

ノ ー ト

培養バッグを用いた簡便かつ効率的な モノクローナル抗体の生産

関根 俊昭・鈴木 小城・木下 博保・吉田 芳哉*・橋本 正勝

株式会社シマ研究所細胞科学センター

(2009年5月12日受付 2009年7月10日受理)

Simple and Effective Method to Produce Monoclonal Antibodies Using Culture Bags —Note—

Toshiaki Sekine, Kojou Suzuki, Hiroho Kinoshita, Yoshiya Yoshida*, and Masakatsu Hashimoto
(Department of Cell Science Center, Shima Laboratories Co., Ltd., 3-6-10 Maeno-cho, Itabashi-ku, Tokyo
174-0063) Seibutsu-kogaku: 87, 437-441, 2009.

The conventional methods to produce monoclonal antibodies (MAbs) from hybridoma cells either require large-scale culture using serum-free media and expensive equipment or the sacrifice of a large number of animals to obtain ascite fluid. Our method, using gas permeable polyethylene bags to culture fused cells for Mab production, not only presents a solution to these difficulties, but also increases the production of IgG by 1.6 times compared with flask culture, as shown by to our experiment.

[**Key words:** monoclonal antibody, serum-free media, culture bag, large-scale culture, low price]

1975年にKohlerとMilsteinによりモノクローナル抗体(以下 MAb と略)の作製方法が確立されて以来, MAb は研究や診断薬に利用されてきた。遺伝子工学の発達により, フェージディスプレイ法²⁾から抗体クローンを得てCHO細胞にMAbを発現させるような優れた手法が確立された現在でも, 免疫動物からハイブリドーマを作製しMAbを得ることは依然として利用価値の高いツールである。

しかしながら, このようにして作製したMAbを大量に使用するためには免疫抑制処置を施したマウスや免疫不全マウスを用いて腹腔内で腹水化することや, 高価で複雑な培養装置を用いた無血清培地による大量培養法が一般的であり, こと腹水化においてはEUを中心動物愛護の観点からこの方法の禁止が表面化している。そこでわれわれは研究室において無血清培地を使い簡便な方法により大量のMAbを得るための培養方法について検討

し, 従来の培養装置などを使用することなく大量のMABが得られる技術を確立したので報告する。

ハイブリドーマ細胞は当社で確立したサブクラスIgG2bを分泌するマウスハイブリドーマ Strain A を無血清培地にて馴化し, 指標細胞株とした。

無血清培地とハイブリドーマの馴化は次のように行った。

Strain Aの培養には, 完全無血清培地SH-001(シマ研究所)を用いた。Strain Aは, 当初15%(v/v)牛胎児血清を含むRPMI-1640培地にて培養していたものをおよそ70日の馴化行程によりSH-001へ馴化した。

培養フラスコでの培養には, T-75, T-175, T-225フラスコ(住友ベークライト)を用いた。培養は, T-75フラスコから開始し, 培養スケールに応じてT-175, T-225フラスコへと拡大した(n=3)。

培養バッグは, Bバッグ-EL(フコク)を用い, フラ

*連絡先 〒174-0063 東京都板橋区前野町3-6-10

TEL. 03-3966-2283 FAX. 03-6379-1188 E-mail: y-yoshida@shimalab.co.jp

スコ培養と同様に培地を添加して最大 1000 ml まで拡大を行った ($n=3$)。本培養バッグは 0.920 g/cm^3 の密度を有し、可塑剤の溶出を抑えたポリエチレンで成型され、ガス透過性を有する。推奨培養体積は 100 ~ 1000 ml である。

培養は CO_2 インキュベータ (三洋電機) にて 37°C 、 CO_2 5% (v/v) 条件下で静置培養した。それぞれの培養は毎日 1 ないし 2 ml サンプリングし、生/死細胞数はトリパンブルー色素排除法によりカウントした。このときの残余は遠心分離 (1500 rpm, 5 min) して培養上清を採取し、この培養上清にアジ化ナトリウム 20% (w/v) を終濃度 0.1% (w/v) となるように添加し、含有イムノグロブリンの定量に供した。

