



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

博士学位論文

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

大平 俊介

2025 年 07 月

大阪大学大学院工学研究科  
生物工学専攻 生物工学コース

## 目次

第1章	序論	3
第1節	研究背景	3
1)	モノクローナル抗体発現宿主としての CHO 細胞	3
2)	モノクローナル抗体医薬品における細胞株構築の位置づけ	4
3)	細胞株構築の効率化	5
第2節	博士論文構成	9
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	11
第1節	緒言	11
第2節	実験材料及び方法	14
1)	24 ディープウェルプレート	14
2)	培地蒸発量及び浸透圧測定	14
3)	細胞株の構築	14
4)	フェドバッチ培養	15
第3節	結果及び考察	17
1)	培養環境における蒸発速度及び浸透圧	17
2)	ウェル位置の培養性能への影響	19
第4節	小括	21
第3章	振とうフラスコの代替培養容器としての妥当性の評価	22
第1節	緒言	22
第2節	実験材料及び方法	23
1)	細胞株の構築	23
2)	フェドバッチ培養	23
第3節	結果及び考察	25
1)	培養特性の比較	25
2)	培養開始液量	28
3)	24 DWP フェドバッチ培養の汎用性検証	32
4)	CHO 細胞株の構築プロセスへの適用評価	37
第4節	小括	40
第4章	総括	42
	本論文に関する発表論文	45
	引用文献	46
	Supplemental Data	50
	Supplemental Data-1	50
	Supplemental Data-2	51

## 第1章 序論

### 第1節 研究背景

#### 1) モノクローナル抗体発現宿主としての CHO 細胞

過去 10 年間で、治療用モノクローナル抗体の販売承認は、数と種類の両面で大幅に増加している。現在、欧州医薬品庁と米国食品医薬品局によって 100 種類以上のモノクローナル抗体医薬品が承認されており、その中には 2023 年 11 月 17 日までの 1 年間に初めて承認された 16 種類の新しい抗体治療製品が含まれる<sup>1, 2)</sup>。

モノクローナル抗体医薬品は、チャイニーズハムスター卵巢 (Chinese Hamster Ovary、CHO) 細胞や NS0、Sp2/0 などのマウス骨髓腫細胞、及び大腸菌細胞を使用して製造されている。このうち最も一般的に使用されている宿主細胞は CHO 細胞であり、もともとはチャイニーズハムスター (*Cricetulus griseus*) の卵巢組織から樹立され<sup>3)</sup>、現在、バイオ医薬品タンパク質、特にモノクローナル抗体の製造によく使用される宿主細胞となっている<sup>4)</sup>。

CHO 細胞を宿主細胞として使用することには、いくつかの利点がある<sup>5)</sup>。特に、CHO 細胞は医薬品タンパク質生産に適した翻訳後修飾システムを備えており、修飾される糖鎖構造がヒト型に類似していて抗原性が低いことが一般的に言われている<sup>6)</sup>。また、CHO 細胞ではげっ歯類特有のレトロウイルスが検出されるが、このウイルス群は人には感染しないことが確認されており、International Conference on Harmonisation (ICH) Guideline Q5A において簡便な安全性評価をすることが認められている<sup>7)</sup>。規制当局の承認実績も多く実証されている。製造の観点から見ると、CHO 細胞は無血清培養に容易に適応でき、また、高細胞濃度浮遊培養への適用も可能であるため、バイオリアクターを用いた大規模製造に適している<sup>8)</sup>。CHO 細胞を用いたモノクローナル抗体の製造プロセスは継続して改良が行わ

れており、現在ではその収量はフェドバッチ培養で  $10 \text{ g L}^{-1}$  にも達している<sup>9, 10, 11</sup>。

## 2) モノクローナル抗体医薬品における細胞株構築の位置づけ

CHO 細胞により生産されたモノクローナル抗体は翻訳後修飾を受け、その翻訳後修飾の割合は抗体の機能、安定性、安全性において重要な役割を果たす<sup>12, 13</sup>。同一のモノクローナル抗体を生産させたとしても、細胞株により翻訳後修飾の割合は異なるため、臨床開発初期の治験薬製造に使用した細胞株を臨床開発後期において変更することは、モノクローナル抗体の同等性、安全性の証明など規制当局への説明が求められるリスクがあり<sup>14</sup>、避けられる傾向にある。そのため、臨床開発初期段階で選定された細胞株がその後の臨床開発後期、商用生産でも使用されることになり、臨床開発初期段階で十分な株評価を行い、バイオ医薬品製造に用いる細胞株として望ましい特性を持つ細胞株を選定することが重要となる。

モノクローナル抗体を含めバイオ医薬品における、分子種決定から宿主細胞を用いたタンパク質生産細胞株を樹立する工程が細胞株構築 (Cell Line Development) プロセスである。細胞株構築プロセスでは、目的遺伝子を導入した細胞集団からクローニングし、その後、数百の細胞株について細胞増殖や目的タンパク質生産性能などの特性評価と選択を数回繰り返すことで、望ましい特性を持つ細胞株を選抜する。ランダム挿入の場合、細胞株ごとに目的遺伝子の染色体上の挿入部位が変わること、また CHO 細胞にすでに存在する遺伝的異質性により、細胞増殖性能や目的タンパク質生産性能が異なる細胞株が出現する<sup>15</sup>。これらの細胞株の中からバイオ医薬品製造に用いる細胞株として望ましい特性を有する細胞株を選抜することになるため、細胞株構築プロセスには時間と手間がかかる<sup>16</sup>。望ましい細胞株を取得するにはできるだけ多くの細胞株を定量的に評価することが必要となるが、医薬品の開発の最も重要な事項の 1 つは、開発時間 (タイムライン) の短縮であり、細胞株構築プロセスの効率化、迅速化が求められている<sup>17</sup>。

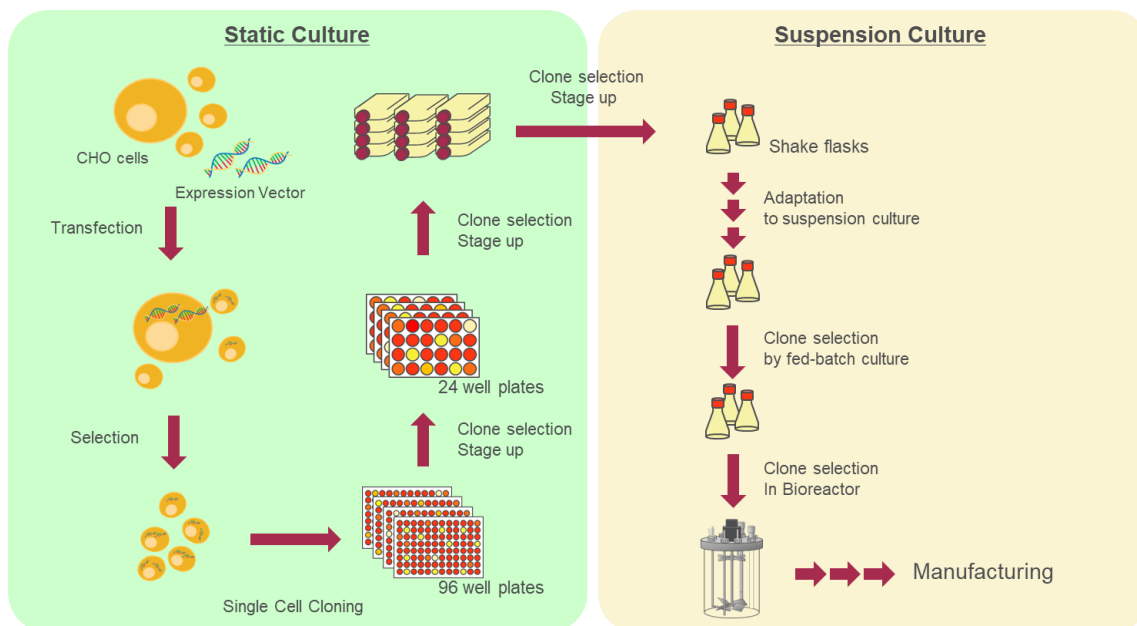


図 1 CHO 細胞株の構築プロセスから製造までの流れ

図 1 に CHO 細胞株の構築プロセスから製造までの流れを示す。細胞株構築プロセスでは、遺伝子導入した細胞集団から細胞を 1 つ 1 つ分離するクローニングを行い、その後細胞を増殖させ、特性評価により選抜し、培養容器を大きくして拡張培養を繰り返す。最初の培養容器には、通常 96 ウェルプレートが用いられる。細胞が十分に増殖した後に生産物濃度を測定し生産性が高い細胞株を選抜、24 ウェルプレートへ継代し、拡張培養を行う。プレート培養以降、振とうフラスコ、通気攪拌培養槽を用いた評価を行い、最終的なタンパク質生産細胞株を選抜する。

### 3) 細胞株構築の効率化

細胞株構築における 96 ウェルプレート及び 24 ウェルプレート段階での培養方法は、通常は静置培養である。一方で、最終的なバイオ医薬品製造においては、多くの場合、通気攪拌培養槽を用いた浮遊培養が行われる。浮遊培養でのフェドバッチ培養と静置培養でのバ

ッチ培養との相関性は低いことが報告されている<sup>18</sup>。これは、フェドバッチ培養で高いタンパク質生産能を示す細胞株であったとしても、静置培養でのタンパク質生産能が低い場合は細胞株構築の早期段階で除外されてしまうリスクを示唆している。早期段階で浮遊フェドバッチ培養を用いたスクリーニングを行うことにより、潜在的に高生産細胞株を見逃す可能性を最小限に抑えることができる。振とうフラスコを用いた培養は、浮遊培養で細胞増殖、培養特性のモニタリングに十分なサンプル量を供給できるプラットフォームとして確立されているが、1本1本のマニュアル操作が基本であるため多数の細胞株を同時に処理するためには多くの工数が必要となる。効率的なスクリーニングのために、自動化された培養システムも開発され、細胞培養のプロセス開発に利用されている<sup>19, 20</sup>。自動化により省力化、効率化は達成されるが、これらの自動化培養システムは高価なシステムの導入が必要であり、培養容器自体が複雑となり振とうフラスコと比較して高価であることが多くランニングコストが高くなるため、その利用には制限がある。安価で効率的な培養プラットフォームとしてウェルプレートを用いた培養があり、マルチチャンネルピペットを使用することで、細胞播種やサンプリングを効率的に行うことができる。しかしながら、96 ウェルプレートでは 100  $\mu$ L、24 ウェルプレートでは 1 mL 程度での培養が一般的であり、限られた液量のため培養状態を経時的に測定することが難しい。より大量の液量を取り扱うことができるよう、各ウェルの深さを増したディープウェルプレート (DWP) が開発された。通常のウェルプレートの高さが 15 mm 程度であるのに対し DWP の高さは 45 mm 程度であり、ウェル容積は通常の 96 ウェルプレートが 0.2 から 0.3 mL、24 ウェルプレートが 2 から 3 mL 程度であるのに対し 96 DWP は 2 mL 程度、24 DWP は 10 mL 程度である。プレートの平面上の面積は変わらないが、より容積を増やすためにウェルの形状は丸型よりも角型が多く用いられている。DWP の平面形状は通常のウェルプレートと変わらないため、ウェルプレートが有する作業の簡便性を維持したまま培養液量を増やすことができ、CHO 細胞

の培養においても活用されている<sup>21)</sup>。24 DWP では 4 mL 程度で振とう培養が可能であり、24 ウェルプレート培養と比較して 4 倍程度の培養液量があることから、培養状態を分析するために経時的に複数回サンプリングしても培養環境に影響しない培養液量を維持できると期待される。

細胞株スクリーニングにおける重要な要素の 1 つとして、各細胞株を正しく評価することが挙げられる。一般的なウェルプレートと蓋においては、プレート周辺の蓋とプレートの隙間によりプレート内部と外部環境とのガス交換が行われる。プレートの中央に位置するウェルでは周囲のウェルを介してガス交換が行われることになり、ウェルのプレート上の位置により外部環境とのガス交換効率に差異が生じる。ウェル位置によるガス交換効率の違いから培養中に蒸発する培地の量が異なり、蒸発が多いウェルの細胞株の抗体濃度の増加は過大評価され、さらに、細胞培養における細胞増殖やタンパク質生産がガス交換効率の違いによっても影響を受ける可能性がある。そのため、DWP フェッドバッチ培養をモノクローナル抗体生産細胞株構築プロセスに組み込むためには、プレート内のウェル位置による培養環境の違いを最小限に抑える必要がある。

製造にとってより望ましい性質の細胞株を構築するためには、可能な限り多くの多様な細胞株を評価し、選抜することが必要である。一方で、細胞株構築が行われるのは、まだ候補医薬品の安全性、有効性が確認できていない段階であり、細胞株構築にかけられる工数には限りがある。前述した通り、細胞株構築プロセスにおいては、作業が簡便なプレートを用いた静置培養にて数百の細胞株を評価し、選別された数十の細胞株について振とうフラスコを用いた浮遊培養による評価が行われている。浮遊培養において多数の細胞株を評価できないのは振とうフラスコ培養の作業性が低いためである。一度に多くの培養評価が可能であることから 96 DWP を用いた培養方法が報告されているが、培養液量が限られるため培養終了時の 1 点のみでの測定となってしまう<sup>22)</sup>。複数のウェルから培養液を抜き取って



