

微細オリフィスへの電界集中を利用した高収率細胞融合チップの開発

津田 欣哉

Keywords: cell-fusion microorifice field-constriction DEP μ TAS

1. 背景

近年、品種改良や抗体作製において、細胞内に別細胞の細胞質や核を移植する細胞融合の技術が多く用いられている。

細胞融合は、主に電気穿孔法を用いた電氣的細胞融合法(Fig.1)を用いて行われている。電極間に細胞懸濁液を導入し、高周波による誘電泳動によって細胞を配列させ、高圧パルス電圧を印加する。細胞膜には、膜電圧(約1 Vp)を印加すると一過的、可逆的な膜破壊が起きるという性質がある[1]ため、細胞同士の接触点で膜が破壊された場合、膜が修復する際に、接触していた細胞同士が融合する。この手法は、(1)細胞膜にかかる電圧は細胞の径に依存すること、(2)電気穿孔による膜破壊が細胞同士の接触点以外で起きやすいこと[2]、(3)1:1の細胞融合になるような制御ができないこと等から、非常に低収率(10^{-5} オーダー)であるという問題点があり、高収率の細胞融合に対する需要が高まっている。

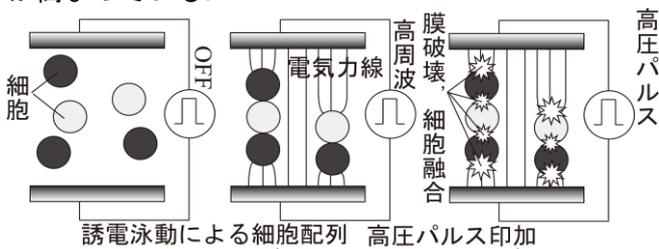


Fig.1 Electro cell-fusion

2. 目的

本研究では、高収率の電氣的細胞融合法を行うチップの開発を目的とする。

3. 原理

電氣的細胞融合法の電極間を、微細オリフィスを設けた絶縁体膜で2つのチャンバーに仕切り、各チャンバーに所望の2種の細胞を導入する(Fig.2)。電極間に電圧を印加した際、微細オリフィスに電気力線が集中するため、誘電泳動においては、(1)細胞を両側のチャンバーから微細オリフィスに向けてハンドリングすることができる。電位降下の殆どが電気力線の集中している微細オリフィス部分で起こるため、細胞融合においては、(2)細胞径に関係なく、微細オリフィス部分にのみ細胞膜破壊を起こし、(3)微細オリフィスを挟んだ1:1の細胞融合を行うことができる。

本研究では、観察の簡単のため細胞を水平に接触させ、個々の細胞融合を確認するための1:1細胞融合観察チップと、微細オリフィスを大量アレイ化し、融合の収率を確認するための大量並列細胞融合チップを作製し、実験を行った。

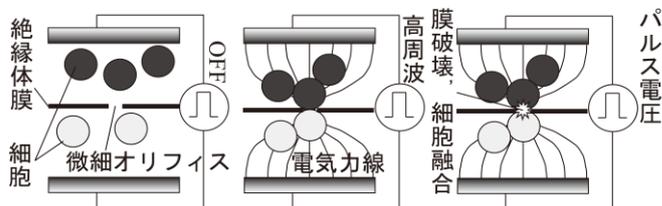


Fig.2 Electro cell-fusion with a microorifice

4. 1:1細胞融合観察チップ

4.1. チップ作成

PDMS(ポリジメチルシロキサン)を用いたソフトリソグラフィにより細胞融合チップを作製した(Fig.3)。チップには2本の流路を設け、毛细管力で細胞を導入する。流路同士は微細オリフィスによって繋がっており、この部分に電界集中を起こし、誘電泳動、細胞融合を行う。電極間距離は細胞融合の効率に影響を与えないが、微細オリフィスの大きさは細胞と同程度以下であることが望ましい[2]。本研究ではJurkat細胞(ヒト白血病細胞、直径約10 μ m)を用いるため、微細オリフィス幅を10 μ m以下とし、細胞が流路内で詰まるのを防ぐため、流路深さを細胞径より僅かに大きい15 μ mとした。

