

総 説

抗体マイクロアレイによる固相サイトメトリー

小笠原朋子\*, 加藤 功一\*\*,\*\*

Solid-Phase Cytometry Using Antibody Microarrays

Tomoko Ogasawara\* and Koichi Kato\*\*,\*\*

(令和3年12月23日受付)

はじめに

サイトメトリーとは多数の細胞を対象とする定量的な分析手法を指し、フローサイトメトリー (flow cytometry; FCM) とイメージングサイトメトリー (imaging cytometry; ICM) という分析様式の異なる2つの手法が知られている。FCMは、蛍光標識抗体を用いて特定の表面マーカーをもつ細胞を染色し、微小流路系、レーザー光源、検出器を搭載した装置を用いて、一つ一つの細胞を高速分析する手法である。分析結果は、蛍光強度分布に関するヒストグラムの形で表現され、それをもとに表面マーカーの発現に関する定量的な情報を得ることができる。取得されるデータは、細胞集団がもつ特性のアンサンブル平均ではなく、集団の均一性や特徴量の分散に関する情報を与える。このようなFCMは、細胞を対象とする基礎研究で多用されるばかりではなく、臨床検査にも用いられている。一方、ICMは顕微鏡及び画像処理技術の発達に伴って開発された新たな分析手法であり、培養中の接着細胞であってもそのままの状態で個々の細胞の特徴量を高速に調べることができる。分析対象となる特徴量は、細胞形態、バイオマーカーの発現、細胞機能など多岐にわたる。ICMを行うための装置が市販されており、おもに細胞を対象とする基礎研究の現場で用いられている。

しかしながら、上記のいずれの手法も、分析の簡便さや汎用性という点においては、必ずしも満足できるものではない。例えば、骨吸収を伴う歯周病や口唇口蓋裂の再生治療を目的として間葉系幹細胞の利用が注目されているが、患者から採取し、体外で加工した細胞を表面マーカーの発現情報をもとに品質管理しようとする場合、検体数が多く、また、分析法の標準化が容易ではない等の理由で従来のサイトメトリーは必ずしも最良の方法とは云えない。

このような背景から、共著者の加藤は、これまで15年以上にわたって抗体マイクロアレイを用いた固相サイトメトリー法 (solid-phase cytometry; SCM) の確立に力を注ぎ、その方法の有用性を主張してきた。近年には、抗体マイクロアレイがサブセット分析にも適用可能であることを見出すなど、応用範囲の拡大に努めている。そこで本稿では、抗体マイクロアレイを用いたSCMについて我々の研究をもとに紹介する。

抗体マイクロアレイの作製

一枚の小さなチップ上に多種類の抗体を微小スポットとして配列固定した分析チップを抗体マイクロアレイと呼ぶ。その作製には、これまで様々な作製方法が報告されてきたが、我々は、以下に述べる二つの理由で、アルカンチオール自己組織化単分子膜 (self-assembled monolayer; SAM) (図1) のマイクロパターン化による手法を採用してきた。第一の理由は、アルカンチオールSAMを用いることで、ガラス基板表面に抗体と反応可能な官能基 (例えばカルボキシル基) を容易に導入できることである。第

\* 広島大学病院小児歯科 (主任: 野村良太教授)

\*\* 広島大学大学院医系科学研究科生体材料学 (主任: 加藤功一教授)

\*\*\* 広島大学ナノデバイス研究所集積医科学研究部門 (主任: 加藤功一教授)

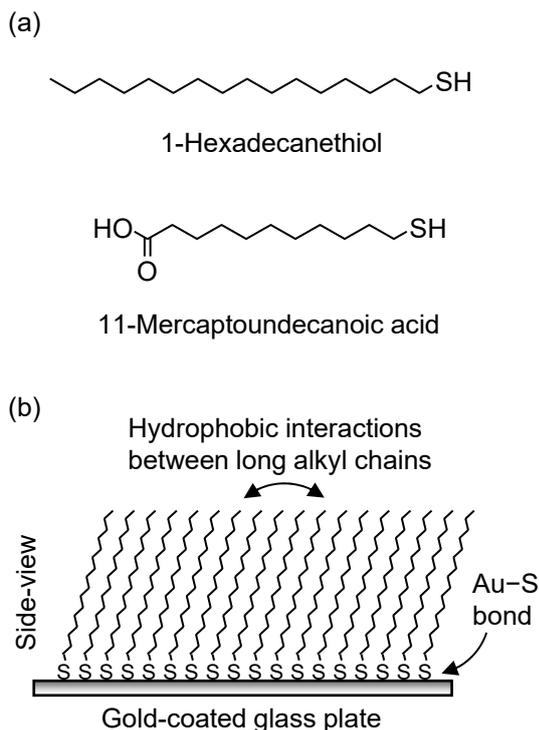


図1 アルカンチオールによる自己組織化単分子膜 (SAM) の形成  
(a) 末端にメチル基あるいはカルボキシル基をもつアルカンチオール。(b) 金薄膜蒸着ガラス基板表面に形成した SAM の概念図。

二の理由は、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance; SPR) と呼ばれる光学現象を利用すれば、微小スポット上に固定化された微量の抗体を検出したり、細胞の結合を非染色かつリアルタイムに追跡したりできることである。しかしながら、抗体マイクロアレイの作製は我々の方法に限定されるものではない。例えば、Belov ら<sup>1)</sup> や Ko ら<sup>2)</sup> は抗体の吸着性に優れたニトロセルロース膜を用いて抗体マイクロアレイを作製している。また、Liu<sup>3)</sup> は96穴プレートを用いた抗体アレイについて報告している。

