

電界集中型細胞融合法による 抗体産生細胞の高収率取得

オケヨ・ケネディ・オモンディ^{*1}, 西垣内 康宏^{**}, 近藤 武宏^{*}, 黒澤 修^{**},
小穴 英廣^{*}, 小寺 秀俊^{***}, 鷺津 正夫^{**}

(2013年9月10日受付; 2013年12月10日受理)

Electrofusion Employing Electric Field Constriction for High Yield Generation of Hybridomas for Monoclonal Antibody Production

Kennedy O. OKEYO^{*1}, Yasuhiro NISHIGAICHI^{**}, Takehiro KONDO^{*}, Osamu KUROSAWA^{**},
Hidehiro OANA^{*}, Hidetoshi KOTERA^{***}, and Masao WASHIZU^{**}

(Received September 10, 2013; Accepted December 10, 2013)

A high-yield electrofusion method has been developed that enables one-to-one fusion of single cells and is cell-size independent. The method utilizes dielectrophoretic force (DEP force) resulting from electric-field constriction at micro-orifices on a thin insulating sheet (orifice sheet) sandwiched between two electrodes to manipulate and pair up single B cells and myeloma cells for fusion by pulsation. Cells were individually aligned and brought into contact at micro-orifices by applying a 5V DEP voltage at 1MHz. Application of a 5V pulse for 100 μ s resulted in electrofusion of paired single B cells and myeloma cells, and a fusion efficiency of over 70% was realized. Fusants were harvested and cultured for 3 days, resulting in the formation of multiple hybridoma colonies. Using this method, a 2% yield rate was achieved, which is 20-2000-fold higher than that obtained by the typical PEG fusion. Thus, this method is applicable to the generation of hybridomas using the relatively few ($\sim 10^6$ cells) B cells harvested from the lymph, enabling faster and less costly monoclonal antibody production.

1. はじめに

細菌などの異物（抗原）が体内に侵入すると、脾臓やリンパ節に存在する B 細胞が刺激され、分裂や分化が活発になる。この状態の B 細胞は、抗原と結合することのできる抗体を産生するようになる¹⁾。複数種類の B 細胞が存在するが、そのうち、一種類の B 細胞（クローン）から産生された、分子構造の均一な抗体がモノクローナル抗体と呼ばれる。モノクローナル抗体は特異性が高く、特定の抗原としか反応しない。そのため、特定の抗原を

検出するための実験用試薬としてのみならず、がん治療のための抗体医薬品や免疫診断薬の中核材料としても利用されており、その応用範囲が急速に拡大している²⁾。

しかし、B 細胞は寿命が短くかつ増殖能力が低いとの性質を持っている。そのため、従来では、モノクローナル抗体取得には PEG (polyethylene glycol) 融合法により、抗体産生 B 細胞と、増殖力の高いミエローマを融合させ、ハイブリドーマを作製する方法がとられている。

PEG 融合法では、B 細胞とミエローマが混在する状態で PEG を加えて融合させるが、接し合う細胞同士がランダムに融合するため、B 細胞とミエローマが 1 対 1 融合する確率は極めて低い ($10^{-6} \sim 10^{-4}$)。一匹のマウスの脾臓から得られる細胞数は約 10^8 個であるが、この中には B 細胞の他にリンパ球の一種である T 細胞も多く含まれている。B 細胞と同様に、T 細胞もミエローマと融合し、コロニーを形成するので、融合効率が $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$ である PEG 融合法では、 10^8 個の B 細胞からは多種類の B 細胞由来のハイブリドーマが 10^3 個程度得られる。この中で、目的の抗体を産生するハイブリドーマの数は、 10^3 個中わずかに数個から数十個しかない。従って、融合効率の向上が課題となっている。

効率が向上すれば、脾臓の代わりにリンパ節に存在す

キーワード：オリフィスシート、電界集中、細胞融合、抗体産生、ハイブリドーマ、モノクローナル抗体

^{*} 東京大学機械工学専攻

(〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1)

Department of Mechanical Engineering, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

^{**} 東京大学バイオエンジニアリング専攻

(〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1)

Department of Bioengineering, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

^{***} 京都大学マイクロエンジニアリング専攻

(〒606-8501 京都府京都市市田本町)