Strain A が産生した MAb (mouse IgG2b) は、サンドイッチ ELISA にて定量した。すなわち $5 \mu\text{g/ml}$ となるように炭酸バッファー (pH 9.5) で調整した抗マウス IgG Fc ウサギ抗体 (Rockland, USA) を固相化し、残基を 1% BSA の PBS でブロッキングしたマイクロプレート (Nalgenunc) に、培養上清を $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させた後に PBS で 3 回洗浄後に 1:1000 に PBS で調整した抗マウス IgG (immune globulin) ウサギ HRP ラベル抗体 (Dako, Denmark) を $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で 1 時間反応したのち、PBS で 3 回洗浄後に *o*-Phenylenediamine dihydrochloride にて発色し、ABS 490/620 nm にて測定した。このとき検量線は、あらかじめ既知量のマウス IgG 標準品 (Chemicon, USA) を用いて作製し、培養上清中の産生 IgG 量の算定に用いた。

Strain A の至適の播種密度を検討するにあたり、12 ウェルプレート (旭テクノグラス) による培養を行った。播種密度は、 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , $7 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ ($n=3$) とし、播種後 2, 5 日目に細胞密度と培養上清中の MAb 濃度を測定した。

無血清培地 SH-001 で馴化した Strain A は、あらかじめ T-75 フラスコで培養されたものを上記の実験で得られた適切な細胞密度となるように調整して、バッグおよびフラスコ各々の培養に供した。培養方法は、細胞数をカウントする度にハイブリドーマの増殖に適した細胞密度となるように培地を添加する流加培養 (Fed-batch 培養) とした。なお、このときのサンプリングと培地添加は 24 時間ごとに行った。

4 段階の細胞密度に播種し、培養した 12 ウェルプレートを 0 日, 2 日, 5 日目に培養液を回収し、生細胞/死細胞密度、IgG 濃度を測定した結果を Table 1 に示した。Table 1 より播種密度の違いにより、増殖率の異なることが分かった。培養 2 日目において Strain A は、 $5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 以上の播種条件化で播種時の 60% 以上の良好な増殖を示し、 $6 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 以上の播種条件下にて $25 \mu\text{g/ml}$ 以上の良好な IgG 産生を示した。培養 5 日目においては、播種密度 $4 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ が最も高い増殖率 (140.83%) を示し、播種密度 $7 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ が最も高い IgG 産生 ($128.83 \mu\text{g/ml}$) を示した。しかし、播種密度 $7 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ の系においては、培養 2 日目での生細胞率が 63.94% と最も低く、ハイブリドーマを増殖させながら培養体積を拡大していく流加培養には不向きであると判明したの

Table 1. Effect of strain A seeding density on cell proliferation and MAb production.

Seeding density ($\times 10^5 \text{ cells/ml}$)	Culture time (d)			
	0	2	5	
4.0	Growth rate (%)	0.00	35.83	140.83
	IgG (0g/ml)	0.00	16.77 ± 2.23	100.30 ± 18.30
	Viability (%)	75.83	72.77	41.58
5.0	Growth rate (%)	0.00	62.67	86.00
	IgG (0g/ml)	0.00	19.59 ± 3.21	88.41 ± 5.01
	Viability (%)	75.83	70.52	44.08
6.0	Growth rate (%)	0.00	71.11	66.67
	IgG (0g/ml)	0.00	28.14 ± 3.26	107.29 ± 12.16
	Viability (%)	75.83	70.48	43.73
7.0	Growth rate (%)	0.00	74.76	33.81
	IgG (0g/ml)	0.00	32.20 ± 7.69	128.83 ± 0.57
	Viability (%)	75.83	63.94	43.36

The strain A was seeded at densities of 4 to 7×10^5 . The density at which the antibody production was highest was 7×10^5 . However, the cell density adopted for the fed-batch culture in this study was 6×10^5 to obtain the highest cell proliferation rate.

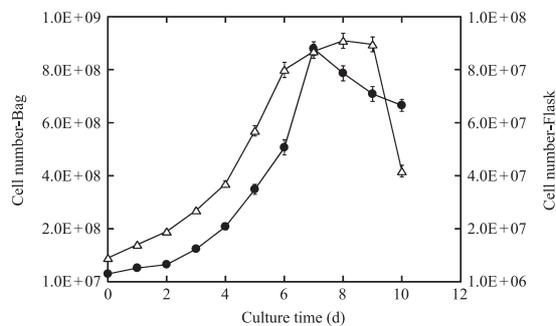


Fig. 1. Proliferation curve for the hybridoma cells in bag and flask cultures. The number of viable cells in the bag culture (●) peaked on the 7th day and that in the flask culture (□) peaked on the 9th day.

