

# 高効率細胞融合技術の開発

二 見 達  
丸 山 高 廣  
山 中 麻 帆  
森 本 篤 史  
松 丸 慶 太郎

## Development of Highly Efficient Technique for Cell Fusion Using Dielectrophoretic Force in Micropores

Toru FUTAMI  
Takahiro MARUYAMA  
Maho YAMANAKA  
Atsushi MORIMOTO  
Keitaro MATSUMARU

We have developed a novel, highly efficient technique for cell fusion. This technique comprises (1) formation of micropores on the insulating membrane, located in the lower electrode of the planar electrodes for the cell fusion chamber, and maneuvering and fixating object cells onto those micropores by dielectrophoretic force generated by the electric field constriction at the said micropores, and (2) the cell-to-cell fusion process of spleen cell and myeloma cell carried out on the micropore thus formed. This technique has provided an extremely high cell fusion frequency ( $1.4 \times 10^{-2}$ ), and has been shown to be applicable to the antibody development processes.

### 1. 緒 言

近年、モノクローナル抗体は、成人病や感染症等の臨床診断薬や、副作用の少ない癌の治療薬として注目されている抗体医薬等に利用される様になり、その応用範囲が急速に拡大している<sup>1)</sup>。従って、診断薬や医薬品の性能を左右する高機能抗体（高親和性、高特異性を有するモノクローナル抗体）の取得効率の向上が求められている。

一般に、モノクローナル抗体を取得する主な工程は、Fig. 1 に示すように、①「動物への免疫」、②「免疫した動物から摘出した抗体産生細胞とミエローマ細胞（骨髄腫細胞）との細胞融合」、③「細胞融合により得

られた融合細胞（ハイブリドーマ）の選別（スクリーニング）」の3工程からなり、工程③で得た高機能抗体を産生するハイブリドーマからモノクローナル抗体が大量に生産される。ここで一般に、抗体産生細胞には免疫したマウスの脾臓細胞が用いられ、骨髄腫細胞にはマウスミエローマ細胞（SP2/0）が用いられる事が多い。

しかしながら、抗体取得工程の課題の一つとして、工程②の細胞融合において融合効率が極めて低い<sup>2)</sup>（従来の細胞融合法であるPEG法<sup>3)</sup>や電気融合法<sup>4)</sup>による、マウス細胞を用いた融合効率：約 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$ ）、融合細胞の取得が難しいという課題があり、モノクローナル抗体の開発効率を低下させる

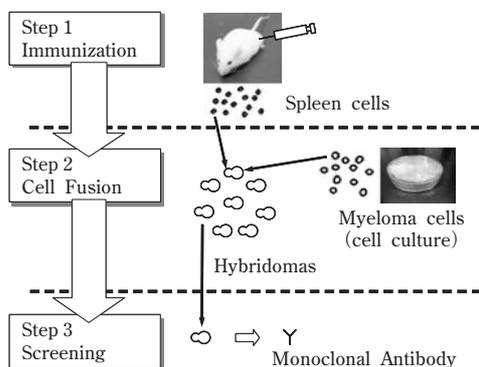


Fig. 1 Development process of monoclonal antibody

一因となっていた。これは、従来の細胞融合法であるPEG法や電気融合法では、2種の細胞をランダムな混合状態で融合するため、目的とする2細胞が融合する事は極めて偶発的であり、同種の細胞や3個以上の細胞が融合したり、全く融合しない細胞が多数を占める場合が多いためである。

融合効率を高めるため、目的とする2細胞を融合する方法が近年いくつか報告されている。例えば、細胞が2個程度入る数百 $\mu\text{m}$ 四方の大きさのマイクロチャンバーの底にあけた微小な穴から吸引により2細胞を固定し融合する方法<sup>5)</sup> (ここでは、マイクロチャンバー法と称する)、レーザー光を細胞に照射し光トラッピングを利用して細胞を1つずつ搬送し融合する方法<sup>6)</sup> (ここでは、光トラッピング法と称する)、電極間に設置された絶縁膜上の微細孔での電界集中により生じる誘電泳動を利用して絶縁膜の両側から2細胞を微細孔に引き寄せて融合する方法<sup>7)~12)</sup> (ここでは、電界集中法と称する) 等がある。

