ポイントオブケア診断を前進させる「空間変調放射」

ピーター・キーゼル、イェルク・マルティーニ、マルクス・ベック、マルテ・ハック、マーシャル・ベルン、ノーブル・ジョンソン

ロバスト、小型、低コストの「空間変調放射」技術は高い信号対雑音（SN）比での識別を可能にし、実用的なオプトフルイディック・バイオ検出を中央集中検査室から持ち出し、患者のポイントオブケア（POC）へと近づける。

現在、POC検査用の小型、ロバスト、低コストの装置は簡単には手に入らないため、生物学と生物医学上の試験の多くは中央集中検査室で実施されている。しかし、POC検査に対するニーズは存在し、その戦略的展望は真に破壊的に変わりつつある。低いコストで適時に検査結果を得て、死亡率を下げ、罹患率を低くするということがこのニーズの原動力である。

フローサイトメータは中央集中検査室にはなくてはならないツールである。しかし、それらのコスト、複雑さ、サイズがPOC診断や環境または産業モニタリングへの適用を阻んでいる。フローサイトメトリは、流体流内の装置を通って流れる生物細胞の物理的／化学的性質を測定するプロセスである[(1)、(2)]。最新の市販装置は、事実上すべてが生体粒子と光との相互作用を利用し、蛍光、散乱、吸収プロセスを通して特性を解析している。そして、いずれの場合にも使用する基本的な光学配置は同じである。つまり、生体分子は極端に局在化されたスポットを通って高速（一般に6m/s）で移動するため、その照明は非常に強くなり、一般的には光学系（レンズ、反射鏡、開口、フィルタ）の複雑な配列が必要になる。この10年間、流動解析物の評価を単純化、小型化するために、流体ハンドリング（ポンピング、混合、フローフォーカシング）と小型光学系を統合した微小流体チャネルを利用する多くの興味深い構想が開発された[(3)、(4)]。こうした努力にもかかわらず、依然として、小型、低コストの装置は市販されていない。これを解決し、POC検査のニーズに応えるために、米パロアルト研究所（PARC）ではフローサイトメトリ用の光学検出システムを根本的に再設計した。

空間変調蛍光の検出

われわれの技術、いわゆる「空間変調放射」は高いSN比識別を精密光学系なしで実行し、高性能、頑丈さ、コンパクト性、低コスト、使いやすさを組合せたフローサイトメータの実現を可能にする。この実現技術では、連続的に蛍光を放射する生体粒子が光伝送用にあらかじめ決められたパタンを横切った時に、時間依存信号を発生する。検出された信号を既知のパタンと相関させ、背景雑音から粒子信号の高度識

