

# C202

## セリシンを利用した、非動物由来因子のみからなる培地の構築

(福井大工)○(学)和田 洋・(学)小林 正宗・(正)佐久間 紹子・(福井大産学官本部)(正)柳原 佳奈・(セーレン)國富 芳博・佐々木 真宏・山田 英幸・(福井大工)(正)寺田 聡\*

### 【緒言】

動物細胞の培養では培養液に牛胎仔血清 (FBS) や哺乳動物由来因子が使用されており、BSEやウイルス等の人畜共通感染症が懸念される。そこでこれら因子を含まない培養が望まれている。われわれは哺乳動物でない因子として絹タンパク質セリシンに着目、これに動物細胞の増殖を促進する活性があることを報告してきた。これをふまえ、哺乳動物由来因子を含んでいるGIT培地(日本製薬)を対象に、セリシンでその哺乳動物由来因子を代替した培地を開発してセリシンGITと命名した。そしてその成果を昨年の秋季大会(広島)で報告した。

セリシンGIT培地はCHO細胞には有効であった。しかし図1に示すように、ハイブリドーマ細胞の培養では、10%FBSを含んだRPMI培地とは同等であったものの、GIT培地には劣っていた。これを受けて本研究では、セリシンGIT培地をハイブリドーマ細胞に適した培地に改良することを目指した。

### 【実験方法】

検討した細胞は、マウスハイブリドーマ細胞2E3-0株である。そして、細胞増殖で培地の評価を行うこととし、トリパンプルー染色法で死細胞を染色した後に細胞密度を血球算定盤で計数して求めた。

ハイブリドーマ細胞の増殖を促進するために、まず抗酸化物質に着目し、アスコルビン酸(和光純薬)、グルタチオン還元型(和光純薬)の効果を検討した。次に、増殖促進作用があることで培養にしばしば添加されるポリペプチドないしタンパク質である、ラクトアルブミン加水分解物(和光純薬)、非哺乳動物由来の組換アルブミン(Millipore)と組換トランスフェリン(Millipore)の効果を検討した。そして最後に、これらのうちで有効であった因子を組み合わせ、ハイブリドーマ細胞用の組成を構築した。

### 【結果・考察】

アスコルビン酸やグルタチオン還元型を一般的に添加されている濃度、それぞれ  $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$  で添加したが、効果はなかった。また、ラクトアルブミン加水分解物を添加した条件でも効果はなかった(いずれについても、データは省略)。

図2で示すように、組換アルブミンの添加で増殖が促進され、 $200 \mu\text{g/ml}$ 添加で最も効果が高かった。

組換トランスフェリンは推奨濃度の $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 添加で増殖促進効果が見られた(図3-a)。しかし、濃度依存的な効果が認められず、一定であった。そこで、より低濃度を検討することにした。トランスフェリン $16 \sim 125 \text{ ng/ml}$ 添加では濃度に比例して効果が上がっているが、 $125 \text{ ng/ml}$ 以上の添加では生細胞数は一定となった(図3-b)。そこで、最適添加濃度は $125 \text{ ng/ml}$ と思われた。

以上をふまえて、組換アルブミン  $200 \mu\text{g/ml}$ と組換トランスフェリン  $125 \text{ ng/ml}$ の両方を添加し、ハ

イブリドーマ細胞を培養した。図4より、トランスフェリンのみの添加でGIT培地と同等の増殖を示し、両方の添加ではGIT培地に優る増殖となった。

以上のように、今回開発したハイブリドーマ細胞用の培地組成は哺乳動物由来因子不含にも関わらず、従来のGIT培地(哺乳動物由来因子を含む)に優っており、バイオ医薬品生産に貢献できると期待される。

### 【謝辞】

ミリポアより、アルブミンとトランスフェリンを提供頂きました。

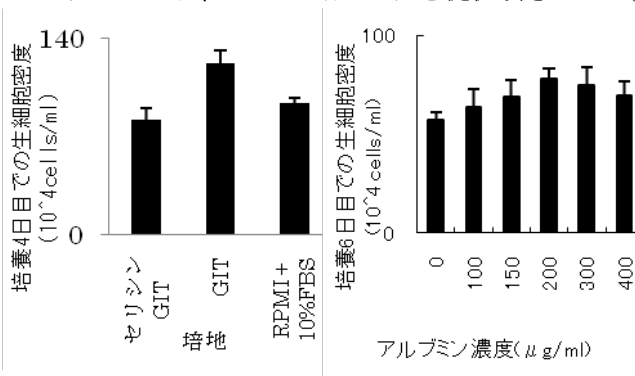


図1 異なる培地でのハイブリドーマ細胞の増殖

図2 アルブミンの増殖促進効果

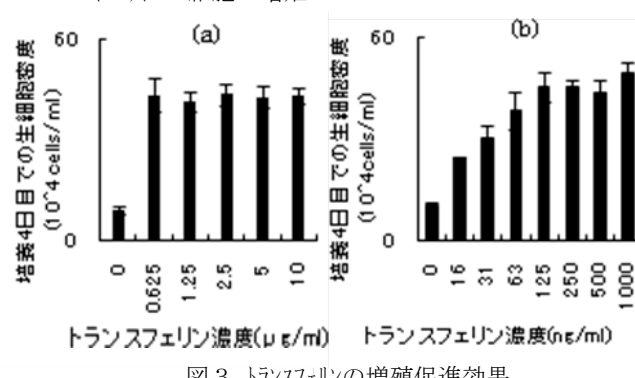


図3 トランスフェリンの増殖促進効果

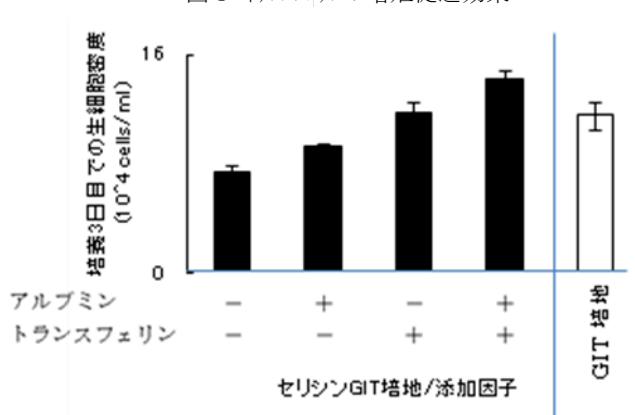


図4 アルブミンとトランスフェリンの相加効果

\*Tel 0776-27-8645 Fax 0776-27-8747  
e-mail: terada@u-fukui.ac.jp