我々が作製してきた典型的な抗体マイクロアレイ作製法では (図2)<sup>4,5)</sup>、まず、ガラス基板 (25 mm × 25 mm × 0.5 mm) の片面に真空蒸着装置を用いて厚さ数十ナノメートルの金薄膜を蒸着する。この基板を末端にメチル基をもつ 1-ヘキサデカンチオール [HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-CH<sub>3</sub>] のエタノール溶液に室温にて24時間ほど浸漬する。これによって、金と硫黄原子間の結合ならびにアルキル鎖間の疎水性相互作用が生起し、1-ヘキサデカンチオールが基板表面上に整列した二次元結晶様の安定な SAM が形成されて、最表面にパッキングされたメチル基に起因して表面は高い疎水性を示すようになる。未反応の 1-ヘキサデ

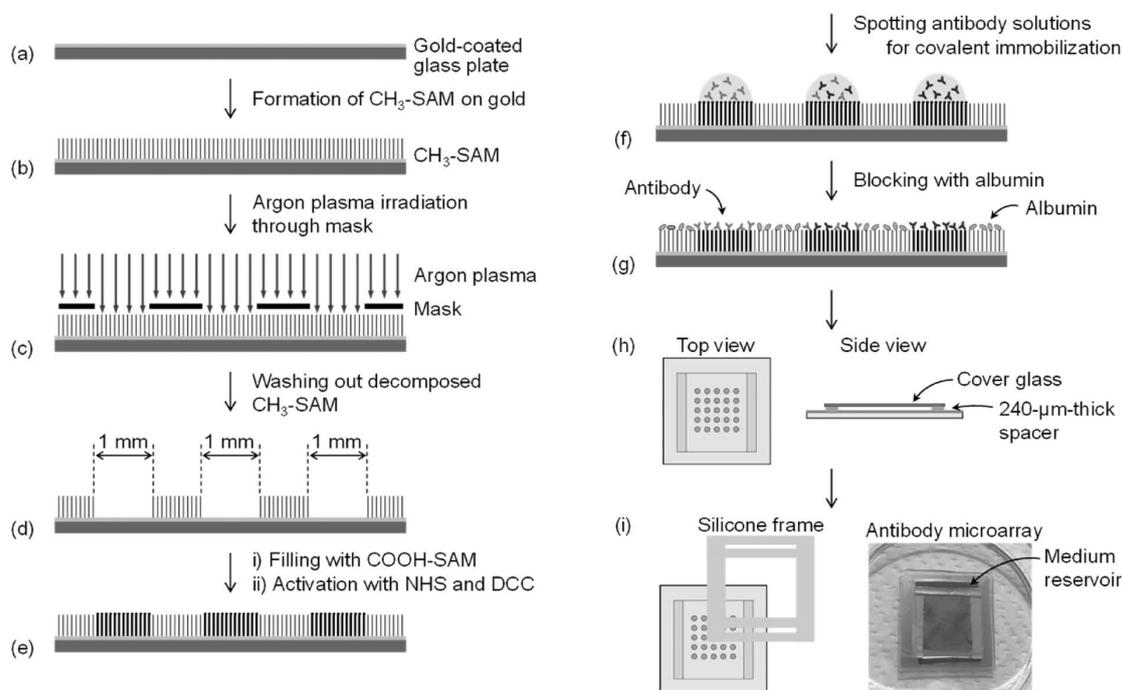


図2 抗体マイクロアレイの作製  
(a) 金蒸着ガラス基板。(b) 1-ヘキサデカンチオール SAM の形成。(c) マスクを介したアルゴンプラズマ処理。(d) プラズマ処理によって金が露出したドット。(e) ドット内における 11-メルカプトウンデカン酸 SAM の形成。(f) 各種の抗体溶液のスポットティングによる固定化。(g) 血清アルブミンによるブロッキング。(h) 平板型チャンバーの構築。(i) シリコンフレームの装着。  
(文献7より許可を得て転載。Copyright 2021 American Chemical Society)

カンチオールをエタノールで洗浄除去し、基板を乾燥させた後、5×5個の円形の透光部（直径1mm）が配列した石英製の光マスクを被せ、水銀ランプを用いて紫外線を約100 mW/cm<sup>2</sup>の強度で120分間照射する。あるいは、パンチング加工したアルミニウムマスクを介してプラズマ処理を行えばより短時間で同様のパターンニングが可能である。紫外線照射あるいはプラズマ処理された部位はSAMが分解され、エタノールで洗浄すると金が露出し、親水性の回復した照射部位を目視にて確認することができる。次に、この基板を11-メルカプトウンデカン酸 [HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-COOH] 溶液に浸漬し、金の露出したスポット内にSAMを形成させる。これによって、最表面にカルボキシル基をもつ多数の円形スポットが形成される。このカルボキシル基を、*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>-N=C=N-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>) 及び *N*-ヒドロキシスクシンイミド (CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-N-OH) を用いて活性エステルに変換する。これらのスポット上に、1 mg/mL程度に調整された各種の抗体溶液をマイクロピペットを用いて微量滴下する（各200 nL程度）。溶液が蒸散しないように注意しながら静置することで、活性エステルと抗体分子中のアミノ基との置換反応が起り、抗体が共有結合で固定化される。抗体間のクロスコンタミネーションが起こらないように気をつけながら基板を洗浄し、細胞の非特異的な結合を抑制するため、基板をウシ血清アルブミン溶液に浸漬してブロッキングを行う。完成した基板に厚さ100~300 μmのスペーサーを介してカバーガラスをマウントし、平板型チャンバー構造とする。さらに、シリコンシートで型枠を作製し、細胞懸濁液のリザーバーを構築する。以上のように作製された抗体マイクロアレイは4℃で保存することができる。

