

●細胞融合 ●核移植 ●卵子活性化

NEPAGENE

究極の細胞融合装置、登場

最新テクノロジーにより、超高性能・小型化・軽量化を実現
世界初！！、AC・DCパルスの電圧値・電流値を自動測定表示
モノクローナル抗体作製の融合効率、PEG法の3～6倍！！

スーパー細胞融合装置 ECFG21



New!!

◆ アプリケーション

[細胞融合]

- 脾臓細胞とミエローム細胞の細胞融合 **ハイブリドーマ**
- テトラプロイドレスキュー法(四倍体胚補完法)
- ES/EG細胞と胸腺細胞(リンパ球)の細胞融合
- ヒト樹状細胞とヒト腫瘍細胞の細胞融合 **抗腫瘍免疫**
- 膵島細胞と腫瘍細胞の細胞融合 **インスリン分泌細胞**
- ヒト化モノクローナル抗体作製
- 植物プロトプラスト融合 **ハイブリッド野菜**
- リポソーム・水滴融合
- イースト・カビ細胞融合
- キノコ菌糸細胞融合

モノクローナル抗体作製
(大容量用電極対応)
テトラプロイドキメラ作成
多能性幹細胞の再プログラム化活性
癌ワクチン療法
細胞移植
抗癌剤との併用による癌治療
ポマト・オレタチ・ジャガトマ・キャベコン等
エレクトロフュージョンデバイス

デモ先募集中！！

細胞融合(モノクローナル抗体作製)・核移植(クローン動物作成)等のデモ実験も大歓迎です。デモ実験終了後、装置一式を一定期間のお貸出しも可能です。

[核移植]

- レシピエント除核卵子と体細胞核移植
- レシピエント除核卵子と受精卵核移植

体細胞クローン動物(ウシ・ブタ・マウス)
優良家畜の増産(ウシ・ブタ)

[卵子活性化]

- 精子注入後の電気刺激

顕微授精(ICSI)

下位機種 of 細胞融合装置 LF シリーズ (LF201 等) のアプリケーションに全て対応しております。

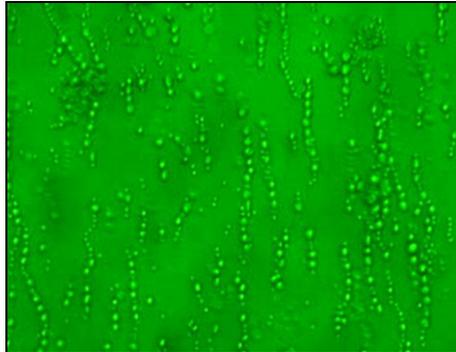
ネッパジーン株式会社

モノクローナル抗体作製

ネッパジーン社が開発した ECFG21 スーパー細胞融合装置は、モノクローナル抗体作製の融合効率が PEG 法の 3~6 倍と大変高い融合効率で作製が可能です。

また、(下位機種種の LF201 細胞融合装置との比較で) 大容量用チャンバー電極にも対応。

◆ 細胞融合の工程



AC → 2ステップ式減衰 DC パルス → ポストフュージョン(AC)

- ①AC
AC(交流)を出力して脾臓細胞(抗体産出細胞)とミエローマ細胞(骨髄腫細胞)の細胞同士を数珠繋ぎ状に接着させます。パールチェーン形成
- ②2ステップ式減衰設定 DC パルス
隣接した細胞同士を 2ステップ式減衰 DC パルス方式(複数回・減衰率・極性切替設定)で高効率に融合させます。
- ③ポストフュージョン(AC)
ACを出力して融合効率の向上と細胞のダメージを回復させます。

● モノクローナル抗体作製における腸骨リンパ節細胞を用いたポリエチレングリコール融合法(PEG 法)、電気的融合法、センダイウィルス外膜蛋白質融合法(HVJ-E 法)との比較検討

◆電気的融合法

電気的融合法で使用する装置 スーパー細胞融合装置 ECFG21 や細胞融合装置 LF201(ネッパジーン社製)電極は、MS スタンド型チャンバー白金電極 CUY497P2(電極間隔:2mm gap, 電極サイズ:L80mm×W2mm×H5mm, 容量:0.8ml, ネッパジーン社製)を用いた(図1)。

