

Cultivation of CHO-S cells by reciprocal mixing



○丹生徳行^{*1,2}, 植木雅志¹, 荻原正章^{1,2}, 佐藤誠^{1,2}, 金森久幸^{1,2}, 加藤好一^{1,2}

¹ 理化学研究所 イノベーション推進センター 動物細胞培養装置研究チーム

² 佐竹化学機械工業株式会社 攪拌技術研究所

背景・目的

我々は、せん断力に敏感な動物細胞の培養に適した穏やかな攪拌方式として“上下動攪拌”を提案し、これまで上面通気法においてCHO-S細胞培養における優位性を示してきた。しかし、工業規模の生産では、スケールアップによる対液容量比表面積割合の減少や高密度培養による高い酸素要求量への対応として、培養液中への酸素吹き込み供給(液中通気)による高い溶存酸素量の維持が必要となる。上下動攪拌は、気泡を分散させる作用を有していないことから、極めて微細な気泡を発生させる通気装置と、上下動攪拌装置(サタケ製 VMOVE MIXER)を組合わせた“培養装置”の確立が、スケールアップを行う上で必須となる。そこで本報告では、シラスポラスガラス(SPG)膜(日揮株式会社製)を用いた液中通気条件下において、CHO-S細胞の培養、及びCHO 1-15₅₀₀細胞によるタンパク質生産に関して、上下動攪拌培養で優位な結果を得たので報告する。

培養条件・方法

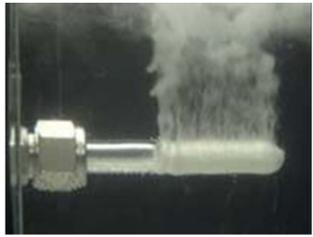


Fig. 1. Microbubbles from SPG (Shirasu Porous Glass) membrane sparger.

Method : Batch Culture
Cells : CHO-S, CHO1-15₅₀₀
Medium : CHO-S-SFMII (+ Ham's F-12 + 3% FBS, for CHO1-15₅₀₀)
Temp. : 37 °C
Aeration : i) Surface Air containing 5% CO₂, 100 ml/min
 ii) Sparging Pure O₂, > 0.1 mL/min

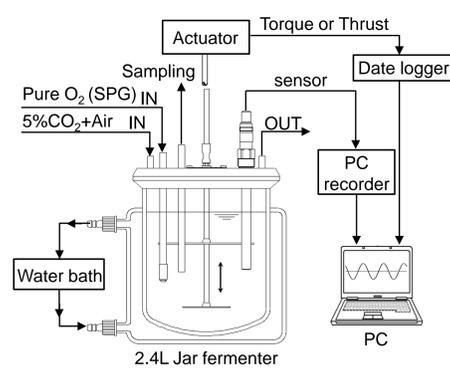


Fig. 2. Cultivation conditions and apparatus.

Table 1. Mixing conditions.

Mixing & Impeller	Reciprocal	Rotary
	Oval plates (VM100)	Elephant ear (EE)
Speed*	20 mm, 2 Hz	140 rpm
Baffles	No	Yes

*Required drive power per unit volume (Pv) values are identical.

Fig. 2に示した培養条件・装置、並びにFig. 1に示したSPG膜スパージャーによる純酸素供給により培養を行った。培養開始時は、細胞濃度を10⁵ cell/mLに調製し、溶存酸素濃度は、常に2.8 mg O₂/L以上になるように純酸素の流量を自動調整した。次に挙げた指標を基に、培養性状の評価を行った。

- (1) 細胞数・生細胞率：一定時間毎に培養液を採取し、トリパンブルーで染色した細胞懸濁液を自動細胞計数機(BioRad Cell Counter TM-20)を用いて、全細胞数と生細胞数をカウントし、生細胞率を算出した。(Fig. 3, 4, 7)
- (2) 細胞径分布：細胞径は、細胞周期を示しているとともに、細胞径の低下は死細胞を示している。細胞径分布によって細胞の性状を評価した。(Fig. 5)
- (3) 培養液中の基質・代謝物の変化：培養液上清中のグルコース、グルタミン、乳酸、アンモニアに着目し、酵素電極センサー(王子計測機器(株) BF-7)を用いて、各濃度の測定を行った。(Fig. 6)
- (4) タンパク質の生産性：CHO1-15₅₀₀ (ATCC CRL-9606)は、recombinant human tissue-type plasminogen activator (tPA)が導入された細胞で、tPAを培養液中に生産する。培養上清中のtPA活性を、S-2288を用いた比色法によって測定し、攪拌方法がタンパク質tPAの生産に及ぼす影響をみた。(Fig. 8)

