生体組織及び臓器の新規保存液に関する研究開発*1
（課題対応新技術研究開発事業）

上　野　義　栄*2　河　村　眞　也*3
野　田　正　司*4　早　川　　潔*5
株式会社ファーマフーズ研究所
株式会社ビーエムジー

1　目　的

近年、医学の進歩により、組織・臓器の移植の症例が増加している。しかし、ドナーから摘出された組織及び臓器は、的確な適応者がいる場合を除き、必ずしも直ちに移植されていないのが現状である。この場合、組織・臓器は保存液中に保存されているが、その保存期間は数時間から数日間と極めて短く、十分とは言い難い。さらにＥＳ細胞等再生医療技術を用いた手法により作られた組織や、その元になる幹細胞等の保存に関する研究は少なく、技術進歩のためにも保存技術は早急に確立されるべき問題である。京都大学再生医科学研究所 玄 丞烋 助教授により、カテキンが細胞のタンパク質と結合して、細胞増殖のスイッチのon－offに関与して増殖を自由自在に制御できる現象が見いだされた[1)]。また、カテキンは抗酸化作用、両親媒性、タンパク質への吸着性に優れ、細胞毒性も少ない。この様な作用を有するカテキンを臓器保存液に応用できれば、臓器の長期保存が可能となる。この新規な臓器保存液の開発を目指し、中小企業総合事業団「課題対応新技術研究開発事業」として平成14年度から平成15年度まで、京都大学再生医科学研究所 玄 丞烋助教授の指導、協力の下、財団法人京都産業21を管理法人とし、京都府中小企業総合センター、株式会社ファーマフーズ研究所及び株式会社ビーエムジーの３機関が共同研究を実施している。平成14年度は、カテキン含有培養液を用いたマウス樹立細胞株（L929）及びヒト歯根膜細胞の培養試験、ラットの角膜及びモルモットの歯根膜の保存性評価等を行った。当センターは、カテキンを添加したマウス樹立細胞株用培養液（イーグルＭＥＭ培地）及びヒト歯根膜細胞用培養液（ダルベッコＭＥＭ（Low）培地）の安定性を確認するするために試作培養液の保存中の色調変化を検討した。

2　研究分担

カテキンの精製及びカテキン含有培養液の試作は株式会社ファーマフーズが、試作培養液による培養試験及び組織の保存試験は、株式会社ビーエムジーが、試作培養液の安定性試験は当センターが分担した。また、その他については、株式会社ファーマフーズ及び株式会社ビーエムジーがそれぞれ担当した。

＊1：平成14年度課題対応新技術研究開発事業（中小企業事業団）研究開発成果報告書に掲載
＊2：研究開発課　主任
＊3：研究開発課　主任研究員
＊4：研究開発課　専門員
＊5：研究開発課　課長（現在株式会社福寿園CHA研究センター）

３　実験結果及び考察（当センター実施分）

３．１　試作カテキン

茶葉抽出物よりカラムクロマトグラフィーで精製したエピガロカテキンガレート（EGCg）を主成分とする試作カテキン、EGCG60（EGCg60%含有）及びEGCG95（EGCg95%含有）を使用した。（株式会社ファーマフーズより提供されたものを使用した）

３．２　カテキン水溶液の保存中の吸光度変化

カテキンは、光や熱により着色反応を起こす。そのため、試作カテキンEGCG60（2.5mg/ml）を紫外線照射又はオートクレーブ処理し、吸光度の測定を行った。結果は、図１のとおりであり、450nm付近の吸収が増大した。カテキン溶液中のカテキンは、保存中に450nm付近の吸収が増加することが予想された。

試作カテキン２種（EGCG60、EGCG95）の水溶液を100又は250μg/mlに調整し、温度（４℃、室温)条件及び遮光の有無による４週間保存した。保存中の吸光度の経時変化は少なく、保存条件による差異ももわずかであった。

３．３　カテキン含有イーグルMEM培地の吸光度変化

100又は250μg/mlの試作カテキン２種（EGCG60、EGCG95）を含むイーグルＭＥＭ培地を、温度（４℃、室温）条件及び遮光の有無により、４週間保存した。保存による吸光度の変化は、図２（a～d）の通りである。カテキン含有

