

単一細胞分析に基づく モノクローナル抗体取得の効率化



鈴木 雅 登

1 はじめに

単一細胞分析の多くは、高価で特殊な装置を用いて多様な DNA や mRNA を網羅的に分析する。馴染みのない研究者には用語や解析方法が特殊で、敷居が高い。一方、単一細胞からの分泌物の分析も重要であり、特に免疫細胞（B 細胞や T 細胞）が分泌する抗体やサイトカインの量や種類の分析は、医薬品開発に必要な細胞の選別につながる。これらの分泌物は、抗原抗体反応を利用した免疫測定法で検出可能で、分光光学や電気化学検出との組み合わせが容易である。そこで、単一細胞が分泌する抗体の分析法を紹介し、様々な分析化学研究者に関心を持ってもらうことを目的とする。

2 モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は単一の B 細胞から得られる抗体であり、特定の抗原決定基を認識する。高い選択性と低い交差性が特徴で、がん、感染症、自己免疫疾患など幅広い領域に利用されている。目的抗原に結合するモノクローナル抗体は、ヒトや動物（マウス、ウサギなど）から単離した抗体分泌細胞群（Antibody-Secreting Cells, ASCs）や、人工的に作製した遺伝子ライブラリから選別される。ここでは ASCs から目的抗原に結合する抗体を分泌する単一細胞を選別する方法を話題とする。

3 従来法による目的抗体分泌 ASCs の獲得

目的抗体を分泌する ASCs の探索には、分泌された抗体の結合能を評価し、抗体を分泌した単一細胞を特定する必要がある。しかし、ヒトや動物から取得された ASCs は培養できず、抗体分泌能の分析が困難であった。そこで、B 細胞と不死化細胞（ミエローマ細胞）の融合（ハイブリドーマ法）や Epstein-Barr virus によるリンパ芽球様細胞株への形質転換法が開発され、長期培養可能な ASCs が構築されてきた。培養可能な ASCs から目的抗体を分泌する単一 ASCs の獲得には限界希釈法が利用される。ASCs 懸濁液を希釈し、96 もしくは 384 ウェルマイクロプレートの各ウェルに確率的に 1 細胞を播種する。培養後、各ウェルの培地中の抗体量を分析して、

分泌能を持つ ASCs を含むウェルを特定する。各ウェルの細胞は一つの ASCs から増殖したモノクローナル細胞集団である。以上の二つの工程を経て目的抗体を分泌する細胞集団が獲得される。

ハイブリドーマ法は特別な試薬や装置が不要なため汎用性が高いが、B 細胞 100000 個あたり 1 細胞程度しかハイブリドーマ細胞が得られず、作製効率が低い。これは B 細胞とミエローマ細胞を 1:1 で正確に密着させることの困難さに起因する。また、限界希釈法は煩雑な操作と培養時間がかかり、希釈中に複数細胞や細胞がないウェルが出現するため効率が悪い。

4 単一 ASCs 獲得に向けたマイクロデバイスの利用

マイクロウェルやマイクロ流体デバイスは、単一細胞サイズの窪みや流路から構成され、単一細胞の任意で確実な操作、連続的な溶液の交換、種々の分析系との融合が可能である。これらの特徴は、単一細胞同士での細胞融合や単一細胞の抗体分泌能の分析を可能にし、ASCs の選別に有用である¹⁾。

4.1 マイクロデバイスによる細胞ペア形成と細胞融合の効率化

異種細胞の効率的な融合を可能とするマイクロ流体デバイスが報告されている。このデバイスは、2 細胞を捕捉する大きな窪みと 1 細胞を捕捉する小さな窪みをもつ微小構造が特徴である。1 種類目の細胞を流路へ導入し、小さな窪みに捕捉する。次に逆方向から溶液を導入し、その細胞を窪みの延長線にある大きな窪みに捕捉させる。そして同じ方向から 2 種類目の細胞を導入し、大きな窪み内に細胞ペアを形成させる。最後に電気パルスを導入し、細胞ペアを融合させる。窪み内で確実に異種細胞のペアが形成され、約 9 割の窪みで細胞が融合し、融合効率が飛躍的に向上した²⁾。