### 表面マーカー発現パターンの定量的解析

抗体マイクロアレイを用いた表面マーカーの分析には、細胞懸濁液を平板型チャンバー内に注入し、表面マーカーと固定化抗体との間で抗原-抗体反応を生起させて細胞を結合させる。その後、未結合の細胞を除去し、細胞がどのスポットに結合したかについて調べれば定性的に表面マーカー発現の有無を知ることができる。さらに、本節で後述するように、結合細胞数を計測すれば、集団内の発現細胞の割合を定量的に評価することも可能である。これらの操

作と原理について以下に詳しく述べる。

試験したい細胞が浮遊細胞の場合は遠心分離によって細胞ペレットを得た後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に分散させる。一方、培養中の接着細胞の場合には、基材からトリプシン処理等により回収したのち、PBSに分散させる。この時、トリプシンによる表面マーカーの分解を避ける必要があるが、我々の経験では、エチレンジアミン-*N,N,N',N'*-四酢酸 (EDTA) 処理や機械的なスクレイピングより、むしろトリプシン処理によって回収の方が細胞のダメージが少なく、抗体マイクロアレイを用いた分析結果の精度が高くなる。また、細胞を懸濁させるPBSには、固定化抗体と細胞表面に発現するFcレセプターとの相互作用を抑制するためγ-グロブリンを加えておくとよい。さらに、カドヘリン等の細胞接着分子同士の相互作用による細胞凝集の抑制にはEDTAを加える。調製した細胞懸濁液に含まれる細胞数を血球係数盤等によって計測した後、適当な細胞密度になるよう調整する。後述のように、定量的解析を行いたい場合には、播種密度が閾値を超えない範囲内で調整することが重要である。

細胞結合試験には、細胞懸濁液（典型的には50~100 μL）を平板型チャンバー内に注入し、37℃で30分間静置する。チャンバー内に注入された細胞は二次元面内に均等に分散して静止する。一方、鉛直方向には重力の影響で沈降する。細胞を剛体球と仮定したとき、その沈降速度は以下のストークス式で与えられる。

$$\frac{4}{3}\pi r^3(\rho - \rho_0)g = 6\pi\eta r v \quad (1)$$

ただし、 $r$ は剛体球の半径、 $\rho$ は剛体球の密度、 $\rho_0$ は媒質の密度、 $g$ は重力加速度、 $\eta$ は媒質の粘度、 $v$ は沈降速度である。例えば白血球の場合、 $r \sim 5 \times 10^{-4}$  cm、 $\rho = 1.07$  g cm<sup>-3</sup>と見積もることができ、また、 $\rho_0 = 1.00$  g cm<sup>-3</sup>、 $g = 9.81$  m s<sup>-2</sup>、 $\eta = 1.0$  m<sup>-1</sup> g s<sup>-1</sup>を代入すると $v = 3.8$  μm s<sup>-1</sup>となる。例えばチャンバーの高さが120 μmの場合、約30秒で細胞はマイクロアレイ表面に沈降し、30分のインキュベーションの間、細胞は固定化抗体と相互作用することになる。

30分後に未結合の細胞を除去するが、強い剪断力が結合細胞に作用すると、細胞は容易に剥がれてしまう。また、媒質が除去され結合細胞が気液界面に暴露されると表面張力によってやはり細胞は瞬時に剥がれてしまい正確な分析ができない。これらを回

避するには、細胞の結合後、細胞懸濁液の除去は行わず、抗体マイクロアレイを穏やかに転倒するとよい。非結合細胞は自重によってカバーガラス側に沈降し、一方、結合細胞はマイクロアレイ側に止まったままとなる。顕微鏡を用いて観察するが、焦点をマイクロアレイ表面に合わせることで結合細胞のみを観察及び計数することが可能である。アクリジンオレンジなどで予め細胞の核を蛍光染色し、蛍光顕微鏡で観察すれば、よりいっそう高解像度での計測が可能になる。

図3に、22種類の表面マーカーに対する抗体と3種類のアイソタイプコントロールを搭載した抗体マイクロアレイを用いて、3種類の白血病細胞（T細胞 CCRF-CEM, B細胞 Ramos, 骨髄芽球 HL-60）の表面マーカー発現パターン分析を行った例を示す<sup>5)</sup>。細胞の種類に応じて、細胞の結合したスポットのパターンが異なることがわかる。また、アイソタイプコントロールスポットやスポット周囲への非特異的

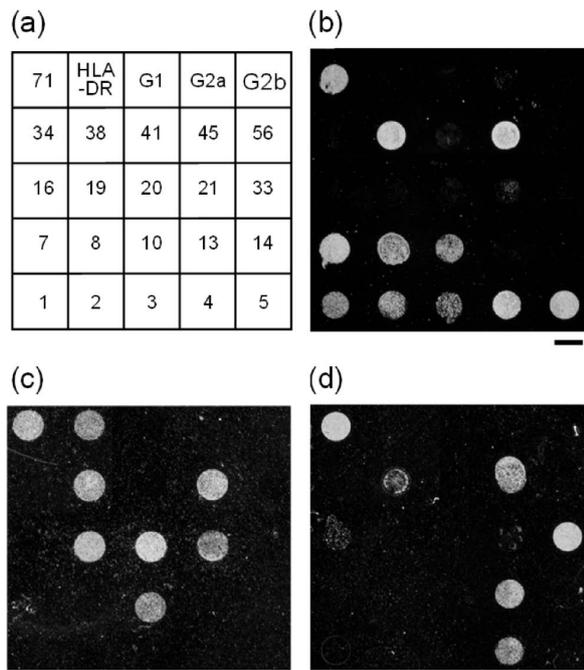


図3 抗体マイクロアレイを用いた細胞表面マーカー発現パターンの分析

(a) マイクロアレイに固定化された抗体及びアイソタイプコントロールの配置。抗体はCD番号あるいは抗原名の略称。(b~d) 抗体マイクロアレイに結合した、(b) CCRF-CEM (T細胞), (c) Ramos (B細胞) 及び (d) HL-60 (骨髄芽球) の実体顕微鏡像。スケールバー：1 mm。

