

Technical note

SEP 2026



MoxiePlex[®]

マルチスペクトラルイメージングシステム

目次

目次	2
1. アンミキシング	3
1-1. 導入	
1-2. アンミキシングの原理	
1-3. アンミキシングの効果	
1-3-1. リニアアンミキシングの実例	
1-3-2. 多重蛍光染色サンプルの評価	
1-3-3. 自家蛍光の検出とアンミキシングの考え方	
1-3-4. 自家蛍光とターゲットのスペクトル特性	
1-3-5. 励起条件による信号の違い	
1-3-6. 実際のスキャン画像での確認	
1-3-7. 自家蛍光スペクトルの抽出とアンミキシングの効果	
1-4. アンミキシングのプロセス	
1-5. 当社の技術	
2. 試薬互換性	10
2-1. 導入	
2-2. MoxiePlex の技術的優位点	
2-3. 主要試薬の組み合わせ例	
2-3-1. 主要試薬の組み合わせ一覧	
2-3-2. Celnovte / TSA	
2-3-3. Vizgen / In-situ Plex (OmniVUE / U-VUE)	
2-3-4. Navinci / PLA	
2-3-5. Molecular Instruments / HCR (RNA-FISH / IF)	
3. 蛍光マクロ	14
3-1. 導入	
3-2. MoxiePlex の技術的優位性	
3-3. 当社の技術	
3-3-1. 5色サンプルの実例	
3-3-2. 無染色サンプルの実例	
3-3-3. 単色サンプルの実例	
参考文献	16

1. アンミキシング

1-1. 導入

組織切片のホールスライドイメージング (WSI) は、作成した組織標本の全体を高倍率のデジタル画像として取得し、組織内の細胞の形態や分布から疾患に関する異常を確認する方法であり、研究から医療まで幅広く利用されている。可視化のためにさまざまな染色法が用いられているが、HE 染色は核と細胞質を染色し、明視野観察により組織の形態を確認する一般的な方法である。

一方、免疫抗体染色法（抗体を対象抗原に結合させ、その位置に色素を結合または局在化させて検出する方法）や、In-situ ハイブリダイゼーション（対象の DNA や mRNA と相補的な塩基配列を持つプローブを結合させ、プローブに結合した色素を検出する方法）では、明視野観察や蛍光観察により、対象となるバイオターゲットの空間的分布を可視化することができる。これらの手法は、コンパニオン診断や確定診断にも利用されている。

近年では、多重化された蛍光免疫抗体染色法の開発が進み、同一組織切片上で複数のバイオターゲットを同時に染色することが可能となった。これにより、異なる細胞型の同定や、細胞間相互作用を In-situ かつ細胞以下の分解能で解析できるようになり、さまざまな分野での活用が進められている。

多重蛍光染色の発展には、試薬の進歩だけでなく、染色、画像取得、画像処理・解析といったワークフロー全体にわたる技術革新が寄与している。特に画像取得においては、高スループット化や高画質化への要求が高まっている。

一方で、蛍光イメージングには本質的な課題も存在する。蛍光色素は、その分子構造に由来して特定の励起波長域および蛍光波長域を有している。例えば一般的な蛍光顕微鏡では、使用する色素に応じて励起光源や、励起用・蛍光用バンドパスフィルタ、ダイクロイックミラーを選択し、特定の蛍光波長のみを検出するように設計されている。

しかし、ある励起光によって複数の色素が同時に励起されたり、特定の波長領域に複数の蛍光色素の発光スペクトルが重なったりする場合、異なる色素由来の信号が混在する。この現象はクロストーク（またはブリードスルー）と呼ばれ、目的とするバイオターゲットの発現量検出の精度を低下させ、解析結果の不確実性を高める要因となる。さらにクロストークは、多重染色における染色数を制限する要因であり、高多重アッセイの開発において重要な課題である。

また、組織切片の蛍光観察では、自家蛍光 (autofluorescence) も重要な問題である。自家蛍光とは、特定の蛍光色素による染色を行わなくても、組織や細胞自体が発する蛍光のことであり、蛍光色素由来の特異的信号と重なり、画像解析を困難にする要因となる。

自家蛍光は組織中のさまざまな成分に由来し、例えばコラーゲン、エラスチン、NADH、フラビンなどの生体分子が知られている。また、組織の固定や処理に用いられる化学物質も自家蛍光の原因となる場合がある。

本資料では、これらの課題に対するアプローチとしてアンミキシング技術を取り上げ、さらに MoxiePlex を活用した場合のアンミキシングの効果について説明する。

1-2. アンミキシングの原理

多重蛍光染色におけるアンミキシングは、混合された信号を元の成分に分解する手法であり、観測された信号が複数の起源信号の線形または非線形な組み合わせとして表されるという仮定に基づく。これに基づき、リニアアンミキシング [1] およびノンリニアアンミキシング [2] などの手法が報告されている。本稿では、リニアアンミキシングに焦点を当てて説明する。

例として、3つの蛍光色素 (Dye1 ~ 3) を図 1-1 のように配置した場合の蛍光イメージングを考える。また、図 1-2 に各色素の励起スペクトルおよび蛍光スペクトル、さらに励起フィルタおよび蛍光フィルタの分光透過率を示す。励起光は、励起フィルタの透過する全波長域にわたってサンプルに照射されるものとする。

色素、励起光、およびフィルタセットにおいてクロストークが生じない理想的条件 (図 1-2-A、1-2-B) では、各励起光 (EX_B、EX_G、EX_R) に対して各色素の信号は完全に分離され、それぞれ対応する画像が取得される (図 1-3-A)。

一方、各励起光により複数の色素が励起され、さらに複数の蛍光色素の発光が蛍光フィルタ (EM_B ~ EM_R) で重なって検出されるようなクロストークが生じる場合 (図 1-2-C、1-2-D)、Dye1 ~ 3 の信号は完全には分離されず、各励起光に対して複数色素の信号が混在した画像が観測される (図 1-3-B)。



図 1-1

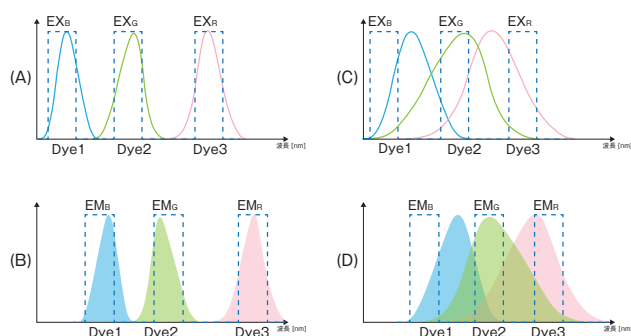


図 1-2:

(A) 理想的なイメージングシステムでの色素の励起スペクトルと励起フィルタの分光透過率

(B) 理想的なイメージングシステムでの色素の発光スペクトルと蛍光フィルタの分光透過率

(C) クロストークが生じるシステムでの色素の励起スペクトルと励起フィルタの分光透過率

(D) クロストークが生じるシステムでの色素の発光スペクトルと蛍光フィルタの分光透過率

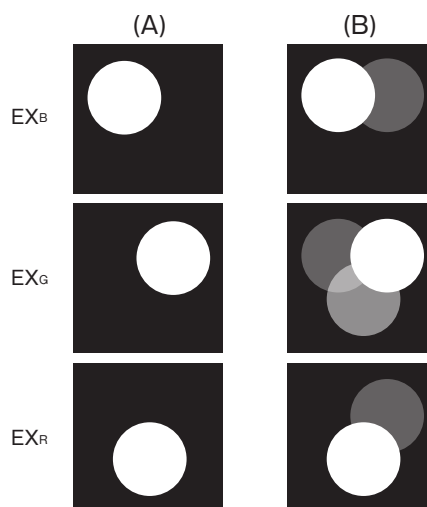


図 1-3

図 1-3-B に示すようなクロストークによって混合された信号が線形モデルに従うと仮定すると、各励起光に対する各色素の寄与は、測定条件における相対信号量として表すことができる。この関係をライブラリ行列 A として定義し、励起光を行、色素の相対信号量を列とする行列として表す。

$$A = \begin{pmatrix} 1 & 0.3 & 0 \\ 0.3 & 1 & 0.4 \\ 0 & 0.2 & 1 \end{pmatrix}$$

図 1-3-A の理想的なイメージング条件では、各励起光が単一の色素のみに対応するため、ライブラリ行列 A は対角成分が 1 でそれ以外が 0 となる単位行列となる。真の色素画像 X と観測画像 Y は、ライブラリ A を用いて次式の関係で表される。

$$Y = AX + N$$

ここで、X および Y はそれぞれ励起光を行、ピクセル番号を列とする行列であり、N はノイズを表す。観測された Y とライブラリ A が既知である場合、次式によりアンミキシング後の画像 X' を求めることができる。

$$X' = (A^T A)^{-1} A^T Y$$

これがリニアアンミキシングである。リニアアンミキシングは、 $\|Y - AX\|$ を最小化するように X' を推定する手法であり、得られる X' は真の信号 X の近似解である点に留意する必要がある。

1-3. アンミキシングの効果

1-3-1. リニアアンミキシングの実例

図 1-4 に示すように蛍光テープを配置し、MoxiePlex により明視野画像およびクロストークが生じる条件下で蛍光画像を取得した。図 1-6 左側に示すように、クロストークが生じる条件下での蛍光画像では、複数色の蛍光テープのラインが重なって観測される。

一方、リニアアンミキシング処理を適用した結果を図 1-6 右側に示す。アンミキシング後の画像では、各蛍光テープのラインが独立して分離されており、その配置が図 1-5 に示す蛍光テープ配置の概念図（明視野相当）と対応していることが確認できる。

次に、定量性について検討する。Dye1 のアンミキシング後の画像およびラインプロファイルを図 1-7 に示す。画像中の点線に沿ったラインプロファイルを、対応する色で画像周囲に重ねて表示している。

蛍光テープの縦方向および横方向の重なり方に応じて観測信号は変化するが、縦および横のラインプロファイルにおいて、それぞれ異なる信号強度の変動が明確に確認される。この結果から、アンミキシングによって得られる蛍光信号が定量性を有していることが示される。

さらに、アンミキシング処理は自家蛍光の低減にも有効である。自家蛍光は特有の広いスペクトル特性を有するため、あらかじめライブラリに含める、または背景成分としてモデル化することで、各蛍光色素の信号と分離することが可能となる。その結果、特異的な蛍光信号の抽出精度が向上し、より信頼性の高い画像解析が実現される。



図 1-4：蛍光テープの配置

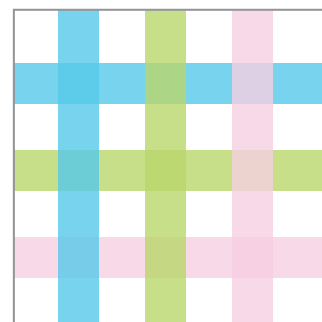


図 1-5：蛍光テープ配置の概念図（明視野相当）

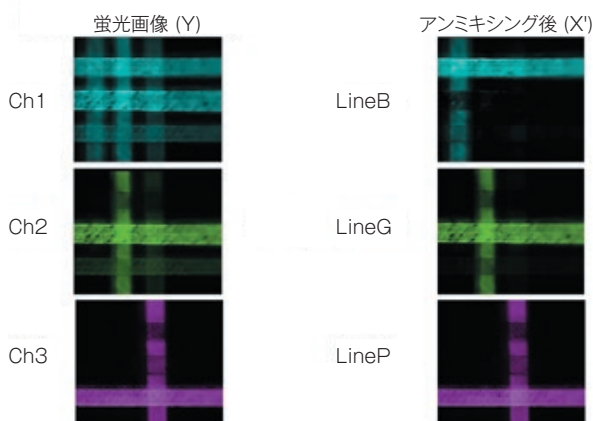


図 1-6：蛍光テープの蛍光画像

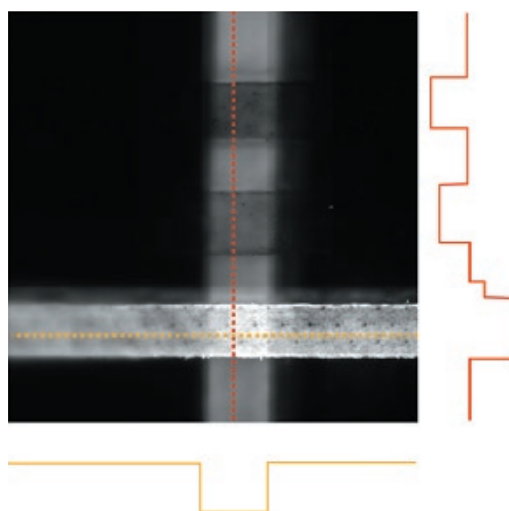


図 1-7：LineP のアンミキシング後の画像とラインプロファイル

1-3-2. 多重蛍光染色サンプルの評価

サンプル情報を表に示す。クロストークが生じる条件で取得したアンミキシング前の画像とアンミキシング後の画像を図 1-8 に示す。アンミキシング後の画像では、自家蛍光成分を含めたライブラリを構築し、自家蛍光を分離・除去した蛍光画像を表示している。一方、アンミキシング前の画像では、自家蛍光の影響によりバックグラウンド信号が増加し、アンミキシング後の画像と比較して、対象バイオターゲットの信号識別が困難となる。これに対しアンミキシング後の画像では、各色素の信号が識別可能であるとともに、自家蛍光の影響が低減されている。その結果、特定のバイオターゲット由来の信号を高い精度で抽出できていることが確認される。