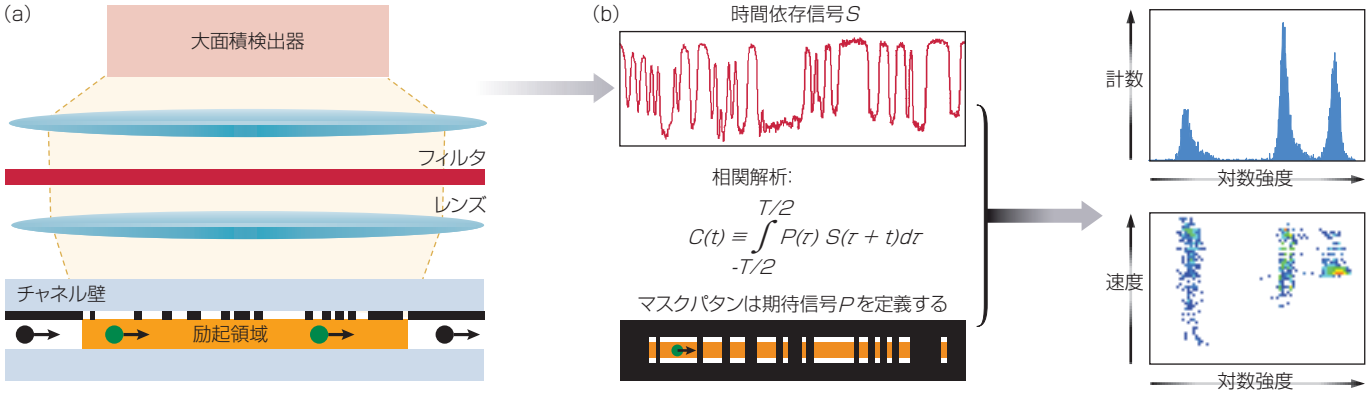

図1　流体チャネルの断面図は空間変調放射のコンセプトを示している（a）。空間パタン化マスクは大面積検出器へと方向付けられた蛍光を変調する。励起光は検出経路のフィルタによってブロックされる。相関分析（b）は、測定された時間変調信号と予測された粒子シグネチャを比較する。それらのデータの評価結果が検出された粒子の強度ヒストグラムと速度プロファイルであり、それぞれから分析物の数と体積を抽出することが可能である。（資料提供：PARC）

別を達成する。

従来のフローサイトメトリは、励起領域のサイズがほぼ粒子のサイズに制限されていた。われわれの方法は、粒子から放射される蛍光の全フラックスを増大させるために、かなり大きな励起面積を利用する。大きな励起面積にもかかわらず、マスクパタンの利用によってミクロン領域の高い空間分解能が達成される。したがって、流れ方向の粒子間隔が個々の粒子のサイズまで接近したとしても、個々の粒子の独立した検出と評価が可能である。さらに、このコンセプトは、溶液中の他の蛍光成分、チャンバの蛍光成分、表面汚染物質などを起源とする背景蛍光に本質的な耐性をもつ。

空間変調蛍光放射法を流体チャネル内の移動する粒子に適用するために、広い励起面積にわたる光検出器への蛍光入射の強度を空間的にパタン化されたマスクで変調した（**図1**）[5]。信号の時間依存性はマスクのストライプの空間構造と粒子の速度によって定義される。記録された信号を相関法で解析し、粒子が検出領域を横切るときの強度と時間を正確に計算した。最先端の実時間相関法を使うことによって、毎秒数mまでの粒子速度を評価できた。

小型プロトタイプ

PARCは、空間変調法に基づくハンドヘルド式フローサイトメータを既製部品から組立てて試験した（**図2**）。最大の部品は低価格の532nmレーザモジュールであり、そのビームは流体チップの研磨されたエンドファセットを通して約1.2×0.1mmの検出面上へと方向付けられる。流体チップは検出ユニットに一体化されている（**図3**）。このアセンブリには安価なコリメータ光学系、励起光用のフィルタ、一体化されたトランスインピーダンスアンプと集光光学系を備えた小型シリコンフォトダイオードが含まれている。パタン化マスクは流体チップに埋め込まれているため、流体チップと検出器ユニット間のアラインメントは必要ない。現在のバージョンで唯一必要なアラインメントは検出領域に向けたレーザビームの方向付けだが、サイズが大きいため、さほど厳しくない。全ユニットは電池式であり、2本の9Vと4本の1.5V電池で10時間以上連続動作させることが十分に可能だ。

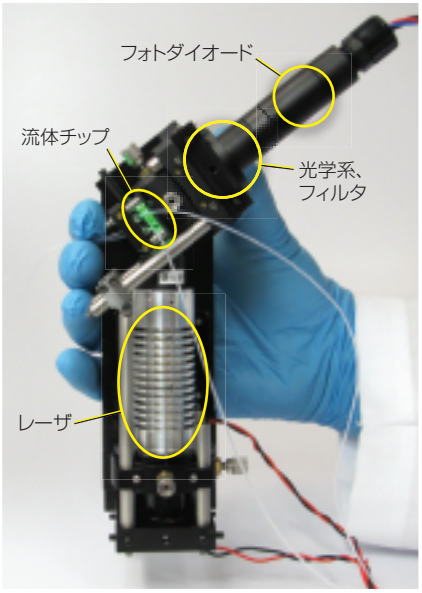

図2　プロトタイプの小型、低価格、電池式のハンドヘルド型フローサイトメータの重量は1ポンド以下であり、同様の重さの電池パックで10時間以上の連続動作が十分に可能である。（資料提供：PARC）