我々は、上記電界集中法に関して東京大学大学院工学系研究科・鷺津正夫教授に技術指導をいただき、この技術を工業用に应用展開し、実用的な細胞数(100万個~1億個)を対象に、目的とする2細胞を融合する高効率細胞融合技術の開発に取り組んだ。その結果、従来の細胞融合法に比べ飛躍的に高い融合効率( $1.9 \times 10^{-3} \sim 1.4 \times 10^{-2}$ )を得る事ができた。

本報告では、誘電泳動の原理、高効率細胞融合技術と融合プロセス、融合効率の検証、細胞の大量処理に向けた対応に関して報告する。

## 2. 誘電泳動の原理

Fig. 2に誘電泳動の原理を示した。交流電界中に置かれた媒体中の細胞等の誘電体粒子には分極が生じ、正負の電荷が誘導される。ここでFig. 2に示すように、

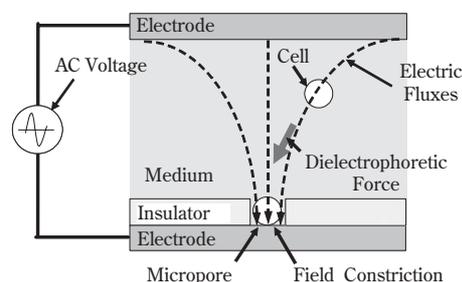


Fig. 2 Principle of dielectrophoresis

上部平板電極に対向する下部電極に形成した絶縁膜上の微細孔に、一様でない不均一な電界(電気力線)が与えられると、細胞は電界の集中する方向(電気力線が密な方向)、すなわち微細孔の方向へと引き寄せられる。これが誘電泳動である<sup>13)</sup>。一般に誘電泳動力は、粒子の体積、粒子と媒体の誘電率の差、不均一な電界の大きさの2乗に比例する。例えば、直径5~10 $\mu\text{m}$ 程度の細胞に対し、電界として周波数100kHz~3MHz、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5 \text{V/m}$ の交流電界を与えると、誘電泳動力が作用して細胞が電界の集中する方向に引き寄せられる。

本融合法の原理は、この誘電泳動の原理を利用して、上部平板電極に対向する下部電極に形成した絶縁膜上の微細孔に交流電界を集中させる事で細胞を引き寄せ、目的とする2細胞を接触させて融合する事を特徴としている。

なお、細胞に誘電泳動力を作用させる場合の媒体の電気伝導度は、媒体に過剰に電流が流れないように10~100 $\mu\text{S/cm}$ 程度が好ましい。

また、細胞が収縮したり膨張して破裂しないよう細胞の浸透圧を保つ必要がある事から、200mM~500mMの糖(マンニトールやシュクロース等)を加えた溶媒が一般に用いられる。

## 3. 細胞融合チャンバーの作製法

本融合法に用いる細胞融合チャンバーの作製には、近年注目が高まっている、いわゆる $\mu\text{TAS}$ (Micro Total Analysis System)や、Lab-on-a-chipなどと呼ばれるミクロンサイズの微小流路や微細孔を有したデバイスを作製する微細加工技術(フォトリソグラフィ技術)を利用している。

電極部材として片面にITOを成膜(膜厚150nm、抵抗率 $10 \Omega/\text{sq}$ )したガラス基板(70mm $\times$ 38mm $\times$ 厚さ1mm)上に、ネガ型のフォトレジスト(SU-8)をスピコートにより塗布(膜厚5 $\mu\text{m}$ )する。次に、微

細孔（直径 $8\mu\text{m}$ 、孔間隔 $20\mu\text{m}$ ）に対応するパターンを形成したガラス製フォトマスクを介してフォトレジストを紫外線露光し、続いて現像、ベークを行い、所定の微細孔に相当する凹部をレジストに形成する。ここで露光条件として、微細孔の底部に電極部材であるITOが露出する様に露光時間、現像時間を調整する。なお、ネガ型のフォトレジストとして用いたSU-8は、紫外線露光された部分が硬化しエポキシ系樹脂となり、微細孔を有する絶縁膜となる。

このようにして作製した電極基板を下側にし、細胞融合領域を確保する厚さ $1.5\text{mm}$ のシリコンゴム製の支持体を介し、さらにその上に電極基板（ITOを成膜した同ガラス基板）を配する事で細胞融合チャンバーを製作した。なお、シリコンゴムの厚みが $1.5\text{mm}$ である事から、本細胞融合チャンバーの電極間は $1.5\text{mm}$ となる。

