フローサイトメトリーを拡張する新しい320nm紫外線レーザ源

ウィリアム・テルフォード、リン・ストリックランド、マルコ・コショレック

320nmレーザは高次元フローサイトメトリーをより簡便に、より安価にする。

フローサイトメトリーは、生物医学科学における基礎技術である。細胞に結合する蛍光タグ分子がレーザによって励起し、光電子倍増管（PMT）や他の光センシング技術を用いて検出する（**図1**）。細胞は、流体力学的に集められた液体ストリーム内で、レーザビームによって誘導される。

いくつかのフローサイトメータは、細胞表面もしくは内部に結合する蛍光タグのみ解析する。蛍光活性化細胞選別（FACS）では、液体ストリームは水滴となり、水滴が静電的に帯電し、収集管に集められる。蛍光タグに基づく細胞の分離と回収が細胞選別によって可能となり、回収された細胞は機能研究やタンパク質・ゲノム解析に利用できる。

フローサイトメトリーは、免疫系、がん細胞学、感染症の理解を広めるうえで決定的なツールとなっている。この技術において、細胞を標識するために使われる蛍光プローブは、複雑な混合物の中から個々の細胞の種類、さらに一細胞の物理的・生理学的特徴を同定できる。

フローサイトメトリー向けレーザの背景

フローサイトメトリーは、蛍光タグを励起するレーザ技術に完全に依存する[1]。初期のフローサイトメータは単一のレーザ（当時は巨大な水冷式イオンレーザ）が使われ、フルオレセインやローダミンなどのよくある蛍光色素を含む、せいぜい1種類か2種類の蛍光プローブを励起できた。最近のフローサイトメータは今や、紫外線（355nm付近）から赤の長波（700nm付近）まで、全可視スペクトルに広がる波長の固体レーザを使う。

高度なサイトメータには、10種類もの異なる単一波長レーザを搭載でき、異なる励起と発光特性をもつ大量の蛍光プローブを励起できる。初期の装置は、1種類か2種類のプローブを励起、検出するしかできなかったが、現在の高度な装置では30種類以上の蛍光プローブを同時に検出できる。この高次元分析によって、免疫系に関する知見がかつてないレベルに広がっている。

近年のフローサイトメータは、多くのレーザ波長と、それらに対応する蛍光プローブを用いて、20種類以上の細胞特性を同時に分析する。高度な装置は、シアンレーザ（488nm）、赤色レーザダイオード（640nm付近）、緑色、黄緑、黄色のダイオード励起固体（DPSS）レーザ（532nm、552nm、561nm）の使用が普通になるだろう。これらのレーザはすべて、多様な蛍光色素を励起する（**図2**）。

紫色レーザダイオードは、BDシリゲン社（BD Sirigen）のBrilliant Violet（BV）ポリマー色素の発展とともに重要な励起源である[2]。7種類のBV色素（BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV787）はスペクトル的に混合可能であり、同時に分析で

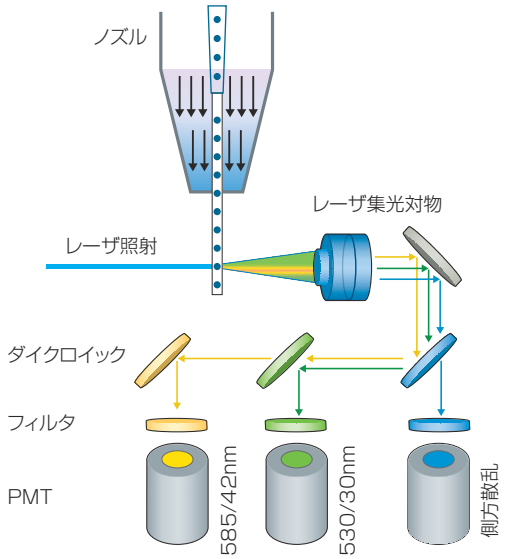


図1　基本的なフローサイトメトリーのオシレーションの概要を描いた。細胞は、ノズルまたは内にあるクォーツのフローセルによって流体力学的に集められる。そして、液体ストリーム内でレーザビームによって誘導される。シグナル収集光学は励起した蛍光シグナルを集め、シグナルはダイクロイックミラーと狭帯域フィルタを用いてPMTに進む。近年の装置では、レーザ伝送やシグナル収集にファイバ光学を利用できる。