Department of Microengineering, Kyoto University, Yoshidahonmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

¹ okeyo@washizu.t.u-tokyo.ac.jp

る $10^5 \sim 10^6$ 個の少量のB細胞を用いてハイブリドーマを作製することが可能となる。リンパ節は呼吸系の近くに存在するため、口や鼻から侵入してきた抗原に一番早く反応して抗体を産生するため、少量の抗原で短時間で抗体作製が可能であり、抗体産生の低コスト化が図れる。

そこで、本研究では、1対1の細胞融合を可能にする電界集中型電気細胞融合法を用い、B細胞とミエロマを1対1に融合させることにより、B細胞1個からなるハイブリドーマコロニーを高効率で作製し、モノクローナル抗体取得効率の向上を図ることを目的とした。

2. 電気細胞融合の原理

2.1 可逆的膜破壊と電気的細胞融合の関係

図1(a)に示すように、外部電界 E_0 中に半径 a の細胞を置くと、膜電圧 V_m が細胞膜に生じる。電界方向を $\theta = 0$ としたときの極座標の天頂角 θ の位置における $V_m(\theta)$ の時間発展は式(1)で与えられる³⁾。

$$V_m(\theta) = \frac{3}{2} a E_0 \{1 - \exp(-t/\tau)\} \cos\theta \quad (1)$$

$$\tau = a C_m (\mu_i^{-1} + \mu_o^{-1}/2) \quad (2)$$

ただし、 t は印加時間、 τ は時定数、 C_m は細胞膜の静電容量、 μ_i と μ_o は細胞内外の導電率である。細胞膜の電気容量 C_m は約 $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ であることが知られており、 $a = 15 \mu\text{m}$, $\mu_i = 3000 \mu\text{S}/\text{cm}$, $\mu_o = 100 \mu\text{S}/\text{cm}$ とすると、時定数 $\tau = 8 \mu\text{s}$ となる。また、式(1)より、膜電圧は $\theta = 0$, $\theta = \pi$ の位置で最大となり、細胞サイズに依存することが分かる。

細胞膜が破壊する膜破壊電圧 V_b は細胞種によらず、約 1V であるとされている³⁾。従って、印加電圧が高すぎる ($V_m \gg V_b$) と不可逆的膜破壊が生じ、細胞が死に至る。逆に印加電圧が低すぎる ($V_m \ll V_b$) と、脂質2重膜(図1b)である細胞膜はコンデンサのように振る舞い、充電されるだけで膜破壊は起きない。一方、 $V_m \cong V_b$ の条件では、一時的な膜破壊が生じるが、電界の作用がなくなると膜が自己修復する。この可逆的膜破壊が起きる電圧条件 ($V_m \cong V_b$) で隣り合う2つ以上の細胞に対してパルス電圧を印加すると、細胞同士の接触点で一時的な膜破壊が生じ(図1c)、その後の膜回復過程で細胞結合が起きる(図1d)。

図1(b)に示すように、一般的な電気的細胞融合法では、細胞懸濁液中の細胞に対して、誘電泳動により細胞同士を接触させ、次にパルス電圧を印加して融合させる。電界中に細胞2個以上が接している場合においては、 $\theta = 0$, $\theta = \pi$ で V_m が最大となるため、接触点 P_0 の他に、接触細胞の両端(点 P_i , 点 P_b)でも膜破壊が生じうる(図1(c))。ただし、接触点 P_0 では細胞膜が2枚接触しているため、可逆的膜

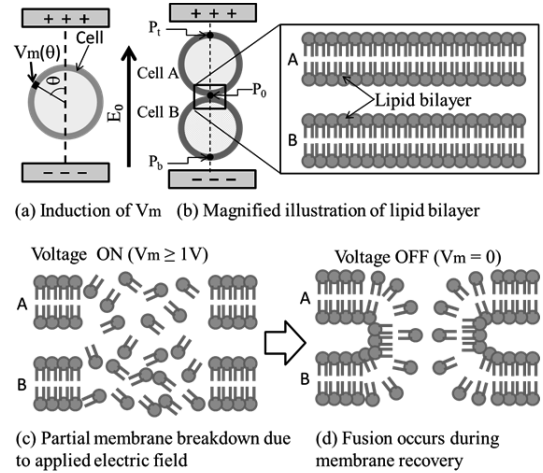


図1 細胞膜の可逆的破壊と自己再生による融合

Fig. 1 Voltage induced membrane breakdown and recovery during cell fusion.