製作した細胞融合チャンバーをFig. 3に示した。本細胞融合チャンバーは、ITOを成膜したガラス基板上のほぼ中央の $30\text{mm}\times 30\text{mm}$ のエリアに、孔径 $8.5\mu\text{m}$ 、孔間隔 $20\mu\text{m}$ 、孔数225万個（縦1500個 $\times$ 横1500個）

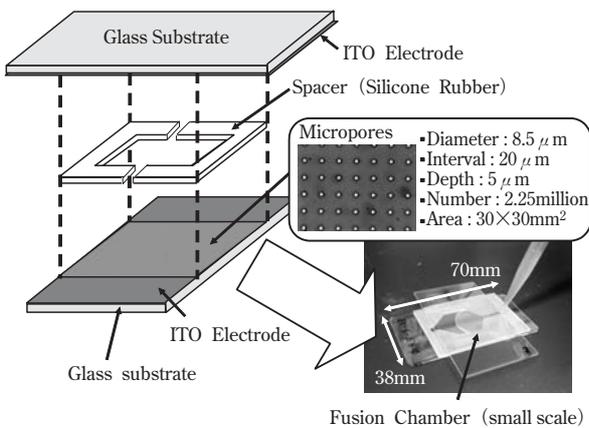


Fig. 3 Structure of fusion chamber having 2.25million micropores

の微細孔を有する絶縁膜が形成されている。

細胞操作・固定技術や融合効率を検討するために、本細胞融合チャンバーに市販の交流電源（エヌエフ回路設計ブロック製、WF1966）と市販の細胞融合電源（ネッパジーン製、LF101）を電極間に接続し実験装置を組み上げた。交流電源と細胞融合電源は、細胞融合チャンバーとの接続をスイッチにより切り換えられるようにした。

#### 4. 高効率細胞融合技術

##### [1] 目的とする2細胞の融合技術

Fig. 4に、微細孔に2種の細胞を固定した後に直流パルス電圧を印加して細胞融合するときの概念図と、その時の微細孔近傍の電界分布を示した。なお、微細孔近傍の電界分布は、市販の電界解析ソフト（Field Precision社製、TriComp）により計算した。

本融合法では、上部平板電極に対向する下部電極に形成した絶縁膜上の微細孔の中に平均直径の小さい細胞を固定し、その上に平均直径の大きい細胞を接触させて2細胞を融合することを特徴としている。一般に、電気融合では電界により細胞膜を一時的に破壊した後、膜破壊された部分で2細胞が結合し、細胞膜が再生される事で細胞融合する。細胞膜を破壊するのに必要な電界は、細胞直径に反比例するといわれており<sup>14)</sup>、平均直径の小さい細胞の膜破壊に必要な電界は、平均直径の大きい細胞の膜破壊に必要な電界よりも大きくする必要がある。本融合法が対象としているマウス脾臓細胞の平均直径は約 $6\mu\text{m}$ 、マウスミエローマ細胞の平均直径は約 $11\mu\text{m}$ である事から、マウス脾臓細胞の細胞膜を破壊するには、マウスミエローマ細胞よりも約1.8倍大きい電界をかける必要がある。

