

フローサイトメトリーと組み合わせてサブミクロンの検出を可能にする共焦点フィルタリング

ロバート・V・キメンティ

擬似的な共焦点設計により、光学ノイズリダクションを介して空間分解能が向上することで、細胞外小胞などのサブミクロン粒子の解析が可能になる。

異種細胞の混合物を個々の細胞ごとに同定、ソート、計数する機能として、フローサイトメータは有効な実験ツールである。フローサイトメトリーは、HIV患者を評価する手段としてT細胞を計数する必要性から、1990年代に研究施設から臨床応用へと移行した⁽¹⁾。今日では、フローサイトメータは血液細胞の表現型の特徴付け、アポトーシスマーカーの測定、細胞内サイトカインの検出などにおいて広く使われている⁽²⁾。フローサイトメトリーの新たな、そしてすぐれた応用の1つが、サブミクロン物質、特に細胞外小胞の測定である。細胞外小胞は細胞内コミュニケーションの手段として細胞から分泌されるため、臨床応用においてバイオマーカーとして非常に興味深いものとなっている⁽³⁾。

しかし、細胞外小胞のサイズは非常に小さく、従来のフローサイトメータで検出するのは困難だった。光路内の迷光に起因するノイズが原因である。近年、オランダのユトレヒト大(Utrecht University)のヴォーベン氏らの研究グループ(Wauben Research Group)は、ベルギーのBDバイオサイエンスヨーロッパ社(BD Biosciences Europe)と共同で、フローサイトメータの空間分解能を格段に向上させるために新規の光学集光設計を開発した。チームは

2017年のCYTOカンファレンス⁽⁴⁾及び2020年に『Cytometry Part A』誌⁽⁵⁾に掲載された中で、バックグラウンドノイズを減少させて空間分解能を向上させるために、検出システムにおける共焦点ピンホールを最適化するアイデアを初めて提案した。

フローサイトメータの基礎

フローサイトメータのことを最も単純に述べると、粒子カウンターと蛍光光度計を組み合わせたものであり、物理的・生化学的特性に基づいて細胞などの小粒子を一斉に選別できる。あらゆるフローサイトメータは4つの基本的なシステム、すなわち流路系、照射系、検出系、データ解析系から構成される(図1)。共焦点フィルタリングは

主に検出系に関わるが、他の系の主な機能も理解しておくことは有用だろう。流路系は、個々の細胞または粒子を1列縦隊の流れに誘導することで、それぞれを個別に分析できる。照射源は通常、1つ以上の低ノイズTEM₀₀レーザーから構成される。レーザーを粒子の流れに照射すると、個々の細胞がビームを通過する際に蛍光分子が励起し、光散乱が誘導される。

検出系は2つの主要パートで構成される。1つは散乱強度を測定するもの、もう1つはさまざまな波長の蛍光強度を測定するものだ。前方散乱光(FSC)は照射路に沿って、側方散乱光(SSC)は照射路と直交して測定される。FSCは、散乱体の周辺で回折したレーザービームの結果であり、細胞や粒子の相対サイズと相関する。一方、SSCは散乱体の構造や粒度に依存する。

フローサイトメータの蛍光の検出系

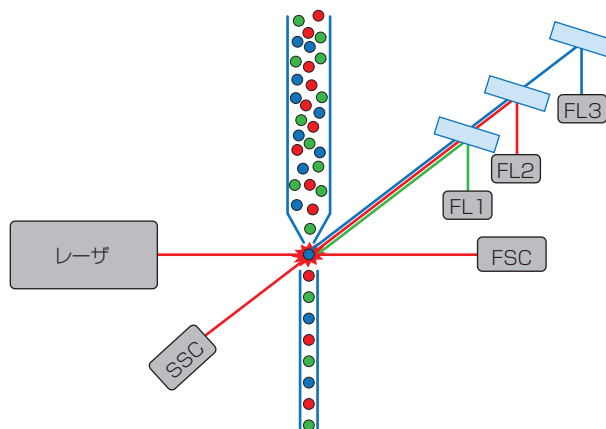


図1 従来のフローサイトメータの設計を示す。ここには、一般的な流路系、照射レーザー、そしてFSCとSSC、3チャンネルの蛍光検出器がある。多くの最新のフローサイトメータでは、複数の照射レーザーと、3種類以上の蛍光検出チャンネルが搭載されている。

