

■ 技術講座

細胞培養培地を長持ちさせる方法 —酸素補給水を用いて

松本 高明^{1,2)}, 萩原 敏且^{1,2)}, 松本 美弥子^{1,2)}

要 旨

従来の培養液は4日おきに液換えをせねばならない。しかしながら、酸素補給水を用いた培地では1週間に1回の液換えて十分な細胞培養環境がえられる。

Key words 酸素補給水, 粉末培地の溶解液, 浮遊細胞培養

(WAARM Journal, 2019; 2: 41-43)

はじめに

細胞培養技術は医学・生物学の分野において欠かせない技術であり、医薬品の開発および再生医療の研究など多岐にわたり使われている。培養細胞を用いるには細胞をはじめ培地、培養方法など種々の検討が必要である。特に、細胞の増殖には培地内の安定した酸素補給が必要である¹⁾。通常、培地は3あるいは4日おきに液換えが必要である。そのため、これに従事する者は休日も返上しなければならないこととなる。

接着細胞培養では培養上清の液換えが容易であり酸素補給は簡単である。しかし、浮遊細胞培養では培養上清の液換えには遠心分離機を用いて浮遊細胞を集めなければならず、その際に浮遊細胞は損傷を受ける。また、培養上清の液換えをしないならば、無菌空気あるいは無菌酸素の気泡を培養液への吹込みと攪拌を行わねばならない。そのためには酸素吸入用の酸素補給装置^{2,3)}を設置しなければならない。その上、酸素飽和濃度の調整、酸素吸入時で生じるエアレーションにより細胞損傷など⁴⁾の問題もある。これらの問題を解決する一助となればと思ひ酸素補給水を溶解液として培養液を作成し、細胞の増殖と生存率からその効果を検討した。通常、接着細胞は培養皿全面に増殖すると、細胞分裂が停止する。しかし、浮遊細胞は細胞同士が結合していない

ため長く細胞分裂をする。そこで、今回の試験には浮遊細胞を用いた。

材料および方法

浮遊細胞はCHO DP-12抗体産生株であるチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた⁵⁾。培地は極東製薬工業株式会社製の無血清・無タンパクCHO用を用いた。培地の溶解液は酸素補給水群(酸素補給水)および対照群(精製水 極東製薬製 ミリQ水)を用いた。酸素補給水(製品名:WOX)はメディサイエンス・エスポア株式会社製であり、飲用として酸素補給に効果があることが報告されている⁶⁻¹⁰⁾。また、両群のpHおよび浸透圧の相違は認められない。それぞれ二群の培養液25mlと 3×10^5 cell/mlに調整した細胞を混合し125ml細胞用バックル付きエルレンマイヤーフラスコを用いて37°C、5%CO₂存在下で振盪攪拌培養を行った。

結果および考察

細胞の増殖

対照群と酸素補給水について培養直後、4、8、11日後の細胞数を血球計算盤を用いて測定した^{11,12)}。4日後までは、両群ともに細胞の増殖の差異はみられない。8日後では対照群の細胞数の増加は鈍化するが、酸素補給水群では8日後では明瞭な細胞増加を示した。しかしながら、11日後では細胞数の増

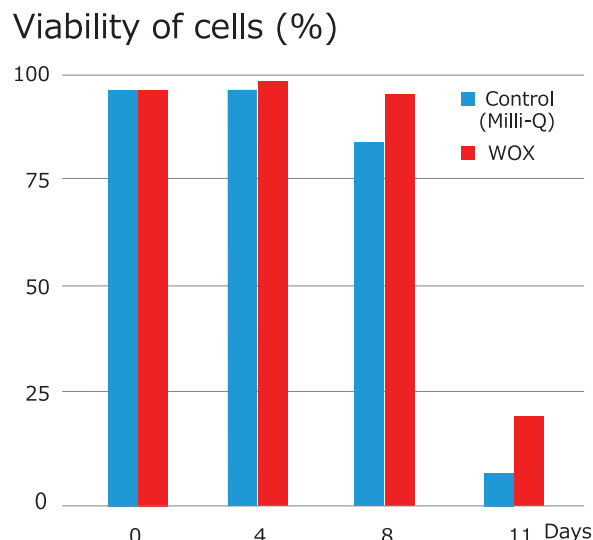
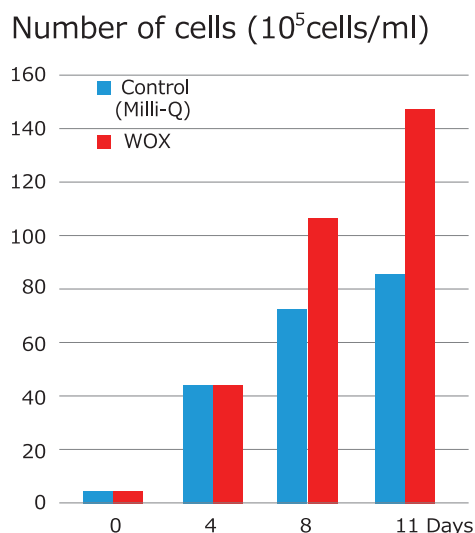
¹⁾ メディサイエンス・エスポア株式会社