ここで、Fig. 4の右側に微細孔近傍の電界分布を示した。微細孔近傍の電界分布は、印加する電圧と電極

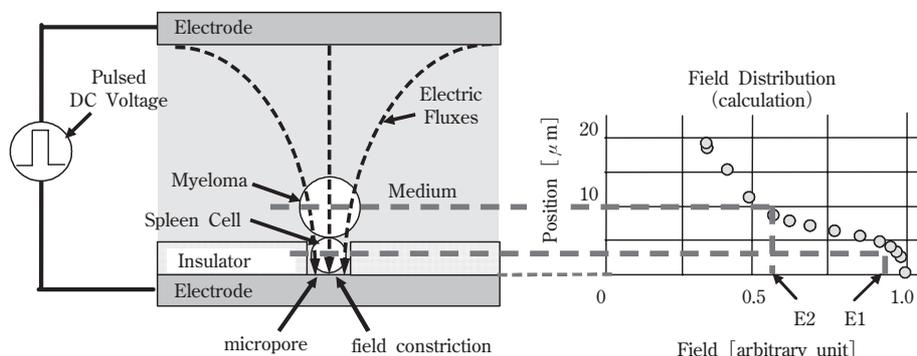


Fig. 4 Principle of highly efficient technique for cell fusion

間距離、媒体、絶縁膜の材質が一定の場合、微細孔形状（孔径、孔間隔、孔深さ）に依存するが、その電界の大きさは、微細孔内で最も大きく、微細孔から離れるに従って小さくなる。従って、平均直径の小さい細胞であるマウス脾臓細胞を微細孔の中に固定し、その上に平均直径の大きい細胞であるマウスミエローマ細胞を固定した場合、マウス脾臓細胞の中心にマウス脾臓細胞を膜破壊する電界（E1）が、マウスミエローマ細胞の中心にマウスミエローマ細胞を膜破壊する電界（E2）がかかる電界分布を目安に微細孔径、微細孔間隔、微細孔深さを概略設計した。更に、これらの設計値を少しずつ変更しながら細胞融合を繰り返し行い、可能な限り高い融合効率が得られる事を指標に、設計値を最適化した。その結果、300mMのマニトール水溶液の溶媒中で、電極間距離1.5mm、直流パルス電圧100Vを印加した場合の微細孔形状として、微細孔径 $8.5\mu\text{m}$ 、微細孔間隔 $20\mu\text{m}$ 、微細孔深さ $5\mu\text{m}$ に決定した。

なおこの場合、微細孔の中のマウス脾臓細胞と接触したマウスミエローマ細胞の上に、更に別の細胞が接触したとしても、その細胞近傍の電界は小さく細胞膜を破壊するには不十分であるため細胞融合は生じにくく、従って、本融合法では3個以上の細胞が融合する確率は低いと考えられる。

このように微細孔形状を最適化し、マウス脾臓細胞、マウスミエローマ細胞の順に逐次細胞を導入し微細孔に固定する事で、目的とする2細胞を融合する事が可能になった。

## [2] 融合プロセス

Fig. 5に、本融合プロセスの概念図を示した。

なお本融合法では、ほぼ1つの微細孔に1つの脾臓細胞を固定する事が好ましい。この条件として、融合容器に導入する脾臓細胞数が微細孔数とほぼ同じかそれ以下になるように脾臓細胞の濃度を調整しておく必要がある。一方、ミエローマ細胞は、微細孔に入った脾臓細胞との接触確率を高めるために、脾臓細胞数と等しいかそれ以上（例えば、微細孔数の1～8倍程度）になるようにミエローマ細胞の濃度を調整しておく必要がある。

## 5. 融合効率の検証

前述した実験装置を用いて、本融合法による融合効率を検証した。

抗体産生細胞には、抗原としてBCP（Blue Carrier

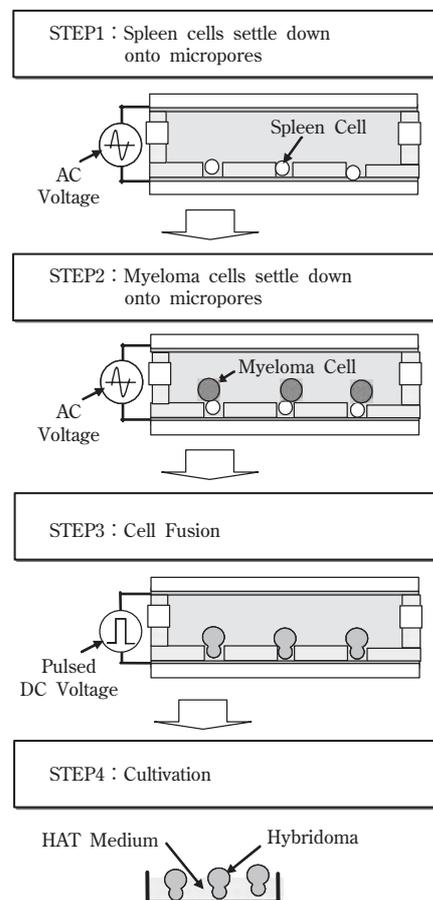


Fig. 5 Fusion process

Immunogenic Protein) を免疫したマウスの脾臓細胞を用い、マウスミエローマ細胞（SP2/0）と細胞融合させた。得られたハイブリドーマは、ハイブリドーマを選択培養するHAT培地で1週間培養し、生き残ったハイブリドーマのコロニー数をカウントした。なお融合効率は、ハイブリドーマのコロニー数を細胞融合チャンバーに入れたマウス脾臓細胞数で除算して求めた。