具体的な事例として、図 1-9 に示す各色素のアンミキシング前後の画像を用いて説明する。左図がアンミキシング前、右図がアンミキシング後である。まず、CM480、CM520、CM570 など、自家蛍光が強く発現しやすい低波長側のチャンネルでは、アンミキシング前の画像ではバックグラウンドに自家蛍光が大きく載っている様子が確認できる。一方、アンミキシング後の画像では、バイオマーカーの輝度を保ったまま、バックグラウンドの自家蛍光成分が低減されていることが分かる。また、CM780 においては、アンミキシング前の画像の左下に CM690 / CK のクロストークが確認できるが、アンミキシング後の画像では、このクロストークが適切に低減されていることが確認できる。

この結果から分かるように、高精度なアンミキシングを実現することで、自家蛍光などのバックグラウンド成分や、他の色素の漏れ込みであるクロストークを効果的に低減できる。その結果、バイオターゲットの認識精度が向上し、次工程である画像解析の精度向上や、マニュアル操作工程の削減にも貢献する。

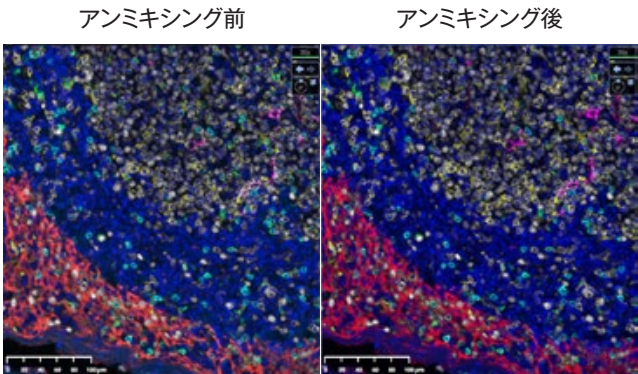


図 1-8：多重蛍光画像

Pseudocolor	Reagent (Celnovte)	Target	Expression
Cyan	CM480	CD8	Cytoplasm
Green	CM520	CD3	Cytoplasm
Yellow	CM570	CD4	Cytoplasm
Magenta	CM620	CD163	Cytoplasm
Red	CM690	CK	Cytoplasm
White	CM780	Ki67	Nuclear
Blue	DAPI	Nuclear	Nuclear

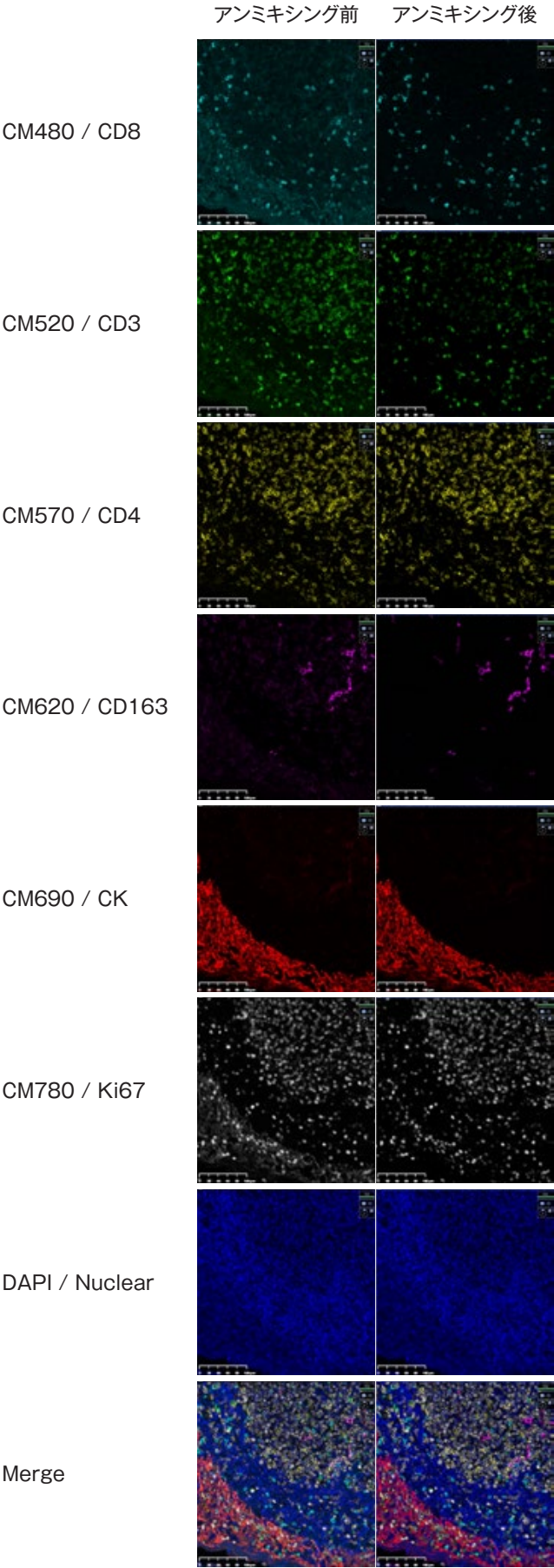


図 1-9：各色素ごとのアンミキシング

1-3-3. 自家蛍光の検出とアンミキシングの考え方

自家蛍光は、赤血球などの組織由来の成分が広い波長帯で発光するため、複数の検出チャンネルにまたがって観測される。そのため、ターゲット蛍光と混在し、正しい信号抽出を妨げる要因となる。

まず、自家蛍光の影響を直感的に理解するために、自家蛍光チャンネルの表示 / 非表示を比較した例を図 1-10 に示す。左図が自家蛍光チャンネル表示、右図が自家蛍光チャンネル非表示である。

一番上の図では、血管内に多数の赤血球由来の自家蛍光が確認できる。自家蛍光成分を正しく検出することで、バイオターゲットの信号と自家蛍光を別々のチャンネルとして区別できる。

中央の図では、FoxP3 (核) を黄色で表示している。FoxP3 の核シグナルは自家蛍光に埋もれやすく、自家蛍光を考慮しない場合、正しい核の検出が困難となる。しかし、正しくアンミキシングすることで、バイオターゲットの核シグナルを明瞭に抽出できる。

一番下の図では、染色に起因するアーチファクトが確認できる。これらもターゲットとは異なるスペクトル特性を持つため、スペクトル情報に基づいて分離することが可能である。

