

アプリケーションの将来性の限界に挑む フローサイトメトリ

ジャコモ・ヴァッカ

フローサイトメータは、すでに病院やライフサイエンスの研究室に普及しており、生物学の構成要素についての知見をこれまでになく明らかにしている。そして、より低コストで性能高く、多くのことを行えるよう、絶え間なく押し進められている。

フローサイトメトリは、サンプル内の膨大な数の細胞を1細胞ごとにパラメータのセットで計測できる。ほとんどの機器において、多くの場合、蛍光分子で標識した細胞の液体懸濁液を細いストリームに流し込むことで1列になり、1秒あたり数千個の割合の細胞が1つ以上の検査レーザービームを通る(図1)。その結果生じる散乱光と蛍光によって、サンプル内の細胞を計数、特徴付けができる。

フローサイトメータのもう1つの機能はセルソータである。散乱光と蛍光のパラメータを利用して細胞集団が同定されると、流れるストリームが粒子状となって噴出される。このとき、1つの粒子に1つの細胞が含まれている。粒子は、含まれている細胞の種類に応じて帯電される。帯電された粒子を静電気のプレートが穏やかに誘導し、採取チューブに回収したり廃棄したりする。ソートされた細胞は次の実験に利用できる。

アプリケーションの歴史

フローサイトメータは、1980年代に世界がHIV/AIDSと戦い始めたときに、最初に生体臨床医学に最も貢献したものの1つである。感染が悪化するにつれて、ウイルスによって発症したか、そしてどのようにして発症するか、それらの評価を支援する診断ツールが必要とされた。

HIVウイルスは、白血球の一部であるヘルパー T細胞を攻撃する。ヘルパー T細胞の表面には、CD4という抗原(タンパク質)が発現している。ヘルパー T細胞は、感染への抵抗に重要な要素であるが、HIVウイルスはこのヘルパー T細胞を殺す。

フローサイトメトリでは、細胞表面に存在する抗原に基づいて細胞を選別できる。これは、蛍光分子と連結する抗体(目的の抗原と結合するもの)である生化学的な標識を導入することで可

能となる。抗体は、目的の抗原のみに結合できるものを選ぶ。抗体が運ぶ蛍光タグは、レーザービームで検査するときに発光する。

抗原特異的CD4の標識抗体を用いると、フローサイトメトリでCD4陽性を精度高く検出、識別、計数できる。CD4陽性の細胞が少なくなるほど、AIDSが進行していることを意味する。数十年間、フローサイトメトリはAIDSの診断や治療モニタリングでゴールドスタンダードだった。

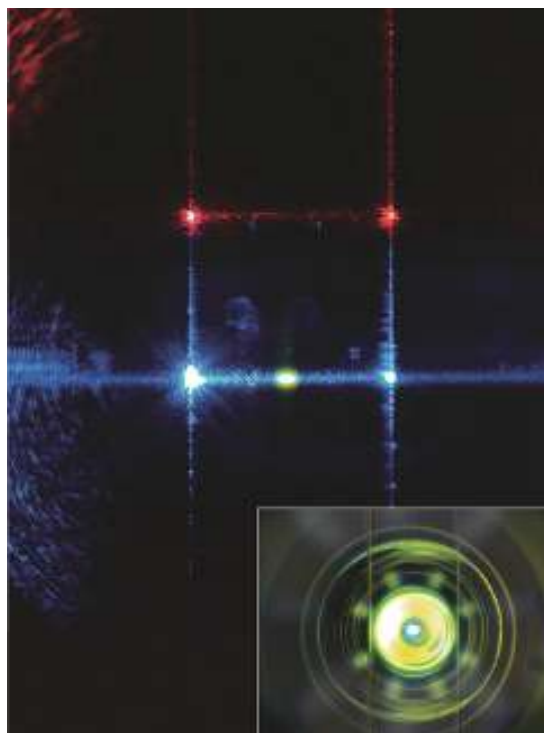


図1 この合成顕微鏡イメージでは、側面(散乱光により垂直方向のチャネル壁が見えている)からフローセルチャンネルに照射されている488nmのレーザービーム(中段)と640nmのレーザービーム(上段)を示す。流れている3 μ mの蛍光ビーズのサンプルが488nmのビームに照射される(中央の明るい楕円)。フローセルの背後に、蛍光の回収路(挿絵の同心円)がLED照明下に配置されている。

