

生物由来原料基準に適合した培地と併用可能な培養基材および添加物の探索

高垣 謙太郎*, 伴 慶子, 佐伯 尚史; 富士フイルム和光純薬(株)
埼玉県戸田市新曽南3-17-35, *kentaro.takagaki@fujifilm.com

Abstract

再生医療を行う際の出発材料として、様々な細胞が提案されている。なかでも、間葉系幹細胞 (MSCs) は、脂肪や骨髄といった組織から分離・培養を行うための方法論が確立されており、世界中で盛んに研究が行われている。再生医療を安全に実施するために、培地を含む原材料が、生物由来原料基準に適合していることが重要である。我々はこれまでに、異種成分を含まず (Xeno-Free) かつ増殖性能に優れたMSCs用無血清増殖培地 (PRIME-XV MSC XSFM MDF1、再生医療等製品材料適格性確認書取得済。以下、MDF1と略す。) を販売している。無血清培地は一般的に細胞接着が弱く、何かしらのコーティング、あるいは細胞接着が強い基材と併用する必要がある。コーティングに関しては、生物原料に由来するものが多く、生物由来原料基準を満たしているものを見つけるのが困難である。MDF1は、Corning社のCellBind®表面処理された基材を用いた場合にのみ、コーティングなしで培養可能であることが確認できており、これらを組み合わせることで、生物由来原料基準を満たした培養が容易に行える。一方、培養が特定の基材に依存するのは、サプライチェーン上のリスクになりえる。今回、CellBind®表面処理された基材以外に使用できる基材がないか、探索を実施した。また、MDF1と生物由来原料基準を満たす添加物を併用することで、単独で使用できなかった基材を用いて培養可能になった事例を紹介する。

Methods

細胞

骨髄由来間葉系幹細胞は、Lonza社から購入した骨髄由来単核細胞 (2M-125C) から分離・培養しストックしたものを使用した。分離・培養はPRIME-XV MSC XSFM MDF1 (富士フイルム和光純薬 #552-37463) を用いて行った。

培養

細胞は、6 well plateに播種し、n=3で行った。培地はMDF1あるいはMDF1にiMatrix®-511 (Matrixome #892 012) やUltraGRO™-PURE GI (AventaCell #HPCHXCGLI05) を添加したものを用いた。細胞はTrypLE™ Select (Thermo Fisher #12563029) で回収し、Vi-Cell™ XR (Beckman Coulter) で細胞数を計測した。各実験で、4継代の培養を行い、以下の式に従ってPopulation Doubling Level (PDL) を算出し、グラフにプロットした。
$$PDL = (\log N - \log N_0) / \log 2 \quad (N = \text{回収時の細胞数}, N_0 = \text{播種時の細胞数})$$