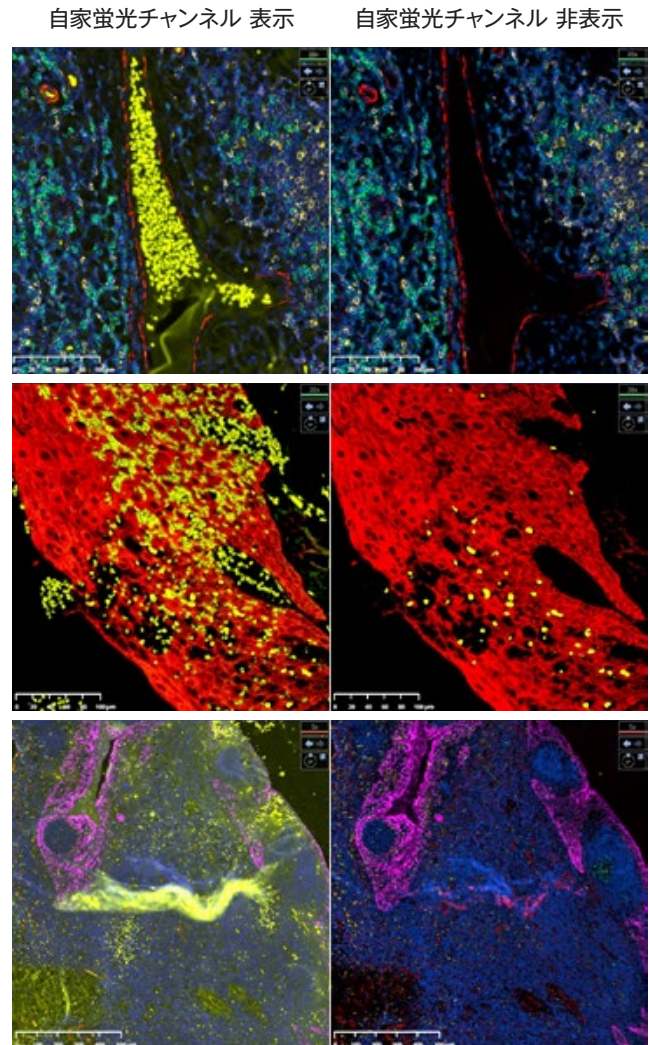


図 1-10：自家蛍光チャンネルの表示 / 非表示を比較した例

左図：自家蛍光チャンネル表示

右図：自家蛍光チャンネル非表示

血管内の赤血球由来の自家蛍光、FoxP3 (核) 信号の埋もれ、染色アーチファクトなど、自家蛍光や非特異的信号がどのように観測されるかを示す。自家蛍光を正しく検出し、アンミキシングすることで、ターゲット信号の抽出が容易になる。

1-3-4. 自家蛍光とターゲットのスペクトル特性

自家蛍光とターゲット蛍光のスペクトル、および MoxiePlex のフィルタ情報を図 1-11 に示す。ここではターゲットとして Opal 480 を例に説明する。

- ・赤血球の蛍光スペクトル：非常にブロードで、複数の検出チャンネルにまたがって観測される
- ・ターゲット蛍光 (Opal 480)：自家蛍光よりも波長幅が狭く、特定のチャンネルに集中して観測される

この違いが、アンミキシングによる分離の根拠となる。

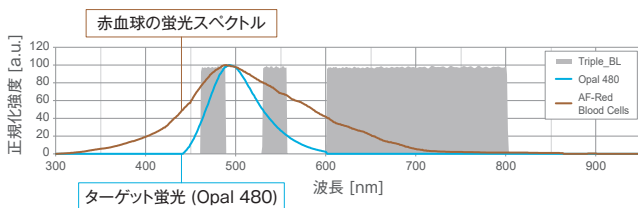


図 1-11：自家蛍光とターゲット蛍光のスペクトル特性

赤血球由来の自家蛍光は非常にブロードな蛍光スペクトルを示し、複数の検出チャンネルで観測される。一方、ターゲット蛍光 (例：Opal 480) は波長幅が狭く、特定のチャンネルに集中して観測される。これらのスペクトル特性の違いが、アンミキシングによる信号分離の根拠となる。

1-3-5. 励起条件による信号の違い

Opal 480 と自家蛍光の励起スペクトルを図 1-12 に示す。

1. Blue 励起：Opal 480 と赤血球の両方が励起される
2. Green 励起：赤血球由来の自家蛍光のみが励起される
3. Orange 励起：赤血球由来の自家蛍光のみが励起される

蛍光スペクトルの図と合わせて見ると、以下のことがわかる。

- ・Blue 励起 → ターゲット+自家蛍光が混在
- ・Green / Orange 励起 → 自家蛍光のみが観測される

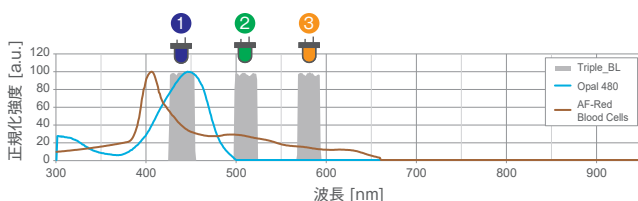


図 1-12：Opal 480 と自家蛍光の励起スペクトル

Blue 励起では Opal 480 と赤血球の両方が励起されるが、Green および Orange 励起では赤血球由来の自家蛍光のみが励起される。励起条件の違いにより、ターゲット信号と自家蛍光を分離するための情報が得られる。

1-3-6. 実際のスキャン画像での確認

図 1-13 に、Blue、Green、Orange 励起の実画像と、それらを重ね合わせた画像を示す。

- ・右上：Blue 励起 → ターゲットと自家蛍光が混在
- ・左下：Green 励起 → 自家蛍光のみ
- ・右下：Orange 励起 → 自家蛍光のみ
- ・左上：3 画像の重ね合わせ

3 つの画像を重ねると、以下のことからスペクトル情報に基づく分離が可能である。

- ・白色領域：3 条件すべてで観測 → 自家蛍光
- ・Cyan 色領域：Blue のみで観測 → ターゲット (Opal 480)

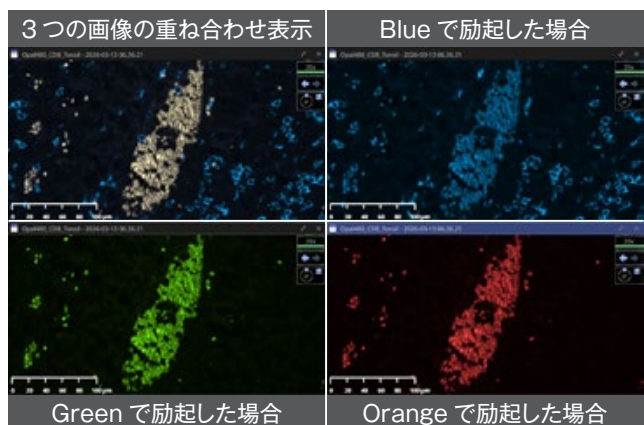


図 1-13：励起条件ごとの実画像と重ね合わせ画像

- 右上：Blue 励起 (ターゲット+自家蛍光)
- 左下：Green 励起 (自家蛍光のみ)
- 右下：Orange 励起 (自家蛍光のみ)
- 左上：3 画像の重ね合わせ