医療診断の分野においても、フローベースの技術は血液学を中心である。血液分析器は、赤血球 (RBC) 濃度、白血球 (WBC) 濃度、血小板などを含む全血球計算 (CBC) を、1 サンプルあたり 1 分以内で算出できる。

さまざまな角度、主に血液分析器から向かって前方と 90 度で、個々の細胞からの散乱パターンの差異を分析することで、細胞のサイズ (血小板は 2 ~ 4 μm 、RBC は 5 ~ 7 μm 、WBC は 7 ~ 15 μm)、核の有無 (血小板と RBC には核がなく、WBC にはある)、核の形状 (丸か突出があるか) を計測できる。この情報は、細胞の分類や計数に利用される。毎年 1 億回もの試験が行われ、CBC は世界で最も普及しているオーダー診断試験である。

ハードウェアの進化

近年まで、従来のフロー機器はコスト、サイズ、複雑性の理由から、中心施設に独占的に配置されているか、部署や施設のユーザー間で共有されるかがほとんどだった。たとえば、米 BD バイオサイエンス社 (BD Biosciences) の LSR II システムは、液体を扱うカードを含めなくて重さが 525 ポンド (約 238 kg)、ベンチスペースとして 15 平方フィート (約 4.6 m^2) が必要だ。

ほとんどの商業用ユニットは 10 万 ~ 50 万ドルで販売されており、これにはメンテナンスや運用コストは含まれていない。そして通常は、ユーザーの代わりに高度なトレーニングを受けた専門家がサンプルを流すときに必要だ。これらの理由のために、一般の研究者が実施できる研究の数や種類に限りがある。

過去 10 年間で、フローサイトメータはより小さくポータブルで、精度高く、安価で使いやすくなりながらも、科学的に要求される性能を維持するか、と

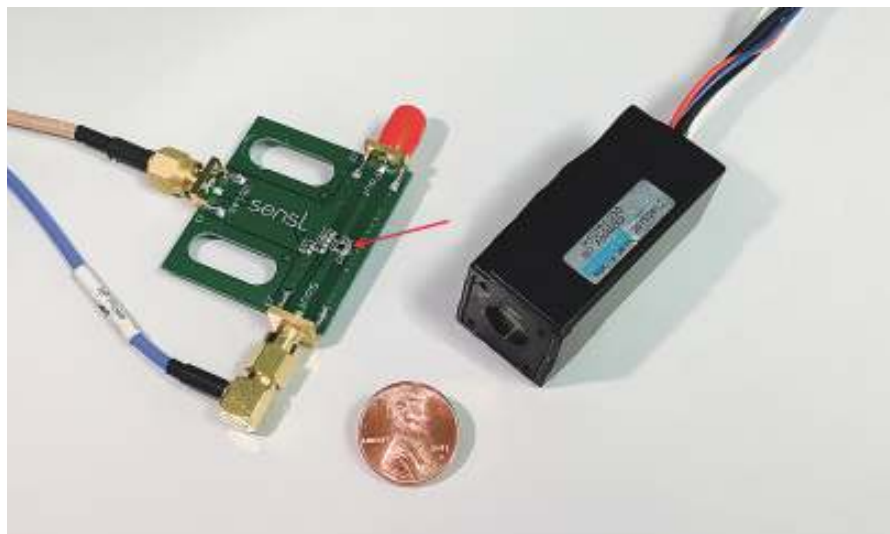


図2 (左)米センスエル社 (SensL) の C シリーズのシリコン光電子増倍管の評価基板の小型化を示す。実際のセンサ (矢印) は 1 mm^2 の部品だ。(右) 対立する日本の浜松ホトニクス社 (Hamamatsu) のヘッドオン型金属パッケージの光電子増倍管モジュールには、高電圧の電源供給回路が組み込まれている。