混合しサンプル量を確保することで培養の経時的な推移を評価することはできるが、同一条件で複数のウェルを使用することになるため、一度に評価可能な条件数は少なくなってしまう<sup>23</sup>。培養液量の少なさをカバーするために培養液を抜き取らずに培養状態を測定する手法として、96 DWP での酸素移動速度 (oxygen transfer rate (OTR)) を測定可能な装置が開発された<sup>24</sup>。液中の酸素濃度が有意に変化しない限り細胞による酸素消費速度 (Oxygen uptake rate (OUR)) は OTR と等しいと仮定し、OUR と生細胞濃度との相関から、培養中の OTR を測定することにより培養液を抜き取ることなく生細胞濃度を推定することが可能となった<sup>25</sup>。しかし、依然として培養中の代謝産物を測定するには培養液の抜き取りが必要であり、培養状態の経時的な推移を評価するには 96 DWP より容積が大きい 24 DWP を用いた培養が有用と言える。24 DWP の細胞株構築プロセスへの適用に関する研究も行われており、Chaturvedi らや Tang らがそれぞれ培養 7 日間、培養 4 日間におけるウェル位置による生細胞濃度への影響を報告している<sup>26, 27</sup>。ウェル位置による細胞培養への影響の要因として、単位時間当たりの蒸発量の差異が考えられる。蒸発量の差は時間とともに大きくなることから、2 週間程度のフェドバッチ培養を想定する場合は同期間における差異を評価する必要がある。また、Mora らの研究では、振とうフラスコ培養により生産される抗体の品質特性 (サイズバリエーション、電荷異性体、糖鎖修飾) について、絶対値は異なるが、24 DWP 培養により評価できる可能性が示された<sup>28</sup>。Mora らの研究では乳酸などの代謝産物の推移について示されていないが、抗体の品質特性は細胞の代謝により影響を受けるため<sup>29</sup>、品質特性の差異の要因を調査する上で代謝産物推移の培養法間差について検証することは重要である。24 DWP 培養の研究は主に、現在振とうフラスコを用いて実施している培養評価の効率化を目指して行われており、著者が知る範囲では、細胞株構築プロセスの静置培養評価の代替として適用することで浮遊培養で評価する母集団を増やし、得られる細胞株の培養特性を従来法と比較した報告はない。

本博士論文では、簡便に作業できる 24 DWP を用い、2 週間程度の培養期間にわたりウェル位置によらず均一な培養環境で細胞培養が行え、振とうフラスコと同等の細胞培養特性（細胞増殖能、抗体生産能、代謝産物推移）を評価できる培養方法の構築を試みた。また、構築した培養法を細胞株構築プロセスの 24 ウェルプレート評価段階の細胞株評価に適用し、多様な細胞株を浮遊培養評価することの有用性を検証した。細胞株構築プロセスで利用できるウェルプレートによる浮遊培養評価手法を構築することで、浮遊培養で評価できる細胞株数を大幅に増加させ、細胞株構築プロセスの迅速化、効率化を通して、バイオ医薬品の開発・製造コスト低減、開発期間の短縮に貢献する。

## 第2節 博士論文構成

本博士論文では、CHO 細胞を宿主としたモノクローナル抗体生産細胞株取得スキームの迅速化、効率化を目指し、フェドバッチ培養による細胞株評価への 24 DWP の適用を試みた。本博士論文の構成は以下のとおりである。

第 2 章では、プレートを用いたフェドバッチ培養の課題となる、ウェル間の不均一性を解消した培養条件の構築を試みた。培養環境下での蒸発量、浸透圧変化を指標に、ウェル間で均一な培養環境を維持するためのサンドイッチリッドの有用性を評価した。また、同一細胞株で 24 DWP を用いたフェドバッチ培養を行い、細胞増殖、生産抗体濃度を指標に、ウェルの位置による培養結果の偏りがないかを評価した。

第 3 章では、同一のモノクローナル抗体を生産する複数の細胞株を用いてフェドバッチ培養を行い、振とうフラスコを用いたフェドバッチ培養と比較することで、24 DWP が振とうフラスコの代替培養容器として利用可能であるか評価した。また、モノクローナル抗体生産細胞株構築プロセスにおいて 24 DWP を用いたフェドバッチ培養による細胞株評価を行い、得られた細胞株群の特性を従来のプロセスで構築された細胞株群と比較し、24 DWP

を用いたフェドバッチ培養導入による有用性を評価した。

第4章では、第3章までの研究内容をまとめると共に本博士論文の結論を示し、今後の研究の展望を述べた。

本博士論文の構成を図2に示す。

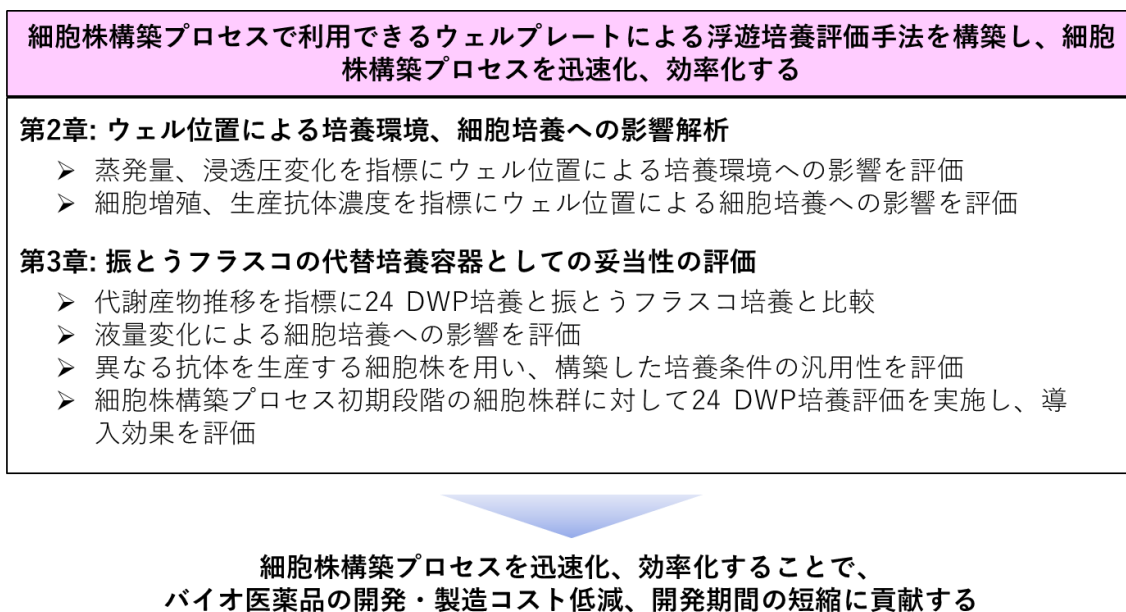


図2 本博士論文の構成

## 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

### 第1節 緒言

24 DWP を用いたフェッドバッチ培養プロセスを確立する際の課題の 1 つとして、ウェル間の培養環境の不均一性が挙げられる。標準的に市販されているプレートの蓋は、単一のプラスチックの板でプレート全体を覆うものである。蓋には穴がないため、プレート内の培養液のガス交換は、プレートの四方の蓋と本体の間の隙間を通じて行われる (図 3A)。プレートの中心に位置するウェルは外部環境と直接接しておらず、外部環境からの影響を受けにくい。一方で、プレートの周囲のウェルは外環境と接しており、特に角のウェルはその二面が外部環境と接している。この外部環境との接触面の数の違いが、各ウェルの培養環境の違いを引き起こすと考えられる。本博士論文では外部環境と接している面の数に基づいて、プレート上のウェルを次の 3 つのグループに分類した。1 つ目を外部環境と 2 つの面を接しているコーナーウェル (図 3C、A1、A6、D1、D6 ウェル)、2 つ目を外部環境と一つの面が接触しているエッジウェル (図 3C、A2 – A5、B1、B6、C1、C6、D2 – D5 ウェル)、3 つ目を外部環境と接していないインサイドウェル (図 3C、B2 – B5、C2 – C5 ウェル) とした。

フェッドバッチ培養では一般的に 2 週間程度培養を継続するため、培養液の蒸発は重要な培養環境の変化となる。蒸発により培養液が濃縮されることで浸透圧が上昇する。いくつかの研究では、浸透圧の変化が CHO 細胞の増殖と生産性に影響を与えることが確認されている<sup>30, 31, 32, 33</sup>。そのため、ウェル間の浸透圧の違いは、プレートを用いた細胞株評価において不要なバイアスを引き起こす可能性がある。また、同量のモノクローナル抗体を生産していたとしても、培養液の濃縮度合いの違いにより見かけの抗体濃度が変わり、そのウェルで培養されている細胞株の性能を過大評価してしまう可能性がある。そのため、24 DWP を

用いたフェドバッチ培養をモノクローナル抗体生産細胞株構築プロセスに適用するためには、ウェル間で培養環境を均一化する必要があると考えられる。

個々のウェルで個別にガス交換可能な環境を実現する方法として、ガス透過性フィルムがある。シール状のフィルムをプレート上部に貼り付けることで個々のウェルを隔離することができ、均一な培養環境を実現できると期待できる。しかし、フェドバッチ培養においては約 2 週間の培養期間中にサンプリングやフィード培地添加のために何度も蓋が開閉されることから、シールではなく繰り返し使用可能な蓋であることが望ましいと考えられる。

Duetz らにより、個々のウェルを隔離し交差汚染を防止できる蓋としてサンドイッチリッドシステムが開発された<sup>34</sup>。サンドイッチリッドシステムは、シリコンシートを蓋として使用しており、上から蓋をプレートに押しつけることにより、各ウェルは隣接するウェルや外部環境から隔離される。各ウェルを隔離した状態でもガス交換ができるよう、サンドイッチリッドシステムでは各ウェルの上部に位置するようにガス交換用のフィルター層を持つ穴があり、そのフィルターを通しガス交換が行われる。(図 3B)。

標準的な蓋と異なり、サンドイッチリッドシステムでは個々のウェルが隔離され、それぞれが外部環境とガス交換できることから、ウェル位置によらず均一な環境であることが期待できる。Duetz らの論文においてウェル間の均一性の重要性についても言及されているが、ウェル位置による培養環境の差異、培養結果への影響については記載されていない。本検討では、サンドイッチリッドシステムを用いた 24 DWP において、各ウェルにおける培養環境を培地蒸発量、浸透圧変化を指標に解析し、ウェル間の環境の均一性について評価した。また、フェドバッチ培養の細胞増殖、タンパク質生産結果を解析し、ウェル位置による細胞培養への影響を評価した。

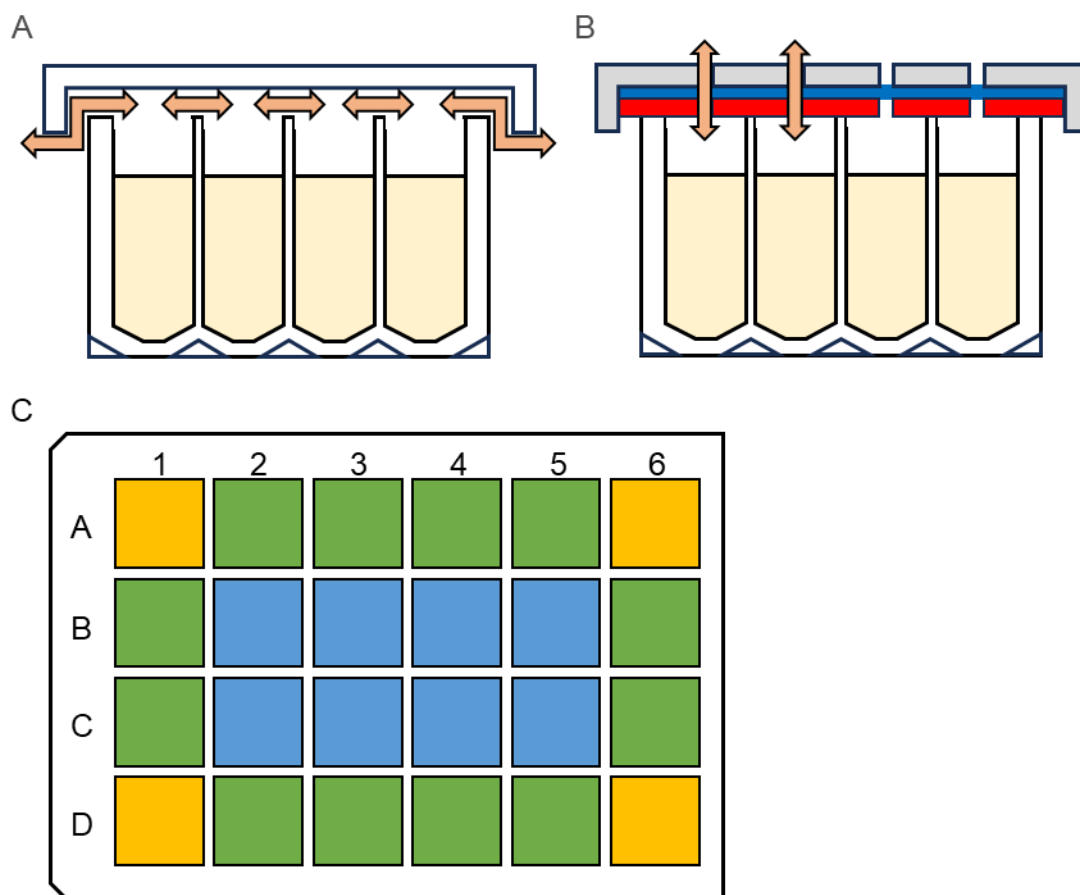


図 3 24 ディープウェルプレートの外観

**A** 標準的な蓋を用いたプレートの断面模式図。**B** サンドイッチリッドを用いたプレートの断面模式図。図 A、B 中の矢印はガス交換の流れの一部を示す。サンドイッチリッドにはシリコンシート（赤色）があり、カバー（灰色）を上から押しつけることで各ウェルを隔離できる。各ウェルにはガス交換用のフィルター層（青色）を持つ穴があり、フィルターを通して各ウェルにてガス交換が行われる。**C** ウェルプレートを上面から見た模式図。ウェルは外部環境と接している面の数に基づいて 3 つのグループに分類した：外部環境と 2 つの面が接しているコーナーウェル（A1、A6、D1、D6 ウェル）、外部環境と 1 つの面が接しているエッジウェル（A2–A5、B1、B6、C1、C6、D2–D5 ウェル）、外部環境と接していないインサイドウェル（B2–B5、C2–C5 ウェル）。

