

Bio XG-310の
培養ヒト白血病細胞に対する
増殖抑制効果検定報告書

原宿クリニック 院長
免疫機能検査科
科長 理学博士

斉藤 辰子
佐藤 静夫
清水 登茂子

目 的

患者より分離し、培養系で悪性増殖する白血病細胞株を用いて、BioX G-310の、同細胞の増殖に与える影響を検定した。

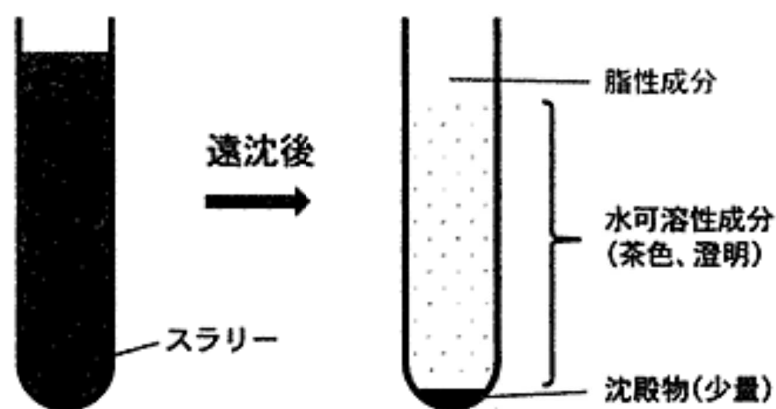
BioX G-310は、カプセルに入った水に不溶性の脂性ペースト状物質で、この状態では培養白血病細胞に対する増殖抑制試験は厳密ではない。従って、BioX G-310を検定可能な水溶液にするために次の三つの方法を試みた。

- 1) 界面活性剤による脂性成分の除去
- 2) エタノールによる抽出
- 3) 比重遠沈を応用した脂性成分と水溶性成分の分離

- ・ 界面活性剤はバイオテクノロジー分野で広く用いられているSDS(ソディウム ドデシルサルフェート)、あるいはDOC(デオキシコーレート)を選んだ。

ペースト状のBioX G-310を水と混ぜ、それにSDSあるいはDOCを、全体量に対して0.5～3.0%になるように加えて抽出を試み、水可溶性成分を得た。しかし、この液をヒト白血病細胞に加えた場合、細胞の形状に界面活性剤による障害が認められた。

- ・ エタノール抽出では、抽出液からエタノールを除いた時に不溶成分が現れた。
- ・ 比重遠沈法の応用。BioX G-310に等量の精製水を加え、よく混和し、湯浴で50～55℃に加温すると、ペーストはスラリー(かゆ)状になり、粘度が小さくなった。この状態で遠沈したところ、スラリーは比重に従って次の図のように分離した。



分離した水可溶性成分をマイクロピペットで吸い取り、性状を調べたところ、pH=5.6、粘性は比較的、強かったが、精製水による希釈でほとんどなくなった。

以上、三つの方法を検討した結果、界面活性剤およびエタノールで調製した試料は、当検定には不適と判断して、遠沈法による調製法を採用し、より安定した分離の条件を検討した。

検定試料の調製

以上の結果により、検定試料は比重遠沈法により調製した。

すなわち、BioXG-310をカプセルから取り出し、ペースト1gに対して精製水9gを加え、よく混ぜスラリー状にした。更に、湯浴にて50～55℃に加温し、冷えないうちに透明な遠沈管に移して、毎分3,000回転、10分間遠沈した。

遠沈により、脂性成分は上面に浮き水可溶性成分を含んだ液と分離する。この水可溶性成分をマイクロピペットで吸い取り、加温、遠沈を二度繰り返し、残留している脂性成分を除いた。後、水可溶性成分液を0.8ミクロンと0.45ミクロンのミリポアフィルターで除菌し、更に0.22ミクロンのフィルター(MILLEX GV)でろ過し、ヒト白血病細胞増殖抑制の検定試料とした。

同試料のpHは5.6～6.0だったが、緩衝作用は弱いので、pHを修正せずに検定に供した。

検定に用いた白血病細胞

悪性リンパ性白血病と診断された、30代の患者(男性)の胸水より分離して培養し、株として確立した、B-リンパ球タイプの白血病(リンフォーマ)細胞である。

この細胞は、牛胎児血清15%加 RPMI-1640培地、WATER JACKETED CO2 /MULTI GAS INCUBATOR、37℃で培養した。

検定方法

増殖抑制効果の検定には、1ミリリットル(以下mlと示す)当たり、白血病細胞80,000個に調整した培養液10mlを、50mlのファルコンフラスコ(培養面積25平方センチ)

