

Title	ハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体生産の培養工学的研究
Author(s)	大政, 健史
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3087926
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

ハイブリドーマを用いた
モノクローナル抗体生産の
培養工学的研究

1992年

大政 健史

ハイブリドーマを用いた
モノクローナル抗体生産の
培養工学的研究

1992年

大政 健史

序論	1
第1章 ハイブリドーマ培養に及ぼすアンモニアおよび乳酸の影響	8
第1節 緒言	8
第2節 実験材料および方法	9
2. 1 使用細胞株および保存方法	9
2. 2 使用培地	9
2. 3 分析方法	10
2. 4 培養方法	11
1. 静置培養	11
2. 攪拌培養	11
3. 流加培養法	12
2. 5 解析方法	13
1. 回分培養	13
2. 流加培養	13
第3節 結果および考察	15
3. 1 アンモニアの影響	15
3. 2 乳酸濃度一定の流加培養	16
3. 3 比増殖速度と比死滅速度	17
3. 4 グルコース消費と乳酸生成	20
3. 5 浸透圧の抗体比生産速度に及ぼす影響	21
第4節 要約	24
第2章 アミノ酸のモノクローナル抗体生産に及ぼす影響	25
第1節 緒言	25
第2節 実験材料および方法	26
2. 1 使用細胞株および使用培地	26
2. 2 分析方法	26
2. 3 培養方法	27
1. 静置培養および攪拌培養	27

2. 流加培養法	27
2. 4 解析方法	28
第3節 結果および考察	30
3. 1 アミノ酸濃度の細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響	30
3. 2 グルタミン添加の細胞増殖および抗体生産に及ぼす影響	32
3. 3 グルコース、グルタミン濃度一定の流加培養	34
3. 4 グルタミン濃度の各比速度に及ぼす影響	35
第4節 要約	39
第3章 成長因子のモノクローナル抗体生産に及ぼす影響	40
第1節 緒言	40
第2節 実験材料および方法	41
2. 1 使用細胞株および使用培地	41
2. 2 分析方法	41
2. 3 培養方法	41
2. 4 解析方法	43
第3節 結果および考察	46
3. 1 インシュリンおよびトランスフェリンの影響	46
3. 2 B S Aの影響	48
1. 静置培養における影響	48
2. 灌流培養における影響	49
3. B S Aの影響解析	51
第4節 要約	53
第4章 抗体生産に及ぼす細胞周期と収率の影響	54
第1節 緒言	54
第2節 実験材料および方法	55
2. 1 使用細胞株、培地および分析方法	55
2. 2 培養方法	56
2. 3 解析方法	56

第3節 実験結果及び考察	58
3.1 連続培養中の比速度の変化	58
3.2 フローサイトメトリーによる解析	61
3.3 抗体生産に及ぼす細胞周期分布の影響	64
第4節 要約	67
第5章 ホロファイバー培養システムによるモノクローナル抗体生産	68
第1節 緒言	68
第2節 実験材料および方法	69
2.1 使用細胞株、培地および分析方法	69
2.2 培養方法	69
2.3 解析方法	71
第3節 結果および考察	73
3.1 ホロファイバー培養の経時変化	73
3.2 ホロファイバー培養におけるBSAの影響	75
3.3 ホロファイバー培養における抗体生産	78
第4節 要約	81
総括	82
使用記号	85
引用文献	87
本論文に関連する報告	92
謝辞	93

序論

動物細胞培養の技術は、生体の一部を細胞の形でとりだして、これを適切な成分を含む培地を用いて培養器内で生育させるいわゆる組織培養技術から発展してきた。この組織培養に関する研究は、複雑な生体制御機構から解放された生命の最小単位である細胞を用いて生命現象を解析することを目的としてきた。また、細胞を一個一個分離した後に培養する細胞培養法は、近年著しく進歩し、この技術によって細胞を生体から独立した生物として取り扱うことが可能となった。即ち、細胞レベルでの分化、物質代謝、老化、発癌機構などを定量的に扱い、微生物において明らかになった知見や技術を簡単に応用できる様になった¹⁾。

動物などの多細胞生物は、微生物などの単細胞生物と異なり、その生体内において細胞間のネットワークともいえる細胞間相互での生理活性物質のやりとりをおこない、そのネットワークによって個体を外界と区別し維持している。近年、動物細胞からこれら生理活性物質を取り出し生体由来の医薬品として用いたり、その生理活性を工業的に利用しようという試みがなされてきた。しかし、生理活性物質を分泌する様な細胞は一般に無限増殖能力が無く、この様な物質の工業的な生産は困難であり、これまでは血液、尿などからの精製、あるいは初代細胞培養を利用する場合に限られていた。しかし、1970年代になって、遺伝子操作や細胞融合の技術が開発され、増殖可能な動物細胞を大量培養し、目的とする物質を大量に取得する技術が確立されてきた²⁾。

一方、遺伝子工学の発展に伴い、動物細胞からmRNAを取り出し、cDNAを作製する事によってこれを微生物に組み込み、発現させ、有用生理活性物質を生産させる方法が発展してきた。しかしインターフェロンに代表される様に、有用生理活性物質の多くは糖タンパク質であり、遺伝子工学的手法を用いても宿主として原核生物を用いている限りにおいては天然型そのものをつくり出すことは困難であり、生産された物質は生理活性自体が認められても生体内の持続性、有効性の面においては十分でない場合が多い。また、宿主由来のタンパク質混入の為、医薬品として適当でない場合もある³⁾。

以上のような背景により、生理活性物質の生産手段としての動物細胞培養技術が、近年になって格段に進歩し、確立されてきた。しかし、ここで発展してきた技術はいわゆる装置的な工夫が中心であり、動物細胞の増殖、物質生産に関して培養工学的に検討した例は非常に少ない。

動物細胞を用いた種々の生理活性物質の生産のなかで、ワクチンおよびモノクローナル抗体の生産は非常に重要である。モノクローナル抗体は、特に1個のB細胞またはそれから派生した均一な細胞集団によって生み出される抗体である。このモノクローナル抗体はある特定の抗原分子の特定の抗原決定基のみを認識し結合するという生理活性を持ち、脊椎動物生体内に於ける免疫機構の一部を担っている。さらに、通常のポリクローナル抗体とは異なり、その特異性のみならず、免疫グロブリンのクラス、サブクラス、親和力などもすべて均一の分子集団である。モノクローナル抗体は特異的に抗原と結合するという性質や、非常に高い親和力($>10^8 \text{ M}^{-1}$)、抗原に対する中和活性によって、臨床検査薬、診断薬、アフィニティ物質精製、生体内外でのガンの診断薬、ガンの治療薬、免疫治療薬、ワクチンなどの様々な用途に用いられ、その世界における市場規模は1991年においては約17億ドルにものぼる(1987年推定)とみられている。

モノクローナル抗体の生産方法としては、従来は脾フォーカス系が用いられてきたが、1975年にKohlerとMilsteinはモノクローナル抗体を分泌するマウス脾細胞と永続的に培養が可能なマウスミエローマ細胞間の細胞融合によって、モノクローナル抗体を生産し、永続的に培養可能な抗体産生B細胞ハイブリドーマを作りだした⁴⁾。以来、モノクローナル抗体の生産はこのハイブリドーマを用いて行なわれてきている。

ハイブリドーマによるモノクローナル抗体生産は、従来、得られたハイブリドーマをマウス体内に戻し、マウス腹腔内に腫瘍を形成させ、腹水中のモノクローナル抗体を取得していた。しかし、前述の様にモノクローナル抗体の社会的な必要性が高まるにつれ、工業的にモノクローナル抗体を大量生産する必要が生じ、反応器内でのハイブリドーマ培養について検討がなされた。

ハイブリドーマは、脾細胞とミエローマ細胞というリンパ系細胞間の融合細胞であるために、組織由来の培養細胞とは異なり、浮遊状態で培養可能な細胞である。従って、従来行われてきた微生物培養の技術がある程度応用可能である。また、生産物であるモノクローナル抗体は細胞外に分泌されるため、その濃度が比較的簡単に測定でき、培養工学的な解析が簡便である。以上の様な理由から、細胞培養による物質生産の例として、また抗体自体の多様な用途のため、様々な側面から近年さかんに研究されてきている。

動物細胞を*in vitro*で培養する技術は、実験室レベルにて20世紀始めにHarrisonによって本格的に始められた⁵⁾。さらに、1950年代になると、血清中のアミノ酸組成を基準にして血清を補う役目としてEarleやEagleが開発した培地に代表される様な、様々な合成培地

が開発された^{6, 7)}。しかし、これらの培地はあくまでも血清を補う為に開発されたものであり、細胞培養には必ず血清を必要とするものであった。しかし、血清は試料毎に細胞増殖能が異なり、さらにその組成もはっきりと解明されていない⁸⁾。そこで、組成不明の血清を既知の物質で置き換えて培養する無血清培養方法が様々に考案されてきた⁹⁾。Hamは目的とする細胞によって細胞毎に適した基礎培地をもちいて各細胞株毎に至適培地を作製した¹⁰⁾。さらに、Satoら^{11, 12)}は血清の主な役割を成長因子の供給にあるとし、血清の代りに幾つかの細胞成長因子を用いて無血清培養を試みた。これらの考え方にに基づき、村上らは^{13, 14)}ハイブリドーマの培養に必要な細胞成長因子としてエタノールアミンを見いだし、ハイブリドーマの無血清培養に有効なRDF-ITES培地を考案した。現在のハイブリドーマの無血清培養はこの成長因子ITES(Insulin, Transferrin, Ethanolamine, Selenium)を加えて培養がおこなわれている。

さらに、動物細胞培養によって生理活性物質を工業的に生産する場合には、微生物に比較して細胞の増殖が遅い、細胞濃度が低い、細胞あたりの物質生産能が低い、環境因子の変化に弱い等の動物細胞特有の様々な問題点を解決しなければならない。動物細胞の産みだす有用物質が注目されるにつれて、この点に関しては、培養中の細胞濃度を高める様な工夫や、細胞増殖、物質生産に関する研究がなされてきている。以下では、さらに細胞培養に於ける工学的研究を、装置的な研究と、細胞増殖、物質生産に関する研究にわけて述べる。

動物細胞培養において、最大の問題点の一つは、細胞の増殖が遅く、しかも到達細胞濃度が低いという点である。通常の組織培養では、その到達細胞濃度は生体内の約1000分の1程度の 10^6 個/mL程度である。この細胞濃度を生体内に近いレベルに上げ、生産性を飛躍的に上昇させようと装置的な工夫がなされている¹⁵⁾。特に、細胞の増殖が通常の微生物に比較して遅い(倍加時間が数十時間程度)ため、一度増殖した細胞を高濃度のままで保持し、継続的に生産物を生産させる培養方法がおこなわれている。細胞濃度を上昇させる工夫として生体内で高細胞濃度が保たれているのにヒントを得て、生体での細胞の状態を模した培養方法が工夫されている。その代表的な培養方法で、工業化も可能な方法として灌流培養法とホロファイバー培養法がある。

