

2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	藻類由来成分を用いたエシカルな無血清培地の開発 ー多様な藻類抽出液の調合による栄養バランスの均衡化と増殖効果ー
キーワード	① 藻類抽出液、② 動物細胞培養液、③ 無血清

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ヤマナカ クミコ 山中 久美子
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	東京女子医科大学、先端生命医科学研究所、特任助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	東京女子医科大学、先端生命医科学研究所、特任助教
プロフィール	専門は分子生物学です。現在は主に培養肉生産に向けた培養液の研究を行っています。

1. 研究の概要

動物細胞の培養は、基礎生物学研究のみならず、バイオ医薬品の製造や再生医療分野、培養肉の生産でも利用されている。細胞培養には、基礎培地と増殖因子から成る培養液が必須である。一般的に基礎培地は穀類由来の栄養で作られ、増殖因子としては、ウシ胎児血清 (FBS: Fetal bovine serum) が使用されている。穀類の生産は、気候変動の影響を受けるため不安定で、使用される化学肥料や農薬は環境汚染の原因となる。血清は動物由来であるため、動物福祉の問題や病原体混入のリスクがあり、さらに価格も高いことが課題である。一方で、微細藻類は、培養にかかる環境負荷が低いため、本研究では、穀類や血清の代わりに微細藻類を使用したエシカルな培養液を作製することを目的とした。

藻類の抽出液には、栄養成分に加え、細胞の増殖を促進する成分が含まれている。産業利用されている4種類の微細藻類 (スピルリナ、ヘマトコッカス、クロレラ、クロロコッカム) から、超音波破碎と酸加水分解により抽出液を作製した。作製した抽出液を栄養成分として、または、増殖促進因子としてバイオ医薬生産に用いられる動物細胞 (CHO 細胞、MDCK 細胞) の培養に利用可能か検討を行った。その結果、藻類を栄養成分とした基礎培地で細胞の維持が可能であり、さらに市販の基礎培地 (DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium) に FBS の代替として微細藻類抽出液を添加した培養液で細胞を増殖させることができた。

2. 研究の動機、目的

様々な分野で活用され始めた細胞培養技術であるが、現在使用されている培養液は、穀類の栄養と、FBS が使用されているため、大量消費することは、これを利用して生産される製品の持続可能性を脅かすことになる。近年、藻類を用いた動物細胞の培養について相次いで報告がなされた。培養液の「栄養素代替」として、または、「FBS 代替」として藻類の抽出液を利用した研究である。これらの報告には、培養可能な細胞が限定されている点や、完全に藻類抽出液に置き換えた場合に細胞の生存率が低下するため、成分を補足する必要があるという課題がある。これらの課題を解決するため、各種藻類の抽出液の成分を解析し、栄養・ミネラルバランスの整った増殖効果を持つ動物由来成分不含の無血清培地を作製することを目的とした。

3. 研究の結果

(1) 藻類の培養・抽出液の作製

本研究では、工業生産されている藻類種を選別し使用した。クロレラ、スピルリナは健康食品として販売されており原末の購入が可能であったが、クロロコッカム、ヘマトコッカスは原末の購入が困難であったため、藻類株を購入し、培養して増幅させた。

①藻類の培養

クロロコッカム（海産藻類）はダイゴ IMK+人工海水培地で培養し、ヘマトコッカスはBG-11 およびC培地で培養を行った。ヘマトコッカスをC培地で培養した場合、細胞がアスタキサンチンという赤色のカロテノイド色素を蓄積し、増殖が止まった。窒素不足によるストレス反応と考えられるため、BG-11 で培養したヘマトコッカスを実験に用いることとした。

②成分の抽出

栄養素の抽出は、酸加水分解と超音波破碎によって行った。酸加水分解は、0.5N 塩酸に 50g/L の濃度で藻類原末を添加し、100°C24 時間インキュベートした。その後、50% 水酸化ナトリウム水溶液 (19N) で中和した。超音波破碎は、超純水に 100g/L の濃度で藻類原末を添加し、氷冷しながら出力 250W、10 分間超音波処理した。各抽出液は、遠心分離で残渣を除いた後、シリンジフィルターを用いてろ過滅菌した。抽出液の色は、酸加水分解抽出液は、全ての藻類で茶褐色を示した。超音波抽出液は、クロレラ、クロロコッカム、ヘマトコッカスは薄緑色であったが、スピルリナは青色（フィコシアニン由来）を示した。

