# 気候変動の実態を明らかにする大規模フローサイトメトリ

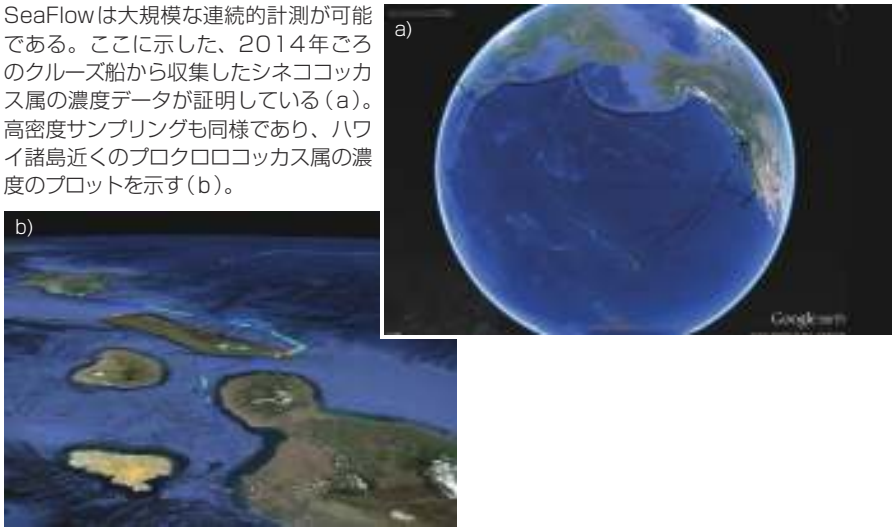
ジャレッド・E・スウォルウェル

**海洋学における技術アプリケーションを劇的に広げるために、フローサイトメトリへの新たなアプローチでは光学が利用される。それにより、環境動態における真相解明が期待されている。**

今後50年の地球がどうなるか、さまざまなモデルで異なる気候シナリオが予測されているという事実がある。その大きな理由として、環境を通して炭素がどのように移動するのかという理解が不十分であることが挙げられる。特に、海洋への炭素溶解量のメカニズムが大きな疑問である。これが解明できれば、気温や二酸化炭素（$CO_2$）の変化に対して生命がどう反応するかを明らかにできると期待されている。

生態系を理解するには、食物連鎖の基礎にある生物であり、エネルギーをバイオマスに変換する独立栄養生物の理解が欠かせない。外洋では、植物プランクトンがこの役目を果たす。優占種は、最小の植物プランクトンであるプロクロロコッカス属である。直径は0.5～0.7μmで、水深約200mに多く存在しており、地球上で最も多い光合成生物だ[1]。しかしながら、その分布と濃度の情報を入手することは困難である。なぜなら、世界の海の表面積は3億km$^2$を超えるからだ。

そのような広大なエリアに生息するサブマイクロメートル規模の生物の個体数を信頼性高く推定するには、どのような計測方法があるのだろうか。その答えは、連続的なサンプリングだ。米ワシントン大（University of Washington）の研究者は、革新的な光学デザインを特徴とする、プランクトンを連続的にモニタリングできる装置SeaFlowをデザインした。これは、生物の地球的分布だけでなく、地球規模や地域規模の環境変化への反応も理解するための手がかりである。




SeaFlowは大規模な連続的計測が可能である。ここに示した、2014年ごろのクルーズ船から収集したシネココッカス属の濃度データが証明している（a）。高密度サンプリングも同様であり、ハワイ諸島近くのプロクロロコッカス属の濃度のプロットを示す（b）。

## スピードに向けた光学イノベーション

フローサイトメトリは、細胞計数と特性評価の技術である。一般的なフローサイトメータは、外側にあるシース液の流体力学的絞り込みによって、液体のサンプル中の細胞を細いストリームとして導く。単波長のレーザを解析部分に照射し、サイトメータは散乱光（通常は前方散乱と側方散乱）を収集する。

