

〔醸酵工学 第66巻 第1号 31-35, 1988〕

ハイブリドーマの培養液循環灌流培養法の開発

渡嘉敷通之*・濱本 公彦・高沢 美治

帝人(株)東京研究センター 生物工学研究所

Perfusion culture of hybridoma cells recycling higher-molecular-weight components.

MICHIOYUKI TOKASHIKI,* KIMIHICO HAMAMOTO, YOSHIHARU TAKAZAWA (*Tokyo Research Center, Biotechnology Research Laboratory, Teijin Limited, 4-3-2, Asahigaoka, Hino, Tokyo 191, Japan*) *Hakkokogaku* 66: 31-35. 1988.

A perfusion culture was developed in which the cell-free culture supernatant was ultrafiltered, and the retentate was recycled to the culture vessel. One mouse-mouse hybridoma line and three mouse-human hybridoma lines were cultured by this method.

In the culture of the mouse-mouse hybridoma 4C10B6 line using serum supplemented medium, the concentration of monoclonal antibody in the culture vessel was increased in proportion to culture time, but cell density decreased as time passed.

In the cultures of 3 mouse-human hybridoma lines using serum-free medium, the concentrations of monoclonal antibodies in culture vessels increased in proportion to culture time to 20 times that of a conventional perfusion culture, and viable cell densities were not less than those of conventional perfusion cultures.

大腸菌などの微生物による物質生産は種々の限界があることがしだいに明らかとなり、動物細胞による生産の重要性が認識されてきている。しかし、動物細胞の培養は一般に微生物に比較して困難であり、経済的な大量培養法はいまだ開発途上にある。¹⁻⁷⁾ 経済的な大量培養法としてはタンク培養による灌流培養が有利と考えられ、種々の研究が行われているが、灌流培養法が完成しても、培養液中の目的物質の濃度が低く分離精製コストおよび培地コストが高いという問題点は解決されない。

動物細胞が産生する有害代謝産物は従来必ずしも明らかにされていないが、その大部分はアンモニアや乳酸のような比較的low分子物質であると予想されていること、^{8,9)} 動物細胞による物質生産の目的物質は一般に高分子のタンパクであること、および培地の構成成分のうち、原価の相当部分は少量の成長因子すなわち高分子のタンパクまたはペプチドであることに着目し、われわれは次の方法により上記の問題の解決を計ることを試みた。すなわち灌流培養において細胞と分離した培養液を、目的物質や培地中の成長因子のような高

分子物質は通過しえないが、その他の低分子物質は通過しうるような限外ろ過処理を行い、透過液は系外へ取出し、残留液を培養系へ還流する培養法である。この培養法によれば通常の灌流培養法に比較して、培養槽中の目的物質の濃度を高くすることができ、同時に系内へ還流される有効な成長因子の量だけ、仕込培地中の成長因子量を減少させることができると考えられる。われわれは上記培養法をハイブリドーマによるモノクローナル抗体の生産に適用した。

実験方法

実験装置 Fig. 1 に本実験に用いた装置を示す。培養槽としては正味培養容積（細胞が存在する部分の容積）：120 ml, 内筒外径：5.0 cm, 外筒内径：6.5 cm のガラス製灌流培養槽を用いた。培養槽にはテフロン製のパドル型かく拌翼が設けられている。培養槽内の底部近傍および内筒で囲まれた部分では、かく拌による乱れにより、細胞は均一に浮遊分散する。外筒と内筒に囲まれた沈降ゾーンでは上方に向うにつれてかく拌効果が及ばなくなり、細胞は重力により沈降分離する。一般に沈降ゾーンでは細胞が培養液と分離する境界は明確に目で見ることができ、本培養槽の最大灌

* 連絡先, Correspondence author

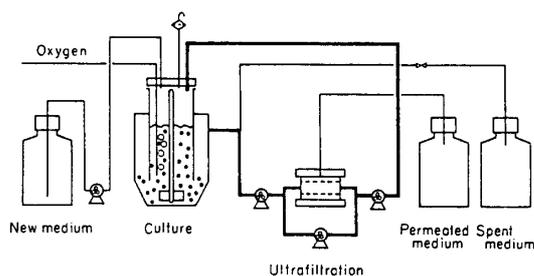


Fig. 1 Experimental apparatus.