破壊を起こすには約 $2V_b$ が必要であるのに対し、点 P_i および点 P_b では膜が1枚で、 $V_b \cong 1\text{V}$ で膜破壊が起きる。

このように、通常の電気的細胞融合法では、接触点で膜破壊電圧(約 2V)に達する前に、接触細胞の両端(点 P_i , P_b)で先に不可逆的膜破壊が生じ、細胞が破裂してしまう。そのため、この方法の融合効率が悪い (0.1%)。また、式(1)に表すように、膜電圧は細胞サイズに依存するため、同じ電界 E_0 であっても、小さい細胞よりも大きい細胞の方が先に膜電圧が膜破壊電圧に達するため、サイズの異なる細胞同士の融合が難しい。さらに、この方法では、電界中の細胞がランダムにパールチェーンを形成するため、融合する細胞の数および種類を制御することができない。次項で説明する電界集中型細胞融合法はこれらの短所を克服した、1対1細胞融合を可能にする画期的な方法である。

2.2 電界集中型1対1細胞融合法

電界集中型1対1細胞融合法とは、電界中の絶縁体に設けた微細なオリフィスで生じる電界集中により発生する正の誘電泳動を利用し、オリフィスを介して1対1の細胞ペアを作った後、パルス電圧を印加して融合させる方法である(図2)。この方法では、オリフィスを介して目的の細胞同士を確実に1対1にペアリングできる。また、この状態でパルスを印加すると、印加電圧のほとんどがオリフィス近傍の細胞膜にかかることが数値シミュレーションの研究から分かっている⁴⁾。そのため、細胞のサイズに依存することなく、2枚の細胞膜の破壊に必要な電圧(約 2V)を印加すれば細胞融合を行うことができる。オリフィス近傍で複数個の細胞でパールチェーンが形成される場合もあるが、膜破壊が生じるのは電界集中の生じるオリフィス部のみであるため、オリフィ

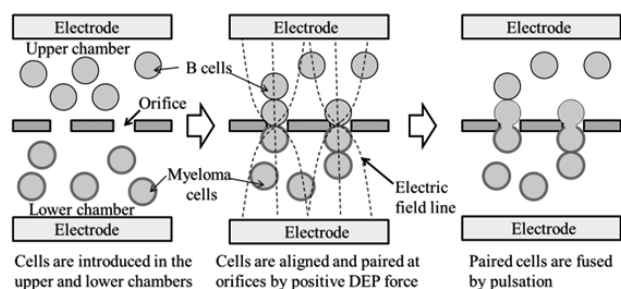


図2 電界集中型細胞融合技術の原理

Fig. 2 Electrofusion employing electric field concentration for cell alignment and fusion

スを介して接触している融合のみが融合する⁵⁾。

電界集中型細胞融合においては、正の誘電泳動を用いて細胞のペアを形成するため、周囲の溶液の導電率を細胞の導電率よりも十分低い $100 \mu\text{S}/\text{cm}$ とし、印加周波数は、Clausius-Mossotti 関数の値が正で、電極反応による気泡や溶液の対流を生じさせない 1MHz を用いる。また、融合のためのパルスは、波高値 2V 以上、持続長は本実験条件における理論的膜電圧の時定数 $\tau \approx 10 \mu\text{s}$ より十分長い $100 \mu\text{s}$ の矩形波パルスを用いる。

3. デバイス構成および実験方法

3.1 融合デバイスの構成

図3に本研究で用いた1対1細胞融合デバイスの構成要素を示す。このデバイスは、顕微鏡観察が可能なITO電極2枚と、シリコンゴムに囲まれたチャンバーの中央に配置するオリフィスシートからなる。上下チャンバー内は細胞を含む細胞懸濁液で満たし、デバイスを密閉した状態で融合操作を行う。