フローサイトメータは、蛍光を検出するためにさまざまなスペクトルチャネルも搭載できる。ストリームは、サンプル中の各細胞をユニークに同定するために必要である。光電子倍増管は、個々の細胞における散乱光と特定の蛍光放射のスペクトル領域を計測する。そのスピードは、1秒あたり細胞数千個だ。光散乱はおおよそ細胞サイズに比例し、蛍光は色素や染色の発光スペクトルを反映する。

過去30年間でフローサイトメトリは、海洋学において不可欠なツールとなっている。その理由は、個々のプランクトンの細胞の数、サイズ、蛍光特性を計測する際のスピードと感度だ[2]。この技術によって理論的には、全プランクトン群の密度を推定できるだけでなく、さまざまなプランクトンの種類を区別もできると、われわれは認識した。

自動化フローサイトメータの現世代にはCytoBuoy[3]やFlowCytobot[4]などがあるが、主に沿岸水域の係留で使われており、航海中の船上で使用され

る例は少ない[5][6]。しかし、従来のフローサイトメトリは、サンプル流におけるシース流の圧力によって定義されるサンプリング領域に、一度にわずか1個の細胞を流すことができる各機器の独自性を保証する。

海洋学のアプリケーション向けにデザインされた装置には、サンプルの準備にも時間がかかる。海の広大なエリアのサンプリングでは、準備の時間はサンプル間の距離を意味する。そのため、スタンダードなアプローチでは、連続的なサンプリングで要求される条件に合わなかった。

## 光学的に特徴付けるサンプルの体積

SeaFlowの決定的な特徴は、われわれが開発し、Virtual Coreサイトメトリとして知られている光学システムである[7]。これにより、他のフローサイトメータの一般的な特徴であるシース流が不要になる。その代わり、事前に海水を100μmでフィルタし、直径200μmのストリームで動作する。こうして、連続的な計測方法が可能となっている。

Virtual Coreサイトメトリでは検出器を3つ利用して、ストリームの中にある粒子の位置を特定する。2つの位置検出器が粒子の左右方向の位置を決定し、焦点面に対する縦方向位置は前方散乱光のシグナルと合わせてこれらの検出器に基づいて計測する。検出領域は、粒子を測定できるストリームの断面であり、200μmの広いストリームの一部を分析する。対物の大きさと視野絞りの幅によって定義される光学システムの視野によって、ボリュームセットを決定する。

従来のフローサイトメータの検出領域は、サンプルボリュームの物理的な大きさによって決まるため、シース流に影響される。SeaFlowでは、検出ボリュームは光学、特に位置感度検出器と前方散乱検出器からのシグナルを比較することによって決定される(**図1**)。最適配置された粒子(OPP)とは、測定ボリュームが決定されたものだが、これは各位置感度検出器からのシグナルと同一である。

さらに、前方散乱の検出器からのシグナルは、位置感度検出器からのシグナルより低くはできない。レーザ出力の能動的安定化とあいまって、これらの制約によって連続的に決定されるボリュームのサンプル領域が制限される。OPPのソフトウエアフィルタのアプリケーションによって、従来のフリーサイトメータで得られたものでは識別できなかった2変数のドットプロットが作成される(**図2**)。

SeaFlowの科学的な重要性と、その独創的な光学デザインが認識されたのは、さらにコンパクトで低出力バージョンの開発を支援するために1万ドルを支払った米エドモンド・オプティクス社(Edmund Optics)によってであった。教育助成金申請で最初のデザインを提案したあと、エドモンド社の製品エンジニアは代替部品で可能となるパフォーマンス向上とコスト抑制を指摘した。初代の部品の一部を、在庫にあるレンズ、フィルタ、ミラー、特別な光学フィルタに置き換えた(**図3**)。われわれと共同研究を続け、PipeCyteと呼ぶ最新のデザインを準備中であ