③栄養成分量、浸透圧およびミネラル量の測定

各抽出液の栄養成分量（図 1）、浸透圧およびミネラル量（図 2）の測定を行った。その結果、藻類種だけでなく抽出方法によっても栄養成分、ミネラル量、浸透圧が異なることが明らかになった。

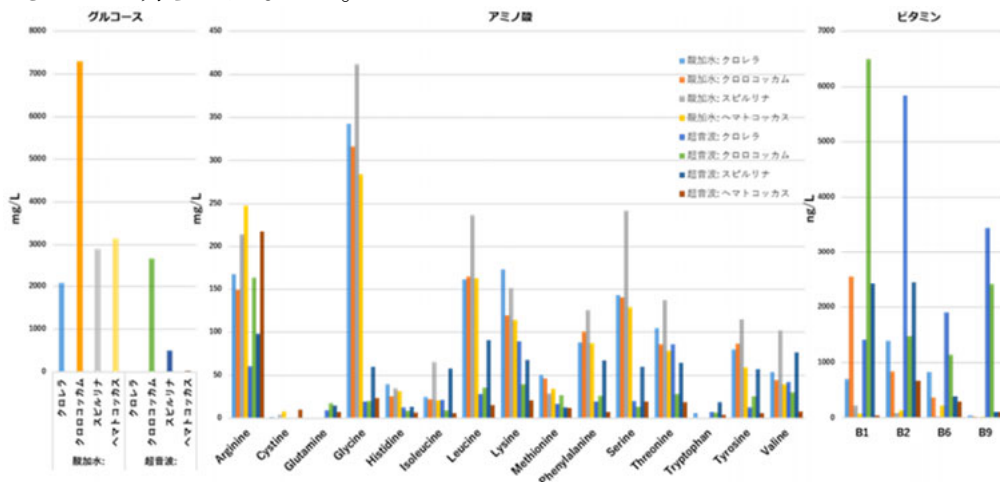


図 1：各種藻類抽出液の栄養成分量

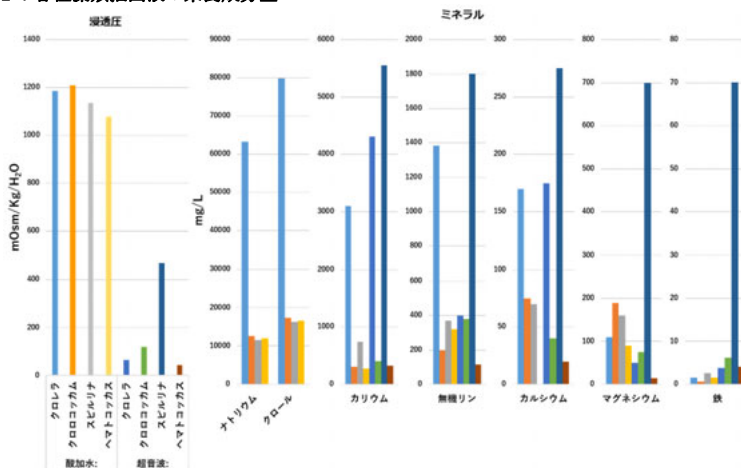


図 2：各種藻類抽出液の浸透圧およびミネラル量

(2) 動物細胞の培養

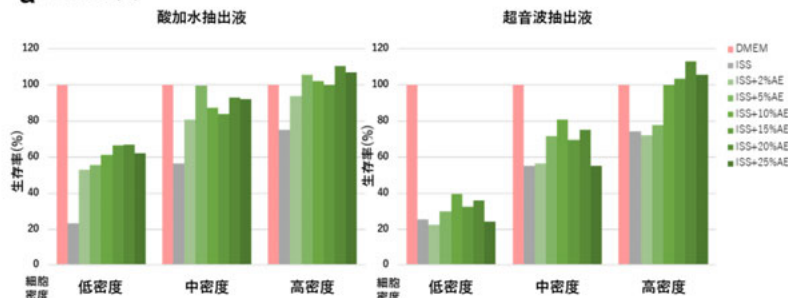
藻類抽出液を使用した培養液の至適な栄養およびミネラル成分を、目的の細胞ごとに決定する必要がある。そのために、各藻類抽出液 (AE: Algal extract) で作製した培養液を用いて動物細胞を 24 時間培養し、その生存率を確認した。また、DMEM を基礎培地として、増殖促進を目的とした添加剤として藻類抽出液を添加して 48 時間培養した場合の細胞の増殖率についても検討を行った。浸透圧は、塩化ナトリウム水溶液を用いて動物細胞の生理的浸透圧 (260-320mOsm/kg/H₂O) になるように調整した。

