

# C203

## 多糖フルクタンを利用した哺乳動物由来因子を含まない細胞培養

(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 佳奈・  
 (福井食研)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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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 0.03-10mg/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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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。

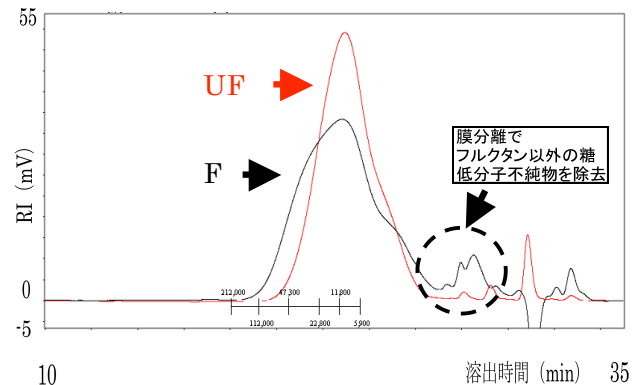


図 1. UF の分子量分布

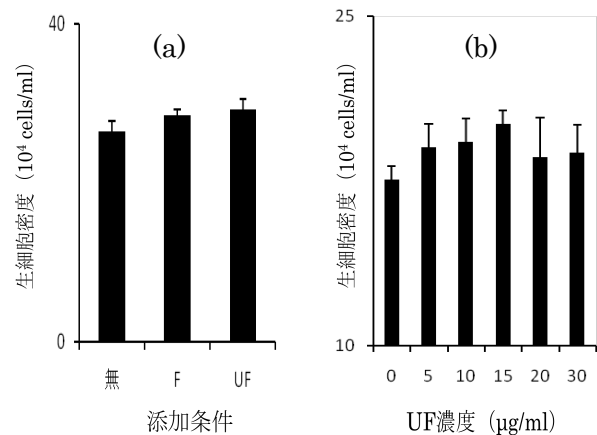


図 2. UF の増殖促進効果 (a) と、最適濃度 (b)

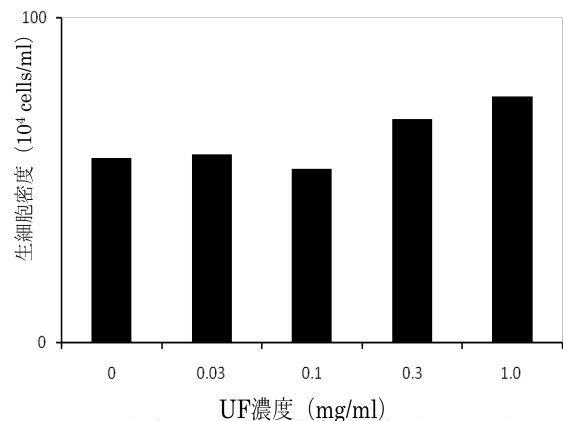


図 3. 凍結液中の UF 濃度と、解凍後の生細胞数

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