

## フローサイトメトリー ～「前にならえ」並べて順に数えます～

金山 直樹

近年の多数の研究において、多細胞生物ではもちろんのこと、単細胞生物であっても細胞集団における個々の遺伝子発現が不均一であることが示されており、生命現象を1細胞単位で観察する、いわゆるシングルセル解析技術の重要性は増している。顕微鏡観察はシングルセル解析の起源であるが、ハイスループットに個々の細胞を測定する方法の代表格はフローサイトメトリーであろう。フローサイトメトリーは、微粒子、微生物、動物細胞、原生動物などを計数する分析手法として広く利用されている。多重パラメータ化（マルチカラー化）することによって、細胞周期を始め、各種マーカーを指標とした細胞集団の同定や分取、また、その集団における特定のマーカーの発現量の評価など、生命科学や医学など多様な分野でさまざまな応用がなされている<sup>1-4)</sup>。

### フローサイトメトリーとは

フローサイトメトリー（flow cytometry）とは、その名の通り細胞を流して計数する技術であり、その測定装置はフローサイトメーター（flow cytometer）と呼ばれる。Becton Dickinson社が販売しているフローサイトメーターは、FACS（fluorescence activated cell sorter）の商標で呼ばれており、この名称をご存じの方も多いであろう。その原理を簡単に述べるとすれば、「細胞を一列に並べて流して、光や蛍光色素を用いて順番に数える」ことにより、サンプル中の細胞の特性を迅速かつ高感度に分析することである。同じく蛍光を用いる蛍光顕微鏡と比べると、(1) 短時間に多くの細胞数を客観的に測定可能（最大数万細胞/秒）、(2) 高感度に定量的な測定が可能、(3) 同一条件での測定が可能、(4) 同時に多重パラメータを測定可能、(5) 特定の細胞を分取可能、といった特徴を持つ。細胞測定に特化した装置のほか、測定データに基づいてリアルタイムに目的の細胞集団を分取できるセルソーター（cell sorter）を装備した装置も開発されている。フローサイトメーターと顕微鏡との決定的な違いは、光学検出系によって得られるデータが、細胞の像としてではなく、一群の測定値（定量的なシグナル）として処理されることである。データ処理の

高速化・高密度化と、細胞構造に関する情報の取得をトレードオフしているとも言える。最近では、顕微鏡にフローサイトメーターの特徴を賦与することでハイスループット化した、イメージングサイトメーター（imaging cytometer）も開発されている。

世界初のフローサイトメーターの開発については諸説ある。1949年に、フロー中の細胞の流れをインピーダンスの変化として計数する「コールターカウンター」が、Wallace Coulterにより発明された<sup>4)</sup>。セルソーターについては、1965年にロスアラモス研究所（原子爆弾開発で有名）のMack Fulwylerらにより、インクジェットプリンターの原理を利用した液滴電荷方式の細胞分取装置が世界で初めて開発された<sup>5)</sup>。1960年代までにはフローサイトメーターの個々の基本的な技術要素は開発され、1970年代には現在のフローサイトメーターの原型となる装置が販売されている。セルソーターに装備されている分取装置は、当初、原子爆弾によって発生した放射性降下物の影響を研究するために、地上核実験で発生したキノコ雲の中に置いた動物の肺の中に存在する粒子を、測定、分取する装置として開発された。生物学者・免疫学者であるLeonard A. HerzenbergとLeonore A. Herzenbergの研究グループが、分取できる粒径が動物細胞と同等であることに着目し、Fulwylerらの技術などを用いてFACSを開発した<sup>6,7)</sup>。Hezenbergらが自らの生物学研究・免疫学研究のためにFACSを開発し、それを実際に使用して成果を挙げたことは、フローサイトメトリーが生命科学において欠かせない分析技術として発展するに至った重要なマイルストーンの一つであろう。この業績により、Leonard A. Herzenbergは2006年に京都賞を受賞している<sup>8)</sup>。

### フローサイトメトリーの原理

フローサイトメトリーの技術的要素は、大きく分けると、「流路系」「光学検出系」「電気パルス処理（電子回路）系」「データ処理（コンピュータ・ソフトウェア）系」「ソーティング系」「蛍光色素」「モノクローナル抗体」であり、このリストを見るだけでもフローサイトメトリーが非常