## 第2節 実験材料及び方法

### 1) 24 ディープウェルプレート

24 DWP として、24-square well (10.4 mL) round bottom plate P/N 931568 (Thomson Instrument Company, Oceanside, CA, USA) を用い、プレート付属の蓋を標準的な蓋として用いた。サンドイッチリッドシステムは Sandwich cover 及び Cover clamp (Getinge, Gothenburg, Sweden) を用いた。Sandwich cover はオートクレーブにより滅菌し使用した。

### 2) 培地蒸発量及び浸透圧測定

培地には CD CHO medium ((Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。24 DWP の各ウェルに 4 g の培地を分注し、標準的な蓋及びサンドイッチリッドシステムで蓋をし、CO<sub>2</sub> インキュベーターシェーカー (Infors-HT, Bottmingen, Switzerland) にて保持した。CO<sub>2</sub> インキュベーターシェーカーは培養条件と同様に、庫内温度 36.5°C、ガス濃度 5% (v/v) CO<sub>2</sub> (95% (v/v) air)、80%相対湿度、回転速度 210 回転/分、回転直径 25 mm とした。

標準的な蓋条件では 8 日後に、サンドイッチリッドシステム条件では 14 日後にウェル中の培地重量及び培養液の浸透圧を測定し、分注直後の培地重量との差分を蒸発量とした。浸透圧は BioProfile400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA, US) を用いた。

### 3) 細胞株の構築

本研究では、モノクローナル抗体 A を発現する CHO 細胞株クローン a をモデル細胞株として使用した。宿主細胞は CHOK1SV 株である。本宿主細胞株は Lonza Biologics 社 (Slough, UK) よりライセンス提供された株であり、CHO-K1 細胞株由来で、浮遊培養に順化され無血清無タンパク質培地にて生育可能な細胞である。発現システムとしてグルタミン合成酵素 (Glutamine Synthetase, GS) 遺伝子発現システム (Lonza Biologics) を用

いた。発現ベクターは、GS 遺伝子発現システムベクター (Lonza Biologics)<sup>35</sup> に目的タンパク質遺伝子をクローニングすることによって構築した。本ベクターでは、GS 遺伝子の選択マーカーとしての機能を最適化し導入遺伝子の発現量を増大させるため、GS コーディング配列は弱いプロモータの制御下に置かれ、導入遺伝子のコーディング配列は強力なプロモータの制御下に置かれる<sup>36</sup>。選択剤は GS を阻害するメチオニンスルホキシミン (Methionine sulfoximine、MSX) を用い、細胞株作成及び細胞増殖に使用された培地は、25 mM MSX を添加した CD CHO 培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で、L-グルタミンは含んでいない。クローニングには ClonePix FL (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を使用した。半固形培地で生育したコロニーを中空のピンでピックアップし、25 mM MSX を含む CD CHO 培地を分注した 96 ウェルプレートに回収した。その後、高い抗体生産能を示す細胞株を選抜し、24 ウェルプレートにて拡張培養した選抜、拡張培養を繰り返し、モノクローナル抗体 A を生産するクローン a を得た。プレート培養は、庫内温度 36.5°C、ガス濃度 5% (v/v) CO<sub>2</sub> (95% (v/v) air)、及び 80%相対湿度に設定したインキュベーターで行った。培養上清中の抗体濃度は、Octet QK (ForteBio, Menlo Park, CA, USA) を使用し、バイオレイヤー干渉法 (BioLayer Interferometry) による生体分子間相互作用解析システムで測定した。

#### 4) フェドバッチ培養

フェドバッチ培養の基礎培地には MSX を含まない CD CHO 培地を用い、フィード培地にはアステラス製薬株式会社で構築した無血清フィード培地を用いた。フィード培地は培養 3 日目から培養 13 日目まで隔日で添加し、必要に応じてグルコースを添加した。24 DWP として 24-square well (10.4 mL) round bottom plate with a lid plate P/N 931568 (Thomson Instrument Company, Oceanside, CA, USA) を用いた。初期細胞濃度は  $0.3 \times 10^6$  cells



mL<sup>-1</sup>、培養開始液量は 4.0 mL とし、庫内温度 36.5°C、ガス濃度 5% (v/v) CO<sub>2</sub> (95% (v/v) air)、80%相対湿度、回転速度 210 回転/分、回転直径 25 mm に設定したインキュベーターシェーカーで培養した。

生細胞濃度 (VCC) 及び細胞生存率は ViCELL-XR 細胞計数装置 (Beckman Coulter、Brea, CA, USA) を使用し、トリパンプルー排除法で測定した。培養上清中の抗体濃度は、Octet QK で測定した。

### 第3節 結果及び考察

#### 1) 培養環境における蒸発速度及び浸透圧

24 DWP に培地を分注後、標準的な蓋及びサンドイッチリッドにより蓋をして CO<sub>2</sub> インキュベーターシェーカーにて保持し、一定期間経過後の培地残量及び培地の浸透圧を測定することで、ウェル位置による差異、及び蓋の種類による影響を評価した。ウェル位置により 3 つのグループに分け、その平均値を比較した (図 4)。コーナーウェルは  $n=4$ 、エッジウェルは  $n=12$ 、インサイドウェルは  $n=8$  の値を用い、1 日当たりの蒸発量は総蒸発量とインキュベーターシェーカーでの保持時間から算出した。

標準的な蓋条件においては、コーナーウェルでの蒸発速度はエッジウェル及びインサイドウェルの蒸発速度よりも有意に高く、インサイドウェルでの蒸発速度が最も低い結果となった。培養 15 日間での総蒸発量及び培養開始液量 4.0 mL に対する蒸発量の割合は、それぞれコーナーウェルで 519  $\mu\text{L}$ 、13%、エッジウェルで 273  $\mu\text{L}$ 、6.8%、インサイドウェルで 167  $\mu\text{L}$ 、4.2%となる。また、一定期間経過後の培地の浸透圧は蒸発速度に応じて高くなる結果が得られた。

一方、サンドイッチリッド条件においては、コーナーウェルとインサイドウェルの間、エッジウェルとインサイドウェルの間の蒸発速度の差が統計的に有意 ( $p < 0.05$ ) となっているが、コーナーウェル、インサイドウェルの蒸発速度が 14.4  $\mu\text{L day}^{-1}$  であるのに対してインサイドウェルの蒸発量は 14.0  $\mu\text{L day}^{-1}$  であり、絶対値自体は非常に小さいことから実質的には無視できると考えられた。培養 15 日間での総蒸発量及び培養開始液量 4.0 mL に対する蒸発量の割合は、それぞれコーナーウェルで 217  $\mu\text{L}$ 、5.1%、エッジウェルで 217  $\mu\text{L}$ 、5.1%、インサイドウェルで 209  $\mu\text{L}$ 、4.9%となる。また、培地の浸透圧に有意な違いが観察されなかったことから、蒸発速度の差に実質的な有意差はないことが支持される。

以上の結果より、標準的な蓋条件ではウェル位置により蒸発速度が異なるが、サンドイッ

チリッドを用いることでウェル位置によらず均一な蒸発速度を実現できることが示された。

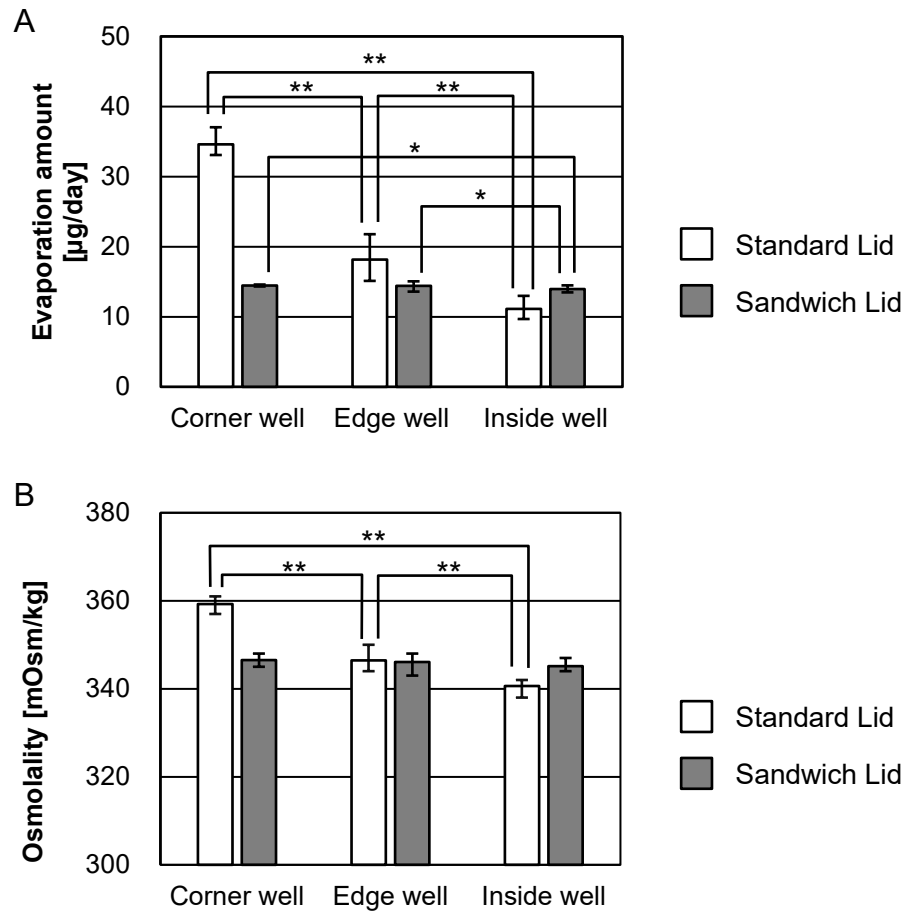


図 4 培養環境下での蒸発量及び一定期間保持後の培地浸透圧

**A** 1 日当たりの蒸発量計算値。**B** 一定期間経過後の培地浸透圧。\*  $p < 0.05$  及び \*\*  $p < 0.01$ 。

エラーバーは、それぞれ各条件の最大値、最小値を示す。

## 2) ウェル位置の培養性能への影響

前項において、サンドイッチリッドを用いることにより、ウェル位置によらず均一な蒸発速度を実現できることが確認できた。そこで、本項では実際の細胞培養におけるウェル位置の影響について検証した。ウェル間の培養性能の違いを比較するため、サンドイッチリッドを用いた 24 DWP の全 24 ウェルで同一細胞、同一条件のフェドバッチ培養を行った。モノクローナル抗体 A を生産するクローン a を用いて 15 日間培養し、培養性能の指標として積算生細胞濃度 (Integrated Viable Cell Concentration、IVCC) 及び培養最終日の培養上清中抗体濃度を評価した。

ウェル位置により 3 つのグループに分けて培養結果を解析した (図 5)。標準の蓋を用いた場合はウェルのグループにより細胞培養結果に有意な差が認められた (Supplemental Data-1) が、サンドイッチリッドを用いた場合は積算生細胞濃度、培養最終日の培養上清中抗体濃度のいずれにおいてもウェルのグループ間で有意な差は認められなかった。これより、サンドイッチリッドを用いることで 24 DWP のウェル間で均一な培養環境が実現でき、2 週間の培養期間においてもウェル位置による影響を受けずに細胞培養評価できることが示された。

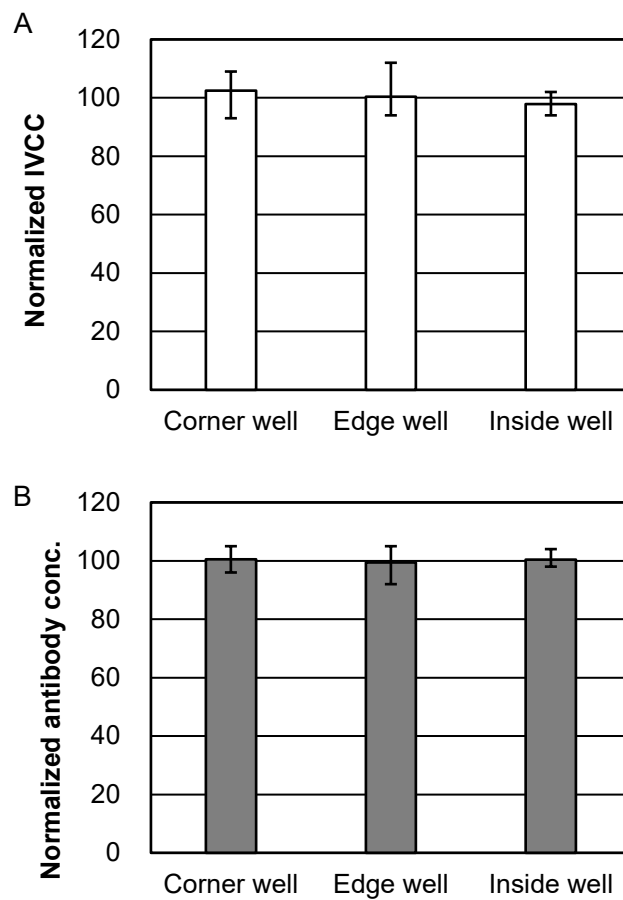


図 5 ウェル間の培養性能比較

**A** 標準化した積算生細胞濃度 (IVCC)。 **B** 標準化した培養最終日の培養上清中抗体濃度。

エラーバーは、それぞれ各条件の最大値、最小値を示す。

#### 第4節 小括

本章では、プレートを用いた培養においてウェルの位置間差がない培養環境を実現するため、サンドイッチリッドを用いた培養方法を評価した。プレート付属の標準の蓋ではウェル位置により培地の蒸発量が異なるのに対し、サンドイッチリッドを用いることで蒸発量の差異は軽減され、ウェル間で均一な培養環境を実現できることが示された。プレート周囲のみでガス交換が行われる標準の蓋に対し、サンドイッチリッドではシリコンシートにより各ウェルが隔離され、個々のウェルでガス交換が行われることでウェルの位置間差が軽減されたと考えられる。ウェル内の培養液の温度については周辺ウェルから中心ウェルに向かって徐々に加温されると考えられるが、あらかじめ加温した培地を用いることで影響を軽減できる。実際の細胞培養評価においてもウェル位置による細胞増殖、抗体生産濃度への影響は認められず、サンドイッチリッドにより均一な培養環境を実現できることが示された。また、標準の蓋を用いた場合、プレート本体と蓋の隙間を通して直接ガス交換が行われており、蓋は固定されておらず振とうにより動くため隙間から雑菌汚染する可能性がある。モノクローナル抗体生産細胞株構築プロセスの初期段階では細胞数が少ないため候補細胞株を凍結保存することはできておらず、雑菌汚染した場合はその細胞株は失われてしまう。サンドイッチリッドを用いた場合ではガス交換はフィルターを介して行われるため、雑菌汚染のリスク低減も期待できる。

