

光学とフォトニクスが進展させる スペクトルフローサイトメトリー

バーバラ・ゲフベルト

高性能なスペクトルフローサイトメトリーの新興世代が、新たな応用をもたらし、より低コストで届くようになっている。

サイトメトリー（細胞計測）は、細胞の大きさや形状や構造といった特性、細胞集団の量、機能的な細胞状態、さらに特定のタンパク質とその位置、DNAといった物質などを評価する。細胞生物学だけでなく、日常的な血液検査や疾患診断を含めた臨床応用では頼みの綱となっている。

流体中で細胞の特性を計測するために、レーザー光を利用する蛍光技術がフローサイトメトリーだ。フローサイトメトリーは、多くのエンジニアや研究者によるハードウェアと試薬のイノベーションを経て、ここ20～30年にわたって大きく進歩している。彼らの共同開発によって、1秒あたり数万個の細胞という割合で個々の細胞に対して

マルチパラメータ解析を行う現在の性能に達している。

しかし、蛍光分子の開発がオプションの広がりをもたらした一方で、多数の蛍光分子を扱うことは、色やフィルタを注意深く選択する必要があるという困難でもある。特殊な色素はしばしば従来のフローサイトメトリーで必要になるが、色を追加すると染色がかすみやすくなり、スペクトルの溢出効果によってマスクされる。スペクトルプロファイルに近い、またはオーバーラップする色素は識別を困難にし、解像度が制限される。

従来のフローサイトメトリーは複数のレーザーを必要とし、ダイクロイックミラーを用いて独立したシグナル検出パ

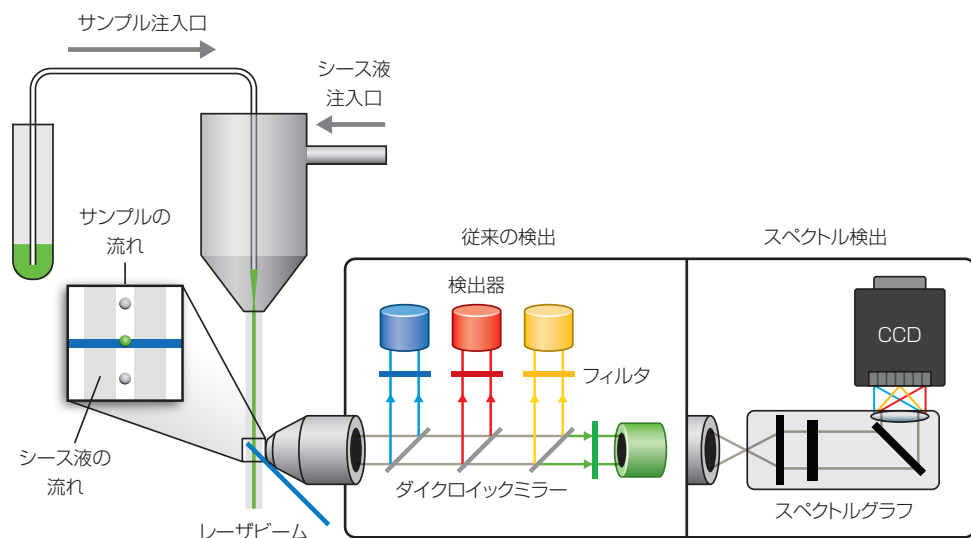
スを作成する。1つの色素に対して1つのフィルタと検出器（通常は光電子増倍管(PMT)）の枠組みとなる。そのため、色の追加は、ハードウェアとパネル設計が複雑になることを意味する。

さらに、異なる組織や生物からの細胞を同定することにもフローサイトメトリーは挑んでいる。これにはデータ解析のために、幅広く、マルチパラメータの代償マトリクスが必要となる⁽¹⁾。

分光計を足すだけ

検出器、光学、ミリ秒以下の計算能、フルスペクトル計測の近年の発展⁽²⁾により、スペクトル（もしくはマルチスペクトルまたはハイパースペクトル）フローサイトメトリーが近年登場し、こ

図1 フローサイトメトリーでは、ラベルされた細胞の流れがレーザービームの前を通過し、細胞から放射される光を対物レンズが集める。従来のシステムでは、励起される細胞のラベルにレーザーの波長を合わせ、対物レンズが集めた光はダイクロイックミラーとフィルタを経由してPMTに伝達される。スペクトルシステムでは、各レーザーからの光がすべてのラベルを照射し、初期のシステムでは蛍光を直線状の検出器アレイに分布する分散系光学を特徴とした(<http://nolanlab.com/spectral-fc.html>より引用⁽⁴⁾)。