灌流培養法は、1965年にHimmelfarbとThayer¹⁶⁾によって開発された方法で、生体の血液灌流機構を真似て、細胞をリアクター内に保持したまま細胞と培地を分離し、培地のみを交換する事によって細胞を生きたまま維持する培養方法である。これを発展させて

TolbertとFederは¹⁷⁾大規模(44L)の培養をおこない、 1×10^7 個/mLレベルの高密度培養をおこなっている。我国では、1981年に始った通産省次世代産業基盤技術開発研究制度に基づき、佐藤ら^{15, 18)}が細胞沈降管を用いた灌流培養装置を、さらに渡嘉敷¹⁹⁾は様々な灌流培養装置にてハイブリドーマの高密度培養を行い、それらについて装置的に比較検討している。灌流培養方法の利点はスケールアップが容易で、装置的にも低コストであり、高濃度培養方法として優れていることである。しかし、その問題点は細胞を培養液から如何にして分離するかということであり、重力沈降法、膜分離法、遠心分離法などが工夫されている。

ホロファイバーは血管を模した中空繊維の表面に細胞を保持し、中空繊維を通じて培地を細胞に供給し、*in vivo*に近い状態で細胞培養を行う方法であり、Knazekら²⁰⁾によって1975年に開発された。この方法を発展させて、Kuら²¹⁾はフラットタイプのホロファイバー培養装置を考案している。ホロファイバーを用いた細胞培養は、他の培養方法と比較してもさらに高濃度の 1×10^8 個/mLの濃度にまで細胞濃度を上昇させることが可能であり、膜を用いた生産物の分離濃縮という、単なる高濃度培養以上の特徴を有し、培養方法としてたいへんすぐれている²²⁾。ホロファイバーによるハイブリドーマ培養はAltshulerら²³⁾によって分画分子量の影響や、さらにラジアルフロー型のホロファイバーを用いた培養結果も報告されている²⁴⁾。しかし、ホロファイバーは培養方法としては優れているが培養システムの複雑さ、系内が均一でないことによる現象解析の難しさのため、実際の培養結果を理論的に解析するのが困難であり、解析もしくは培養のどちらか一方にのみ重点をおいた研究が多い。

さらに、細胞の固定化培養が行われている。これは、固定化することによって、細胞濃度を上げ、かつ細胞へのダメージを少なくするという利点を持つ反面、スケールアップが難しいという欠点を持つ。固定化培養に関しては、例えば、白井ら²⁵⁾はアルギン酸ゲルを用いて、飯島ら²⁶⁾は、ポリウレタン強化の固定化方法によって、Kingら²⁷⁾は、分子量分画のあるマイクロカプセルを用いてハイブリドーマの固定化培養をおこない、高細胞濃度を実現している。

上記の様な装置的な培養方法の工夫に比較して、細胞増殖、抗体生産に影響を及ぼす各種栄養源、環境因子等の培養面からの検討に関しては、近年までほとんど研究はされていなかったが、ここ数年、各種栄養源、環境因子の影響について様々な報告がなされている。

BirchとCartwright²⁸⁾は細胞増殖に影響を制限する因子として、阻害物質の蓄積、栄養

源、血清、成長因子の枯渇、接着面積の不足の3つがあると述べている。実際に田谷ら²⁹⁾はhuman promyelocytic leukemia cell HL-60とhuman hematopoietic cell RPMI8226を用いて乳酸、グルコース、アンモニアの細胞増殖に及ぼす影響について定量的に検討している。ハイブリドーマについては、Glackenら³⁰⁾は各種環境因子(血清、グルタミン、アンモニア、乳酸)についてinitial metabolic rateにより定量的に解析し、モデルを構築している。また、Millerら³¹⁾も同様の解析を行っている。また、Millerら³²⁾は連続培養において、流入培地中のグルコース、グルタミン濃度をステップ状に変化させ、その変化がグルコース消費、酸素消費、各種アミノ酸消費、生成速度に及ぼす影響についても検討をおこなっている。さらに、McQueenら^{33, 34)}は、アンモニアによる細胞増殖阻害のメカニズムについて詳細に検討している。栄養成分の影響としては、培地成分の強化による抗体生産増強^{35, 36)}、抗体生産を促進する因子の探索³⁷⁾なども行われてきている。また、以上の様な非構造化モデルではなく、微生物において行われているような構造化モデルをハイブリドーマにおいても構築しようとする試みも近年なされてきている^{38, 39)}。また、さらに詳細にハイブリドーマの培養中の変化を測定する試みとしてフローサイトメトリーを用いて培養中の細胞変化を検討した例もある。FrameとHu⁴⁰⁾は、細胞の培養中の挙動を解析し、細胞の大きさが培養中に変化することを示し、その結果を連続培養の解析に応用した。また、Goebelら⁴¹⁾は培養中の大きさおよび細胞表面の変化と抗体生産について検討している。しかし、これらの因子の検討もほとんどが血清培地中に行われているものが多く、無血清培養中の細胞の挙動について検討したものは少ない。また、各環境因子の影響についても定量的に検討した例は少ない。

さらに、これらの細胞の増殖、物質生産に影響を及ぼす因子について定量的に検討した結果に基づいて、装置的に総合的に検討した例はほとんどない。

本研究では、細胞培養による効率的な物質生産法の確立をめざし、例としてマウスマウスハイブリドーマ3A21株による抗RNaseAモノクローナル抗体生産をとりあげ代謝産物濃度の影響および細胞あたりの物質生産速度向上のための各環境因子、培地条件について培養工学的に検討した。さらに、高細胞濃度達成可能な細胞培養システムとしてホロファイバー培養システムをとりあげ、このシステムの特徴、各因子の影響、さらに細胞培養による効率的な物質生産法について検討した。以下に本論文の概要を示す。

第1章では、細胞の代謝産物であるアンモニアおよび乳酸のハイブリドーマ培養に及ぼす影響について検討し、代謝産物である乳酸が細胞培養に大きく影響を及ぼす事を示した。さらに、乳酸濃度一定の流加培養を行い、乳酸による細胞増殖阻害について定量的に検討し、乳酸による細胞増殖阻害の原因が乳酸を中和することによる浸透圧増加にあることを示した。

第2章では、アミノ酸のモノクローナル抗体生産に及ぼす影響について検討し、グルタミン強化が抗体生産を増強させることを見出した。さらに、グルタミン、グルコースの2基質濃度一定の流加培養を行い、グルタミンの影響を定量的に検討し、抗体生産に最適なグルタミン濃度が存在することを見出した。

第3章では、成長因子のモノクローナル抗体生産に及ぼす影響について検討し、インシュリン、トランスフェリン、BSAの細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響について検討した。その結果、インシュリン、トランスフェリンは抗体生産には影響を及ぼさなかったが、BSAは、抗体生産に対して増強効果を示し、特に分離用ホロファイバーユニットを有する灌流培養において著しい効果がみられた。

第4章では、グルコース律速の連続培養を用いて増殖期（回分時）と定常期（連続時）における細胞状態、収率の変化および抗体生産に及ぼす細胞周期分布の影響について検討した。その結果、グルコース律速の連続状態においてグルコース重量あたりの細胞収率は重量基準についても、細胞数基準についても上昇した。また、細胞周期分布と抗体生産の関係について検討し、G0+G1期の割合を増加させると抗体比生産速度が上昇することが示された。

第5章では、ホロファイバー培養システムにおける操作条件について検討した。ホロファイバー培養システムによるモノクローナル抗体生産について検討し、約60日間にわたる連続培養の結果、細胞濃度は通常の回分培養の約50倍に相当する 5×10^7 個/mLにまで上昇した。この培養における培養終了時の細胞濃度からグルコース比消費、乳酸比生産速度を算出した結果、培養初期に比較して低下していた。また、ホロファイバー培養におけるBSA添加の影響について検討した結果、灌流培養同様、BSAの連続添加が抗体生産を著しく増強することが示された。

さらに、これまで得られた知見に基づいて、ホロファイバー培養システムによる抗体生産について考察した。その結果、抗体生産に最適な基質濃度、供給流量が存在し、ホロファイバー培養システムはモノクローナル抗体生産において効率のよいシステムであること

が示された。

最後に本研究の結果を総括した。

第1章 ハイブリドーマ培養に及ぼすアンモニアおよび乳酸の影響

第1節 緒言

一般に動物細胞培養に於いては、細胞自身の排泄する代謝産物によって細胞は強い増殖阻害、生産阻害をうける。細胞培養に於ける主な増殖阻害物質はグルコースより解糖系を経て生成されるL-乳酸と、グルタミンを細胞内に取り込む際に生成するアンモニアである (Fig. 1-1)。細胞増殖はpH、溶存酸素濃度 (DO)、代謝産物によって阻害され、細胞濃度は高濃度まで至らない^{2,6)}。従って、細胞濃度を上昇させ、生産性を向上させるためには、これら代謝産物の細胞増殖、生産物生産に及ぼす影響を定量的に検討する必要がある。

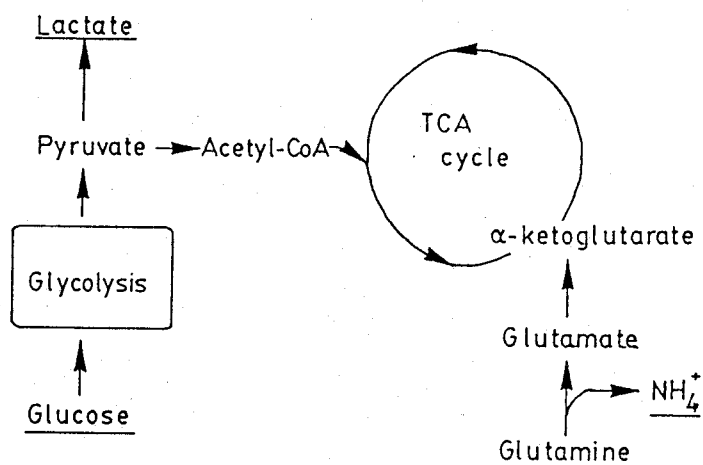


Fig. 1-1 Metabolic pathways of glucose and glutamine

しかし、これら代謝産物の細胞増殖、抗体生産に対する影響について定量的に検討した例は少く^{29, 30, 31, 32)}、また、これら代謝産物の細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響を検討した実験は、すべて、回分培養における初期代謝速度を用いて解析したものである。さらに、これらの実験はほとんど血清培地をもちいて行われたものであり、血清はその組成が複雑であるため、それらの成分の役割についての検討はまだ十分行われていない。また、血清間での細胞増殖、抗体生産に対するロット差も存在する⁴²⁾。従って、その性質が明らかでない血清を用いるよりも、無血清培地を用いて代謝産物の影響を検討することが重