①イヌ腎臓上皮細胞株 (MDCK 細胞) の培養

MDCK 細胞をスピルリナの酸加水抽出液、超音波抽出液を栄養成分とした基礎培地で培養したところ、細胞の播種密度によって生存率が異なることが分かった。細胞密度が高いほど、細胞の生存率が高く、これには細胞同士のオートクライン、パラクライン効果が発現していることが示唆された (図 3-a)。クロレラの酸加水抽出液を用いた場合、生存率は DMEM よりも高く (146%)、栄養成分としてだけでなく、増殖促進因子も含まれている可能性が示唆された (図 3-b)。

MDCK細胞

a スピルリナ



b クロレラ

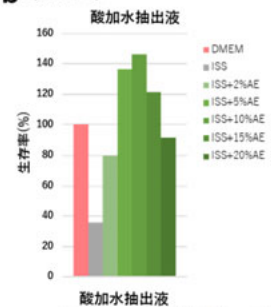


図 3 : MDCK 細胞の生存率 ISS に藻類抽出液を添加した基礎培地で低・中・高の 3 種類の細胞密度の MDCK 細胞を 24 時間培養後の生存率 (XTT assay で測定) a. スピルリナ酸加水抽出液、超音波抽出液 b. クロレラ酸加水抽出液 AE: Algal extract, DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium, ISS: Inorganic salt solution

また、DMEM に増殖促進因子としてスピルリナとヘマトコッカスの抽出液を添加して培養したところ、スピルリナの酸加水抽出液では 2%~25% 添加で増殖活性を認め、ヘマトコッカスの酸加水抽出液、超音波抽出液では、それぞれ、2%、2~10% 添加で増殖活性が認められた (図 4)。添加量が増えると、増殖が抑制される傾向が示された。

MDCK細胞

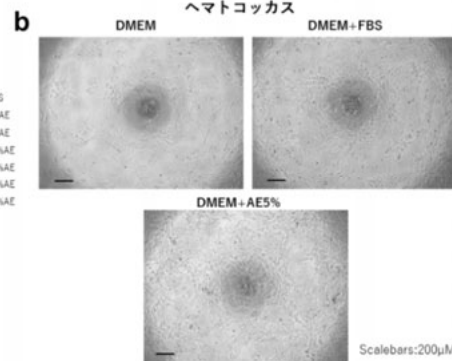
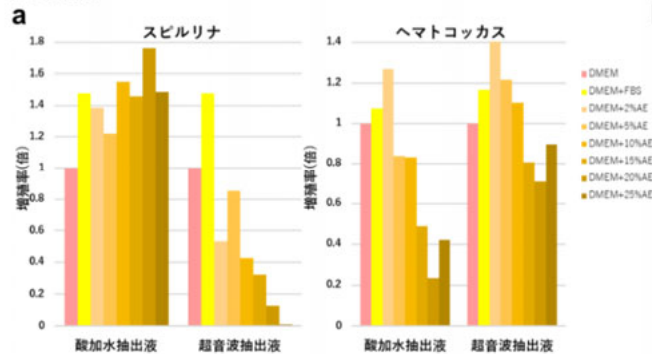


図 4 : MDCK 細胞を DMEM に藻類抽出液を添加した増殖培地で 48 時間培養後の増殖 a. XTT assay を用いた増殖率 b. DMEM、DMEM に FBS を添加した培地、DMEM にヘマトコッカス超音波抽出液 5% を添加した増殖培地で 48 時間培養後の写真. AE: Algal extract, DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium, FBS: Fetal bovine serum

②チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株 (CHO 細胞) の培養

次に、CHO 細胞をクロレラおよびヘマトコッカスの抽出液を栄養成分とした基礎培地で培養したところ、どの場合も DMEM と同等の生存率を得ることはできなかった (図 5-a)。CHO 細胞は栄養消費量が多く、藻類抽出液だけでは賄えなかった可能性がある。対して、DMEM に増殖促進因子としてヘマトコッカスの抽出液を添加して培養したところ、酸加水抽出液では最大約 1.4 倍 (10%AE)、超音波抽出液では 1.8 倍 (5%AE) に増殖した (図 5-b)。

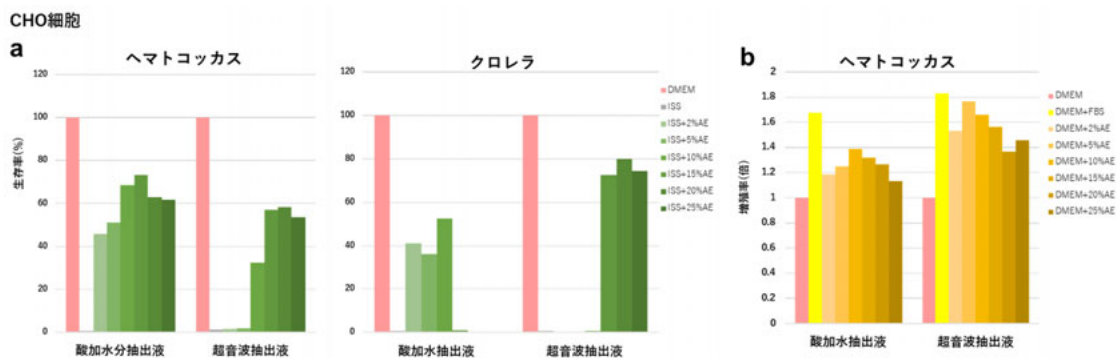


図 5: CHO 細胞の生存率および増殖率 a. ISS に藻類抽出液を添加した基礎培地で高密度の CHO 細胞を 24 時間培養後の生存率 (XTT assay で測定) b. DMEM に藻類抽出液を添加した増殖培地で 48 時間培養後の増殖率を XTT assay で測定 AE: Algal extract, ISS: Inorganic salt solution, DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium, FBS: Fetal bovine serum

以上のように、藻類抽出液は、藻類種および抽出方法によって栄養成分やミネラルの組成が多様であり、それに伴って浸透圧も異なる。無機塩培地に藻類抽出液を加えた基礎培地で動物細胞を培養した場合の生存率、市販の基礎培地 (DMEM) に藻類抽出液を添加した増殖培地で動物細胞を培養した場合の増殖率は、藻類抽出液ごとに全く異なる挙動を示した。また、動物細胞は種類によって栄養代謝効率が異なるため、対象の細胞種によっても生存率や増殖率が異なる。本研究では、MDCK 細胞の生存と増殖には、それぞれクロレラとスピルリナの酸加水分解抽出液が有効であることが明らかとなった。また、CHO 細胞の増殖には、ヘマトコッカスの抽出液が効果的であることが示唆された。今後は、各種藻類抽出液と動物細胞種の組み合わせを変えてデータ収集し、対象とする動物細胞毎に藻類抽出液の混合および添加量の最適化によりテーラーメイドで調整すれば、さらに効果の高い培養液の作製が可能であると考えられる。

4. 研究者としてのこれからの展望

細胞培養技術は、100 年以上の長い年月をかけて改良され、現在では様々な用途で用いられています。これまで、技術の進歩に優先的に目が向けられ、地球上の限られた資源をどのように有益に活用するかについては、後回しになっていたように感じています。今回の研究を通して、地球環境への配慮を取り入れた細胞培養技術の開発をしていく必要があると、強く感じました。そこで、今後の研究では、私たちの生活の質の向上だけに目を向けるのではなく、環境や動物福祉への影響も考慮した技術の開発を目指して精進していきたく思います。

5. 支援者 (寄付企業等や社会一般) 等へのメッセージ

この度は、2022 年度 女性研究者奨励金を賜り、厚く感謝申し上げます。ご支援により、目的の微細藻類の購入や、抽出液の栄養成分解析の外部委託などを行うことができ、非常に有用なデータを取得することができました。そのおかげで、エシカルな培養液の開発が前進し、この成果はいずれ SDGs の実現にも貢献すると確信しています。ご支援者の皆様方に重ねて深くお礼申し上げます。