

学位論文題名

魚血清を利用したウシ血清フリー動物細胞培養に関する研究

学位論文内容の要旨

高齢化社会の到来を迎え、高度な医療に関わる工学技術の重要性が益々増大している。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「ウシ胎仔血清 (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、これまでにヒト血清の利用や無血清培地の利用が検討されてきたが、代替物としての条件を十分に満たすことができなかった。一方、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。

本論文では、魚血清を利用したウシ血清フリー動物細胞培養に関する研究を行った。本論文は 7 章から構成されており、以下にその概要を記した。

第 1 章は緒論であり、研究の背景と研究の目的を明らかにした。

第 2 章では、FCS の代わりに魚血清を用いてチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を接着培養して、魚血清を用いて細胞が培養ディッシュ底面に接着することが可能であるか、接着した細胞が増殖することが可能であるか、魚血清を用いて接着培養した細胞が生理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) を生産することが可能であるかについて検討した。その結果、10% マダイ血清培地で CHO 細胞を培養した場合、培養 24 h での細胞の接着効率が低かった (約 25%)。したがって、細胞を接着させるために培養初期に FCS 培地で培養した後、魚血清培地に交換する必要があるがあった。10% FCS 培地で CHO 細胞を 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結果、細胞密度が 10% FCS 培地の約 71% まで増殖することが確認された。マダイ血清培地において、通常のディッシュでは細胞の接着効率が低かったが、タイプ I コラーゲンコートディッシュを用いた場合、接着効率が高く (60~91%)、さらに細胞の増殖促進が確認された。したがって、魚血清を用いる場合、タイプ I コラーゲンコートディッシュを用いることが有効であることが分かった。コラーゲンコートディッシュを用いた 20% マダイ血清培地での CHO 接着培養では、10% FCS 培地の場合とほぼ同等の hGM-CSF 生産活性が確認された。

第 3 章では、FCS では血清中に含まれる補体による細胞増殖阻害を排除するために熱処理することがあるので、魚血清においても、熱処理した後、基本培地に添加して CHO 細胞を接着培養し、魚血清の熱処理が細胞増殖促進に与える影響について検討した。その結果、FCS での補体の不活

性化温度である 56 °C で熱処理することによって、細胞増殖活性が顕著に促進されることが確認された。このブリ血清の 56 °C の熱処理による増殖活性促進には、ロット差がないことが確認された。さらに、マダイ血清にも同様な熱処理による増殖活性促進が確認されたので、この熱処理による接着培養促進効果が魚血清に共通する性質である可能性が高いと考えられた。

第 4 章では、FCS は通常 10% の濃度が細胞増殖に最適な添加濃度であるが、魚血清の最適な添加濃度は不明であるため、魚血清の添加濃度を変えて基本培地に添加し、CHO 細胞を接着培養して、細胞増殖に最適な魚血清の濃度を検討した。また、熱処理と添加濃度の組合せに関して、細胞増殖に最適な条件を検討した。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することが、ブリ血清とマダイ血清の両方に共通して確認された。熱処理したブリ血清を低濃度添加した培地 (1.25%) では、hGM-CSF 比生産速度が 10% FCS 培地での比生産速度の約 50% であったが、hGM-CSF が生産されていることが確認された。結論として、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。

第 5 章では、魚血清濃度が高い場合、魚血清に由来する培地中の過剰な脂質成分が細胞の増殖を阻害した可能性が考えられたため、魚血清から抽出した脂質成分を添加した培地で CHO 細胞を接着培養して、魚血清の脂質成分が細胞増殖に与える影響について検討した。その結果、魚血清の脂質濃度がブリ血清、マダイ血清共に FCS より実際に約 3~50 倍高いことが確認された。次に、魚血清中の脂質成分を抽出した後、濃度を変えて培地に添加して CHO 細胞を培養した結果、ブリ血清を添加した場合と同様に、添加濃度が高いと細胞増殖が減少することが確認された。したがって、魚血清濃度が高い場合に細胞増殖促進が低下する主要な原因の一つは、培地中の脂質成分による細胞増殖の阻害であると考えられた。