きに超えている。この傾向は、後に BD バイオサイエンス社が買収した米アクリサイトメータ社 (Accuri Cytometers) が 2 個のレーザ、6 個の検出器をもつ C6 を発表した 2008 年に始まった。この機器は再アライメントを必要としない。さらに近年、米ベックマン・コールター社 (Beckman Coulter) が 2014 年に買収した中サイトジェン社 (Xitogen) は、コンパクトで 3 個のレーザ、15 パラメータをもつ CytoFLEX を生産した⁽¹⁾。これは、蛍光感受性という意味ではこのクラスで最高とされている。2014 年には、スタートアップの米 ACEA バイオサイエンス社 (ACEA Biosciences) が NovoCyte を発表した。これは、時分割多重化を用いて複数の蛍光チャンネル間を個々の検出器で共有するコンパクトな分析器である。

セルソータについても、従来は大きく複雑で操作しにくかったが、より小さいサイズで簡便なものが現れている。これは、治療用幹細胞の回収といった新規臨床アプリケーション向けだ。米バイオ・ラッド社 (Bio-Rad) の S3e は、

全システム (2 個のレーザ、4 個の蛍光チャンネルソータ) が幅・奥行き・高さ 2.5 フィート (約 76 cm) に収められており、バイオセーフティなキャビネットに格納できる。

市場を切り拓き始めているのは、日本のオンチップ・バイオテクノロジーズの FISHMAN-R や独ミルテニーバイオテック社 (Miltenyi Biotec) の Tyto のような、よりコンパクトなマイクロ流体チップベースのセルソータだ。以前は分厚く、電力を大量消費するガスレーザが搭載されていたが、フローサイトメータの小型化が進んでいる。現在は、多くの固体レーザがシャツのポケットに収まりよく入るほどになったことで、システム設計者は過去の制約から解放され、非常に小さな設置面積の中に多くの部品を収めることができる。

検出器のサイズが小さくなったことも影響している。最新の光電子増倍管は過去のサイズの 10 分の 1 である。さらに、より小さなシリコンベースで、検出器に代わるものが支持され始め、マーケットシェアを広げている (図 2)。

免疫学向けの多色フロー

免疫系の学問である免疫学では、感染や疾患への抵抗を支援する多様な細胞（ほとんどはWBCのサブタイプ）の同定や特徴付けで困惑する。免疫系の複雑性の理解を進めるためには、さらなる多重化（複数の細胞パラメータを同時に測定する）が不可欠だ。

AIDS治療の観察で用いられるCD4試験とは異なり、多くの免疫学アプリケーションでは複数のレーザーが用いられる。各レーザーは、異なるスペクトルバンドで各種蛍光標識を同時に励起する（各標識は、異なる抗原といった異なる細胞の特徴に合わせて用いられる）。より多くのパラメータを分析すれば、サンプル中の細胞集団をよりよく決定できる。

しかしながら、現在の多重化アプローチにはセルソートの停滞が見られる。一般的な蛍光の発光スペクトルは約30～50nmの幅があり、さらにロングテールがあるため、得られるスペクトルには3つまたは4つ以上の蛍光が含まれてしまう。その結果、1つのチャンネルで受容するバンドと、隣接するチャンネルを対象とする発光のテールの間でやっかいなオーバーラップが生じる（図3）。このスペクトルのスピルオーバー問題の回避方法は補償と呼ばれているが、これには時間がかかり、蛍光に依存している。新しい分析プロトコルのたびに繰り返す必要があるため、実験への意欲がそがれたり、機器の感受性やダイナミックレンジに悪影響をもたらしたりしている。

レーザーと検出チャンネルの追加もまた、機器のコストと複雑性が上がる。これらの理由により、BDバイオサイエンス社のBD LSRFortessa X-20（355、405、488、561、640nmの5個のレーザーをサポート）のような従来のフローサイトメータでは約20パラメータが上限になる。