※各種培養プレートの製造元に関しては、弊社まで直接お問い合わせください

Results

各種培養プレートの検討

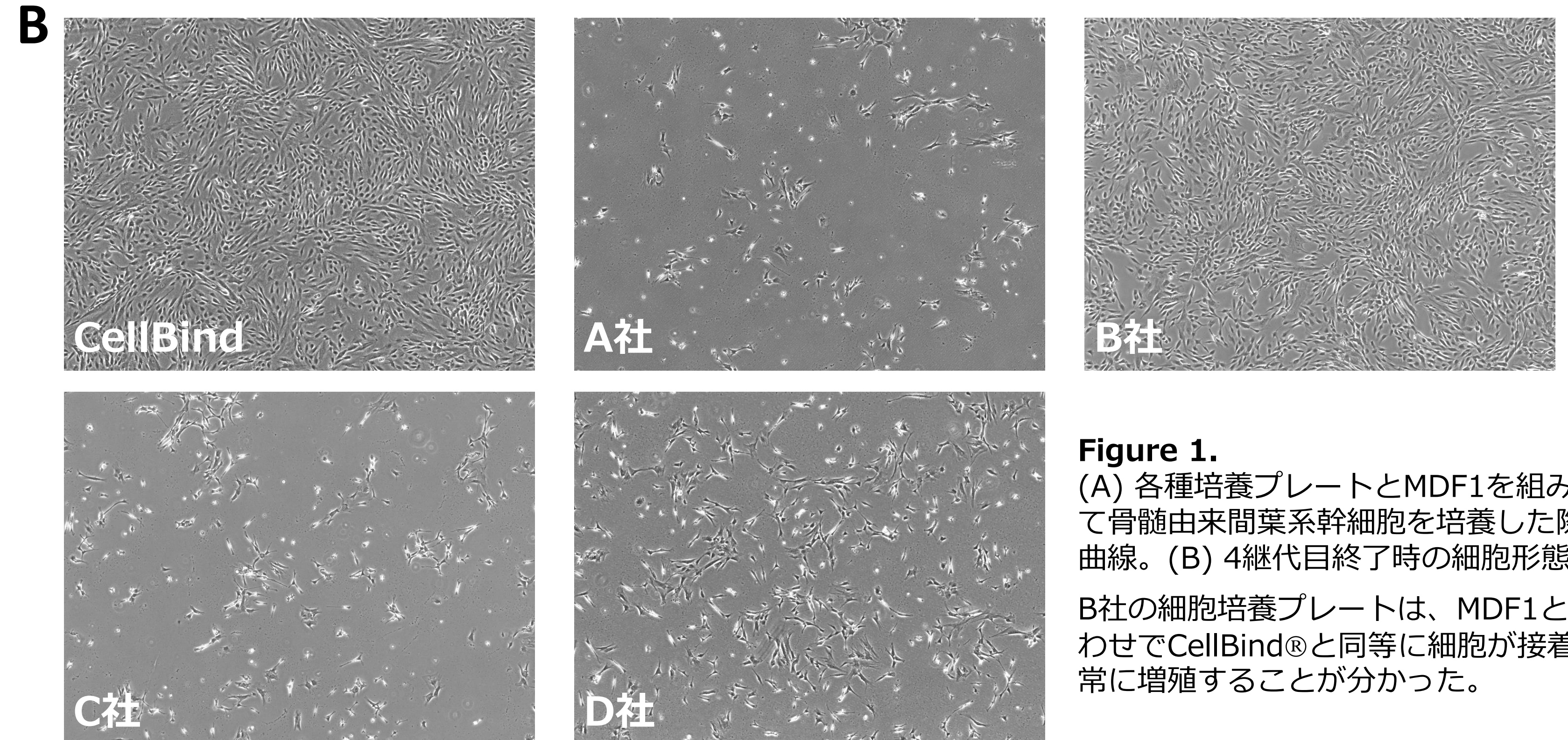
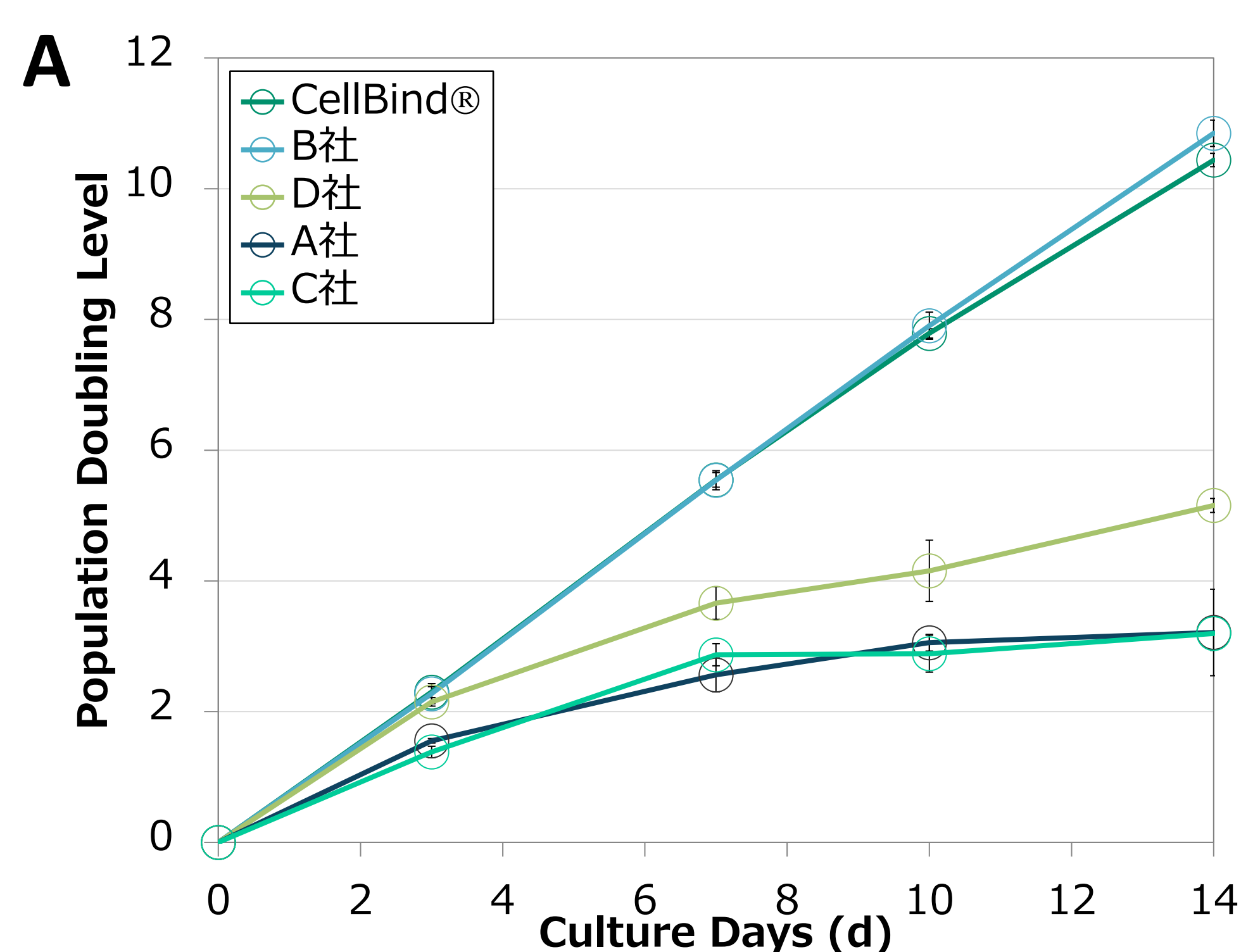