もまた、レーザーの照射路に直交する光を測定できるように構成されている。蛍光は、波長特異的な光検出器へシグナルを誘導する一連のダイクロイックフィルタを介して検出される。そして、特定の蛍光体に対する親和性の有無によって、細胞の種類を生化学的に識別できる。フローサイトメーターによっては、個々のフィルタベースの検出チャンネルではなく、分光計によって蛍光を分析することに注意が必要である⁽⁶⁾。

データ解析系は、SSCとFSC検出器による物理データと、蛍光検出系による生化学的データを組み合わせ、異種細胞の混合物をまとめてカウント、ソートする。情報は、ユーザーが比較したいパラメータ数に応じて、1次元ヒストグラム、2次元散布図、3次元等高線プロットとして表示できる。さらに、データポイントの1セット(SSCとFSCの1組など)の情報を利用して、別のセット(異なる蛍光検出器)におけるゲーティングパラメータを作成するのに有用であると、多くの使用者が体感している。

ノイズ減少による分解能向上

FSCはレーザー光路に沿うため、バックグラウンドノイズの影響を非常に受けやすい。加えて、光は弾性的に散乱するため、FSCの光は照射レーザーと同じ波長であり、従来の光学フィルタは使用できない。長年にわたり、レーザー光をフィルタリングするために複数の異なるアプローチが計測工学によって試されてきた。そして最終的に、最も効果的なソリューションとして、集光光学系の前面に不透明な遮光物を設置することを業界標準にした。これにより、障害物周辺を通過する軸外のFSCを集光しながら、光学系の中心にあるレーザー光を遮断できる。このアプローチは、直接レーザー光をフィルタリングす

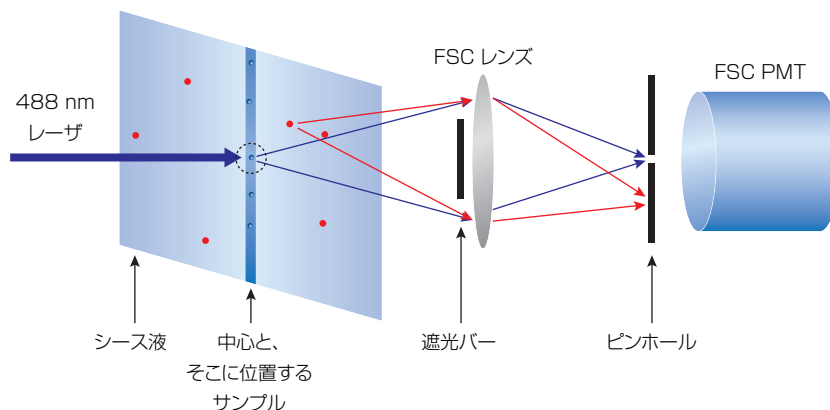


図2 FSCの擬似的な共焦点の光学設計には、遮光バー、集光レンズ、ピンホールがある⁽⁵⁾。(著者の許可を得て出典から転載)

るといふ優れた性質を有するが、システム内の軸外迷光をあまり遮断できず、バックグラウンドノイズフロアが生じる要因となる。

ほとんどの細胞計数アプリケーションにおいて、光学的バックグラウンドノイズは無視できる。しかし、粒子サイズが小さくなるにつれてFSC強度が弱くなり、ノイズフロアを超えて検出できなくなるため、細胞外小胞のようなサブミクロン粒子の解析は非常に困難である。ヴォーベン研究グループはこの課題に取り組むため、空間フィルタとして機能する光路内で最適なピンホールを探索することにした。その設計は、共役するピンホールがないため技術的には真の共焦点ではないものの、個々の散乱体そのものがピンホールに共益するので、非常に類似した効果が得られた。図2に、ピンホールを設置したFSCの光学レイアウトの模式図を示す。遮光物周辺を通過して光検出器に向かう一般的な迷光を、この擬似的な共焦点配置がどのようにフィルタリングできるか、この図から容易に理解できる。