モノクローナル抗体生産細胞株構築プロセスに 24 DWP フェドバッチ培養法を適用する際の課題となるウェル位置による不均一性を軽減できたため、次章では 24 DWP フェドバッチ培養法についてより詳細に検討し、振とうフラスコを用いたフェドバッチ培養法の代替法として使用できるか評価した。

### 第3章 振とうフラスコの代替培養容器としての妥当性の評価

#### 第1節 緒言

モノクローナル抗体生産細胞株構築プロセスの初期段階では、液量が限られるウェルプレートで培養しているため、多くの項目を測定することができず、一般的には培養上清中の生産物濃度に基づいて細胞株が評価される。細胞増殖や代謝産物などの細胞培養の特性は、拡張培養を繰り返した後に、十分なサンプルを入手できる振とうフラスコを用いた培養、あるいはそれ以降の通気攪拌培養槽を用いた培養において評価される。

より良い細胞株を取得するためには、より多くの細胞株についてその培養特性を評価し、選抜することが望ましい。しかしながら、振とうフラスコ培養のサンプリングやメンテナンスは手作業であり時間と労力がかかることから、現実的に評価できる細胞株数は限定されてしまう。一方、24 DWP を用いた場合、マルチチャンネルピペットの活用などにより複数のプレートを並行して培養することが可能であり、より多くの細胞株を評価することができる。また、24 DWP は培養スケールが数 mL であるため、培養特性を把握するためのサンプルを取得することができる。このような特性から、24 DWP 培養において振とうフラスコ培養と同様の詳細さで培養特性を評価することができれば、モノクローナル抗体生産細胞株構築プロセスにてウェルプレート培養評価と振とうフラスコ培養評価ステップを 24 DWP を用いた評価に代替することができる。24 DWP では培養液量が振とうフラスコよりも少なく、培養開始に必要な細胞数が少ないため細胞拡張の期間を短縮することができ、モノクローナル抗体生産細胞株構築プロセス全体の期間短縮が期待できる。

そこで、本章では 24 DWP を用いたフェドバッチ培養と振とうフラスコを用いたフェドバッチ培養の培養特性を比較し、24 DWP が振とうフラスコの代替培養容器として利用可能かを検証した。また、フェドバッチ培養ではサンプリング、フィードにより液量が変動す

ることから、許容できる培養液量について検証し、標準培養条件を構築した。さらに、構築した 24 DWP を用いたフェドバッチ培養条件が他の抗体を生産する細胞株においても汎用的に適用できるか検証した。最後に、抗体生産株構築プロセスの初期段階（24 ウェルプレート培養評価）にある細胞株群に対して 24 DWP 培養評価を実施し、24 DWP フェドバッチ培養導入の有用性を検証した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 1) 細胞株の構築

第 2 章で使用したモノクローナル抗体 A を生産するクローン a に加え、異なるモノクローナル抗体 B、C、D を生産する細胞株を取得し本章の実験に使用した。細胞株の取得方法は第 2 章に記載した手順に従った。

抗体生産細胞株構築プロセスの初期段階の細胞株群として、モノクローナル抗体 B を生産する細胞株群を用い、96 ウェルプレート培養結果に基づき選抜された 192 株を 24 ウェルプレート培養評価及び 24 DWP フェドバッチ培養評価に用いた。

### 2) フェドバッチ培養

24 DWP フェドバッチ培養については、第 2 章に記載した手順に従い実施した。培養開始液量は 3.0 mL、4.0 mL、4.5 mL とした。振とうフラスコを用いたフェドバッチ培養については、125 mL Erlenmeyer flask with a vent cap (Corning、Corning、NY、USA) を用いた。初期細胞濃度は  $0.3 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>、培養開始液量は 30 mL とし、庫内温度 36.5°C、5% (v/v) CO<sub>2</sub> (95% (v/v) 空気)、80%相対湿度、140 回転/分、回転直径 25 mm に設定したインキュベーターシェーカーで培養した。

培養 0、2、3、5、7、8、9、10、11、13、14、15 日目にサンプリングし、培養液中の生



細胞濃度、細胞生存率、遠心上清中の抗体、グルタミン、グルタミン酸、アンモニウムイオン、グルコース、乳酸濃度、及び浸透圧を適宜測定した。培養上清中の抗体濃度は、Octet QK で測定した。グルタミン、グルタミン酸、アンモニウムイオン、グルコース、乳酸濃度、浸透圧は BioProfile400 で測定した。

24 DWP フェドバッチ培養による細胞株選抜の実験においては、24 DWP フェドバッチ培養は 13 日間培養し、培養上清中の抗体濃度は Octet QK を使用し測定した。振とうフラスコを用いたフェドバッチ培養は 15 日間培養し、培養上清中の抗体濃度は UV 検出器とプロテイン A アフィニティカラムを備えた HPLC システム（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA）を使用して測定した。

### 第3節 結果及び考察

#### 1) 培養特性の比較

24 DWP が振とうフラスコの代替培養容器として活用可能かを検証するため、サンドイッチリッドを用いた 24 DWP フェドバッチ培養における細胞増殖と代謝物の経時的な推移を振とうフラスコフェドバッチ培養と比較した。モノクローナル抗体 A を生産するクローン a を用いた。15 日間培養を行い、培養液中の生細胞濃度、細胞生存率、遠心上清中の抗体、グルタミン、グルタミン酸、アンモニウムイオン、グルコース、乳酸濃度、及び浸透圧を測定した (図 6)。24 DWP フェドバッチ培養条件では、コーナーウェル、エッジウェル、インサイドウェルの 3 グループでそれぞれのサンプルを混合し、測定した。振とうフラスコ培養条件は同条件で 2 本を培養し、それぞれのサンプルを測定した。

本検討で用いている細胞は CHOK1SV 由来であり、外来遺伝子発現システムとしてグルタミン合成酵素システムを使用している。そのため、細胞培養中にグルタミンの蓄積が認められた (図 6D)。また、培養 15 日目について、24 DWP の各グループ及び振とうフラスコ-2 (SF-2) の乳酸濃度、24 DWP の各グループのグルコース濃度は検出限界未満であったため測定できなかった。浸透圧測定に用いた BioProfile400 では、浸透圧は他の測定項目の結果を基に算出されるため、検出限界未満で測定できない項目があったサンプルについては浸透圧が算出されない。培養 5 日目の乳酸について、コーナーウェルで他のウェルよりも高い濃度が測定された。細胞内代謝に差がある可能性が考えられたが、同日の細胞濃度や他の代謝物濃度に顕著な差は認められていない。また、培養 7 日目以降は他のウェルと同様の値を示していることから、測定に不備があった可能性も示唆される。培養 5 日目以前の濃度推移や再現性の確認が必要である。

培養 5 日目のコーナーウェルの乳酸を除き、細胞増殖、代謝産物等の推移において、24 DWP 条件のウェル位置による顕著な差異は認められなかった。また、振とうフラスコ条件

と比較すると、培養後半において 24 DWP 条件の方が VCC (図 6A) が高めに推移しているが、他の測定項目について顕著な差異は認められなかった。

以上の結果から、24 DWP フェドバッチ培養でも振とうフラスコフェドバッチ培養と同様のレベルの培養特性を評価できることが示唆された。

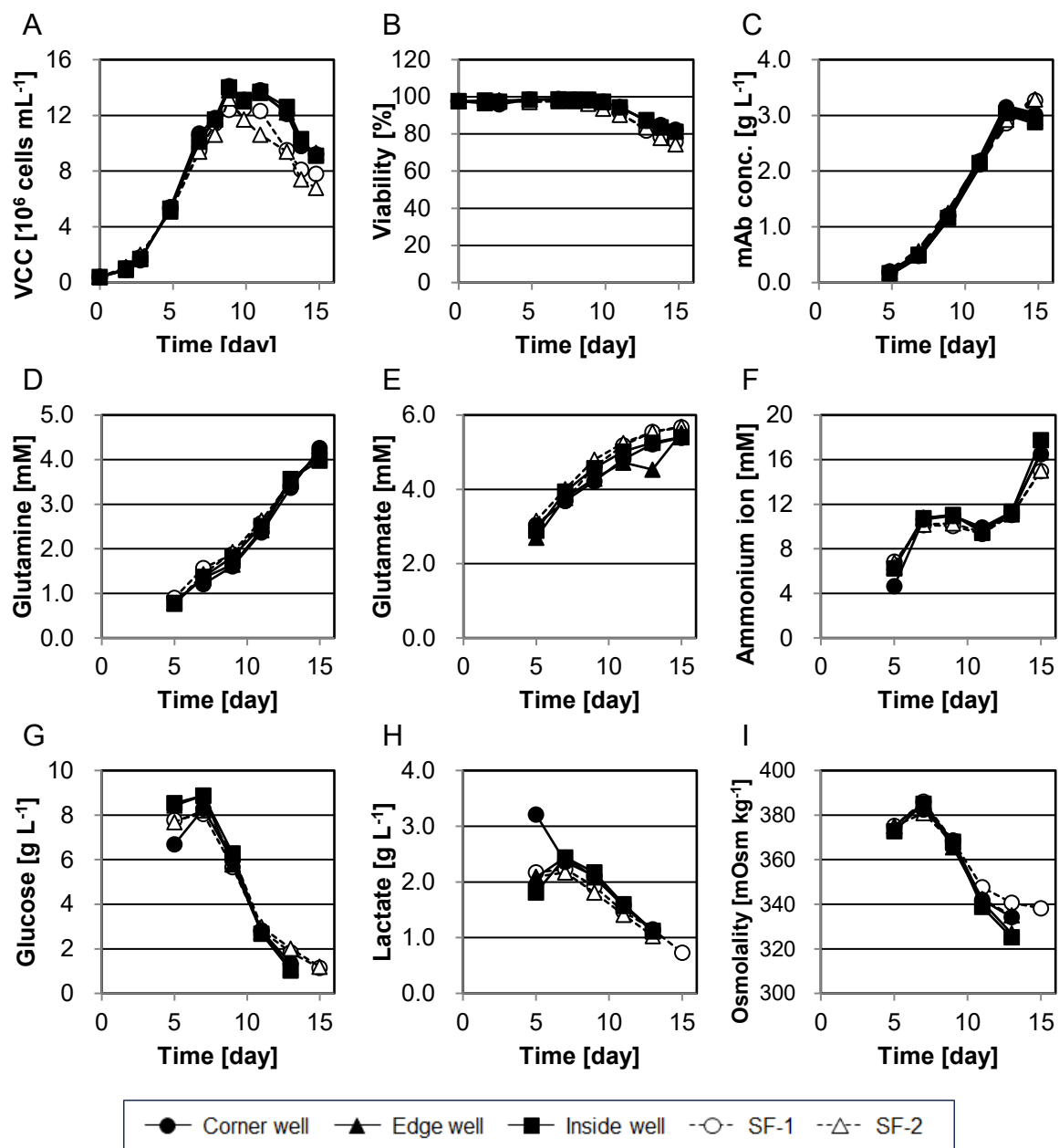


図 6 24 DWP によるフェドバッチ培養と振とうフラスコによるフェドバッチ培養の培養特性の比較

A 生細胞濃度 (VCC)。B 細胞生存率。C 抗体 (mAb) 濃度。D グルタミン濃度。E グルタミン酸濃度。F アンモニウムイオン濃度。G グルコース濃度。H 乳酸濃度。I 浸透圧。

SF: 振とうフラスコ (Shaken flask)

## 2) 培養開始液量

細胞数測定や培養液上清の分析には一定量のサンプリングが必要である。24 DWP における培養液の絶対量は振とうフラスコと比較して小さいため、定量サンプリングによる培養液量の相対的な変化は 24 DWP の方が振とうフラスコよりも大きくなる。培養液体積に対する表面積の比が変化することは酸素移動速度定数  $k_{La}$  に影響を与える可能性があることが知られている<sup>37, 38</sup>。酸素移動速度定数が変化することにより培養液中の溶存酸素濃度が増加することで、細胞増殖、抗体生産能に影響する可能性がある。そこで、培養体積の変化が細胞培養特性に与える影響を評価するため、培養開始液量を 3.0 mL、4.0 mL、4.5 mL として 24 DWP フェドバッチ培養を行った。比較として振とうフラスコによるフェドバッチ培養を行い、細胞はモノクローナル抗体 B を生産する細胞株 12 株を用いた。