Figure 1.
(A) 各種培養プレートとMDF1を組み合わせ、骨髄由来間葉系幹細胞を培養した際の増殖曲線。(B) 4継代目終了時の細胞形態。
B社の細胞培養プレートは、MDF1との組み合わせでCellBind®と同様に細胞が接着し、正常に増殖することが分かった。

各種培養プレートとiMatrixを組み合わせた検討

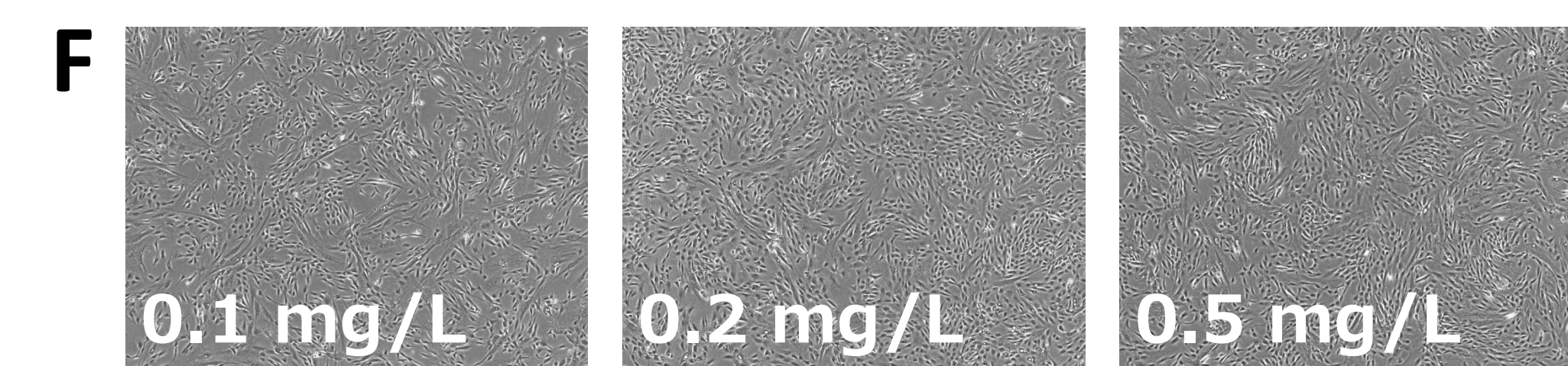