要である。ここでは無血清培養における乳酸、アンモニアなどの代謝産物の細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響を検討する目的でスピナーフラスコ内で代謝産物濃度を一定に保持できるような流加培養法を構築し、実験と解析を行った。

第2節 実験材料および方法

2. 1 使用細胞株および保存方法

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとしてマウスマウスハイブリドーマ3A21株を用いた。この細胞株はマスキロマ細胞(P₃-X63-Ag8-U1)とRNaseA (bovine pancreatic ribonuclease A; Sigma R-5125)によって免疫されたBALB/c AnNCrjマウスの脾細胞をポリエチレングリコールを用いて細胞融合し、3回の限界希釈法によるクローニングで得られた抗RNaseAモノクローナル抗体(IgG)を産生するハイブリドーマである⁴³⁾。

細胞の凍結保存は細胞を10%のdimethyl sulfoxide (DMSO)を含むRDF-ITES培地に懸濁し、液体窒素中で保存した。この細胞株を適宜解凍して継代培養を行い、その継代培養より細胞を調製し、以下の実験をおこなった。

2. 2 使用培地

培地として村上らによって開発された無血清のRDF-ITES培地を用いた^{13, 14, 25)}。この培地は組織培養用のRPMI1640(Gibco 430-1800)、Dulbecco改変MEM(DMEM; 日水製薬 05915)、およびF12(日水製薬 05910)培地を2:1:1に混合したRDF培地に、成長因子としてITESと呼ばれる牛脾臓由来インシュリン(Sigma I-5500)、ヒトトランスフェリン(Sigma T-2252)、エタノールアミン(ナカライテスク 234-05)、セラム(ナカライテスク 172-94)を、タンパク成分として牛血清アルブミン(bovine serum albumin; Sigma A-4503)を、pH緩衝剤としてHEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid)を添加したものである。pHの調節はHClを用いて7.35に調節し、さらにφ0.22μmのメンブレンフィルター(FALCON 7105)を用いて濾過除菌した。培地組成を以下のTable 1-1に示す。

Table 1-1 The composition of RDF-ITES medium (serum-free)

RPMI1640	5.27 g/L	Insulin	10.0 mg/L
DMEM	2.50 g/L	Transferrin	20.0 mg/L
Ham F12	2.65 g/L	Ethanolamine	2.0 μ L/L
Glucose	0.88 g/L	Sodium selenite	0.17 μ g/L
Kanamycin	36.0 mg/L	Bovine serum albumin	5.0 g/L
Streptomycin	120.0 mg/L	HEPES	0.36 g/L
NaHCO ₃	2.0 g/L		

さらに、アンモニアおよび乳酸の影響を検討する際には、アンモニアとして塩化アンモニウム(ナカライテスク024-24)を、乳酸としてはL-(+)乳酸リチウム(ナカライテスク207-39)もしくはL-(+)乳酸(Sigma L-1750)を水酸化ナトリウム(ナカライテスク 315-11)で中和した乳酸ナトリウムを用いた。

2. 3 分析方法

生細胞および全細胞濃度はトリパソブルを用いた色素排除法にて測定した。トリパソブル水溶液0.2%(W/V)とNaCl水溶液4.25%(W/V)を4:1の割合で混合し、この液に細胞浮遊液を等量混合し、Burker-Turk型血球計算盤(ERMA 4296)に一滴(約20 μ L)のせ、ただちに検鏡して生細胞濃度、全細胞濃度を計測した。血球計算盤では右側と下側の二辺にかかる細胞は計測時には省いた。ここで、計測した細胞数を用いて、血球計算盤付属の検定値に従って血球計算盤の深さの補正を行い、血球計算盤上の体積を計算し、細胞濃度を算出した。グルコース濃度は、固定化グルコースオキシダーゼを用いたグルコースアナライザー(Yellow Springs Model 27)にて、乳酸濃度は固定化L-乳酸オキシダーゼを用いた乳酸アナライザー(東洋紡 Diagluca HEK-30L)を用いて測定した。アンモニア、尿素濃度は酵素法による食品分析用キット(ベーリンガーマンハイム山ノ内 F キット)を用いて測定した。

抗体濃度測定法として酵素標識抗体測定法(ELISA;enzyme-linked immunosorbent assay)の間接法を用いた^{44, 45)}。この方法は固層に吸着させた抗原と抗原-抗体反応をおこさせ、

さらに、この固層-抗原-抗体に対して酵素標識2次抗体を反応させ、抗体濃度を酵素濃度で代表させ、抗体濃度を測定する方法である。ここでは抗原としてRNaseA(Bovine pancreatic ribonuclease A; Sigma R-5125)、固層として96穴ELISA用プレート(Greiner 655 061)、酵素標識2次抗体としてアルカリホスファターゼ標識 goat抗マウスIgG抗体(TAGO 6550)、酵素基質として p-nitrophenyl phosphate(Sigma 104-105)を用いた。吸光度の測定(A405)はマイクロプレートリーダー(東ソー MPR-A4)を用いた。サンプルはあらかじめ、抗体の希釈とELISAの発色が直線関係になる0.1~0.3の範囲に希釈して測定した。抗体濃度は280nmの吸光度を用いてあらかじめ濃度を測定した(モル吸光係数; 280 nmで $\epsilon = 2.1 \times 10^5$)⁴⁶⁾濃度既知の精製抗体を同時にELISA法にて測定し、その値を用いて補正して算出した。

2. 4 培養方法

1. 静置培養

静置培養として100 mm組織培養用ディッシュ(Corning 25020)を用いて培養を行った。20 mLの培養液に生細胞濃度約 1×10^5 個/mLになる様に前培養液から細胞を接種し、5% CO₂、37 °Cインキュベーター内で培養を行った。サンプリングはクリーンベンチ内で培養液を良く攪拌した後、約1 mLの培養液を取ることによって行った。

2. 攪拌培養

ジャケット付きガラス製スピナーフラスコ(柴田HARIO culstar 1609-500)を攪拌培養に用いた。スピナーフラスコの内容積は1400 mL、培養液量は400 mL~1000 mLの範囲で変更する事が出来、温度はジャケットに温水を通すことによって37°Cに保った。攪拌速度は60 rpm、通気は40 mL/minで上面通気を行った。pHは通気のラインに電磁バルブを用いて炭酸ガスを流す事によって7.4にオン-オフコントロールした。溶存酸素はDOセンサー(ABLE 3673N)を用いて測定し、その結果はデータロガー(DATAPRO PAD1000S)を通してコンピューター(NEC PC-9801F2)に取り込み、飽和濃度の30%以上に保たれていることを確認した。流加培養の場合は、初発容量400 mLで回分培養を開始し、培養12時間目に乳酸ナトリウムもしくは乳酸リチウムを目的の乳酸濃度となる様に添加した。その後、乳酸濃度を一定に

保つように新鮮培地を流加した。培養液量が約1000 mLになった時点で流加培養を終了した。また、乳酸濃度を低く保つ場合は、培養時間を長く保つために、槽内の液量が約1000 mLとなった時点で適宜培養液を引き抜き、再度流加した。

3. 流加培養法

乳酸濃度を一定に保つ流加培養は、乳酸濃度がオンラインで測定不可能なために、流加区間を6時間毎に区切り、オフラインで乳酸濃度を測定し、その測定値に基づいて算出された流加速度を用いて流加区間中は一定に保った。流加速度の算出は以下の様な方法に基づいて行った。

1 2時間の回分培養の後、L-乳酸ナトリウムもしくはL-乳酸リチウムを目的の乳酸濃度になる様に槽内に添加した。その後、細胞濃度を6時間間隔で2回、乳酸濃度を3時間間隔で3回測定し、これらの測定値に基づいて比増殖速度 μ 、比死滅速度Kd、乳酸比生産速度 ρ_L を算出した。これらの値を用いて、以降6時間間隔毎に流加速度を変化させる流加培養により乳酸濃度を一定に保った。

1回目の流加区間の目的乳酸濃度 L^*_1 は流加区間前の6時間の間に測定した3回の乳酸濃度の測定値の平均に設定した。1回目の流加区間の流加速度 F_1 は、流加区間前の6時間の間に測定した乳酸、細胞濃度の測定値に基づいて算出された比速度の値を用いて1回目の流加区間の終了時点で目標乳酸濃度に達する様に決定した。

以降の流加区間における流加速度の決定は以下の様に行った。まず、あらかじめ定めた流加区間の間に細胞濃度1回、乳酸濃度を2回測定し、最初の流加区間からの測定値すべてを用いて、比増殖速度 μ 、比死滅速度Kd、乳酸比生産速度 ρ_L を算出した。さらに、i番目の流加速度は、これらの比速度のデータに基づいて、i番目の流加区間の最後に目標乳酸濃度 L^*_i に達する様に決定した。i番目の目標乳酸濃度はその流加区間までの乳酸濃度の平均値 \bar{L} を用いて、流加区間毎に以下の(1-1)式の様に修正した。

$$L^*_i = \frac{1}{2} (\bar{L} - L^*_{i-1}) \quad (1-1)$$

この様に目標乳酸濃度を修正したのは、測定値と目標値間の大きな差を生じないようにするためである。すなわちこの方法によって流加培養の急激な変動をおさえることができ、乳酸濃度は流加培養中一定に維持することができた。