4.2 マイクロドロップレットでの単一 ASCs 分析

マイクロドロップレット（微小液滴）と蛍光活性型フローサイトメトリー（FACS）を組み合わせ、単一 ASCs の抗体分泌能の高速評価法が報告された。オイルで満たされた十字型構造のマイクロ流体デバイスに水溶液を導入すると、微小液滴を大量に作製できる。このデバイスを用いて、単一 ASCs、分泌抗体を捕捉する抗原固定化微粒子、蛍光標識二次抗体が封入された液滴が作製された。液滴内で ASCs から分泌された抗体を介して、粒子上に蛍光標識二次抗体が濃縮される。FACS を使用することで、各液滴の蛍光強度に基づき、抗体分泌能を持つ ASCs を含む液滴を迅速に取得できる。しかし、ASCs と捕捉用微粒子の両方を持つ液滴の確率が低い課題がある³⁾。そのため、微粒子をナノ化して一定数を確実に封入させる方法や⁴⁾、分泌抗体を捕捉するハイドロゲルの使用が報告されている⁵⁾。

4.3 マイクロウェルでの単一 ASCs 分析

マイクロウェルを使用した単一 ASCs の抗体分泌能の評価法がいくつか報告されている。マイクロウェルを捕捉分子（抗原や捕捉抗体）で修飾し、分泌された抗体を

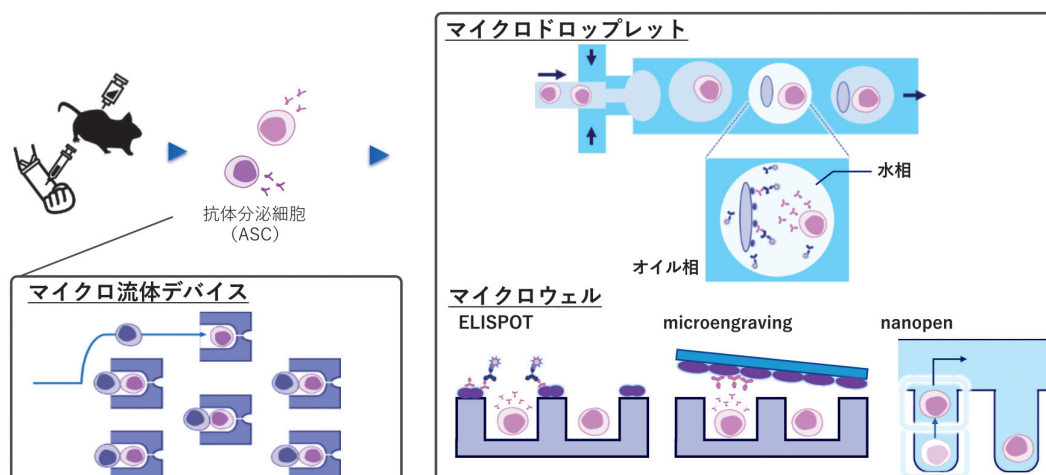


図1 抗体分泌細胞群から目的抗体を分泌する単一細胞を選別する方法

マイクロウェル周辺に捕捉する。捕捉された抗体の免疫染色によって目的抗体分泌ASCsを特定する(Enzyme-Linked ImmunoSpot, ELISPOT法)⁶⁾。しかし、免疫染色の際にウェルに捕捉された細胞の一部が散逸する恐れがある。一方で、捕捉用抗体が固定化されたガラス基板で「フタ」する方法(microengraving法)も提案されている⁷⁾。ASCsをマイクロウェルへ捕捉した後、「フタ」をする。「フタ」へ濃縮された分泌抗体を免疫染色で検出し、抗体分泌能があるASCsを特定する。この方法は、マイクロウェルへの染色処理が不要なためASCsの散逸を防ぎ、フタの交換により分泌タンパク質の量や種類の時間変化を追跡できる。しかし、いずれの方法も目的ASCsの回収にはガラスキャピラリの近接が必要であり、時間と手間が課題である。