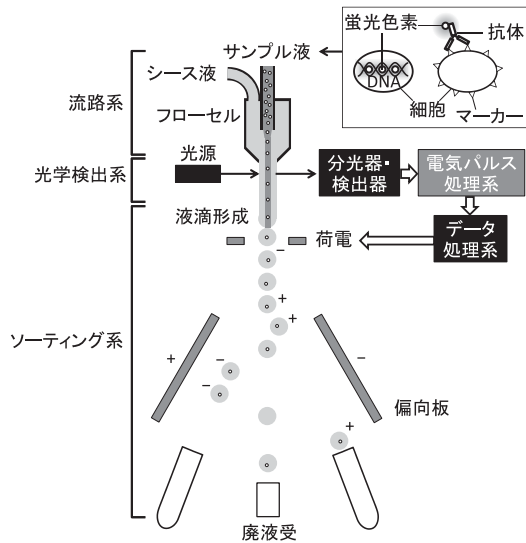


図1. フローサイトメーターの概念図

に多くの技術の塊であることが理解できる(図1)<sup>1-4)</sup>。

**流路系** 正確に細胞を1個ずつ測定するには、細胞が液中を1個ずつ整列して流れていく必要がある。それを実現するのがフローセル (flow cell) と呼ばれる流体力学に基づいて設計された部品である。サンプル液の流れ (sample flow) を包むようなシース (鞘) 液の流れ (sheath flow) を作り、サンプルフローの圧力をシースフローの圧力より少し低くすると、層流を形成する過程で流体力学的絞り込み (hydrodynamic focusing) が生じて、非常に細いサンプル液の流れを作ることができる。これにより、サンプル中の細胞を一列に並べて非常に限られた流路に連続的に流すことが可能になり、この細い流れに集光されたレーザービームを照射することによって、細胞を1個ずつ高感度、高分解能、高速に測定することができる。

市販されている装置の大部分は流体力学的絞り込みを採用しているが、マイクロキャピラリーを用いることによってシース液を用いないフローセルのほか、最近では、超音波を照射することによって流れの中心に粒子を集積させる、音響絞り込み (acoustic focusing) と呼ばれる技術も登場している<sup>9,10)</sup>。この技術は、パイプオルガンの共鳴管の中央に埃が整列するという100年以上前の発見に基づいている。

**光学検出系** フローサイトメーターのほとんどで、光源としてレーザー (light amplification by stimulated emission of radiation) を使用する。レーザー光が集光レンズを通してフローセル内のサンプルフローに照射されると、サンプル中の細胞にレーザー光があたった場合

に散乱光や蛍光が生じる。散乱光には、レーザー入射とほぼ同じ方向に散乱する前方散乱光 (forward scatter, FSC)、垂直方向に散乱する側方散乱光 (side scatter, SSC) がある。FSCは細胞の大きさ、SSCは細胞の形態、核、顆粒などの細胞内部構造に関する情報を反映する。発生した散乱光や蛍光は、集光レンズとピンホールを用いて迷光を除去した平行光線に変換された後、各種光学フィルターの組み合わせによりさまざまな波長成分に分光され、最終的にはフォトダイオードや高感度の光電子倍增管 (photo-multiplier tube, PMT) などの検出器によって検出される。この光学検出系の部分は、共焦点レーザー走査顕微鏡と非常に類似している。複数のレーザー光源と光学フィルター・検出器のセットを使用することによって多重パラメータ解析が可能になる。分光フィルターではなく、最近の共焦点レーザー顕微鏡に装備されているようなプリズムによって光を分離して検出する装置も開発が進んでいるようである。

**電気パルス処理系** レーザー光を細胞が通過するときに発生する散乱光や蛍光が検出器に検出されると、検出器に電圧パルスという電圧と時間の次元を持ったアナログ値が発生する(図2)。電圧パルスの積分値は、発生した光の総量に比例するので、この値をアンプで増幅した後、整数値に変換する(アナログ/デジタル変換)。1個ずつの細胞についての複数パラメータの測定値が、1セットのデータとしてコンピュータに記録される。各蛍