流量は目的とする細胞の種類により異なるが、一般に 900~1500 ml/day である。酸素吹込ノズルの位置は沈降ゾーンへの気泡の混入を防ぐため内筒の下端より上部に設けた。限外ろ過装置はミリポア社製ペリコンラボカセット XX 42 OLC 00, 限外ろ過膜はミリポア社製 PTHK OLC 00 (分画分子量 10,000) を用いた。培地送入ポンプ, 培養液取出しポンプ, 限外ろ過循環ポンプおよび濃縮培養液還流ポンプとしてはいずれもペリスタポンプを用いた。溶存酸素電極はオリエンタル電気(株)製の酸素電極を用いた。

細胞 次の4種類の株を用いた。マウス・マウスハイブリドーマ 4C10B6 株: マウスミエローマ P3/X63-Ag8-U1 株とマウス脾臓細胞を融合して得られた IgG_{2b} 産生株, マウス・ヒトハイブリドーマ V-6 株, H-2 株, C-41 株: いずれもマウスミエローマ P3/X63-Ag8-U1 株とヒト B セルを融合して得られた株であり, それぞれ Valisela zoster virus, Hepes simplex virus および Cytomegaro virus と特異的に結合するヒト型 IgG₁ 産生株である。

培地 培養液循環を開始する以前は仕込培地を, 循環開始後は循環培養添加培地, (以下添加培地と呼ぶ) を用いた。培地としては血清添加培地および2種類の無血清培地を用い, 基本培地としては eRDF を用いた。¹⁰⁾ 血清添加培地の場合, 仕込培地と添加培地の血清濃度は10%および1%とした。無血清培地としては牛血清アルブミンを含む無血清培地 A とこれを含まない無血清培地 B を用いた。その組成を Table 1 に示す。

抗体の測定法 抗体の測定は ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法および SRID (single radial immunodiffusion) 法により行った。

実験方法 37°C の恒温水槽中に設置された培養槽にろ過滅菌した仕込培地を仕込んだ。ついで CO₂ インキュベーターで静置培養して得られた細胞を接種

Table 1. Composition of serum-free medium.

(a) Serum-free medium A: BSA + ITES + eRDF

	Before recycling	Under recycling
BSA	0.5%	0.025%
Insulin	9 μg/ml	1.8 μg/ml
Transferrin	10 μg/ml	0.5 μg/ml
Ethanolamine	10 μM	10 μM
Selenite	20 nM	20 nM

(b) Serum-free medium B: ITES + eRDF

	Before recycling	Under recycling
Insulin	9 μg/ml	1.8 μg/ml
Transferrin	10 μg/ml	0.5 μg/ml
Ethanolamine	10 μM	10 μM
Selenite	20 nM	20 nM

し, かく拌速度 60 rpm でかく拌を行った。培養初期においては, 溶存酸素電極と連動したソレノイドバルブを経由して 5% CO₂ 含有空気を培養槽自由表面の上部に送入した。ソレノイドバルブの作動点は溶存酸素 3 ppm に設定した。5% CO₂ 含有空気では溶存酸素を 3 ppm に維持できなくなった時点で, ガスを酸素に切換えた。実験結果に記載した条件で沈降ゾーンから, 細胞と分離した培養液を限外ろ過を行わずに連続的に系外に取り出し, 培養槽の液位が一定になるように手動で新培地の送分量を調節することによって灌流培養を行った。細胞密度が高くなり, 上記の方法では溶存酸素濃度を 3 ppm に維持できなくなった時点で, 酸素の供給を培養槽自由表面上部への供給から培養液中への吹込みに切換えて培養を継続した。この方法により培養液中の溶存酸素は, 全ての実験について 2.5~3.5 ppm の範囲で自動的に調節された。回分培養と比較して十分に高密度に培養されていることを確認した時点で, 限外ろ過を行い, 残留液の培養系へ還流を開始し, 同時に培地を仕込培地から添加培地に切換えて培養液循環培養を継続した。