第 6 章では、CHO 細胞によるバイオ医薬品生産の多くは細胞接着を必要としない浮遊培養法で行われているので、FCS の代わりに魚血清を用いて CHO 細胞を浮遊培養して、細胞が増殖することが可能であるか、魚血清を用いて浮遊培養した細胞が生理活性タンパク質であるティッシュプラスミノゲンアクチベーター (tPA) を生産することが可能であるかについて検討した。さらに、接着培養では魚血清の熱処理と低濃度が細胞増殖促進に有効であったので、浮遊培養において魚血清の熱処理および添加濃度が CHO 細胞の増殖促進効果に与える影響について検討した。その結果、4% ブリ血清を用いた浮遊培養では、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。浮遊培養では、血清濃度と細胞増殖促進の関係が接着培養の場合と反対であり、魚血清濃度が高いと細胞増殖が促進されることが確認された。この培養では、tPA の比生産速度 (8.8 fg/cell/h) が 10% FCS 培地での比生産速度 (5.4 fg/cell/h) より大きかったので、tPA が良好に生産されたことが確認された。また、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。結論として、魚血清を FCS の代わりに CHO 細胞の浮遊培養に使用できる可能性が示された。

第 7 章は総括であり、本研究で得られた成果をまとめた。FCS 培地の代わりに魚血清培地を用いて CHO 細胞の接着培養が可能であり、魚血清を熱処理及び低濃度添加することで、FCS 培地の培養成績と同等な培養成績を得られることを明らかにした。CHO 細胞の接着培養において、魚血清中の脂質成分が細胞増殖を阻害している要因の一つであることを明らかにした。魚血清培地を用いて CHO 細胞の浮遊培養が可能であることを明らかにした。本研究で得られた成果は、ウシ血清を用いない安全な動物細胞培養技術を開発する上で重要であり、動物細胞培養によるバイオ医薬生

産、再生医療への貢献が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 木 睦

副 査 教 授 棟 方 正 信

副 査 教 授 田 口 精 一

学 位 論 文 題 名

魚血清を利用したウシ血清フリー動物細胞培養に 関する研究

高齢化社会の到来を迎え、高度な医療に関わる工学技術の重要性が益々増大している。動物細胞培養技術は、バイオ医薬品の生産や再生医療において、中心的な工学技術である。このような医療用途の培養技術には高度な安全性が要求されるが、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「ウシ胎仔血清 (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。

ここで、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。

本論文では、魚血清を利用したウシ血清フリー動物細胞培養に関する研究を行った。本論文は 7 章から構成されており、以下にその概要を記した。

第 1 章は緒論であり、研究の背景と目的を明らかにした。

第 2 章では、FCS 培地の代わりにマダイ血清培地を用いてチャイニーズハムスター卵巣 (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、細胞接着効率が高く (60~91%)、さらに細胞の増殖促進が確認された。生理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。

第 3 章では、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、マダイ血清にも同様な熱処理による増殖活性促進が確認されたので、この熱処理による接着培養促進効果が魚血清に共通する性質である可能性が高いと考えられた。

第 4 章では、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 が生産されたことが確認された。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。

第 5 章では、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することが確認された。したがって、魚血清濃度が高い場合に細胞増殖促進が低下するのは、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。

第 6 章では、FCS の代わりに魚血清を用いて CHO 細胞を浮遊培養した。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、tPA が良好に生産されたことが確認された。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 FCS の代わりに CHO 細胞の浮遊培養に使用できる可能性が示された。

これを要するに、FCS 培地の代わりに魚血清培地を用いて CHO 細胞の接着培養が可能であり、魚血清を熱処理及び低濃度添加することで FCS 培地の培養成績と同等な培養成績を得られること、CHO 細胞の接着培養において魚血清中の脂質成分が細胞増殖を阻害している要因の一つであること、魚血清培地を用いて CHO 細胞の浮遊培養が可能であることを明らかにしたものであり、動物細胞培養工学に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。