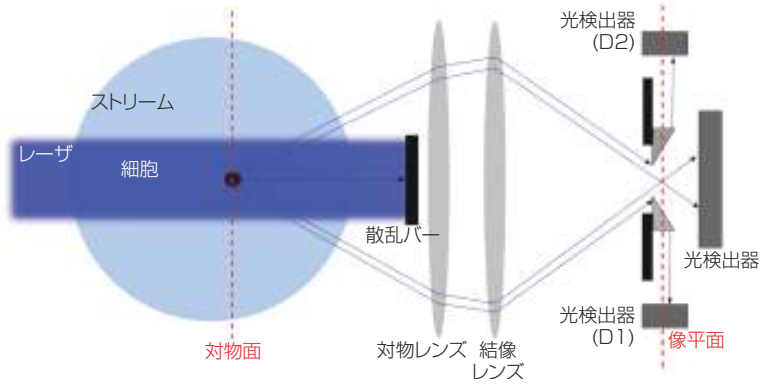



**図1**　SeaFlowの散乱光検出器は光学的にサンプルボリュームが決定される。この特徴によって連続的なデータ収集が可能になる。

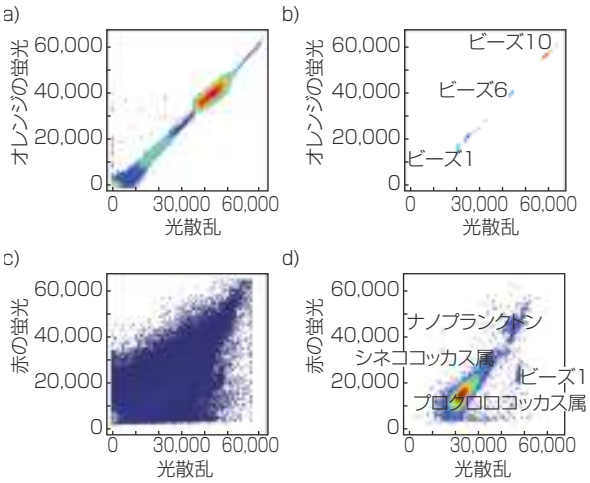



**図2**　キャリブレーションビーズ(a, b)と、亜熱帯の太平洋で採取した海水サンプル(c, d)の光散乱と蛍光のフローサイトメトリ計測。検出可能な全粒子(a, c)とOPP(b, d)を示す。赤いほど粒子量が多いことを意味する。豊富なプロクロロコッカス属群がベースラインを超えていることに注目。

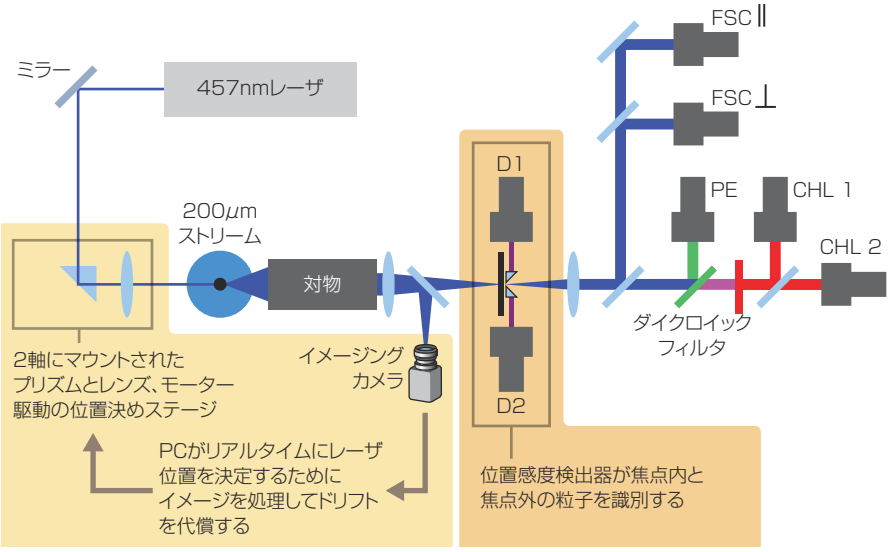



**図3** SeaFlowの空間・スペクトルの識別によって、細胞ごとにサイズと色素含量の特徴付けが可能になる。これにより、計測された全細胞を明確に同定できる。

り、2017年後半に開発を予定している。PipeCyteはSeaFlowよりさらに小さく、よりエネルギー効率がよい。最新のデザインによって、世界中の複数のプラットフォームで同時に環境モニタリングするためにより多くの機器が作られるべきである。