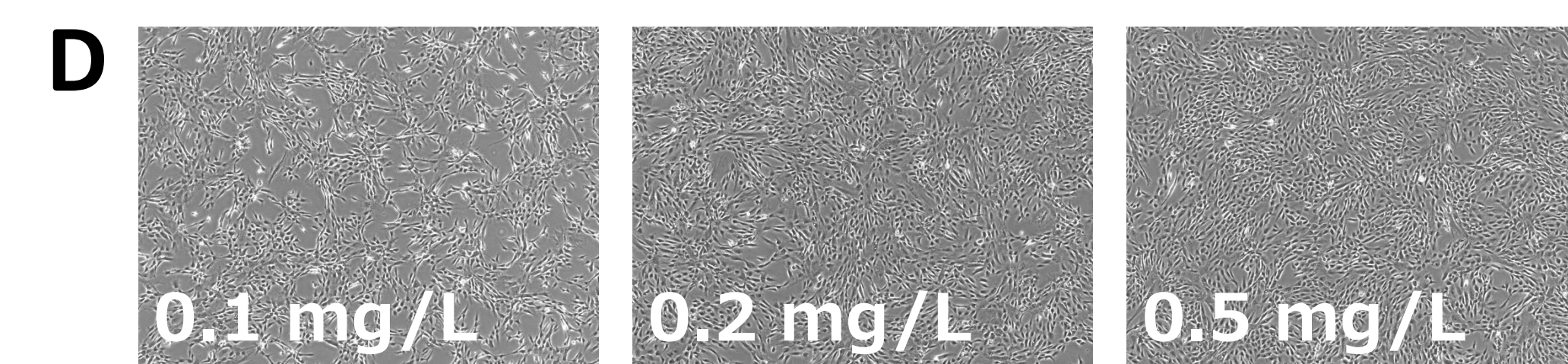
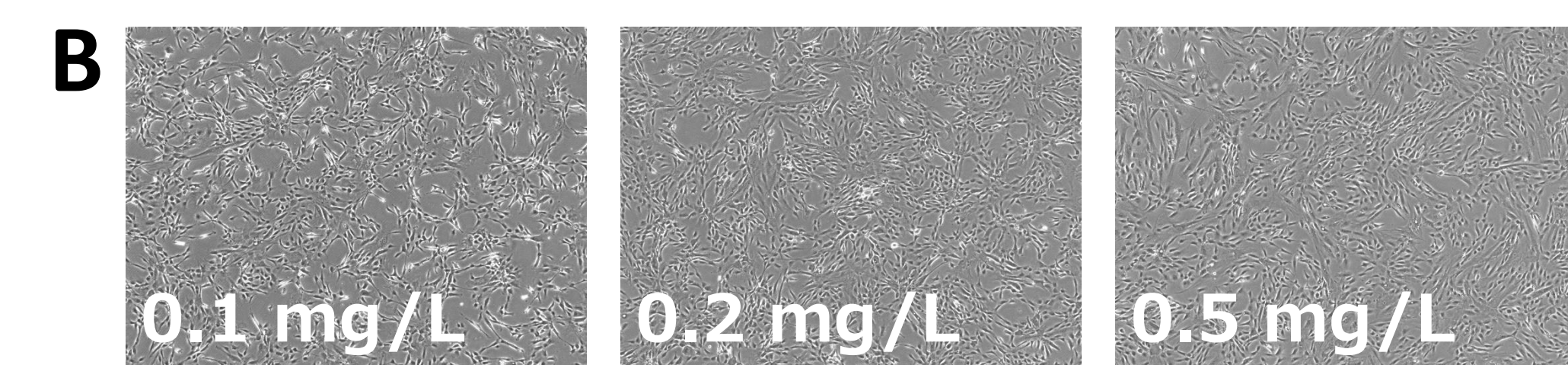
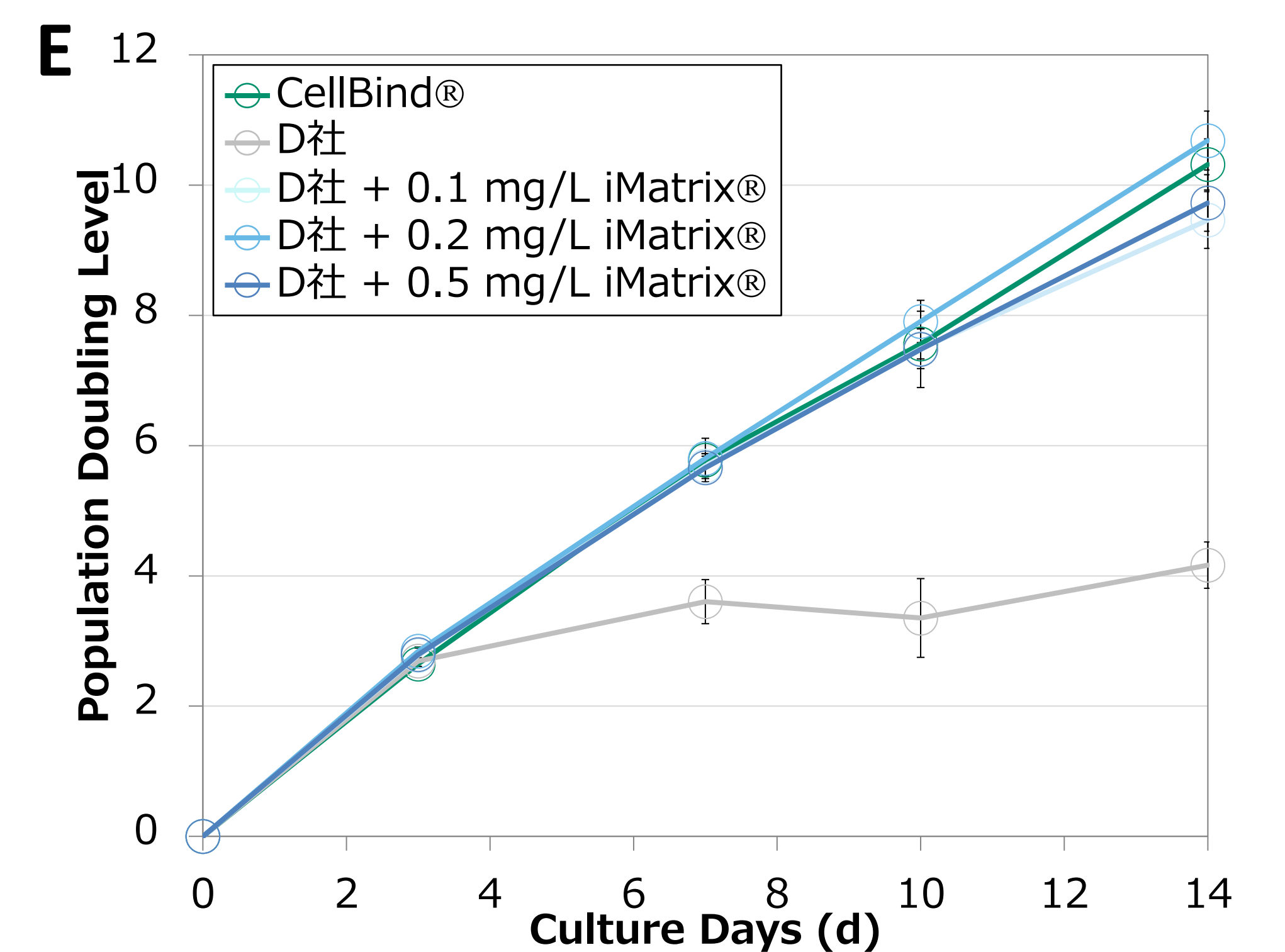
