

## 雑種細胞の効率的操作・融合法

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	内田, 憲孝 高辻, 正基
巻/号	13巻5号
掲載ページ	p. 23-28
発行年月	1990年5月

# 雑種細胞の効率的操作・融合法

— 1 対 1 細胞融合法の開発 —

内田 憲孝\*・高辻 正基\*\*

高等植物の有力な品種改良技術の一つとしての細胞融合技術は、単に物珍しい植物を創る段階から、実用的な新品種の作成へと移行しつつある。細胞融合技術を真に実用化する中で、融合したプロトプラストを植物体まで再分化できることが、何と言っても重要なステップではあるが、もう一つの重要なステップとして、雑種細胞を純度良く効率的に生産することが挙げられる。この点で従来は、融合処理した細胞群の中から、雑種細胞を選抜するという手法がおもに用いられてきた。我々は、融合させたい細胞のペアを予め形成させ融合処理することで、選抜なしに雑種細胞を生産するという方法を提案し、その装置の開発を行ってきたので、これについて紹介したい。

## 1. はじめに

一般に広く行われている細胞融合技術では、目的とする雑種細胞のほかに、多重融合細胞や同種で融合した細胞等の種々のタイプの融合細胞が生じる。このため、この中から雑種細胞を選抜しなければならず、「汎用的で効率的な雑種細胞の選抜方法」を確立することが望まれている。雑種細胞を純度良く効率的に生産する手段の一つとして、従来のように細胞を集団的に融合させた後に選抜するのではなく、図1に示すように個別に大量に融合させる1対1の細胞融合方式が考えられる。

ここでは、細胞融合技術開発プロジェクトで取り組んできた1対1細胞融合装置の開発について紹介する。これは、シリコンウエハー上に多数作られた微小容器の中で、プロトプラスト

を個別に同時に融合処理することによって、雑種細胞を純度良く効率的に生産する装置である。

## 2. マイクロセル

マイクロセルとは、プロトプラスト対を形成させるために用いる微小容器のことで、シリコンウエハー上に、半導体微細加工技術（マイクロマシニング）を利用して製作したものである。そのSEM像を写真1に示す。マイクロセルは、底部にスリット状のフィルターを有する、すりばち状の形態をしており、直径3インチのシリコンウエハーに36×44の2次元マトリクス状に1584個設けてある。

## 3. マイクロセルへのプロトプラストの注入方法

プロトプラストをマイクロセルに注入するためには、個々のプロトプラストをできるだけ正

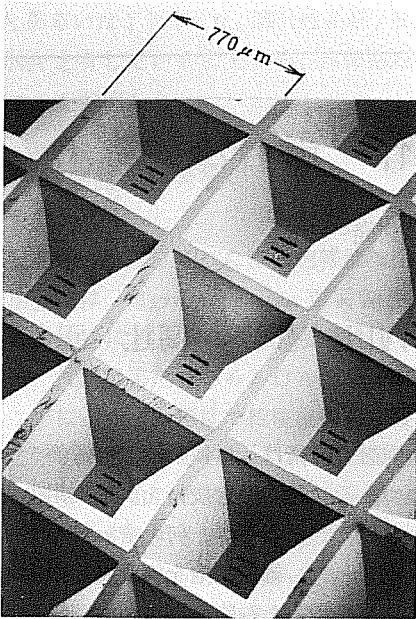


写真1 マイクロセル

確かつ高速にハンドリングする技術を確立しなければならぬ。プロトプラストを個別に操作する方法としては、電界を利用する方法と、流体の流れを利用する方法が考えられる。電界による操作は、精度には優れるが、移動速度が遅いためプロトプラストの大量処理には向かない。そこで流体の流れを利用したプロトプラストの操作法を取り上げ、装置を開発することにした。

