



Title	24ディープウェルプレートを用いたフェドバッチ培養法によるCHO細胞株構築プロセスの迅速化
Author(s)	大平, 俊介
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/103197">https://doi.org/10.18910/103197</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏名（大平俊介）	
論文題名	24ディープウェルプレートを用いたフェドバッチ培養法によるCHO細胞株構築プロセスの迅速化
論文内容の要旨	
第1章 序論 抗体医薬品の製造においては、宿主細胞としてチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞が最も広く用いられており、その抗体生産における翻訳後修飾は抗体の機能や安全性に深く関わる。そのため、医薬品の開発初期に選定された細胞株が開発後期や商用生産でもそのまま用いられる傾向にある。したがって、開発初期における細胞株評価が重要であり、製造に適した細胞株をいかに効率よく選定できるかが、抗体医薬品の品質、製造コスト、開発期間に大きな影響を与える。一般に、細胞株の初期スクリーニングでは作業の簡便さからウェルプレートを用いた静置培養が採用されるが、実際の製造環境である通気搅拌培養との相関は高くなく、有望株を見逃すリスクがある。一方、振とうフラスコは浮遊培養であり通気搅拌培養により近い評価が可能であるが、工数がかかるため初期スクリーニングで多数の細胞株を扱うには不向きである。そこで、浮遊培養が可能なディープウェルプレート（DWP）を用いた浮遊培養が検討されるが、DWPはその構造上、ウェル位置によって培養環境に差が生じやすいという課題がある。本研究では、ウェル位置による培養環境、細胞培養への影響を明らかにし、ウェル位置によらず均一な浮遊培養が可能な24 DWPフェドバッチ培養法の構築を試みた。構築した培養法の導入により生産細胞株構築プロセスを迅速化、効率化することで、抗体医薬品の開発・製造コスト低減、開発期間短縮を目指した。	
第2章 ウェル位置による培養環境、細胞培養への影響解析 サンドイッチリッドの導入による効果を評価した。シリコンシートにより各ウェルが隔離され個別にガス交換ができることで、ウェル間の培地蒸発速度、浸透圧変化の差が低減された。抗体Aを生産するCHO細胞株を用いたフェドバッチ培養の結果、ウェル位置により積算細胞濃度及び生産抗体濃度に影響がないことが示され、均一な評価が可能であることが示された。	
第3章 振とうフラスコの代替容器としての妥当性の評価 構築した24 DWP培養条件が振とうフラスコと同様の培養特性を再現できるかを検証した。抗体Aを生産するCHO細胞株を用い、両培養法における生細胞濃度や乳酸、アンモニウムイオンなどの代謝産物、抗体濃度を比較した結果、両者でほぼ同様の推移が得られた。振とうフラスコにおける細胞の培養特性を24 DWPにより再現できることが示された。また、24 DWP培養における培養液量の影響を評価した。培養開始液量を3.0、4.0、4.5 mLとしたフェドバッチ培養の結果、培養液量は2.5～4.5 mLの範囲で推移したが培養結果に顕著な差を生じないことが示された。いずれの液量条件においても振とうフラスコと同等の積算細胞濃度が得られ、24 DWPのガス交換効率は十分に高いことが示された。他の抗体生産細胞株群においても振とうフラスコと同様の培養結果が得られ、汎用的であることが示された。以上より、24 DWPが振とうフラスコの手間を軽減しつつ、同様の細胞培養特性を評価できる培養法であると考えられた。また、細胞株構築プロセスへの24 DWPフェドバッチ培養法導入の有用性を、従来法との比較により検証した。細胞株構築プロセスの24ウェルプレート培養評価前の192株を用いて従来法及び24 DWPフェドバッチ培養法のそれぞれで抗体生産能を指標に30株を選抜し、振とうフラスコを用いた培養により評価した。その結果、従来法で選抜された株群の平均抗体濃度2.9 g L <sup>-1</sup> 、標準偏差1.0 g L <sup>-1</sup> に対し、24 DWP法で選抜された株群ではそれぞれ3.6 g L <sup>-1</sup> 、0.49 g L <sup>-1</sup> であり、高生産性かつばらつきの少ない株群が得られた。生産能が最も高かった株は24 DWP法でのみ選抜されており、有望株の見逃しを防ぐ効果も明らかとなった。	
第4章 総括 本研究により構築された24 DWPフェドバッチ培養法は、従来のウェルプレートで見られた不均一性を解消しつつ、振とうフラスコ培養と同様の評価制度を持ち、高スループットで多数の株を同時に評価可能な有効な手法であることが示された。本方法の導入により、生産細胞株のスクリーニング効率が大幅に向上し、抗体医薬品の製造コスト削減や開発期間短縮などの効果が期待できる。	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 ( 大平 俊介 )	
論文審査担当者	(職) 氏名 主査 教授 大政 健史 副査 教授 内山 進 副査 教授 本田 孝祐

