

モノクローナル抗体作製における電気的融合法の活用

モノクローナル抗体の作製においては、B細胞とミエローマの融合細胞を上手に作る事が重要である。細胞融合にはポリエチレングリコールを用いた方法(PEG法)以外に電気的融合法が知られている。この電気的融合法を従来のPEG法と比較するため、マウスならびにラットの腸骨リンパ節法により得られた細胞を用いて融合効率を確かめた。抗原としてオボアルブミンを用いて、マウスまたはラットの尾根部に抗原エマルジョンを1回注射し、17日後に腸骨リンパ節を取り出し、凍結保存した。この凍結保存した細胞を解凍後、それぞれの方法でSP2ミエローマ細胞との融合を行った。96穴培養プレートに播かれた融合細胞は8日後または9日後にエライザを行って陽性ウエルの数を調べた。得られた結果は効率、確実性という点では電気的融合法が優れ、PEG法の約3倍(マウス)から6倍(ラット)の効率であった。

腸骨リンパ節の準備

マウス腸骨リンパ節の保存：6匹の8週齢雌BALB/cマウス(BALB/cAnNCrIj)日本チャールス・リバー)に、オボアルブミン(Calbiochem 32467)を抗原としてフロイントコンプリートアジュバント(FCA)とともにエマルジョンを作製し、一回尾根部に注射した。マウス1匹あたり50 μ gの抗原を注射した。抗原投与17日後にマウスの腸骨リンパ節を取り出した。6匹からの腸骨リンパ節を一緒にしてステンレスメッシュを通し、6等分して凍結し(細胞数は約 2×10^7 個/凍結チューブ)、 -80 のディープフリーザーに保存した。

ラット腸骨リンパ節の保存：4匹の10週齢雌WKYラット(WKY/NCrIj、日本チャールス・リバー)に、オボアルブミン(Sigma A7641)を抗原としてフロイントコンプリートアジュバント(FCA)とともにエマルジョンを作製し、一回尾根部に注射した。ラット1匹あたり100 μ gの抗原を注射した。抗原投与17日後に4匹のラットから腸骨リンパ節を取り出し、ステンレスメッシュを通し、すべての細胞をプールしたものを21本に分注凍結し(細胞数は 2×10^7 個/凍結チューブ)、 -80 のディープフリーザーに保存した。

細胞融合

・PEG法 通常のPEG法により行った。すなわち1)無血清のDMEM培地で洗ったリンパ球とSP2ミエローマ細胞(SP2/0-Ag14細胞)を2:1の割合になるように50ml用プラスチック製遠沈管に入れ混ぜ合わせる。2)遠心して沈査にし、培地を吸引除去した。3)37の湯煎で2分間温め、さらに2分間遠沈管を軽く手ではじいて沈査をほぐす(タッピング)。

モノクローナル抗体作製における電気的融合法の活用
(佐渡義一、重井医学研究所免疫部門)

4) 遠沈管の先端を円を描くようにゆっくり振り続けながらあらかじめ 37℃ に温めておいた 50%のPEG4000 (メルク) 1ml を 1 分間かけて滴下し (図 1) その後 2 分間ゆっくり振り続ける。5) 次に、9mlのDMEM培地を注射器にとり、最初の 3 分間で 3mlを、次の 3 分間で 6mlをゆっくり攪拌しながら 加えてPEGを希釈する。6) 遠心後 10%BM-Condimed H1 を加えたHAT培地で 96 穴培養プレート (ファルコン 353075) 4 枚にまいて、細胞融合 5 日後に培地を全量交換し、9 日後にヌンクイムノプレート (442404) を用いたエライザスクリーニングして陽性ウエルの数を調べた。陽性ウエルの判定はエライザプレートのオルトフェニレンジアミン発色が吸光度 0.3 以上のものを陽性ウエルとした。このときの陰性ウエルの吸光度(ベースライン)は 0.2 以下であった。



図 1 . PEG 法による細胞融合 . リンパ球と SP2 ミエローマ細胞の沈査に PEG 溶液を加えているところ .