実験結果

マウス・マウスハイブリドーマ 4C10B6 株の培養 4C10B6 株の培養は血清添加培地を用いて行った。結果を Fig. 2 に示す。この株の静置培養における最高

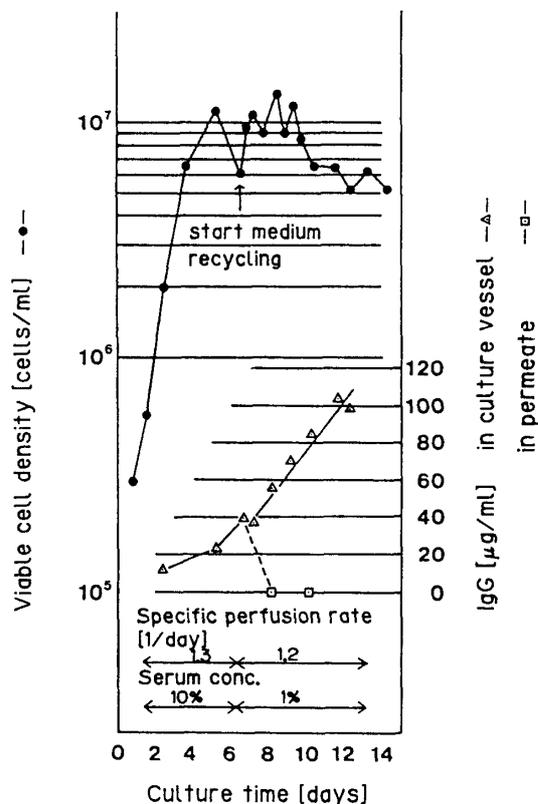


Fig. 2 Perfusion culture of mouse-mouse hybridoma 4C10B6 cells with recycling of culture medium after ultrafiltration.

到達生細胞密度は $1.0 \sim 1.5 \times 10^6$ [cells/ml] である。仕込培地を用いて灌流培養を行ったところ、6日目に生細胞密度が 6.0×10^6 [cells/ml] に達し、回分培養に比較して十分高くなっていることを確認したので、培地を血清含量1%の添加培地に切換えると同時に培養液の限外ろ過をはじめ培養液循環培養に移行した。循環開始後約3日間生細胞密度は 1×10^7 [cells/ml] を保ったが、その後低下し、循環開始後8日目(培養開始14日目)には 5.0×10^6 [cells/ml] となった。一方培養槽中の培養液抗体濃度は時間の経過とともに直線的に上昇し、循環開始6日目には 100 [$\mu\text{g/ml}$] と通常の灌流培養の場合の約5倍に達した。循環開始2日目および4日目に限外ろ過透過液中の抗体を測定したが 1 [$\mu\text{g/ml}$] 以下であった。以上の結果からモノクローナル抗体は培養液中に蓄積し、濃度が上昇することは明らかになったが、細胞密度は本条件では通常の灌流培養のレベルを維持できないことがわかった。

マウス・ヒトハイブリドーマ V6 株の無血清培養 V6 株の培養は無血清培地 A を用いて行った。この株の静置培養における最高到達生細胞密度は約 1×10^6

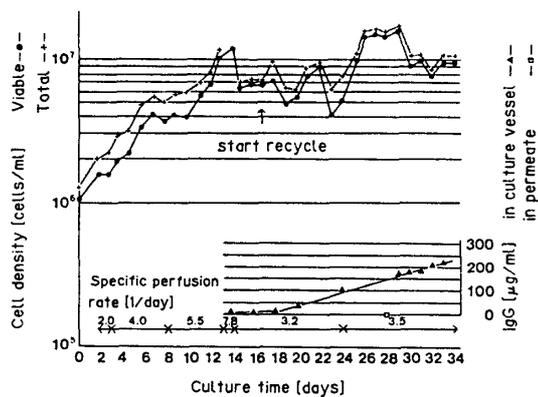


Fig. 3 Perfusion culture of mouse-human hybridoma V-6 cells with recycling of culture medium after ultrafiltration. (Culture medium: 0.5% BSA + ITES eRDF)