²⁾ 特定非営利活動法人 QOL サポート研究会

代表者 松本 高明

連絡先 住所: 〒212-0027 川崎市幸区新塚越 1-2 2-502 電話: 044-511-2214 e-mail アドレス: matsumoto@espoir.com

細胞の増殖と生存率の比較検討



加はわずかながら鈍化していた。(図)

細胞の生存率

対照群と酸素補給水群による培養直後、4、8、11日後の細胞の生存率の測定にトリパン青染色液を用いて死細胞を検索した¹²⁾。4日目までは両群ともトリパン青で染色される細胞は見られない。しかしながら8日後では対照群では20%がトリパン青で染色される死細胞が観察される。酸素補給水群ではトリパン青で染色される細胞は見られない(図)。11日後では対照群ではほとんどの培養細胞がトリパン青で染色される。しかしながら、酸素補給水群では15~18%の培養細胞が生存していた。

これらの結果から、従来用いられている培地の溶解液(対照群)と酸素補給水群では明確な差が認められた。即ち、対照群では培養細胞は4日を過ぎると細胞の増加や生存率の減少が見られた。しかし酸素補給水では8、11日後でさえも増加していた。また、トリパン青で染色される死細胞は対照群では8日後では4割認められる。しかし酸素補給水群では8日後でも認められない。これらのことは、従来用いられている培地では細胞の増殖能および生存率より4日間は使用することができる。即ち対照群では4日以降は培養液の液換えを行わなければならないことを示している。

それに対して、酸素補給水を用いた培養液では8日後も4日後と同様に細胞数の増加率や生存率を示しており、培養液は8日間使用できることを示した。最後に、従来の培養液では4日おきに液換えが必要

であるが、酸素補給水を用いた培地では1週間に1回の液換えで、十分な細胞環境が得られる。時間的にも実験計画の段階でも培地の1週間に1回の液換えは革命的なことと信じる。

この酸素補給水が細胞培養の培地の溶液として広く用いられることを期待している。

謝辞

本報告にご協力をいただきました極東製薬工業株式会社に深謝いたします。

参考文献

- 1) 黒沢尋：培養細胞への酸素供給：生物工学 2013：91 巻 11 号：646-653
- 2) 川原弘之、満田伸二郎：最近の動物細胞大量培養技術 化学と生物 1993：31 巻 7 号：450-456.
- 3) 田中秀夫：培養装置の開発とその実用的利用 生物工学会誌 2006：84 巻 1 号：2-15.
- 4) 奥村大成、小島秀蔵、田原直樹：マイクロバブルの培養への適用：日揮技術ジャーナル 2011：1 巻 1 号：1-6
- 5) Wurm FM: Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells: *Nature Biotechnology*. 2004; **22**: 1393-1398.
- 6) 松本高明、大槻公一、谷口明ほか：高濃度溶存酸素液(WOX)飲用による動脈血酸素飽和濃度(SPO₂)への効果：*Prog. Med.* 2016; **36**: 127-130.
- 7) 萩原敏且、山崎勉、野口いづみほか：慢性閉塞性肺疾患(COPD)症状と高濃度酸素液(WOX)の飲用効果：*Prog. Med.* 2016; **36**: 571-576.
- 8) 萩原敏且、猪森茂雄、松本美弥子ほか：うつ、睡眠障害における高濃度酸素液(WOX)の効果：

- Prog. Med.* 2016; 36: 973-976.
- 9) 萩原敏且, 松本美弥子, 織田慶子ほか: 糖尿病の HbA1c と高濃度酸素液 (WOX) 飲用: *Prog. Med.* 2016; **36**: 1711-1713.
 - 10) 萩原敏且, 松本美弥子, 織田慶子ほか: 糖尿病の 血糖値および HbA1c の変動と高濃度酸素液 (WOX) 飲用: *Prog. Med.* 2018: 669-672.
 - 11) 北村敬: 細胞数の測定と生存細胞数の測定: ウイルス検査のための組織培養技術: 近代出版 1976: 98-102
 - 12) 血球計算盤を用いた細胞数のカウント法: <http://www.abcan.co.jp/protocols/counting-cells-using-a-haemocytometer>.