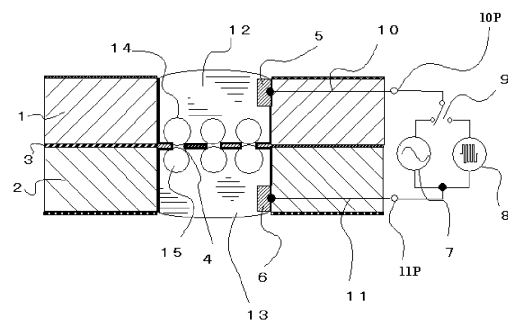




【特許請求の範囲】

【請求項 1】

融合させようとする2種類の細胞のいずれの直径よりも小さい小孔（オリフィス）を持つ絶縁性薄膜（以下オリフィスシートと呼ぶ）と、これを挟むようにおかれる取り外し可能な2つの貫通孔を持つ絶縁板と、該貫通孔内それぞれに設置された電極、およびその電極を励起するための電源からなり、各々の貫通孔内部へ融合させようとする各々の細胞懸濁液を入れ、電極に高周波電圧を印加した時のオリフィスへの電界集中を利用して細胞を誘電泳動力によりオリフィスへと引き寄せ、オリフィス上にて2種類の細胞を対合させた後に、パルス電圧または高周波変調パルス電圧を印加し、それぞれの細胞を融合し、その後、絶縁板を取り外し、オリフィスをはさんで2つの球を連結したような形状となる融合細胞を、オリフィスプレートともに取り出すことを特長とする電気細胞融合装置。

10

【請求項 2】

上記請求項1項記載の貫通孔を持つ絶縁板が、貫通孔内面が親水性で、それ以外の部分が疎水性であることを特長とする電気細胞融合装置。

【請求項 3】

上記請求項1項記載の融合装置において、上側となった貫通孔内の細胞を重力で沈降させることにより補助して誘電泳動によりオリフィスへ吸着した後に、上下を反転させ、反対側の細胞を重力で沈降させることにより補助して誘電泳動によりオリフィスへ吸着させることにより、オリフィス部分に細胞を対合させることを目的とした、上下反転可能な構造を持つ電気細胞融合装置。

20

【請求項 4】

上記請求項1項記載のオリフィスシートが、厚さ10 μ m以下の変形可能な軟質ゴム製で形成されており、融合後の細胞の分裂増殖の時に、オリフィスシートが変形または破壊されることにより、分裂増殖した細胞がオリフィスシートから抜け出せることを特長とする電気細胞融合装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

大量並列を可能とする高収率な電気細胞融合装置に関する。

30

【背景技術】

【0002】

従来の細胞融合技術には、ウイルスを利用するもの、PEG等の薬剤を利用するものなどがあったが、これらはウイルスや薬剤の細胞に対する毒性に問題がある。これと異なり、電気細胞融合は、純粹に物理的手段によるもので、細胞毒性などの問題点はないが、従来よりその収率は低い（たとえば1万分の1）とされていた。これは、従来の電気細胞融合法が、細胞懸濁液に高周波電界を印加して細胞列を形成させ、そこにパルス電圧を印加することにより細胞接触点での細胞膜を融合させることにより細胞融合を行うものであるが、細胞懸濁液中の各々の細胞接触点に融合に適度な制御された電圧を印加する手段がなかったことに由来する。

40

【0003】

これに対し、下記非特許文献1、非特許文献2は、細胞径と同程度以下の大きさを持つオリフィスを挟んで2つの細胞を対合させて電気融合操作を行えば、オリフィスの作る電界集中により、2つの細胞膜の接触点近傍のみに制御された大きさの膜電圧を印加できることを理論的に示し、また下記非特許文献3には、微細加工技術を用いて作製された流体回路内におかれたオリフィスを用いて、誘電泳動を用いて細胞をオリフィスを挟んで配置した後にパルス電圧を印加すれば、90%以上の収率で融合操作が行えることが実験的に実証されている。また、このようなオリフィスをアレイ状に並べれば、大量並列の細胞融合を同時に行うことができるであろうことは容易に推考できる。

50

しかしながら，この手法には以下のような問題点がある。

【 0 0 0 4 】

1. 誘電泳動力が及ぶ範囲はオリフィス径程度なので，オリフィスのごく近傍にいる細胞しか引き寄せられない。従って，オリフィスアレイにいかにか細胞を収率よく配列するかが大きな問題になる。

【 0 0 0 5 】

2. 細胞は通常の培養液中では沈降するので，水平に置いたオリフィスシートの上側に細胞を寄せることは容易である。しかしながら，オリフィスシートの下側におかれた細胞は沈降によりオリフィスシートから遠ざかってしまう。オリフィスシートの下側を比重の大きい溶液で満たして細胞を浮遊させればオリフィスシートに寄せられるが，溶液の密度の調整に用いるFicollなどの分子は細胞毒性や高い粘性が問題になる。

10

【 0 0 0 6 】

3. 流体回路を引き回すと，デッドボリウムが大きく，すなわち入れた細胞すべてを有効に利用できない。

【 0 0 0 7 】

4. 流体回路中で得た融合産物を，融合したものとしていないものを選び分けて取り出すのが容易でない。

【非特許文献1】[1] 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. vol.40, p.1831-1837 (2007)