24 DWP フェドバッチ培養中のサンプリング量、フィード量に基づき計算した推定液量推移を図 7 に示す。24 DWP の培養液量はサンプリング (0.15 mL 又は 0.45 mL) により減少し、フィード (培養液量の 10%) により増加する。4.5 mL 条件では培養期間を通してほぼ 4.5 mL の培養液量が維持されるが、3.0 mL 条件ではサンプリング量がフィード量を上回るため培養液量は減少し、培養終了時は約 2.5 mL となる。

培養性能への影響の評価指標として、生産した抗体濃度及び IVCC を用いた。各細胞株の 24 DWP フェドバッチ培養におけるそれぞれの開始液量条件の培養最終日の抗体濃度、IVCC を縦軸値として、同じ細胞株の振とうフラスコを用いたフェドバッチ培養における結果を横軸値としてプロットした (図 8)。得られたプロットは開始液量条件間で顕著な差は認められず、ほぼ同等の抗体濃度、IVCC が得られた。培養液量が多い 4.5 mL 条件では液量に対する表面積比が小さいことから、ガス交換、酸素供給面において懸念があったが、他の条件と同等の IVCC が得られた。また、各結果は、図 8 の点線で示した 24 DWP 培養の結果と振とうフラスコ培養の結果が等しくなる線の近傍にプロットされ、絶対値としても

培養容器間で同等の結果が得られた。本研究において、24 DWP の回転速度は 210 回転/分で実施した。Duetz らの研究で、回転速度 300 回転/分、回転直径 25 mm、液量 2.5 mL における 24 DWP の OTR は  $39.3 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  と報告されている<sup>39</sup>。Meier らは、物理的理論と様々な培地・容器・操作条件下で得られた実験データを統合することで、振とう条件における OTR に関する半経験式を作成した<sup>40</sup>。半経験式において、OTR は回転速度のべき乗に比例しその指数は溶液の浸透圧により変化すること、溶液量の<sup>-0.74</sup>乗に比例することが示されている (式 (1))。

$$OTR \propto \text{回転速度}^{\left(1.18 - \frac{Osmol}{10.1}\right)} \times V_L^{-0.74} \quad (1)$$

式 (1) において、Osmol は培地浸透圧 ( $\text{Osm kg}^{-1}$ )、 $V_L$  は培地液量 (mL) である。本研究の条件である回転速度 210 回転/分、培地浸透圧  $0.33 \text{ Osm kg}^{-1}$ 、液量 4.0 mL における OTR は、Duetz らの報告及び式 (1) から導かれる以下の式 (2) より  $18.4 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  と推定される。同様に、4.5 mL における OTR は  $16.9 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  と推定される。

$$\frac{OTR(210 \text{ rpm}, 4.0 \text{ mL})}{OTR(300 \text{ rpm}, 2.5 \text{ mL})} = \left(\frac{210}{300}\right)^{\left(1.18 - \frac{0.33}{10.1}\right)} \times \left(\frac{4.0}{2.5}\right)^{-0.74} \quad (2)$$

CHO 細胞の酸素消費速度は細胞株や培養条件により変動するが、いくつかの研究により  $0.19 \sim 0.32 \text{ pmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$  の範囲で報告されている<sup>41, 42, 43, 44</sup>。この範囲の酸素消費速度を基とすると、 $OTR = 18.4 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  及び  $16.9 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  により酸素供給可能な CHO 細胞濃度は、それぞれ  $58 \times 10^6 \sim 97 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 、 $53 \times 10^6 \sim 89 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$  と推定される。この結果は、本研究で用いた細胞株の培養において酸素供給が律速とならないことを示している。一方で、より酸素消費速度が大きい細胞株やより高細胞濃度となる培養

に本 24 DWP 培養条件を用いる場合は、酸素供給が律速とならないか確認が必要である。

以上の結果から、培養開始液量を 4.0 mL とする 24 DWP フェドバッチ培養条件を設定し、以降の検討に用いた。

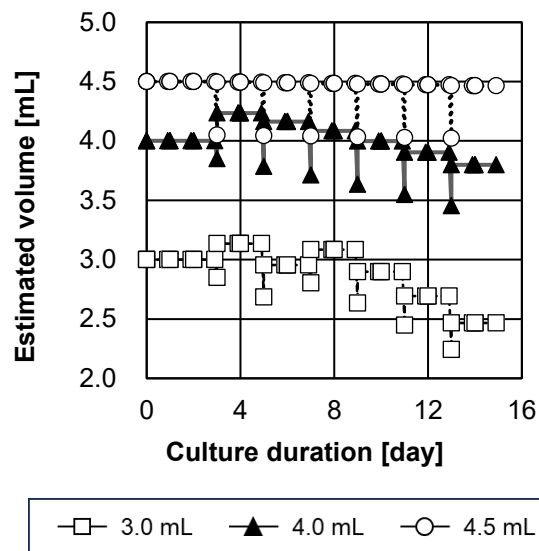


図 7 24 DWP フェドバッチ培養における推定液量推移

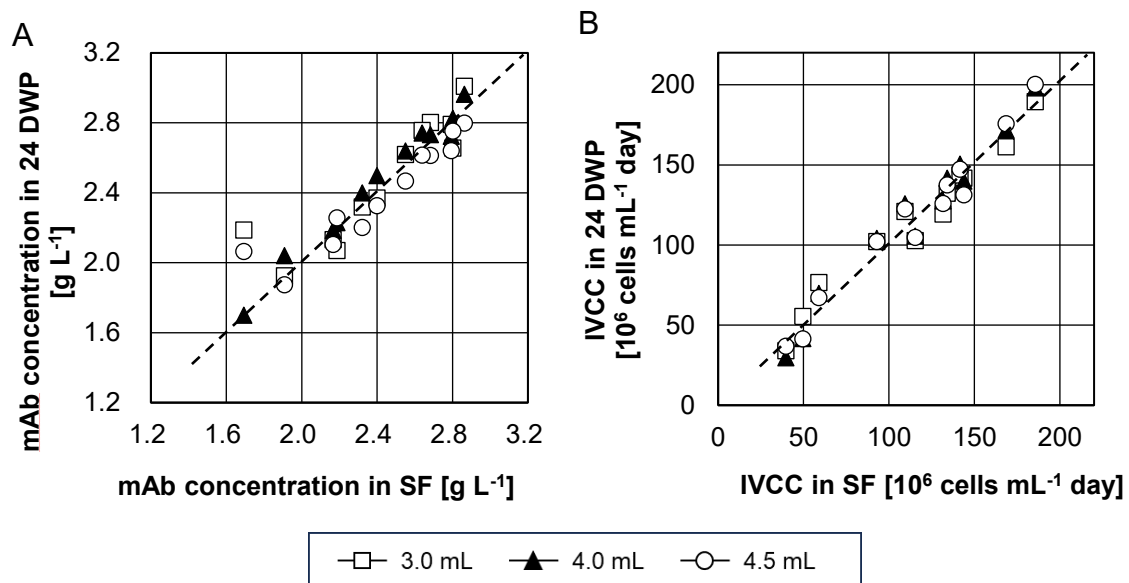


図 8 24 DWP フェドバッチ培養の培養開始液量の影響評価

**A** 培養液上清中の抗体 (mAb) 濃度。**B** 積算生細胞濃度 (IVCC)。各点はそれぞれの細胞株における 24 DWP 培養結果を縦軸に、振とうフラスコ (SF) 培養結果を横軸とした点を表す。図中の点線は 24 DWP と振とうフラスコ培養の結果が等しくなる線を表す。



### 3) 24 DWP フェドバッチ培養の汎用性検証

前項では、モノクローナル抗体 B を生産する 12 株を実験に用いて 24 DWP フェドバッチ培養の特性を評価、検証した。24 DWP フェドバッチ培養をモノクローナル抗体生産細胞株構築プロセスに導入するにあたっては、様々なモノクローナル抗体生産細胞株に対しても適用可能であることを検証する必要がある。そこで、モノクローナル抗体 C 及びモノクローナル抗体 D を生産する細胞株を用いて、24 DWP フェドバッチ培養の汎用性を検証した。それぞれの IgG サブクラスは、モノクローナル抗体 B、C は IgG2、モノクローナル抗体 D は IgG1 である。

前項と同様に、それぞれのモノクローナル抗体を生産する細胞株 12 株を用いて 24 DWP 及び振とうフラスコにてフェドバッチ培養を行い、それぞれの培養容器条件から得られた結果を比較することで、24 DWP フェドバッチ培養の妥当性を評価した。評価指標として、生産した抗体濃度、積算生細胞濃度に加え、到達生細胞濃度 (VCC max)、抗体の比生産速度 (Specific Production Rate、SPR) を用いた。各細胞株の 24 DWP での培養結果を縦軸値として、振とうフラスコでの培養結果を横軸値としてプロットし、得られたプロットから培養容器間の相関を評価した (図 9、図 10、図 11)。

いずれのモノクローナル抗体生産細胞株群を用いた場合でも、得られた結果は図中の点線で示した 24 DWP 培養の結果と振とうフラスコ培養の結果が等しくなる線の近傍にプロットされた。また、表 1 に示すように、いずれの細胞群においてもそれぞれの評価指標について高い決定係数が得られた。

以上より、24 DWP フェドバッチ培養法は汎用的に利用できるものと考えられる。

表 1     24 DWP 培養と振とうフラスコ培養の決定係数

	到達 生細胞濃度	積算 生細胞濃度	抗体濃度	抗体 比生産速度
モノクローナル抗体 B	0.958	0.968	0.978	0.879
モノクローナル抗体 C	0.972	0.955	0.913	0.910
モノクローナル抗体 D	0.859	0.874	0.815	0.959

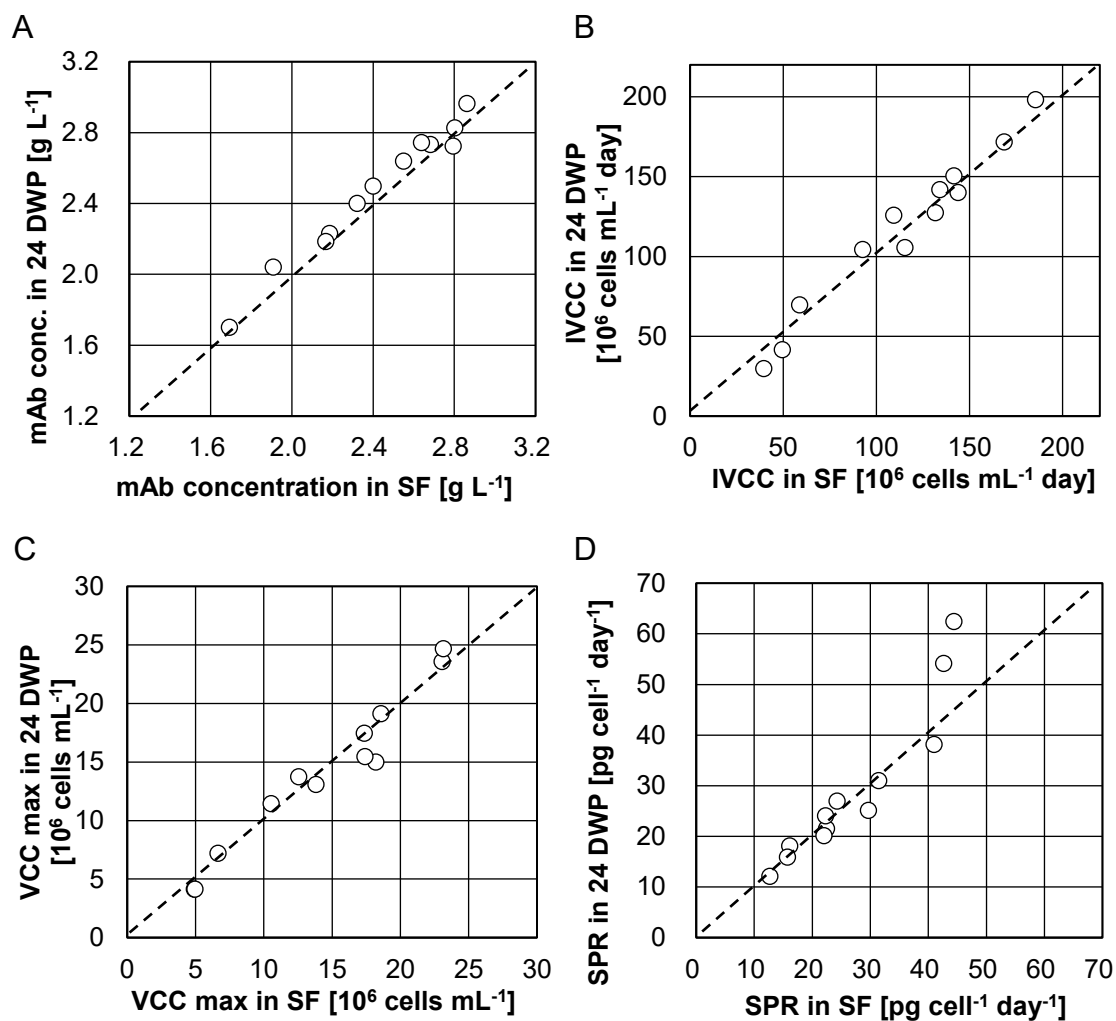


図 9 モノクローナル抗体 B 生産細胞株 12 株を用いた比較結果

**A** 培養液上清中の抗体 (mAb) 濃度。**B** 積算生細胞濃度 (IVCC)。**C** 到達生細胞濃度 (VCC max)。**D** 抗体比生産速度 (SPR)。各点はそれぞれの細胞株における 24 DWP 培養結果を縦軸に、振とうフラスコ (SF) 培養結果を横軸とした点を表す。図中の点線は 24 DWP と振とうフラスコ培養の結果が等しくなる線を表す。

