

2S-Ca01 細胞培養液の現状と安全性について

○伊藤 丈洋
(株式会社細胞科学研究所)

生体を構成する最小単位である組織や細胞を体外で培養するという試みは19世紀後半から行われてきた。1907年ハリソンらはカエル神経組織をリンパ液で固めてガラス容器のなかで神経線維が成長する様子を捉えることに成功している。さらに1948年にはアールらによって組織から細胞を解放してばらばらの状態で培養することにも成功している。以降、組織・細胞培養技術は多くの研究者によって磨き上げられ生物学や医学の発展に多大な貢献を果たしてきた。21世紀に入り、ES/iPS細胞に代表される再生医療に多くの期待がかけられていくが、これらの細胞の樹立や再生医療の実現には細胞培養技術は不可欠のものとなっている。従来、細胞培養には無機塩類、アミノ酸、ビタミン等の基礎成分の他に、細胞の増殖や機能発現に必要な動物由来成分(血清、血清蛋白質、組織抽出物)を添加したものが培養液として広く使用されてきた。しかしながら、動物由来成分を使用することには、未知ウイルスや異種抗原の存在による培養細胞の汚染、ロットによる活性変動、さらに構成成分が不明であることから、生体活性因子の詳細な解析が困難である等の問題点もあった。

細胞培養は再生医療や医薬品生産から実験室における基礎研究を目的とするものまで、それを必要とする分野は大きく広がっており、必要とされる安全性基準や品質管理基準についても当然ながら目的によって異なってくる。細胞治療や再生医療においては、最終製造物の安全性と同一性担保が求められ、日本においてはFDAのGTPに準じるものとして「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」(医薬発1314号)のなかで培養工程のあるべき姿が示されてきた。この指針は現在ではヒト由来細胞・組織に特化した指針(薬食初0208003号、同0912006号)に改定され、その中で「細胞の培養を行う場合」として培養液に求められる事項が記述されており、原則すべての培養液成分についてその適格性を明らかにすることや、規格の設定とともに異種血清の可及的不使用が求められている。また、生物医薬製造分野においては、代表的な国際的指針としてICH(日米EU 医薬品規制調和国際会議)ガイドラインにおいて細胞培養液についての要件が示されている。培養細胞が再生医療のように直接体内に投与されることがない生物医薬製造用細胞培養においても培養液の全成分組成や由来について、すべて明らかにする必要があることが明記されている。基礎研究分野においては培養工程の安全性もさることながら、生体活性因子の解析等に有利な成分既知培養液が求められている。なかでも昨今のES/iPS細胞研究においては、将来的に医療応用への展開を考慮して基礎研究の段階から安全性や培養方法について科学的根拠に基づいた標準化を図る試みがInternational Stem Cell Initiative (ISCI) 等において進められている。

以上のように細胞培養を必要とする分野の拡大に伴い、個々に求められる「細胞培養液のあるべき姿」は異なるものとなってきている。本発表においては各分野にて使用されている細胞培養液の現状や安全性を担保するための手段について報告する。

Current status and safety of animal cell culture media

○Takehiro ITOH
(Cell Sci. Tech. Inst., Inc.)

Key words Animal cell culture, Serum-free culture media

2S-Ca02 魚血清を用いた動物細胞培養

○藤原 政司, 高木 睦
(北大院・工・生物機能)

動物細胞培養技術は、抗体医薬などバイオ医薬品の生産にとって、最も有用な生産技術である。また、先端医療である再生医療でも動物細胞培養技術が中心的存在である。このような医療用途の生産には高度な安全性が要求される。しかし、これまで動物細胞培養用の培地に一般的に添加されてきた「ウシ血清(FCS)」にはBSE問題に代表されるようにその安全性に大きな懸念がある。そこで、動物細胞培養プロセスにおいて、FCSに代わる安全な培地添加物の開発が緊急の課題となっている。

その解決策として、魚類にはヒトに感染するウイルスが報告されていないことと、魚類の血清に細胞増殖因子が含まれていることから、魚血清をFCSの代わりに利用できることが期待できた。

そこで、我々は魚血清を添加した培地でチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を接着培養または浮遊培養して、魚血清がCHO細胞の培養に使用できるか検討した。

はじめに、FCS培地の代わりにマダイ(*Pagrus major*)由来の血清を含んだ培地(マダイ血清培地)を用いてCHO細胞を接着培養した。その結果、培養24 hでの細胞の接着効率が低かった(約25%)が、10% FCS培地で24 h培養して細胞を接着した後、10% マダイ血清培地に交換した場合、細胞密度が10% FCS培地の約71%まで増加することが確認された。マダイ血清培地において、タイプIコラーゲンコートディッシュを用いた場合、細胞接着効率が60~91%、さらに細胞の増殖促進も確認された。生体活性タンパク質であるヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(hGM-CSF)の生産活性は、コラーゲンコートディッシュを用いた20% マダイ血清培地では、10% FCS培地の場合とほぼ同等であることが確認された。

次に、ブリ(*Seriola quinqueradiata*)由来の血清(ブリ血清)において、FCSでの補体の不活性化温度である56°Cで熱処理した後、基本培地に添加してCHO細胞を接着培養した。その結果、細胞増殖活性が顕著に促進されることが確認された。

さらに、ブリ血清の添加濃度を変えて基本培地に添加し、CHO細胞を接着培養した。その結果、ブリ血清の添加濃度が高い(5~20%)と増殖に阻害的に働いたが、添加濃度が低い(1.25~2.5%)と細胞増殖促進活性が顕著に向上することが確認された。魚血清の低濃度添加と熱処理を組み合わせると、さらに増殖促進活性が向上し、FCS培地の場合と同様な培養成績が得られることが確認された。この培養では10% FCS培地の約50%の比生産速度で、hGM-CSFが生産された。このように、魚血清を熱処理と低濃度添加することで、FCSの代わりに魚血清をCHO細胞の接着培養に使用できる可能性が示された。

次に、魚血清濃度が高い場合に細胞増殖促進が低下する原因を調べるために、魚血清の脂質濃度について調べた。その結果、ブリ血清、マダイ血清共にFCSより約3~50倍高いことが確認された。そこで、魚血清から脂質成分を抽出し、培地に添加してCHO細胞を培養した結果、脂質成分の添加濃度が高いと細胞増殖が減少した。したがって、高濃度による増殖低下は、培地中の脂質成分による細胞増殖の阻害が主要な原因の一つであると考えられた。

最後に、FCSの代わりに魚血清を用いてCHO細胞をスピナーフラスコで浮遊培養した。その結果、4%ブリ血清を用いた場合、細胞密度が10% FCS培地の約33%まで増殖可能なことが確認された。この培養では、組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)が良好に生産された。熱処理した10% マダイ血清を用いた浮遊培養では、熱処理が細胞増殖に全く影響を与えないことが確認された。このように、魚血清をCHO細胞の浮遊培養に使用できる可能性が示された。

以上のように、FCS培地の代わりに魚血清培地を用いてCHO細胞の培養が可能であることが示された。

Mammalian cell culture employing fish serum

○Masashi FUJIWARA, Mutsumi TAKAGI
(Div. Biotech. Macro. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words fish serum, mammalian cell culture, fetal calf serum