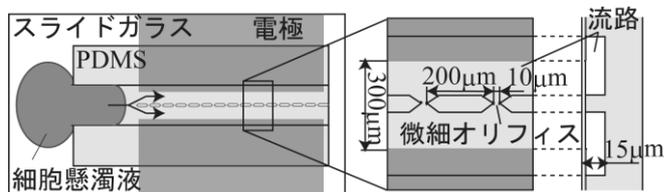


Fig.3 Cell-fusion chip with PDMS flow chamber

4.2. 実験

Jurkat細胞懸濁液(導電率2-5 mS/m)をチップ内に導入し、誘電泳動(矩形波,10 Vp,5 MHz)、細胞融合(矩形波,1-10 Vp,50 msec,10 kHz)を行った。細胞融合を確認した後、誘電泳動用電圧を切り、流路内の流れによって細胞を微細オリフィスから取り出し、経時観察を行った。

4.3. 実験結果、考察

誘電泳動による細胞固定、細胞融合を確認した。Fig.4は、(1)融合用電圧印加直前、誘電泳動によって微細オリフィスに細胞が固定されている。(2)融合用電圧を印加し、誘電泳動用電圧を切った3秒後。写真(1)で微細オリフィスから離れたところに固定されていた細胞は融合せずに流されており、融合が微細オリフィス部でのみ起こったことがわかる。(3)流れに従って微細オリフィスを抜ける融合細胞(4)融合2分後(5)融合3分後(6)融合3分30秒後の様子を示している。微細オリフィスの両側に

固定された2細胞のみ融合し、融合後、2細胞が一体化していく様子が確認できた。

11回実験を行ったところ、細胞融合に要した電圧は6-10 Vpで、融合の成功率は90%以上であった。この結果は、微細オリフィスを用いた細胞融合が従来の電気細胞融合法に比べ、非常に高効率であることを示している。

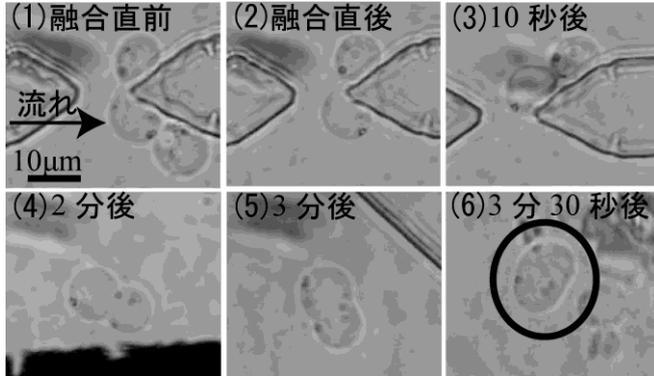


Fig.4 Snapshot of cell-fusion at a microorifice

5. 大量並列細胞融合チップ

5.1. チップ作成

大量高収率細胞融合を実現するためには、微細オリフィスを2次元アレイ化することが望ましい。融合する細胞の種類を制御するためには、微細オリフィスを細胞が通過できない大きさ(10 μm以下)にする必要があるが、その大きさの微細オリフィスを挟んで2細胞が接触するためには、絶縁体膜の薄さを約2 μm以下にする必要がある。

本研究では、パラキシリレン樹脂をガラス板上に蒸着(CVD, 厚さ2 μm)、レーザで微細オリフィス(10×10, 直径6 μm, 50 μm間隔)を設け、剥離したものを、チャンバー、電極を設けた2個のシリコン片で微細オリフィスが水平方向を向くように両側から固定した。

(Fig.5)