に入れ、これに、試料を無菌状態で添加して検定群とし、2、4、6日間培養後における細胞数(ml当たり個数)を、対照群と比較した。

検定各群に加えた試料は0.25, 0.5, 0.75, 1.0mlで、対照群は試料の代わりに同量の生理食塩液を添加した。

結果

実験各群の培養2、4、6日目における細胞数を表1、図-1に示す。

表1

	開始	2日後	4日後	6日後
対象群	80,000	300,000	1,500,000	2,000,000
0.25ml加群	80,000	230,000	780,000	870,000
0.50ml加群	80,000	97,000	380,000	520,000
0.75ml加群	80,000	90,000	220,000	340,000
1.00ml加群	80,000	86,000	94,000	88,000

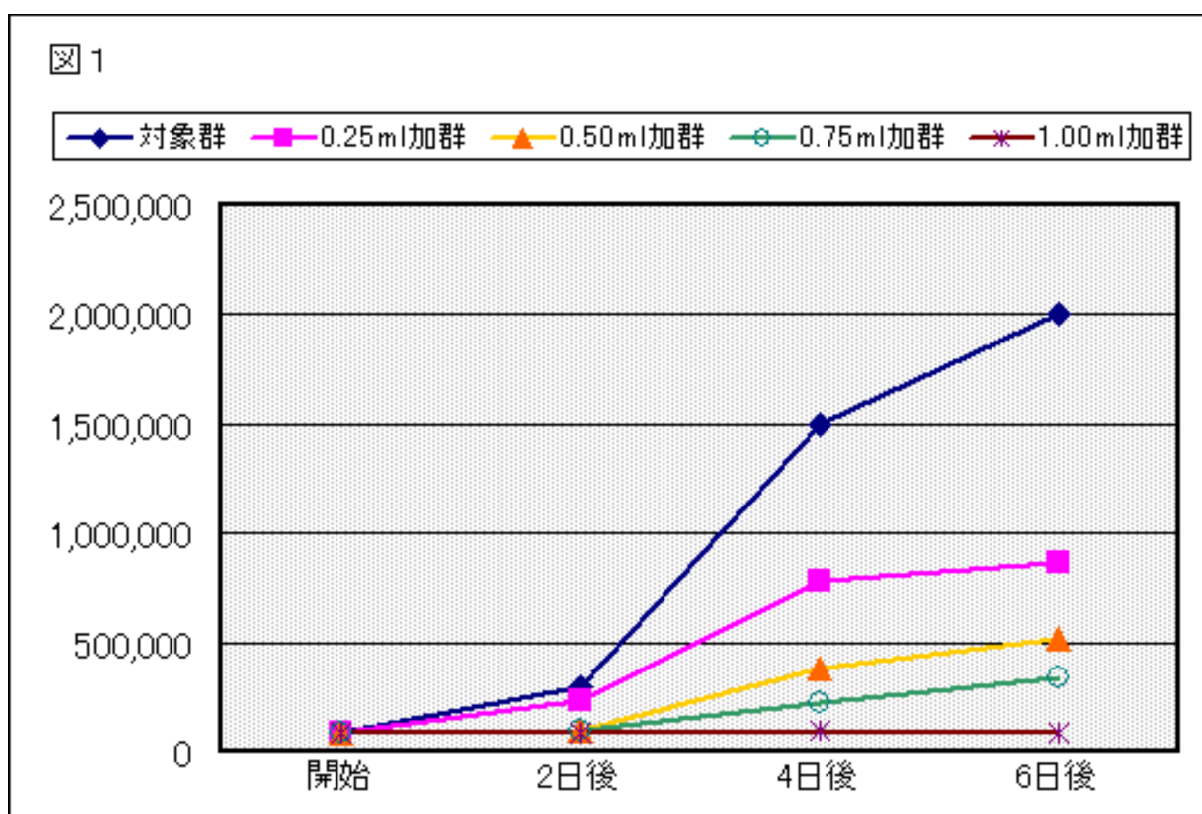


表-1及び図-1から、BioX G-310は、0.5ml加群で対照群に対し70%強、1.0ml加群では、90%以上の増殖抑制効果を認めた。

特に、1.0ml加群では培養6日目で培養開始時とほぼ同じ細胞数だった。

結論及び考察

BioX G-310(カプセル)の水可溶性成分には、培養ヒト白血病細胞を抑制する因子が認められた。

すなわち、同液を0.25ml加えた群では50%以上、0.5ml加えた群では70%以上、増殖を抑制した。

同じように、1.0ml加えた群では90%以上、増殖を抑翻し、細胞数は培養4日から6日にかけて、明らかに減少した。

このことは、細胞が死に至ったためであり、同液に抗ヒト白血病成分が含まれていることを示唆している。

検定試料(液)を比重遠沈法で分離したために、試料中に脂性成分が混入し、特に1.0ml加群においては、これらの成分が培養環境を変え、培養ヒト白血病細胞の増殖に影響した可能性もある。

しかし、各群の増殖抑制率(図-1)から判断して、影響があったとしても、小さいと考えられる。

今後、この点を考慮した更なる研究により、よりはっきりした効果抑制が出るものと期待される。

以上