重ね合わせ画像では、3 条件で共通して観測される領域 (白色) が自家蛍光、Blue のみで観測される領域 (Cyan) がターゲット信号に対応する。

1-3-7. 自家蛍光スペクトルの抽出とアンミキシングの効果

複数の励起条件で画像を取得することで、自家蛍光のスペクトル情報を高精度に抽出できる。自家蛍光を観測するチャンネル数が多いほど、そのスペクトル特性をより正確に捉えることができ、結果として自家蛍光の効果的な低減が可能となる。さらに、アンミキシング後の画像では、以下の効果が得られる。

- ・バイオターゲットの輝度を保ったまま自家蛍光を低減
- ・他色素の漏れ込み (クロストーク) も抑制
- ・バイオターゲットの認識精度が向上
- ・画像解析工程の精度向上
- ・マニュアル操作工程の削減

1-4. アンミキシングのプロセス

アンミキシングのプロセスは、以下のステップで構成される。

1. ライブラリの作成：使用する蛍光色素および測定条件に応じたライブラリを作成する。
2. 画像取得：複数の色素が混在した蛍光画像を取得する。
3. アンミキシング処理：観測画像とライブラリを用いてデータ処理を行い、アンミキシング後の画像を生成・保存する。

これらを実行するためには、いくつかの準備が必要となる。本章では、そのポイントと運用上の課題について説明する。

ライブラリの作成

ライブラリは使用する蛍光色素および測定系に依存するため、測定対象サンプルに応じて事前に作成しておく必要がある。ライブラリの作成では、単一色素で染色されたサンプルを用い、多重染色サンプルのイメージング計測と同等の条件で画像を取得する必要がある。また、アッセイ条件やイメージングシステムに変更が生じた場合にはライブラリを更新する必要があり、実運用においては時間およびコストの負担が課題となる。

画像取得

画像取得では、ライブラリと対応した測定条件において、十分な信号強度を有する高品質な画像を取得する必要がある。そのため、信号の飽和や低信号状態を回避するよう最適な露光条件を設定しなければならない。

アンミキシング処理

アンミキシング処理では、ホールスライドイメージング (WSI) データを対象とするため、大規模なデータ処理が必要となる。そのため、処理には十分なメモリ容量が求められるとともに、処理時間がボトルネックとならないよう高速な演算処理が必要となる。

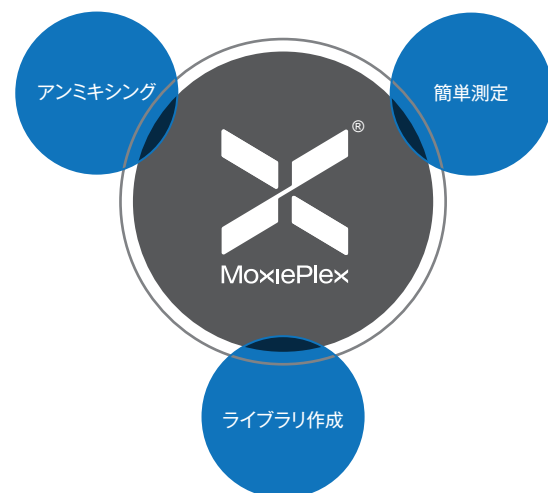
1-5. 当社の技術

MoxiePlex は、アンミキシング運用における課題を解決する独自機能を有している。

ライブラリの作成機能では、単一染色サンプルから各蛍光色素のスペクトル情報を取得し、これをもとにライブラリを構築する。また、アッセイ条件やイメージングシステムの変化に応じてライブラリを更新する機能を備えている。さらに、自家蛍光を有するサンプルに対しても、自家蛍光成分を含めたライブラリの構築が可能である。

簡単測定機能では、ライブラリに対応した測定条件（スキャンプロファイル）を連動して適用することにより、パラメータ設定や管理の煩雑さを低減する。また、測定時には最適な画像品質となるよう、測定パラメータを自動的に調整する機能を有している。

アンミキシング機能は、ライブラリに基づくリニアアンミキシング処理として、スキャンと同時にリアルタイムで実行することが可能である。これにより、データ処理時間の短縮およびデータ容量の削減といった課題を解決できる。



ライブラリの作成

- ・ライブラリ更新機能
- ・自家蛍光のライブラリも作成

簡単測定

- ・ライブラリとスキャンプロファイルの連動
- ・パラメータ自動設定

アンミキシング

- ・リニアアンミキシング処理
- ・リアルタイム処理

2. 試薬互換性

2-1. 導入

多重蛍光染色技術の高度化に伴い、解析対象となるバイオマーカーの種類や組み合わせは急速に多様化している。このような背景から、イメージングシステムには特定のベンダーや限定的な染色系に依存することなく、多様な蛍光試薬およびパネル試薬を柔軟に受け入れられる高い汎用性が求められている。

MoxiePlex は、図 2-1 で示すように 400 nm ~ 900 nm の広帯域において高い量子効率を有する検出系と、多波長励起および分光分離を前提とした光学設計を採用することで、一般的な蛍光色素から高度に多重化されたパネル試薬まで、幅広い試薬選択に対応可能なプラットフォームとして設計されている。これにより、研究者は解析目的に応じて最適な抗体・色素・増幅系を選択でき、特定の試薬構成に制約されることなくアッセイ設計を行うことができる。

さらに、多数の試薬に対応できることは、単に染色数を拡張することを意味するのではなく、異なる試薬メーカーや異なる染色原理 (TSA、バーコード、FISH など) を横断的に統合し、同一ワークフロー上で評価できる点に本質的な価値がある。

MoxiePlex は、このような要求に対し、アンミキシングを前提とした画像取得および解析ワークフローを構築することで、多様な蛍光試薬の組み合わせを実質的に活用可能とする統合プラットフォームを実現している。これにより、スペクトル特性の異なる複数の蛍光信号を高精度に分離・定量することが可能となり、従来は併用が難しかった試薬系の組み合わせにも柔軟に対応できる。

