

ラミニン5Bを用いた無血清培地の開発

株式会社エーシーバイオテクノロジーズ

石塚保行 高崎夕嫁 張 紅

【目的】

当社は無血清細胞培養により生産したヒトコラーゲンの製造を行っているが、コラーゲン産生細胞を増殖させる工程では、数%の血清を使用している。ラミニン5Bを基礎培地に添加することで、血清0%での細胞増殖が可能かどうかを検討し、ヒトコラーゲンの完全無血清培養化のための培地の開発を目標とした。

【方法】

- 1) 材料：ラミニン5Bは、横浜市大・宮崎先生から提供して頂いた組換え型ヒトラミニン5B (0.001~0.1 µg/ml) を用いた。
- 2) 細胞：ヒト正常線維芽細胞
- 3) 培養法：D-MEM 基礎培地に抗生物質とアスコルビン酸を添加したベース培地にラミニン5Bや種々の添加物（血清由来以外）を組み合わせたオリジナル培地を作製して培養に用いた。
- 4) 評価法：細胞増殖は、MTT法と細胞数の計測から5%血清添加ベース培地との比較で評価した。

【結果】

- 1) ベース培地にラミニン5Bを添加した培地では、5%血清培地に比較して20%の増殖性を示した。そこで、ベース培地にラミニン5Bと血清を少量（5%以下の範囲）添加することで、5%血清に比較して80%の増殖性を示した。
- 2) ベース培地にラミニン5Bと血清由来以外の成分を組み合わせたオリジナル培地では、5%血清に比較して60%の増殖性を示した。
- 3) ベース培地にラミニン5Bと無血清培養上清を添加した培地では、5%血清に比較してほぼ同等の増殖性を示した。但し、この培地からラミニン5Bを除いても70%の増殖性がある。

【考察】

ラミニン5Bと数種類の成分を加えることで、5%血清の60%相当の増殖を示したが、100%コンフルエントに達するまでの時間が長く、実用的な培地ではなかった。しかし、無血清培養上清との組合せでは、増殖性も良く、血清の代替としての可能性があった。しかし、細胞の形態や継代数が短いという問題が生じたので、現在、詳細に検討している。

【結論】

正常線維芽細胞において、ラミニン5Bは無血清培地に添加した方が良いが、必須ではない結果であった。今後、ラミニン5Bを固相化した条件での無血清培養を検討したい。