『Cytometry Part A』誌に掲載された論文⁽⁵⁾の中で、アルケステイン氏(Arkesteijn)らはFSCを集光するた

めに、BD Influx Jet in Airソーターとミットヨの20倍plan apo無限補正対物レンズを用いて、作動距離20mmでこのアプローチをテストした方法を記載した。彼らは、対物レンズの手前に調整可能な7mmの遮光バーを設置することで、システムを変更した。遮光バーの先には焦点距離50mmの収光レンズを設置し、光検出器の手前にある18mmのピンホールを通過してFSC光を集める。直径100nmの蛍光ミクロスフェアを用いて、異なる遮光とピンホールサイズの組み合わせを29種類テストし、8mmの遮光バーと200 μ mのピンホールが最適な組み合わせであることを明らかにした。30秒のバックグラウンド測定中に記録された最小のイベント数を調べることでFSCの閾値を測定し、定量化した。

研究者は、同じ擬似共焦点光学設計を用いて、ミクロスフェアだけでなく、直径140nm以下の細胞外小胞に蛍光タグを付けて精製したものも検出できる性能があるか、証明に取り掛かった。この技術は、精製した細胞外小胞の計数には優れた結果を示したとしながらも、生物学的サンプルの異種混合物を用いて検証する前にさらなるテストが必要であると強調した。著者はまた、

本研究では「半定量的解析」を用いたことにも言及し、集光効率における影響を理解するために、将来的にはシステムの完全なフーリエ光学解析が必要であると認識している。

細胞外小胞やその他のサブミクロン粒子を解析できる大きな可能性を示している。この技術などにより、フローサイトメータの光学的バックグラウンド

ノイズを減らして空間分解能を向上させることで、これまで考えられなかった新しい、画期的なサイトメトリーアプリケーションが開かれるだろう。

加速する勢い

フローサイトメトリーをサブミクロンに応用することに対して、急速に勢いが増している。このことは、2020年のバーチャルCYTOカンファレンスにおける本会議の2つ、「細胞内サイトメトリー」と「細胞外・大洋サイトメトリー」が、そのことに特化していたという事実から明らかである。

研究者の結果は未だに予備的なものではあるが、共焦点フィルタリングは、

参考文献

- (1) T. A. Fleisher and J. B. Oliveira, J. Clin. Immunol., 1239-1251 (2019).
- (2) A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, and A. Nalbant, Crit. Rev. Biotechnol., 37, 2, 163-176 (2017).
- (3) G. Van Niel, G. d'Angelo, and G. Raposo, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 19, 4, 213 (2018).
- (4) G. J. Arkesteijn, S. F. Libregts, E. N. Nolte-'t Hoen, and M. H. Wauben, "Improved flow cytometric light scatter detection of submicron-sized particles by reduction of optical background signals," 32nd Congress of the International Society for Advancement of Cytometry, Boston, MA (Jun. 10-14, 2017).
- (5) G. J. Arkesteijn, E. Lozano - Andr?s, S. F. Libregts, and M. H. Wauben, Cytometry Part A, 97, 6, 610-619 (2020).
- (6) B. Gefvert, Laser Focus World, 55, 2, 28-30 (2019); <https://bit.ly/LFW-Cytometry>.

著者紹介

ロバート・V・キメンティは、米RVCフォトンクス社ディレクターであり、米ローワン大の物理天文学科のインストラクター。robertc@rvchotonics.com

LFWJ

光産業技術マンスリーセミナー

OITDA

Optoelectronics Industry and Technology Development Association

プログラム (12~1月)

No. / 開催日	講演テーマ / 講師
第451回 12月15日(火) 15:30-17:30	「ガラスの超高速精密加工 ～フェムト秒レーザー誘起高速現象の解明とその応用～」 講師：伊藤 佑介 氏 (東京大学)
第452回 1月19日(火) 15:30-17:30	「光ファイバセンシング技術の新たな展開」 講師：水野 洋輔 氏 (横浜国立大学)

- 場所 オンライン開催 (WebEx 会議)
- 定員 各90名
- 参加費 光協会賛助会員：1,500円 (税込み) / 一般参加：3,000円 (税込み)
大学・公的機関：無料 (学生・院生含む)
※支払いは、当日受付にて現金でお願いします。
- 申込方法 オンライン申込フォーム >>> http://www.oitda.or.jp/main/monthly/monthly_postmail.html
- 申込締切 定員になり次第締め切ります。なお、締め切った場合には Web 上にその旨を掲載します。

問い合わせ先

一般財団法人光産業技術振興協会マンスリーセミナー担当 村谷、間瀬
〒112-0014 東京都文京区関口1-20-10 住友江戸川橋駅前ビル7F TEL:03-5225-6431 FAX: 03-5225-6435
E-mail: mly@oitda.or.jp URL: <http://www.oitda.or.jp/>