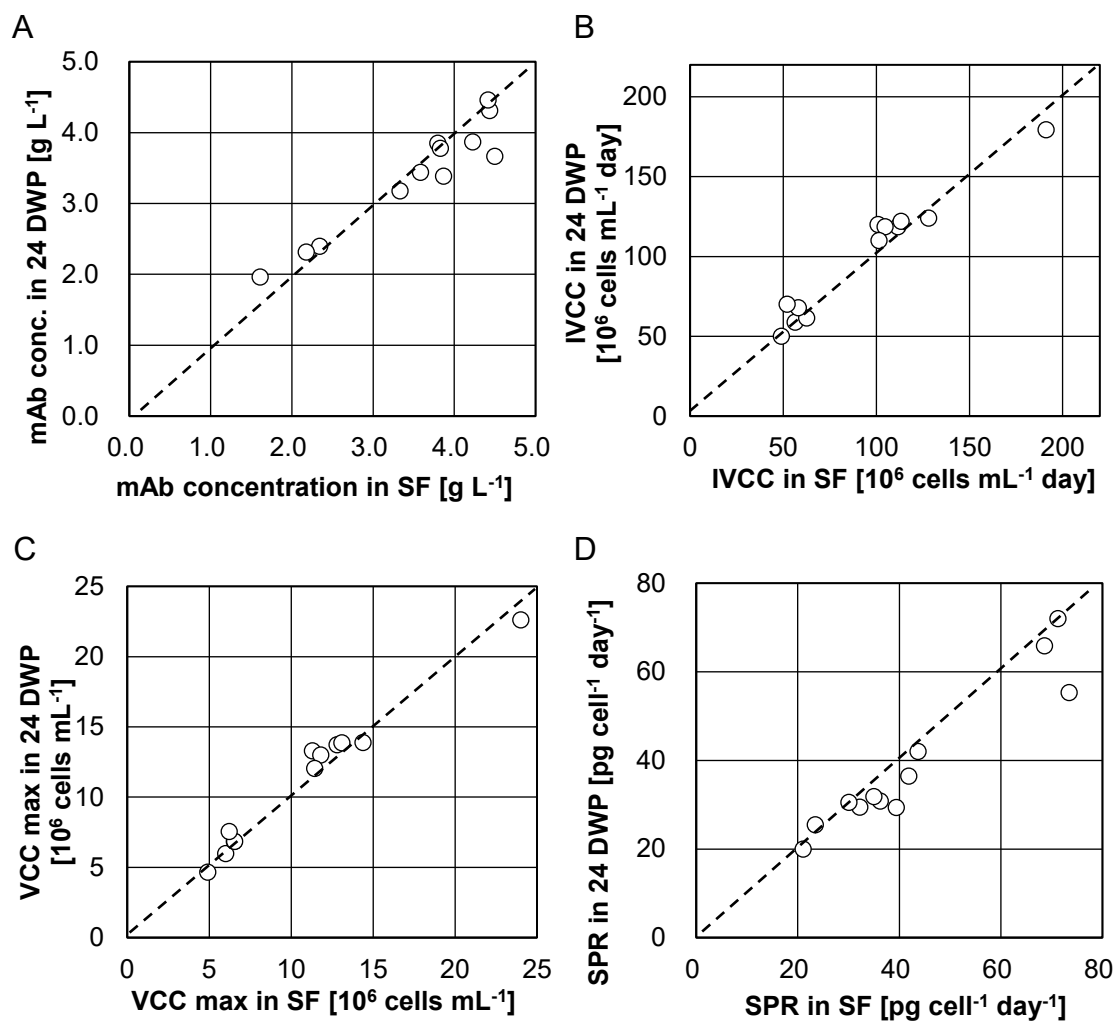


図 10 モノクローナル抗体 C 生産細胞株 12 株を用いた比較結果

**A** 培養液上清中の抗体 (mAb) 濃度。**B** 積算生細胞濃度 (IVCC)。**C** 到達生細胞濃度 (VCC max)。**D** 抗体比生産速度 (SPR)。各点はそれぞれの細胞株における 24 DWP 培養結果を縦軸に、振とうフラスコ (SF) 培養結果を横軸とした点を表す。図中の点線は 24 DWP と振とうフラスコ培養の結果が等しくなる線を表す。

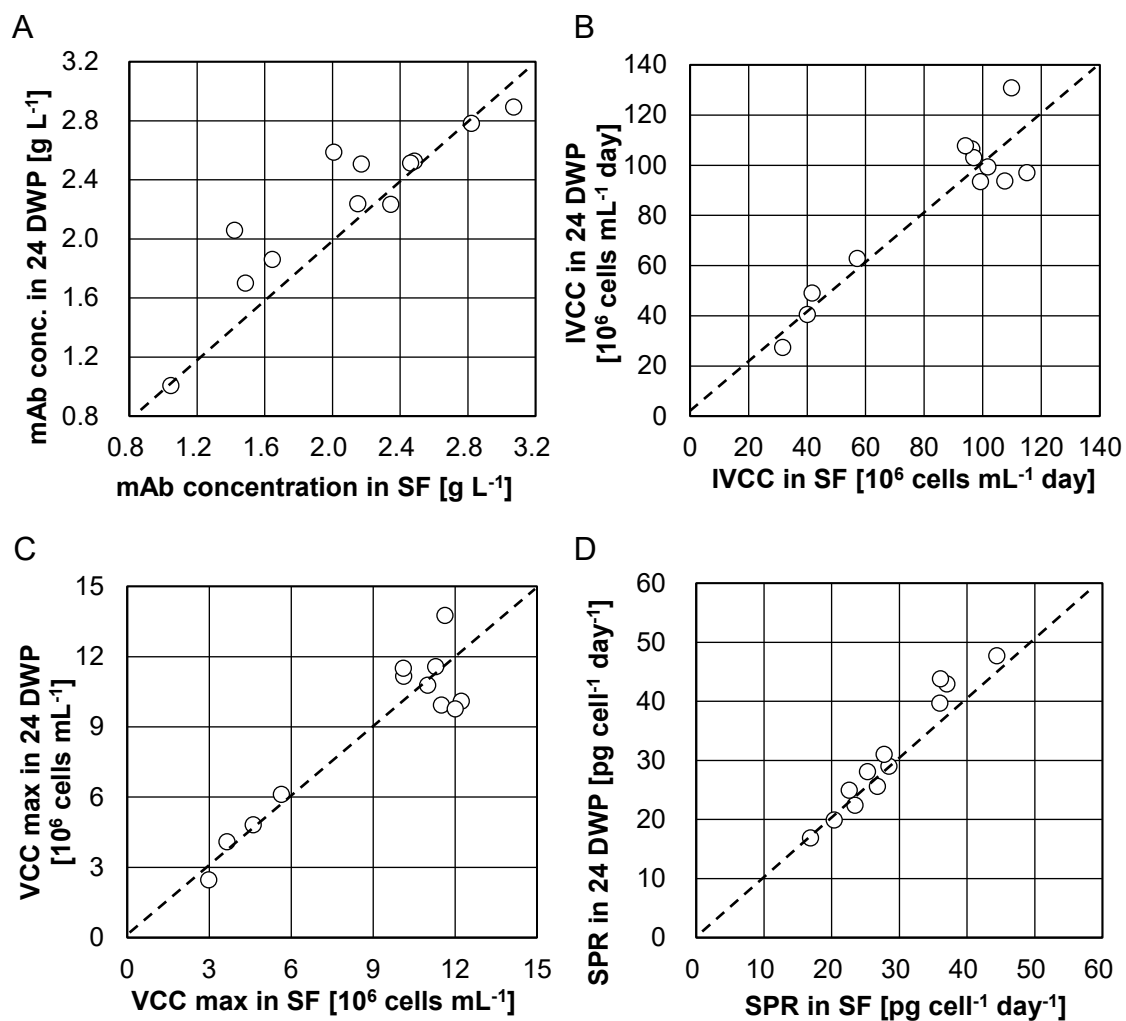


図 11 モノクローナル抗体 D 生産細胞株 12 株を用いた比較結果

**A** 培養液上清中の抗体 (mAb) 濃度。**B** 積算生細胞濃度 (IVCC)。**C** 到達生細胞濃度 (VCC max)。**D** 抗体比生産速度 (SPR)。各点はそれぞれの細胞株における 24 DWP 培養結果を縦軸に、振とうフラスコ (SF) 培養結果を横軸とした点を表す。図中の点線は 24 DWP と振とうフラスコ培養の結果が等しくなる線を表す。

#### 4) CHO 細胞株の構築プロセスへの適用評価

これまでの研究結果により、サンドイッチリッドを用いた 24 DWP フェドバッチ培養の培養手法としての妥当性を示すことができた。本培養手法を用いることで、高いスループットで、振とうフラスコと同等のデータを取得することができる。これまでの研究には既存の手法で取得された抗体生産細胞株を用いてきた。本実験では、モノクローナル抗体生産細胞株構築プロセスの初期段階の評価に 24 DWP フェドバッチ培養評価を導入し、取得された細胞株の特性について既存のプロセスで取得された細胞株と比較することで、24 DWP フェドバッチ培養導入の有用性について検証した。

モノクローナル抗体 B を生産する 192 株に対して、従来法 (24 ウェルプレート培養) 及び 24 DWP フェドバッチ培養による評価を実施し、抗体濃度を指標にそれぞれの評価方法により 30 株を選抜した (Supplemental Data-2)。それぞれの手法で選抜された細胞株を用いて振とうフラスコでのフェドバッチ培養を行い、培養最終日の抗体濃度について度数分布表を作成し、得られた細胞株群の特性を比較した (図 12)。

24 ウェルプレート培養で取得した細胞株の振とうフラスコでのフェドバッチ培養の結果、30 株の抗体濃度の平均値は  $2.9 \text{ g L}^{-1}$ 、中央値は  $3.2 \text{ g L}^{-1}$  であった。一方、24 DWP フェドバッチ培養により選抜・取得した細胞株の振とうフラスコでのフェドバッチ培養の結果、30 株の抗体濃度の平均値は  $3.6 \text{ g L}^{-1}$ 、中央値は  $3.7 \text{ g L}^{-1}$  であり、従来法と比較して平均値、中央値が高濃度側に移動した。また、標準偏差は従来法選抜株が  $1.0 \text{ g L}^{-1}$  であるのに対し 24 DWP フェドバッチ培養評価法選抜株では  $0.48 \text{ g L}^{-1}$  であり、ばらつきが少なく高生産細胞株を取得できることが示された。

また、振とうフラスコでのフェドバッチ培養で最も高い抗体生産性を示した細胞株は 24 DWP フェドバッチ培養条件からのみ選抜された。この結果は、従来のウェルプレートを用いた細胞株選抜方法では実際に高生産細胞株を見落としてしまうこと、そして 24 DWP フ

エドバッチ培養による評価を抗体生産細胞株構築プロセスの初期段階に導入することで、  
これらの細胞株を見出し選抜できることが示された。

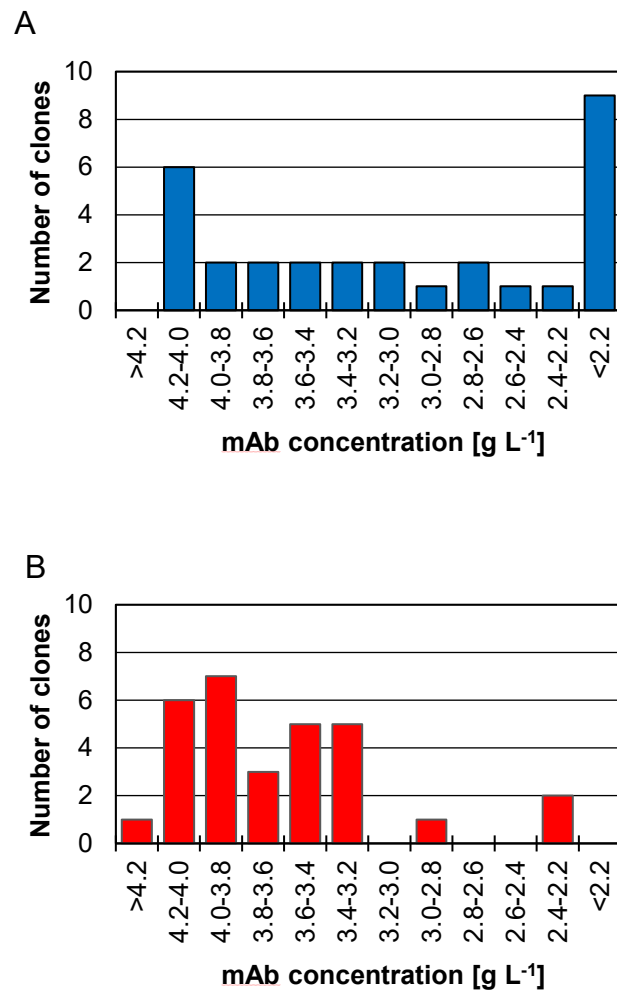


図 12 各手法で取得した 30 株の振とうフラスコ培養評価結果のヒストグラム

**A** 24 ウェルプレート培養評価に基づき選抜された 30 株の振とうフラスコフェドバッチ培養結果。**B** 24 DWP フェドバッチ培養評価に基づき選抜された 30 株の振とうフラスコフェドバッチ培養結果。培養最終日の抗体濃度を基にヒストグラムを作成した。