電気融合用電極液は、0.3M マンニトール、0.1mM 塩化カルシウム、0.1mM 塩化マグネシウム溶液を使用した。

- ①15ml 用プラスチック製遠沈管にリンパ球とミエローマが 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。細胞懸濁液に融合用電極液を 2.4ml 加えて細胞懸濁液を作った。
- ②細胞懸濁液を 0.8ml ずつ 3 回に分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)させる為の交流(周波数:1MHz、電圧:30Vrms)を 20 秒間行い、細胞融合する為の直流パルス(電圧:350V、パルス幅:30 μs、パルス間隔:0.5 秒)を 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、細胞懸濁液に 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 枚に播いた。



図 1

表 1: マウス腸骨リンパ節法における融合法の比較

	PEG 法 陽性ウェル数	電気的融合法 陽性ウェル数	PEG 法: 電気的融合法 比率
1 回目	166	250	1: 1.5
2 回目	60	182	1: 3.0
3 回目	65	262	1: 4.0

◆PEG 法と電気的融合法の比較

マウス腸骨リンパ節細胞を用いて PEG 法と電気的融合法の比較実験を行った。2 本の凍結チューブの細胞を解凍して混ぜ合わせ(約 4×10^7 個)、それを 2 等分し一方を PEG 法で融合し、もう一方を電気的融合法で融合した。このセットを 3 組行った。3 セットの融合の比較では、1.5~4.0 倍の値で電気的融合法の方が多くの陽性ウェルが得られた(表 1)。平均すると 2.8 倍であった。

◆電気的融合法の考察

ラット腸骨リンパ節細胞を用いて、PEG 法・電気的融合法・HVJ-E 法の 3 種類の融合法で比較実験を行った(図 2・表 2)。電気的融合法は、PEG 法や HVJ-E 法に比べて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。従って陽性ウェルの ELISA 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。融合の操作が簡単のため融合技術に個人差はないと考えられる。一度、細胞融合操作及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。今回のラットリンパ節法のモデル実験では、PEG 法に比べて約 6 倍の陽性ウェルが得られている。

◆まとめ

今回、3 種類の細胞融合方法をマウス及びラット腸骨リンパ節細胞を用いて比較検討した。PEG 法は、経済的であるが融合ごとの差が大きい。HVJ-E 法の効率は、PEG 法と同程度かそれ以上であったが融合細胞が元気に増殖するという点において PEG 法に比べて優れていると思われる。電気的融合法の効率は、PEG 法と比較してラットで約 6 倍、マウスで約 3 倍の高い効率であった。効率・確実性と言う点も含め 3 種類の細胞融合方法の中で、明らかに電気的融合法が優れていると判断される。

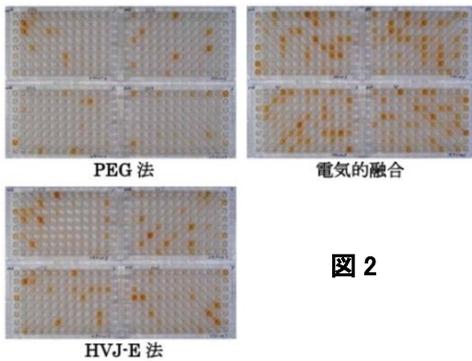


図 2

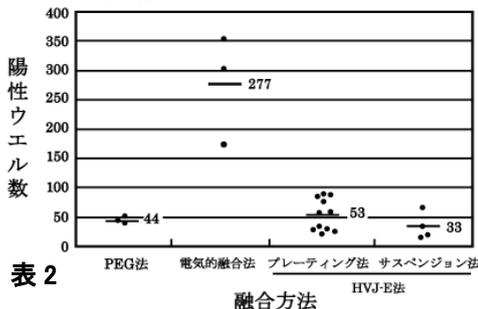


表 2

テトラプロイドキメラ作成

● 核移植によるメラノーマゲノムのリプログラミング

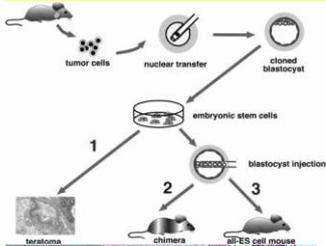


図 1. 癌細胞からマウスを作るための 2 段階のクローニング手順

除核卵母細胞への核移植のために、種類の異なる腫瘍細胞をドナーとして使用した。ES 細胞を作るために、得られた胚盤胞を培地へ移植した。ES 細胞の発癌と分化の可能性を SCID マウスに奇形腫を生じさせ in vitro で評価し(1)、キメラマウスと完全に ES 細胞に由来するマウスを作るために、細胞を 2 倍体(2)・4 倍体(3)の胚盤胞へ注入して in vivo で評価した。