(文献5より許可を得て転載。Copyright 2007 Elsevier)

な細胞の結合はほとんど見られない。以上の結果から、3種類の細胞の表面には、接着スポットに対応する表面抗原が発現していると考えられる。白血病細胞表面に発現する表面マーカーと白血病のタイプとの関連については多くのデータの蓄積があるが、それらの発現パターンは、抗体マイクロアレイ分析で得た発現パターンとよく一致している。以上の結果から、抗体マイクロアレイを用いることで表面マーカーの発現パターンを簡便に調べることが可能であることがわかる。

ところで、図3の各スポットを注意深く観察すると、スポットによって細胞の結合数が異なっていることがわかる。これは、結合細胞密度に定量的な情報が含まれているためである。図4は、すべての細胞

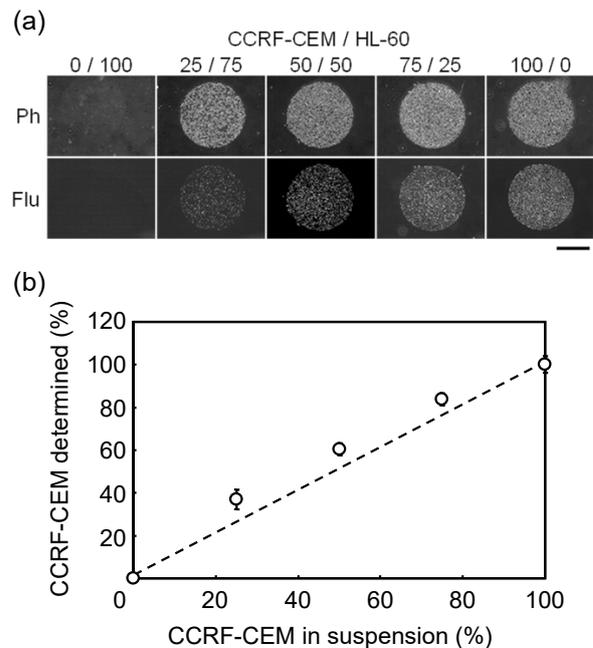


図4 抗体マイクロアレイ分析の定量性

CD5を発現する細胞（CCRF-CEM；細胞膜を赤色蛍光色素によって染色）とCD5を発現しない細胞（HL-60；非染色）を様々な比率で混合した細胞懸濁液を用いて抗CD5抗体固定スポットへの結合試験を行った。(a) 抗体スポットに結合した細胞の位相差(Ph)及び蛍光(Flu)顕微鏡像。写真上部の数字は細胞の混合比（CCRF-CEM/HL-60）。スケールバー：0.5 mm。(b) 抗CD5抗体スポットに結合した蛍光標識細胞の数（100% CCRF-CEM懸濁液を用いて結合試験を行ったスポット上の結合細胞数に対するパーセンテージ）を懸濁液中のCCRF-CEMの割合に対してプロットした。

(文献5より許可を得て転載。Copyright 2007 Elsevier)

胞が CD5 を発現する T 細胞 (CCRF-CEM) とすべての細胞が CD5 を発現しない細胞 (HL-60) を様々な比率で混合し、抗 CD5 抗体を固定したスポット上に結合した細胞の数を調べた結果である。抗 CD5 抗体スポットには T 細胞だけが結合し、また、分散液中の T 細胞含有率が上昇すると結合細胞数が直線的に増加した。この結果は、スポットへの結合細胞密度から検体中の表面マーカー発現細胞率が求められることを示している。

図 5 に、細胞播種数と結合細胞数の関係を示す。CD105 を発現するマウス骨髄由来間葉系幹細胞株 (C3H10T1/2) を様々な密度で抗 CD105 抗体を固定したスポット上に播種したときの結合細胞密度を示す<sup>6)</sup>。播種数が  $2,400 \text{ cells/mm}^2$  以下の場合に、播種密度と結合密度がほぼ一致している。この結果は、この範囲内において、播種した細胞のすべてがスポットに結合したことを示している。また、結合試験の過程で、スポット外に沈降した細胞がスポット内へ面内移動し、播種密度を超えて結合することは起らないこともわかる。一方、播種密度を  $2,400 \text{ cells/mm}^2$  より高くしても細胞の結合密度は変化しない。 $2,400 \text{ cells/mm}^2$  の場合、細胞がスポット上に単層で隙間なく沈降・結合し、それ以上細胞を播種しても過剰な細胞はスポットと相互作用できないためである。なお、この閾値は、細胞のサイズによって変化する。また、抗原-抗体の組み合わせが異なれば、結合に伴う細胞の変形具合が異なるため閾値は変化する。

図 6 に、表面マーカー発現細胞 (図中の○) と非発現細胞 (図中の●) が混在する場合の細胞結合試験の様子を図示する。双方の細胞は一旦マイクロアレイ上に沈降する。このとき、沈降細胞中に占める発現細胞と非発現細胞の比は、分散液中のそれに一致する。洗浄あるいは転倒によって、発現細胞はすべてスポット上に留まり、非発現細胞はすべて除去される。すなわち、結合細胞密度 (留まった発現細胞) と播種細胞数 (播種した発現細胞+播種した非発現細胞) の比を求めれば、分散液中の全体に占める発現細胞の比率がわかることになる。以上のように、抗体マイクロアレイを用いた SCM では、対象とする表面マーカーを発現する細胞の存在割合を求めることが可能である。