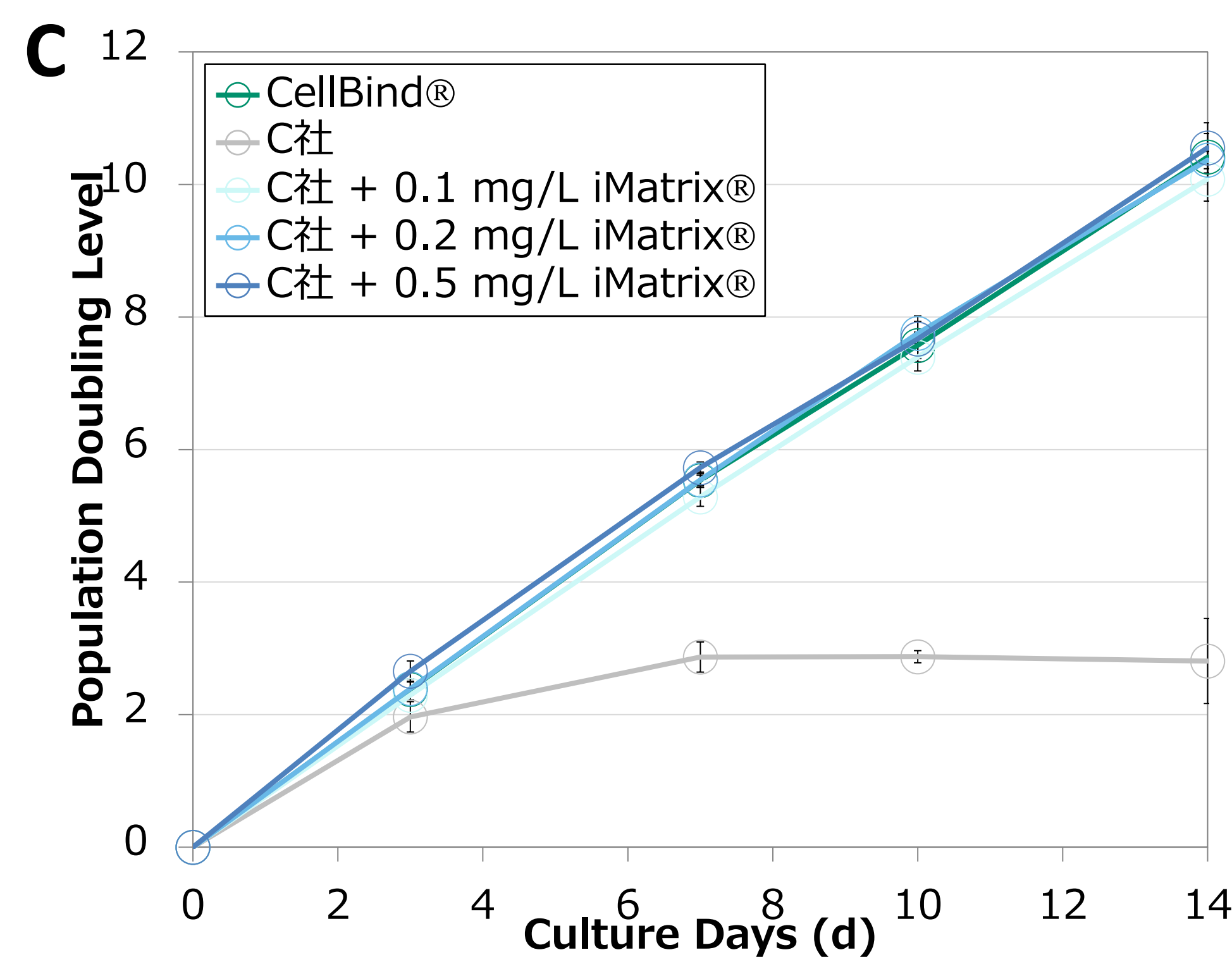
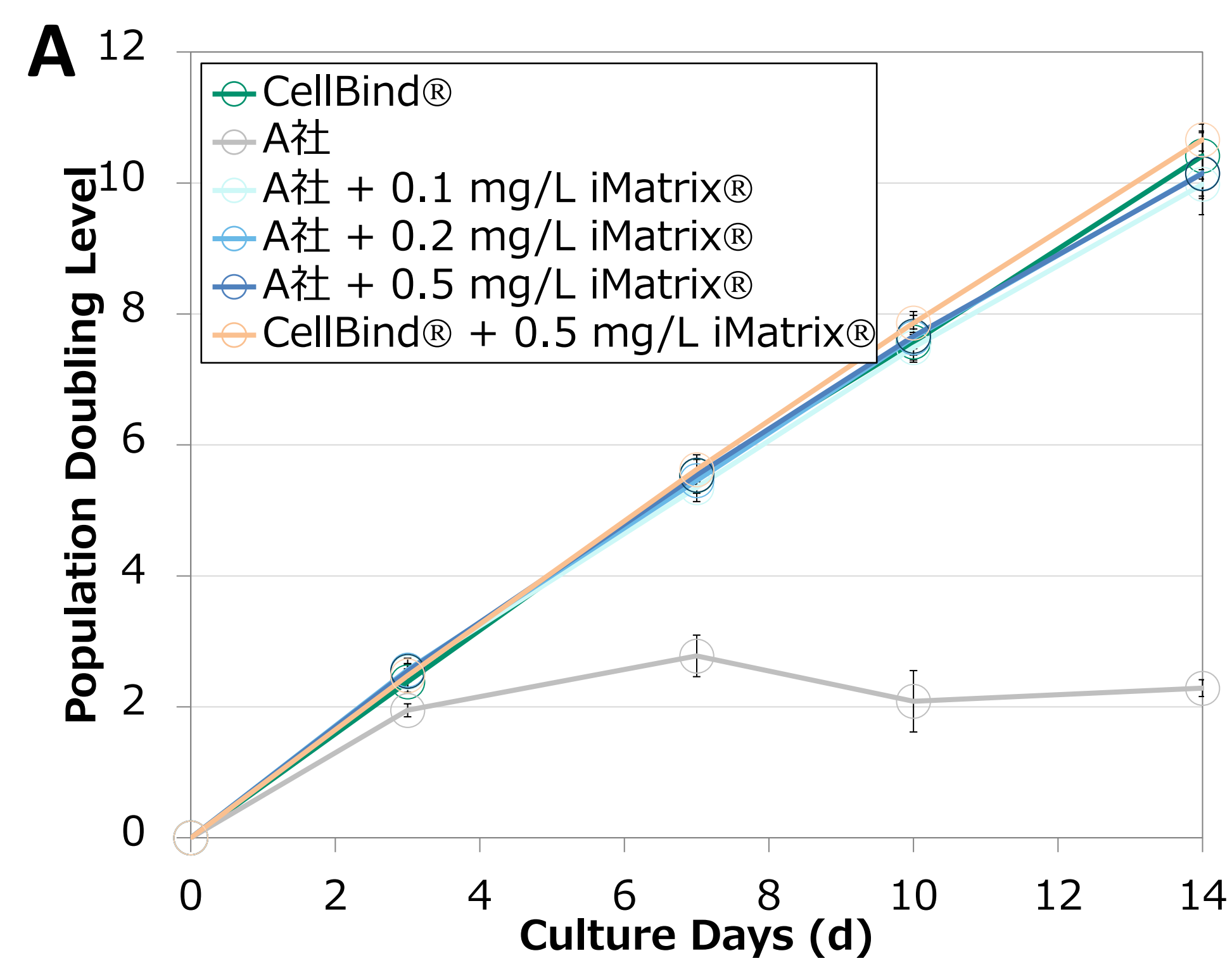