[cells/ml] である。本法による培養の結果を Fig. 3 に示す。仕込培地を用いて灌流培養を行ったところ最高到達生細胞密度は $6 \sim 12 \times 10^6$ [cells/ml] であった。またこの間の培養液中の抗体濃度は約 9 [$\mu\text{g/ml}$] であった。培養開始後16日目に培養液循環を開始した。18日間の培養液循環培養において最高到達生細胞密度は 1.6×10^7 [cells/ml] に達し、少なくとも灌流培養と同等の生細胞密度が維持できることが明らかになった。培養槽中培養液の抗体濃度は培養液循環開始後時間の経過とともに直線的に上昇し、循環開始17日目(培養開始33日目)には 220 [$\mu\text{g/ml}$] に達した。これは通常の灌流培養の約24倍に相当する。28日目に透過液中の抗体濃度を測定したところ 1 [$\mu\text{g/ml}$] 以下であり、大部分の抗体は培養系内に蓄積していることが明らかになった。

マウス・ヒトハイブリドーマ H2 株の無血清培養 H2 株の無血清培地 A および 10% FCS 添加培地を用いた静置培養における最高到達全細胞密度はそれぞれ 0.9×10^6 および 1.3×10^6 [cells/ml] であった。H2 株を無血清培地を用いて培養した結果を Fig. 4 に示す。17日目までは仕込培地で灌流培養を行ったが、最高到達生細胞密度は 6.2×10^6 [cells/ml] であり、この間の培養液中の抗体濃度は約 30 [$\mu\text{g/ml}$] であった。17日目に培養液循環を開始した。時間の経過とともに生細胞密度は漸増する傾向を示し31日目には 1.3×10^7 [cells/ml] に達した。この値は静置培養の最高到達生細胞密度の約14倍に相当する。その後急激に生細胞密度が減少したので培養を中止した。培養槽中培養液抗体濃度は培養液循環開始後、時間の経過に対して直線

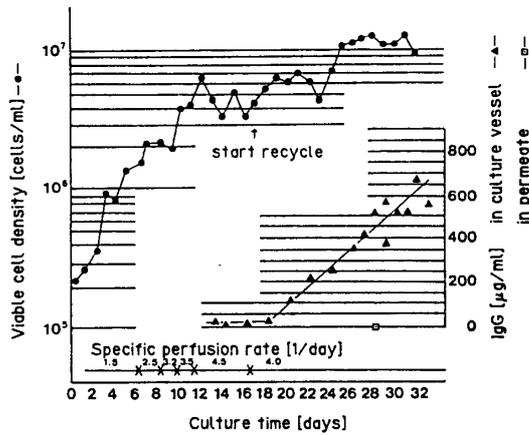


Fig. 4 Perfusion culture of mouse-human hybridoma H2 cells with recycling of culture medium after ultrafiltration. (Culture medium: 0.5% BSA+ITES+eRDF)

的に上昇し、32日目には 660 [$\mu\text{g/ml}$] に達した。28日目に透過液中の抗体濃度を測定したところ 0.5 [$\mu\text{g/ml}$] であった。

マウス・ヒトハイブリドーマ C41 株の無血清培養 C41 株を無血清培地 B を用いて静置培養を行ったところ、最高到達生細胞密度は 1.0×10^6 [cells/ml] であった。C41 株を無血清培地 B を用いて灌流培養を行った結果を Fig. 5 に示す。最高到達生細胞密度は培養液置換率 7.5 [1/day] の条件で 9.0×10^6 [cells/ml] であり、抗体産生能は 6~12 [$\mu\text{g}/(10^6 \text{ cells}) \cdot (\text{day})$] で