### 定量的サブセット分析

細胞集団の特徴量としてサブセット分率も重要で

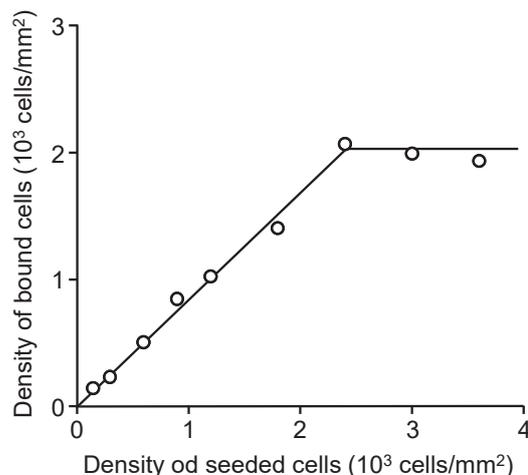


図 5 細胞播種数と結合細胞数の関係

抗 CD105 抗体を固定したスポットに CD105 を発現する間葉系幹細胞株 (C3H10T1/2) を様々な密度で播種した。  
(文献 6 より許可を得て転載。Copyright 2015 American Chemical Society)

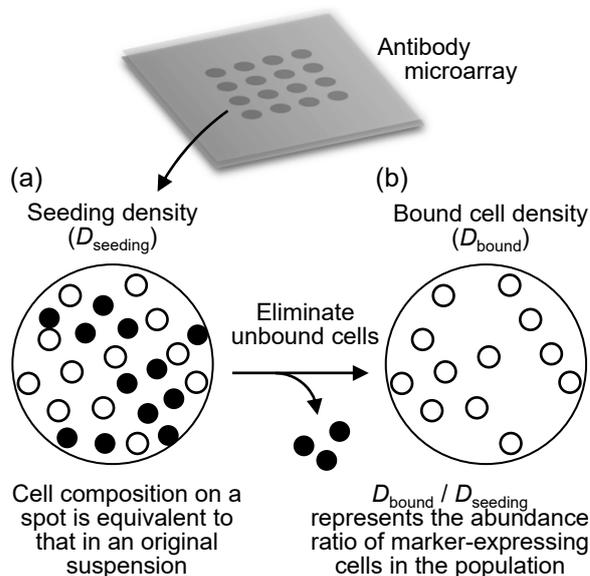


図 6 抗体マイクロアレイによる定量分析の原理

任意の表面マーカーを発現する細胞 (図中の○) 及び非発現細胞 (図中の●) が混在する集団を考える。(a)スポット上に沈降した全細胞に占めるマーカー発現細胞 (○) の割合は試料懸濁液中のそれに等しい。(b)表面マーカーを持たない未結合の細胞 (●) は除去され、マーカーを発現する結合細胞 (○) がスポット上に残留する。播種密度を  $D_{\text{seeding}}$ 、結合細胞密度を  $D_{\text{bound}}$  とすると、 $D_{\text{bound}}/D_{\text{seeding}}$  は試料分散液中のマーカー発現細胞 (○) の存在割合に等しい。

ある。細胞サブセットに関する情報を取得するには、2つ以上の表面マーカーが単一の細胞上に同時に発現しているかどうかを分析する必要がある。これまで述べてきた抗体マイクロアレイ分析では、異なる表面マーカーの発現は別々の細胞の結合能から評価されるため、複数の表面マーカーが同時に発現しているか判断できない。これを可能にするため、異なる表面マーカーに対して複数の抗体を提示するスポットと、それぞれの抗体を単独で提示するスポットをもつ抗体マイクロアレイを考案した。さらに、集合演算の概念を使ってデータ処理を行えば、サブセットに関する定量的データを導出できる<sup>7)</sup>。

以下に抗体マイクロアレイを用いた定量的サブセット分析の例を示す。ここでは、CD13 及び CD49f の2種類の表面マーカーに着目し、それらに対するモノクローナル抗体を使用して抗体マイクロアレイを作製した<sup>7)</sup>。一枚のマイクロアレイには4つの異なるタイプの抗体スポットを配置した。すなわち、両方の抗体を共固定したスポット、どちらか一方の抗体を固定したスポット、そして、いずれの抗体も固定されていないスポット（コントロールとして IgG を固定）である。試験には CD13 及び CD49f の異なる発現パターンをもつ4種類の細胞株を用いた。つまり、THP-1 (CD13<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>)、HL-60 (CD13<sup>+</sup>CD49f<sup>-</sup>)、CCRF-CEM (CD13<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>)、及び Ramos (CD13<sup>-</sup>CD49f<sup>-</sup>) の4種類である。それらの細胞を

異なるサブセットモデルと捉え、様々な比率で混合した5種類の細胞分散液を調製した。これらを用いて抗体マイクロアレイへの結合試験を行った。

図7にサブセット導出の原理を示す。各スポットからそれぞれのサブセットの分率を直接知ることはできない。しかしながら、集合の概念を取り入れることによって、実験結果から各サブセット分率を数値計算で求めることが可能である。細胞播種密度を  $D_s$ 、抗 CD13 抗体及び抗 CD49f 抗体を単固定したスポット上の結合細胞密度をそれぞれ  $D_a$  及び  $D_b$ 、両抗体を共固定したスポット上の結合細胞密度を  $D_{ab}$  とすると、4種類のサブセットの存在割合 (abundance ratio; AR) は以下の式(2)~(5)で与えられる。

$$AR_{CD13^+ CD49f^+} = D_a / D_s + D_b / D_s - D_{ab} / D_s \quad (2)$$

$$AR_{CD13^+ CD49f^-} = D_{ab} / D_s - D_b / D_s \quad (3)$$

$$AR_{CD13^- CD49f^+} = D_{ab} / D_s - D_a / D_s \quad (4)$$

$$AR_{CD13^- CD49f^-} = 1 - D_{ab} / D_s \quad (5)$$

図8に、そのようにして求めた4種類のサブセット (CD13<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>CD49f<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>CD49f<sup>+</sup>, CD13<sup>-</sup>CD49f<sup>-</sup>) の分率を予測値に対してプロットした。図からわかるように、両者には高い正の相関があり (相関係数: 0.8668), 導出手法の妥当性を示