・電気的融合法 電気的融合法はスクエア式電気融合装置LF201 (株式会社ネッパジー)を用いて行った。電極はMSスタンド型チャンバー白金電極 (CUY497P2、電極間隔 2 mm 電極サイズ 80 x 2 x 5 mm) を用いた (図 1) 。電気融合用電極液は 0.3 Mマンニトール、0.1 mM塩化カルシウム、0.1 mM塩化マグネシウム溶液を使用した。1) 15 ml用プラスチック製遠沈管にリンパ球とSP2 ミエローマ細胞が 1:1 の割合になるように融合用電極液に懸濁し、遠心して上清を吸引除去した。細胞沈査に融合用電極液を 2.4 ml加えて細胞懸濁液を作った。2) 細胞懸濁液を 0.8 mlずつ 3 回にわけて、電気パルスをかけた。細胞を接着 (パールチェーンを形成、図 2) させるための交流周波数は 1.0 MHz、交流電圧は 30 V、20 秒間

モノクローナル抗体作製における電気的融合法の活用
(佐渡義一、重井医学研究所免疫部門)

行い、細胞融合するための直流パルス電圧は 350 V、パルス幅は 30 μ 秒、パルス間隔は 0.5 秒でパルスは 3 回かけた。3) 融合し終えた細胞液は 1000 回転 5 分間の遠心後、細胞沈査に 10%BM-Condimed H1 を添加したHAT培地を加えて攪拌し、96 穴培養プレート 4 枚にまいた。



図2 . 電気融合用チャンバーを斜め上から見たところ . 中央の溝が白金電極間のスペースでここに細胞を入れる。上部に接続用の白金線が 2 本見える。ここに電極線をつなぎ電流を流す。

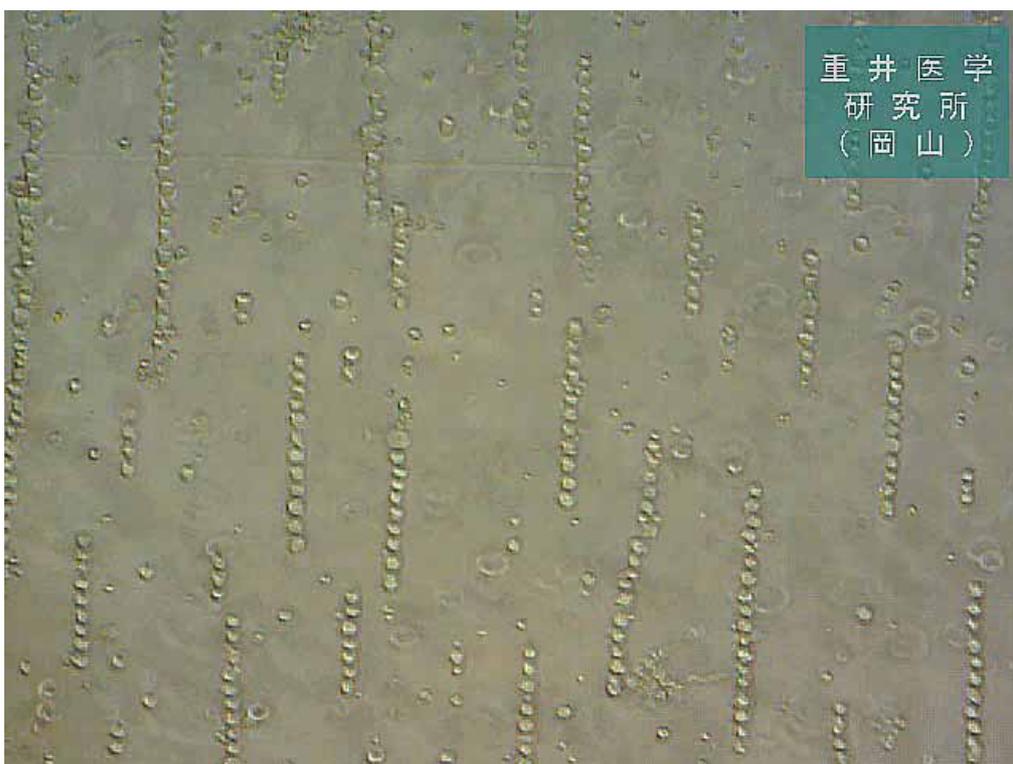


図3 . 電気的細胞融合時のパールチェーン . 大きい細胞が SP2 ミエローマ細胞で、小さい細胞がリンパ球である。このように交流電流で細胞を接着させ、ここに直流パルス電流を流し細胞を融合させる。

モノクローナル抗体作製における電気的融合法の活用
(佐渡義一、重井医学研究所免疫部門)

マウス腸骨リンパ節細胞を用いたPEG法と電気的融合法の比較

凍結チューブの細胞を解凍して（約 2×10^7 個）PEG法または電気的融合法で融合した場合を図 1 に示した。PEG法では 3 回のうち 1 回に 166 個のウエルが陽性になるというPEG法としては大変に良い融合結果が得られた。このようなすばらしい融合が時々あるがいつもという訳にはいかないのがPEG法である。PEG法で得られた陽性ウエルの平均は 97 であるが、3 回の中央値の 66 の方が、実験者の感覚である。