この行き詰まりを別の方向から打破する方法が模索されている。米キネティックリバー社（Kinetic River）では、ソートするオプションを含め、従来のフローサイトメトリと同じワークフローを維持しながらも、利用できる検出チャンネルの配置を拡張し、補償の必要性を減らすことなく多重化の新技術（Armo技術）を開発している。このコンセプトは合理的であると示されており、ユーザーやメーカーに多くの利点があることを確認している。現在は、ミッドレンジ機器と同じ設置面積とハードウェアの使いやすさで、チャンネル数が非常に多い分析器（30個以上）を実現するために、このアプローチの実用限界を計画している。

生物学的ナノ粒子の検出

いくつかの研究分野では、検出技術の限界を超えるパフォーマンスが要求されている。科学者は、がんや他の疾患の病態に関する重要な情報を明らかにできる、非常に小さいナノメートルサイズの生物粒子を評価している。この極小の粒子は細胞外小胞（EV）と総称される。微小胞（サイズは100～

1000nm）やエクソソーム（サイズは30～100nm）などがあり、細胞から分泌されて血液を循環する。

粒子からの光シグナル（散乱光と蛍光）は粒子のサイズにともなって急激に低下するため、マイクロサイズの細胞を検出するために設計されたフロー機器は、EVを計測できる範囲まで拡大しようと苦心している。現在のほとんどの商業用ユニットは200nm以上で感受性をもち、ごく一部が100nmを捉える。フローサイトメータの検出感度には、EVを十分に特徴付けるための飛躍が求められている。

近年、より高出力なレーザー、狭い焦点、長い積分時間などの改良によって、100nm未満のEVや50nm未満のウイルスの検出に、米シンテロン研究所（Scintillon Institute）と中国の厦門大（Xiamen University）が成功した^(2,3)。これらの利点を、研究や臨床用途向けにロバストかつ信頼のある機器にすることが進められている。

柔軟性のためのカスタマイズ

多くの場合、コアラボのユーザーが研究で必要とすることは、標準的な商

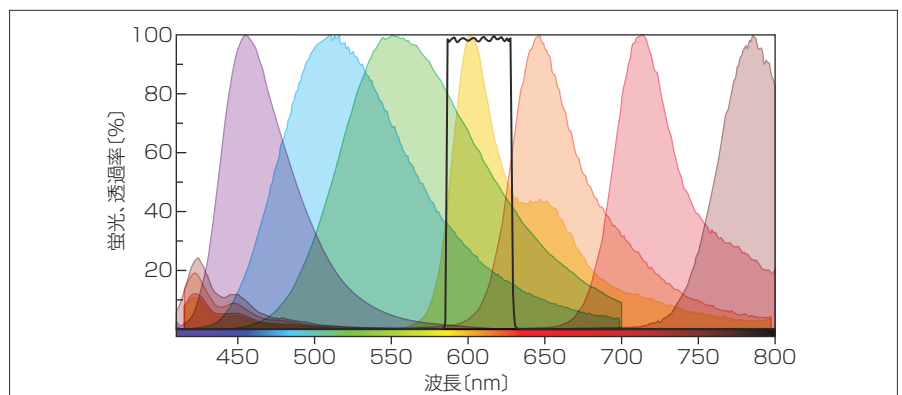


図3 蛍光分子のスピルオーバー問題。従来から使われているフローサイトメータで最も利用できるスペクトル（400～800nm近辺）で、紫色で励起するポピュラーな7種類の蛍光（カラーカーブ）を示す。黒のカーブは、中心の蛍光分子（黄色）からの光を捉えるために設計された帯域フィルタの透過スペクトルを示す。近隣の蛍光（青、緑、オレンジのカーブ）の発光ロングテールがこの計測に混ざり、補償という問題の原因になる。データは米セムロック社（Semrock）のSearchLightソフトウェアでモデル化した。