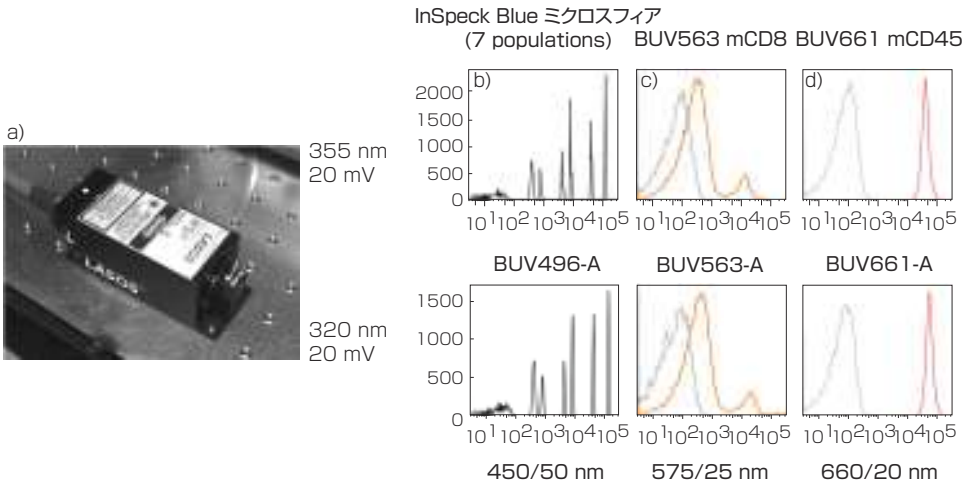


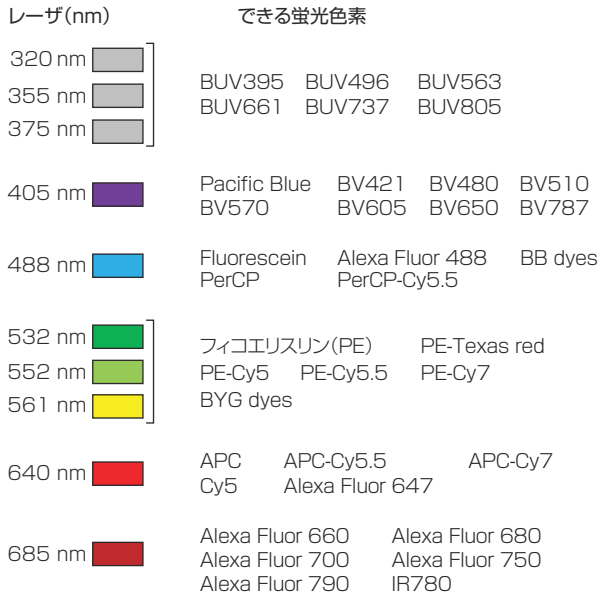
図3　(a)ラソス社の320nmレーザモジュールは非常に小さい。(b)InSpeck Blueのミクロスフィアの混合物(7つの集団)を20mWで、320nmのレーザ源(上)と355nmのレーザ源(下)を用いて分析した。(c、d)BUV563とBUV661で標識したマウスの膵臓細胞を20mWで、320nmのレーザ源(上)と355nmのレーザ源(下)を用いて分析した。色の付いた線が標識された細胞を、グレーの線が標識されていないコントロールを示す。InSpeck BlueのミクロスフィアのBUV563とBUV661で標識された細胞で使われるバンドパスフィルタのスペクトルカーブをヒストグラムの下に示した。(提供:ウィリアム・テルフォード氏)

きる細胞マーカー数を劇的に増やした。紫外(UV)レーザは、近年開発された6種類のBrilliant Ultraviolet色素(BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805)を用いるフローサイトメトリーにおいて新たな重要性をもたらしており、同時に蛍光分析する合計数は30種類近くになった。UVレーザは現在、高度なフローサイトメトリー装置で重要なコンポーネントである。

近年のフローサイトメータは、BUVや他のUV励起色素を励起するために、周波数3倍のネオジウムドープバナデート($Nd:YVO_4$)の355nm固体レーザに主に依存している。これらのレーザは、かつてUV励起に必要とされたアルゴンイオンやクリプトンイオンレーザよりもはるかに性能が向上しており、より小さく、より維持しやすくなっている。しかしながら、いまだに高価であり、高価格帯の装置において最もコストのかかる唯一のコンポーネントである。

より安価や近UVレーザダイオード(375nm)が、BUVを含む多くのUV励起色素に対する355nm源の代わりになり得る[3]。だが、これらの波長は、シリーズの中で波長の最も短いBUV395の発光範囲に対して非常に近く、検出を困難にしている。それゆえ、高次元フローサイトメトリーのコストを下げる、より安価な固体UVレーザオプションが必要とされている。