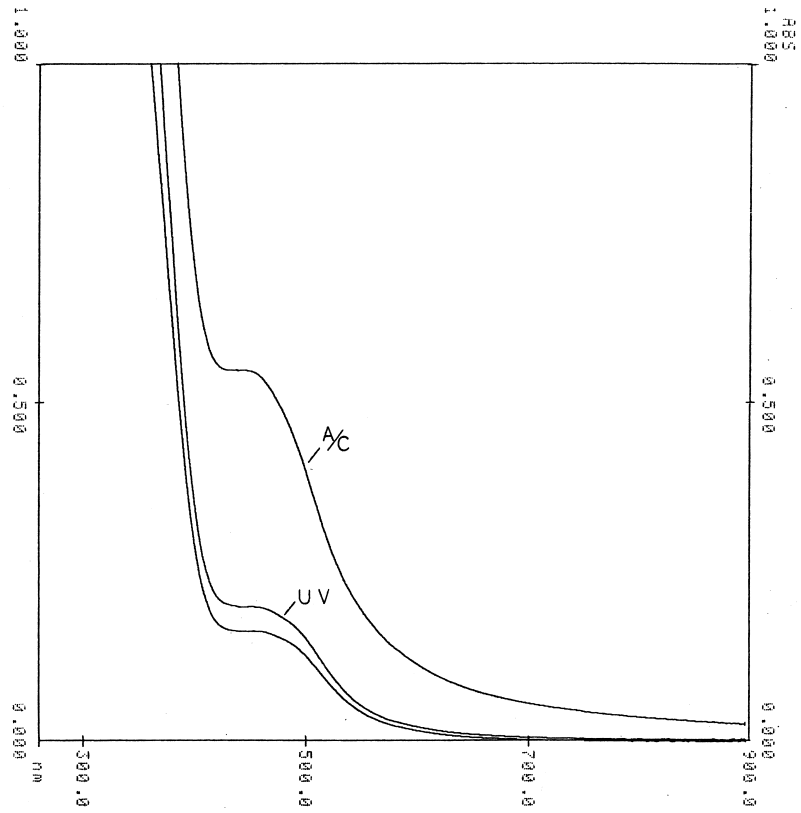

図１　EGC60水溶液の紫外線照射及びオートクレーブ処理による吸光度への影響

A／C：オートクレーブ（121℃、15分）処理
UV：紫外線照射

培地調整当初は、430nmと560nm付近に吸収が見られる。それぞれの条件で保存後の培地は、430nm付近の吸収が減少し、560nm付近の吸収が増加した。また、温度条件及び遮光の有無による差は少なかった。４週間保存後の吸収波長パターンの変化により、培地調整時よりも色調が赤紫から赤に若干変化していることが示された。また、カテキンの保存中の変化を表す吸光度（450nm）の経時変化は、わずかであり、培地の色調の変化は培地中のカテキン以外の成分による吸光度の減少の影響が大きいと思われる。

３．４　カテキン含有ダルベッコMEM（Low）培地の吸光度変化

100又は250μg/mlの試作カテキン２種（EGCG60、EGCG95）を含むダルベッコＭＥＭ（Low）培地を、温度（４℃、室温）条件及び遮光の有無により、４週間保存した。保存による吸光度の変化は、図３（a～d）の通りである。カテキン含有イーグルＭＥＭ培地と同様、カテキン含有培地調整当初は、430nmと560nm付近に吸収が見られる。それぞれの条件で保存後の培地は、430nm付近の吸収が減少し、560nm付近の吸収が増加した。また、温度条件及び遮光の有無による差は少なかった。４週間保存後の吸収波長パターンの変化により、培地調整時よりも色調が赤紫から赤に若干変化し、カテキン含有イーグルＭＥＭ培地と同様であった。また、カテキンの保存中の変化を表す吸光度（450nm）の経時変化は、わずかであり、培地の色調の変化は培地中のカテキン以外の成分による吸光度の減少の影響が大きいと思われる。

