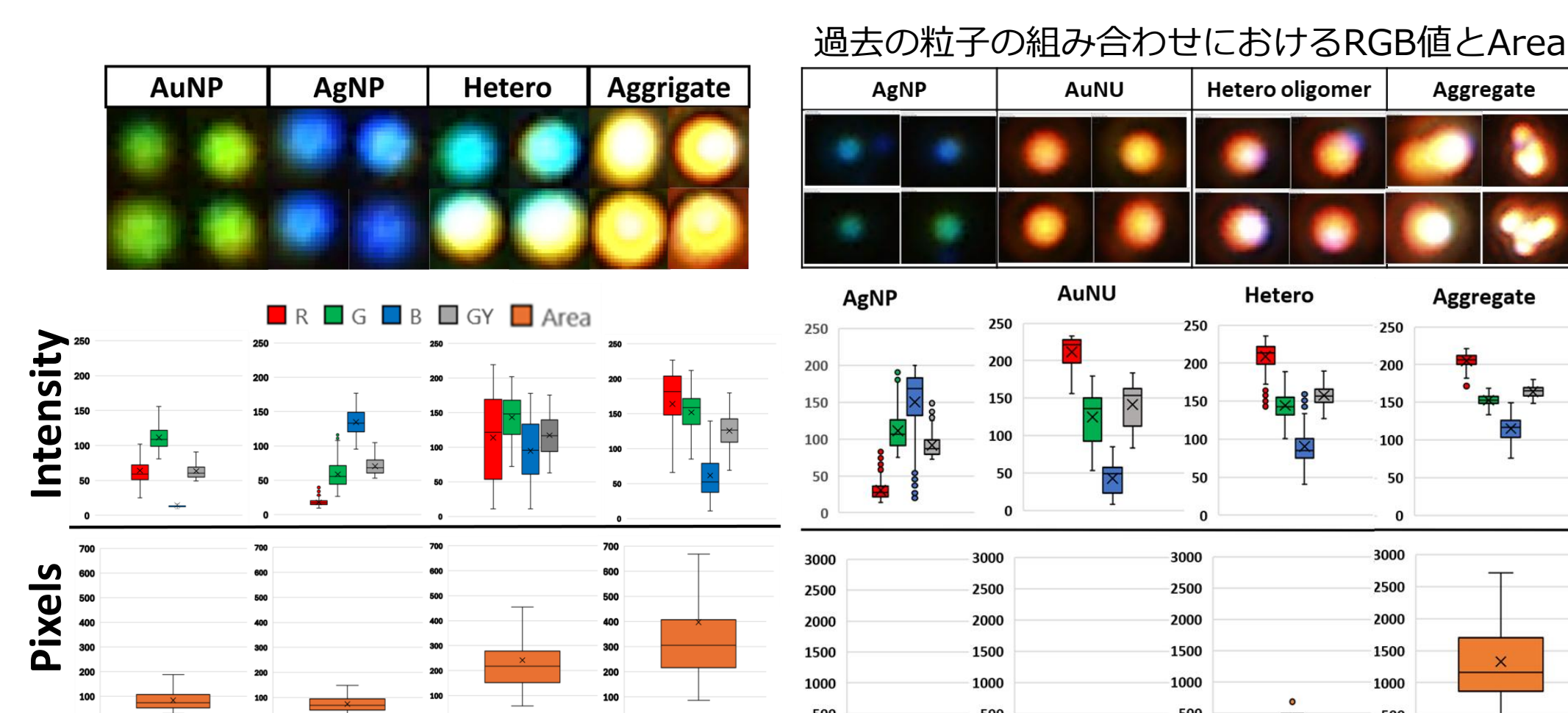


大津の二値化法により輝点を正確に取得することに成功

機械学習のパラメーター検討

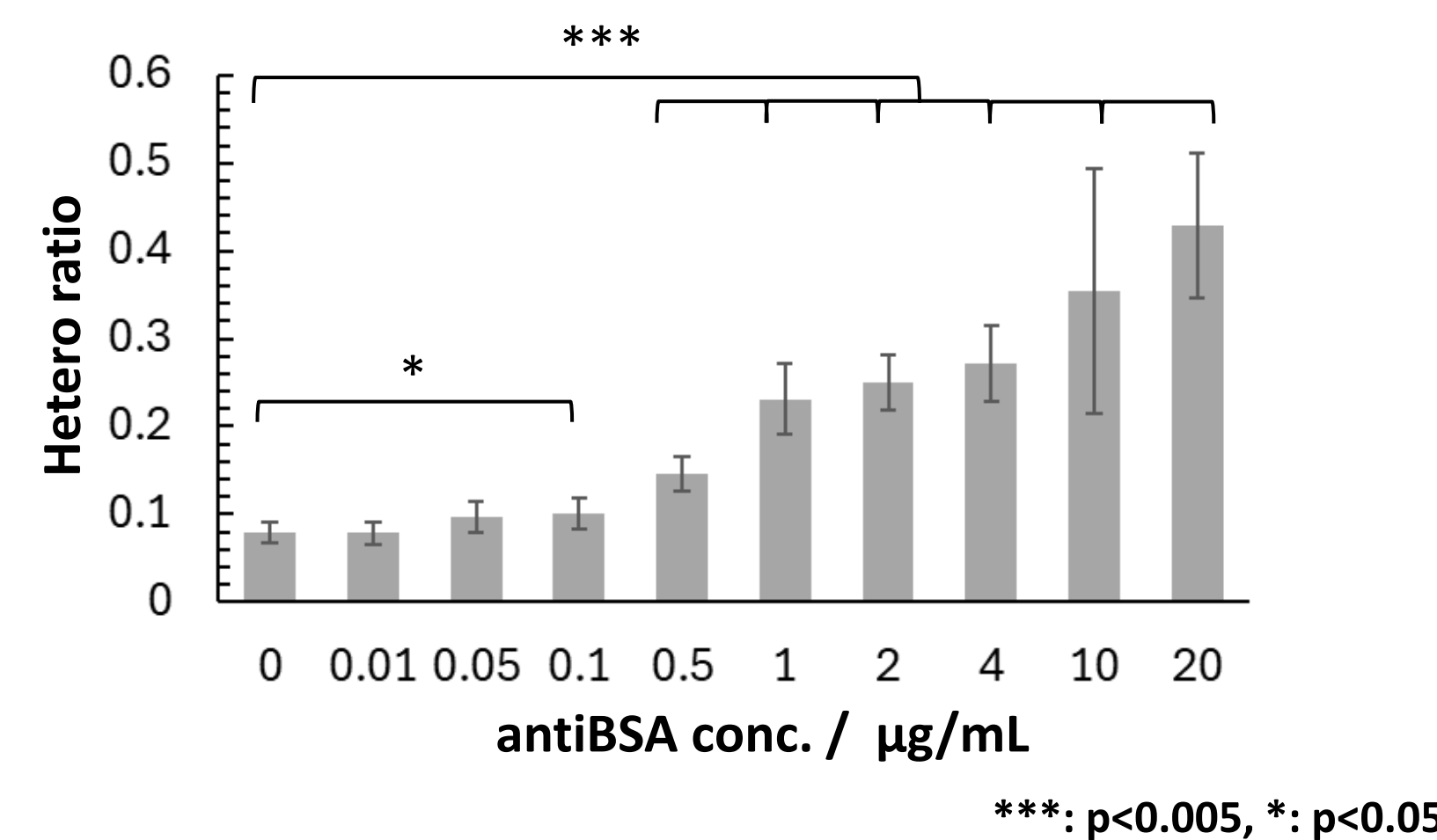