光誘電泳動を利用した単一細胞の迅速かつ正確な回収法が報告された(Beacon SelectTM, BRUKER Cellular Analysis)⁸⁾。この装置の微小流路チップは上面が透明導電性(ITO)基板、下面にアモルファスシリコン(a-Si:H)が塗布されたITO基板で構成される。流路の各側面には「nanopen」と呼ばれる微小なくぼみがあり、チップへ光を照射するとa-Si:Hの導電性が変わり誘電泳動力が作用する。光の照射位置を制御することで、単一細胞のnanopenへの捕捉やnanopenからの目的細胞の回収が迅速に行える。

5 おわりに

単一細胞分析によってASCsの抗体分泌能を評価し回収する方法を紹介した。近年では、マイクロドロップレット作製のマイクロ流体デバイスやマイクロウェルチップが消耗品として購入でき、微細加工装置がなくても単一細胞分析が可能となっている。単一細胞の網羅的な遺伝子解析に加えて、今後は動的な細胞機能の分析が細胞を使った医薬品開発に求められる⁹⁾。動的な細胞機能解析には、単一細胞が分泌した微量な分子の検出を可能とする化学的な増幅技術に加え、光や電場などを使った非標識分析¹⁰⁾、機械学習を用いた細胞画像解析による細胞機能予測¹¹⁾など、多分野の研究領域との融合が必要である。

文 献

- 1) L.J. Schlottheuber, I. Luchtefeld, K. Eyer : *Lab. Chip*, **24**, 1207 (2024).
- 2) A.M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch, J. Voldman : *Nat. Methods*, **6**, 147 (2009).
- 3) B. Li, X. Ma, J. Cheng, T. Tian, J. Guo, Y. Wang, L. Pang : *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **11**, (2023). DOI: 10.3389/fbioe.2023.1121870.
- 4) K. Eyer, R.C.L. Doineau, C.E. Castrillon, L. Briseño-Roa, V. Menrath, G. Mottet, P. England, A. Godina, E. Brient-Litzler, C. Nizak, A. Jensen, A.D. Griffiths, J. Bibette, P. Bruhns, J. Baudry : *Nat. Biotechnol.*, **35**, 977 (2017).
- 5) K. Fischer, A. Lulla, T.Y. So, P. Pereyra-Gerber, M.I.J. Raybould, T.N. Kohler, J.C. Yam-Puc, T.S. Kaminski, R. Hughes, G.L. Pyeatt, F. Leiss-Maier, P. Brear, N.J. Matheson, C.M. Deane, M. Hyvönen, J.E.D. Thaventhiran, F. Hollfelder : *Nat. Biotechnol.*, (2024). DOI: 10.1038/s41587-024-02346-5.
- 6) A. Jin, T. Ozawa, K. Tajiri, T. Obata, S. Kondo, K. Kinoshita, S. Kadowaki, K. Takahashi, T. Sugiyama, H. Kishi, A. Muraguchi : *Nat. Med.*, **15**, 1088 (2009).
- 7) J.C. Love, J.L. Ronan, G.M. Grotenbreg, A.G. van der Veen, H.L. Ploegh : *Nat. Biotechnol.*, **24**, 703 (2006).
- 8) A. Winters, K. McFadden, J. Bergen, J. Landas, K.A. Berry, A. Gonzalez, H. Salimi-Moosavi, C.M. Murawsky, P. Tagari, C.T. King : *mAbs*, **11**, 1025 (2019).
- 9) Y. Xu, M.T.J. Chan, M. Yang, H. Meng, C.-H. Chen : *Lab. Chip*, (2025). DOI: 10.1039/D4LC00904E.
- 10) S. Ansaryan, Y.-C. Liu, X. Li, A.M. Economou, C.S. Eberhardt, C. Jandus, H. Altug : *Nat. Biomed. Eng.*, **7**, 943 (2023).
- 11) J. Jin, T. Ogawa, N. Hojo, K. Kryukov, K. Shimizu, T. Ikawa, T. Imanishi, T. Okazaki, K. Shiroguchi : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **120**, e2210283120 (2023).



鈴木 雅登 (SUZUKI Masato)

兵庫県立大学大学院理学研究科(〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1)。東北大学大学院環境科学研究科博士後期課程修了。博士(学術)。《現在の研究テーマ》マイクロ電極を使った単一細胞分析。《趣味》かき水の食べ歩き。メガネを色々とする。

E-mail : suzuki@sci.u-hyogo.ac.jp