

CHO-S細胞培養における上下動攪拌の評価



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

* E-mail : tansho@riken.jp

背景・目的

動物細胞培養には、従来から回転式攪拌装置が広く用いられている。しかし、細胞へのダメージの抑制や、細胞の高密度化が求められており、それらを満たす新しい動物細胞培養装置の確立が望まれている。そこで我々は、“優れた混合性能”と“穏やかな攪拌”を可能とするように開発した“上下動攪拌装置VMOVE MIXER®”をベースに、動物細胞培養に特化した培養装置の研究・開発を進めており、これまでにHL-60細胞を用いた培養でその優位性を報告してきた。本報では、抗体医薬品等の工業的生産に広く用いられているCHO-S細胞に対する、上下動攪拌の適性を評価した。

培養条件・方法

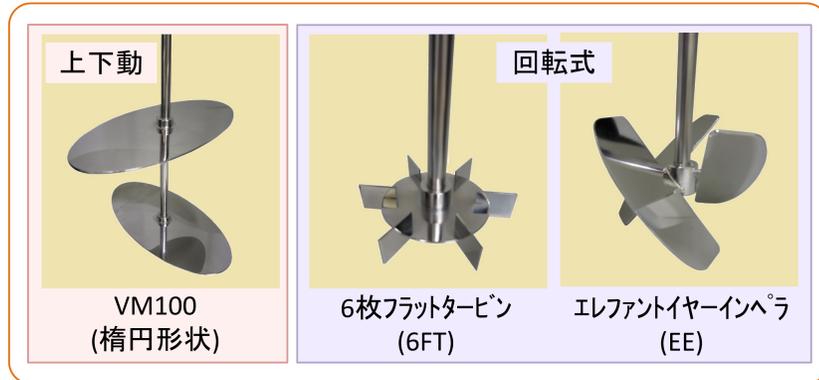
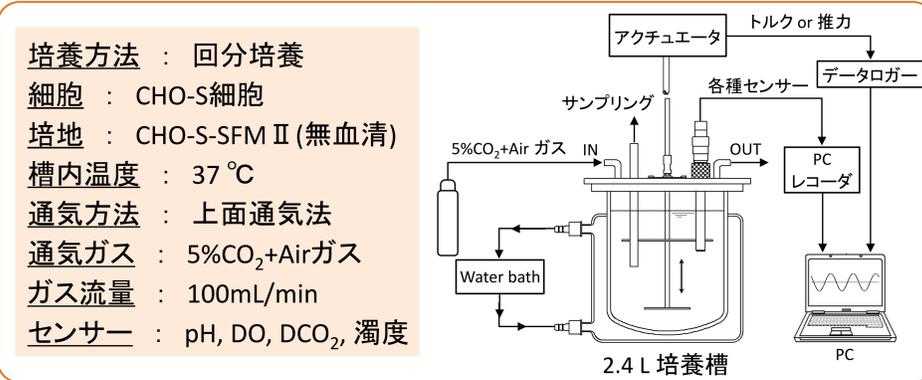


図1. 培養条件および装置図

写真1. 上下動および回転式攪拌翼

表1. 攪拌条件

攪拌方式	攪拌翼	邪魔板	運転条件	Pv [*] [W/m ³]
上下動	VM100	無	20mm 2Hz	36
回転式	6FT	有	135rpm	36
			190rpm	100
			140rpm	36
	EE			

※ 単位体積あたりの攪拌所要動力

評価方法

- ① **細胞の増殖速度** : 所定の培養時間に培養液を採取し、顕微鏡を用いトリパンブルー染色法にて、細胞の形態を考慮し生細胞数をカウントして、対数増殖期から倍化時間を算出した。(図. 2)
- ② **培養槽内のDO** : 培養槽内のDOを記録して細胞増殖との関係を検証した。(図. 3)
- ③ **細胞への物理的障害** : 培養液上清中の乳酸脱水素酵素(LDH)活性の測定により、攪拌による物理的障害を評価した。(図. 4)
- ④ **細胞代謝の影響** : 培養液上清中のグルコース、グルタミン、乳酸、アンモニア濃度を測定し、基質の消費量と代謝物の生成量を生細胞濃度の経時的積分値(IVC)を基に評価した。(図. 5, 6)