図 2. R545-1 ES 細胞の発生の潜在性の分析

(a) 核移植による肺癌細胞由来の胚盤胞のハッチングで、卵割腔・栄養外胚葉層・内細胞塊が見られる。

(b, c) R545-1ES 細胞から作られた奇形腫部の H&E 染色により、成熟神経細胞・間葉細胞・扁平上皮細胞への分化が見られ(b)、円柱上皮細胞・軟骨細胞・含脂肪細胞の分化が見られる(c)。

(d-f) GFP ラベルした ES 細胞の新生キメラマウスへの寄与。

上段は、キメラマウスの頭(d)・心臓(e)・腸(f)の GFP 像。

下段は、位相差顕微鏡下での同じ像。

(g) Rag2/R545-1 ES 細胞キメラの末梢血 FACS 分析で、FITC-IgM/PE-B220 抗体を使った B 細胞と FITC-CD4/PE-CD8 抗体を使った T 細胞の存在が示されている。

(h) R545-1 細胞の皮膚への寄与によりメラニン細胞への分化が示されている。矢印はキメラマウスの目と首の腫瘍の自然発生を示している。

(i) 4 倍体補完法で完全に ES 細胞から作られた胚が、明らかな尾芽と肢芽・閉鎖した神経管・鼓動を打つ心臓を伴って E9.5 へ成長している。

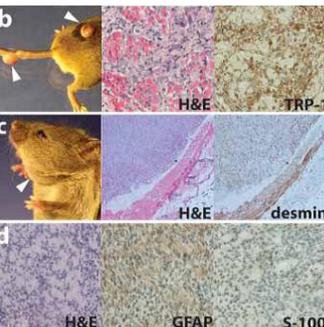
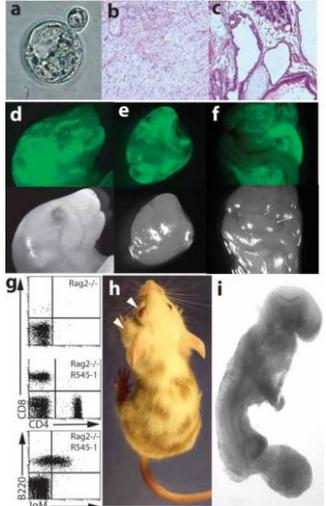


図 3. キメラマウスの癌の表現型

(a) メラノーマドナーマウス(上段)と核移植キメラマウス(下段)の腫瘍発生潜伏期間の比較。ドキシサイクリン再投与後、核移植キメラの腫瘍発生潜伏期間がドナーマウスと似通っていることに注目。(再発性腫瘍)

(b-d) R545-1 核移植キメラに形成した腫瘍の代表的な写真と免疫組織染色。矢印は腫瘍の成長部分を示している。H&E 染色とメラニン特異の TRP-1 抗体・筋肉特異のデスミン抗体 MPNST を検出する GFAP 抗体・S-100 抗体による免疫組織染色により、メラノーマ(b)・横紋筋肉腫(c)・悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST: d)が確認された。

Massachusetts Institute of Technology, Whitehead Institute for Biomedical Research and Department of Biology, Konrad Hochedlinger 先生, Robert Blelloch 先生 Genes & Development, Volume 18, Issue 15, Pages 1875-1885, 1 August 2004 参考

リポソーム・水滴融合

● 融合のタイミングが制御可能なエレクトロフュージョンデバイス

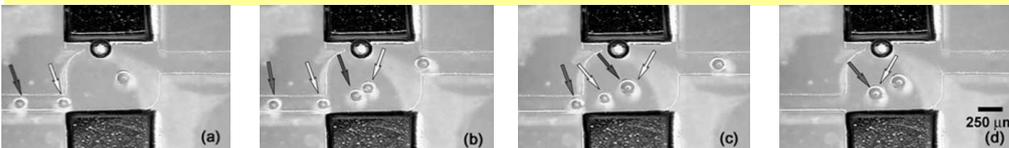


図 1. 融合用チャンバー内ドロプレットの電気融合

(a) 上流のドロプレットがチャンバー内に入る。

(b) チャンバー拡大の為、ドロプレットは融合チャンバー内の進入時に減速し接触する。

(c) 電場条件(電極間 750 μm gap, 電圧: 50V, パルス幅: 10 μs, パルス間隔: 0.2sec, 5 回)で接触したドロプレットが融合する。