問題点: 色の似た輝点の誤解析

輝点面積をパラメーターとして導入



輝点面積の取得により各輝点の正確な分類に成功

< 機械学習による解析(RF) >



***: p<0.005, *: p<0.05

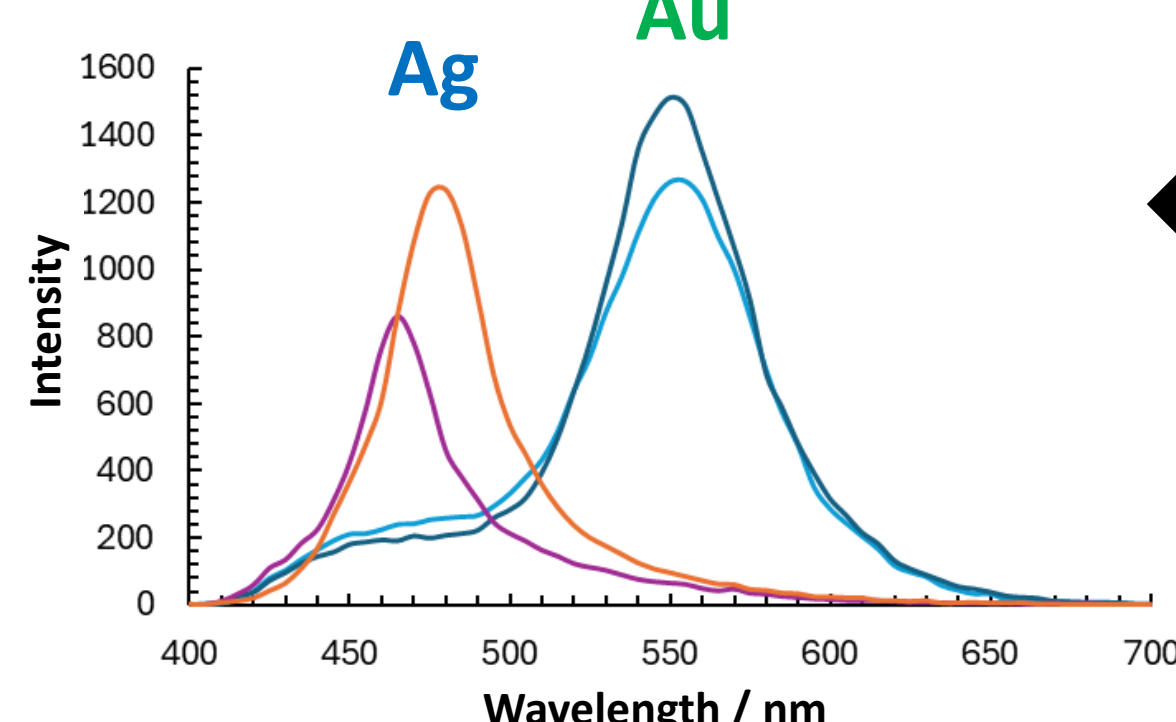
- BSA抗体濃度依存的にHetero oligomer割合の増加を観察
- 0.5 µg/mL BSA抗体を検出可能
- SVMでも同様であった(data not shown)