結果・考察

1. CHO-S 細胞培養

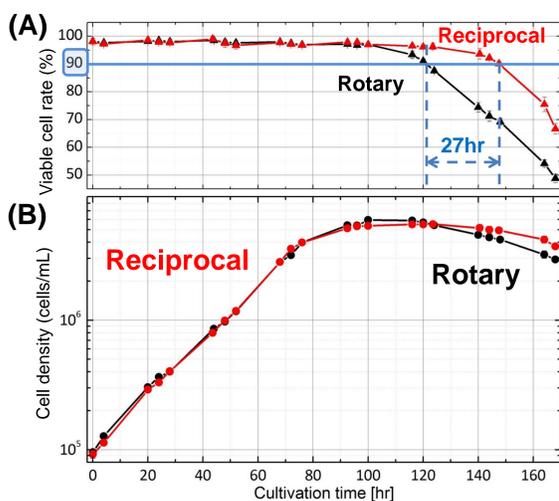


Fig. 3. Growth curves of CHO-S cells. (A) Viable cell rate, (B) Cell density.

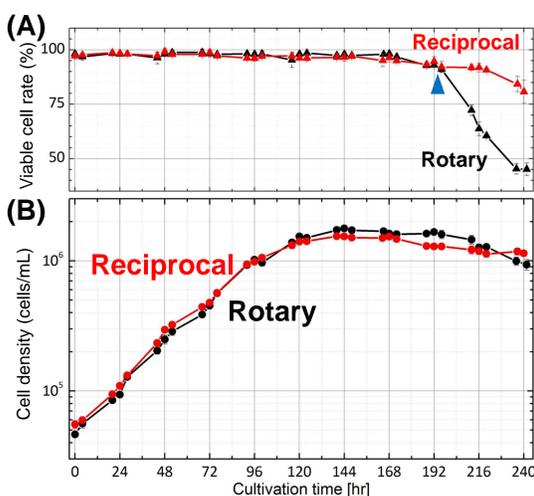


Fig. 6. Growth curves of CHO1-15₅₀₀ cells. (A) Viable cell rate, (B) Cell density.

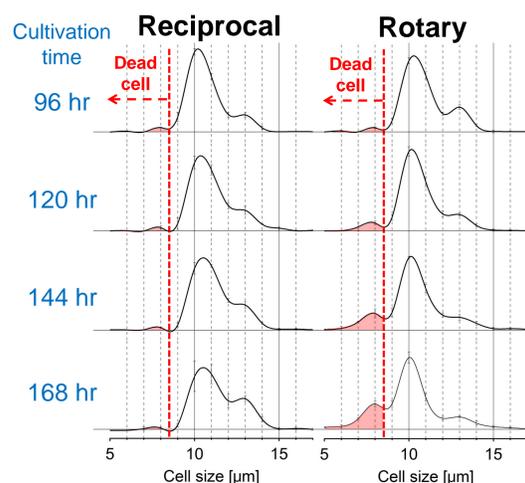


Fig. 4. Change of cell size distribution.

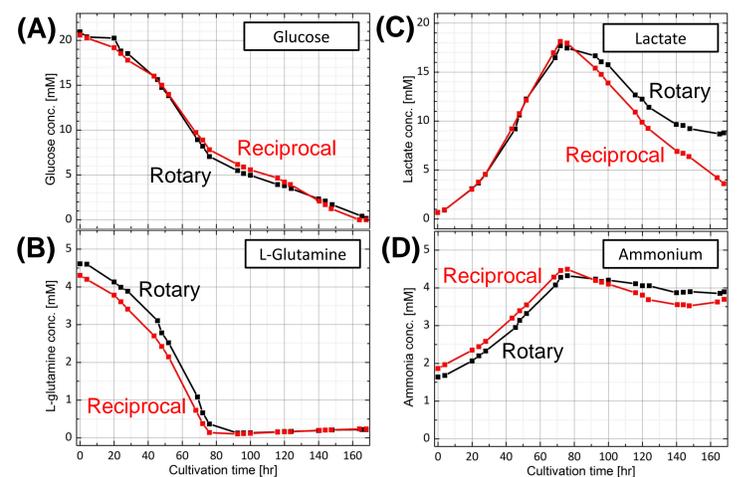


Fig. 5. Substrate consumption, and metabolite production.