図3(a)にオリフィスシートのSEM画像を示している。本実験では、オリフィスが $50 \mu\text{m}$ 間隔で格子状に並んだ、径 2.5mm のオリフィスシート(オリフィス数が2,500個)を用いた。図3(b)に示すように、オリフィスの形状は中央絞りのテーパ形状となっており、穴の最も広い表面

付近ではオリフィスの直径が $20 \mu\text{m}$ で、穴が最も狭い部分では直径が $5 \mu\text{m}$ である。このオリフィスシートは株式会社三陽より購入した。図3(c)および(d)にデバイス全体の構成を示す。

3.2 実験材料および方法

3.2.1 実験に用いた細胞および培養方法

本実験では、ヒトTリンパ腫由来の浮遊性細胞である Jurkat 細胞を融合電圧条件の検討に用いた。また、ハイブリドーマ作製には、マウスミエローマ細胞 (NS-1 株)、株化された B 細胞 (BCL1 Clone CW13.20) およびマウス脾臓から採取されたプライマリ B 細胞を用いた。Jurkat 細胞とミエローマ細胞は、FBS (牛胎児血清) 10% および抗生物質 1% を添加した RPMI 1640 培地を用いて培養した。B 細胞は、FBS 10% および抗生物質 1% を添加した DMEM 培地を用いて培養した。

細胞融合後のハイブリドーマを含む細胞は、HAT 培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む動物細胞用の培養液) で培養した。ヌクレオチドの de novo 合成をブロックする成分を含む HAT 培地では、ヌクレオチドのサルベージ合成のできる B 細胞とこの性質を B 細胞から受け継いだハイブリドーマのみが生きられるが、ヌクレオチドのサルベージ合成に必要な酵素、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) を欠くミエローマは生きられない。また、B 細胞は寿命が短く、数日でほとんど死んでしまうので、結局 HAT 培地に残るのはハイブリドーマのみである。

3.2.2 融合バッファの調整

正の誘電泳動を発生させるためには、融合バッファの導電率を細胞の導電率 ($1 \sim 10 \text{mS}/\text{cm}$) より十分に低くする必要がある。本実験では、先行研究⁴⁾を参考に、 100mM のソルビトール溶液に、 0.5mM の酢酸マグネシウムと 0.1mM の酢酸カルシウムを加え、融合バッファの導電率が $100 \mu\text{S}/\text{cm}$ 程度となるよう調整した。この融合バッファは動物細胞にとっては低張液であり、このバッファにおける Jurkat 細胞と株化 B 細胞の直径は約 $15 \mu\text{m}$ であり、ミエローマは約 $18 \mu\text{m}$ 、プライマリ B 細胞は約 $10 \mu\text{m}$ であった。また、融合バッファの浸透圧を変更させた実験では、ソルビトール濃度 150mM の融合バッファを用いた。このバッファ中では、Jurkat 細胞および株化 B 細胞の直径が約 $13 \mu\text{m}$ 、プライマリ B 細胞が $7 \mu\text{m}$ 、ミエローマが $15 \mu\text{m}$ であった。

3.2.3 細胞融合の手順

まず、融合確認のため、実験に用いる2種類の細胞をそれぞれ緑色と赤色の蛍光色素 calcein AM (使用濃度 $5 \mu\text{M}$) を添加した培地で 30 分培養して染色した。特に B

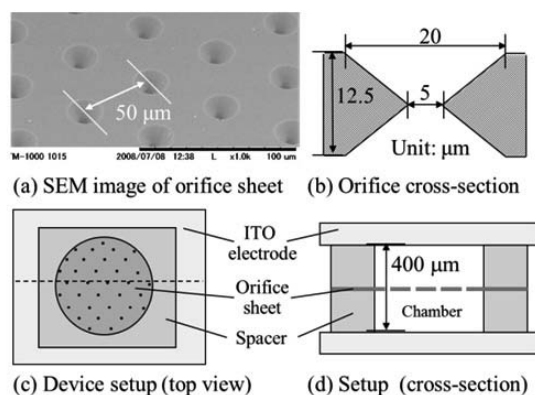


図3 デバイスの構成

Fig. 3 Device configuration

細胞とミエローマの融合実験では、calcein AM よりも細胞内での滞在時間が長い赤色蛍光色素 DiI（使用濃度 5 μM ）を用いた。このとき、ミエローマは DiI で染色し、B 細胞は無染色のままにした。