５　文　献

１）玄　丞烋：ザ・クインテッセンス, 20(2), 3-14（2001）

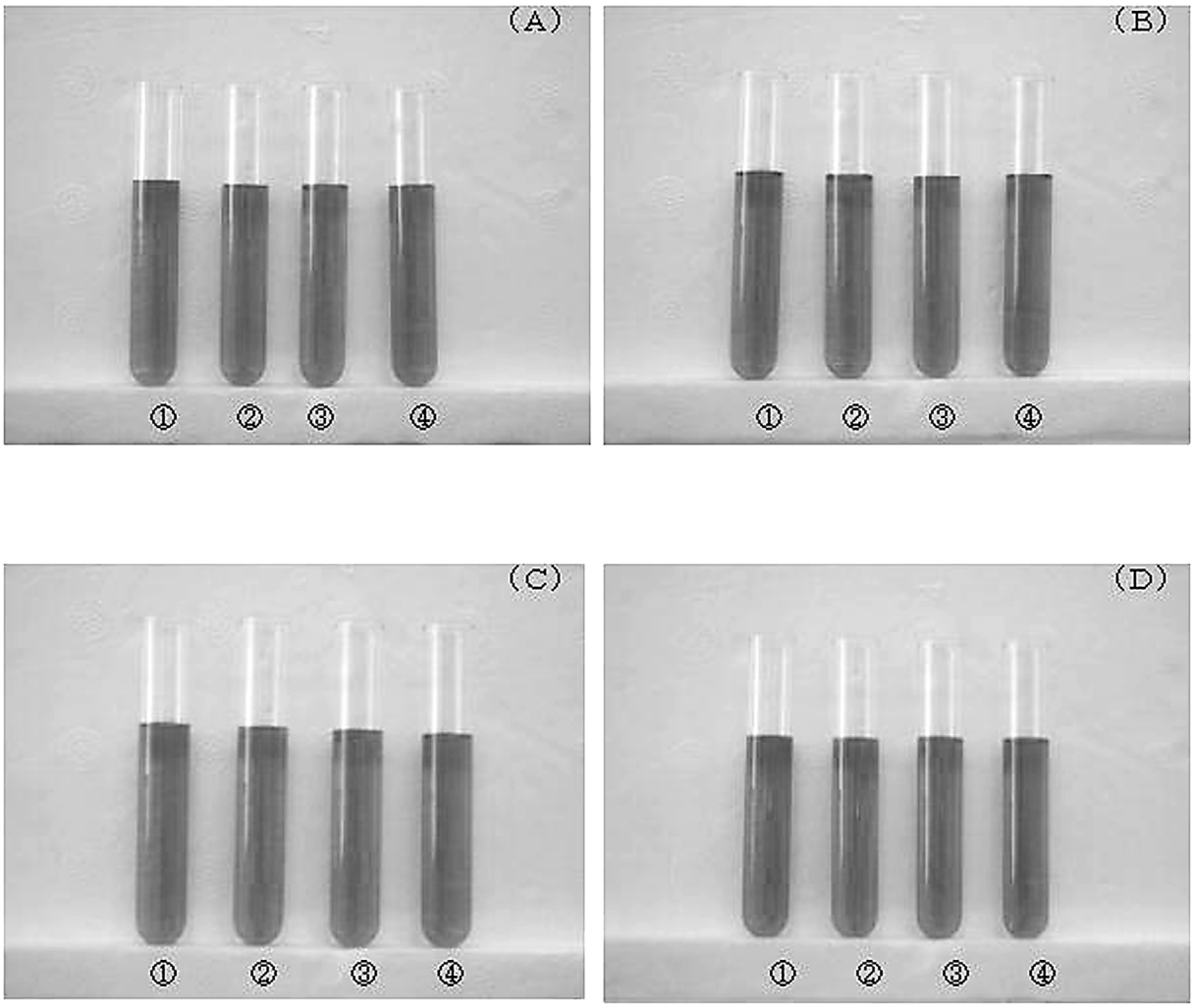

図２　EGCG60、EGCG95含有イーグルＭＥＭ培地の保存条件による影響

（A）EGCG60（100μg/ml）
（B）EGCG60（250μg/ml）
（C）EGCG95（100μg/ml）
（D）EGCG95（250μg/ml）

① ４℃、４週間保存
② ４℃、遮光、４週間保存
③ 25℃、４週間保存