20

【非特許文献2】[2] Masao Washizu and Boonchai Techaumnat: "Cell Membrane Voltage During Electrical Cell Fusion Calculated by Re-expansion Method", J. Electrostatics vol.65, p.555-561 (2007)

【非特許文献3】[3] Kinya Tsuda, Murat Gel, Hidehiro Oana, Boonchai Techaumnat, Hidetoshi Kotera and Masao Washizu: "Very high yield electro cell-fusion based on field constriction at an microorifice", μ -TAS 2007, p.1375-1377 (2007)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

本発明は，大量並列を可能とする高収率な電気細胞融合装置を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

本発明においては，融合装置自体を上下反転可能な構造とし，重力沈降により補助することにより誘電泳動による細胞のオリフィスへの吸引を容易にし，かつ，細胞径より小さいオリフィスを用いることにより，ここを挟んで融合された細胞を幾何学的に拘束してオリフィスシートごとに取り出すことにより，融合した細胞のみを得る。

「作用」

本発明によれば，シリコンゴム等で形成されるオリフィスアレイ両面へ融合したい各々の細胞を大量に固定し，かつ融合操作後に，融合した細胞のみを容易に取り出すことができる。

40

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明によれば，貴重な細胞試料を有効に利用し，高収率な電気細胞融合を大量並列で行う装置が実現できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 1 】

50

融合させようとする2種類の細胞のいずれの直径よりも小さい小孔（オリフィス）を持つ絶縁性薄膜（以下オリフィスシートと呼ぶ）と、これを挟むようにおかれる取り外し可能な2つの貫通孔であって、細胞懸濁液を収容するチャンバーを形成する部分を持つ絶縁板と、該貫通孔内それぞれに設置された電極、およびその電極を励起するための電源から構成され、細胞を含む溶液を上下の貫通孔内に好ましくは、表面張力等によって、保持され、逆さにしてもこぼれ落ちない状態で、オリフィスシートを挟んで形成されるチャンバーにそれぞれ融合用細胞を含む溶液が保持された状態で、電氣的に細胞を融合させるチップ状の形成可能な細胞融合装置を実現し得る。

【実施例 1】

10

【0012】

図1は、本発明による細胞融合の、融合操作直前の模式図である。このような配置にすれば、電界集中を利用して高い収率で細胞融合が行えることは、非特許文献[1]～[3]に記述の通りである。

これを実現するための本発明の実施例を以下に説明する。

1. 厚さ2 μm 程度のやわらかいシリコンゴムでできたオリフィスシート3の両側に、貫通孔を持つ絶縁性の板2枚（上部板1、下部板2）を、あとで取り外せるようにクランプして固定する。貫通孔4は、細胞をロードするためのチャンバーとしての機能を持つ。貫通孔4を持つ上部板1、下部板2の上面を疎水性、内側面およびオリフィスシート3を親水性にする。これは、例えば、ガラス板に貫通孔を加工し、その上面に疎水性コーティングを施すことにより得られる。貫通孔4内部の内側面の任意の位置にそれぞれ電極5及び6を設ける。

20

【0013】

2. まず底面がオリフィスシート3で周囲を上部板1で囲まれて形成された上部チャンバーに細胞14の懸濁液12を満たす。オリフィスシート3が親水性なので気泡が入ることなく、オリフィス内部まで溶液が入る。貫通孔4を持つ板の上面は疎水性であるので、ここに懸濁液がしみ出すことはない。

【0014】

3. デバイスを上下反転する。チャンバー径が2ないし3mm程度なら、表面張力により溶液がこぼれることはないが、必要があれば上からカバーガラス等で覆ってもよい。

30

4. 底面がオリフィスシート3で周囲を下部板2で囲まれて形成された下部チャンバー上から細胞15の懸濁液13を入れる。

5. 上側チャンバーの細胞14がオリフィスプレート3上に沈んでくるので、スイッチ9を切り換えて交流電圧発生部7より交流電圧を電気リード線10、11を介して電極5、6へ印加し、誘電泳動によりオリフィス上へと引き込む。十分に細胞の密度が高ければほとんどすべてのオリフィスプレート3の貫通孔4に細胞が固定される。なお、細胞の直径を5 μm 、比重を1.2とすると、沈降速度は10 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 程度であるので、チャンバー深さが1mmであれば沈降に要する時間は100秒程度である。

【0015】

40

6. デバイスを再び上下反転する。誘電泳動力は十分に強いので、前段階でオリフィスプレート3に固定された細胞15はオリフィスプレート3から脱離することはない。上側チャンバーの細胞15が沈んできて誘電泳動力によりオリフィスプレート3に固定され、すでに固定されている細胞14とオリフィスプレート3を挟んで対合する。

【0016】

7. スwitch 9を切り換えてパルス発生部8よりパルスを印加すると、オリフィスプレート3を挟んで接触している細胞が1:1で融合する。オリフィスプレート3外に存在する剰余の細胞は、オリフィスから遠くなると電界が極めて弱くなるため、融合しない。