2. 5 解析方法

1. 回分培養

回分培養における各比速度は以下の様にして算出した。まず、回分培養時における全細胞濃度、生細胞濃度、グルコース濃度、乳酸濃度の変化は以下の(1-2)~(1-5)式で表現できる。

$$\frac{dX_t}{dt} = \mu X_v \quad (1-2)$$

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu - K_d)X_v \quad (1-3)$$

$$\frac{dG}{dt} = -\nu_G X_v \quad (1-4)$$

$$\frac{dL}{dt} = \rho_L X_v \quad (1-5)$$

これらの式の μ 、 K_d 、 ν_G 、 ρ_L 一定として t について(1-2)~(1-5)式を積分するとそれぞれ(1-6)~(1-9)式になる。

$$\ln(X_t) = \mu \int \left(\frac{X_v}{X_t} \right) dt + \ln(X_t)_0 \quad (1-6)$$

$$\ln(X_v) = (\mu - K_d)t + \ln(X_v)_0 \quad (1-7)$$

$$-G = \nu_G \int X_v dt - G_0 \quad (1-8)$$

$$L = \rho_L \int X_v dt - L_0 \quad (1-9)$$

この(1-6)~(1-9)式の下線部をプロットすることによって生細胞に基づく各比速度を算出した。

2. 流加培養

流加培養についても回分培養と同様に全細胞濃度、生細胞濃度、グルコース濃度、乳酸濃度の変化はサンプリングによる培地の引き抜きを考慮して、以下の(1-10)~(1-13)式の様に表示できる。

$$\frac{dVX_t}{dt} = \mu VX_v - FoX_t \quad (1-10)$$

$$\frac{dVX_v}{dt} = (\mu - K_d)VX_v - FoX_v \quad (1-11)$$

$$\frac{dVG}{dt} = FG_t - \nu_c VX_v - FoG \quad (1-12)$$

$$\frac{dVL}{dt} = \rho_L VX_v - FoL \quad (1-13)$$

ここで、Foはサンプリングによる培地の引き抜き速度を表しているが、これは流加培養中にサンプリングした液量を培養時間で割り、平均の値としている。ここでサンプリングは流加区間毎に同量おこなった。この(1-10)~(1-13)式を積分することによって以下の(1-14)~(1-17)式が得られる。

$$\ln(VX_t) - \int \left(\frac{Fo}{V} \right) dt = \mu \int \left(\frac{X_v}{X_t} \right) dt + \ln(VX_t)_0 \quad (1-14)$$

$$\ln(VX_v) - \int \left(\frac{Fo}{V} \right) dt + \mu t = K_d t + \ln(VX_v)_0 \quad (1-15)$$

$$(VG) - \int FG_t dt + \int FoG dt = -\nu_c \int VX_v dt + (VG)_0 \quad (1-16)$$

$$(VL) + \int FoL dt = \rho_L \int VX_v dt + (VL)_0 \quad (1-17)$$

これらの式を用いて回分時同様に下線部をプロットし、各比速度を求めた。

第3節 結果および考察

3. 1 アンモニアの影響

アンモニア濃度のハイブリドーマ培養に及ぼす影響を検討するために、ディッシュ静置培養において初発濃度を変化させ、初期の比増殖速度、比死滅速度に及ぼすアンモニアの影響を検討した。その結果をFig. 1-2に示す。この図に示される様に培地中のアンモニアの増加に伴い、比増殖速度の減少、比死滅速度の増加が見られ、アンモニア濃度8~10 mM付近で急激に細胞増殖が阻害された。このアンモニア濃度は細胞濃度 5×10^6 個/mLに相当し、回分培養で細胞濃度を 1×10^6 個/mLレベル以上に上昇させるためには灌流操作などのアンモニア濃度を下げる工夫が必要であると考えられる。また、検討した範囲内では抗体比生産速度にアンモニア濃度はほとんど影響は及ぼさなかった。

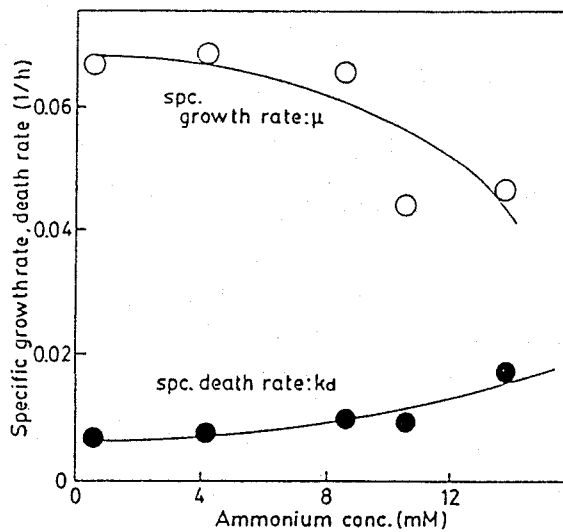


Fig. 1-2 Effect of ammonium concentration on specific growth rate, μ and death rate, k_d in static dish culture

3. 2 乳酸濃度一定の流加培養

アンモニアに比較して培養中に多量に生成される乳酸については先に述べた方法により槽内の乳酸濃度を一定になるようにした流加培養法を用いて検討した。通常、培養中に生成した乳酸はpHを一定に保つために中和され、乳酸塩の形で存在する。ここでは乳酸としてL-乳酸リチウムまたはL-乳酸ナトリウムを用いて乳酸濃度の影響を検討した。Fig. 1-3にその培養結果の経時変化を示す。12時間の回分培養の後、L-乳酸ナトリウムが目的の乳酸濃度になるように添加し、その後、乳酸濃度を一定に保つように新鮮培地を前述の方法により流加した。流加区間に於いては、乳酸濃度は流加培養中 2.04 ± 0.14 g/Lに一定に保たれたが、細胞濃度および抗体濃度は増加し、グルコース濃度は減少した。

各比速度の算出は前述の(14)~(17)式を用いて行った。この結果、細胞濃度、グルコース濃度の変化にもかかわらず、各比速度は流加培養中一定の値であった。同様の実験をKimuraら¹⁷⁾の報告に従って、乳酸リチウムを用いて行ったが、リチウムによる著しい細胞増殖阻害がみられた。

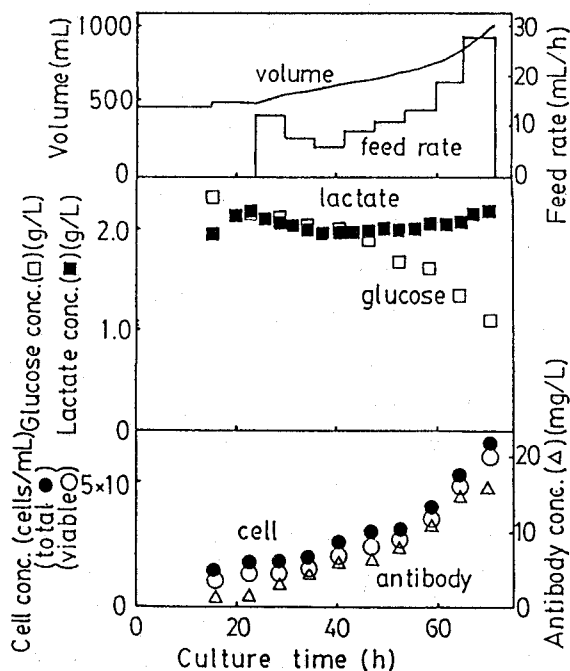


Fig. 1-3 Example of the time course of the fed-batch culture operated to keep the lactate concentration constant. ($L=2.04$ g/L)

3. 3 比増殖速度と比死滅速度

流加培養による乳酸濃度と比増殖速度、比死滅速度の関係をFig. 1-4に示す。この図に示されるように、乳酸濃度の増加に伴って比増殖速度は減少し、比死滅速度は増加した。また、乳酸濃度が7.4 g/Lを越えると、比死滅速度は急激に増加し、見かけの比増殖速度(比増殖速度-比死滅速度)は負の値となり、生細胞濃度は減少した。また、非常に低い乳酸濃度では比増殖速度の値は減少した。これは、乳酸濃度を低く保つために流加速度を高く保ちすぎた結果、ウォッシュアウトが起ったためと考えられる。

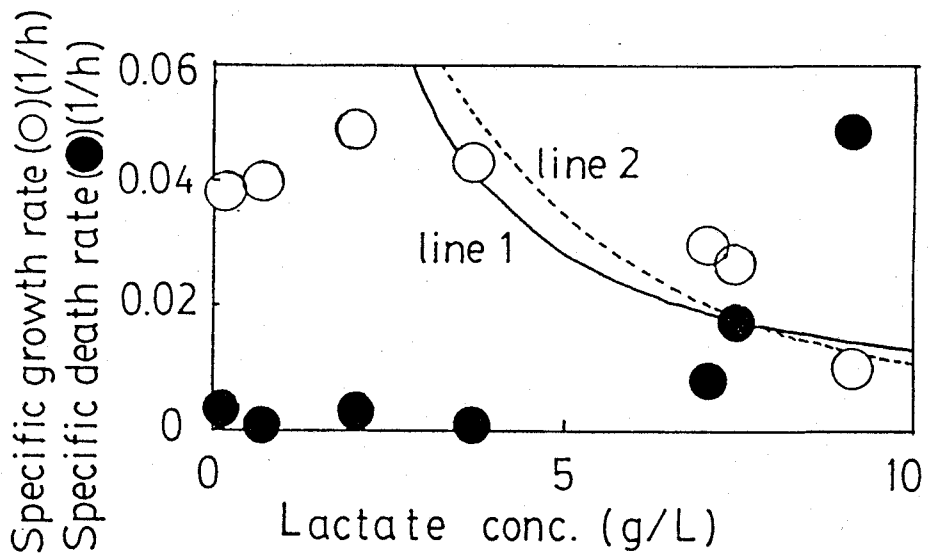


Fig.1-4 Effects of lactate concentration on the specific growth rate, μ and death rate, K_d .

細胞培養に於ける一般的な乳酸阻害は

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot K_{lac}}{K_{lac} + L^n} \quad (1-18)$$

で示されるが、この式において田谷らは初期代謝速度を用いてhuman promyelocytic

leukemia cell HL-60とhuman hematopoietic cell RPM18226の両細胞株においてn=1をあてはめ²⁹⁾、さらにGlackenらはマウスマウスハイブリドーマCRL-1606細胞株にn=2をあてはめ、各パラメーターを算出している³⁰⁾。Table 1-2にこれらの値とこれ以外の細胞株について初期反応速度を用いて計算した $K_{1..c}$ の値を示す。

Table 1-2 The comparison of kinetic parameters¹⁾

Method	Cell type	$K_{1..c}$	Salt	pH control	medium	Ref.No.
Batch initial rate	hybridoma CRL-1606	12000 mM ²	Na-lactate (4 points)	none	serum	30)
Batch initial rate	HL-60	26.6 mM	Na-lactate (4 points)	none	serum-free	29)
Batch initial rate	RPM18226	20.5 mM	Na-lactate	none	serum-free	29)
Batch initial rate	HL-60	16 mM	Li-lactate (5 points)	none	serum-free	47)
Batch initial rate	RPM18226	15 mM	Li-lactate (5 points)	none	serum-free	47)
Batch initial rate	hybridoma HB8178	11±7 mM (calculated in Ref. 50)	(3 points)	none	serum	48)
Estimated from continuous culture	hybridoma AB2-143.2	140 mM		controlled	serum	31)
Estimated from batch culture	hybridoma	8 mM		controlled	serum	49)

1) This table was compiled with the data of Table II of Ref. 49 and the results of Ref. 46 and Ref. 48.