④ 25℃、遮光、４週間保存

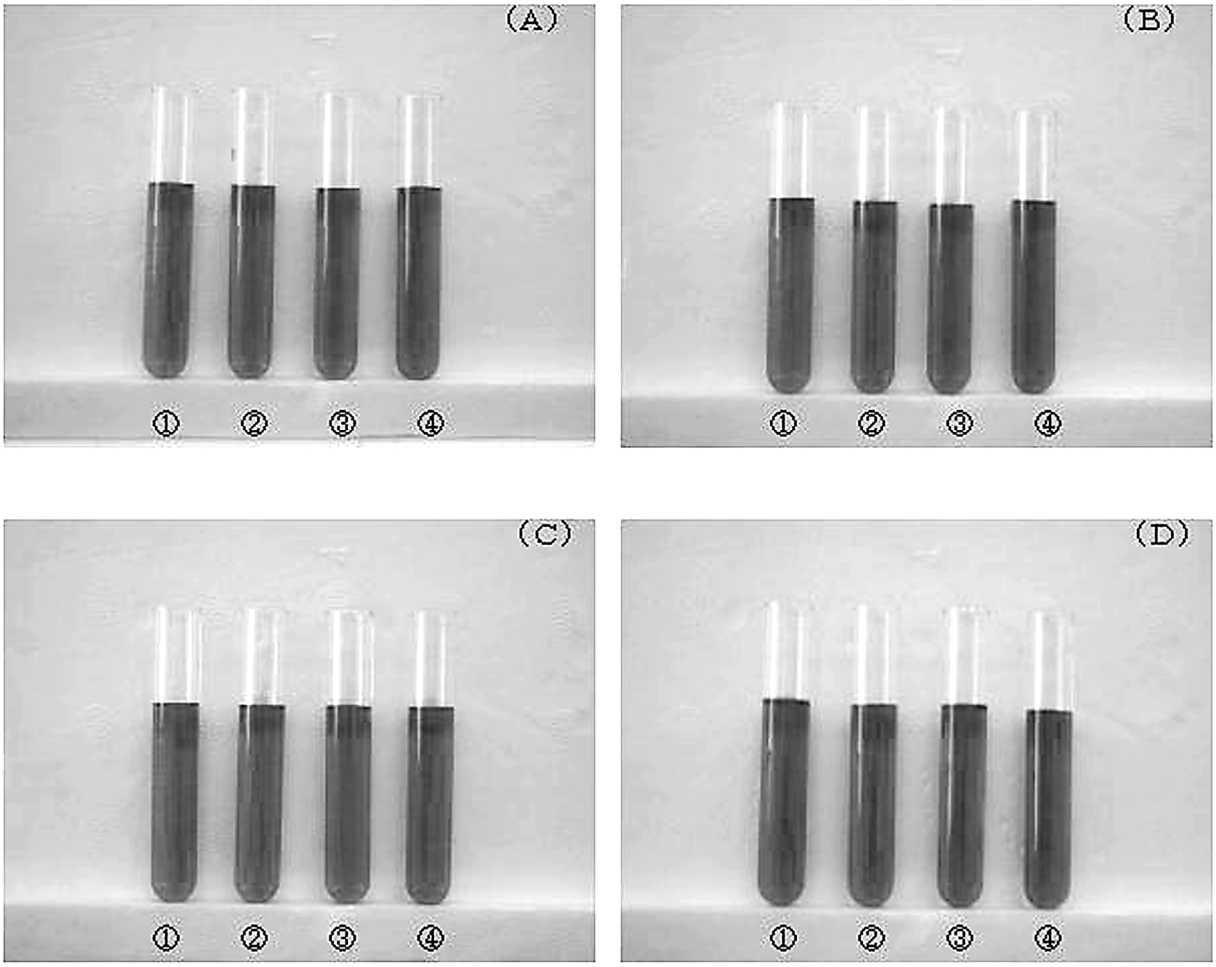

図３　EGCG60、EGCG95含有ダルベッコMEM（Ｌow）培地の保存条件による影響

（A）EGCG60（100μg/ml）
（B）EGCG60（250μg/ml）
（C）EGCG95（100μg/ml）
（D）EGCG95（250μg/ml）

① ４℃、４週間保存
② ４℃、遮光、４週間保存
③ 25℃、４週間保存
④ 25℃、遮光、４週間保存