

海洋微細藻由来抗腫瘍性物質の大量生産技術の開発と創薬研究

池部慶太（高知県海洋深層水研究所）・矢野雄也・隅田隆・川北浩久（高知県工業技術センター）・西坂太樹・熊谷慶子・津田正史（高知大学）

1 背景と目的

海洋産アンフィジニウム属 (*Amphidinium*) 渦鞭毛藻から得られるマクロリド化合物は、新しいタイプの抗がん剤リード化合物として期待されている。平成21年（2009年）11月より200L規模の培養を開始し、平成23年（2011年）7月に4t規模（1t×4基）の培養に成功した。この規模は、渦鞭毛藻の培養において世界最大である。現在、抗腫瘍性を示す新規化合物を見つけ出し、機能解明に取り組んでいる。

本研究では、アンフィジニウム属渦鞭毛藻を大量培養した際に、細胞数の計数と温度測定を行うとともに培地成分を分析し、得られた結果から渦鞭毛藻の安定的かつ効率的な培養条件を探ることを目的とした。

2 材料と方法

2.1 培養

PES添加深層水培地を使用した。20L→200L→1tの順で、アルテミア水槽を使用して攪拌培養を行った。深層水は0.01 μ mの中空糸UF膜（CP20-1010-B、東レ製）でろ過した。

2.2 水温測定と細胞数の計数

データロガー（Tidbit v2、HOBO製）を使用した。4~20 μ Lの培養液を抜き取り、液中の細胞数を計数し、その数値を基に全数を算出した。

2.4 培地成分分析

栄養塩分析はAutoAnalyzer II（ブラン・ルーベ製）を使用し、分析方法はNO₂...スルファニルアミド・ナフチルエチレンジアミンによる吸光

光度法、NO₃+NO₂...カドミウム・銅カラム還元法（+スルファニルアミド・ナフチルエチレンジアミンによる吸光光度法）、PO₄...モリブデン青吸光光度法、NH₄...インドフェノール法、SiO₂...モリブデン青吸光光度法とした。

その他金属元素の分析はVista Pro（SEIKO製）を使用し、分析方法はICP（高周波誘導結合プラズマ発光分析）とした。

3 結果と考察

3.1 培養日数と最終細胞数

200L培養においては、平均培養日数15.9日で、平均細胞数約79.9億個、最高細胞数約116.5億個、最低細胞数約36.0億個であった。1t培養においては、平均培養日数18.0日で、平均細胞数約259.5億個、最高細胞数約407.5億個、最低細胞数約125.0億個であった。

3.2 細胞数/mLと温度・培養日数の関係

200L培養と1t培養における細胞数/mLと温度（℃）の関係を見ると、細胞数のピークが25℃付近にあるようであった（図1）。200L培養と1t培養における細胞数/mLと培養日数の関係は、培養日数が長くなるにつれて細胞数が増える傾向があった（図1）。温度は25℃付近、培養日数は特に200L培養においては長い方が細胞数/mLが増加するものと考えられた。

3.3 培地成分の推移

NO₃は減少傾向を示した。NO₂は増加傾向を示す、もしくは低く推移した（表1）。NH₄は低く推移する、もしくは一時的に増加してから減少した（表1）。一般的な植物の硝酸同化においては、

硝酸イオンは高エネルギーの亜硝酸イオンにまず変換され、さらに高エネルギー形態であるアンモニウムイオンに変換された後に、グルタミンのアミド基へ取り込まれる (Taiz & Zeiger 2004)。硝酸イオンが減少したので、渦鞭毛藻も硝酸イオンを吸収し、同化しているものと思われる。しかし、硝酸イオンの減少よりも少ないが、亜硝酸イオンが増加することがあるため、同化途中の亜硝酸イオンが、溶出もしくは排出されることがあるようである。アンモニウムイオンは一時的に濃度が高まることがあるため、同化途中のアンモニウムイオンが、溶出もしくは排出されることがあるようである。

PO₄とSiO₂も減少傾向を示した (表1、2)。Fe、Mn、Znも減少傾向を示した (表2)。

3.4 増殖細胞数/Lと減少傾向を示した培地成分の消費量 (mg/L) の関係

増殖細胞数/L (最終細胞数/L - 培養開始時細胞数/L) と減少傾向を示した培地成分の消費量 (mg/L) の関係にはばらつきがあり、顕著な傾向は見い出せなかった (図2)。

4 まとめ

25℃付近で培養した時に、最も効率良く増殖するようであり、培養日数が長い方 (約2週間<約3週間) が、細胞数が増える傾向がある。NO₂とNH₄以外の測定項目は、減少傾向を示した。増殖細胞数/Lと培地成分の減少量 (mg/L) の関係にはばらつきがあり、顕著な傾向は見い出せなかった。