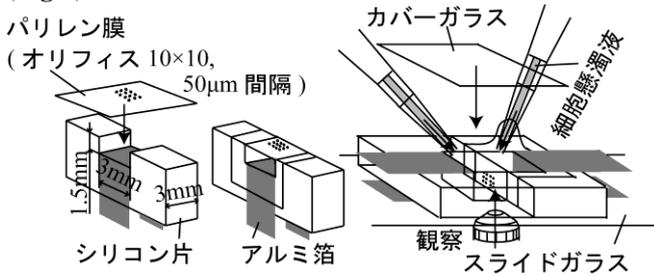


Fig.5 Cell-fusion chip with poly-para-xylylene membrane with microorifices

5.2. 実験

Jurkat細胞懸濁液(溶媒導電率2-5 mS/m)をチップ内に導入し、誘電泳動(矩形波,10 Vp,5 MHz)、細胞融合(矩形波, 1-10 Vp,50 msec,10 kHz)[2]を行った。細胞を効率よく微細オリフィスに固定するため、細胞導入後、誘電泳動用電圧を印加したままチップ全体を大きく左右に傾け、膜近傍まで沈降した細胞を誘電泳動力で微細オリフィスに固定した。融合の確認のため、微細オリフィスの片側に導入する細胞のみ予め蛍光色素(Calcein AM)で細胞内染色しておき、融合後、細胞質が混ざること、微細オリフィスを挟んで接触してい

た非染色の細胞が光り出す様子を蛍光観察した。

5.3. 実験結果, 考察

誘電泳動による細胞固定、細胞融合を確認したところ、50%以上の微細オリフィスにおいて、微細オリフィスの両側に細胞を固定できていた。それらのうち1対の細胞に注目し、細胞融合を確認した。Fig.6は、融合用電圧印加前、印加5分後のそれぞれ明視野像、蛍光像を示している。融合前には片側の細胞のみに蛍光が認められ、融合後、両方の細胞に蛍光が認められた。オリフィスを挟んだ2つの細胞が融合し、細胞質が混ざったと考えられる。現段階では実験数が少ないため、融合収率については不明だが、融合条件を調整しつつ実験を重ねることで、高収率大量並列細胞融合を実現できると考えられる。

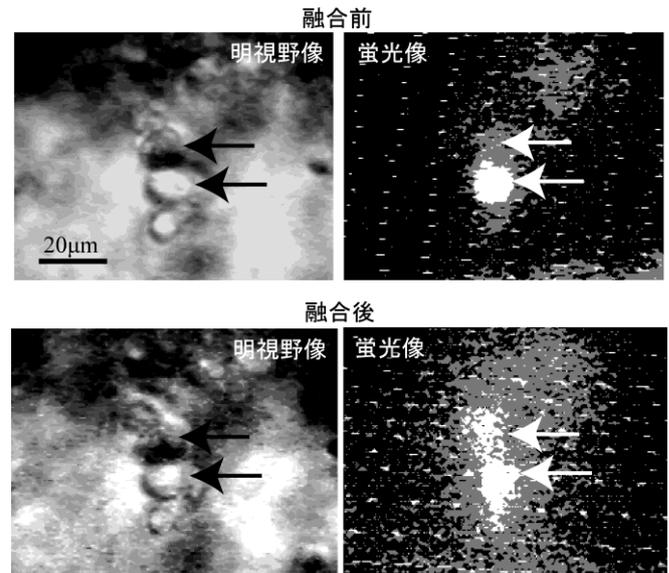


Fig.6 Snapshot of cell-fusion at a microorifice

6. 結論

微細オリフィスを用いた高収率細胞融合を実現、観察し、その有用性および、微細オリフィスの二次元アレイ化による大量細胞融合への応用性を検証した。

今後、本研究に加え、融合条件の検討、融合細胞の培養評価を行うことで、実用的な高収率細胞融合法を確立できると考える。

参考文献

- [1] Osamu Kurosawa *et al*, "Electroporation through a micro-fabricated orifice and its application to the measurement of cell response to external stimuli", *Measur. Sci. Technol.* 17(2006)3127-3133
- [2] Boonchai Techaumnat and Masao Washizu, "Analysis of the effects of an orifice plate on the membrane potential in electroporation and electrofusion of cells", *J. Phys. D: Appl. Phys.* 40 No 6 (21 March 2007) 1831-1837