融合効率を検証する際、細胞を固定する交流電圧には10Vpp、3MHzの交流電圧を、融合電圧には100V、 $30\mu\text{s}$ の直流パルス電圧を、前述した細胞融合チャンバーの電極間（1.5mm）に印加した。また、細胞融合チャンバーの微細孔の形状は、前述した孔径、孔間隔、孔深さとした。

また溶媒として、300mMのマニトール水溶液に、1mg/mLのBSA（ウシ血清アルブミン）と、それぞれ0.1mMの $\text{CaCl}_2$ 及び $\text{MgCl}_2$ を添加した融合液を用いた。前述した様に、糖の種類と濃度は、細胞の浸透圧を保ち細胞の形状を維持に影響する。また融合液の添加物として、BSAやCaイオン（ $\text{CaCl}_2$ ）、Mgイオン（ $\text{MgCl}_2$ ）を適量添加により融合効率が向上するとい

われている<sup>15)</sup>。一般に、BSAには細胞膜保護作用があるといわれ、また、Caイオンは細胞膜の修復を促進する作用があり、MgイオンはCaイオンによる細胞膜の修復を高める作用があるといわれている。これらの融合液組成の条件も可能な限り高い融合効率が得られる事を指標に最適化した。

上記融合条件での融合効率の結果をTable. 1に示した。特にNo.1~No.4は、同じマウスを用いて、従来法であるPEG法 (No.1,2) と本融合法 (No.3,4) を同時に行い、融合効率を比較した結果である。なお、No.1~No.4の融合効率は、Fig. 6にも示した。

ここでPEG法での融合条件として、分子量1500のPEGが50%含有した無血清培地 (ERDF) に、マウス脾臓細胞とマウスミエローマ細胞 (SP2/0) を8 : 1で混合し融合した。

この結果から、本融合法は、脾臓細胞の処理量はPEG法より少ないが、PEG法よりも2桁程度高い融合効率を得た。またマウスは異なるものの、最大で $1.4 \times 10^{-2}$ の極めて高い融合効率を得、本融合法が従来法に比べて飛躍的に高い融合効率を得られる事がわかる。

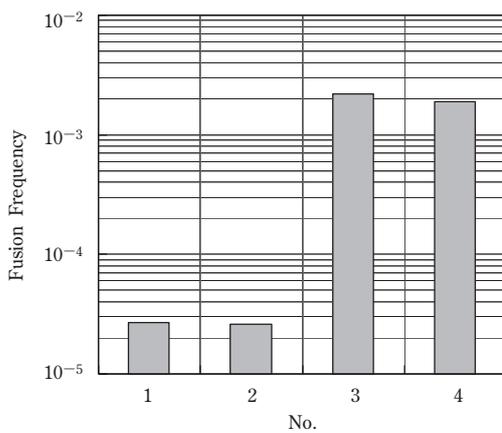


Fig. 6 Fusion frequencies of PEG fusion (No.1, 2) and highly efficient cell fusion (No.3, 4)

## 6. 細胞の大量処理に向けた対応

### [1] 細胞融合装置の構成

一般に、マウス1匹から約1億個の脾臓細胞が摘出されるため、1億個の細胞を1度に細胞融合処理できる事が望ましい。

本融合法では、処理できる細胞数は微細孔の数と等しい。また、最適化した微細孔形状 (孔径、孔間隔、孔深さ) のまま、細胞処理量を増やす必要があることから、細胞融合チャンバーの面積を大きくした大型融合チャンバーを作製した。

Fig. 7に大量処理に対応した細胞融合装置の概観を示した。細胞融合装置は、本融合法専用の細胞融合用電源と大型融合チャンバーから構成される。

大型融合チャンバーのサイズは、微細加工時や細胞融合時のハンドリングの容易性から、125mm×125mm×厚さ1mmサイズのガラス基板を用いた。ガラス基板のほぼ中央の100mm×100mmのエリアに前述した形状の微細孔を2,500万個 (縦5,000個×横5,000個) 形成した。従って、本大型融合チャンバー4枚で約1億個の細胞を細胞融合できる。なお、1枚の大型融合チャンバーの融合領域は、融合液中の細胞を均一