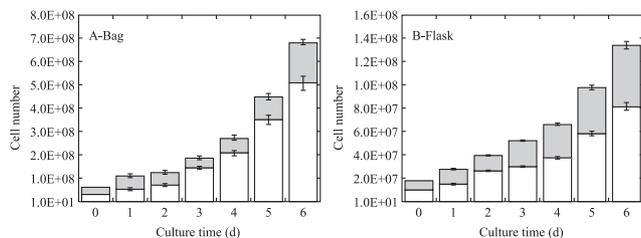


Fig. 2. Cell viability in the bag and flask cultures. The percentage of viable cells determined by trypan blue exclusion assay in the bag culture (A) was 80% on day 3, but it was only 60% in the flask culture (B). Symbols: □, viable cells; ■, dead cells.

で、培養バッグと培養フラスコ培養における Strain A の播種密度は、 6×10^5 cells/ml とした。

播種密度 6×10^5 cells/ml におけるバッグ培養とフラスコ培養の増殖を Fig. 1 に示した。全細胞数は図のように、バッグ培養では7日目で 86×10^5 cells となり、フラスコ培養では9日目に 9.6×10^5 cells で最も高い生細胞数に達した。このときの生死細胞の比率を Fig. 2 に示した。フラスコ培養 (B) においては培養6日目まで死細胞/生細胞の比率が約 40 : 60 を維持し続けたのに対し、バッグ培養 (A) では0~2日目においては、フラスコ培養と同様に 40 : 60 前後で推移し、3~6日目においては 20 : 80 を維持していることが分かった。なお、このときの培養体積は Fig. 3 のようになり、初期細胞数による培養体積の差があるものの、類似したパターンで増加していったことが示された。

バッグ培養とフラスコ培養における MAb の産生量を Fig. 4 に示した。MAb は、それぞれの培養系において、培養最終日 (10日目) に高い産生量を示し、フラスコ培養では $48.7 \mu\text{g/ml}$ (全培養液 127 ml 中の IgG 量として 6.2 mg) を、バッグ培養では $79.2 \mu\text{g/ml}$ (全培養液 994 ml 中の IgG 量として 78.8 mg) となり、このときのバッグ培養の産生 IgG 濃度は、フラスコ培養の約 1.6 倍に達した。

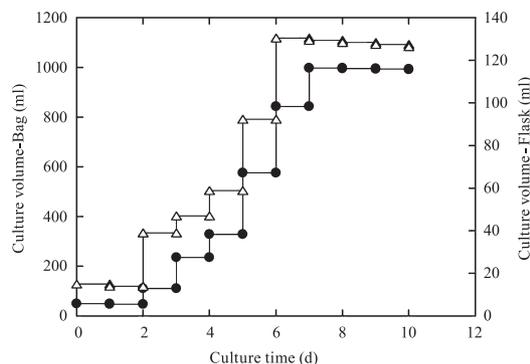


Fig. 3. Cumulative changes in volume of culture medium in the bag (●) and in flask (□). A fresh cell culture medium was added every 24 h to maintain the appropriate cell density.

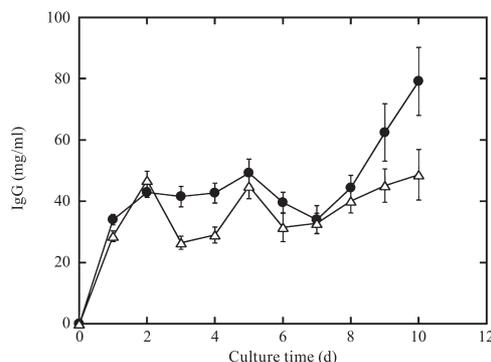


Fig. 4. Concentration of Mab IgG produced in bag (●) and flask cultures (□). The concentration in each culture supernatant was determined by the anti-mouse IgG rabbit HRP-labeled antibody sandwich method in which 5 mg/ml 100 ml of anti-mouse IgG Fc rabbit antibody (adjusted to pH 9.5 with carbonate buffer) was added to microplates were then incubated at room temperature for 24 h. The amount of IgG produced was calculated using the standard curve of mouse IgG as reference.

