

多糖フルクタンを利用した動物細胞培養

(福井大工)○(学)水井 慎也・(学)千田 泰史・(正)佐久間 紹子・(福井大産学官)(正)柳原 加奈・
 (食化研)小林 恭一・大浦 剛・(鈴鹿高専)(正)小川 亜希子・
 (エル・ローズ)森山 展行・安川 沙織・(福井大工)(正)寺田 聡*

【諸言】動物細胞培養は、抗体などバイオ医薬品生産や再生医療のために行われており、細胞培養の培地成分と有用な細胞株の凍結保存因子に、ウシ胎仔血清など動物由来因子が利用されている。動物由来因子は有効な生理活性因子を含む一方、狂牛病など人畜共通感染症の懸念があるため、医療に用いるべきでない。そのため、「植物由来因子」が強く望まれている。

我々は植物に由来し、食品として研究されてきたラッキョウフルクタンの作用に着目し、細胞の培養と凍結保存に有効であることを報告してきた。しかし、現状のフルクタンは不純物として塩類や単糖など低分子が含まれており、精製すべき余地が残されている。そこで限外濾過膜によって低分子成分を除いたフルクタンを調製し、限外濾過フルクタン (UF) と命名した。そしてこれを従来の粗精製フルクタン (F) と比較した。続いて、限外濾過フルクタンの細胞培養での最適濃度の探索や細胞凍結保存液への応用を検討した。

【方法】ラッキョウから抽出したフルクタンから、限外濾過により、分子量数千以下の低分子を除去した。この限外濾過したフルクタンをゲル濾過カラム (TSKgel G4000PWXL、G3000PWXL、G2500PWXL、東ソー株式会社) を用いた液体クロマトグラフィーにより分子量分布を検討した。

細胞増殖については、ハイブリドーマ 2E3-O 細胞を無血清培地 ASF104(味の素)に限外濾過フルクタンあるいは従来のフルクタンを 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加して 3 日培養し、生細胞数をトリパンブルー染色法で血球算定盤で計数し、比較した。続いて、限外濾過フルクタン濃度を 5 - 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加し、増殖促進の最適濃度を探索した。

細胞凍結保存については、PBS+10%DMSO に 0.03-10 mg/mL の濃度で限外濾過フルクタンを添加し、2E3-O 細胞を -80°C で 1 週間凍結保存し、解凍後 3 日間培養、生細胞数を計数して評価した。

【結果・考察】図 1 で示されるように、限外濾過されたフルクタンは、従来のフルクタンでみられた低分子不純物が除去されていた。一方、高分子領域のフルクタンは減少していたが、この原因は限外濾過フルクタンの調製過程で酸性 pH 条件での加熱操作もあわせて行ったため、加水分解されたと考えられる。

次にこの限外濾過フルクタンを無血清培地に添加してハイブリドーマ細胞を培養したところ、従来のフルクタンに比べて高い増殖促進効果を示した (図 2-a)。続いて最適濃度を検討した。従来のフルクタンは 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が最適であった (2009 年秋季大会) のに対して、図 2-b で示されるように 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が最も有効であった。これは、不純物除去により、フルクタン標品中の有害性が低下した

ためと思われる。

最後に、細胞凍結への効果を検討したところ、限外濾過フルクタン 0.3 mg/mL 以上の添加で解凍後の細胞数が改善されており、限外濾過フルクタンは細胞凍結液の成分としても有効であるといえる。