Fig. 1-4の点線 1 および 2 は本研究の実験値に基づいて、式(1-18)においてそれぞれn=1 およびn=2として計算した曲線である。このFig. 1-4に示される様にこの3A21株における乳酸阻害はこれらのモデルではうまく表現できなかった。

高乳酸濃度においては乳酸は中和されて乳酸ナトリウムの形で系内に存在しているため、系内の浸透圧は高い状態にある。比増殖速度および比死滅速度に及ぼす影響を、乳酸濃度ではなく浸透圧に対して表現したのがFig. 1-5である。ここで、浸透圧の値は溶液の重量モ

ル濃度 m および浸透係数 ϕ を用いて(1-19)式より近似計算した⁵⁾¹⁾。

$$\pi = \frac{\nu R T w_A}{1000 V_A} \phi m \quad (1-19)$$

この図に示されるように、浸透圧の増加に伴って細胞増殖は阻害された。さらに、乳酸ナトリウムの代わりに塩化ナトリウムを用いて同じ浸透圧下で培養を行った結果も同一図上に示した。この図に示される様に塩化ナトリウムと乳酸ナトリウムの結果は同一線で表現でき、乳酸ナトリウムによる細胞増殖阻害の原因が浸透圧の増加にあると考えられた。

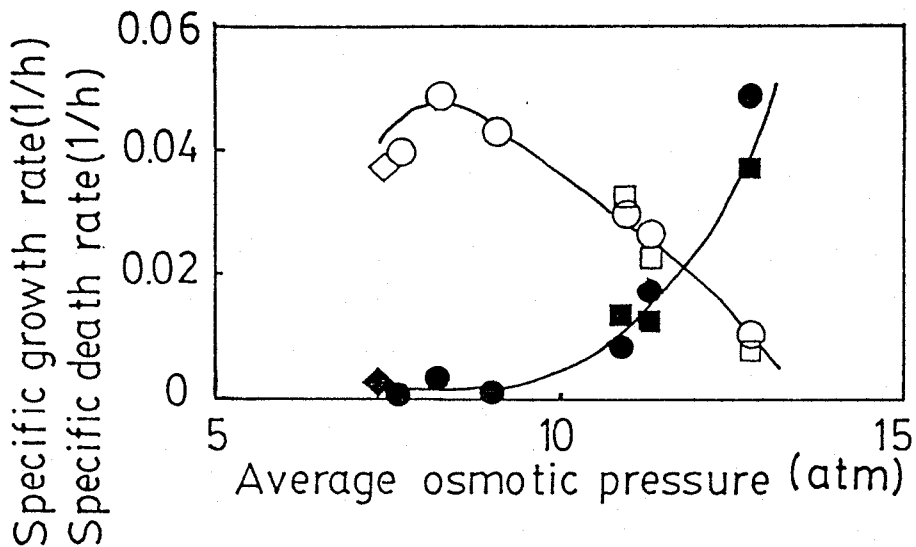


Fig.1-5 Effects of the average osmotic pressure on the specific growth rate, μ and death rate, K_d . Open symbol is the specific growth rate and closed symbol is the specific death rate. (sodium lactate \circ , \bullet ; sodium chloride \square , \blacksquare ; no addition \diamond , \blacklozenge)

3. 4 グルコース消費と乳酸生成

乳酸濃度とグルコース比消費速度、乳酸比生産速度の関係を示したのがFig. 1-6である。この図に示されるように、乳酸濃度の上昇に伴って、両比速度は減少した。高乳酸濃度においては細胞増殖は浸透圧の増加によって阻害され、比増殖速度は減少している。従って、このグルコース比消費速度、乳酸比生産速度の減少は、比増殖速度の減少による影響であると考えられた。

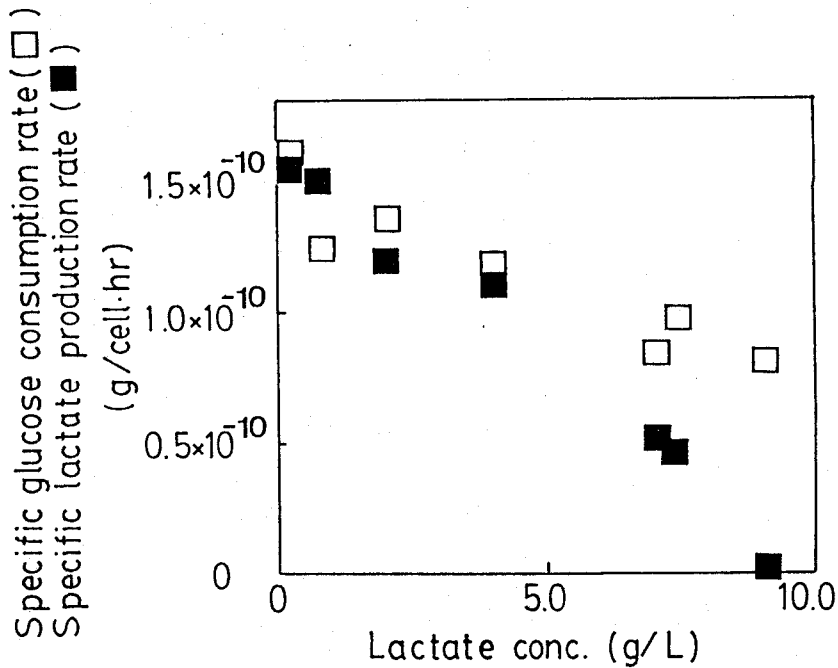


Fig. 1-6 The specific glucose consumption rate and specific lactate production rate for various lactate concentrations.

グルコースは主に解糖系によって代謝され、乳酸に至る。生成した乳酸/消費したグルコース比はグルコース代謝による乳酸生成の活性を示す重要な因子である。Fig. 1-7に生成乳酸/消費グルコースと乳酸濃度の関係を示す。この図に示される様に、乳酸濃度の上昇に伴って生成乳酸/消費グルコースの減少がみられた。このことは高乳酸濃度においてグルコースから解糖系を経て生成される乳酸の割合が減少していることを意味し、乳酸生成が阻害されていると考えられる。一方、塩化ナトリウムを用いて培養を行った場合は、細胞増殖は阻害されるが、生成乳酸/消費グルコースの減少は見られない。従って、これ

は乳酸自身による乳酸生成の阻害によるものと考えられ、この様な乳酸生成の阻害原因としては、L-lactate dehydrogenaseの高乳酸濃度による阻害が考えられた^{1), 6)}。

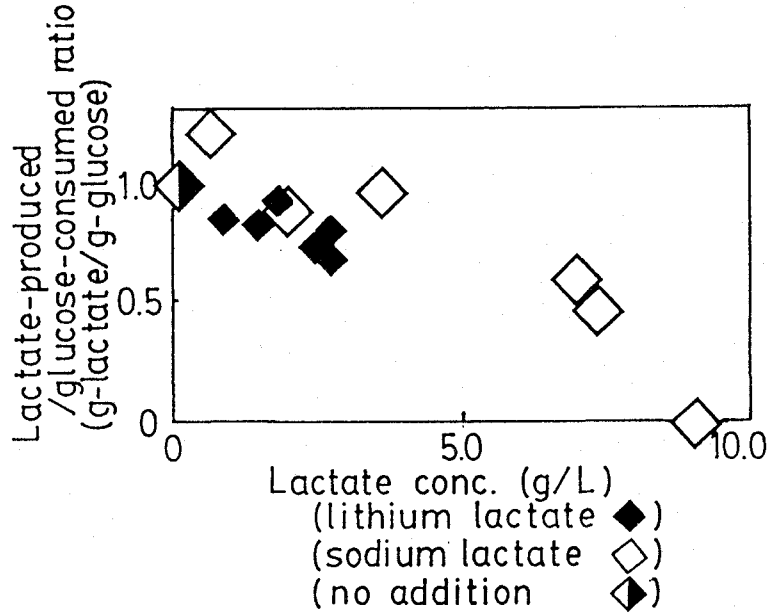


Fig. 1-7 The ratio of lactate-produced / glucose-consumed against the lactate concentration.

3. 5 浸透圧の抗体比生産速度に及ぼす影響

浸透圧の抗体生産に及ぼす影響を検討したのがFig. 1-8である。この図に示されるように、乳酸濃度2.0 g/L~8.0 g/Lに相当する浸透圧8~12 atmの範囲で抗体比生産速度が最大を示した。さらに、抗体比生産速度と比増殖速度の関係を示したのがFig. 1-9である。

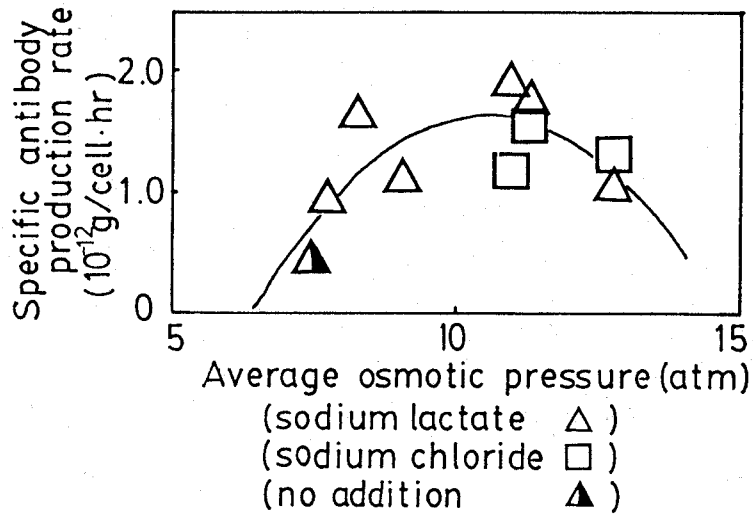


Fig. 1-8 The relationship between average osmotic pressure and specific antibody production rate.

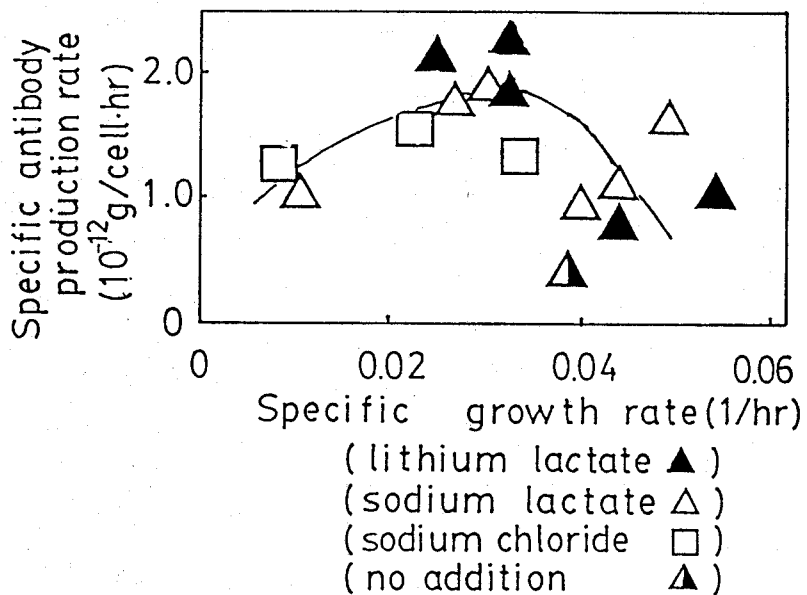


Fig. 1-9 The relationship between specific growth rate and specific antibody production rate.