#### 第4節 小括

本章では 24 DWP が振とうフラスコの代替培養容器として利用可能かを検証するため、24 DWP を用いたフェドバッチ培養と振とうフラスコを用いたフェドバッチ培養の培養特性を比較した。それぞれの容器を用いてフェドバッチ培養を行った結果、培養後半において 24 DWP 条件の方が VCC (図 6A) が高めに推移しているが、他の測定項目について顕著な差異は認められず、24 DWP でも振とうフラスコと同様のレベルの培養特性評価を実施可能であることが示唆された (図 6)。

また、24 DWP フェドバッチ培養の標準的な培養条件を設定するため、培養開始液量が培養特性に与える影響について検証した。モノクローナル抗体 B を生産する細胞株 12 株を用いて 24 DWP 培養と振とうフラスコ培養を行い、その結果を培養容器間で比較した。培養開始液量が多い条件ではガス交換効率に懸念があったが、培養開始液量を 3.0~4.5 mL とした条件間で顕著な差は認められなかった (図 8)。以上より、培養開始液量を 4.0 mL とする標準的な培養条件を構築した。

構築した 24 DWP フェドバッチ培養条件が汎用的に活用できるかを検証するため、モノクローナル抗体 C、D をそれぞれ生産する細胞株を用いて、24 DWP 培養結果と振とうフラスコ培養結果とを比較した。いずれの細胞株群においても振とうフラスコ培養結果との間に高い相関が認められ、本 24 DWP フェドバッチ培養条件が汎用的に活用できることが示唆された。

構築した 24 DWP フェドバッチ培養法を用い、モノクローナル抗体生産細胞株構築プロセスの 24 ウェルプレート培養評価段階にある細胞株群に対して細胞株評価を実施した。従来法により選抜・取得された 30 株の振とうフラスコ培養での生産抗体濃度の平均値は  $2.9 \text{ g L}^{-1}$ 、中央値は  $3.2 \text{ g L}^{-1}$ 、標準偏差は  $1.0 \text{ g L}^{-1}$ であったのに対し、24 DWP フェドバッチ培養法により選抜・取得された 30 株の平均値は  $3.6 \text{ g L}^{-1}$ 、中央値は  $3.7 \text{ g L}^{-1}$ 、標準偏差は

0.48 g L<sup>-1</sup>であり、分布が高濃度側に移動し、ばらつきが少なくなった。また、最も高い抗体生産性を示した細胞株は 24 DWP フェドバッチ培養条件からのみ選抜されたことから、従来法では有望な細胞株を見落としてしまうことが確認でき、24 DWP フェドバッチ培養で評価することによりそれらの細胞株を適切に評価・選抜できることが示された。

以上の結果から、24 DWP フェドバッチ培養法を抗体生産細胞株構築プロセスに導入することは有用であると言える。

## 第4章 総括

抗体医薬品を CHO 細胞を用いて製造する際、翻訳後修飾の違いが安全性や有効性に影響を与える可能性がある。翻訳後修飾の度合いは細胞株により異なるため、抗体医薬品の開発途中で抗体生産細胞株を変更することは、安全性、有効性の同等性の証明が必要であり容易ではない。そのため、医薬品開発の初期で選定された細胞株がその後の商用生産でも使用されることになり、開発初期段階で適切な生産細胞株を選択することが重要となる。目的となる抗体遺伝子をランダム変異で CHO 細胞に導入する場合、評価する母集団を大きくすることが、より好ましい細胞株を取得することにつながる。細胞株構築プロセスにおいて、一度に多くの細胞株を評価できる培養法としてプレート培養があるが、プレート培養は静置培養であり、製造で用いられる浮遊培養とは細胞増殖や目的タンパク質生産能などにおける相関は高くない。一方、浮遊培養である振とうフラスコを用いた培養は、より製造に近い条件で細胞株を評価できるが、1本1本のマニュアル操作であるため評価できる細胞株の数は限定的である。そこで本博士論文では、プレート培養が持つ操作の簡便さと、振とうフラスコ培養が持つより製造に近い条件で評価できるという両者の特徴を兼ね備えた 24 DWP を用いたフェドバッチ培養による細胞株評価方法を構築することで、抗体生産細胞株構築プロセスの迅速化、効率化を試みた。

第2章において、プレート培養の課題であるウェル位置による培養環境の差異について、細胞培養への影響について検討した。24 DWP に付属する標準的な蓋ではウェル位置により培地の蒸発量が異なり、培養環境の不均一さから細胞株評価に用いるには適切ではないことが示された。一方で、サンドイッチリッドを用いることで、ウェル位置によらず蒸発量が同程度となり（図 4）、細胞培養結果においてもウェル間で差がないことが示された（図 5）。個々のウェルがそれぞれ外部環境と直接ガス交換できる孔を持つことにより、ウェル位置による培養環境の差が解消された。この結果は、24 DWP を用いたフェドバッチ培養が、

細胞株評価において信頼性の高い手法であることを示唆している。

第3章では、第2章においてウェル間で均一な培養環境であることが検証できた 24 DWP 条件が振とうフラスコの代替培養容器として妥当であるかを検討した。24 DWP を用いたフェドバッチ培養の細胞増殖や培養上清中の代謝産物の経時的な推移を比較した結果、振とうフラスコを用いたフェドバッチ培養と同等の培養特性が得られること示した (図 6)。これにより、24 DWP が振とうフラスコの手間を軽減しつつ、同様のデータを取得できることが確認された。24 DWP は振とうフラスコと比較して液量が少ないことから、液量の増加減少による培養液体積当たりの比表面積の変化は大きくなる。ガス交換は気液界面で行われるため、比表面積が小さくなることはガス交換効率の低下につながる。培養液量変化による細胞培養への影響を評価した結果、培養液量が 2.5~4.5 mL の範囲で変動しても培養結果に顕著な差が生じないことが示された (図 8)。液量変動に対して頑健であり、培養中に経時的にサンプリングを行い各細胞株の細胞増殖や代謝産物を測定し、その培養特性を評価するのに適した培養法が構築できた。さらに、異なるモノクローナル抗体を生産する細胞株群に対しても、同様に振とうフラスコを用いたフェドバッチ培養と高い相関が得られ、24 DWP を用いたフェドバッチ培養法が汎用的に利用できる培養法であることが示された (表 1)。

また、構築した 24 DWP フェドバッチ培養法を用いて、ケーススタディとして実際の抗体生産細胞株構築プロセスに導入し、評価手法を変更することの効果を検証した。抗体生産細胞株構築における 24 ウェルプレート培養段階にある細胞株群に対し、従来の 24 ウェルプレート培養及び 24 DWP フェドバッチ培養の両方で細胞株を選抜し、振とうフラスコを用いたフェドバッチ培養における抗体生産能を比較した。従来法で選抜された細胞株による抗体生産濃度の平均値は  $2.9 \text{ g L}^{-1}$ 、中央値は  $3.2 \text{ g L}^{-1}$ 、標準偏差は  $1.0 \text{ g L}^{-1}$  であったのに対して 24 DWP フェドバッチ培養法選抜株では平均値は  $3.6 \text{ g L}^{-1}$ 、中央値は  $3.7 \text{ g L}^{-1}$ 、

標準偏差は  $0.48 \text{ g L}^{-1}$  であり、24 DWP フェドバッチ培養法で選抜することで抗体生産能が高い細胞株を高効率で選抜できることが示された。

以上より、本博士論文において、従来のウェルプレートで懸念されるウェル間の不均一性を解消し、多数の細胞株を一度に評価できる高いスループット性を持ち、振とうフラスコと同様のレベルで培養特性を評価できる 24 DWP フェドバッチ培養法を構築できた。従来の抗体生産細胞株構築プロセスの 24 ウェルプレート培養評価・振とうフラスコ培養評価を 24 DPW フェドバッチ培養評価に換えることで、従来法では評価できていなかった細胞株を振とう浮遊培養で評価できるようになった。また、24 DWP 培養は振とうフラスコ培養と比べて培養開始液量が少ないため必要な細胞数も少なく、評価培養を開始するための拡張培養期間を短縮することができる。

これらの性質から、24 DWP フェドバッチ培養法の細胞株構築プロセスへの導入により、従来法よりも早い段階で多くの細胞株を同時に浮遊培養にて評価することで、その後の通気攪拌培養で評価する細胞株群を効率的に迅速に選抜できるようになる。また、より浮遊培養に適した細胞株群を通気攪拌培養評価の対象とできることで、より高い生産性やより高品質な抗体を生産する細胞株が得られ、バイオ医薬品の製造コスト、開発コストの低減や市場に投入されるまでの時間短縮につながると期待できる。

本研究の成果を踏まえ、今後さらに抗体生産細胞株構築プロセスを効率化、迅速化するためには、24 DWP を用いた継代培養が考えられる。バイオ医薬品の生産細胞として求められる重要な特性の 1 つに、継代を繰り返しても生産するタンパク質の品質が変わらず、生産能が低下しないことが挙げられる。この継代安定性評価については、実際に一定期間継代を繰り返し、その後の生産タンパク質の品質、生産能を評価する必要がある。継代は振とうフラスコを用いて行われるため、候補となる細胞株すべてを並行して実施するには多くの工数が必要となる。そのため、候補となる細胞株の数が絞られてから実施することになり、

細胞株評価が進むのを待つため、抗体生産細胞株構築プロセス全体の律速となることがある。24 DWP を用いて継代培養を行うことができれば多数の細胞株を同時に評価することができるため、細胞株選抜の早期段階から継代安定性の評価を開始することで、抗体生産細胞株構築プロセス期間の短縮が期待される。細胞濃度を迅速に測定できる系を構築することで、24 DWP による継代安定性評価の有用性をさらに高められると考える。

また、本研究において、24 DWP フェドバッチ培養により、振とうフラスコを用いたフェドバッチ培養と同様のレベルで培養特性を評価できることが示された。このことから、細胞培養プロセス開発に 24 DWP フェドバッチ培養を用いることで、プロセス開発の効率化が期待できる。例えば培地開発においては、培地に含まれる各成分の濃度の最適化や新規成分の添加効果などを評価するため、膨大な条件数を評価することになる。高いスループット性を持つ 24 DWP を用いることで、一度に多くの条件を評価することができ、プロセス開発期間の短縮化、効率化を実現できると考える。さらに、様々な条件を検討することでプロセスの理解度が深まり、製造プロセス自体や生産されるバイオ医薬品の品質の安定化や再現性が向上し、最終的にはバイオ医薬品の安全性と有効性の向上につながることを期待される。

## 本論文に関する発表論文

1. Ohira S., Omasa T., Incorporating shaken 24-deep-well plate fed-batch culture shortens CHO cell line development time. *Cytotechnology* 77, 64, doi: 10.1007/s10616-025-00728-4 (第 2 章、第 3 章)

## 引用文献

- 1 Grilo AL, Mantalaris A (2019) The increasingly human and profitable monoclonal antibody market. *Trends Biotechnol* 37:9-16.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.014>
- 2 Crescioli S, Kaplon H, Chenoweth A, Wang L, Visweswaraiah J, Reichert JM (2024) Antibodies to watch in 2024. *mAbs* 16:2297450.  
<https://doi.org/10.1080/19420862.2023.2297450>
- 3 Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108: 945-56. <https://doi.org/10.1084/jem.108.6.945>
- 4 Horie M, Yamano-Adachi N, Kawabe Y, Kaneoka H, Fujita H, Nagamori E, Iwai R, Sato Y, Kanie K, Ohta S, Somiya M, Ino K (2022) Recent advances in animal cell technologies for industrial and medical applications. *J Biosci Bioeng* 133:509-514.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.03.005>
- 5 Kunert R, Reinhart D (2016) Advances in recombinant antibody manufacturing. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(8), 3451–3461.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7388-9>
- 6 van Beers, M. M., & Bardor, M. (2012). Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. *Biotechnology journal*, 7(12), 1473–1484. <https://doi.org/10.1002/biot.201200065>
- 7 International Conference on Harmonisation. ICH Q5A(R2): Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin. 2024.
- 8 Omasa T, Onitsuka M, Kim WD (2010) Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells. *Curr Pharm Biotechnol* 11:233-40.  
<https://doi.org/10.2174/138920110791111960>
- 9 Takagi Y, Kikuchi T, Wada R, Omasa T (2017) The enhancement of antibody concentration and achievement of high cell density CHO cell cultivation by adding nucleoside. *Cytotechnology* 69:511-521. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0066-7>
- 10 Kamachi Y, Omasa T (2018) Development of hyper osmotic resistant CHO host cells for enhanced antibody production. *J Biosci Bioeng* 125:470-478.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.11.002>
- 11 Xu WJ, Lin Y, Mi CL, Pang JY, Wang TY (2023) Progress in fed-batch culture for recombinant protein production in CHO cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 107:1063-1075. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12342-x>
- 12 Wang T, Liu L, Voglmeir J (2022). mAbs N-glycosylation: Implications for biotechnology and analytics. *Carbohydrate research*, 514, 108541.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108541>
- 13 Chen, B., Liu, W., Li, Y., Ma, B., Shang, S., & Tan, Z. (2022). Impact of N-Linked Glycosylation on Therapeutic Proteins. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(24), 8859. <https://doi.org/10.3390/molecules27248859>