融合の具体的な手順を図 4(a~d) に示す。まず、図 4(a) に示すように、下部チャンバーに細胞（約 5000 個、緑色蛍光染色）とスターラーバーを入れてからオリフィスシートを設置し、次に、図 4(b) に示すように、上部チャンバーに細胞（約 5000 個、赤色蛍光染色）を導入し、DEP 電圧（5 V, 1 MHz）を印加することにより細胞をオリフィス部に配置させた。その後、DEP 電圧を印加したままデバイスを逆さまにし、図 4(c) に示すように、回転磁石によりスターラーバーを回し、電極面に付着していた細胞をオリフィスシート上に落としながら誘電泳動によりオリフィス部に配置させた。なお、B 細胞とミエローマの融合実験では、サイズの小さい B 細胞がオリフィスをすり抜けないようにするため、まずミエローマ細胞をオリフィス部に配置させてから B 細胞を導入した。

3.2.4 細胞融合の観察および評価

上記の手順でオリフィスシートの上下面に細胞を配置させた後、DEP 電圧（5 V, 1 MHz）を印加したまま、パルス電圧を印加し、オリフィス部の細胞ペアを融合させた（図 4(d)）。この際、融合確認のため、図 4(e) に示すように、下側のチャンバーの細胞に顕微鏡の焦点を合わせ、励起フィルターを上側の細胞の蛍光色素に合わせた。細胞融合が起き、上側の細胞の蛍光色素が下側の細胞に流入したとき、観察視野内の細胞の輝度が上昇するので、

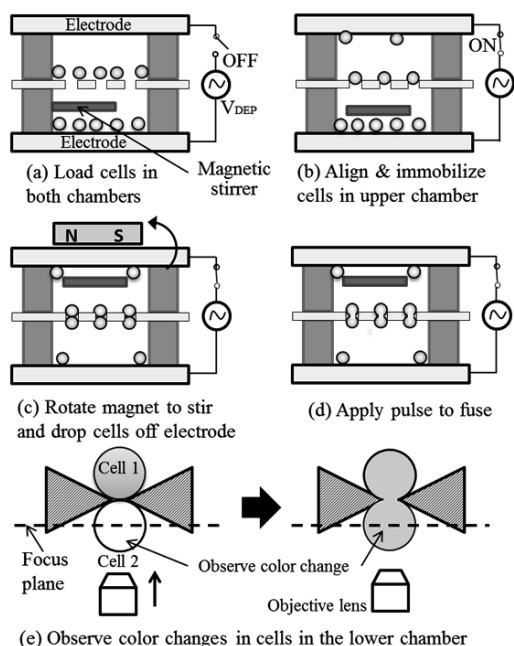


図 4 細胞融合の操作手順および観察方法
Fig. 4 Procedures for cell fusion and observation

これを指標に融合を判定した。

なお、オリフィスアレイに固定された細胞の蛍光は配列化された輝点として画像に現れる。画像に見えるそれ以外の輝点は、オリフィスに固定できなかった細胞か、細胞以外のゴミとみなされる。

4. 実験結果および考察

4.1 融合条件の検討結果

2.2 項で述べたように、電界集中型 1 対 1 細胞融合では、理論的には、細胞同士の接触点において細胞膜 2 枚を破壊するのにパルス電圧 2 V を印加すれば十分である。しかし、実際はチャンバー内の溶液やオリフィスシート等で電圧降下が生じるため、2 V よりも大きなパルス電圧が必要になることを予想できる。

そこで、本実験では、Jurkat 細胞を用い、まず理論的に融合が起きるパルス電圧 2 V から段階的に電圧を上げながら細胞融合の様子を観察した。

パルス電圧の検討結果を図 5 に示す。図 5A および図 5B はパルス電圧（2 V, 100 μs ）の印加前後の様子を示すが、両方の画像の比較より明らかなように、輝点には特に明確な変化はなく、この電圧条件では細胞融合が認められなかった。図 5C および図 5D に示すように、パルス電圧が大きくなるにつれ、輝点の増加がみられ、融合する細胞数が増加した。パルス電圧 5 V では、Jurkat 細胞ペアのうち 85% が融合した（図 5D）。パルス電圧を 6 V に上げても融合する細胞数の増加が見られず、逆に既に融合細胞のうち破裂するものが出てきた。従って、パルス電圧の条件（5 V, 100 μs ）とし、同様の電圧条件に次項で説明する B 細胞とミエローマの融合を行った。