この図に示される様に、抗体比生産速度は比増殖速度0.02~0.04 (1/h)の間で最大値を示した。ここで示した様な比増殖速度の低下に伴って抗体比生産速度が上昇する現象は、他の文献でも報告されており^{54, 55)}、また、浸透圧増加が抗体生産を増強する例も報告されている^{56, 57)}。

しかし、本研究での結果は0.01 (1/h)より低い比増殖速度において抗体比生産速度が低下するという現象は、これまでの報告とは若干異なっている。しかし、細胞周期阻害剤を用いて比増殖速度と抗体比生産速度の関係を検討した例では低比増殖速度において抗体生産の低下がみられた例もあり⁵⁸⁾、この様な低い比増殖速度(高い浸透圧)では比増殖速度の低下そのものが抗体生産低下の原因であると考えられる。

これらの結果より、抗体生産を最大にするには細胞濃度を上昇させ、さらに比増殖速度を少し抑える様な培養法、例えば、灌流培養法、ホロファイバー培養法が有効であると考えられる。

第4節 要約

ハイブリドーマ3A21株の培養におけるアンモニア濃度および乳酸濃度の影響について定量的に検討した。その結果、培地中のアンモニアの増加に伴って、比増殖速度の減少、比死滅速度の増加が見られ、8~10 mM付近で急激に細胞増殖が阻害された。しかし、アンモニア濃度の上昇は抗体比生産速度に影響は及ぼさなかった。

さらに、乳酸に関しては、乳酸濃度を一定に保つ流加培養法をもちいてその影響を定量的に検討した。その結果、乳酸濃度7.4 g/Lを越えると、比死滅速度は急激に増加し、見かけの比増殖速度（比増殖速度－比死滅速度）は負の値となり、生細胞濃度は減少した。また、乳酸による細胞増殖阻害の原因を検討するために、塩化ナトリウムを用いて浸透圧を調節して培養を行った結果、乳酸による細胞増殖阻害の原因が浸透圧上昇にあることが示された。また、乳酸比生産速度およびグルコース比消費速度の解析の結果、乳酸自身による乳酸生成の阻害が認められた。

また、抗体生産に関しては、抗体比生産速度を最大にする乳酸濃度が存在した。さらに、抗体比生産速度と比増殖速度の関係で整理することによって、抗体生産には最大比増殖速度[0.05 (1/h)程度]より小さい比増殖速度[0.03 1/h 程度]の培養が有利であることが示された。

第2章 アミノ酸のモノクローナル抗体生産に及ぼす影響

第1節 緒言

近年、無血清培養技術が著しく進歩し、様々なハイブリドーマ細胞株が無血清培地を用いて培養できるようになった^{13, 14)}。この様な無血清培地を用いて動物細胞培養を行う際のもっとも重要な栄養源は糖とアミノ酸であり、これらは培地成分の約30%を占め、細胞増殖と抗体生産に対して重要な基質である^{5, 9)}。従って、この糖およびアミノ酸の細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響に関しては多くの報告がなされ、特にグルタミン濃度の細胞増殖に及ぼす影響に関しては詳細に検討されている^{29, 30, 31)}。また、これら糖とアミノ酸濃度を通常より高くした場合、細胞の増殖期が延長され、その結果、到達抗体濃度が増加したとの報告もなされている^{35, 36, 60)}。

しかし、これら基質濃度の増加の抗体比生産速度に及ぼす影響について定量的に検討した例はこれまでほとんどみあたらない。また、これらの因子の濃度の影響を定量的に検討するために、これらの基質の濃度を一定に保った上で検討しなければならない。しかし、この様な糖およびアミノ酸の濃度をオンラインで測定し、制御するのが難しいため、これらの基質濃度を一定に保つのは困難な状況にある。

2章ではこれら糖およびアミノ酸の影響について広い濃度範囲で定量的に検討し、さらに抗体比生産速度増強効果の認められたグルタミンに関しては、グルタミン、グルコース 2 基質の濃度を同時に一定に保つ流加培養法を構築し、グルタミン濃度の影響を定量的に検討した。

第2節 実験材料および方法

2. 1 使用細胞株および使用培地

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとしてRNaseAモノクローナル抗体(IgG)を産生するマウスマウスハイブリドーマ3A21株を用いた。培地として村上ら^{13, 14, 25)}によって開発された無血清のRDF-ITES培地を用いた。この培地は前述のRDF培地よりグルコースおよびグルタミンを除いたRDF(HO)培地(極東製薬 RDF(HO))に、成長因子としてITESと呼ばれる牛脾臓由来インシュリン(Sigma I-5500)、ヒトトランスフェリン(Sigma T-2252)、エタノールアミン(ナカライテスク 234-05)、セリウム(ナカライテスク 172-94)を、タンパク成分として牛血清アルブミン(bovine serum albumin; Sigma A-4503)を、pH緩衝剤としてHEPESを添加した培地である。この培地に適宜グルコース(和光純薬工業 041-00595)およびL-グルタミン(和光純薬工業 074-00522)を添加した。また、N-acetyl-L-glutamine添加実験の際にはグルタミンの代わりにN-acetyl-L-glutamine (Sigma A-9125)を等モル濃度になるように添加した。

2. 2 分析方法

生細胞および全細胞濃度は第1章と同様にしてトリパソブルーを用いた色素排除法にて測定した。また、グルコース、乳酸、アンモニア、抗体濃度も第1章と同じ方法を用いて測定した。グルタミン濃度は食品分析用酵素法測定キット(ベーリンガーマンハイム山ノ内 F kit)を用いて測定した。また各アミノ酸濃度はニンヒドリン反応を用いた高速液体クロマトグラフィーによるアミノ酸分析システム(東ソー CCP & 8000)を用いて分析した。

2. 3 培養方法

1. 静置培養および攪拌培養

静置培養は、第1章の方法に従って、5% CO₂, 37°Cインキュベーターを用いて行った。攪拌培養は第1章の装置を用い、さらに、槽内の溶存酸素不足を防ぐために培地中に多孔性のテフロンチューブ（気孔率60% 住友電工 POREFLON TB-32）を用いて通気した。また、データロガー(DATAPRO PAD1000S)によってコンピューターに取り込んだ溶存酸素濃度のデータを用いて、酸素消費速度を算出した。流加培養は、初発容量500 mLで培養を開始し、細胞濃度が 1×10^5 個/mLに達した時点で目的のグルタミン濃度になる様に高濃度グルタミン培地を加えた。また、グルタミン濃度を一定に保つためあらかじめ調製した流加培地をグルコース濃度を指標にして流加した。

2. 流加培養法

グルコースおよびグルタミン濃度を同時に一定に保つ流加培養法は以下の様にして構築した。まず、流加培養中のグルコースおよびグルタミン濃度の物質収支式は以下の(2-1)、(2-2)式で表現できる。

$$\frac{dG}{dt} = (G_f - G) \frac{F}{V} - \nu_G X_v \quad (2-1)$$

$$\frac{dGln}{dt} = (Gln_f - Gln) \frac{F}{V} - \nu_{Gln} X_v \quad (2-2)$$

以上の式において添え字、fは流入培地中の濃度を表す。流加培養中にこれら流入培地中の濃度が以下の(2-3)式を満たし、 $dG/dt = 0$ の時、上記の(2-1)、(2-2)式の左辺は零となり、培養中両基質の濃度は一定に保つことができる。従ってこの(2-3)式を満たすことが両基質濃度を一定に保つ必要条件となる。

$$\frac{G_f - G}{G_{lnf} - G_{ln}} = \frac{\nu_G}{\nu_{G_{ln}}} \quad (2-3)$$

従って、ここでは静置培養の実験結果から得られたグルコース比消費速度 ν_G およびグルタミン比消費速度 $\nu_{G_{ln}}$ の値を用い、一定に保ちたいグルタミン、グルコースの濃度を与え、(2-3)式を満たす様に流加培地中のグルタミン、グルコース濃度を設定した。さらに、グルコース濃度については第1章の乳酸濃度を一定に制御した場合と同様に流加区間を区切って、測定値に基づきグルコース濃度が一定となるように算出した流加速度を用いた。さらに、流加培養中グルタミン濃度については(2-3)式を満たしていればグルタミン一定に保つことができる。

2. 4 解析方法

静置培養、流加培養中の比増殖速度、比死滅速度、グルコース比消費速度、乳酸比生産速度、抗体比生産速度は第1章の方法を用いて算出した。さらに、グルタミン比消費速度およびアンモニア比生産速度は以下の様にして算出した。

流加培養中のグルタミンの物質収支式はグルタミンの分解とサンプリングによる引き抜きを考えれば、

$$\frac{dVG_{ln}}{dt} = FG_{lnf} - \nu_{G_{ln}}X_v - k_GVG_{ln} - FoG_{ln} \quad (2-4)$$

ここで、 k_G はグルタミンの自然分解速度定数である。グルタミンは通常の培養温度下で等モルのアンモニアとpyroglutamateに分解する。従って、アンモニアの収支式は以下の様になる。

$$\frac{dVA_m}{dt} = \rho_{Am}X_v + k_GVG_{ln} - FoA_m \quad (2-5)$$

ここで、 k_G の値として通常培地を用いた5% CO₂, 37°Cインキュベーターでの静置実験の結果より得られた0.00128 (1/h)の値を用いた。この結果は他の報告者の結果^{61, 62, 63)}と

も良く一致した。さらに、この(2-4)、(2-5)式を積分することによって第1章と同様にしてグルタミン比消費速度、アンモニア比生産速度を求めた。

さらに、酸素比消費速度についてはコンピューターに取り込んだデータを用いて以下のようにして計算した。流加培養中の溶存酸素の物質収支式は、

$$\frac{dVC}{dt} = V k_{La}(C^* - C) - V Q_{O_2} X_v + F C_f \quad (2-6)$$

となる。

ここで、 k_{La} は酸素移動容量係数、 C^* は培地中の溶存酸素濃度の飽和値、 C_f は流加培地中の溶存酸素濃度である。さて、流加培地中の溶存酸素濃度が飽和濃度に等しいと仮定すると、(2-6)式は、

$$\frac{dC}{dt} = \left(k_{La} + \frac{F}{V} \right) (C^* - C) - Q_{O_2} X_v \quad (2-7)$$

