

リンパ節からの抗体産生を目指した細胞融合マイクロデバイスの開発

東京大学工学部機械工学科 鷲津・小穴研究室 03110194 近藤武宏 指導教員：鷲津正夫教授

1. 研究の背景及び目的

抗体は、抗原に特異的に結合する性質から、研究用ツールとして広く使われている。抗体を産生する B 細胞と、増殖力の強いミエローマを融合させてハイブリドーマを作製し、選択培地でハイブリドーマを選択的に回収することで、精製の不要なモノクローナル抗体を多量に回収するという抗体取得方法がある [図 1]。しかし、従来の融合法ではハイブリドーマの収率の低さが課題となっている。そのため融合には脾臓からの多量の B 細胞が用いられているが、リンパ節からの少量の B 細胞を利用できれば、時間や抗原の節約が可能である。

そこで本研究では、本研究室で開発された電界集中型細胞融合法を用いて、リンパ節の利用可能を目指した融合効率の向上と、その後ハイブリドーマを回収する技術の開発を目的とする。

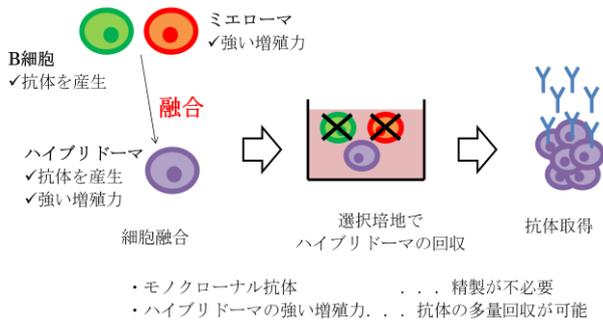


図 1 モノクローナル抗体の取得

2. 電界集中型細胞融合法

我々の研究室で開発された電界集中型細胞融合法は高効率で融合が可能であり、先行研究によるとハイブリドーマの収率は従来の方法の 10~10³倍と高い[図 2]。この方法を用いることによる、リンパ節からの B 細胞を利用したモノクローナル抗体取得の可能性が示唆された。

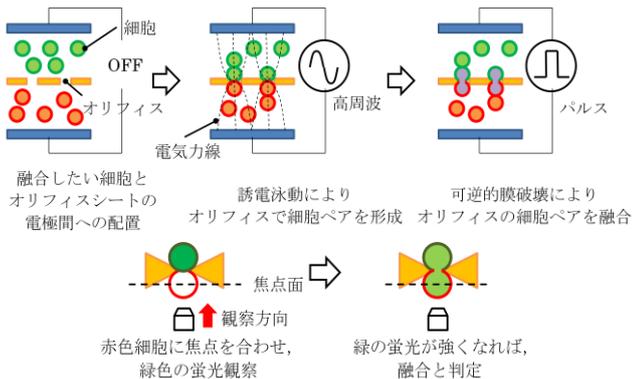


図 2 電界集中型細胞融合

3. 細胞融合条件の検討

先行研究によると、細胞種により融合効率に違いがあり、幾つかの細胞種では 80%の融合効率が達成できているが、B 細胞とミエローマの融合効率は 10%と特に低い。原因特定のためにミエローマの融合能力の検証を行った。ミエローマ同士における融合効率は 10%と低かった。そこでミエローマ同士を高効率で融合できる条件を検討していったところ、

- ① バッファの浸透圧を高くして、細胞膜を変形し易くさせ、細胞同士を接触し易くする。
- ② トリプシン処理を行うことで、細胞表面タンパク質を除去し、膜同士の密着度を上げる。

の 2 つの条件を与えることで、ミエローマ同士を 70%の高効率で融合できた。それらの条件を B 細胞とミエローマの融合に適用すると、80%の高効率で融合できた[図 3]。また、融合にはライン化された B 細胞を用いた。

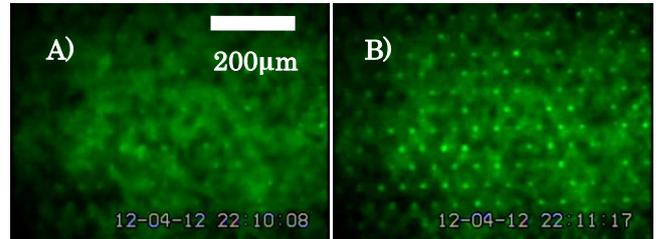


図 3 B 細胞とミエローマの高効率融合

A)融合前. B)融合後. 緑色が強くなったところが融合した細胞.

4. ハイブリドーマの回収、培養

融合後、BSA でコーティングされたオリフィスシートを取り出してゆすぎ、培地に置換することで、ハイブリドーマを物理的に選択して回収することができる[図 4]。これにより、選択培地を用いる必要がなくなった。

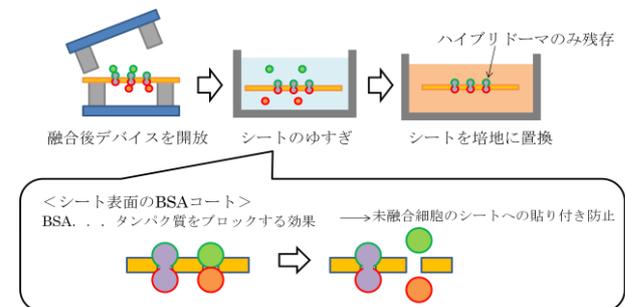


図 4 ハイブリドーマの物理的選択

回収後培養 3 日目で、ディッシュ底面に複数のハイブリドーマと思われるコロニーが観察された[図 5]。

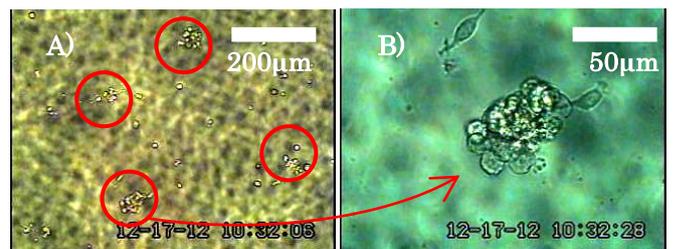


図 5A)B) ハイブリドーマと思われるコロニー

5. 結論と今後の展望

B 細胞とミエローマの融合効率を先行研究の 10%から、研究により 80%まで向上できた。また、ハイブリドーマを物理的に選択して回収することが可能となり、選択培地を用いる必要が無くなった。

今後は、実際にリンパ節から直接取得された B 細胞を用いて融合を行っていく。

6. 参考文献

西垣内康宏：平成 23 年度修士論文 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