なお、DEP 電圧（5 V, 1 MHz）によりオリフィス部に細胞を配置したが、ゴミがオリフィスを塞いでしまう間

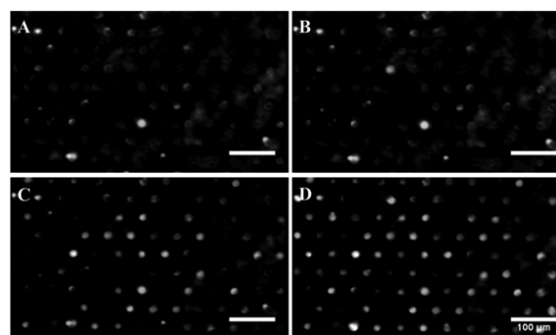


図 5 パルス電圧と融合細胞数の変化。格子の上に並んでいる蛍光点（白い点）が融合細胞の位置を示す。A：電圧印加前，B：印加パルス電圧 2 V，C：印加電圧 3 V，D：印加電圧 5 V。パルス幅は 100 μs である。

Fig. 5 The effect of applied voltage on cell fusion efficiency. A: Before pulse, B: after 2 V pulse, C: after 3 V pulse, (D) after 5 V pulse, all applied for 100 μs .

題などから、すべてのオリフィス (2,500 個) に細胞のペアを形成することは難しく、実際の細胞のオリフィス占有率は約 80% であった。つまり、導入細胞数に関係なく、実際に得られた細胞ペア数は約 2,000 個であった。

4.2 B細胞とミエローマの1対1電気融合

4.1 項で示したパルス電圧条件で株化 B 細胞とミエローマを融合させた結果を図 6 に示す。図中の白丸は、パルス電圧印加前後で輝度変化 (融合を意味する) が確認されたオリフィス部を示す。図 6A と図 6B の比較より、オリフィス部で形成された細胞ペア 2,000 個のうち 10% のペアしか融合しなかったことがわかり、Jurkat 細胞の場合の 85% と比較してかなり融合効率が低かった。この結果を受け、ミエローマ同士の融合を行った。その結果、同種細胞同士の融合であるにも関わらず約 10% と低い値であることがわかった。

オリフィスシートを用いた場合は、細胞サイズに関係なく融合ができることを理論的にも実験的にも知られている^{4,5)}。従って、ミエローマ同士の融合効率が低かったことに焦点を当て、B 細胞とミエローマの低い融合効率について次の 2 つの可能性を考えた。1 つ目は、融合バッファの浸透圧の影響である。モル濃度 100 mM の融合バッファは動物細胞にとって低張液であるため、細胞膜が張った状態にある。そのため、オリフィス内部での膜変形が生じず、細胞ペアの接触が起きにくいと考えた。2 つ目は、細胞膜上のタンパク質や糖鎖の影響であり、これらが融合時における膜破壊や膜の再構築を妨げ、融合が起きにくくすると考えた。

まず、浸透圧について検討を行った。細胞がより変形し易くなることを期待して、融合バッファのモル濃度を 100

mM から 150 mM に上げ、浸透圧を大きくした。その結果を図 6C (融合前) および図 6D (融合後) に示す。これらの図の比較より、細胞ペアのうち 16% が融合し、わずかなではあるが、浸透圧の変化により融合効率に改善が見られた。

次に、ミエローマ同士の融合効率が低いことに着目し、膜上タンパク質の酵素分解によりさらに融合効率を上げられるか、検討を行った。実際、融合する細胞をトリプシン等のプロテアーゼで処理すると融合効率が向上するという報告がある⁷⁾。融合前にミエローマを濃度 0.05% のトリプシン溶液に入れて 5 分間培養し、その後、融合バッファ 150 mM で融合を行った結果、融合効率が約 41% に上昇した。また、図 6E および図 6F に示すように、処理時間をさらに長くして 15 分にしたところ、融合効率が約 73% にまで上がった。この結果より、膜上タンパク質が B 細胞とミエローマの融合効率が低かった原因の一つと言える。従って、融合パルス電圧に加え、膜上タンパク質や糖鎖、さらに、融合バッファの浸透圧が融合効率を左右する主なファクターであると言える。