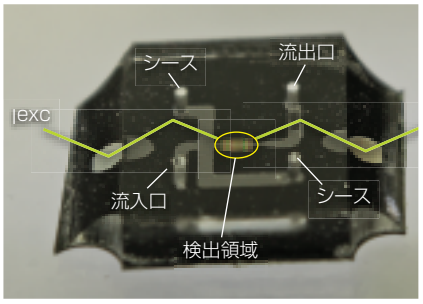

図3　一体化されたパタン化マスクを含む流体チップが示されている。このマスクは、1台の大面積検出器でマルチパラメータ検出を可能にする各種の色のストライプパタンが形成されている。（資料提供：PARC）

部品の大量購入による値引と量産を仮定するならば、ハンドヘルド型POC装置の単位製造コスト目標としての数百ドルも現実味が出てくる。この予想される価格目標は、入手可能または公表されたあらゆる装置の価格に比べて極めて有利である。現在、われわれは流体ハンドリングとデータ収集に市販の注射器ポンプとデスクトップコンピュータを使っている。次のステップでは、流体ハンドリングを安価なスプリング付き注射器の使用によって単純化し、データ評価はノート型パソコンで実行する予定だ。将来的には、データ評価はフィールドプログラマブルゲートアレイ（FPGA）またはスマートフォンで実行されるであろう。プロトタイプに使われた流体チップは内製され、レーザ加工された接着膜を使って2枚のアクリルスライドから組立てられた。将来の流体チップは、使い捨てタイプとなり、射出成形または熱エンボス加工などの大量／低コスト製造技術によって組立てられるであろう。

性能の実証

フローサイトメータの性能を実証するための標準的な方法は既知の濃度の特殊な蛍光体を含浸させた小径のビーズを使用する[6]。この目的に頻繁に使われている蛍光体はフィコエリトリン（PE）色素であり、蛍光強度の単位はマイクロビーズの輝度を定義する「PE等価分子」またはMEPEである。

われわれの小型プロトタイプの検出範囲を2μm径のレインボーキャリブレーションビーズ（米スフェロテック社製RCP20-5）を使って評価した。10μlの溶液中の1万420個の全ビーズを測定することによって、300 MEPEより良い検

出限界が実証された。測定に要した時間は10分以内であった(**図4**)。

MEPEにおける絶対キャリブレーションは、指定のPE強度を持つ市販のキャリブレーションビーズ(米BDバイオサイエンス社製のBD Quantibrite)を使った交差キャリブレーションによって得られた。

記録された全粒子数は、この範囲の一つの低強度端ピークを除いて、理論的に予測された値と極めて良く一致した。この予測値からの偏差が検出限界である。しかし、実証されたわれわれのプロトタイプの感度は、すでに、ヒトの血液分析を含む広範囲の生体粒子検出アプリケーションの要求を十分に満たしている。

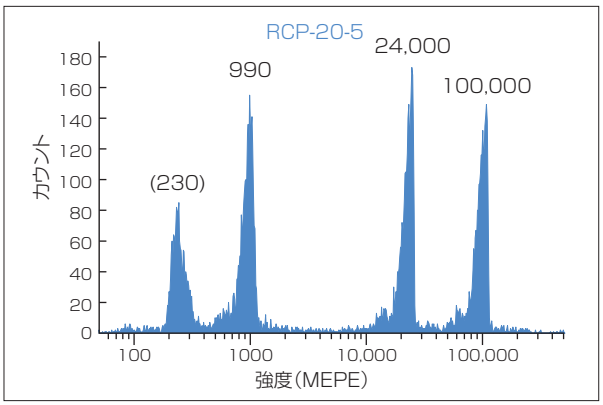

図4 この強度ヒストグラムは小型プロトタイプによって測定された直径2μmのレインボーキャリブレーションビーズの例である。(資料提供:PARC)