8. チャンバーを外し、オリフィスプレート3を取り出し、軽く洗浄する。融合した細

50

胞はオリフィスをぬけられないので、オリフィスプレート3とともに回収される。オリフィスプレート3は薄いシリコンゴム製なので細胞が分裂等の運動を起こせば、シートの変形または破壊により、オリフィスシートから抜け出すことができる。

【0017】

9. 以上により、1:1で融合した細胞のみを取り出せる。

10. 以上の過程から明らかなように、試料の細胞懸濁液は、貫通孔を満たすだけの体積があればよく、そこに含まれる細胞は融合に有効に利用されることになる。

なお、オリフィスの貫通孔間の距離、ピッチは細胞径以上であればよく、これをオリフィスシート上に2次元状に配列することにより、大量並列の融合が可能であることはいうまでもない。

10

【産業上の利用可能性】

【0018】

本発明は、遺伝子操作等で使用される細胞融合において、大量並列融合を可能とする高収率な電気細胞融合装置として利用される。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】本発明の一実施例を示す図。

【図2】本発明の一実施例を示す図。

20

【図3】本発明の一実施例を説明する図。

【図4】本発明の一実施例を説明する図。

【図5】本発明の一実施例を説明する図。

【図6】本発明の一実施例を説明する図。

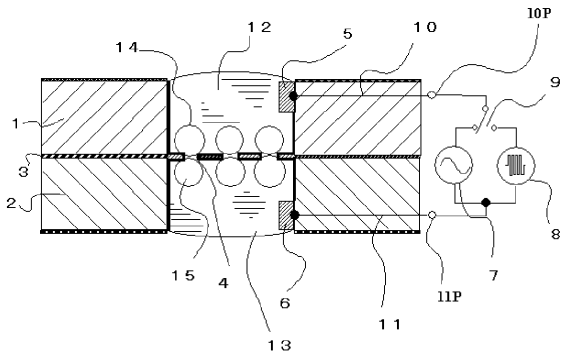
【符号の説明】

【0020】

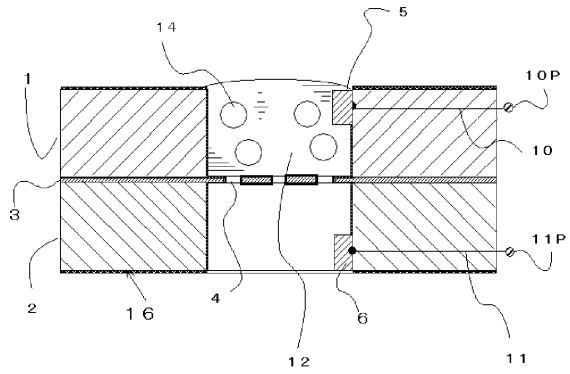
- 1 上部板
- 2 下部板
- 3 オリフィスシート
- 4 貫通孔

30

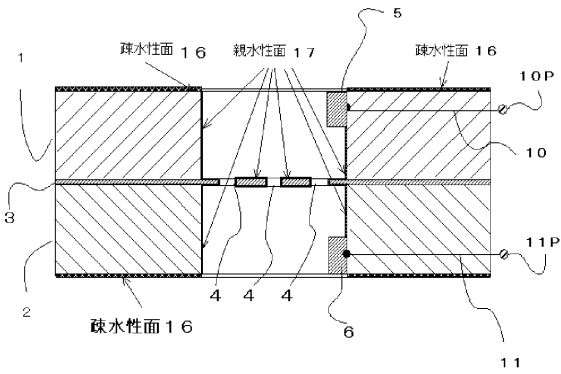
【図 1】



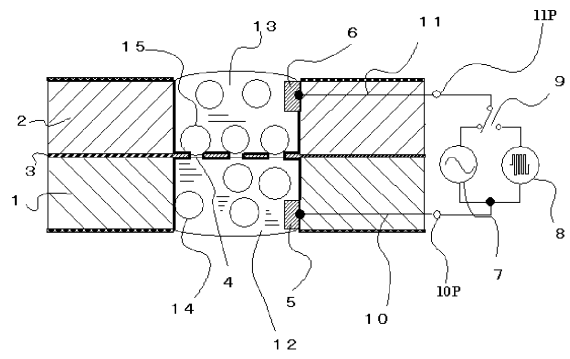
【図 3】



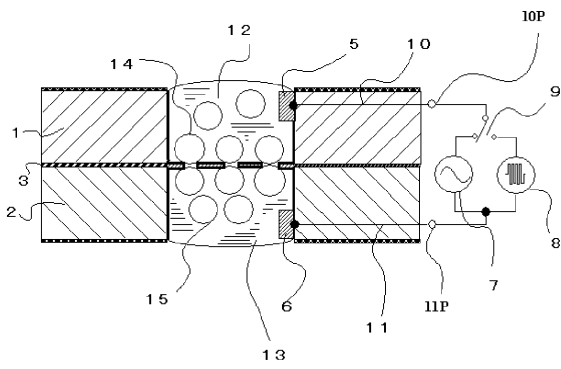
【図 2】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