以上より、限外濾過フルクタンは動物細胞培養・細胞凍結に有効な因子である。

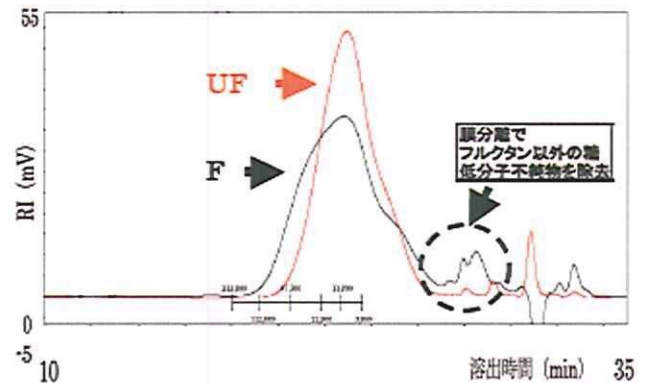


図 1. UF の分子量分布

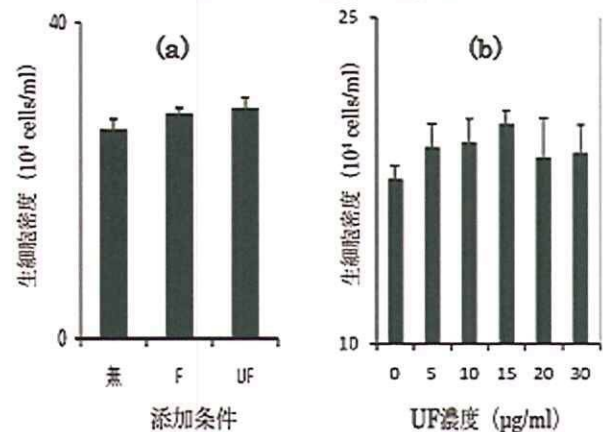


図 2. UF の増殖促進効果 (a) と、最適濃度 (b)

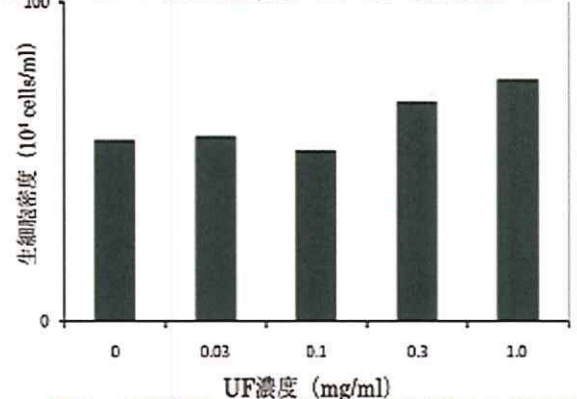


図 3. 凍結液中の UF 濃度と、解凍後の生細胞数

無血清培養の向上を目指した、ラッキョウフルクタン最適化

(福井大繊維センター)○(正)佐久間 紹子、(福井大院工)(学)千田 泰史、
(学)水 井 慎也、(正)寺田 聡*、(福井大産学官)柳原 佳奈、
(鈴鹿高専)(正)小川 亜希子、(福井食加研)小林 恭一、
大浦 剛、(エル・ローズ)森山 展行、安川 沙織

【緒言】

動物細胞培養には、一般的に増殖因子としてウシ胎児血清(FBS)など哺乳動物由来因子が添加されている。特にFBSは細胞の増殖や生存、機能維持など、様々な点で有効であるため幅広く利用されている。しかしながら、医薬品生産・再生医療に使用する細胞培養において、哺乳動物由来因子はBSEなどの人畜共通感染症の懸念が払拭されないため、使用を見合わせる傾向にある。

動物由来因子の代替品として、ラッキョウ由来多糖であるフルクタンが細胞増殖促進効果を持つことを見出し、鹿児島での年会などで報告している。フルクタンはフルクトース残基のみからなる多糖であるが、結合様式として β 2-1結合と β 2-6結合を含んでおり、さらに重合度も多様なものが含まれている。そこで本発表では、ラッキョウフルクタンを細胞培養因子として利用するために、その分子量ないし分岐構造に着目して、細胞への影響を検討した。