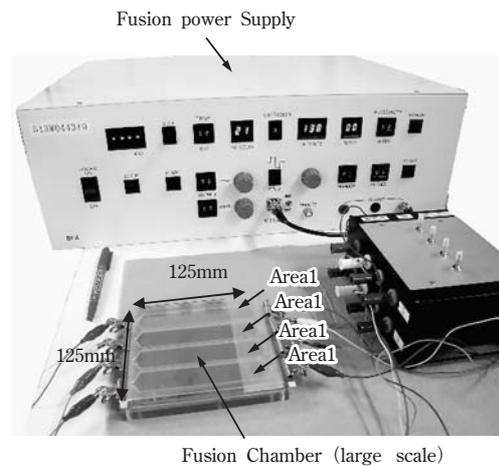


Fig. 7 Cell fusion system

Table. 1 Fusion frequencies of PEG fusion (No.1, 2) and highly efficient cell fusion (No.3-8)

No.	Spleen Cells	Myeloma Cells	Hybrid. Colonies	Fusion Frequency	Note (date)
1	$6.5 \times 10^6$	$8.1 \times 10^5$	176	$2.7 \times 10^{-5}$	mouseA, PEG fusion ('06/11/01)
2	$6.5 \times 10^6$	$8.1 \times 10^5$	170	$2.6 \times 10^{-5}$	mouseA, PEG fusion ('06/11/01)
3	$9.9 \times 10^5$	$3.9 \times 10^6$	2200	$2.2 \times 10^{-3}$	mouseA, highly efficient cell fusion ('06/11/01)
4	$9.9 \times 10^5$	$3.9 \times 10^6$	1900	$1.9 \times 10^{-3}$	mouseA, highly efficient cell fusion ('06/11/01)
5	$9.9 \times 10^5$	$7.6 \times 10^6$	7400	$7.5 \times 10^{-3}$	mouseB, highly efficient cell fusion ('07/06/21)
6	$9.9 \times 10^5$	$7.6 \times 10^6$	8400	$8.5 \times 10^{-3}$	mouseB, highly efficient cell fusion ('07/06/21)
7	$9.9 \times 10^5$	$3.0 \times 10^6$	13500	$1.4 \times 10^{-2}$	mouseC, highly efficient cell fusion ('07/08/08)
8	$9.9 \times 10^5$	$3.0 \times 10^6$	12900	$1.3 \times 10^{-2}$	mouseC, highly efficient cell fusion ('07/08/08)

Fusion Frequency=Hybrid. Colonies/Spleen Cells

に充填し易くするため長方形形状に4分割 (Area1~Area4) した。

また、電解質である融合液 (溶媒) の量の増加に伴う融合チャンバーの電気抵抗の変動に対応できるように、印加電圧をフィードバックし交流電圧を安定して出力できる機能を付加した専用の細胞融合用電源を製作した。

## [2] 細胞融合装置を用いた融合効率の検証

本細胞融合装置を用いて細胞融合した時の融合効率をTable. 2とFig. 8に示した。抗体産生細胞には、BCP免疫したマウスの脾臓細胞 (約2,300万個) を用い、マウスミエローマ細胞 (SP2/0) と融合した。

融合効率は、1枚の大型融合チャンバーを4分割した融合領域毎 (Area1~Area4) に示してある。融合領域毎の融合効率はほぼ同等であり、平均で $6.1 \times 10^{-3}$ の飛躍的に高い融合効率を得た。

なお、大型融合チャンバー1枚の細胞融合処理に要する時間は14分程度であった。本結果から、大型融合チャンバーにおいても飛躍的に高い融合効率を得られ、実用的な細胞数である約1億個の脾臓細胞を対象にした細胞融合を1時間以内で実施できる見込みを得た。