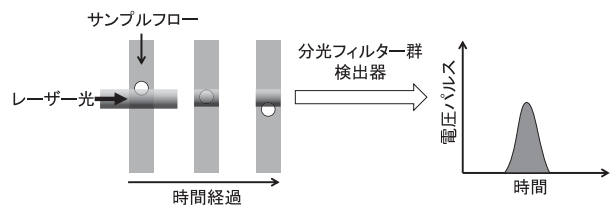


図2. 電圧パルスとしての細胞の検出

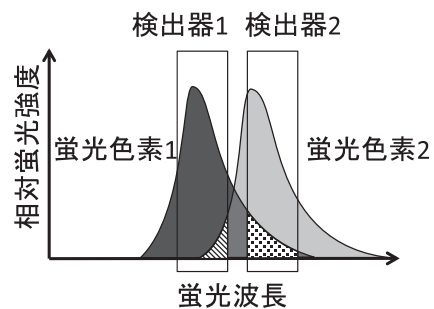


図3. 蛍光色素の蛍光波長分布が重複する場合の模式図。重なりの部分を差し引いて補正する。

光色素の蛍光には波長分布があるため、光学フィルターで分離した各波長域の光は、目的の蛍光色素以外の色素由来の蛍光の漏れ込みも含んでいる(図3)。漏れ込み部分を差し引いた蛍光データを得るために、電子回路により電氣的または数学的に補正することを蛍光補正(コンペンセーション)と呼ぶ。コンペンセーションは、下流のデータ処理系によってソフトウェア的に実施することも可能である。

**データ処理系** アナログ/デジタル変換して数値化された電圧パルスは、コンピュータに取り込んで処理することが可能になる。個々の細胞の測定パラメータを数値にしたがってプロットしていくと、細胞数頻度分布が形成される。Y軸に細胞数、X軸に測定パラメータを取ったグラフをヒストグラムと呼ぶ。X軸とY軸にそれぞれパラメータを割り当てたものを二次元ヒストグラムまたは二次元プロットと呼び、表示されたドットの一つ一つが個々の細胞の測定値である。たとえば、ヒト末梢血から単離した白血球を測定したデータをFSCとSSCでプロットすると、リンパ球、単球、顆粒球の集団に分離することができる(図4A)。多重パラメータを測定した場合、そのすべてを分かりやすく同時に表示させることはできない。そこで、あるパラメータで表示した二次元プロットの中から、関心のある細胞集団のみを別のパラメータのヒストグラムあるいは二次元プロットで表示させる。たとえば、FSC/SSCで分離したヒト末梢血中の

リンパ球集団を、特定のマーカー発現を指標とし、それを特異的な蛍光標識抗体によって検出することによってTリンパ球(CD3陽性CD19陰性)とBリンパ球(CD19陽性CD3陰性)などに、さらに分離することも可能である(図4B, 4C)。このようなデータ処理を「ゲーティング」と呼ぶ。最終的に、ヒストグラム上で分離された細胞集団のうち、関心のある細胞集団の割合やその集団のパラメータ値の平均値などを表示できる。近年のフローサイトメーターの高機能化は、電気パルス処理のための電子回路や、データ処理のためのコンピュータ、ソフトウェアの高度化によるところが大きい。

**ソーティング系** 液滴荷電方式による細胞分取機能を備えたセルソーターでは、フローセル全体に超音波発生装置によって振動を与えることによって、フローセルの先端から噴出されたサンプル/シース流に途中から液滴を形成させる。上記の測定系によって分取すると判断された細胞が流れてくると、水流が液滴に分かれる直前に+または-の電荷を加え、目的の細胞が含まれる液滴を+または-に帯電させる。負荷される電荷は、細胞固有の電荷には依存せず、極性および強度を任意に変更できる。したがって、液滴が±4000~6000Vの電位差を負荷した偏向板の間を落下するとき、+に荷電した液滴は-極板側に、-に荷電した液滴は+極板側に、荷電強度に依存して引き寄せられ、捕集チューブに内に回収される。帯電されなかった液滴はそのまま落下して廃棄される。同一サンプル中に含まれる複数の細胞集団に異なる電荷を負荷することにより、それぞれを異なるチューブに同時に分取することが可能である。また、チューブだけでなくマイクロウェルプレートの各ウェルに1個ずつ細胞を分取する装置を備えたセルソーターもある。

**蛍光色素** フローサイトメトリーの開発当時、使用できる色素はDNAを染色するもので、細胞内のDNAを定量的に測定することによる細胞周期解析がフローサイトメトリーの初期の応用例であった。フローサイトメトリーの多重パラメータ化に伴って、多種多様な蛍光色素の開発が進んだ<sup>11)</sup>(表1)。個々の蛍光色素の説明は本稿では省略するが、使用できる蛍光色素の特徴はレーザー顕微鏡と同様である：(1) 使用するレーザーの波長で励起可能である、(2) 蛍光が強い、(3) 励起波長と蛍光波長の差(ストークスシフト)が大きい、(4) 細胞に結合した蛍光色素の量とその蛍光強度が比例する、(5) 光に対して安定である。1本のレーザーで多重パラメータを測定する場合は、使用する蛍光色素同士の蛍光波長の重複が少ない方がよい。すなわち、長波長側の色素は、蛍光波長が励起波長から長波長側にずれる、いわ