業用機器にある性能以上のものだ。その対応としてキネティックリバー社は、米国国立がん研究所 (NCI: National Cancer Institute) の実験移植・免疫学部門 (Experimental Transplantation and Immunology Branch) フローサイトメトリ中央施設 (Flow Cytometry Core Facility) に、カスタマイズしたモジュール型のフローサイトメータを納品した。

ウィリアム・テルフォード研究室長 (William Telford) と彼の組織は、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health) 全体の研究における細胞解析と選別をサポートしている。彼はまた、研究を新しい分析や検出技術に導き、一風変わった光源で実験している。

Potomac は、ファイバ結合した 100mW、488nm のレーザーと、2 個の散乱検出器、5 個の蛍光チャンネルを搭載する (図4)。これは、パルス、スーパーコンティニウム、遠紫外線レーザーなど、外部ソースからのレーザービームとも組み合わせる。最適化された流体工学、励起、発光回収、検出技術と合わせると、光学的な可能性として7個のレーザーと20個の検出チャンネルまで広がり、固定システムでは得られない柔軟性が得られる。

Danube 分析器には、従来の蛍光強度に加えて蛍光寿命の時間領域計測機能が搭載されている。この性能は、細胞内環境やタンパク質の相互採用、細胞代謝を精密に調べるために使われる。

より明るく、性能のよい色素

フローサイトメータとソーターは、フォトニクス以外にも、試薬、流体工学、エレクトロニクス、ソフトウェアなど、多様な分野にサポートされている複雑なシステムである。特に蛍光分光子は、言及する価値がある。



図4 キネティックリバー社のモジュール型フローサイトメータPotomacは、オープンアクセスできるように設計された構成である。国立衛生研究所に納品されたこのユニットは、外部レーザーで動作するようにカスタマイズされた。

量子ドット (サイズ依存的な発光スペクトルをもつ半導体のコアシェルナノ粒子) やタンデム色素 (ドナーの発光をアクセプタが吸光して長波長に励起する色素のペア) などの開発によって、200nm 以上の大きく効率よいストークスシフトが得られるようになり、スペクトルの利用や多重化の代わりとして支援されている。だが、これらの標識の制限 (量子ドットは細胞膜を通過できず、タンデム色素は一貫して製造が難しい) によって、これらの利点が最大化されにくい。

この数年でポリマー色素という蛍光標識の新種類が登場し、優れたパフォーマンスをもたらしており、研究者が利用できるオプションが広がっている。ポリマー色素は、多重化アプリケーションにおいて非常に好ましい。多重化アプリケーションでは、大きな発

光シフトほど分析設計はより柔軟性が高くなり、明るいほど暗い集団を解明できる。これらの色素 (Brilliant Violet ファミリーなど) は紫で励起し、その構造と製造プロセスの工夫により、非常に明るい。400nm 近いストークスシフトを効率よく発生できるタンデム蛍光は、従来の代替品よりも安定している⁽⁴⁾。

光学とフォトニクスの進歩は、細胞分析アプリケーションに大きな影響を与えている。フローサイトメトリで利用されているフォトニクスの発展には、新しいパワフルなシステム設計ツール、小さく精度高い光源、安価でコンパクトな固体検出器、明るく安定した色素が含まれている。新たなフォトニクスによって可能となったソリューションは、よりよい診断から細胞生物学におけるより深い理解まで、その道を照らしている。

参考文献

- (1) R. Duggan, "A first look at the Beckman Coulter CytoFLEX," <https://goo.gl/MyAjTn> (2014).
- (2) S. A. Stoner et al., *Cytometry A*, 89, 2, 196-206 (2016).
- (3) L. Ma et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, 10239-10243 (2016).
- (4) See <https://goo.gl/MnsJGq>.

著者紹介

ジャコモ・ヴァッカはキネティックリバー社の社長兼創業者、また米ビームワイス社 (BeamWise) の共同創設者。e-mail: gvacca@kineticriver.com URL: www.kineticriver.com, www.beamwise.com