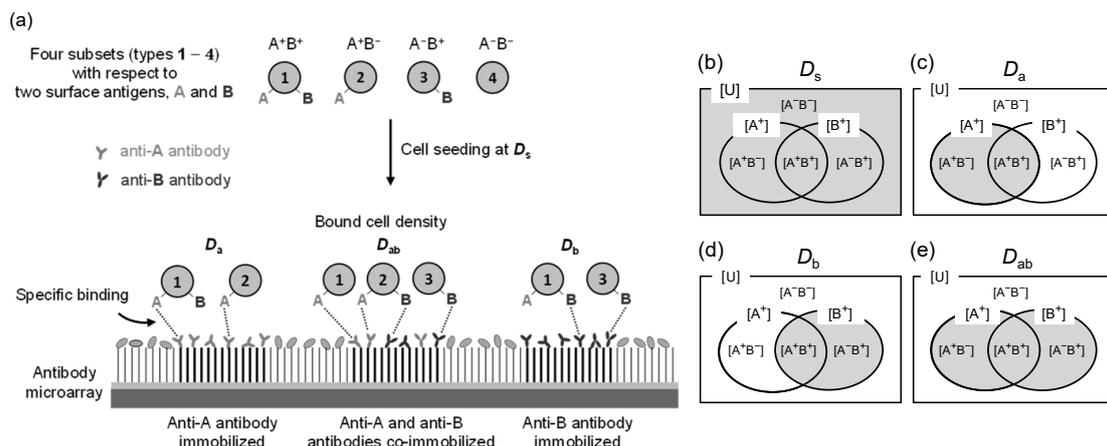


図7 抗体マイクロアレイを用いた定量的サブセット分析の原理

2種類の表面マーカーA及びBに注目し、抗A抗体及び抗B抗体を用いて作製した抗体マイクロアレイ上で細胞の結合試験を行う場合について示す。(a)各スポットへ結合する細胞サブセットと試験により求められる結合密度の関係。(b~e)全体集合([U])と表面マーカーA(集合[A<sup>+</sup>])またはB(集合[B<sup>+</sup>])を発現する細胞の集合との関係を表すベン図。網掛け部分は、(b)播種された全細胞、(c)抗A抗体、(d)抗B抗体、及び(e)抗A抗体と抗B抗体の両方を提示するスポット上に結合する細胞に対応する。

(文献7より許可を得て転載。Copyright 2021 American Chemical Society)

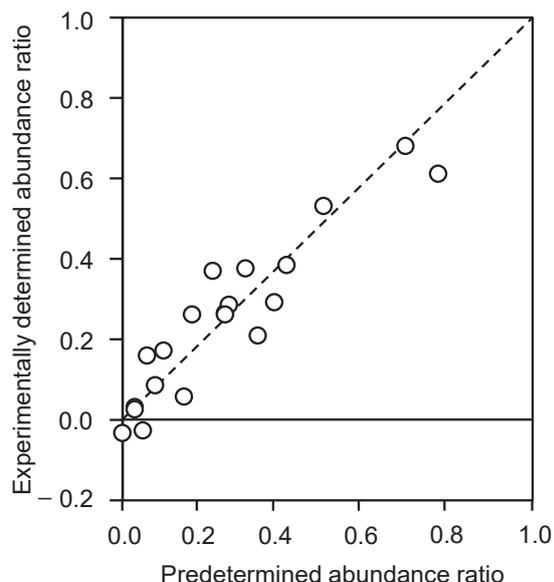


図8 抗体マイクロアレイを用いた定量的サブセット分析

4種類のサブセット ( $CD13^+ CD49f^+$ ,  $CD13^+ CD49f^-$ ,  $CD13^- CD49f^+$ ,  $CD13^- CD49f^-$ ) を様々な割合で含む5つの細胞集団について抗体マイクロアレイ分析を行い、求められた各サブセットの存在比率を既知の存在比率に対してプロットした。

(文献7より許可を得て転載。Copyright 2021 American Chemical Society)

している。

我々が提案するサブセット分析は、例えば、新型コロナウイルス感染症への感受性評価に用いることができるかと期待する。新型コロナウイルスによる感染は、ホストの気管上皮等に発現するACE2と呼ばれる膜タンパク質にウイルスのスパイクタンパク質が結合することによって引き起こされる<sup>8)</sup>。またそのさい、TMPRSS2というプロテアーゼ活性をもつ膜タンパク質が補助的役割を果たすことが知られている。すなわち、ACE2及びTMPRSS2の膜タンパク質に関するサブセットを分析することは、ウイルスに対する感受性を議論する上で興味深いと思われる。

#### 表面マーカー発現解析のハイスループット化

前述したように、抗体マイクロアレイに結合する細胞の結合密度は細胞試料に含まれる表面マーカー発現細胞の割合と定量的な関係にある。そこで、多数のスポットに結合した細胞の密度を如何に迅速に計測するかが、本分析法のスループットに大きく影響する。例えば、25スポットの顕微鏡像をもとに、

目視や画像解析ソフトを用いて細胞を計数する場合、信頼性の高いデータセットを得るには1日以上時間を要し、スループットは極めて低い。この問題の解決には表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング装置が有用である<sup>9)</sup>。