SPG膜を用いて酸素を液中供給した場合、CHO-S細胞は良好に生育し、液中供給しなかった場合に比べてより高い細胞濃度(5 ~ 6 x 10⁶ cell/mL)まで達し、攪拌方法による違いは見られなかった(Fig. 3)。しかし、定常期(90hr ~)に入ってから、回転式攪拌では生細胞率は速やかに減少し始めたが、上下動攪拌においては高い生細胞率(生細胞率>90%)が27時間以上長く維持された(Fig. 3A)。これは、細胞径分布においても、回転式攪拌では定常期において死細胞とみられる細胞径8.0 μm以下の小細胞片が増えていることから裏付けられた(Fig. 4)。グルコースやグルタミンの消費量には、培養期間通じて大きな違いは見られなかったが(Fig. 5A, B)、乳酸・アンモニアの生成量においては対数期後期(50 hr ~)以降に違いが現れた(Fig. 5C, D)。攪拌方法と乳酸・アンモニアの生成量の違いとのメカニズムは不明であるが、これが定常期に入ってから生細胞率に関連していると考えられる。

2. CHO1-15₅₀₀ 細胞によるtPA (tissue plasminogen activator)生産

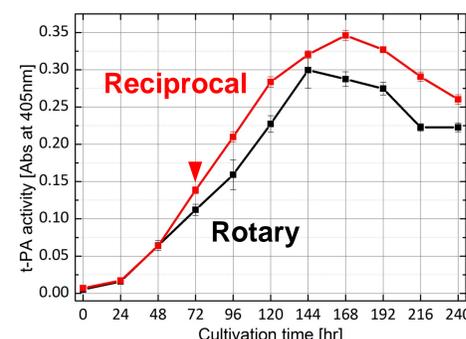


Fig. 7. Production of tPA by CHO1-15₅₀₀ cells.

次に同じ培養条件(培地は、CHO-S-SFM II / Ham's F-12 + 3% FBS)を用いて、CHO1-15₅₀₀細胞の培養を行い、生産されるtPA量に攪拌方法がどのように影響するかをみた。その結果、攪拌方法に関わらず、同様の増殖が見られ(Fig. 6B)、到達した細胞濃度(1.7 x 10⁶ cell/mL)もほぼ同じであった。しかし、定常期後期(192 hr ~)から、回転式攪拌においては、生細胞率が著しく低下し始めたが(Fig. 6Aの▲)、上下動攪拌では培養終了(240 hr)まで高い生細胞率が維持された(Fig. 6A)。回転式攪拌においては、定常期初期(120 hr ~)から培地中の乳酸量が多いこと(data not shown)が、定常期後期の生細胞率に影響したと考えられる。一方、培養上清中に生産・分泌されるtPAは、対数期中期(72 hr ~)から違いが現れ始め(Fig. 7の▼)、上下動攪拌で高いtPA活性が見られた。メカニズムは明らかではないが、上下動攪拌が目的タンパク質の効率的生産に適していることを示している。

まとめ

● 培養液中に純酸素の通気を行いながら、上下動攪拌と回転式攪拌とで、CHO-S細胞の増殖・性状に及ぼす影響を検討した。その結果、増殖速度・到達細胞濃度には大きな違いは見られなかったが、上下動攪拌で定常期後期に高い生細胞率が維持されることが見いだされた。乳酸・アンモニア濃度が低いことと関連していると考えられる。

- CHO1-15₅₀₀細胞の培養でも、同様の性状が見られた上に、対数期中期付近から上下動攪拌において高いtPA生産が見られた。これは、上下動攪拌が目的タンパク質の効率的生産に適していることを示している。
- 今後、抗体医薬生産を目的としたスケールアップの検証、並びに再生医療分野(iPS細胞培養など)への応用など、幅広い分野に適した培養装置の確立を目指す。また、上下動と回転式との攪拌方法の違いによって、なぜ細胞性状の違いが生じるのか、メカニズムの検討も行っていく予定である。

上下動攪拌法とSPG膜スパージャーを用いた培養装置「VerSus Reactor」



VerSus Reactor