【実験方法】

1. 調製方法の異なるフルクタンの増殖促進効果

無血清培地 ASF104 (味の素)を用いたハイブリドーマ 2E3-O 株の培養に、異なる方法で調製した3種のラッキョウフルクタン(以下、フルクタン A、B、C)を添加した。細胞増殖はトリパンブルー染色法で計数した。また、これらフルクタンの分子量は、Prominence LC-20Aシリーズ(島津製作所)を用いて、OHpak SB803HQ(shodex)とOHpak SB804HQ(shodex)を連結したゲルろ過クロマトグラフィーによって検討した。

2. HPLCによる分画

Prominence LC-20A シリーズ(島津製作所)を用いて、OHpak SB803HQ(shodex)と OHpak SB804HQ(shodex)を連結したゲルろ過クロマトグラフィーによって、フラクションに分画した。

3. HPLC 分画フルクタンを用いた細胞培養実験

無血清培地 ASF104 (味の素)を用いたハイブリドーマ 2E3-O 株の培養に、上で分画したラッキョウフルクタンを添加した。トリパンブルー染色法を用いて生細胞密度を計数し、その細胞増殖促進作用の特性を検討した。

【結果・考察】

異なる方法で調製したフルクタンの分子量を比較し、フルクタン A、C、B の順で分子量が大きいことが見いだされた(図1)。これらを用いて、細胞培養実験を行ったとこ

ろ、分子量の大きいフルクタン A が最も増殖促進効果が高く、増殖促進効果と分子量に関連がみられた(図2)。

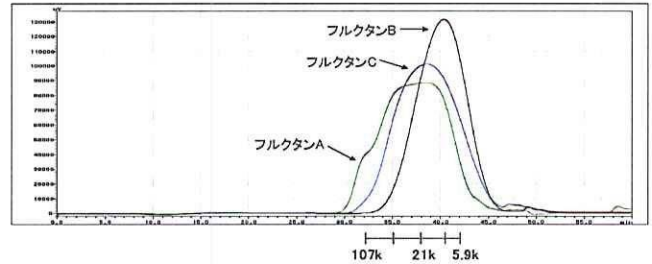


図1. フルクタンのゲルろ過クロマトグラフィーによる比較

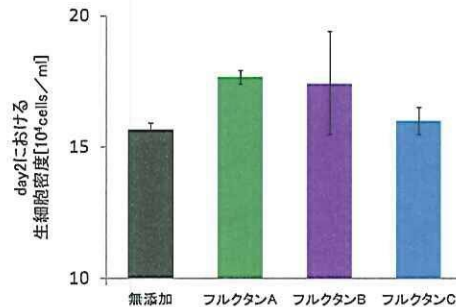


図2. 調製法の異なるフルクタンの増殖促進効果

これを承け、最も増殖促進効果の高かったフルクタン A を対象に、ゲルろ過クロマトグラフィーによって 9 個のフラクションに分画した。それらを用いて、細胞培養を行った結果、もっとも分子量の大きいフラクション F0 において、分画前の効果を上回る増殖促進効果が認められた。さらに、それよりやや分子量の小さい F2 画分では細胞増殖を阻害するという結果が得られた。これら結果から、ラッキョウフルクタンの特に高分子領域が細胞増殖に効果があると思われ、今後、この領域の解析を進めたい。

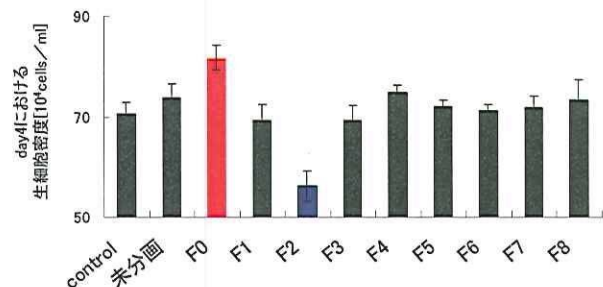


図3. フルクタンAのゲルろ過分画標品の細胞増殖促進効果