酸素消費速度 $Q_{O_2} X_v$ を一定と仮定すれば、(2-7)式を積分することによってこの速度は算出でき、また、 k_{La} はダイナミック法を用いて培養開始前にあらかじめ算出しておけば⁶⁴⁾、酸素比消費速度 Q_{O_2} は流加培養中の生細胞濃度の測定値 X_v で酸素消費速度 $Q_{O_2} X_v$ を割る事によって算出できる。

第3節 結果および考察

3. 1 アミノ酸濃度の細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響

アミノ酸濃度の影響を検討するに先立って、通常培地を用いディッシュ静置培養にて、アミノ酸濃度の経時変化を測定した。その結果をFig. 2-1に示す。

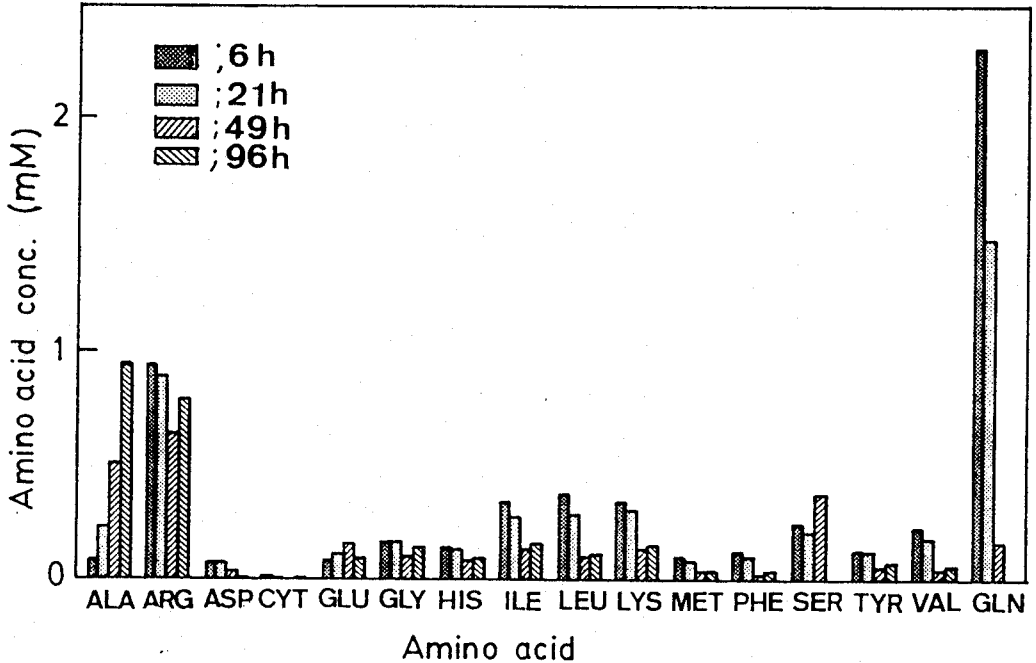


Fig. 2-1 Amino acids profiles in the RDF medium during batch culture.

Fig. 2-1に示される様に、これらアミノ酸の消費は3タイプに分類できた。すなわち、培養中にその濃度が減少するもの(Gln, Asp, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Val)、濃度がほぼ一定のもの(Arg, His, Gly, Ser, Tyr, Cyt)、そして、その濃度が上昇するもの(Ala, Glu)である。アラニンの培養中における増加は他の研究者らによっても報告されている^{66, 67, 68})。また、Newlandらは動物細胞においては、アラニンはグルタミンからグルタミン酸をへてalanine aminotransferaseによって生成されると報告している⁶⁹)。本細胞株においてもアラニンの生産はグルタミンの消費と関連していることから我々の細胞株においても同様のalanine aminotransferaseによる反応がおこっていると考えられた。

また、もっともよく消費されるアミノ酸はグルタミンであった。この結果よりグルタミン及びグルコースについて細胞増殖、抗体生産に及ぼすこれらの濃度の影響をディッシュ静置培養を用いて検討した。グルコースおよびグルタミン濃度を変えて測定した比増殖速度、および抗体比生産速度の値を通常培地(グルタミン濃度2.28 mM、グルコース濃度14.3 mM)におけるそれぞれの値の比として示したのがFig. 2-2である。

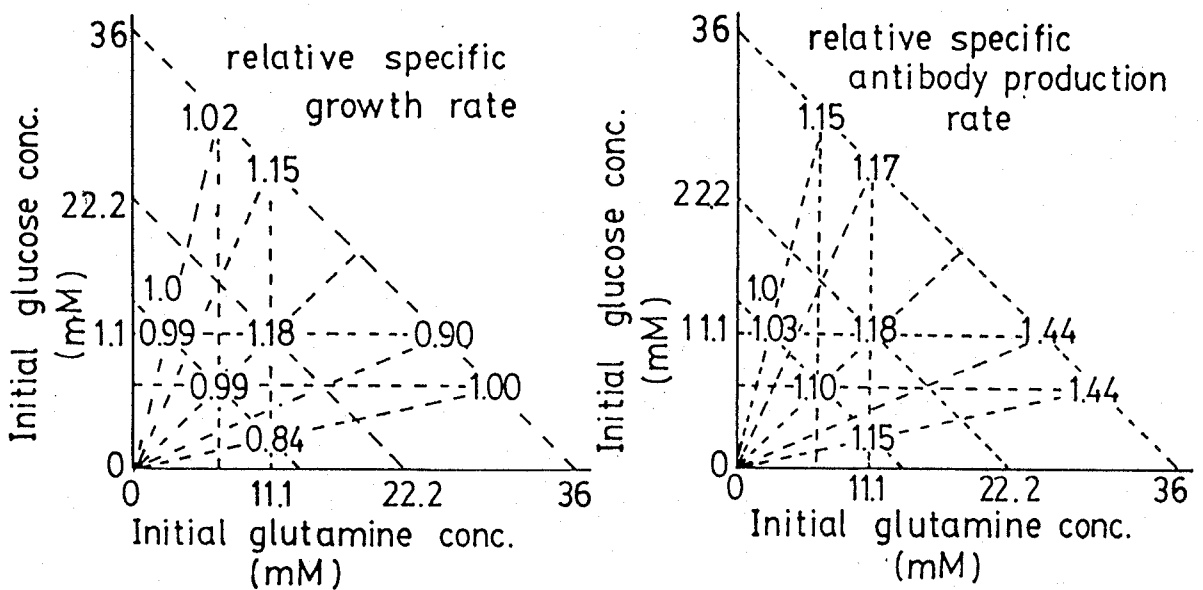


Fig. 2-2 Effect of glucose and glutamine concentration on the initial specific growth and antibody production rate.

ここで、第1章の結果から、浸透圧が10 atm以上であればこの圧力が細胞増殖、抗体生産に影響を及ぼすことがわかっているので、グルタミンおよびグルコース濃度の増加させたことによって上昇する浸透圧が上記の圧力以下であるグルタミン、グルコースの合計モル数が36 mM以下の範囲内で検討した。Fig. 2-2に示される様に、グルタミン、グルコース濃度が上昇してもほとんど比増殖速度には影響を及ぼさなかったが、抗体比生産速度はグルタミン濃度が上昇すると上昇した。

さらに、この様な成分強化の影響が他のアミノ酸にもみられるかどうかを検討するために、培養中に消費されるアミノ酸についてもその強化の影響を検討した。培養中に消費されたアミノ酸(Asp, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Val)およびThrについてその濃度を3倍および10倍に強化して初期代謝速度に及ぼす影響を検討した。その結果、これらのアミノ酸強化は最終の抗体濃度を増加させたものの、抗体比生産速度は上昇させなかった。同様の結果が他の研究者によっても報告されているが^{35, 36, 60}、最終抗体濃度の上昇は抗体比生産速度の上昇によるものではなく細胞増殖期の延長によるものであった。さらに、有効グルタミンあたりのアンモニア生成量が少ないと考えられるn-acetyl glutamine⁷⁰を添加してその濃度強化の影響を検討した。その結果、抗体比生産速度は増強されたものの細胞増殖がそれ以上に強く阻害された。従って、本研究ではグルタミンの抗体生産に及ぼす影響について定量的に検討した。

3. 2 グルタミン添加の細胞増殖および抗体生産に及ぼす影響

動物細胞培養におけるグルタミンの主な役割はTCAサイクルを通して代謝されることによって、エネルギー源として利用されることである^{71, 72}。また、酸素消費速度はTCAサイクルの活性を表す重要な指標である。静置培養においては培養中の酸素消費速度は測定不可能であるため、スピナー回分培養を用いてグルタミン濃度増加の抗体生産、酸素消費に及ぼす影響について検討した。

はじめに、初発グルタミン濃度を20 mMに増加させた培地を用いて初発細胞濃度 1×10^5 個/mLにて培養を開始したが、細胞の増殖はみられなかった。そこで、通常のグルタミン濃度2.28 mMの培地を用いて回分培養を行い、細胞濃度が 5×10^5 個/mLに達した時点で槽内に高濃度グルタミンをスピナー内濃度約20 mMになる様に添加し、その添加前後における各パラメーターの変化を検討した。その培養経過をFig. 2-3に、添加前後の各パラメーターの値を Table 2-1に示す。

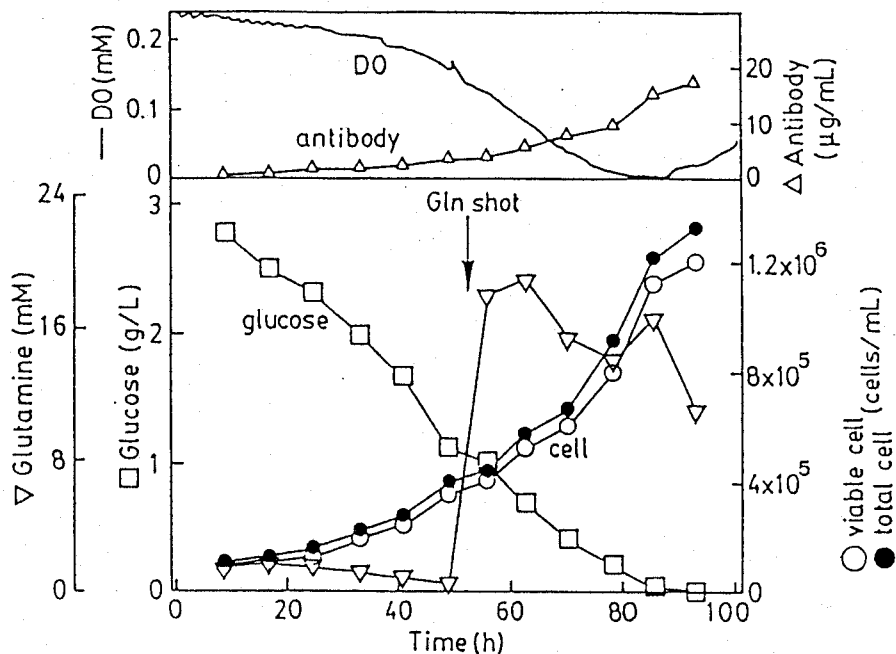


Fig. 2-3 Time course of spinner batch culture with glutamine shot.