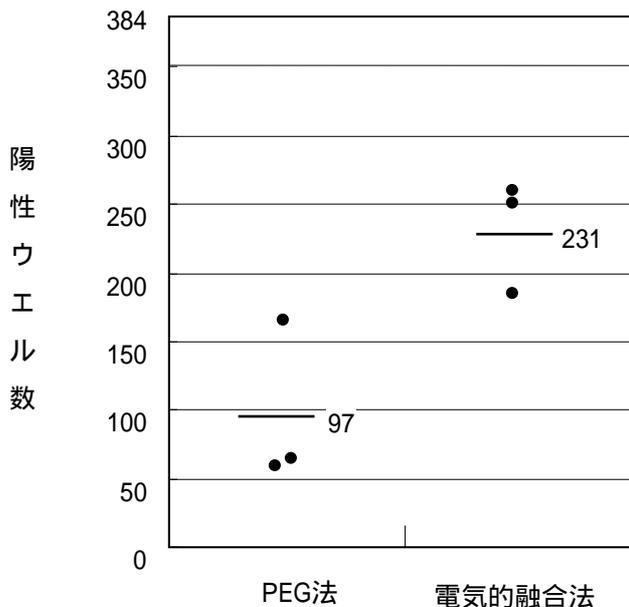


図 4 . マウス腸骨リンパ節細胞を用いた PEG 法と電気的融合法の比較 . 一回の細胞融合の細胞を 4 枚の 96 穴培養プレートにまき、8 から 9 日後にエライザ法で陽性ウエルを調べたもの。バーは平均値 .

ラット腸骨リンパ節細胞を用いたPEG法と電気的融合法の比較

典型的なエライザプレートの状態を図 5 に示した。また、図 6 には繰り返し行った場合の陽性ウエルの数を図で示した。

PEG法と電気的融合法の比較に関する考察

PEG 法においては、PEG の分子量、細胞に加える量、添加方法、希釈方法などの融合条件は研究室により異なり、融合効率は研究室ごとに異なっているように思われる。特に、遠心してパックした細胞塊をタッピングにより適度の大きさにほぐす過程があり、この過程は融合効率を大きく関与していると考えられる。この過程があるために同じ研究室内でも個人差があり、同一実験者においても実験ごとのばらつきが起きると考えられる。

モノクローナル抗体作製における電気的融合法の活用
(佐渡義一、重井医学研究所免疫部門)

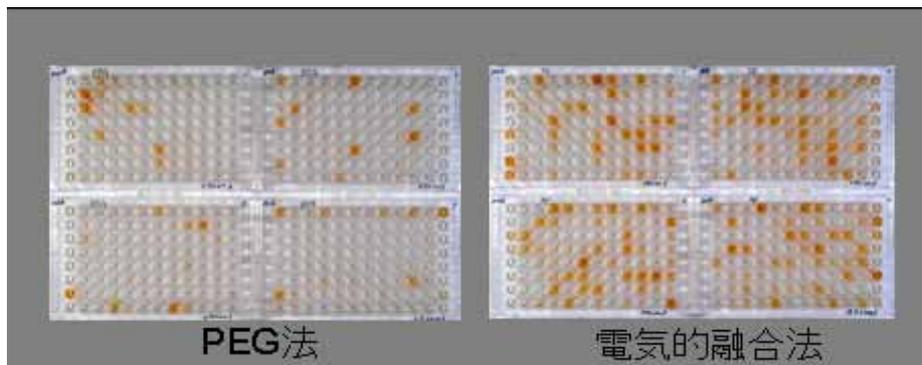


図5．ラット腸骨リンパ節細胞を用いた PEG 法、電気的融合法の比較． 融合後 8 日または 9 日後の 4 枚の 96 穴培養プレートの上清を解析したエライザプレート．