これらの限界に立ち向かっている。超高速の光学分光計を内蔵するスペクトルフローサイトメトリー⁽³⁾は、従来のフローサイトメトリーよりシンプルな光学パスで少ないコンポーネントから構成され、少ないレーザーでより高品質な結果をもたらす。

どちらの形式のフローサイトメトリーでも、懸濁液中の蛍光ラベルされた細胞は、ラベルを励起するのに合わせた波長のレーザービームの前を1つずつ通過する。従来のフローサイトメトリーでは、各レーザーは3~5色を励起できる。光学システムには、細胞から放射された光を集め、ダイクロイックミラーとフィルタを通じて検出器に誘導する対物レンズが含まれる。スペクトルフローサイトメトリーでは、各システムレーザーは、使用するすべてのラベルを励起する。初期のスペクトル法のいくつかは、プリズムや回折格子などの分散的光学を利用して蛍光シグナル(各細胞にある生体色素、ナノ粒子、蛍光タンパク質)を直線状の検出アレイに分配する(図1)⁽³⁾。半導体検出器、通信光学、計算能が進展する近年のさらなる革命により、わずか3つのレーザーで24色以上の高品質なデータ出力というフルスペクトル計測が可能となっている(図2)。この最新の手法は、より広い科学者がスペクトルサイトメトリーを受け入れることにつながっている。

従来のフローサイトメトリーが蛍光色素の放射ピークを検出する一方、スペクトルフローサイトメトリーは各粒子の全蛍光スペクトルを計測し、幅広い連続波長における放射スペクトル形状を識別する⁽¹⁾。

スペクトルフローサイトメトリーの大きな特徴は当然、スペクトルの非混合だ。すなわち、明らかにする情報を

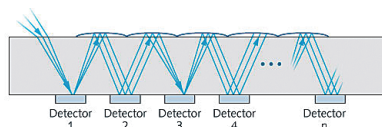


図2 スペクトルフローサイトメトリーシステムの最新版では、サンプルから放射された蛍光は光学ファイバベースの低密度光波長多重通信(CWDM)の分波器部品に伝送される。ここでは、スペクトルプロファイルを検出するためにフォトダイオードアレイを用いる。(提供:サイテック・バイオサイエンス社)

抽出するためのスペクトルデータの分析である。スペクトルの非混合は正確なラベル強度を推定でき、大きなスペクトルオーバーラップの蛍光色素を解像できる。この処理で使われるアルゴリズムは、従来のフローサイトメトリーの代償マトリクスを置き換え、自家蛍光を独立パラメータとして扱う⁽¹⁾。

これは複雑でなく高性能かつ柔軟な機器である。研究者には、アッセイ設計時により多くの選択がある。

商品化がさらに研究を促進

革新者の中でスペクトルサイトメトリーの構想が生まれたのは、1980年代前半だった。高感度なPMTアレイが利用可能になったことで、米パデュー大(Purdue University)のサイトメトリー研究室の研究者が試作システムを開発できるようになるまで20年もかからなかった⁽⁴⁾。パデュー大のチームは設計に関する特許を米国で取得したが、これは後にソニーのライフサイエンス事業にライセンスされた。2014年、ソニーは商業的に入手できる初のシステムであるSP6800スペクトルアナライザを発表した。同年、米サイテック・バイオサイエンス社(Cytek Biosciences)という会社が設立され、直後にAuroraスペクトルフローサイトメーターを発売した。続く2018年には、特許出願中

の技術をベースにした、Northern Lightsと呼ばれるコンパクトなシステムのシリーズを発表した(図3)。

商業システムの有用性は、従来のフローサイトメトリーでは困難だった条件におけるスペクトルフローサイトメトリーの可能性を強調する研究成果を引き出した。例えば2016年の研究では、心臓と腸といった組織の細胞集団を解析したソニーのシステムの性能が示された。21のパラメータ(そのうち19は蛍光分子)を特徴付け、特定の集団を高い解像度で分析し、自家蛍光を効率よく処理した。これらは従来のフローサイトメトリーでは不可能だったことだ⁽¹⁾。

後の研究ではスペクトルフローサイトメトリーを用いて、非小細胞肺癌(NSCLC)の患者から採取した組織サンプルを使用した腫瘍・免疫システムのダイナミクスが調べられた⁽⁵⁾。NSCLCは最も一般的な肺癌の種類であり、通常はステージが進展するまで診断されない。近年の免疫療法の進歩は新たな治療法をもたらす可能性がある一方、研究者は理解のための新規マーカーを同定する必要がある、そのようなマーカーを見つけるには生物学的なダイナミクスを理解する必要がある。