### 論文審査の結果の要旨

第1章 序論においては、抗体医薬品の製造における宿主細胞としてのチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞の重要性ならびに製造に適した細胞株選定の重要性について論じている。一般に、細胞株の初期スクリーニングでは作業の簡便さからウェルプレートを用いた静置培養が採用されるが、実際の製造環境である通気攪拌培養との相関は高くなく、有望株を見逃すリスクがある。一方、振とうフラスコは浮遊培養であり通気攪拌培養により近い評価が可能であるが、工数がかかるため初期スクリーニングで多数の細胞株を扱うには不向きである。そこで、浮遊培養が可能なディープウェルプレート (DWP) を用いた浮遊培養が検討されるが、DWP はその構造上、ウェル位置によって培養環境に差が生じやすいという課題がある。本博士論文では、ウェル位置による培養環境、細胞培養への影響を明らかにし、ウェル位置によらず均一な浮遊培養が可能な 24 DWP フェドバッチ培養法の構築を試みている。

第2章 ウェル位置による培養環境、細胞培養への影響解析においては、サンドイッチリッドの導入による効果を評価している。シリコンシートにより各ウェルが隔離され個別にガス交換ができることで、ウェル間の培地蒸発速度、浸透圧変化の差が低減され、抗体 A を生産する CHO 細胞株を用いたフェドバッチ培養の結果、ウェル位置により積算細胞濃度及び生産抗体濃度に影響がないことが示され、均一な評価が可能であることが示されている。

第3章 振とうフラスコの代替容器としての妥当性の評価においては、構築した 24 DWP 培養条件が振とうフラスコと同様の培養特性を再現できるかを検証している。抗体 A を生産する CHO 細胞株を用い、両培養法における生細胞濃度や乳酸、アンモニウムイオンなどの代謝産物、抗体濃度を比較した結果、両者でほぼ同様の推移が得られている。振とうフラスコにおける細胞の培養特性を 24 DWP により再現でき、24 DWP 培養における培養液量の影響を評価している。培養開始液量を 3.0、4.0、4.5 mL としたフェドバッチ培養の結果、培養液量は 2.5~4.5 mL の範囲で推移したが培養結果に顕著な差を生じず、いずれの液量条件においても振とうフラスコと同等の積算細胞濃度が得られ、24 DWP のガス交換効率は十分に高いことが示されている。また、他の抗体生産細胞株群においても振とうフラスコと同様の培養結果が得られ、汎用的であることが示されており、24 DWP が振とうフラスコの手間を軽減しつつ、同様の細胞培養特性を評価できる培養法であると考察している。また、細胞株構築プロセスへの 24 DWP フェドバッチ培養法導入の有用性を、従来法との比較により検証している。細胞株構築プロセスの 24 ウェルプレート培養評価前の 192 株を用いて従来法及び 24 DWP フェドバッチ培養法のそれぞれで抗体生産能を指標に 30 株を選抜、振とうフラスコ培養により評価し、従来法で選抜された株群の平均抗体濃度  $2.9 \text{ g L}^{-1}$ 、標準偏差  $1.0 \text{ g L}^{-1}$  に対し、24 DWP 法で選抜された株群ではそれぞれ  $3.6 \text{ g L}^{-1}$ 、 $0.49 \text{ g L}^{-1}$  であり、高生産性かつばらつきの少ない株群が得られている。

第4章 総括においては、本博士研究により構築された 24 DWP フェドバッチ培養法は、従来のウェルプレートで見られた不均一性を解消しつつ、振とうフラスコ培養と同様の評価制度を持ち、高スループットで多数の株を同時に評価可能な有効な手法であることを取りまとめており、本方法の導入により、生産細胞株のスクリーニング効率が大幅に向上升し、抗体医薬品の製造コスト削減や開発期間短縮などの効果が期待できる。

以上のように、本論文は生物工学分野における 24 ディープウェルプレートを用いたフェドバッチ培養法による CHO 細胞株構築プロセスの迅速化に関する研究を行い、抗体医薬品の製造における株選択の新しい方法を示しており、よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。