Fig. 2-A, B のようにバッグ、フラスコの2つの培養系が対数増殖期であった6日目までについて、生/死細胞の比率を見たとき、培養1日目までは、バッグ培養、フラスコ培養ともに全細胞数の 50% 前後の低い生細胞率を示している。しかし3日目以降、特にバッグ培養において生細胞率が優位に増加し、フラスコ培養の約 56~60% 以下に対して、約 74~79% を示した。この数値は、培養バッグが表面積 $627 \text{ cm}^2 \times 2$ 面 (表裏として) でガス交換が可能であるのに対し T-225 フラスコは 225 cm^2 のガス交換能力しか得られないという物理的な問題点に関連性があると考えられる。

今回検討した2つの培養系では、培養フラスコが要するスペースの問題からフラスコ培養系の培養スケールを縮小して実験を行ったが、播種時の細胞数が異なるため、2つの培養系を直接比較することはできない。そこで、バッグ培養とフラスコ培養の培養スケールの差を補正

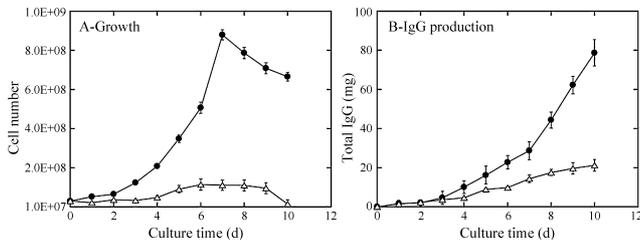


Fig. 5. (A) Cell proliferation time curves for bag (●) and flask cultures (□) after adjusting for the initial difference in the number of seeded cells. (B) Mab production time curves for bag (●) and flask cultures (□) after adjusting for the initial difference in the number of seeded cells.

した全細胞数と抗体産生量のグラフを Fig. 5 に示した。Fig. 5-A の細胞数の増加は、バッグ培養が培養 7 日目をピークに下降傾向が著しいのに比べ、フラスコ培養は培養 9 日目まで増殖していた。このときのフラスコ培養での増殖率は、バッグ培養ほどではないが増加傾向を維持している。次に、Fig. 5-B の総 IgG 量をバッグとフラスコとで比べてみるとバッグ培養では細胞増殖が下降に転じた培養 7 日目から急速に産生抗体が増加していることが分かる。しかし、フラスコ培養では、細胞増殖にほとんど影響されることなく一定の速度で抗体を産生していることが示された。このことは、ハイブリドーマ細胞の増殖曲線から推測して、細胞の分裂時には抗体の産生は少なく、増殖が停止状態になったときに抗体を産生していることが示唆できた。

これは、細胞分裂と分裂期の間期においてより安定して抗体タンパク質の生産を行っているためと考えられ、培地の栄養素や pH の影響により分裂を起こすことなく死滅する細胞の増減が見られるためと思われる。

Table 1 に示した予備実験では細胞増殖や IgG 産生が高い状況にあるのは、12 穴シャーレを用いて培地液量を 1.2 ml/穴で 37°C の CO₂ インキュベータ中に静置培養を行うと液高が約 3 mm と低く、培養液低層までガス交換が良好であったためと推察できる。このことからシャーレなどを用いて培地量を少なく保持することで、培地のガス交換が良好となり、細胞増殖、抗体産生を高くすることが期待でき、ガス交換と細胞増殖性が密接に関わっていることが示唆できる。船津と桁山³⁾ は浮遊細胞培養において、ガス交換能を上げることで細胞増殖性があがったと報告していることと一致している。このことから、シャーレなどの培養容器を用いて培養液層をできるだけ浅く培養することでガス交換性を上げて培養することにより、細胞増殖能とタンパク産生量は確保が可能と思われるが、シャーレ培養における操作性や汚染の危険性を考慮した場合に現実的ではない。

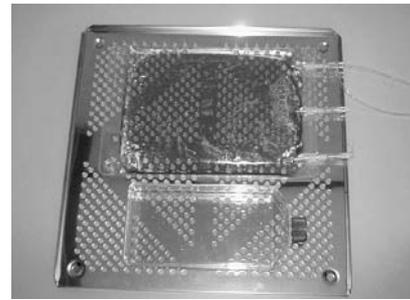


Fig. 6. Comparative pictures of the flask and bag cultures showing the difference in volume capacity. The culture was carried out in a bag containing 1000 ml of cell culture medium and in a flask containing 200 ml of the medium. The culture volume of one bag is equivalent to that of 5 flasks.

