

第6章 細胞融合とハイブリドーマ

6.1 細胞融合法

6.1.1 ポリエチレングリコール(PEG)法

- ・PEGは細胞膜の[]構造を緩やかにし、細胞膜同士の接着を誘起し、膜構造の回復時に細胞融合する。
- ・簡便で、細胞の[]は高いが、融合効率が悪い。

6.1.2 電気融合法

○電気融合の緩衝液

- ・マンニトール緩衝液

電解質を多く含む緩衝液では、抵抗が低いためにジュール熱による対流が起こり、[]が形成されない。

- ・融合条件

交流印加時に[]が形成される。そして、直流のパルス電圧をかけると一過的な[]が起こり、膜修復の際に細胞膜の融合が起こる。

- ・融合効率はよいが、特別な装置を必要とし、生存率が低い。

6.2 ハイブリドーマ(Hybridoma)

○ハイブリドーマ作製の歴史

1975年にケーラー(Köhler)とミルシュタイン(Milstein)が特定の抗体を産生するBリンパ球ハイブリドーマを作製したのが最初。特定の抗原と反応する抗体を産生するマウス[]と長期培養可能なマウス[]とを融合し、特定の抗体を生産し、しかも長期培養可能なハイブリドーマを作った。

○ハイブリドーマ作製の目的

- ・リンパ球は抗体を産生するが、[]ができない。
- ・リンパ腫もしくは骨髄腫細胞(ガン細胞)は、抗体は作らないが、[]可能。

↓

両方の良い性質を持った融合細胞を作製する
(抗体を生産し、長期継代可能な細胞の作製)

○HAT 培地

- ・ハイブリドーマだけを選択的に増殖させる培地

H: ヒポキサンチン(Hypoxanthine)

[]回路によるプリン、ピリミジン塩基合成の原料。

A: アミノプテリン(Aminopterin)

葉酸のアナログで、葉酸リダクターゼを阻害することで[](de novo経路)を阻害。

T: チミジン(Thymidine)

[]回路によるプリン、ピリミジン塩基合成の原料。

○親細胞(ガン細胞)

サルベージ回路に必要なヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase: HGPRT)活性を欠如したリンパ腫、骨髄腫細胞株を用いる。親細胞株は HGPRT を欠損しているため、サルベージ回路が動かない。また、de novo 経路もアミノプテリンで阻害されているため、HAT 培地中では増殖できない。

○融合細胞の選択

- ・親細胞: HGPRT 欠損、および *de novo* 経路阻害で増殖不可。
- ・リンパ球: 長期継代培養不可。
- ・親細胞同士、リンパ球同士の融合体も同理由で増殖不可。
- ・親細胞とリンパ球の融合体、すなわちハイブリドーマのみが HAT 培地で増殖可能。

○ハイブリドーマのクローニング

- ・HAT 培地で増殖してきたハイブリドーマの集団を1個ずつ培養する。
- ・限界希釈法。
- ・特異抗体の検出は酵素抗体法で行う。

6.3 モノクローナル抗体の活用法

抗体の持つ高い抗原特異性、すなわち特定の物質とだけ結合する性質を利用し、特定の成分だけを選択的、かつ高感度で検出する。

- ・酵素抗体法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)
- ・ウエスタンブロットティング法 (Western-blot analysis)
- ・免疫組織染色 (Immunohistostaining)
- ・アフィニティークロマトグラフィ (Affinity chromatography)