今後は、培養温度を25℃付近に安定させる方法を検討するとともに、培地の濃度や培養日数を調節することで、収量増加を目指したい。渦鞭毛藻は上記の培地成分を吸収して増殖している可能性があるが、各培地成分の消費量にはばらつきがあった。培地の改良によって効率的な培養方法を確立するためには、温度等の培養条件を一定にし、細胞の増殖量と培地成分の消費量を比較検討する必要があるだろう。

5 参考文献

Taiz & Zeiger 植物生理学 第3版 培風館 2004

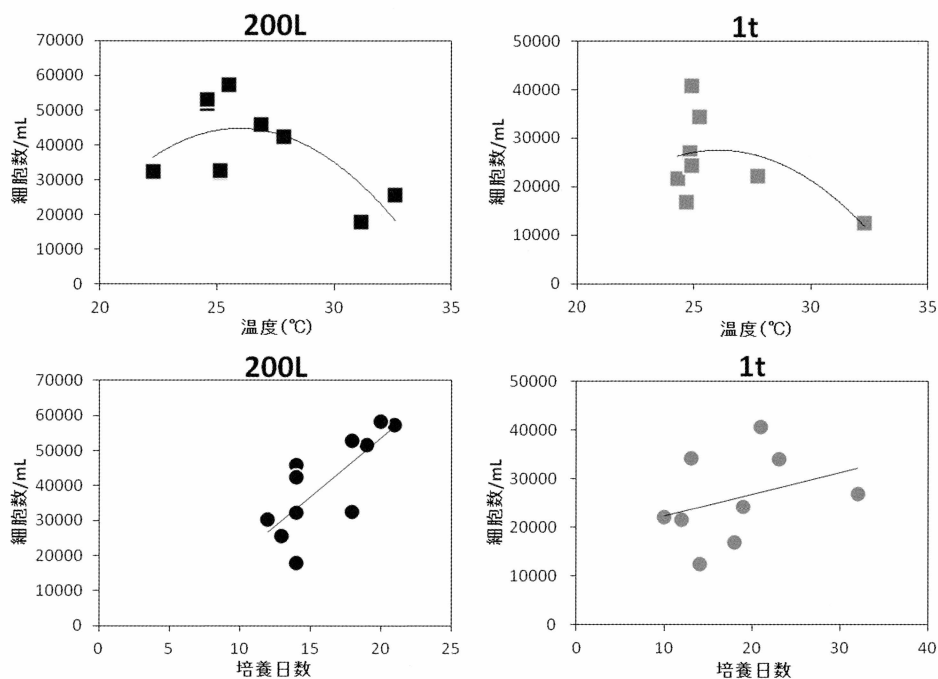


図1 200L培養と1t培養における細胞数/mLと温度 (°C)・培養日数の関係

表1 培地中のNO₃、NO₂、NH₄、PO₄の推移の傾向

培養開始日		容量(L)	NO ₃	NO ₂	NH ₄	PO ₄
2010	4.23.	200	減少	増加	傾向なし	傾向なし
	4.23.	200	減少	増加	傾向なし	傾向なし
	5.7.	1000	減少	増加	傾向なし	傾向なし
	5.21.	200	傾向なし	低く推移	増加して減少	増加して減少
	6.8.	200	低く推移	傾向なし	減少	減少
	6.8.	1000	減少	低く推移	増加	減少
	6.22.	200	傾向なし	減少	低く推移	低く推移
	7.6.	1000	減少	増加	増加して減少	低く推移
	7.23.	200	減少	増加	増加して減少	減少
	8.4.	200	減少	増加	増加して減少	減少
	8.20.	200	減少	増加	増加して減少	減少
	9.2.	1000	減少	増加	増加して減少	減少
	10.4.	200	減少	低く推移	低く推移	低く推移
	10.25.	1000	減少	低く推移	低く推移	減少
12.10.	1000	減少	低く推移	低く推移	減少	
2011	1.12.	200	減少	減少	低く推移	減少
	2.4.	1000	減少	減少	低く推移	低く推移
	2.24.	200	減少	低く推移	低く推移	減少
	3.15.	1000	減少	増加	増加して減少	減少
	4.6.	200	減少	増加	低く推移	低く推移
	4.27.	1000	減少	低く推移	低く推移	減少
	5.12.	1000	減少	増加	増加	減少