4.3 ハイブリドーマの回収および培養

株化 B 細胞とミエローマの融合後、融合デバイスを培地中に開放しオリフィスシートを取り出した後、まず、B 細胞側を下側にして培地中でオリフィスシートを軽く揺さぶり、未融合の B 細胞を洗い出した。このとき、オリフィスシートの上側にあるミエローマはオリフィスよりも大きいため、ハイブリドーマは落ちない。この操作の後、ミエローマ側を上にしたままオリフィスシートを新しい DMEM 培地中に設置してから裏返し、ミエローマ側を下にした状態で 3 日間培養を行った。

プライマリ B 細胞を用いた融合実験でも同様の操作を行ったが、DMEM 培地で 1 日培養を行った後、HAT 培地に切りかえ、続けて培養を行った。また、ハイブリドーマコロニーの増殖を促進させるため、フィーダー細胞として、融合に使っていないプライマリ B 細胞と一緒に培養した。未融合のミエローマは HAT 培地中で生きられないので、ほとんど排除される。

図 7A に DMEM 培地中に回収した株化 B 細胞由来のハイブリドーマの培養結果を示す。ハイブリドーマが複数のコロニーを形成している様子が確認できる (図 7A 中、拡大部分)。また、図 7B より、これらのコロニーが接着性であり、またミエローマの染色に用いた DiI 色素の蛍光を発していることから、ハイブリドーマであると言える。比較のため、ミエローマの画像を図 7C に示す。

さらに、図 7D にはプライマリ B 細胞由来のハイブリドーマを 3 日間 HAT 培地中に培養した結果を示している。白い点線で囲んだ領域では細胞が接着して比較的密

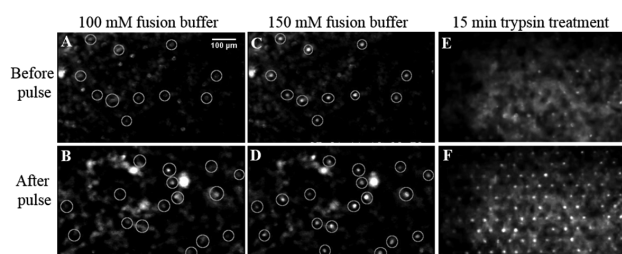


図 6 B 細胞とミエローマの融合結果。A, B: 融合バッファ 100 mM を用いた場合のパルス印加前と後。C, D: 融合バッファ 150 mM を用いた場合のパルス印加前と後。円で囲んだ箇所は融合前と後とで輝度変化が確認されたオリフィス部を示す。E, F: 15 min トリプシン処理された B 細胞を用いた場合で、150 mM においてパルス印加前 (E) と印加後 (F)

Fig. 6 Fusion of B cells with myeloma cells. A, B: Before and after pulsation using a 100 mM fusion buffer, C, D: Before and after pulsation using a 150 mM fusion buffer. E, F: Before and after pulsation for the case where B cells (cell line) were perfused with trypsin for 15 min and fusion performed in 150 mM buffer.

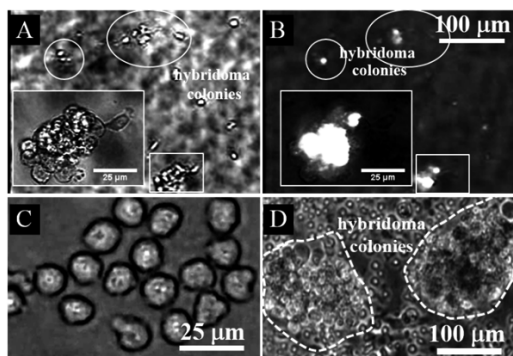


図7 ハイブリドーマの培養とコロニー形成。A：培養ディッシュ底面におけるハイブリドーマコロニーの形成（株化B細胞使用の場合）、白枠は拡大部分を示す。B：形成コロニーの蛍光画像、C：ミエローマの顕微鏡画像、D：プライマリB細胞由来のハイブリドーマコロニー形成の様子。白丸がコロニー、周りはフィーダー細胞

Fig. 7 Hybridoma culture and colony formation. A: Hybridoma colony formed at the bottom of culture dish, B: Hybridoma colony expressing DiI fluorescent dye used to stain only myeloma cells, C: Image of non-adherent myeloma cells, D: Hybridoma derived from primary B cells in a HAT culture medium.