- 14 Li Z, Du X, Wang YMC (2024) A survey of FDA Approved Monoclonal Antibodies and Fc-fusion Proteins for Manufacturing Changes and Comparability Assessment. *Pharm Res* 41, 13–27. <https://doi.org/10.1007/s11095-023-03627-5>
- 15 Wurm FM (2013) CHO quasispecies-implications for manufacturing processes. *Processes* 1:296-311. <https://doi.org/10.3390/pr1030296>
- 16 Nakamura T, Omasa T (2015) Optimization of cell line development in the GS-CHO expression system using a high-throughput, single cell-based clone selection system. *J Biosci Bioeng* 120:323-329. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.002>
- 17 Xu J, Ou J, McHugh KP, Borys MC, Khetan A (2022) Upstream cell culture process characterization and in-process control strategy development at pandemic speed. *mAbs* 14: 2060724. <https://doi.org/10.1080/19420862.2022.2060724>
- 18 Porter AJ, Racher AJ, Preziosi R, Dickson AJ (2010) Strategies for selecting recombinant CHO cell lines for cGMP manufacturing: improving the efficiency of cell line generation. *Biotechnol Prog* 26:1455-1464. <https://doi.org/10.1002/btpr.443>
- 19 Bareither R, Pollard D (2011) A review of advanced small-scale parallel bioreactor technology for accelerated process development: current state and future need. *Biotechnol Prog* 27:2-14. <https://doi.org/10.1002/btpr.522>
- 20 Sandner V, Pybus LP, McCreath G, Glassey J (2019) Scale-down model development in ambr systems: an industrial perspective. *Biotechnol J* 14:e1700766. <https://doi.org/10.1002/biot.201700766>
- 21 Silk NJ, Denby S, Lewis G, Kuiper M, Hatton D, Field R, Baganz F, Lye GJ (2010) Fed-batch operation of an industrial cell culture process in shaken microwells. *Biotechnol Lett* 32:73-78. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0124-0>
- 22 Wang B, Albanetti T, Miro-Quesada G, Flack L, Li L, Klover J, Burson K, Evans K, Ivory W, Bowen M, Schoner R, Hawley-Nelson P (2018) High-throughput screening of antibody-expressing CHO clones using an automated shaken deep-well system. *Biotechnology progress*, 34(6), 1460–1471. <https://doi.org/10.1002/btpr.2721>
- 23 Neuss A, Steimann T, Tomas Borges JS Dinger R, Barsett Magnus J (2025) Scale-up of CHO cell cultures: from 96-well-microtiter plates to stirred tank reactors across three orders of magnitude. *J Biol Eng* 19, 5. <https://doi.org/10.1186/s13036-024-00475-8>
- 24 Dinger R, Lattermann C, Flitsch D, Fischer JP, Kosfeld U, Büchs J (2022) Device for respiration activity measurement enables the determination of oxygen transfer rates of microbial cultures in shaken 96-deepwell microtiter plates. *Biotechnology and bioengineering*, 119(3), 881–894. <https://doi.org/10.1002/bit.28022>
- 25 Neuss A, von Vegesack N, Liepelt R, Büchs J, Barsett Magnus J (2024) Online monitoring of the respiration activity in 96-deep-well microtiter plate Chinese hamster ovary cultures streamlines kill curve experiments. *Biotechnology progress*, 40(5), e3468. <https://doi.org/10.1002/btpr.3468>
- 26 Chaturvedi K, Sun SY, O'Brien T, Liu YJ, Brooks JW (2014) Comparison of the behavior of CHO cells during cultivation in 24-square deep well microplates and conventional shake flask systems. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 1-2, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.04.001>



- 
- 27 Tang X, Quiroz J, Zhang Y, Pan J, Lai Z, Du Z, Liu R (2024) A deep-well plate enabled automated high-throughput cell line development platform. *Biotechnology progress*, 40(3), e3442. <https://doi.org/10.1002/btpr.3442>
  - 28 Mora A, Zhang SS, Carson G, Nabiswa B, Hossler P, Yoon S (2018) Sustaining an efficient and effective CHO cell line development platform by incorporation of 24-deep well plate screening and multivariate analysis. *Biotechnol Prog* 34:175-186. <https://doi.org/10.1002/btpr.2584>
  - 29 Fan Y, Jimenez Del Val I, Müller C, Wagtberg Sen J, Rasmussen SK, Kontoravdi C, Weilguny D, Andersen MR (2015) Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnology and bioengineering*, 112(3), 521–535. <https://doi.org/10.1002/bit.25450>
  - 30 Kiehl TR, Shen D, Khattak SF, Jian Li Z, Sharfstein ST (2011) Observations of cell size dynamics under osmotic stress. *Cytometry A* 79:560-569. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21076>
  - 31 Pan X, Dalm C, Wijffels RH, Martens DE (2017) Metabolic characterization of a CHO cell size increase phase in fed-batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:8101-8113. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8531-y>
  - 32 Romanova N, Niemann T, Greiner JFW, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Noll T (2021) Hyperosmolality in CHO culture: effects on cellular behavior and morphology. *Biotechnol Bioeng* 118:2348-2359. <https://doi.org/10.1002/bit.27747>
  - 33 Alhuthali S, Kotidis P, Kontoravdi C (2021) Osmolality effects on CHO cell growth, cell volume, antibody productivity and glycosylation. *Int J Mol Sci* 22:3290. <https://doi.org/10.3390/ijms22073290>
  - 34 Duetz WA, Rüedi L, Hermann R, O'Connor K, Büchs J, Witholt B (2000) Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Appl Environ Microbiol* 66:2641-2646. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2641-2646.2000>
  - 35 Barnes LM, Bentley CM, Dickson AJ (2000) Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system. *Cytotechnology* 32:109–123. <https://doi.org/10.1023/A:1008170710003>
  - 36 Bebbington CR, Renner G, Thomson S, King D, Abrams D, Yarranton GT (1992) High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Biotechnology (N Y)* 10:169–175. <https://doi.org/10.1038/nbt0292-169>
  - 37 Bos AB, Luan P, Duque JN, Reilly D, Harms PD, Wong AW (2015) Optimization and automation of an end-to-end high throughput microscale transient protein production process. *Biotechnol Bioeng* 112:1832-1842. <https://doi.org/10.1002/bit.25601>
  - 38 Duetz WA (2007) Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. *Trends Microbiol* 15:469-75. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.09.004>

- 
- 39 Duetz WA, Witholt B (2004) Oxygen transfer by orbital shaking of square vessels and deepwell microtiter plates of various dimensions. *Biochem Eng J* 17:181-185. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00177-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00177-3)
- 40 Meier K, Klöckner W, Bonhage B, Antonov E, Regestein L, Büchs J (2016) Correlation for the maximum oxygen transfer capacity in shake flasks for a wide range of operating conditions and for different culture media. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 228-235. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.014>.
- 41 Ducommun P, Ruffieux P, Furter M, Marison I, von Stockar U (2000) A new method for on-line measurement of the volumetric oxygen uptake rate in membrane aerated animal cell cultures. *Journal of biotechnology*, 78(2), 139–147. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00237-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00237-0)
- 42 Xing Z, Kenty BM, Li ZJ, Lee SS (2009) Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 103(4), 733–746. <https://doi.org/10.1002/bit.22287>
- 43 Huang YM, Hu W, Rustandi E, Chang K, Yusuf-Makagiansar H, Ryll T (2010) Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnology progress*, 26(5), 1400–1410. <https://doi.org/10.1002/btpr.436>
- 44 Goudar CT, Piret JM, Konstantinov KB (2011) Estimating cell specific oxygen uptake and carbon dioxide production rates for mammalian cells in perfusion culture. *Biotechnology progress*, 27(5), 1347–1357. <https://doi.org/10.1002/btpr.646>

## Supplemental Data

### Supplemental Data-1

ウェル間の培養性能の違いを比較するため、標準の蓋を用いた 24 DWP の全 24 ウェルで同一細胞、同一条件のフェドバッチ培養を行った。モノクローナル抗体 D を生産するクローン b を用いて 15 日間培養し、培養性能の指標として積算生細胞濃度 (Integrated Viable Cell Concentration、IVCC) 及び培養最終日の培養上清中抗体濃度を評価した。

ウェル位置により 3 つのグループに分けて培養結果を解析した (図 S 1)。

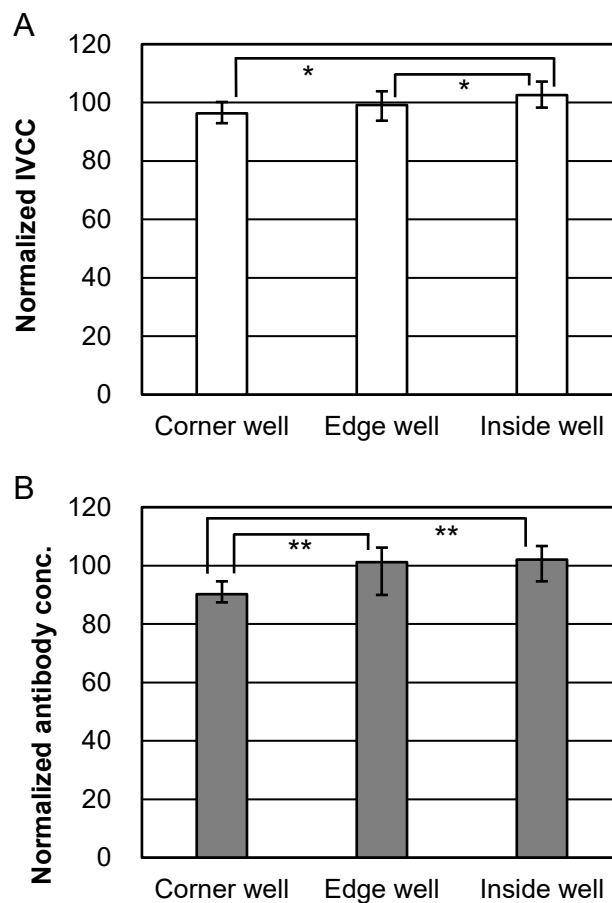


図 S 1 標準の蓋を用いた場合のウェル間の培養性能比較

**A** 標準化した積算生細胞濃度 (IVCC)。 **B** 標準化した培養最終日の培養上清中抗体濃度。

\*  $p < 0.05$  及び \*\*  $p < 0.01$ 。エラーバーは、それぞれ各条件の最大値、最小値を示す。

Supplemental Data-2

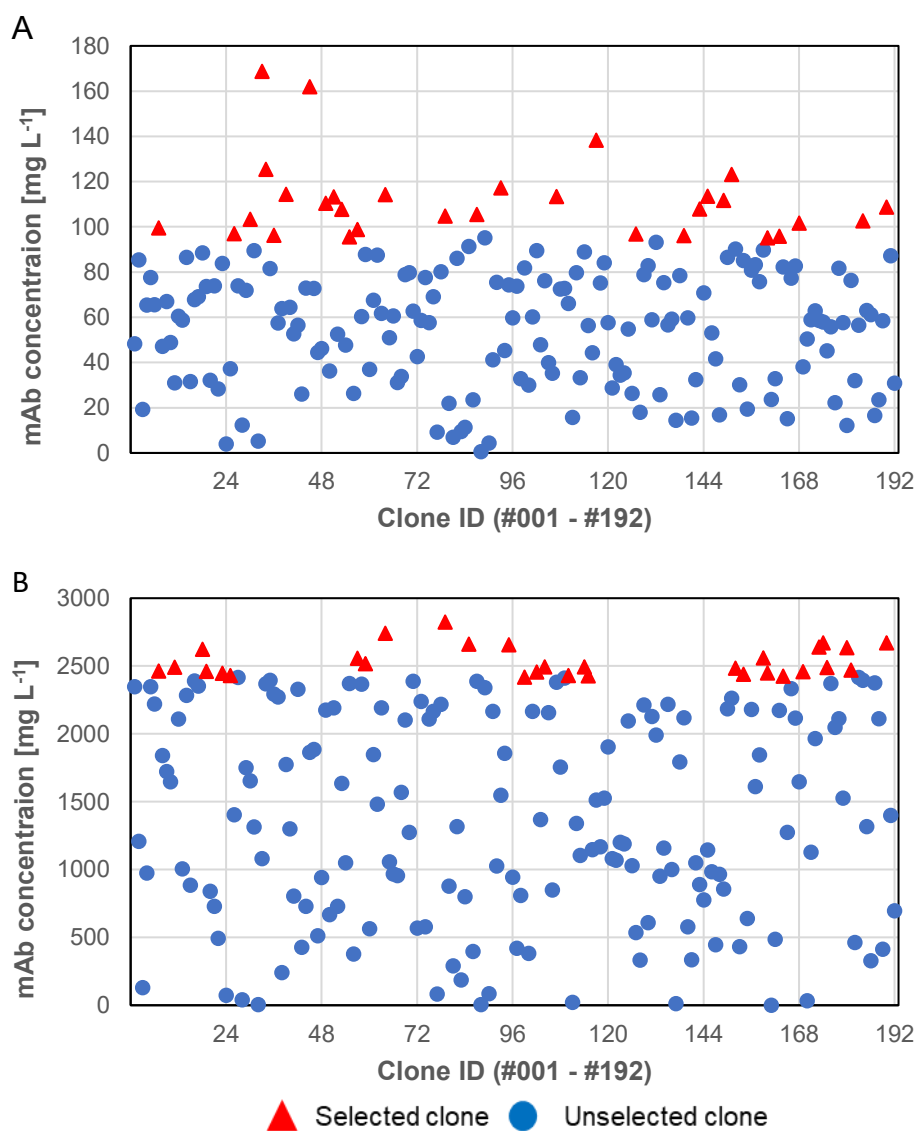


図 S 2 モノクローナル抗体 D 生産株 192 株の培養評価結果

**A** 24 ウェルプレート培養結果。**B** 24 DWP フェドバッチ培養結果。横軸は各細胞株の Clone ID を表す。