さらに、このような試薬互換性は、将来的な新規試薬の導入や新たなパネルへの対応に対する高い拡張性を提供し、継続的な技術進展に対応可能な基盤となる。

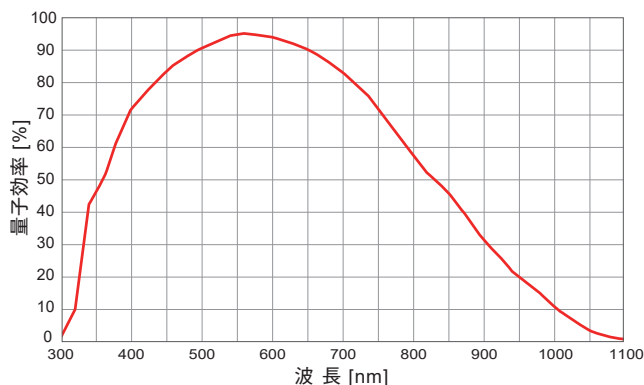


図 2-1：分光感度特性

2-2. MoxiePlex の技術的優位点

試薬由来のスペクトル重なりや自家蛍光の影響を低減し、高い再現性と定量性を担保するこのような試薬対応力は、探索研究からトランスレーショナル研究、さらには LDT (Laboratory Developed Test) や将来的な臨床応用を見据えたアッセイ開発において、技術的自由度と将来拡張性を両立する上で極めて重要であり、MoxiePlex の中核的な特長の一つである。

2-3. 主要試薬の組み合わせ例

2-3-1. 主要試薬の組み合わせ一覧

	DAPI	CFP	FITC	YFP	TRITC	mCherry		Cy5		Cy7
Akoya Opal 7-plex A	DAPI	Opal 480	Opal 520	-	Opal 570	Opal 620	-	-	Opal 690	Opal 780
Akoya Opal 7-plex B	DAPI	Opal 480	Opal 520		Opal 570	Opal 620	Opal 650	-	Opal 690	-
Akoya Opal 9-plex	DAPI	Opal 480	Opal 520	Opal 540	Opal 570	Opal 620	Opal 650	-	Opal 690	Opal 780
Vizgen In-situ Plex	DAPI	-	ATTO488	-	-	ATTO590	-	ATTO647N	-	Alexa750
Cell signal Technology Signal star	DAPI	-	Alexa488	-	-	Alexa594	-	Alexa647	-	Alexa750
ThermoFisher Alexa	DAPI	-	Alexa488	-	Alexa555	Alexa594	-	Alexa647	-	Alexa750
Roche Discovery	DAPI	DCC	FAM	Rho6G	-	Red 610	-	Cy5	-	-

[NOTES]
Rho6G : Rhodamine 6G

2-3-2. Celnovte / TSA

Celnovte の CelMaxTSA は、未標識の一次抗体（通常の一次抗体）を用いた Tyramide Signal Amplification (TSA) に基づく多重蛍光免疫染色技術により、高プレックス解析を実現する試薬である。本アプローチにより、一次抗体の事前標識を必要とせず、既存の抗体資産を活用した柔軟なパネル設計が可能となる。本試薬は、FFPE（ホルマリン固定パラフィン包埋）サンプルに対応した mIHC ワークフロー向けに設計されており、高い信号強度と明瞭な組織局在に加え、低バックグラウンドを実現する。

さらに、Celnovte 独自の MicroStacker™ ポリマーテクノロジーにより、高感度かつ高特異性の検出を可能とし、複雑な組織環境においても高精度な解析を実現する。本試薬は MoxiePlex と組み合わせることで、最大 9 色の空間生物学イメージングに対応する。また、手動および自動染色の双方に対応した簡易化プロトコルが提供されており、Celnovte 製および他社製プラットフォーム上でワークフロー検証が行われているため、既存設備へのスムーズな導入が可能である。

Reagent (Celnovte)	Pseudocolor
DAPI	Blue
CD8	Light blue
CD3	Green
CD4	Yellow
CD21	Red
CK	Pink
CD163	Orange
CD23	Light Green
CM780	White

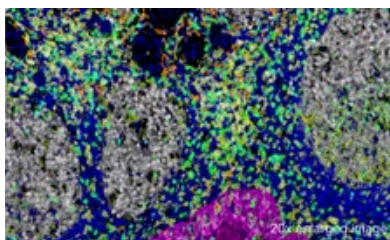


図 2-2：パラフィン包埋ヒト扁桃サンプルの 9 色重ね合わせ画像

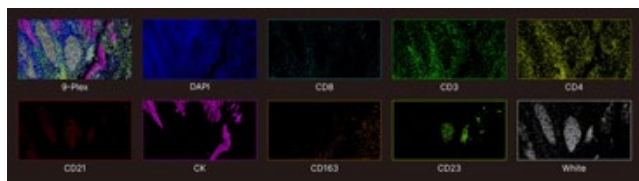


図 2-3：チャンネル画像表示

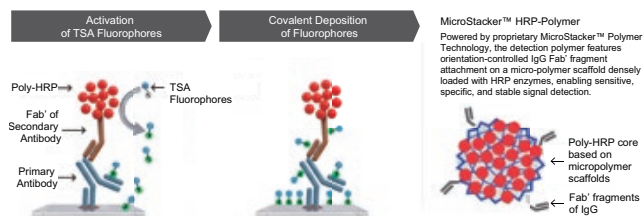


図 2-4：MicroStacker ポリマー技術による駆動

MicroStacker HRP ポリマーは、マイクロポリマースキャフォールド上に配向制御された IgG の Fab 断片を結合し、HRP 酵素を高密度に担持した検出ポリマーである。この構造により、高感度かつ高特異性を維持しながら、安定した信号検出が可能となる。

2-3-3. Vizgen / In-situ Plex (OmniVUE / U-VUE)

OmniVUE および U-VUE アッセイでは、DNA バーコードを結合した一次抗体を使用する。これらの抗体コンジュゲートは、固定化された組織または細胞サンプル中の目的タンパク質を同定するために用いられ、単一の染色ステップで処理することが可能である。

抗体コンジュゲートの混合液でサンプルをインキュベートした後、各ターゲットに対応する DNA バーコードを増幅することで、アッセイの感度を向上させる。この増幅は、すべてのターゲットに対して同時に行われる。その後、バーコード配列に相補的な蛍光プローブをサンプルに添加し、各イメージングラウンドにおいてターゲットを順次結合・標識する。1 回のイメージングラウンド内では、各ターゲットはスペクトル的に異なる蛍光色素で標識されるため、各シグナルを独立して検出でき、全スライドのマルチプレックスイメージングが可能となる。高プレックスアッセイでは、イメージングラウンド間で蛍光プローブを交換するため、穏やかな信号除去（ストリッピング）ステップが用いられる。

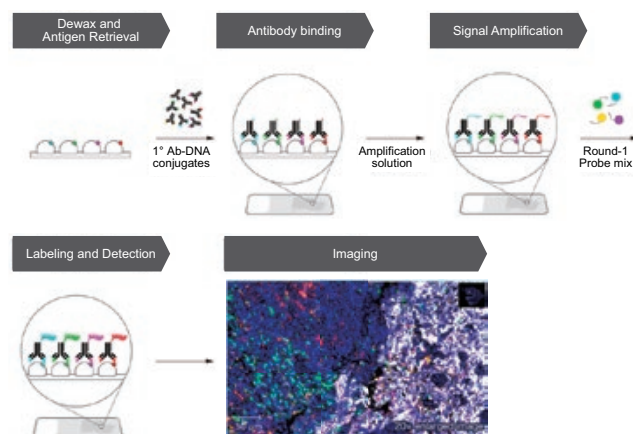


図 2-5：In-situ Plex の染色原理

2-3-4. Navinci / PLA

Naveni の In-situ 近接ライゲーションアッセイ (PLA) は、分子間の近接を明るく局在した DNA 信号に変換し、細胞および FFPE 組織中におけるタンパク質間相互作用や修飾状態を可視化する技術である。