(d) 写真は二つの融合したドロプレットである。※電極先にある円形粒子は気泡

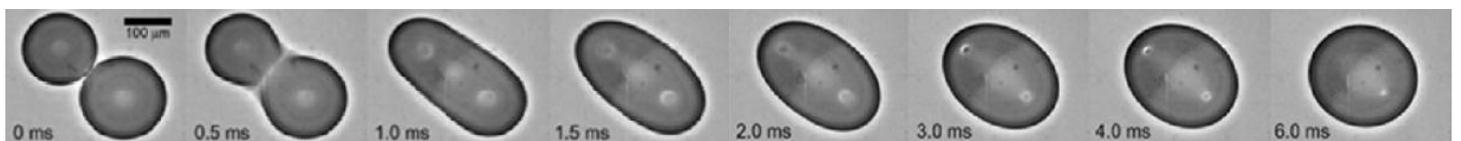


図 2. 高速度カメラ画像による融合プロセスの様子

融合プロセスはほぼ一瞬で行われ、2つのドロプレットは1ms以内に結合し一つの“ピーナッツ型”のドロプレットとなる。さらに5ms後にドロプレットは表面張力の影響で球状になる。融合プロセスを通して、紺青色インクのドロプレット(左端)と淡色のドロプレット(右端)は、はっきりと分離している。

東京大学生産技術研究所 マイクロメカトロニクス国際研究センター Wei-Heong Tan 先生・竹内昌治先生 Lab on a chip, Volume 6, Issue 6, Pages 757-763, June 2006 参考

