

第4章 無血清培養法

4.1 基本合成培地

- ・アミノ酸、無機塩類、ビタミン、微量元素などで構成される。
- ・浸透圧調整のため、が入る。
- ・pH 指示薬としてを含む。
- ・1950 年代に活発に開発され、動物細胞培養の発展に大きく寄与した。
- ・MEM (Minimum Essential Medium)、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、RPMI 1640、Ham' F-12、ERDF 等

4.2 血清添加培地 (Serum-supplemented medium)

○血清

- ・血清は非常に多くの生物学的分子 (、糖質、脂質、、無機塩類) の複雑な成分の混合物。
- ・細胞の増殖を生理的にバランスよく促進したり、抑制したりする活性を持つ。
- ・基本合成培地に ~ % 添加する。

○血清の供給源

・ウシ

ウシ胎仔血清: 心臓穿刺(せんし)により採血

ウシ新生児血清: 生後 10 日以内仔ウシより採血

仔ウシ血清: 生後 1 年以内の仔ウシより採血

成牛血清

- ・ウマ
- ・ニワトリ
- ・ヤギ
- ・ブタ

○血清の主な機能

①細胞の増殖や機能発現を導くホルモンの供給

- ・血清中には 1 mL あたり、数ミリグラムから数ナノグラム存在。
- ・特定の細胞だけに作用する特異的なものがある。上皮性増殖因子 (EGF: Epidermal Growth Factor)、線維芽細胞増殖因子 (FGF: Fibroblast Growth Factor)。
- ・ホルモンの中で、 はほとんどの培養細胞の増殖に不可欠。半減期が短く、システインによる不活性化を受けやすいので、比較的高濃度に必要。
- ・ステロイドホルモンを必要とする細胞もある。

②細胞の接着や伸展のための因子(接着因子: Cell adhesion factor)の供給

- ・細胞外基質に必須の成分である接着因子の供給。
- ・多くのほ乳類細胞は適切な基質に接着し、分裂を始めたり、単層になつたりする前にまず伸展しなければならない。その伸展・接着に必要な因子が□。

例)コラーゲン(Collagen)、フィブロネクチン(Fibronectin)。

③ホルモンや無機質、脂質などを輸送する輸送タンパク質の供給

- ・血清は、細胞に必須な数種の低分子因子を運ぶための輸送タンパク質を含む。
- ・アルブミン(Albumin)は、ビタミンや脂質(脂肪酸、コレステロール)や、とくに□を輸送する。
- ・□であるトランスフェリン(Transferrin)はほとんどすべての培養細胞に必要。細胞膜表面上にトランスフェリンレセプターがある。

④細胞の生存と増殖とに必須な脂質の供給源

- ・脂肪酸、リン脂質、レシチン、コレステロールの供給。

⑤無機微量元素の供給源

- ・微量元素(銅、亜鉛、コバルト、マンガン、モリブデン、セレン)は多くの酵素の補助因子として働いている。□は、代謝による解毒作用に不可欠な酵素を活性化し、遊離ラジカルの不活性化にも関与。

○血清の問題点

- ①多くの細胞にとって、血清はその細胞が由来する元の組織で接していた生理学的体液ではない。
- ②血清にも細胞毒性がある。
細菌毒や脂質のような選択的な阻害因子の他に、ポリアミンオキシダーゼを含んでいることがある。これは、ポリアミン(スペルミン、スペルミジン)と反応して毒性を有するポリアミノアルデヒドを生成する。ウシ胎仔血清は、比較的この酵素レベルが高い。
- ③ロットによる性質の違いが大きい。
生まれ、□、環境、□、遺伝的性質、年齢、性別による成分の違いが大きい。
- ④細胞に特異的な増殖因子を必ずしも十分に含んでいるとは限らない。
- ⑤高価である。500 mL 3~4万円。
- ⑥成分が複雑なため、培養液から細胞が生産した物質の分離精製が困難。

4.3 無血清培地 (Serum-free medium)

○無血清培養の目的

- ・不明確な血清成分の [] の違いによる培養条件の不確定性をなくす。
- ・動物細胞による物質生産において、目的物質以外をできる限り含まない方が有利。
- ・血清によるコスト高の解消。

○無血清培地の利点

- ・血清のロットによる培養状態の変化がなく、培養の [] が上昇する。
- ・ウイルス、細菌、マイコプラズマなどの血清由来の [] の危険度が減る。
- ・経済性が高い。
- ・培養産物の精製が容易。
- ・バイオアッセイにおいて、 [] による阻害が減少する。
- ・血清の毒性の影響がなくなる。
- ・初代培養における線維芽細胞の増殖過多が防止できる。

○無血清培養の問題点

- ・多くの細胞株に対しては血清が不要となることで経済的であるが、特殊なホルモンや増殖因子の添加が必要な場合、血清以上に高価になりうる。
- ・ホルモン、成長因子の組み合わせは細胞種特異的であるので、細胞種ごとに異なる成分の無血清培地が必要になる。たとえば、神経細胞を増殖させる因子の組み合わせは、他の細胞種には無効である。

○無血清培養の添加因子

●インスリン (Insulin)

- ・分子量約 [] の増殖因子。20 個のアミノ酸からなる A 鎖と 30 個のアミノ酸からなる B 鎖からなる。
- ・細胞によるグルコース、アミノ酸、カリウムイオンの取り込み促進、RNA、タンパク質、脂質、グリコーゲンの生合成を促進。

●トランスフェリン (Transferrin)

- ・遊離の鉄イオンの利用は効率が悪く、鉄イオン輸送タンパク質が必要。
- ・分子量8万の []。1分子に2個の鉄イオンを結合する。
- ・トランスフェリンレセプターを介して3価の鉄イオンを移送する。細胞内に取り込まれた後、トランスフェリンは鉄イオンを遊離し、トランスフェリン自身は細胞外に再分泌される。

●エタノールアミン (Ethanolamine)

- ・分子量 61.08。 [] の一種。細胞膜の構成要素。
- ・脂質合成に関与。

●亜セレン酸ナトリウム (Sodium Selenite)

- ・分子量 172.94。
- ・グルタチオンペプチダーゼの構成元素であり、組織や膜脂質において非特異的な [] 作用を示し、生体膜機能の維持に効果がある。

- アルブミン (Albumin)
 - ・脂肪酸や微量元素、ある種の[]の運搬体として働く。
 - ・過酸化水素や過剰の微量元素に対する[]作用。
 - ・細胞を物理的な作用から守る。
 - ・アルブミンの添加は、ハイブリドーマやリンパ球の細胞増殖や物質生産能を促進する。
- メルカプトエタノール (2-mercaptethanol)
 - ・システインの取り込み促進に関与。
 - ・過酸化物の還元。
 - ・細胞周期の G1 期から S 期への移行を促進。
- プロスタグランジン (Prostaglandin)
 - ・脂肪酸。
 - ・幾つか種類があり、F2 α , E1 が用いられる。
- ヒドロコルチゾン (Hydrocortisone)
 - ・分子量 362.47。
 - ・各種アミノトランスフェラーゼを活性化して糖新生を促進する。
- プロゲステロン (Progestogen)
 - ・分子量 314.47。
 - ・[]の一種。
 - ・胎盤から分泌される。妊娠中の女性は通常の 300 倍の血中濃度。
- 無血清培養の注意点
 - ・pH 緩衝能に関する注意事項
 - 血清添加培地ほどの pH 緩衝能がない。
 - pH 上昇には注意が必要。