機械学習による輝点分類・BSA抗体検出に成功

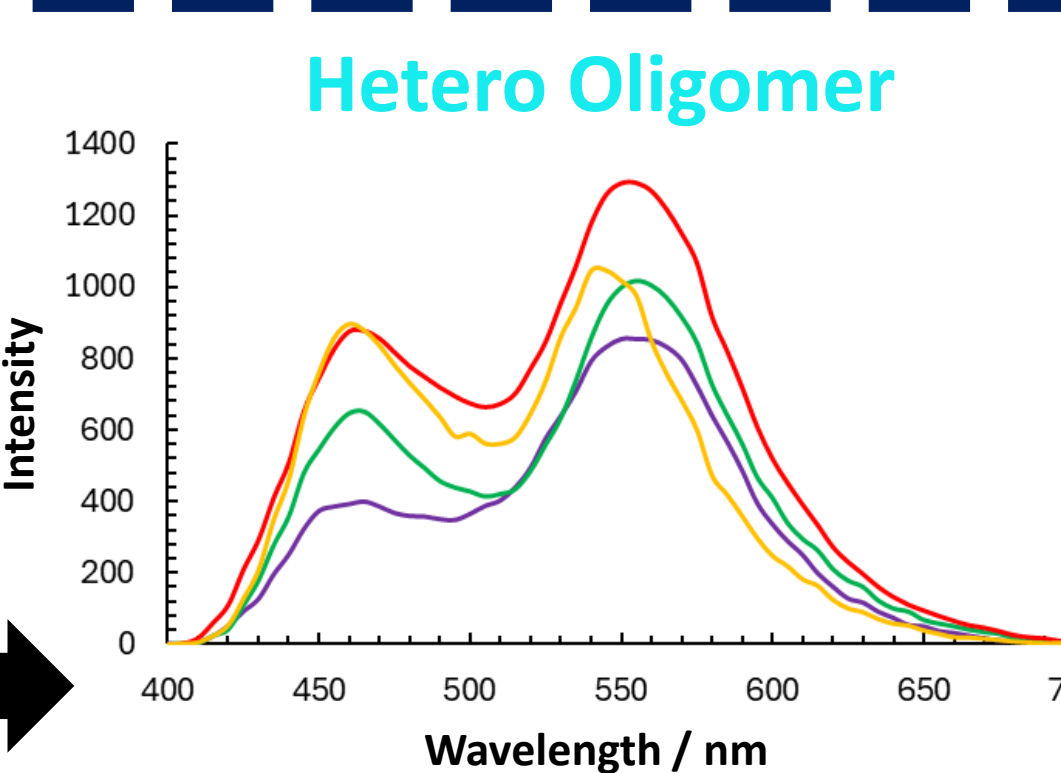
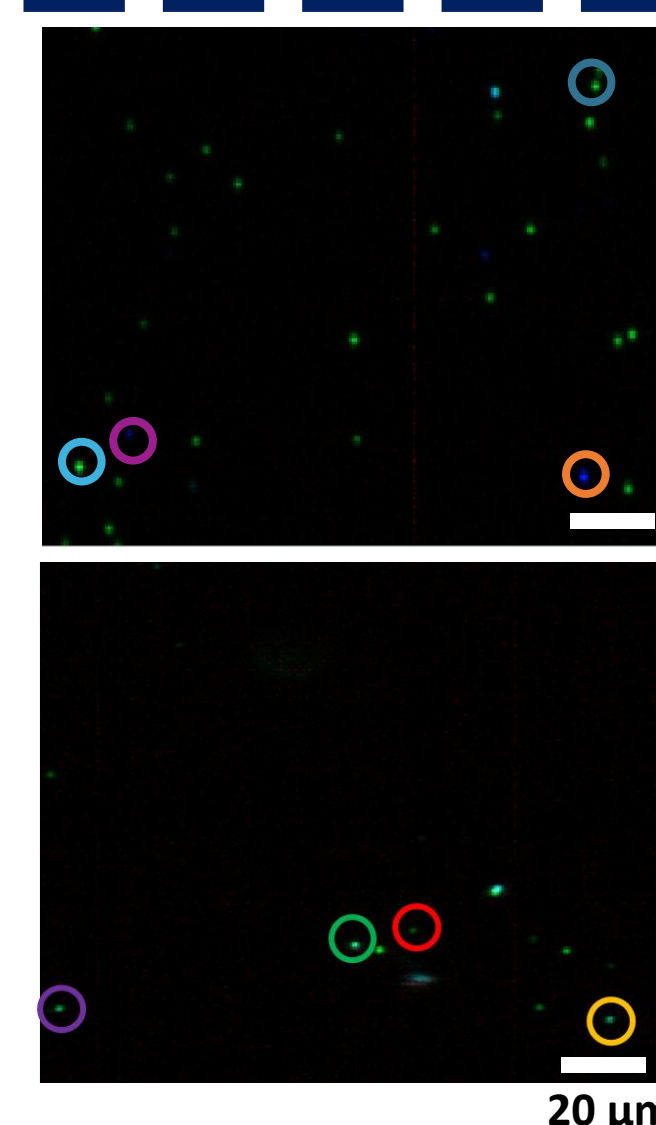
Conclusion and Future outlook

- DFM観察下における, Hetero oligomer輝点色の観察に成功
- Hetero oligomer輝点の機械学習手法を用いた分析によりBSA抗体検出に成功

- ハイパースペクトルイメージング(HSI)を用いた検出手法の開発(右図)
⇒スペクトルを用いた粒子の分類の可能性を示唆
- 機械学習的手法の向上化
 - スペクトルベースの分類化
⇒スペクトルデータの取り込み可能な環境構築する必要がある
 - 従来の手法(SVM, RF)に加えて新たな解析手法(畳み込みニューラルネットワークなど)の検討
⇒分類時の正確性が高く, 微小な変化でさえも認識可能



HSIを用いた
[BSA抗体] = 0 µg/mLの時の
AuNPとAgNPのスペクトル



HSIを用いた
[BSA抗体] = 10 µg/mLの時の
Hetero oligomerのスペクトル