Figure 2.
(A, C, E) MDF1に0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/LとなるようにiMatrix®を添加し、各プレートで培養した際の増殖曲線。(B, D, F) 図に示した濃度のiMatrix®を添加し、培養した細胞の4継代目終了時の細胞形態。
いずれのプレートも、iMatrix®を添加することで培養が可能となった。濃度が高いほど、細胞接着が強固になった扁平な細胞が観察されるようになるが、0.1 mg/Lの添加でもCellBind®と同程度の細胞が得られた。

血小板抽出物を用いた検討

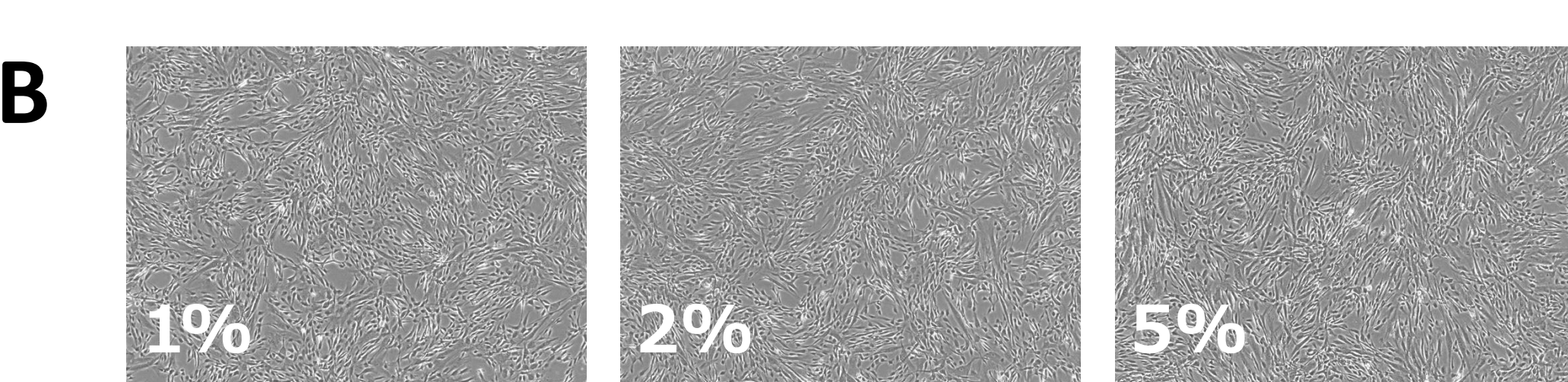
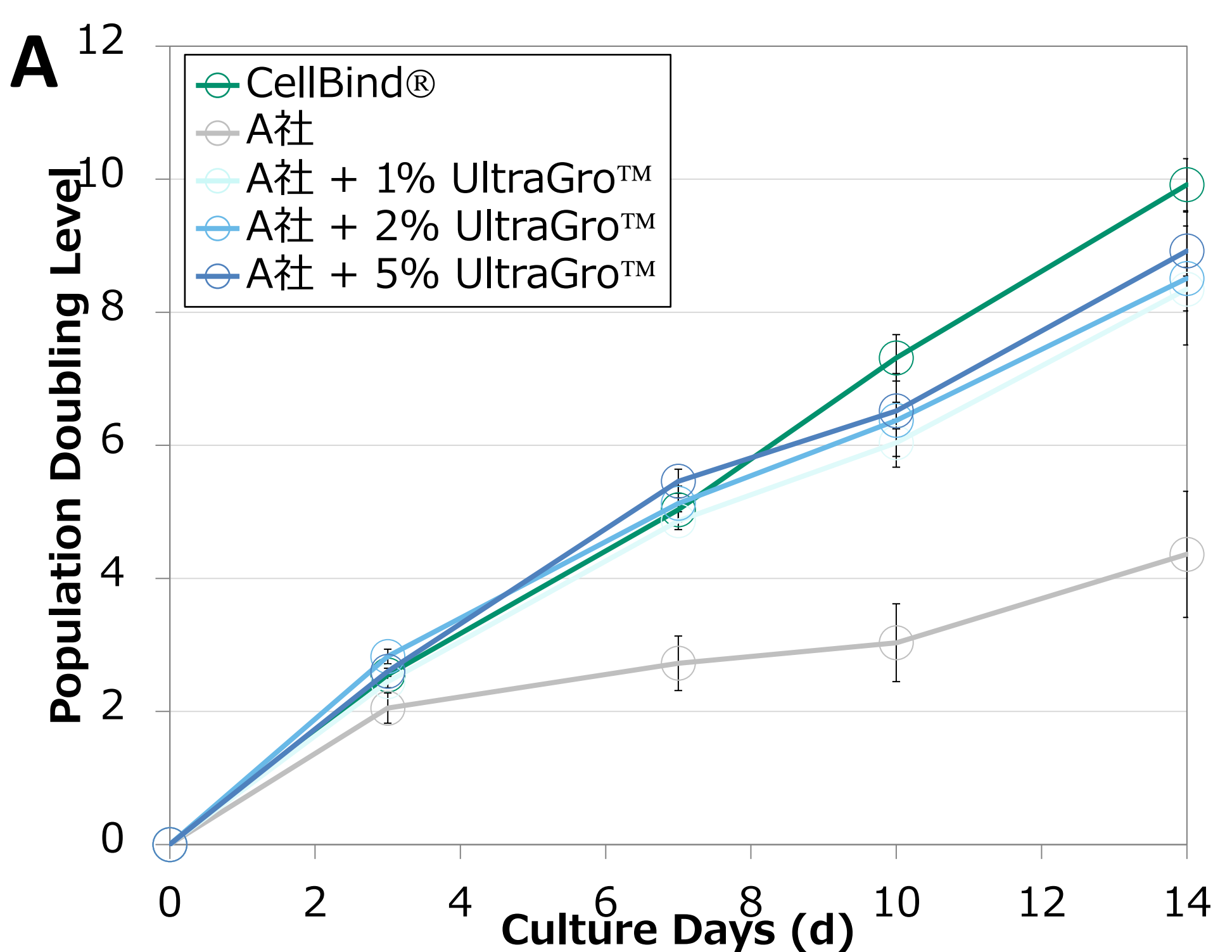


Figure 3.
(A) MDF1に1%、2%、5%となるようにUltraGro™ (血小板抽出物) を添加し、A社製のプレートで培養した際の増殖曲線。(B) 図に示した濃度の血小板抽出物を添加し培養した細胞の、4継代目終了時の細胞形態。
血小板抽出物添加により、CellBind®以外のプレートとMDF1を組み合わせた条件での細胞接着が促され、培養が可能であった。

なお、Figure 1から3で示したすべての条件において、細胞表面マーカーCD90およびCD105が陽性であり、CD45が陰性であることを確認した (データは未提示)。

Conclusions

- CellBind®以外では、B社製の培養プレートで、MDF1を用いた間葉系幹細胞の培養が可能であった。
- B社製以外のプレートに関しても、生物由来原料基準を満たすiMatrix®やUltraGro™を組み合わせることで、MDF1を用いた培養が可能であった。

COI

筆頭演者は、過去1年間 (1月～12月) において、本演題の発表に関して開示すべきCOIはありません。