

フローサイトメトリーに 影響を及ぼすレーザー技術の進歩

ウォルター・バージェス

フローサイトメトリーは複雑なサンプルを迅速かつ正確に分析できる。フローサイトメトリーの性能の核心には、蛍光分子を励起させるために使用する光源にある。レーザーの役割はますます重要なものになっている。

フローサイトメトリーにおける蛍光の基本メカニズムは、蛍光分子と入射光との相互作用に依存している。光子の吸収と、それに続くより長い波長の光の放出が起きている。このプロセスに、レーザーは必要不可欠である。なぜなら、レーザーの光物理学および光化学的特性が、コヒーレントと単色光源として作用するからである。

蛍光分子がレーザーからの光子を吸収すると、基底電子状態から励起状態に遷移する。この遷移は、吸光として知られるプロセスによって生じる。基底電子状態と励起状態の状態間のエネルギー差は、吸収された光子のエネルギーに対応する。その後、蛍光分子は内部変換と振動緩和を受け、熱というかたちでエネルギーを失う。最終的に、蛍光分子は蛍光発光によって基底状態に戻り、光子を放出する。この放出された光子は、吸収されたものよりも波長が長く、エネルギーが低いという特徴を持つ。この放出された光子をフローサイトメータが検出・分析することで、研究対象のサンプルに関する貴重な情報が得られる。

他の光源ではなく レーザーを選択する

最適なパフォーマンスを得るために適切な光源を選択する際には、いくつかの重要な要素を考慮することが必要

である。スペクトル幅、強度、安定性の意味を理解することで、研究者はフローサイトメトリーのデータの質と信頼性に大きく影響を与える情報を得たうえで意思決定ができる。

最初のステップは、選択した蛍光分子の励起スペクトルを考慮することだ。レーザー波長の選択は、研究対象の蛍光分子の励起スペクトルに対して慎重に合わせるべきであり、効率的かつ選択的な励起を確実なものにする必要がある。

レーザー光源のスペクトル幅も重要だ。スペクトル幅の広いLEDとは異なり、レーザーはスペクトル幅が狭いため、スペクトルとして隣接する蛍光分子の不要な交差励起のリスクを最小限に抑えることができる。このことは、複数の蛍光分子を同時に検出することが求められるマルチプレックス実験では不可欠である。コヒーレンスはスペクトル幅に直接関係し、反比例する。高い空間的・時間的コヒーレンスは、励起効率を高め、より効果的なシグナル収集を可能にし、バックグラウンドノイズを低減する。しかし、過剰なコヒーレンスはスペックルパターンの形成や干渉効果を引き起こし、フローサイトメトリーのデータの正確性に悪影響を及ぼす可能性がある。まさに綱渡りだ。

実験間の再現性と一貫性を確保する

ためには、出力の安定性も欠かせない。レーザー出力や波長の変動は、フローサイトメトリーの計測においてばらつき（エラー）を引き起こし、データの解釈を混乱させ、結果の正確性を損なう可能性がある。長期的な出力安定性と低ノイズ特性に優れた光源を選択することは、極めて重要であり、生成されたデータの信頼性を維持して、複数の実験や時点にわたって比較できるようにする。

フローサイトメトリーにおける光源としてしばしば提案されているものに、波長可変レーザーとスーパーコンティニウムレーザーがある。波長可変レーザーは励起波長を柔軟に調節でき、特定の蛍光分子に対してレーザー光源を最適化できる。一方、スーパーコンティニウムレーザーは幅広い波長スペクトルを発生させるため、励起プロファイルの異なる複数の蛍光分子を同時に励起できる。波長可変レーザーもスーパーコンティニウムレーザーも高度なマルチプレックスを容易にし、さまざまなアプリケーションへの適応性を高める。しかし、フローサイトメトリーにおける最適なツールとして捉えられることは少ない。

例えば、波長可変レーザーとスーパーコンティニウムレーザーは、サイトメータの設計やアライメントを複雑化し、メンテナンスや操作に専門的な知識が

要求されるようになる。波長可変レーザーとスーパーコンティニウムレーザーは、個別のレーザー光源の4~5倍のコストがかかってしまうため、多くの人は異なる蛍光分子を調べるために複数の個別レーザーを使用することになる。これら高額なレーザーは、しばしば出力制限があり、多くの蛍光分子を検討対象から外してしまう。

マイクロLEDとマイクロレーザーの開発には、小型化と性能の間で繊細なバランスが要求される。小型化によってフローサイトメトリー計測の品質や出力、信頼性を損なうことがあってはならない。フローサイトメトリーの分野が進化を続ける中、フローサイトメトリーの技術革新をさらに推進するために、研究者はこれらの新興フォトニクス技術の利点と限界を慎重に検討し、その可能性を十分に活用しなければならない。現在のところ、マイクロLED

技術は出力が低く、真のマイクロスケールレーザーが研究目的に十分な安定性を持つようになるには10年近くかかるかもしれない。

レーザーの性能

フローサイトメトリーにおけるレーザーの性能は、いくつかの相互関連する要因によって規定される。その要因が最適化されると、蛍光分子の効率的な励起と正確なデータ収集に寄与する。第一に、ビーム品質が、一貫性のある明確な励起プロファイルを保証する。低いM2値と高い空間的コヒーレンスを特徴とする最適なビーム品質により、レーザースポットが照射点にしっかりと集光され、シグナル分解能と感度が向上する。

波長の安定性も、特定の蛍光分子の励起と検出に直接影響するため、不可欠だ。安定した波長は、信頼性と再現

性のある結果を保証する。レーザーの出力波長の変動によって生じる可能性のある取得データの偏差を最小限に抑えるためである。この特性は、複数のレーザーを使用する場合や、励起帯域の狭い蛍光分子を使用する場合に、特に重要となる。