ガス交換性のある程度確保しつつ、無菌的に大量培養するためには培養バッグによる閉鎖系培養法が優れている。これは角田ら⁴⁾ がヒトリンパ球の培養においてポリエチレン製バッグ培養がフラスコ培養に比べて省力的に大量培養が可能でかつ 1.8 倍のリンパ球の増殖性を示したことも同意できる。

ローラーボトルやスピナーフラスコ、振とうフラスコなどでハイブリドーマを培養して高収量の MAb を得るためには⁵⁾、培養体積の確保が必要であり⁶⁾、使用にあたっては振とうや回転速度などといったパラメータの最適化のための調整作業が必要になる⁷⁾。さらに専用の培養装置や培養容器などに多くのコストを投入しなければならず、加えて培養装置を設置するための多くのスペースも必要になる。一方で既存の培養系や⁸⁾ 培養基材の改良を試み⁹⁾、新たな培養容器の提案、市販化¹⁰⁾ がなされてきたが、高価になってしまう傾向がある。今回、われわれが提案する培養バッグの形態を Fig. 6 に示したが、このバッグを用いた系は、汎用の CO₂ インキュベータを要するのみであり、培養にかかるコストは培養バッグと培地に集約される。また 1 l スケール (B バッグ-EL を使用) の培養を行うにあたり必要とする培養バッグの設置スペースは、23 × 40 cm² (バッグのポート部分含む) を要するのみであり、要求される抗体量に応じて CO₂ インキュベータ内の架台と培養バッグを最大限に増やすだけで 10 数 l 程度までの培養が可能である。

本報告では、培養バッグを用いることにより、通常の CO₂ インキュベータと少ない培養空間のみという汎用性の高い条件下で培養フラスコに比べ効率良く MAb を得ることが示された。しかし、本実験で使用した細胞株は Strain A の 1 種類のみであり、今後、異なるいくつかのハイブリドーマを用いて比較検討を行う必要がある。

要 約

動物保護の観点から、腹水化が困難となりつつある現状において、ハイブリドーマからMABを多く得るためには、無血清培地による大量培養もしくは高価な培養容器などを用いる必要がある。そこで、著者らはガス透過性を有するポリエチレンフィルムで成型された培養バッグでハイブリドーマを培養することにより、培養フラスコに比べ、安価かつ簡便に高収量のIgGを得ることができた。このときのIgG産生は、フラスコ培養の48.7 $\mu\text{g/ml}$ に対し、バッグ培養では79.2 $\mu\text{g/ml}$ とおよそ1.6倍強の高いMABが得られた。

本研究は独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」により行ったものである。ここに記して謝意を表す。

文 献

- 1) Köhler, G. and Milstein, C.: *Nature*, **256**, 495-497 (1975).
- 2) Smith, G. P.: *Science*, **228**, 1315-1317, (1985).
- 3) 船津和守, 栢山正吉: 農化, **61**, 149 (1987).
- 4) 角田卓也, 谷村 弘, 山上裕機, 岩橋 誠, 谷 眞至, 玉井美紀子, 野口浩平, 有井一雄, 堀田 司: *Biotherapy*, **6**, 499-500 (1992).
- 5) Kelley, K. W. and Lewin, H. A.: *J. Anim. Sci.*, **63**, 288-309 (1986).
- 6) Pannell, R. and Milstein, C.: *J. Immunol. Methods*, Vol.146, Issue 1, p.43-48 (1992).
- 7) Kallel, H., Zaïri, H., Rourou, S., Essafi, M., Barbouche, R., Dellagi, K., and Fathallah, D. M.: *Cytotechnology*, **39**, 9-14 (2002).
- 8) Zhang, H., Williams-Dalson, W., Keshavarz-Moore, E., and Shamlou, P. A.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **41**, 1-8 (2005).
- 9) Altshuler, G. L., Dziewulski, D. M., Soweck, J. A., and Belfort, G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 646-658 (1986).
- 10) Bruce, M. P., Boyd, V., Duch, C., and White, J. R.: *J. Immunol. Methods*. **264**, 59-68 (2002).