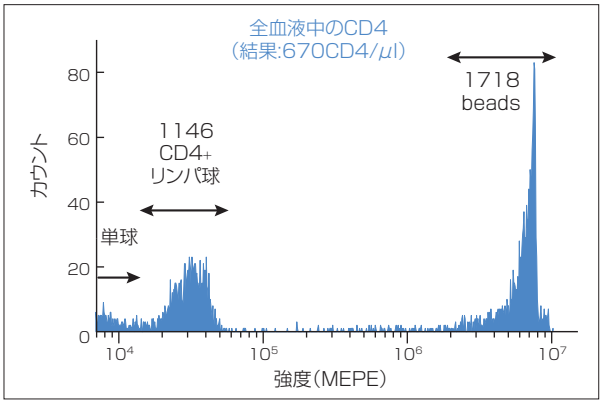

図5 この強度ヒストグラムは空間変調蛍光放射に基づくハンドヘルド式フローサイトメータで検出された蛍光強度の関数としての血液中CD4+Tリンパ球の数を示している。二つのピークはキャリブレーションビーズ(右)とCD4リンパ球(中央)を識別する。CD4単球の開始が左に見える。全測定時間は10分以内であった。(資料提供:PARC)

全血液中のCD4

この技術の有用性を実証するために、ヒト血液中の絶対CD4+計数測定を実施した。これはHIVに感染した患者のスクリーニング、治療開始、監視に必要とされている。ベンチマーキングでは、われわれのプロトタイプと市販のBDバイオサイエンス社製FACSCountを使った同一血液試料の測定結果を直接1対1で比較してみた。全血液試料は標準CD4試薬(PE-CD4、PE/CY5-CD3、既知の数の蛍光マイクロビーズ)でタグ付けした。このプロトコルでは、赤血球溶解(細胞破壊)も未結合色素を除去する洗浄ステップも必要ない。

試料調製も、比較のために、PARCとBDバイオサイエンス社の両方で推奨試料調製プロトコルを使って実施した。蛍光強度を横軸とする検出粒子数のヒストグラムは、キャリブレーションビーズとCD4+Tリンパ球を識別する二つのピークを示した(**図5**)。CD4単球のシグネチャはヒストグラムの低強度端に観測された。この測定では、約2μlの全血液を含む約20μlの被検体溶液(1:10の希釈)の分析に要した時間は10分以内であった。キャリブレーション用粒子の既知の濃度に基づいて、全血液中のCD4+Tリンパ球の絶対濃度が決定された。得られた濃度670±15CD4/μlはFACsCountで決定された682CD4/μlと極めて良く一致した。このことによって、ハンドヘルド式POC診断の実際的ソリューションとしての空間変調蛍光放射の有用性が実証された。

謝辞

著者は、CD4ベンチマーク実験に対して支援と有益な意見をいただいたBDバイオサイエンス社のロバート・ホフマン氏(Robert Hoffman)とナー・ビュイ氏(Nga Bui)に感謝したい。本研究は部分的に米国立予防衛生研究所(NIH)からの補助金で実施された。

参考文献

(1) H.M. Shapiro, Practical Flow Cytometry, Wiley & Sons(2005).
(2) M.A. Van Dilla et al., Science, 163, 1213(1969).
(3) D.A. Ateya et al., Analytical and Bioanalytical Chem., 391, 1485(2008).
(4) J. Godin et al., J. Biophoton., 1, 355(2008).
(5) P. Kiesel et al., Appl. Phys. Lett., 94, 041107(2009).
(6) R.A. Hoffman, Springer Series on Fluorescence, 6, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 307-342(2008).

著者紹介

パロアルト研究所オプトエレクトロニクスグループ所属のピーター・キーゼル(Peter Kiesel)は主任科学者、イェルク・マティーニ(Joerg Martini)は科学者、マルクス・ベック(Markus Beck)は博士号取得研究者、マルテ・ハック(Malte Huck)は研究助手、マーシャル・ベルン(Marshall Bern)は主任科学者、ノーブル・ジョンソン(Noble Johnson)はリーダーである。
e-mail: peter.kiesel@parc.com

LFWJ