NSCLCの組織サンプルと、循環腫瘍細胞(CTC)のための血液サンプルを組み合わせて調べた研究では、一細胞レベルで複数の免疫と腫瘍マーカーを同時にプロファイルするためにサイテック社のAuroraが使われた。免疫マーカーと腫瘍マーカー両方の高レベルな発現と、CTC量で示される疾患悪性度の間に関連があることが明らかになった。これらの研究から得られる知見は免疫システムとがん細胞、この二者の相互作用の理解を早め、疾患の診断やモニタリング、そして創薬を加速させるだろうと、研究者は言及する。



事実、がん研究はフローサイトメトリーの需要を推進するのに一役買っている。研究者が同意する巨大な市場が今後数年間で劇的に成長するだろう。スペクトルフローサイトメトリーは、急速に伸びているがん研究の分野に特に適している。そこには、治療に対して予想される患者の反応を決めるのに役立つ免疫プロファイル、腫瘍を標的とするよう白血球を改変する新規治療法であるキメラ抗原受容体 (CAR)-T 細胞療法、がんを殺すために患者自身の免疫システムを支援するがん免疫療法が含まれる。

現在、がん免疫療法では、細胞の遺伝子プロファイルを得るためにゲノミクス技術を用いる。しかし、ゲノミクスのプラットフォームは細胞の種類と状態を明らかにできるものの、不均一な (ヘテロな) 細胞集団で実施するのは困難だ。そのため、通常はゲノミクス技術を用いる前にセルソータを使用する。一方スペクトルフローサイトメトリーは、ヘテロな集団にある個々の細胞の状態を迅速かつ客観的に解明できる。

図3 サイテック社は、スペクトルフローサイトメーターである Northern Lights を通じて、より多くの研究者がフローサイトメトリーを利用しやすくなることを目指している。これは、明らかに性能が劣る機器と同等の価格で24色以上解析できる。光学設計と非混合アルゴリズムにより、大きくオーバーラップするスペクトルを含む広範囲で低コストな色素を利用できる。

ードできる。このシステムによって、通常なら3~4本のチューブを必要とする大量の情報を、1つのサンプルから抽出できる。わずかな量しか利用できない腫瘍を必要とするがん研究では重要だ。

Northern Lights は、すべてのアプリケーションに対して1つの光学機器構成を用いる。そのため、従来のフローサイトメトリーで使われる、しばしば高価でメンテナンスが煩雑なレーザと比較して手のかからないレーザであり、実験エラーを削減して時間を節約できるだろう。この企業はシステムの使いやすさと合理化されたシステム設計を強調しており、購入者はシステムの機能をフルに利用できる。

ほとんどのサイトメータは、光子を検出して電子に変換するためにPMTを使うが、サイテック社のシステムは、この処理をするために小型のアバランシェフォトダイオード (APD) を使用している。APDは消しゴムサイズのため、システムの小型化に寄与し、さらに高い感受性をもたらす。これにより、400~900nmにおいて高い量子効率 (QE) を持つ。PMTよりノイズは3分の2に下がる。ノイズは染色をぼやかすため、APDはより高い解像度をもたらす。

サイテック社には、スペクトルフローサイトメトリーを多くの「限界に挑む者たち」の手にもたやすための製品ロードマップがあると、ジャンCEOは言う。次のイノベーションは何をもたらすのだろうか。

新興世代

「フローサイトメトリーがもたらす恩恵は科学コミュニティによく知れ渡っているものの、ケタ違いの費用とワークフロー集約的な特徴のために採用が遅れている」と、サイテック・バイオサイエンス社のCEO ウェンビン・ジャン氏 (Wenbin Jiang) は述べる。「かつてごく少数の科学者だけが利用可能だったものを、より多くの研究者が利用しやすい高度な装置を製作するミッションに取り組んでいる」。

このミッションを遂行するため、サイテック社はNorthern Lights シリーズを発表した。これは、スペクトルサイトメトリーの導入費用を劇的に抑え、特にがん研究で重要な性能とした。Northern Lights は1レーザ (9色まで) から3レーザ (24色以上) にアップグレ

参考文献

- (1) S. Schmutz, M. Valente, A. Cumano, and S. Novault, PLoS ONE, 11, 8, e0159961 (2016).
- (2) J. P. Nolan and D. Condello, Curr. Protoc. Cytom., 63, 1, 1.27.1-1.27.13 (2013).
- (3) G. Grégori et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 377, 191-210 (2014).
- (4) See <http://nolanlab.com/spectral-fc.html>.
- (5) X. Wang et al., Proc. AACR Annual Meeting 2018, Chicago, IL (Apr. 14- 18, 2018); doi:10.1158/1538-7445.am2018-2112.