SPRは、金属薄膜表面の電子雲の偏りに基づく疎密波と、金属薄膜背面から直線偏光を入射した際に生じるエバネセント光との相互作用によって生じる共鳴現象である。共鳴を与える光の入射角が、薄膜表面近傍の屈折率に大きく依存するため、共鳴角の変化を計測することで、センサー表面への生体分子の吸着や細胞の接着を非標識かつ水中下でリアルタイムに追跡することが可能である。抗体マイクロアレイ全面をカバーするサイズの光を入射し、CCDカメラを用いて反射光強度を計測すれば、抗体マイクロアレイの全スポット上に結合する細胞を瞬時に検出し、デジタルデータとして一挙に読み出すことができる。図9aにSPRイメージの一例を示す。また、表1に各スポットの反射光強度の測定結果を示す。

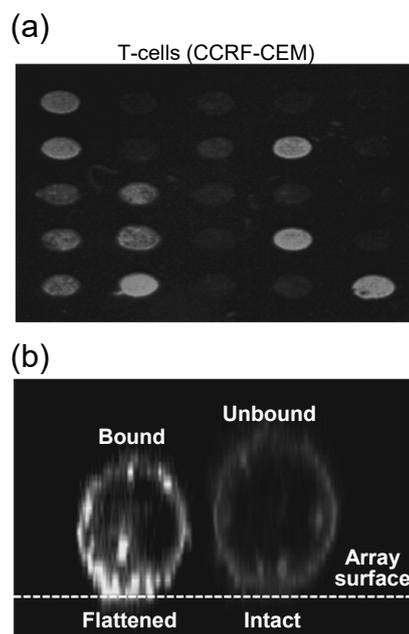


図9 表面プラズモン共鳴イメージング装置を用いたハイスループット検出

(a)抗体マイクロアレイに結合したT細胞 (CCRF-CEM) をSPRイメージング装置によって観察した。(b)抗体スポット上の結合細胞 (左) と非結合細胞 (右) の共焦点レーザー顕微鏡による三次元観察結果。結合細胞底部の扁平化が認められる。

(b: 文献8より許可を得て転載。Copyright 2007 American Chemical Society)

これらのデータは FCM によって得られる平均チャンネル蛍光強度とよく相関する。共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次元解析の結果 (図 9b), SPR シグナルの発生は, 細胞の抗体スポットへの結合によって細胞底部が扁平化し, それに伴ってマイクロアレイ表面近傍の屈折率が大きく変化することに起因することがわかった。

以上のように, 抗体マイクロアレイを用いた分析のスループットは SPR イメージング法を併用することで大きく改善される。表 2 に示すように, スループットの観点で SCM は FCM より優れている。データの精度の点では FCM に軍配があがるが, これは 1 種類の表面マーカーあたり FCM では約 1 万個の細胞を分析するのに対して, 抗体マイクロアレイでは数千個の細胞しか必要としないことによる。このように抗体マイクロアレイ分析法の特質上避けられ

ない欠点もある。しかしながら, 多くの点で SCM は有利であることから, 多検体について迅速にスクリーニングしたい場合にとくに有効な分析手法となるであろう。

### 抗体マイクロアレイの応用

抗体マイクロアレイによる表面マーカー発現パターン分析には, 細胞の特性解析や病気の診断など様々な応用の可能性がある。その一つに細胞の品質管理への応用が挙げられる。とくに, 再生医療製品としての細胞は, 臨床使用にさいして安全性や再現性の観点からロットごとに品質保証されなければならない。多数のロットについてルーティン分析を行う場合, 分析の正確性に加えてスループットや費用対効果が求められる。そのような意味で抗体マイクロアレイを用いる SCM は有用である。

表 1 抗体マイクロアレイによる T 細胞表面マーカーの発現解析\*

Surface marker/ isotype control	Cell density ( $10^5$ cells/cm <sup>2</sup> )	SPR** Intensity ( $10^5$ )	FCM*** Mean channel
CD1a	5.06 ++	1.93 ++	85.7 ++
CD2	4.76 ++	1.92 ++	54.2
CD3	3.04 +	1.77 +	63.9 +
CD4	5.81 +++	2.32 +++	114.2 +++
CD5	6.10 +++	2.44 +++	133.9 +++
CD7	5.84 +++	2.37 +++	105.7 +++
CD8	4.05 ++	1.91 ++	116.1 +++
CD10	3.66 ++	1.65 +	87.9 ++
CD13	0	0.98	57.8
CD14	0	0.98	42.8
CD16	0	1.03	43.1
CD19	0	1.06	42.8
CD20	0	1.01	43.3
CD21	0	1.15	49.3
CD33	0	1.00	44.6
CD34	0.44	1.14	64.0
CD38	6.25 +++	2.70 +++	166.4 +++
CD41	0	1.03	43.8
CD45	6.39 +++	2.51 +++	159.5 +++
CD56	0	0.99	45.1
CD71	5.89 +++	2.69 +++	130.6 +++
HLA-DR	0	1.06	43.6
IgG1a	0	1.01	42.6
IgG2a	0	1.00	44.4
IgG2b	0	0.99	45.9

\* 各分析法によるデータの大小に関するスコア: + やや大きい, ++ 大きい, +++ 極めて大きい。 \*\* Surface plasmon resonance。 \*\*\* Flow cytometry。