### (1) 装置の基本原則

流体を利用してマイクロセル内にプロトプラストを1個ずつ注入する装置の基本原則を図2に示す。この装置では、セルソータや血球カウンターで用いられているフローセル技術を利用している。次にこの装置の動作について簡単に述べる。試料液中に含まれるプロトプラストは、フローセルによって1次元状に整列させられる。レーザー光によってフローセル内を流れるプロトプラストを感知したら、タイミングを合わせてマイクロセルを移動させる。フローセルから流れ出たプロトプラストは、マイクロセル底部のスリットからの緩い吸引によってマイクロセル内に保持される。この時のスリットからの吸

引力は、水頭差によるサイホンの原理によって得ている。このようにして、一種類目のプロトプラストを注入した後、試料液を交換して二種類目のプロトプラストを同様に注入し、マイクロセル内にプロトプラスト対を形成する。

全体の実験装置の設計試作に先立ち、流体部分の主要な構成要素を20~30倍に拡大した簡単なモデル実験装置を組み、注入のための流体系の構造及び流速などの流体力学的条件を検討した。この装置で最も重要な点の一つとして、マイクロセルを移動したときすでに注入が完了している細胞が試料ノズルから吹き出る流れで、セルから飛散することを防止することである。モデル実験の結果、細胞が飛び出すことなくマイクロセルへ注入できる見通しが得られた。そこで、図2に示すような細胞注入実験機を設計試作し、実際の細胞の注入条件について検討を行った。

### (2) プロトプラストの注入条件

本装置において、プロトプラストをマイクロセルに注入するためには、次の2つの条件を同時に満たすことが必要である。

①スリットからの吸引力によって、プロトプラストが破壊したりスリットから抜け落ちたりしないプロトプラストの保持条件

②プロトプラストを含む試料液がマイクロセルからあふれないという流体的な条件である。

そこで実際にサラダナの葉肉プロトプラストを用いて、マイクロセルへのプロトプラストの注入条件について検討した。

#### ① プロトプラストの保持条件

あらかじめマイクロセル内にプロトプラストを注入しておき、スリット下面からの吸引力を徐々に上げ、プロトプラストが破壊したりスリットから抜け落ちる瞬間の吸引力を測定した。プロトプラストは、10mmH<sub>2</sub>Oの吸引圧から抜け始め、吸引力を上げるにしたがいプロトプラストがマイクロセル内に保持される確立は低下した。これらより、プロトプラストの保持条件は、10mmH<sub>2</sub>O以下の吸引圧を保つことが必要