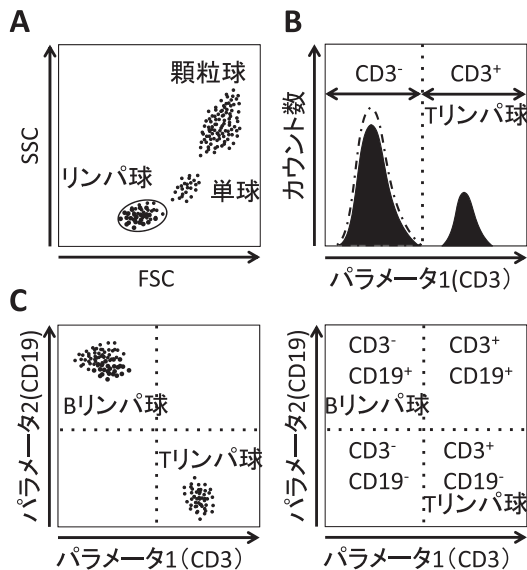


図4. フローサイトメトリーのデータ表示の模式図。(A) FSCとSSCの二次元プロット；(B)リンパ球集団をゲーティングし、別のパラメータでヒストグラム表示、一点鎖線は非染色コントロール(陰性コントロール)；(C)リンパ球集団の二次元プロット表示とデータの解析の例。

表1. フローサイトメーターで使用される代表的なレーザーと蛍光色素の例

レーザー波長	蛍光色素	励起波長 (nm)	最大蛍光波長 (nm)
488 nm	Alexa Fluor 488	495	519
	FITC	495	530
	PE	488	575
	PE-Cy5	広範囲	670
	PE-Cy7	広範囲	779
	PI	536	617
	7-AAD	546	647
	EGFP	489	508
	CFSE	492	517
	633 nm	APC	650
Alexa Fluor 647		650	665
Cy5		650	670
APC-Cy7		広範囲	779
405 nm		Alexa Fluor 405	401
405 nm	Cascade Blue	375, 400	423
	Pacific Blue	410	455
375 nm	DAPI	345	455
	Hoechst33342	343	483

ゆるストークスシフトが大きい色素を用意する必要がある。単一色素で上記の特徴を満たし、かつ、ストークスシフトの大きい色素は多くない。タンデム色素は、蛍光特性の異なる色素を結合させたものであり、レーザーで励起された第1の色素から近接する第2の色素にエネルギーが転移して蛍光を発する。この過程は、蛍光共鳴エネルギー転移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) と呼ばれ、ストークスシフトの拡張に利用できる。表1の色素のほとんどは、抗体の標識やDNAの染色に用いられるものであるが、細胞内の酵素活性、pH、膜電位やカルシウムイオンを検知して蛍光を発する色素など、さまざまな色素が開発されている。また、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescence protein) やさまざまな蛍光タンパク質遺伝子をマーカーとして特定の遺伝子のプロモーターに連結して細胞に導入しておけば、遺伝子発現を蛍光色素で染色することなく直接フローサイトメトリーで観察することができる。

**モノクローナル抗体** フローサイトメトリーが生命科学にとって重要な分析技術となった一つのきっかけは、細胞のマーカーに特異的なモノクローナル抗体を作製することができるようになったからである。フローサイトメトリー開発当初、免疫動物の血清から採取したポリクローナル抗体が使用されていたが、多種多様な抗体を含むために標的抗原に対する特異性を完全に保証することができず、ロット差も大きく、また、よいロットであっても量が限られているなどの問題があった。抗体産

生細胞とミエローマ細胞株の細胞融合によって不死のハイブリドーマを作製するという、MilsteinとKöhlerによって確立されたモノクローナル抗体作製法によってこの問題は解決された<sup>12)</sup>。その後、各種細胞の細胞表面の抗原に対する抗体が多数、網羅的に作製され、フローサイトメトリーで使用された。白血球の細胞表面に存在する分子がCD (cluster of differentiation) 番号で分類されるのは、この頃、多数作製された白血球の細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を、白血球分化に関わる抗原ごとにクラスタ解析によって分類したことにちなんでいる。

### フローサイトメトリーの実際

実際にフローサイトメトリーを用いてある細胞集団を解析する流れは、(1) 免疫染色、(2) 測定 (分取)、(3) データ解析となる。「免疫染色」は、細胞を分散された懸濁液として扱う以外は顕微鏡観察の場合と同じで、「いかにバックグラウンドを減らして、目的蛍光を増やすか」ということに注意点は集約される。使用する抗体、蛍光色素の組み合わせによって、抗体濃度、その他の染色条件などはその都度、検討する必要がある。抗体の添付書類に必ず書いてある「使うときは各自で条件を最適化してください」である。