結果・考察

表2. 倍化時間

攪拌翼	運転条件	倍化時間 [hr]
VM100	2Hz	16.4
6FT	135rpm	16.4
6FT	190rpm	15.0
EE	140rpm	15.5

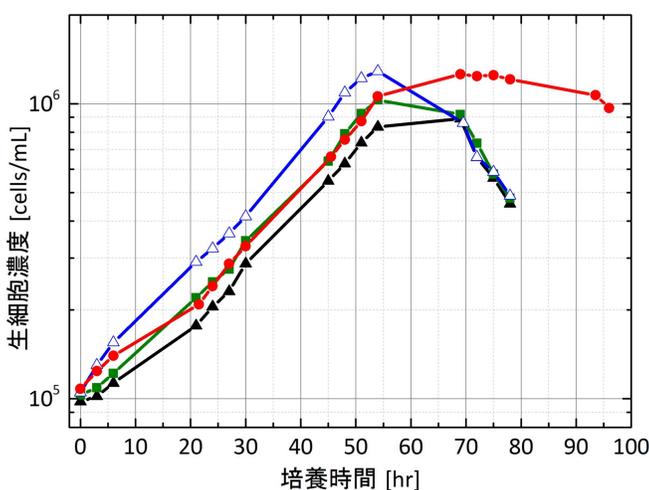


図2. 培養時間と生細胞濃度の関係

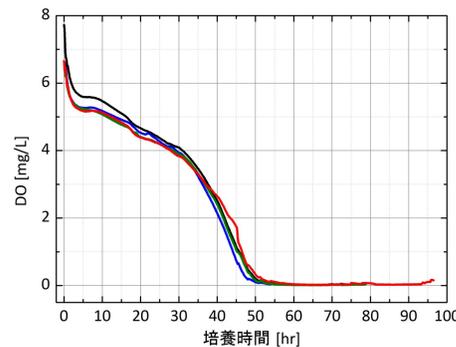


図3. 培養時間とDOの関係

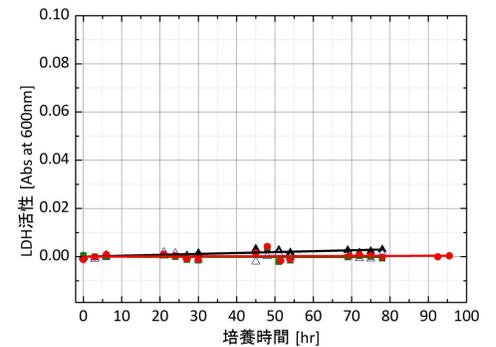


図4. 培養時間とLDH活性の関係

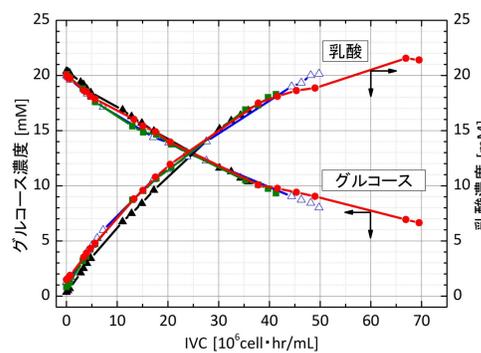


図5. グルコース・乳酸濃度

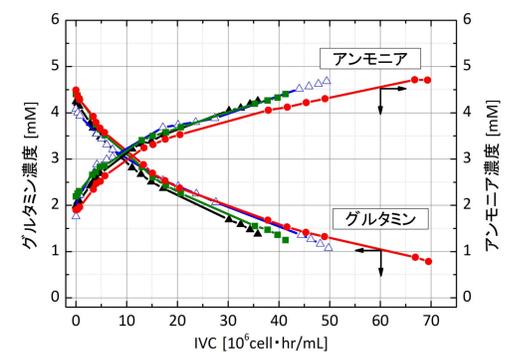


図6. グルタミン・アンモニア濃度

培養時間50時間以降にDOが枯渇したが、上下動では培養時間70時間以降の培養後期においても生細胞濃度が維持された。培養後期に上下動と回転式で生細胞濃度に差があるが、培養上清中のLDH活性に変化が見られないことから、細胞の物理的破壊によるものではないと考えられる。また、上下動と回転式ともに基質の消費量、代謝物の生成量に大きな違いが見られなかったことから、この違いは異なる攪拌方法に起因するShear Stressや培養液全体の流動の違いによるものと思われる。今後は、それぞれの攪拌方法によって生じる剪断場の違いが細胞の増殖に及ぼす影響を分子生物学的に検証すると共に、in silico シミュレーションなどを活用し、上下動攪拌特有の性質を明らかにする必要がある。また、通気によってDOを一定以上保ったときの細胞増殖・基質消費・代謝物生産を比較することによっても、攪拌方法が細胞の生理状態にどのように影響するかを検証を行う予定である。

まとめ

- ・上下動攪拌は、高密度で生細胞数を長時間維持できることから、目的タンパク質の生産性向上が期待できる攪拌方法であることが示唆された。
- ・今後は、タンパク質の生産性を検証するとともに、培養条件の検討および最適化を行って、新しい培養装置の確立を目指す。