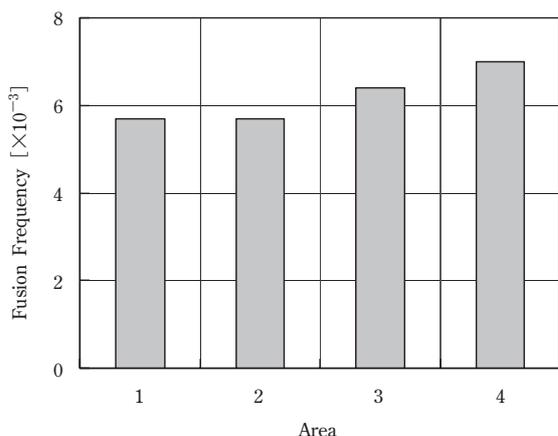


Fig. 8 Fusion frequencies of highly efficient cell fusion with large scale fusion chamber

Table. 2 Fusion frequencies of highly efficient cell fusion with large scale fusion chamber

Date : '07/06/08				
Area	Spleen Cells	Myeloma Cells	Hybrid. colonies	Fusion Frequency
1	$5.7 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$	32500	$5.7 \times 10^{-3}$
2	$5.7 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$	32100	$5.6 \times 10^{-3}$
3	$5.7 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$	36300	$6.4 \times 10^{-3}$
4	$5.7 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$	39500	$6.9 \times 10^{-3}$
Total : $2.3 \times 10^7$			Total : 140400	Average : $6.1 \times 10^{-3}$

## 7. まとめ

以上の様に、上部平板電極に対向する下部電極に形成した絶縁膜上の微細孔の中に、平均直径の小さい細胞を固定し、その上に平均直径の大きい細胞を接触させて2細胞を融合する高効率細胞融合技術を開発した。

また、本技術を用いた融合法に最適な融合条件を検討し、従来の細胞融合法に比べ飛躍的に高い融合効率 (最大で $1.4 \times 10^{-2}$ ) を得た。

更に、専用の細胞融合用電源の製作と細胞融合チャンバーの大型化により、マウス1匹から摘出される脾臓細胞 (1億個) の融合処理を1時間以内で実施できる見込みを得た。現在、具体的な開発ターゲットを設定し、本融合法による抗体開発を予定している。

最後に、本研究開発にあたり、基本技術である電界集中法<sup>7)~12)</sup> に関して技術的なご指導をいただいた、東京大学大学院工学系研究科・鷺津正夫教授に深く感謝を申し上げます。

## 参考文献

- 1) ㈱富士経済、2005バイオビジネス市場、178 (2005)
- 2) V. Krenn et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 6 (2), 47 (1995)
- 3) De St. Groth S.F., Scheidegger D., *J. Immunol. Methods*, 35, 1 (1980)
- 4) U. Zimmermann, G. Pilwat, H. Pohl, *J. Biol. Phys.*, 10, 43 (1982)
- 5) K. Sato, Y. Kawamura et al., *Sensors and Actuators*, A21-A23, 948 (1987)
- 6) 特開平3-297385
- 7) S. Masuda, M. Washizu et al., *IEEE Trans. on IA*, 25 (4), 732 (1989)
- 8) 特公平7-4218
- 9) O. Kurosawa, M. Washizu, et al., *microTAS2006*, 458 (2006)

- 10) K. Tsuda, M. Washizu, et al., *microTAS*2007, 1375 (2007)
- 11) Y. Kimura, M. Washizu, et al., *microTAS*2008, 540 (2008)
- 12) M. Gel, M. Washizu, et al., *microTAS*2008, 1968 (2008)
- 13) H. A. Pohl, *Dielectrophoresis*, 6 (1978)
- 14) U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Riemann, *Biophysical Journal*, 14, 881 (1974)
- 15) K. Ohnishi, J. Chiba, Y. Goto, T. Tokunaga, *J. Immunol. Methods*, 100, 181 (1987)

## 著 者

氏名	二見 達	氏名	丸山 高廣	氏名	山中 麻帆	氏名	森本 篤史
	Toru FUTAMI		Takahiro MARUYAMA		Maho YAMANAKA		Atsushi MORIMOTO
所属	東京研究センター 東京研究所 新材料無機分野 主席研究員	所属	東京研究センター 東京研究所 新材料無機分野 主任研究員	所属	東京研究センター 東京研究所 新材料無機分野 副主任研究員	所属	東京研究センター 東京研究所 新材料無機分野 副主任研究員

氏名 松丸 慶太郎  
Keitaro MATSUMARU

所属 東京研究センター  
東京研究所  
新材料無機分野  
副主任研究員