配属されたばかりの4年生や初めてフローサイトメトリーを使用する人にとって、「測定」は慣れるまでは鬼門であろう。現在の装置はかなりの部分が自動化されているが、装置の各システムをそれぞれ設定・制御する必要がある。しかし、慣れてしまえば自動化されてしまっている装置よりも手動操作の余地を残している装置のほうが使いやすい場合も多い。フローサイトメトリーでは、蛍光標識試薬で染色されない細胞集団 (陰性コントロール) の測定値を基準として、染色された陽性細胞集団の測定値を評価することから (図4参照)、PMTなどの検出器を最適に感度調節することがまず重要である。感度が低すぎると陰性集団と陽性集団の分離が悪いし、高すぎても陰性集団の自家蛍光などのノイズのレベルが上昇してやはり分離が悪くなる。一方、フローサイトメトリーに限らず、多重パラメータのデータを取得する機器の宿命であるが、各パラメータの正確なデータを取得するためには各パラメータ間のデータの干渉をできる限り取り除く必要がある。n種の蛍光色素を用いた場合、n(n-1) 通りの補正操作が必要である。感度調節や蛍光補正の程度は選択する蛍光色素や染色強度に左右されるので、免疫染色の検討段階からこれらのことを考慮しておく必要がある。

「分取」はさらに難しく、細胞にレーザーが照射されてから電荷を負荷するまでのタイミングを完全に合わせなければ、目的の細胞を純度よく分取することができない。このタイミングは、特にシース液やサンプル液の流れが安定していないとずれてくるため、一昔前の装置であれば安定するまで数時間待つということも必要であった。最近の装置ではこの部分はかなり改善されている。

フローサイトメトリーでは、一般的には $10^4 \sim 10^6$ 細胞分のデータを取得する。したがって、免疫染色や測定操作を正確に行っていれば、取得データ全体の統計的な精度は高く維持できる。ところが、上述のゲーティング操作によって集団のうちの一部の亜集団を多重パラメータで解析すると、最終的に抽出された集団の細胞数が非常に小さくなる場合がある。しかも、絶対数が小さいが故に、ゲーティング操作で扱う細胞集団の囲みが少しずれるだけでデータが変化してしまうこともある。この部分は、フローサイトメトリーのデータを扱う上で、もっとも細心の注意を払うべき部分であり、無意識のうちに都合のよいデータに改ざんしてしまわないように気をつけなければならない。最近の装置は大きな母集団のデータを取り扱えるようになっているが、一昔前の機種で多重にゲーティングを重ねているデータなどを見ると、筆者などは「これほんまかいな」とうそぶいたりするのである。

## おわりに

さまざまなマーカーを用いた多重パラメータ解析が普及するにしたがって、今後、フローサイトメーターの高度化がさらに進むであろう。もっとも求められる処理速度の向上には、高流速でも細胞が隊列を崩さず詰まりも起こさない流路系、高速で細胞を流してレーザー照射時間が短くなっても高感度に細胞を測定できる光学検出系、膨大なデータを遅延なく処理できる電流パルス処理系・データ処理系が必要であり、多面的な技術革新が起こっていくと期待している。

## 文 献

- 1) Shapiro, H. M.: *Practical Flow Cytometry, 4th Ed.*, Wiley Liss (2003).
- 2) 中内啓光監修：細胞工学別冊 新版フローサイトメトリー自由自在，学研メディカル秀潤社 (2004).
- 3) 日本サイトメトリー技術者認定協議会編：スタンダードフローサイトメトリー，医歯薬出版 (2009).
- 4) <http://www.bc-cytometry.com/cytometry.html>
- 5) Fulwyler, M. J.: *Science*, **150**, 910 (1965).
- 6) Hulett, H. R. *et al.*: *Science*, **166**, 747 (1969).
- 7) Herzenberg, L. A. and Herzenberg, L. A.: *Annu. Rev. Immunol.*, **22**, 1 (2004).
- 8) [http://www.inamori-f.or.jp/laureates/k22\\_a\\_leonard/prf.html](http://www.inamori-f.or.jp/laureates/k22_a_leonard/prf.html)
- 9) Goddard, G. *et al.*: *Cytometry Part A*, **69A**, 66 (2006).
- 10) <http://www.lifetechnologies.com/flowcytometry>
- 11) Johnson, I. and Spence, M. T. Z. (eds.): *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Ed.*, Molecular Probes (2010).
- 12) Köhler, G. and Milstein, C.: *Nature*, **256**, 495 (1975).