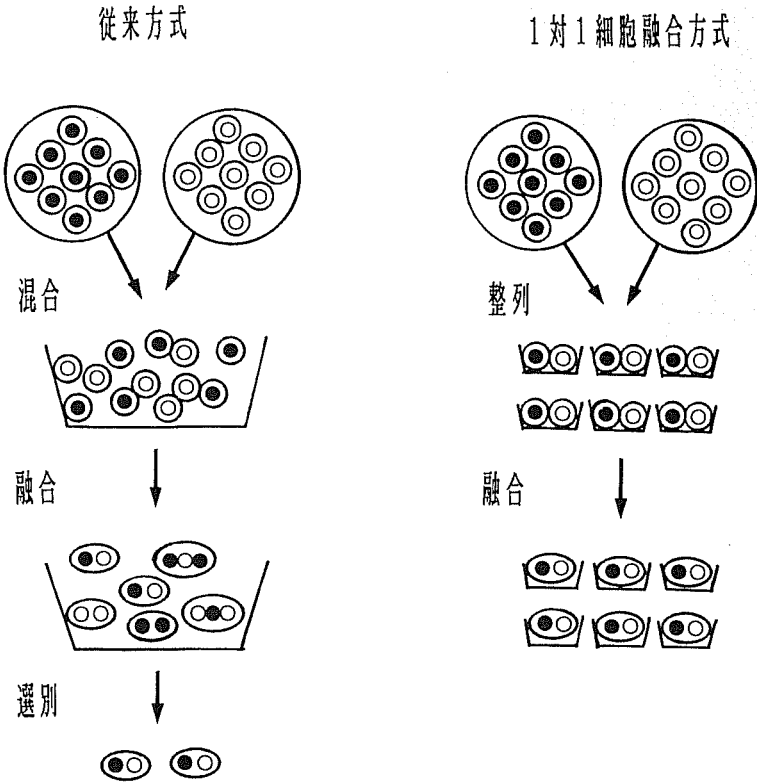


図1 従来の融合方式と1対1細胞融合方式の比較

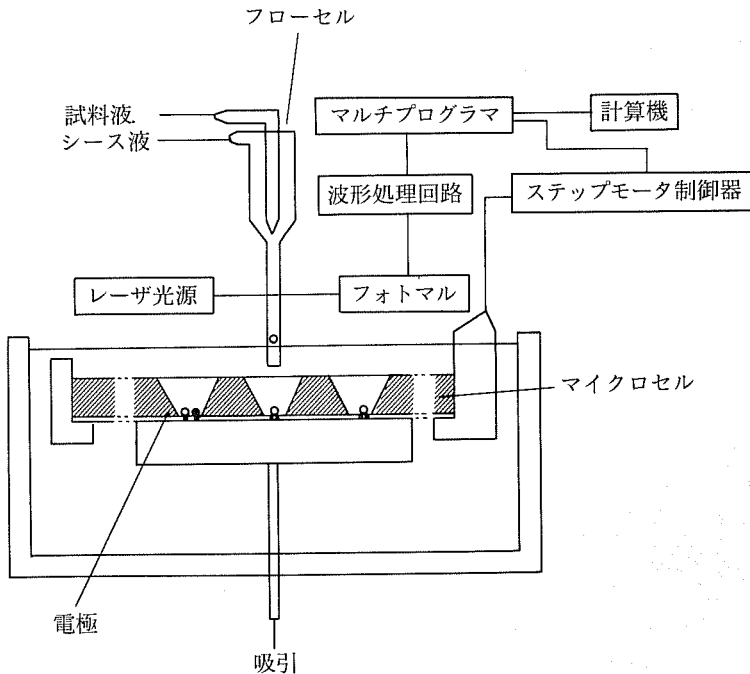


図2 プロトプラスト注入装置の基本構成

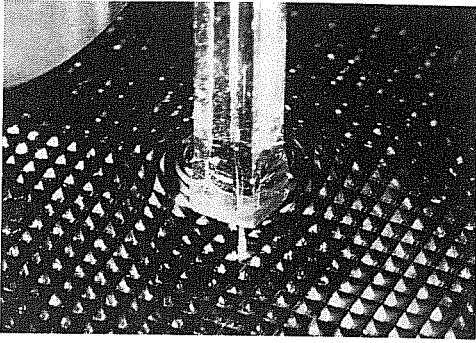


写真2 試料液がマイクロセルに注入される様子

であると判明した。

② 試料液の注入条件

試料液流量一定の条件下で、スリットからの吸引圧を十分に強くしていると、写真2に示すように試料液はマイクロセル内に収まっている。ここで吸引圧を徐々に低下させると、試料液があふれ出す。このあふれ出す瞬間の吸引圧を、いくつかの試料液流量について測定し、試料液流量と吸引圧の関係を求めた。その結果図3のa部では、試料液はマイクロセルに収まることがわかった。

マイクロセルへのプロトプラストの注入範囲として、10mmH<sub>2</sub>O以下でかつ図3のa部に重なる領域(図3b部分)が求められた。これは写真1で示したスリットが3本あるマイクロセルへの注入条件であるが、スリットの数が変わっても同様にして、マイクロセルへのプロトプラストの注入条件を求めることができる。