図2　フローサイトメトリーで用いられる蛍光プローブは、励起に必要なレーザ波長とペアになる。これらのプローブのほとんどはスペクトル的に混合可能で、レーザ波長を十分に配置した装置では同時に使用できる。Brilliant Blue(BB)、Brilliant Yellow Green(BYG)、Brilliant Violet(BV)、Brilliant Ultraviolet(BUV)色素はBDシリゲン社の商標、Pacific Blue、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 790はサーモフィッシャー社(Thermo Fisher)の商標である。



コンパクトな320nmレーザモジュール

この状況は、独ラソス社（LASOS）が最近開発した、小さな空冷ユニットに収めた連続波発光と小型の固体320nmレーザモジュールによって変わってきている。フローサイトメータは、歴史的にヘリウム・カドミウム（HeCd）レーザを搭載しており、UV色素を励起するために325nmのレーザラインを活用する。ところが、HeCdレーザは大きく、あまりパワフルではなく、経年劣化でノイズ問題が生じる。320nm源は、このレガシーである波長に非常に近く、合理的にBUV色素を励起するスペクトルに基づいていると予測できる。

このレーザ波長とレーザ源がフローサイトメトリーに適しているかテストするため、BD LSR IIフローサイトメータの従来の355nmUVレーザ源の代わりに、このモジュールを組み込んだ（**図3**a）[4]。レーザは、細胞をレーザ路に注入するために使われる液体ストリームに当たるよう配置された。本来は355nmレーザ源向けに構成された装置の光学は、320nmに下がっても効率は維持されており、試料ストリームとビームに集束させる合成石英レンズにレーザを進ませる広帯域のUVミラーを用いた。

フローサイトメトリーは、装置動作が適切かどうか決定するため、そして新規レーザ源をテストするため、シミュレーションサンプルとして蛍光色素タグが付いたポリマーミクロスフィアを用いた。明るいUVに励起するミクロスフィアと、暗いUVに励起するものの混合物（サーモフィッシャー社のInSpeck Blueミクロスフィア）も分析された。最も暗い集団の解像度が、良質な励起と検出の指標となる。最も暗い集団を含むこれらのミクロスフィアは、このレーザ源で容易に分解できた（図3b）。感度は、同等の出力において355nmレーザと類似していた。次に、マウスの膵臓細胞を、2種類のBUV色素であるBUV563、BUV661に結合する抗体を用いて標識し、細胞表面マーカーとした。320nmモジュールによって、これらの試料は355nm源とほぼ同様に励起した（図3c、3d）。

これらの結果から、ラソス社の320nmレーザ源が、フローサイトメトリーにおいて355nm励起の良い代替となることが示された。これらのモジュールは、ほとんどの355nm源に比べて小さく安価であるため、高次元フローサイトメトリーに対して費用対効果の高い代替である。この範囲と全可視スペクトルの両方において、小型の固体レーザ源はフローサイトメトリーに革命をもたらし、近年の装置におけるサイズ、コスト、保守ニーズを減らすことができる。これは、技術開発において有望なトレンドであり、より良い生物医学の分析装置に貢献し続けるだろう。

参考文献

(1) W. G. Telford, Methods Cell Biol., 102, 375–410 (2011); doi:10.1016/b978- 0-12-374912-3.00015-8.
(2) P. K. Chattopadhyay et al., Cytometry A, 81, 456–466 (2012).
(3) W. G. Telford, Cytometry A, 87, 1127–1137 (2015).
(4) W. G. Telford, L. Strickland, and M. Koschorreck, Cytometry A, 91, 314– 325 (2017).

著者紹介

ウィリアム・テルフォードは米国立衛生研究所、米国立がん研究所の実験移植、免疫部門職員（e-mail: telfordw@mail.nih.gov）、リン・ストリックランドはラソス北米社、マルコ・コショレックはラソス社（ドイツ）。

LFWJ

LASOS
For worldwide photonics

顕微鏡、ラマン分光、ホログラフィー、フローサイトメトリに最適！

DPSS レーザー

波長：320, 473, 515, 532, 540, 546, 552, 561, 594, 607, 640 nm

LDM-XT LD レーザー

波長：375, 395, 405,415, 425, 445, 457, 473, 488, 505, 515, 520, 633, 638, 660, 685, 705, 730, 785, 808, 830 nm

He-Ne レーザー

波長：543, 594, 632.8 nm

Ar レーザー

波長：454.5, 457.5, 488, 514.5 nm

http://www.japanlaser.jp/
E-mail: lase@japanlaser.jp

JLC JAPAN LASER 株式会社日本レーザー

本　社　〒169-0051 東京都新宿区西早稲田2-14-1
TEL: 03-5285-0862（直）
大阪支店　TEL: 06-6323-7286
名古屋支店　TEL: 052-205-9711