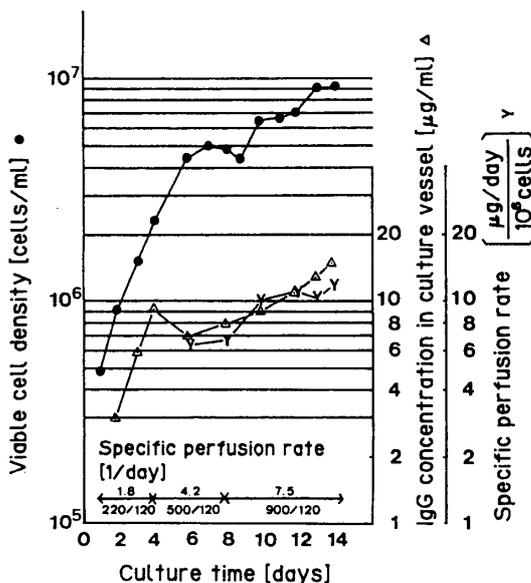


Fig. 5 Perfusion culture of mouse-human hybridoma C41 cells. (Culture medium: ITES+eRDF)

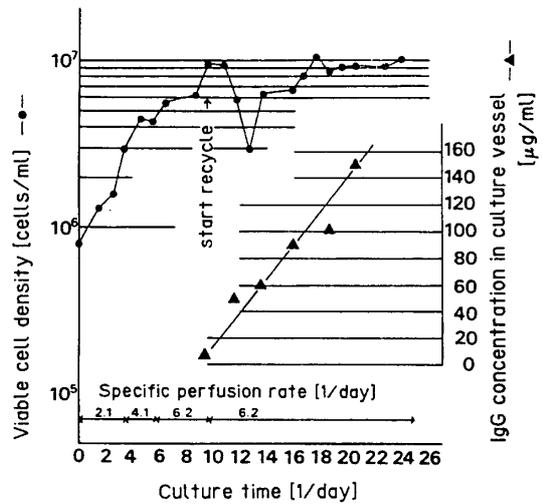


Fig. 6 Perfusion culture of mouse-human hybridoma C41 cells with recycling of culture medium after ultrafiltration. (Culture medium: ITES+ERDF)

あった。培養液循環灌流培養を行った結果を Fig. 6 に示す。10日目までは仕込培地を用いて通常の灌流培養を行い培養液置換率 6.2 [1/day] で生細胞密度は 9.5×10^6 [cells/ml]、培養液中抗体濃度は 7 [$\mu\text{g/ml}$] に達した。10日目に培養液循環を開始と同時に送入培地を添加培地に切替えた。生細胞密度はいったん減少したが時間の経過とともに回復し通常の灌流培養と同じレベルに維持できた。培養槽中培養液の抗体濃度は時間の経過とともに直線的に上昇し20日目(循環開始10日後)には 150 [$\mu\text{g/ml}$] に達した。

考 察

培養液循環培養における細胞の抗体産生能について通常の灌流培養と培養液循環灌流培養では抗体濃度等の培養環境が異なるため、細胞の抗体産生能に差が出る可能性がある。これを知るためにはそれぞれの培養における抗体産生能を明らかにしなければならない。培養液循環培養の抗体産生能を知るためには所定期間の抗体収支を明らかにしなければならないが、系内の抗体濃度が上昇するにつれてサンプリングや操作異常にともなう培養液の系外取出の影響が大きくなり、小規模の実験ではそれが極めて困難である。4種類の株の実験のうち C41 株については比較的操作が安定していたので、培養液循環培養における細胞の抗体産生能について検討を行ってみる。この株の培養で、Fig. 6 において培養液循環を開始した10日目から20日