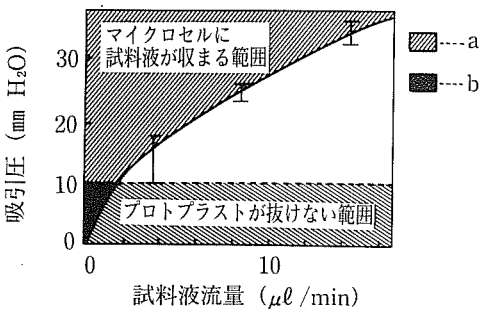


図3 プロトプラストのマイクロセルへの注入条件

(3) 細胞の検出及び装置の制御

フローセル中を流れてくるプロトプラストは、レーザー光を照射して得られる前方散乱光をフォトマルで感知することで認識される。波形処理回路で一定レベル以下のシグナルをカットすることで、プロトプラストとその他のゴミの区別を行った。一定レベル以上のプロトプラスト由来のシグナルをA/D変換して計算機に出力し、マイクロセルの駆動制御を行った。

(4) プロトプラストの注入

以上のように各要素の条件を調整し、サラダナ葉肉プロトプラストを用いて、注入率を測定したところ52~57%の注入率が得られた。また1個のプロトプラストを注入するのに要する時間は、約2秒かかった。

4. マイクロセル内での細胞融合

マイクロセル内にプロトプラスト対が形成されたとすると、次に融合処理を行わなければならない。マイクロセル内での細胞融合では、マイクロセル内壁面と細胞が接触状態にあること等を考慮する必要があり、通常の融合の場合と条件が異なると考えられた。融合の方法としては、一般にPEG等を用いる化学的融合法と、電気パルスによる融合法があるが、どちらの方法がマイクロセル内での融合法に適しているか、また最大でどの程度の融合率が得られるかについて検討した。

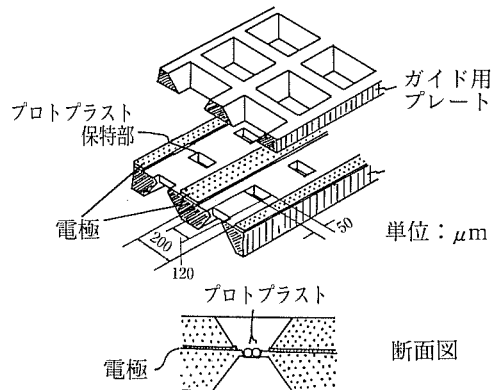


図4 電気融合用マイクロセル

(1) PEGによる細胞融合

PEGによる融合法では、細胞の破壊あるいは内壁面への吸着、浮き上がり等が生じ、マイクロセル内での細胞融合には、PEG法は、適さないことが判明した。

(2) 電気融合

マイクロセル内で電気融合を行うためには、マイクロセル内に電極を配置しなければならない。このためにマイクロセルの構造を図4に示すような3層構造にした。これは、細胞を保持するためのスリットのすぐ脇に、金の電極を蒸着し、その上にガイドとなるプレートをおいたものである。3層構造ではあるが、すりばち状で底部にスリットを有するマイクロセルの構造の特徴を維持している。