レーザーの出力も考慮しなければならない。なぜなら、出力はシグナル・ノイズ比に直接影響を与え、より微弱なシグナルの検出や、異なる細胞集団の分離を可能にするからである。しかし、過剰なレーザー出力は光退色や光毒性を引き起こし、サンプルの完全性や細胞の生存を損なう可能性がある。正確で信頼性のあるフローサイトメトリーの結果を得るためには、これらの要因のバランスをとることが必要不可欠だ。

例えば、米パワー・テクノロジー社 (Power Technology) の装置品質IQおよびCKシリーズのレーザーダイオードモジュールは、優れた光学品質と、安定した温度、波長、出力を必要とする臨床研究やフローサイトメトリーアプリケーションのニーズに対応するために特別に設計されている。これらのレーザーは、精密な操作電流源とPID温度制御ループを特徴としており、 $5\mu\text{Rad}/^\circ\text{C}$ 以下のビーム位置安定性を可能にしている。これらのモジュールはオンボード・マイクロプロセッサを備えており、高度なユーザー制御とモニタリング機能を提供する。

臨床研究におけるアプリケーション

フローサイトメトリーの多面的な領域は、臨床研究において幅広い応用が可能な、強力な分析技術となっている。レーザー技術の進歩は、サイトメータ装置の高度化を推進している。

例えば、タンパク質やバイオマーカー



図1 アーカンソー州立大では、フローサイトメータで細胞の物理特性を計測するためにレーザーが使用されている (提供:アーカンソー州立大/アーカンソー州リサーチアライアンス)

一の検出はフローサイトメトリーのアプリケーションの基礎であり、細胞成分やシグナル分子の同定や定量を容易にする。このアプローチによって、研究者は細胞プロセスの複雑な相互作用を解明し、潜在的な治療ターゲットを発見できるようになる。

フローサイトメトリーは微生物分析にも優れており、多様な微生物集団の迅速かつ正確な同定、計数、特性評価を可能にする。

この技術は、細菌の生存能力の評価から微生物集団の構造の変化のモニタリングまで、こうした複雑な生態系を研究・操作する我々の能力に革命をもたらしている。フローサイトメトリーは、幹細胞研究や免疫表現型検査、細胞内シグナル伝達経路の研究など、無数の応用において新境地を開拓し続けている。レーザー技術とフローサイトメトリー装置の進化とともに、この多用途技術が科学的発見の未来を形作るうえで極めて重要な役割を果たし続けることに疑いはない。

レーザー vs 他の光源

蛍光分子の励起効率を考慮すると、レーザーはアーク灯やLEDなどの代替光源よりも明らかに優れている。レーザーが発する高強度の単色光は蛍光分子の励起に優れており、フローサイトメトリー装置における感度と特異度の向上につながっている。このことは、低存在量のターゲットや、複数の蛍光分子を同時に励起する必要があるマルチカラーアプリケーションを扱うときには、特に重要である。

レーザーは一般的にスペクトル幅が狭いため、蛍光分子間のスペクトルのオーバーラップを最小限に抑え、バックグラウンドノイズを低減する。対照的に、アーク灯やLEDの中には発光スペクト



図2 パワーテクノロジー社の装置品質IQおよびCKシリーズのレーザーダイオードモジュールは、優れた光学品質と、安定した温度、波長、出力を必要とする臨床研究やフローサイトメトリーアプリケーションのニーズに対応するために特別に設計されたものだ(提供:パワーテクノロジー社)

ル幅が広いものがあり、蛍光分子間のクロストークが増加し、感度の低下につながる可能性がある。しかし、近年のLED技術は発展しており、狭帯域幅のLEDが開発されている。従来のLEDと比較してスペクトル特性が改善されるかもしれないが、レーザーには遠く及ばない。比類なき安定性ととも、レーザーがフローサイトメトリーにおける高品質データ収集のゴールドスタンダードである理由が、ここにある。

レーザーは、複雑なサンプルを分析するためのより高感度で精密な手法の開発を可能にする。安定した狭いスペクトル幅と高い強度を持つレーザーを使用することで、複数の蛍光分子を同時に検出でき、最終的にフローサイトメトリーアクセシビリティのマルチプレックス性能を高めることができる。その結果、今や研究者は一度の実験で、多数の細胞パラメータの詳細な情報を得ることができ、解析の効率と深度が大幅に向上した。

フローサイトメトリーにおけるレーザーのインパクトは、がん研究や創薬領域で特に顕著であり、先進的なサイト

メータによって新たなアプリケーションの探索が可能となっている。例えば、レーザー駆動フローサイトメトリーは、がんの増殖や転移に重要な役割を果たすがん幹細胞の特性解析に有益である。レーザー技術によってフローサイトメトリーの高スループット性能は強化されており、創薬活動のための化合物ライブラリの大規模スクリーニングを容易なものとしている。

これらの進歩とともに、レーザー技術は、時間分解蛍光分子のような新規のフローサイトメトリー技術の開発にも貢献しており、細胞プロセスの動的な挙動に関する貴重な洞察を提供できる。これにより、生体医学研究におけるフローサイトメトリーの適応範囲がさらに広がり、細胞シグナル伝達、遺伝子発現、タンパク質間相互作用について、より包括的な研究が可能になるだろう。

著者紹介

ウォルター・バーゲスは、パワー・テクノロジー社の共同最高経営責任者。
email: waburgess@powertechnology.com
URL: www.powertechnology.com