## フィールドで証明されるパフォーマンス

SeaFlowは7つの分析パラメータを使用する。2つの位置感度検出器、直交偏光と垂直偏光それぞれの前方散乱、クロロフィル、大きい粒子のためのクロロフィル、フィコエリトリンである。この装置は0.5～1.5μmにわたる異なる細胞を識別、定量化するために、各細胞の光散乱と自家蛍光特性を利用する。

実際には、船の海水システムが、解析すべき生の海水を装置に流す。まず、水を100μmのステンレス鋼のメッシュに通し、200μmのノズルに入れて計測ストリームを形成する。SeaFlowは個々の細胞のサイズと色素含量に関する情報を収集し、1秒あたり数千個をリアルタイムに計数する。連続的なフローという特徴によって、数mから数千kmの空間スケールで、表面の植物プランクトンの動態を探索できるようになる。

異なる集団の細胞濃度を決定するために、検出領域のボリュームと、全検出粒子に対するOPP粒子の比を乗算して、OPP領域（Virtual Coreと呼ぶ）のボリュームを最初に計算する。OPPボリュームで分割された群内の細胞数は、1mlあたりの細胞数における濃度となる。培養物と自然界のサンプルの分析によって、SeaFlowが得る細胞濃度は、サイトメータのゴールドスタンダードであるBD Influxを使用するときと一致することが示された[8]。

Virtual Coreの光学は、装置の設定と操作を簡便化するという多くの自動化と合わせて、2010年にいくつかの研究船にあるSeaFlowに組み込まれている。われわれは200日分以上のデータを集めており、これはフリーサイトメトリのサンプル10万回分に相当する。さらに、米ロングビーチから香港まで太平洋を横断する貨物船上でSeaFlowを操作して、この横断における5万km同等のデータも収集した。

海洋における$CO_2$挙動の生物地球化学的な計測を合わせて、SeaFlowのデータは、植物プランクトンのホットスポットが炭素循環量の不均化の原因であることを示唆している。この機器のよりコンパクトで低出力なバージョンであれば、無人潜水機や海洋係留、研究ブイを含めた計測プラットフォームを拡大できるだろう。理想は、この技術によって世界で経済的な不利益を被っている地域の水質や、近隣の運河の工業化の影響を調査することだろう。

**参考文献**

(1) F. Partensky, W. R. Hess, and D. Vaulot, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63, 1, 106–127 (1999).
(2) M. Sieracki et al., "Sustained ocean observations and information for society," Proc. OceanObs '09, 2, ESA Publication WPP-306 (2009); doi:10.5270/oceanobs09.cwp.81.
(3) G. B. J. Dubellar and P. L. Gerritzen, Sci. Mar., 64, 255–265 (2000).
(4) R. J. Olson, A. Shalapyonok, and H. M. Sosik, Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 50, 2, 301–315 (2003).
(5) A. Cunningham, D. McKee, S. Craig, G. Tarran, and C. Widdicombe, J. Marine Syst., 43, 1–2, 51–59 (2003).
(6) M. Thyssen, N. Garcia, and M. Denis, Biogeosciences, 6L, 569–583 (2009).
(7) J. E. Swalwell, T. W. Petersen, and G. van den Engh, Cytometry Part A, 75, 11, 960–965 (2009).
(8) J. E. Swalwell, F. Ribalet, and E. V. Armbrust, Limnol. Oceanogr., 9, 466–477 (2011).

**著者紹介**

ジャレッド・E・スウォルウェルはワシントン大アルムブラスト（Armbrust）生物海洋学研究室のリサーチエンジニア。

e-mail: jarred@u.washington.edu　URL: http://armbrustlab.ocean.washington.edu

LFWJ