目までの10日間の平均生細胞密度は 7.7×10^6 [cells/ml] であり、培養系内の抗体濃度上昇は 140 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] であった。限外ろ過の残留液が循環する系の容積は 350 ml であった。有効培養容積を 120 ml とし、上記期間中細胞の抗体産生能は一定と仮定すると平均抗体産生能は 5.3 [$\mu\text{g}/10^6$ cells \cdot day] となる。この値は Fig. 5 における抗体産生能 $6\sim 12$ [$\mu\text{g}/10^6$ cells \cdot day] に比較するとやや低い値である。操作上の理由による培養液の系外への取出しや、サンプリング時の取出し量を考慮していないことが理由の一つとして考えられるが詳細は明らかでない。

また4種類の株のいずれの実験においても、抗体濃度は時間の経過とともに上昇しており、抗体濃度が高くなっても本実験の範囲では著しい抗体の産生阻害をおこしていないことを示唆している。

仕込培地と添加培地中の成長因子濃度について
マウス・ヒトハイブリドーマの培養液循環培養では、仕込培地と添加培地のタンパクの含量の比はインスリンについては $1/5$ 、アルブミンおよびトランスフェリンについては $1/20$ とした。しかし、この実験結果はそれぞれのタンパクの必要量がこの割合で減少しうることを意味するものではない。灌流培養と培養液循環灌流培養の培地組成について論じるためには両法の最適培地を求め両者間の比較を行う必要があるが、本実験ではその検討は行っていない。しかし、H2株については添加培地で静置培養を行ったが細胞の増殖は認められなかったので、培養液循環培養により成長因子の添加量を減少しうることは期待される。

要 約

灌流培養において、細胞と分離した培養液を限外ろ過し、透過液は系外へ取出し、残留液を培養系へ還流する培養液循環灌流法を開発し、マウス・マウスハイブリドーマ1株およびマウス・ヒトハイブリドーマ3株の培養を行い次の結果を得た。

1. マウス・マウスハイブリドーマ4C10B6株を血清添加培地を用いて本培養法を行ったところ、培養槽

中培養液抗体濃度は時間の経過に比例して上昇することが明らかになった。しかし本実験条件では培養液循環を行うことにより、生細胞密度は低下する傾向にあった。

2. マウス・ヒトハイブリドーマ3株について無血清培地を用いて本培養法を行ったところ、培養槽中培養液抗体濃度は時間の経過に比例して上昇し、通常の灌流培養の培養液の抗体濃度の約20倍の値に達した。生細胞密度はいずれも通常の灌流培養と有意の差は認められなかった。

文 献

- 1) Himmelfarb, P., Thayer, P. S., Martin, H. E.: *Science*, **164**, 555-557 (1969).
- 2) Tolbert, W., Feder, J.: *Annual Reports on Fermentation Processes*, **6**, 35-74 (1983).
- 3) Murakami, H., Shimomura, T., Ohashi, H., Hashizume, S., Tokashiki, M., Shinohara, K., Yasumoto, K., Nomoto, K., Omura, H.: *Growth and Differentiation on Cells in Defined Environment*, pp. 111-116 copublished by Kodansha Ltd. and Springer-Verlag, (1985).
- 4) Brunt, J. V.: *Bio/Technology*, **3**, 408- (1985).
- 5) Lydersen, K., Pugh, G., Paris, S.: Sharma, P., Noll, A.: *Bio/Technology* **3**, 63-67 (1985).
- 6) Marcipar, A., Henno, P., Lentwojt, E., Roseto, A., Brown, G.: *Annals New York Academy of Science*, 416-419 (1983).
- 7) Knazeki, P. A., Gullino, P. M., Kohler, P. O., Dedrick, R. L.: *Science*, **178**, 65-67 (1972).
- 8) Butler, M. Imamura, T., Thomas, J., Thilly, W. G.: *J. Cell. Sci.*, **61**, 351-356 (1983).
- 9) Iio, M., Moriyama, A., Murakami, H.: *Growth and Differentiation of Cells in Defined Environment*, pp. 437-442. copublished by Kodansha Ltd. and Springer-Verlag, (1985).
- 10) Murakami, H., Shimomura, T., Nakamura, T., Ohashi, H., Shinohara, K., Omura, H.: *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, **58**, 575-583 (1984).

(昭62. 8. 3受付)