抗体に結合したオリゴヌクレオチドプローブは、互いに近接して結合した場合にのみ環状テンプレートを形成し、これを起点としてローリングサークル増幅が誘導されることで、単一分子レベルの感度を実現する。UnFold/NaveniFlex プローブ設計は、ライゲーション工程を簡素化するとともに、反応効率および信号の再現性を向上させ、バックグラウンドを低減する。増幅産物は蛍光プローブまたは発色プローブにより検出され、標準的なイメージングプラットフォーム上で、マルチプレックスかつ高い空間分解能を有する解析を可能とする。この増幅ベースの検出戦略により、複雑なサンプル中におけるタンパク質ネットワークおよび翻訳後修飾状態の定量的マッピングが可能となる。

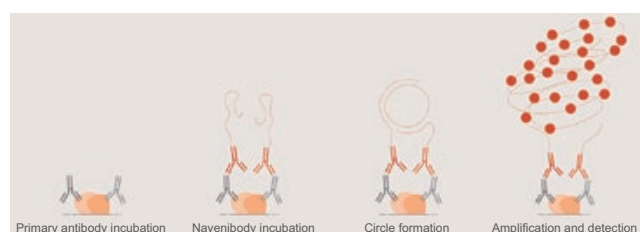


図 2-6: In-situ proximity ligation の原理

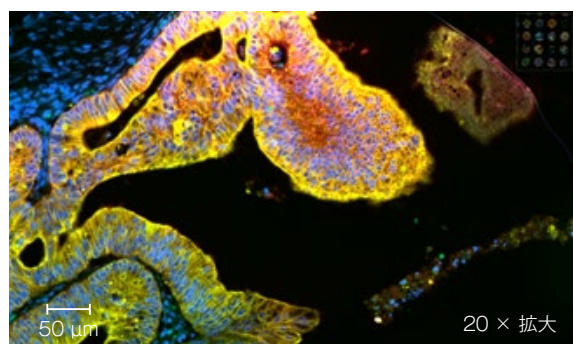


図 2-7: パラフィン包埋ヒト結腸サンプルの 4 プレックス重ね合わせ画像

2-3-5. Molecular Instruments / HCR (RNA-FISH / IF)

Hybridization Chain Reaction (HCR) は、酵素を使用しない等温型の信号増幅技術であり、RNA およびタンパク質の In-situ イメージングにおいて、高い感度と優れた空間分解能を両立する。

HCR では、短い DNA イニシエータープローブが標的 RNA、あるいは抗体に結合したオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、これを起点として蛍光標識された DNA ヘアピンが連鎖的に開裂・重合することで、標的部位に固定化された増幅ポリマーを形成する。ヘアピン構造は、正しく核形成された場合にのみ自己集合するため、HCR は高いバックグラウンド抑制機構を備えており、自家蛍光が高い組織においても優れた信号対ノイズ比を実現する。

さらに、生成された増幅ポリマーは標的部位に局在したまま保持されるため、相対発現量を評価するアナログ定量から、サブ細胞分解能での単一分子カウントに至るまで、幅広い定量的イメージングが可能である。

組織イメージングにおける HCR の重要な特長の一つは、試薬の物理的サイズが小さいことに起因する高い組織浸透性である。HCR イニシエータープローブおよびヘアピンは短鎖 DNA オリゴヌクレオチドで構成されており、酵素や大型の増幅複合体では到達が困難な高密度組織や未処理組織においても効率的に拡散する。このコンパクトなプローブ設計により、過度な透過処理を必要とせず、全胚標本、厚切り脳切片、さらには FFPE 組織においても信頼性の高い浸透性が得られ、形態および空間的コンテキストを保持した解析が可能となる。同様の小型プローブ原理は、RNA-FISH と免疫染色を統合する共通フレームワークの基盤となっており、難浸透性組織においても複数の RNA およびタンパク質ターゲットを同時かつ単一ステップで増幅し、再現性の高い定量解析を可能とする。

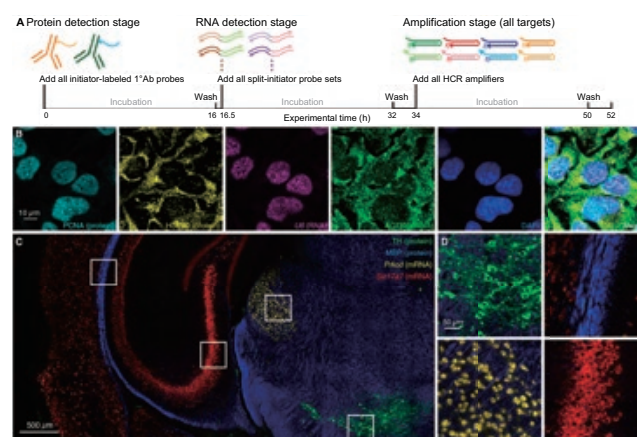


図 2-8: HCR の原理

3. 蛍光マクロ

3-1. 導入

多重免疫蛍光解析において、高い再現性と操作性を両立するためには、サンプル認識や露光条件設定の自動化が不可欠である。しかし、蛍光染色された組織標本は高い透明性を有するため、明視野画像に基づく領域検出やフォーカス設定、露光時間の最適化は本質的に困難であった。

MoxiePlex に搭載された蛍光マクロ機能は、この課題に対する有効なソリューションである。本機能は、低倍率・広視野で取得した蛍光マクロ画像を用いて、撮像前に組織領域の自動認識、最適な露光条件の算出、およびフォーカス位置の設定を行う点に特長がある。蛍光信号そのものを指標として解析を行うため、形態情報が不明瞭なサンプルにおいても安定した制御が可能となる。

本機能は特許技術に基づき実装されており、チャンネルごとに最適な条件設定を行うことで、マルチプレックス蛍光イメージングにおける定量性、再現性、およびワークフロー効率を大幅に向上させる。