集になっていることから、これらがハイブリドーマのコロニーと考えられる。

デバイスに導入したプライマリB細胞5,000個に対し、形成された細胞ペア数が2,000個であり、得られたコロニー数が100個程度であった。よって、収率（生成コロニー数と融合に参加したB細胞数の割合）は2%となる。この収率では、リンパ節からのB細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個を用いても十分なハイブリドーマのコロニーが得られる。よって、本研究で提案した融合法を用いれば、リンパ節からのB細胞を使ったモノクローナル抗体の産生が可能となる。

5. 結論

本研究では、従来のPEGよりも高収率でハイブリドーマを作製できる方法として、電界集中型1対1細胞融合法について検討を行った。

この方法では、微細なオリフィス（有効径5 µm）を有する薄膜ポリマーシートを電極間に設置し、DEP電圧（5 V, 1 MHz）を印加することにより、オリフィス部で生じる電界集中を利用して細胞を誘導し、オリフィス部の両側に1対1の細胞ペアを形成した。そして、パルス電圧（5 V, 100 µs）を印加することにより、細胞サイズによらず、細胞ペアを電気融合させた。その結果、Jurkat細胞同士を用いた同種細胞融合では、85%の高い融合効率を達成できた。

B細胞とミエローマを用いた異種細胞融合の場合は融合効率が10%と比較的低かったが、融合バッファの浸透圧調整やミエローマのトリプシン処理を予め施すこと

により、73%以上の融合効率を実現できた。

さらに、B細胞とミエローマの融合で得られたハイブリドーマを回収して培養した結果、デバイスに導入した5,000個のB細胞に対して100個以上のハイブリドーマコロニーを確認できた。

以上より、電界集中型電気融合を利用した1対1細胞融合法の収率は2%であり、PEG融合の20~2,000倍である。以上、電界集中型1対1細胞融合法を用いれば、脾臓からのB細胞のみならず、リンパ節からのB細胞をモノクローナル抗体産生に使用することができ、必要な抗原の量の削減や抗体産生までの時間短縮等のメリットが期待できる。

今後、融合効率と回収効率の両方をさらに向上させると同時に、得られたハイブリドーマのコロニーが実際に抗体産生能力を持っているかどうかの検討を行う。

謝辞

本研究は、科研費（12808552, 25790034）の助成を受けたものである。また、東京大学先端科学技術研究センター分子生物医学浜窪先生よりプライマリB細胞をご提供いただいた。この場をお借りして感謝を申し上げたい。

参考文献

- 1) G. Kohler and C. Milstein: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256** (1975) 495-497
- 2) 松葉隆雄, 三苦恵民, 田中千代, 井上益男: 高親和性ウサギモノクローナル抗体の創製（高感度エストラジオール測定系への応用）. 東ソー研究・技術報告, **52** (2008)
- 3) U. Zimmermann and W.M. Arnold: Biophysics of Electroporation and Electrofusion. *Journal of Electrostatics*, **21** (1988) 309-345
- 4) B. Techaumnat and M. Washizu: Analysis of the effects of an orifice plate on the membrane potential in electroporation and electrofusion of cells. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **40** (2007): 1831-1837
- 5) Y. Kimura, M. Gel, B. Techaumnat, K. Tsuda, H. Oana, H. Kotera, T. Tsuda and M. Washizu: High-yield parallel electrofusion device based on field constriction at an orifice array, MicroTAS 2008, San Diego, California, USA.
- 6) G. A. Neil and U. Zimmermann: Electrofusion. *Methods in Enzymology*, **220** (1993) 174-196
- 7) T. Ohno-Shosaku and Y. Okada: Facilitation of electrofusion of mouse lymphoma cells by the proteolytic action of proteases. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **120** (1984) 138-143