このマイクロセルを用いて、融合率を指標に電気条件を検討した。通常の電気融合法では、

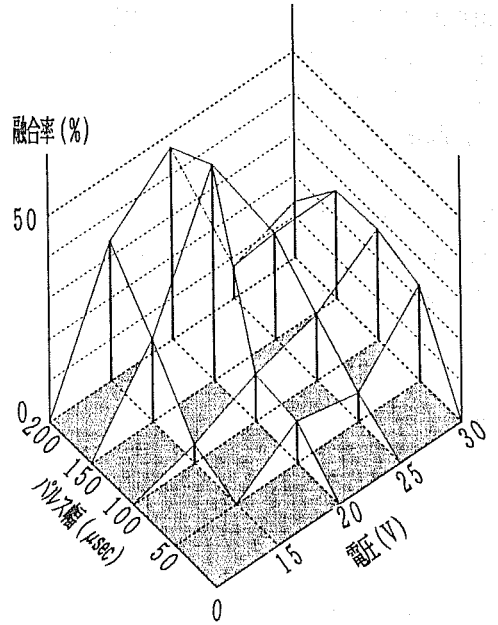
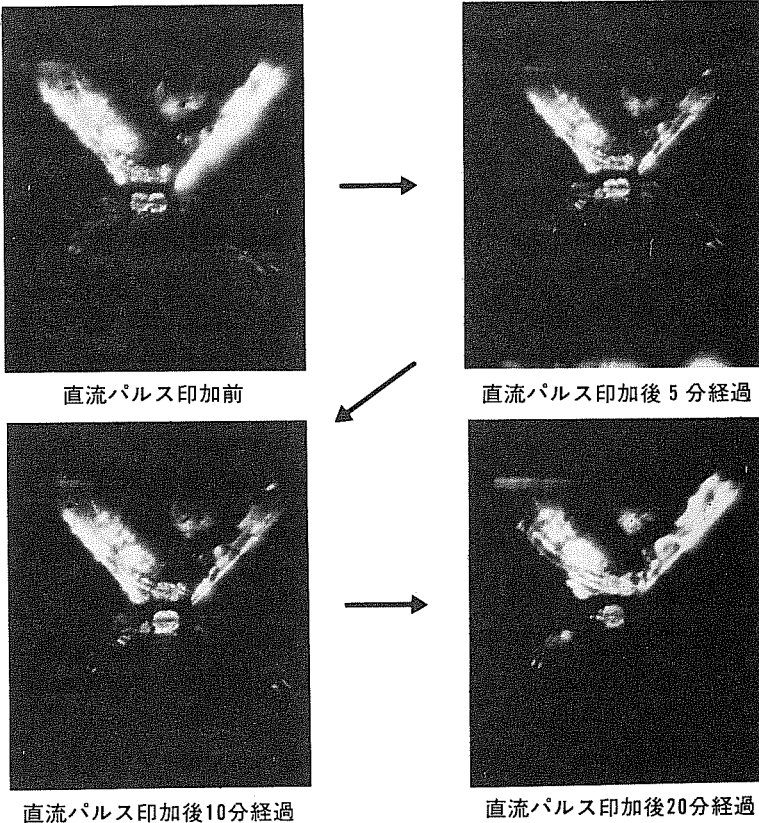


図5 マイクロセル内での融合率



直流パルス印加前

直流パルス印加後5分経過

直流パルス印加後10分経過

直流パルス印加後20分経過

中央にみえるものがプロトプラスト

50 μm

写真3 マイクロセル内での細胞融合

細胞同士を接触させるために、予め高周波を印加しているが、マイクロセル内での融合では、スリットからの吸引によって流体的に細胞同士を接触させることができるため、直接矩形のパルスを印加することができた。モデルとして用いた細胞は、サラダナ葉肉プロトプラストで直径約40 $\mu$ mのもの、0.5Mソルビトールに1mMのMgCl<sub>2</sub>を加えた溶液の中で、印加電圧とパルス幅についての検討を行った。

その結果を示したものが図5である。最大で52%の融合率が得られた。またマイクロセル内での融合の様子については写真3に示す。

## 5. おわりに

本装置での雑種細胞生成率を試算すると、  
 $0.57 \times 0.57 \times 0.52 = 0.168 \dots \dots 17\%$   
 となる。この値は装置の実用化を考えると十分な値ではないが、通常行われている細胞融合法

の1%程度の生成率に比べると大きな向上が図られている。また本方法のもう1つの大きな問題点として、注入に要する時間がかかりすぎていることである。細胞の注入法に関しては、現在別の方法についても同時に検討しているところである。

今後は、雑種細胞生成率の向上はもちろん、操作時間の短縮、操作性の向上等を図り、装置の実用化を目指すと共に、タバコなどのモデル植物で雑種植物の作成の向上が本当に可能かどうかを証明することが必要である。

(\* 日立製作所基礎研究所 研究員)

(\*\* 同上 主任研究員)

## 参 考 文 献

- 1) 鶴岡 久ほか：信学技報, MBE 86-92, 113 (1987)
- 2) 内田憲孝ほか：Bioindustry, vol. 6 No.10 (1989)