表2 培地中のSiO₂、Fe、Mn、Znの推移の傾向

培養開始日		容量(L)	SiO ₂	Fe	Mn	Zn
2010	4.23.	200	傾向なし	減少	減少	NT
	4.23.	200	減少	減少	減少	NT
	5.7.	1000	減少	減少	減少	NT
	5.21.	200	減少	減少	減少	傾向なし
	6.8.	200	増加して減少	低く推移	増加して減少	増加して減少
	6.8.	1000	傾向なし	減少	減少	減少
	6.22.	200	減少	低く推移	低く推移	低く推移
	7.6.	1000	減少	減少	減少	減少
	7.23.	200	減少	低く推移	減少	低く推移
	8.4.	200	減少	減少	減少	増加して減少
	8.20.	200	減少	減少	減少	減少
	9.2.	1000	減少	増加して減少	減少	減少
	10.4.	200	減少	NT	NT	NT
	10.25.	1000	減少	NT	NT	NT
12.10.	1000	減少	NT	NT	NT	
2011	1.12.	200	傾向なし	NT	NT	NT
	2.4.	1000	傾向なし	NT	NT	NT
	2.24.	200	減少	NT	NT	NT
	3.15.	1000	傾向なし	NT	NT	NT
	4.6.	200	減少	低く推移	減少	減少
	4.27.	1000	減少	減少	減少	減少
	5.12.	1000	傾向なし	減少	減少	減少

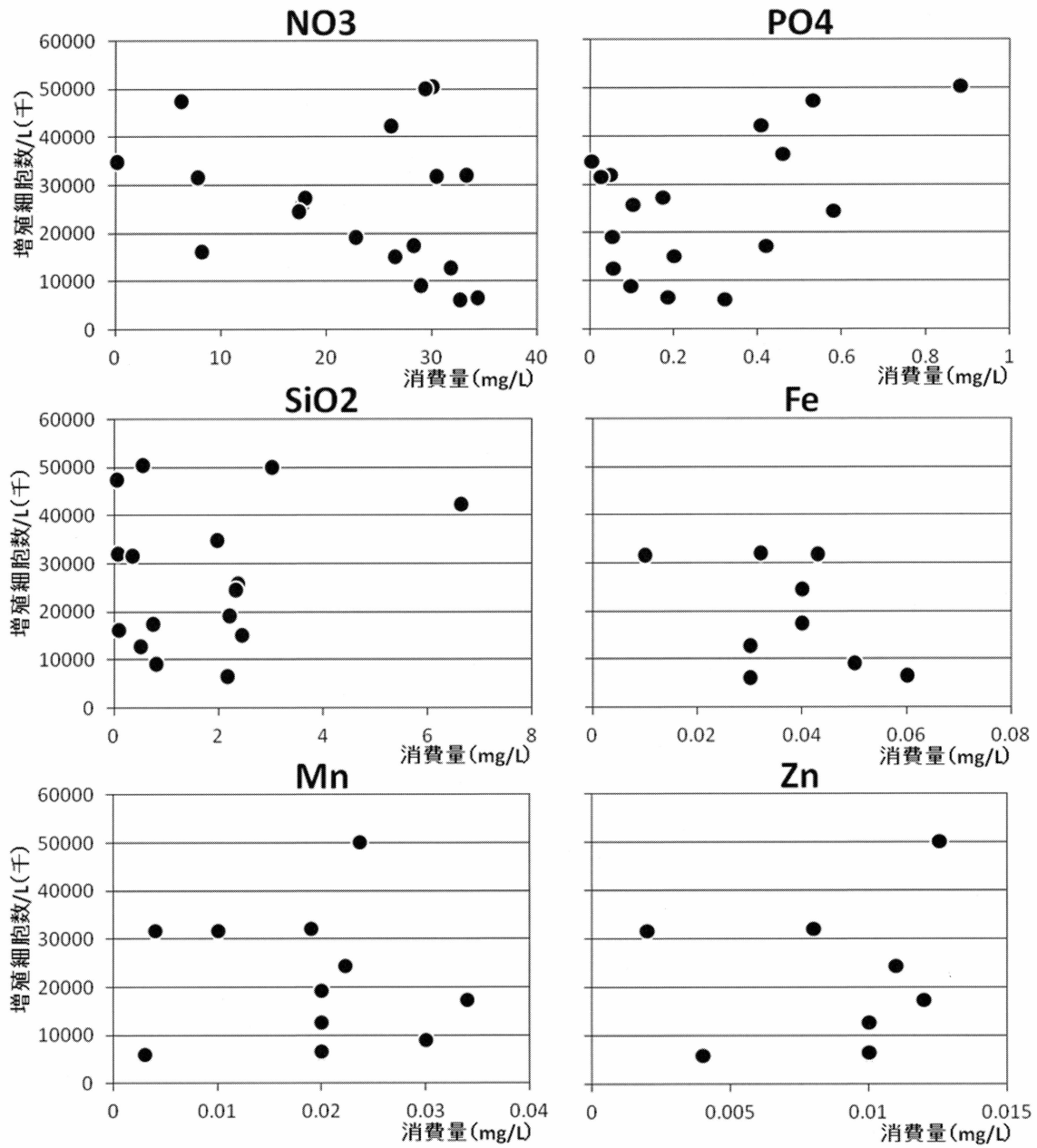


図2 増殖細胞数/Lと減少傾向を示した培地成分の消費量 (mg/L) の関係