表2 抗体マイクロアレイによる固相サイトメトリーとフローサイトメトリーの比較

	固相サイトメトリー	フローサイトメトリー
一度に分析可能な表面マーカー数	典型的には20種類程度 100種類程度までスケールアップ可	一般的には1～3種類程度 現在の技術では十数種類以上不可
一種類の表面マーカーの分析に必要な細胞数	1,000～5,000個	10,000～20,000個
分析に要する時間	SPR イメージングを併用すれば10分程度	試料調製を含め4～5時間
試料調製	非標識でも分析可	標識抗体との反応, 洗浄, ブロッキング等の前処理が必要
定量分析における有効桁数	～1%	～0.1%
標準化	容易 分析者の熟練度の依存しない 1チップ当たり千円程度 汎用顕微鏡で検出可	ゲーティング等の高度なデータ処理が必要 分析者の熟練度に依存する
コスト	SPR イメージング装置を用いても百万円程度	分析装置は数千万円を超える

我々は、歯科領域で注目されている間葉系幹細胞の品質管理に抗体マイクロアレイによる SCM を適用することを試みた<sup>6)</sup>。とくに、培養によって製造される細胞集団の再現性という観点に注目した。間葉系幹細胞と分化の進んだ骨芽細胞との混合分散液を多数用意し、それらの集団に含まれる幹細胞の含有率を抗体マイクロアレイによって分析することを試みた。間葉系幹細胞が CD105 を特異的に発現することに着目し、抗 CD105 抗体スポットに結合する細胞数を調べた。図10に示すように、分散液中の骨芽細胞の含有率が増えるにつれて、抗 CD105 抗体スポットへの結合細胞数がすべての含有率において直線的に減少した（相関係数：0.9942）。すなわち、抗体マイクロアレイ分析によって CD105 を発現する間葉系幹細胞含有率を簡便に求めることができる。

抗体マイクロアレイ分析法は、幹細胞表面に発現する表面マーカーの同定にも効力を発揮する。多くの幹細胞系において、未分化状態の表面マーカーに関する情報は乏しいため、幹細胞を選別するのは難しい。Ko らは<sup>4)</sup>、ラット胎児脳の線条体から採取した神経幹細胞を含む細胞集団を用いて抗体マイクロアレイへの結合試験を行い、その後、細胞をスポット上に結合させたまま培養を継続した。数日後に神経幹細胞内に発現されるネスチン（神経幹細胞マーカー）を蛍光免疫染色し、各スポットにおける全結合細胞に占めるネスチン発現細胞数を求めることに

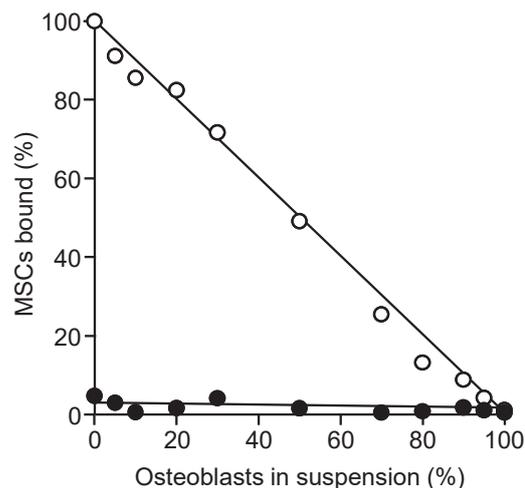


図10 抗体マイクロアレイを用いた幹細胞の品質管理の可能性

間葉系幹細胞 (C3H10T1/2) 及び骨芽細胞 (MC3T3-E1) を様々な比率で含む懸濁液を用いて、(○) 抗 CD105 抗体スポット及び (●) IgG 固定スポット (コントロール) への結合細胞数を調べた。

(文献 6 より許可を得て転載。Copyright 2015 American Chemical Society)

より、ネスチンの発現ともっとも相関の高い表面マーカーが CD57 であったと報告している。

## おわりに

本稿では、抗体マイクロアレイを用いた表面マーカー分析法について、その原理から応用に至るまで幅広く紹介した。将来、民間企業等によって信頼性

と操作性に優れた抗体マイクロアレイが供給されるようになり、また、分析操作ならびにデータ解析プロトコルの標準化が進めば、生物学・医学分野において多くの有用な情報を生み出す分析技術となるであろう。

## 謝 辞

本研究の遂行に当たりお世話になりました京都大学再生医科学研究所・岩田博夫名誉教授、同研究所組織修復材料学研究分野の共同研究者、大阪歯科大学医療保健学部・錦織 良講師に感謝申し上げます。

本研究は文部科学省知的クラスター事業、経産省地域新生コンソーシアム事業、科学技術振興機構A-STEPの支援のもと実施しました。ここに深謝します。

本稿に関連し、開示すべきCOIはありません。

## 文 献

- 1) Belov L, de la Vega O, dos Remedios CG *et al.*. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer Res* 2001; 61: 4483–4489.
- 2) Ko I-K, Kato K and Iwata H. Antibody microarray for correlating cell phenotype with surface marker. *Biomaterials* 2005; 26: 687–696.
- 3) Liu AY. Differential expression of cell surface molecules in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 3429–3434.
- 4) Ko I-K, Kato K and Iwata H. Parallel analysis of multiple surface markers expressed on rat neural stem cells using antibody microarrays. *Biomaterials* 2005; 26: 4882–4891.
- 5) Kato K, Toda M and Iwata H. Antibody arrays for quantitative immunophenotyping. *Biomaterials* 2007; 28: 1289–1297.
- 6) Nishikiori R, Watanabe K and Kato K. Antibody arrays for quality control of mesenchymal stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015; 7: 16828–16836.
- 7) Ogasawara T, Kuwabara R, Kozai K *et al.*. Quantitative cell subset analysis using antibody microarrays. *ACS Appl Bio Mater* 2021; 4: 7673–7681.
- 8) Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S *et al.*. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020; 181: 271–280.
- 9) Kato K, Ishimuro T, Hirata I *et al.*. High-throughput immunophenotyping by surface plasmon resonance imaging. *Anal Chem* 2007; 79: 8616–8623.