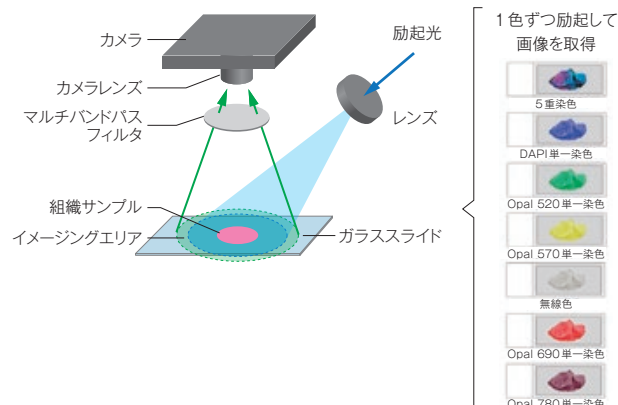
3-2. MoxiePlex の技術的優位性

蛍光染色された組織標本においては、標本自体が高い透明性を有することから、明視野画像のみを用いた領域検出、フォーカス設定、露光条件の最適化は本質的に困難である。

この課題に対し、蛍光マクロ機能では、画像取得前に低倍率・広視野での蛍光マクロ撮影 (Fluorescence Macro Imaging) を行い、その画像に基づいてサンプル認識、露光条件の調整、およびフォーカス位置の設定を自動的に実行する。

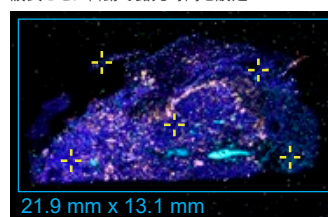
これにより、従来は手動調整に依存していたサンプル認識、露光条件設定、フォーカス制御といった工程を自動化し、多重蛍光イメージングにおける再現性、定量性、および操作性を同時に向上させる。

1. 組織サンプル全体の蛍光イメージング

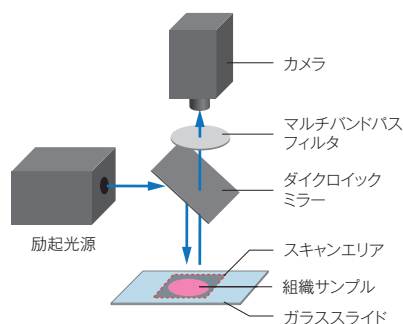


2. 組織サンプルの検出と露光時間の自動算出

波長ごとに自動で露光時間を設定



3. 蛍光画像の取得



3-3. 当社の技術

MoxiePlex における組織認識および露光条件の自動調整は、特許を取得した撮像制御技術に基づいて実現されている。

本技術では、本スキャンに先立ち、蛍光励起を用いた予備スキャンを実施し、蛍光信号の有無および強度分布を解析することで、ガラス領域と組織領域を自動的に識別する。蛍光応答そのものを指標とするため、明視野画像に依存せず、形態が不明瞭なサンプルにおいても安定した組織認識が可能である。認識された組織領域に基づいて撮像範囲が自動的に設定され、不要な背景領域を除外した効率的なスキャンが実現される。

さらに、予備スキャンで得られた蛍光強度ヒストグラムを用いて、信号飽和や低輝度、S/N 状態を定量的に評価し、その結果に基づいて最適な露光条件を演算的に決定する。この露光最適化は蛍光波長、すなわちチャンネルごとに独立して実行されるため、発現量差の大きいマルチプレックス免疫蛍光染色においても高い再現性を確保できる。

これらの処理は、光源制御、フィルタ切替、カメラ取得、画像解析、および撮像条件制御が統合されたシステム構成を前提としており、MoxiePlex は本特許技術を実装することで、組織認識と自動露光制御を高精度かつ高再現性で実現している。

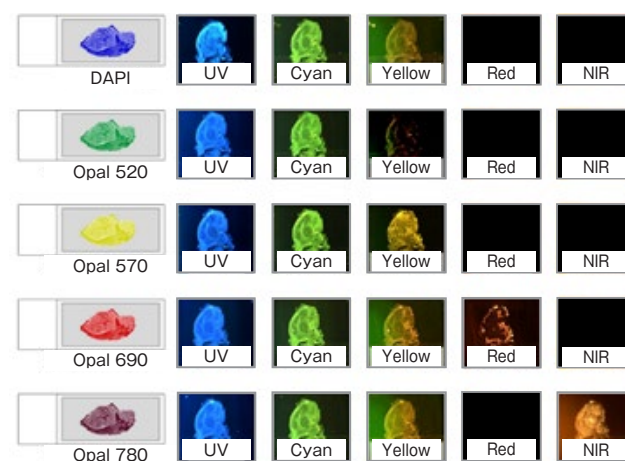
特許：JP7640821B1 - 画像取得装置及び画像取得方法

3-3-3 単色サンプルの実例

Fluo-macro 機能を用いて単色サンプルを観察した。各サンプルについて、UV、Cyan、Yellow 励起における自家蛍光画像を取得することが可能であった。

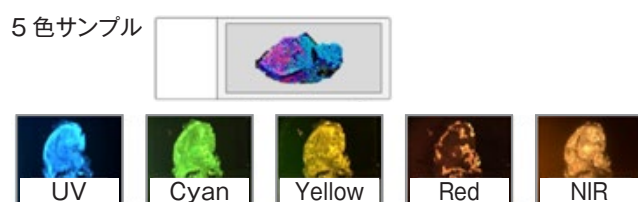
DAPI は UV 励起下において自家蛍光とは異なる信号を示すため、核由来の信号が観測される場合がある。同様に、他の励起波長においてもサンプル由来の信号が検出された。

MoxiePlex では、これらの Fluo-macro 画像を用いることで、フォーカス位置および露光条件の自動設定を可能としている。



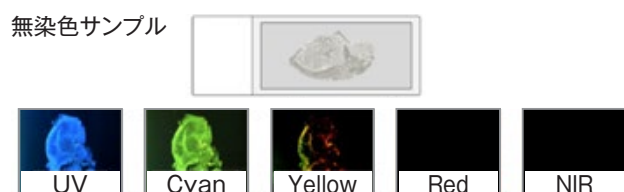
3-3-1 5色サンプルの実例

Fluo-macro 機能を用いて 5 色サンプルを観察した結果、任意の励起波長において蛍光画像を取得可能であることを確認した。



3-3-2 無染色サンプルの実例

Fluo-macro 機能を用いて無染色サンプルを観察した結果、UV、Cyan、Yellow の各励起条件において、自家蛍光画像を取得可能であることを確認した。



参考文献

アンミキシング： - “Spectral Imaging and Linear Unmixing in Light Microscopy” by Zimmermann T. (Adv Biochem Eng Biotechnol. 2005;95:245-65.)

ノンリニアアンミキシング： - “Nonlinear unmixing of hyperspectral images: models and algorithms” by Dobigeon N. et al. (IEEE Signal Processing Magazine. 2014;31 (1):82-94.)

- MoxiePlex、 は、浜松ホトニクス（株）の登録商標です。
- その他の記載商品名、ソフトウェア名などは該当商品製造会社の商標または登録商標です。
- カタログに記載の測定例は代表例を示すもので、保証するものではありません。
- カタログの記載内容は 2026 年 9 月現在のものです。本内容は改良のため予告なく変更する場合があります。