クローン動物作成

● クローン仔牛の誕生と牛 ES 細胞の遺伝子導入キメラ胚の作成

図 1. 牛 ES 細胞の核移植により生まれた世界初の ES クローン仔牛

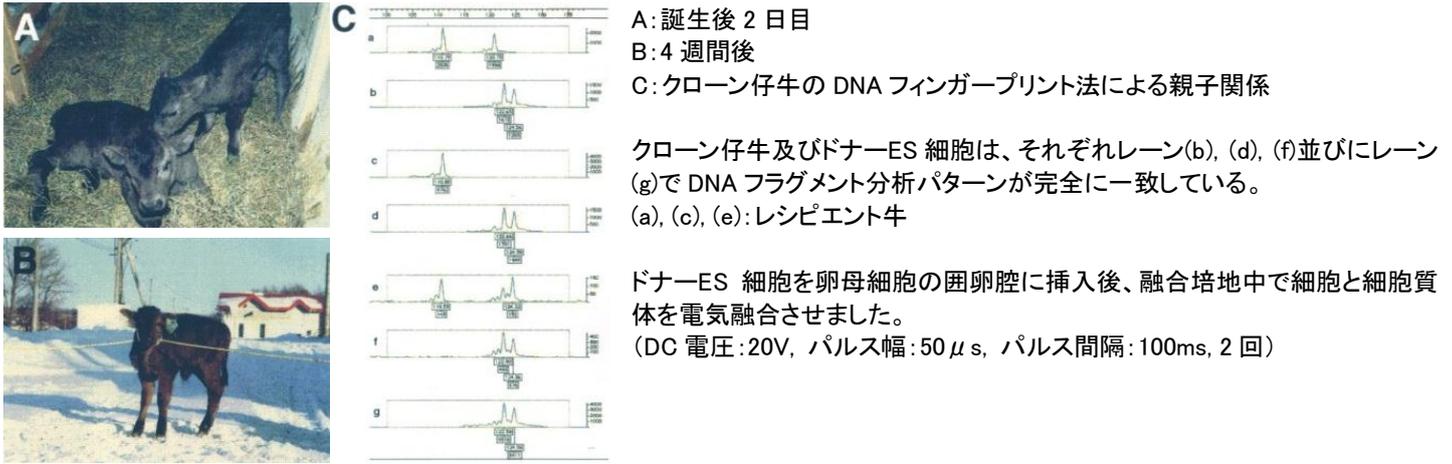
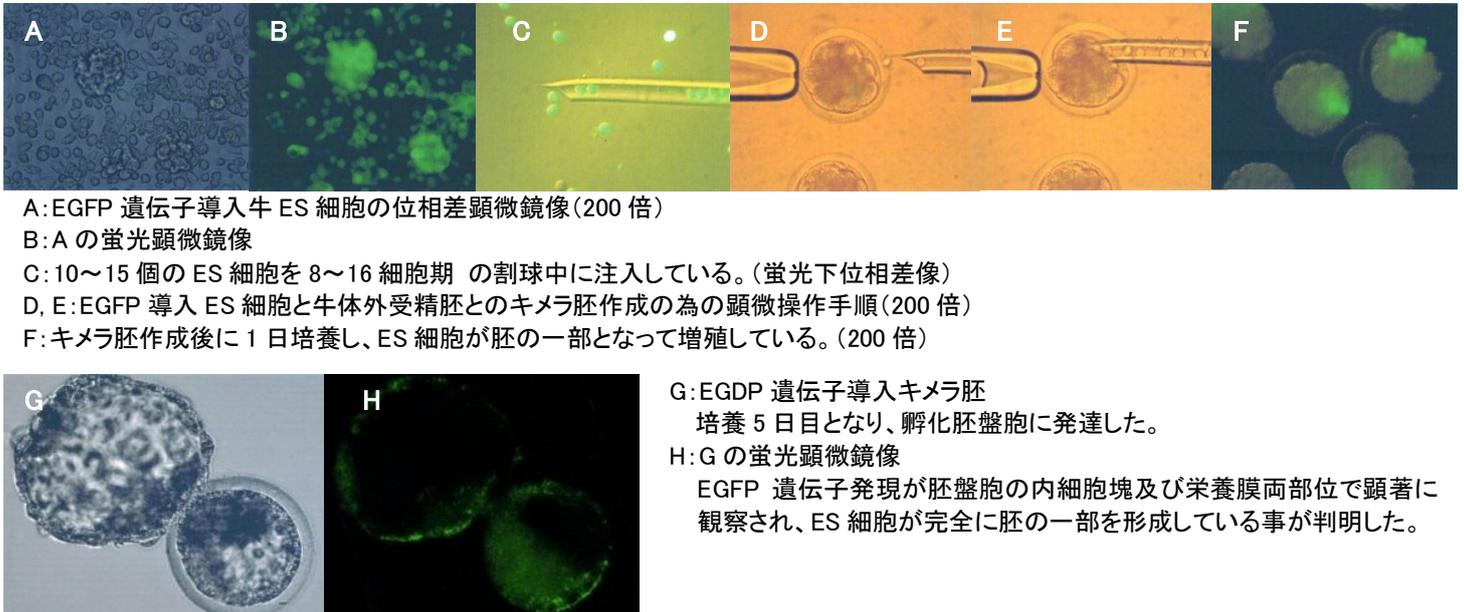


図 2. EGFP 遺伝子導入牛 ES 細胞のキメラ受精卵(胚)での遺伝子発現



齋藤セルテクノロジー研究所 齋藤成夫先生

Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 309, Issue 1, Pages 104-113, 12 September 2003 参考

◆ 仕様

□AC(交流)

交流波形	正弦波
交流電圧	0~80Vrms (1Vrms 刻み)
周波数	1MHz
時間	0~99sec (1sec 刻み)
ポストフージョン	0~99sec 正弦波 or 減衰波
接続負荷	50 Ω 以上

□DC パルス

DC 波形	スクエアー ※極性切替機能内蔵
DC 電圧	1~1,500V (1V 刻み)
パルス幅	0~99 μ s (1 μ sec 刻み)
パルス間隔	0.1~9.9 sec (0.1sec 刻み)
パルス回数	0~99 回 自動 or 手動
減衰率	0~99%

抵抗値測定	50.00k Ω まで	設定値表示	AC・DC・ポストフージョン 全パラメーター
メモリー機能	99 条件	測定値表示	AC: 電圧・電流 DC: 電圧・電流・エネルギー
電源	AC100~240V, 50/60Hz	寸法・重量	386W \times 370D \times 121H mm, 9.0kg

●商品の仕様および外観は予告なく変更される場合がありますのでご了承下さい。

●商品の詳細は当社ウェブサイトをご参照下さい。

総発売元

 **ネッパジーン株式会社**
〒272-0114 千葉県市川市塩焼3-1-6
TEL : 047-306-7222 FAX : 047-306-7333
E-mail : info@nepagene.jp
URL : http://www.nepagene.jp

販売代理店

販売代理店