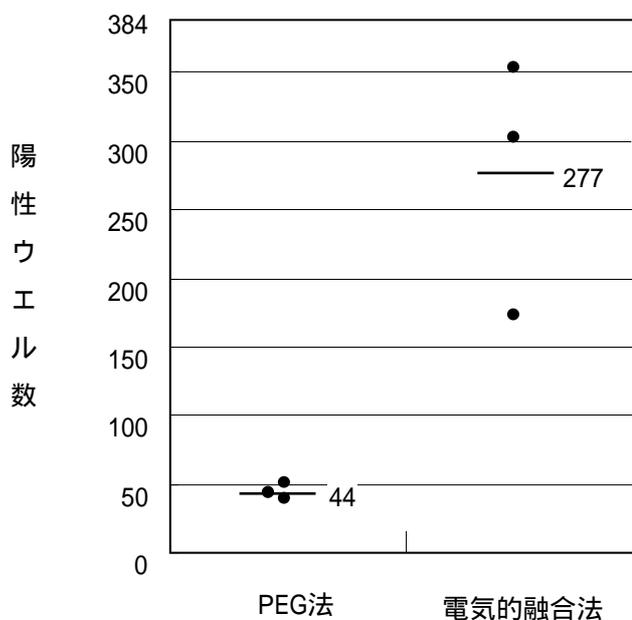


図6．ラット腸骨リンパ節細胞を用いた PEG 法と電気的融合法の比較． 一回の細胞融合の細胞を 4 枚の 96 穴培養プレートにまき、8 から 9 日後にエライザ法で陽性ウエルを調べたもの。バーは平均値．

電気的融合法の原理は白金板を 2 枚平行に貼り付けた電極間にリンパ球とミエロームの細胞懸濁液を入れ、電極間に交流電圧を架けることにより、電極に垂直に細胞が数珠状につながったものが多数形成される（パールチェーンの形成）。この状態で直流パルス電圧を加えると細胞膜の電気伝導度が瞬間的に低下し、脂質二重層により構成される細胞膜の可

モノクローナル抗体作製における電気的融合法の活用
(佐渡義一、重井医学研究所免疫部門)

逆的乱れ、隣あう細胞 2 個の細胞膜が融合すると、その結果細胞融合が起こるものである。リンパ球とミエローマの混合比率は用いる抗原や免疫動物により、最適比は同じではないかもしれないが、ラットとマウスではいずれも 1 : 1 で十分良い結果が得られた。PEG 法に比べれば、少量のリンパ球でも細胞融合ができ、また操作時間も短時間ですむ。融合用電極液も準備しやすく安価である。融合した細胞に与えるダメージが少ないようでハイブリドーマの成長が早い。従って陽性ウエルのエライザスクリーニングも PEG 法に比べて 1 日早く行うことになった。融合の操作が簡単なため融合技術に個人差は少ないと考えられる。一度細胞融合操作および電圧の条件等を最適化しておけば同じ動物種のリンパ球であればいつも同じ条件で細胞融合が行える。一定条件で融合させれば結果にばらつきが少ない。細胞融合も短時間で細胞に与えるダメージも少なくしかも融合効率が一番高い。電源および電極が高価であるということはこの方法の特徴である。この点に関しては機能をモノクローナル抗体の融合細胞の作製に限定するなどしてでも、低価格の融合装置の開発が望まれる。

マウス腸骨リンパ節法では腸骨リンパ節の細胞数が少ないことから、また、陽性ウエル数のある程度（通常 50 から 100 ウエル程度）確保したいことから、2 匹のマウス由来の腸骨リンパ節細胞をプールして 1 回の PEG 法に使用していた。しかし、電気的融合法を用いることにより、1 匹分の腸骨リンパ節細胞でも一回の電気パルスをかけるのに十分な細胞数が得られ、しかも、陽性ウエルも PEG 法の約 3 倍程度は期待できることから、マウス 1 匹でも細胞融合が可能であるといえる。電気的融合法による効率の上昇は使用するマウスの数を減らすことも可能にし、さらに、使用する必要抗原量も減らすことができる。抗原量が少ない場合は大いに助かる。

また、マウス腸骨リンパ節法においては IgG1 と IgG2a と IgG2b のサブクラスの比率はおおよそ 8 : 1 : 1 である。したがって IgG2a、IgG2b のサブクラスのモノクローナル抗体を得たい場合は、電気的融合法は強力な助けとなる。著者らは IV 型コラーゲンの鎖を識別するマウス抗体の作製を行ったことがあるが電気的融合法により多くのこれらのサブクラス抗体を得ている。すこし大げさに感じられるかもしれないが、目的のクローンがかろうじて得られた場合と多くの候補クローンから選びぬかれた複数のクローンが得られた場合はクローンの質が異なるように思う。複数のクローンを確立することにより、抗体の特異性を細かな点までチェックすることができ、それらの中から最善の染色態度示すものを選び出すことにより染色の強度と信頼性を高めることが可能である。

腸骨リンパ節法に電気的融合を用いる方法はモノクローナル抗体の作製をさらに容易に、さらに確実にするものである。モノクローナル抗体の作製は誰にでもできる技術になった。あなたも是非チャレンジしてみてください。(佐渡義一、重井医学研究所免疫部門)