Table 2-1 Effects of glutamine addition on kinetic parameters

	Before Gln shot (0~45h)	After Gln shot (46~96h)	Ratio (after /before) ¹⁾
specific growth rate (1/h)	0.0397	0.0368	0.93
specific antibody production rate (pg/cell·h)	0.379	0.553	1.46
specific oxygen consumption rate (mmol/cell·h)	2.90 $\times 10^{-10}$	4.70 $\times 10^{-10}$	1.62
specific ammonium production rate (mmol/cell·h)	1.36 $\times 10^{-10}$	1.90 $\times 10^{-10}$	1.40

1) Gln conc. ; before shot 1mM → after shot 20mM

この表に示される様に、抗体比生産速度はグルタミン添加によって46%増加した。さらに、酸素比消費速度、アンモニア比生産速度もグルタミン添加によって増加した。しかし、

培養後期になると槽内のグルコースが枯渇し、また、アンモニア濃度も細胞増殖に阻害を及ぼす様な濃度にまで増加したため、長期間の培養は困難であった。さらに、グルタミン濃度も添加後急激に低下し、その濃度の影響を定量的に把握するのは困難であった。

そこで、グルタミン濃度の定量的な影響についてはグルタミン、グルコースの2基質の濃度を一定に保つ流加培養法を構築し、これを用いて検討した。

3. 3 グルコース、グルタミン濃度一定の流加培養

グルタミン、グルコース2基質の濃度を一定に保つ流加培養の経時変化をFig. 2-4に示す。流加培養は初発液量400 mLで開始し、細胞濃度が 5×10^5 個/mLに達した時点で目的のグルタミン濃度になる様にグルタミンを添加した。その後、2基質の濃度を一定に保つ流加培養方法に従ってグルコース濃度を指標にしてグルタミン濃度を一定に保った。この実験ではグルコース濃度0.9 g/L、グルタミン濃度26.4 mMに一定に保っている。グルタミン添加前までの回分時（グルタミン濃度2.28 mM）と流加培養時（グルタミン濃度26.4 mM）における比速度を比較すると、比増殖速度はやや低下したが、抗体比生産速度は約40%増加し、アンモニア比生産速度および酸素比消費速度も増加した。

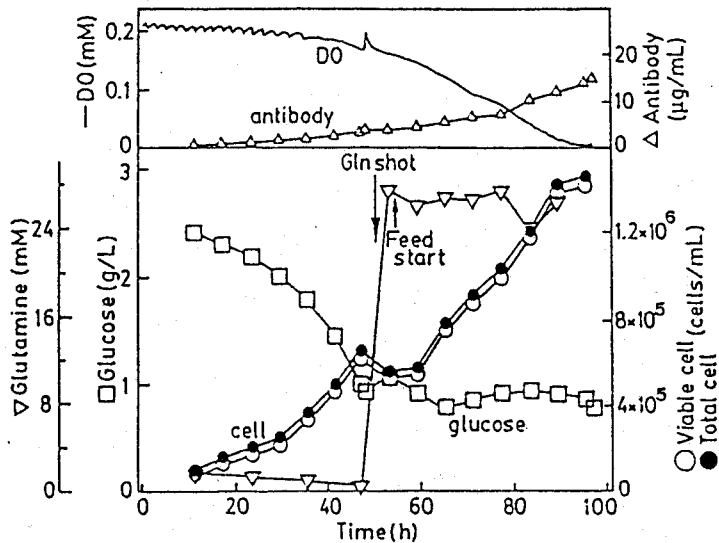


Fig. 2-4 Time course of spinner batch culture with glucose concentration controlled at 0.9 g/L and glutamine at 26mM

3. 4 グルタミン濃度の各比速度に及ぼす影響

グルコース濃度を0.9 g/L、に保ち、グルタミン濃度を0.4~33.3 mMの間で一定に維持した流加培養を行い、グルタミンの比増殖速度 μ および抗体比生産速度 ρ_{Ab} に及ぼす影響について定量的に検討した。比増殖速度および抗体比生産速度をグルタミンの添加前の回分時（グルタミン濃度2.28 mM）のそれぞれの値に対する相対値で示したのがFig. 2-5である。この図に示される様に、グルタミン濃度の上昇に伴って比増殖速度は低下した。一方、抗体比生産速度はグルタミン濃度が上昇するにつれて上昇し、30 mM以上のグルタミン濃度において再度低下した。従って、抗体比生産速度はグルタミン濃度25 mM付近で最大値を示した。

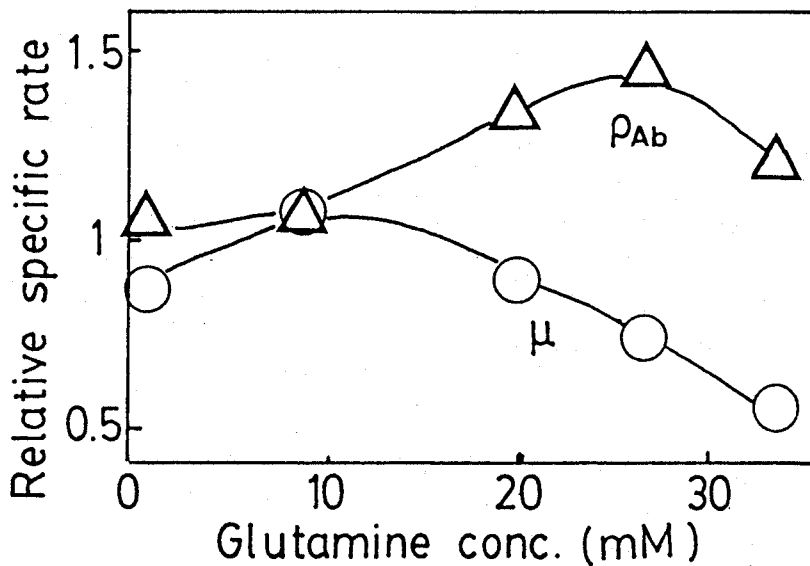


Fig. 2-5 Effects of glutamine concentration on relative specific rates of growth and antibody production.

○; relative specific growth rate

△; relative specific antibody production rate

さらに、グルタミン濃度に対するグルタミン比消費速度およびアンモニア比生産速度の関係を示したのがFig. 2-6、酸素比消費速度との関係を示したのがFig. 2-7である。これらの図に示される様に、グルタミン濃度が上昇するに従ってグルタミン比消費速度、アンモニア比生産速度は同調して上昇した。この様なグルタミン比消費速度の増加はGlackenら⁷³⁾によっても報告されており、グルタミン自身がグルタミンの消費を促進していると考えられた。一方、酸素比消費速度は20 mM付近のグルタミン濃度で最大値を示した。しかし、グルコース比消費速度はグルタミン濃度の影響を受けなかった。

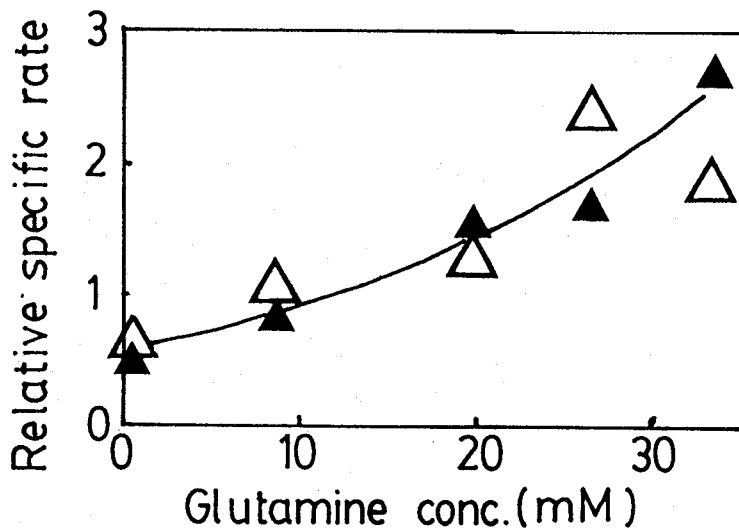


Fig. 2-6 Effects of glutamine concentration on relative specific rates of glutamine consumption and ammonia production.
 ∇ ; relative ν_{Gln} \square ; relative ρ_{Am}

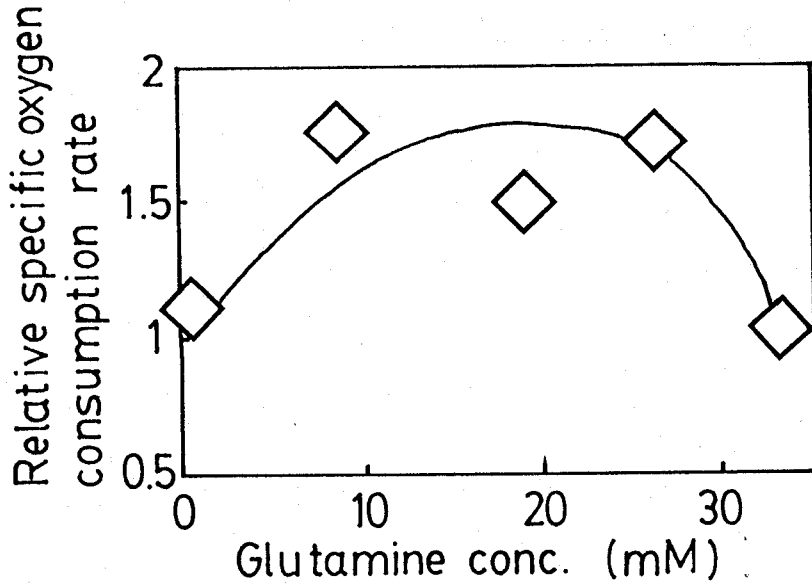


Fig. 2-7 Effects of glutamine concentration on relative specific oxygen consumption rate.

一方、フローサイトメーターをもちいて細胞のサイズ分布を計測したのがFig. 2-8である。この図は、グルタミン濃度2.28 mMとグルタミン濃度33.3 mMにおける前方散乱光 (FSC; Forward Scattering Channel)の分布を示している。ここで、前方散乱光は細胞の大きさと対応しているが、この図に示されるように細胞のサイズ分布はグルタミン濃度が上昇すると右へシフトし、細胞の大きさが大きくなっていることが示された。

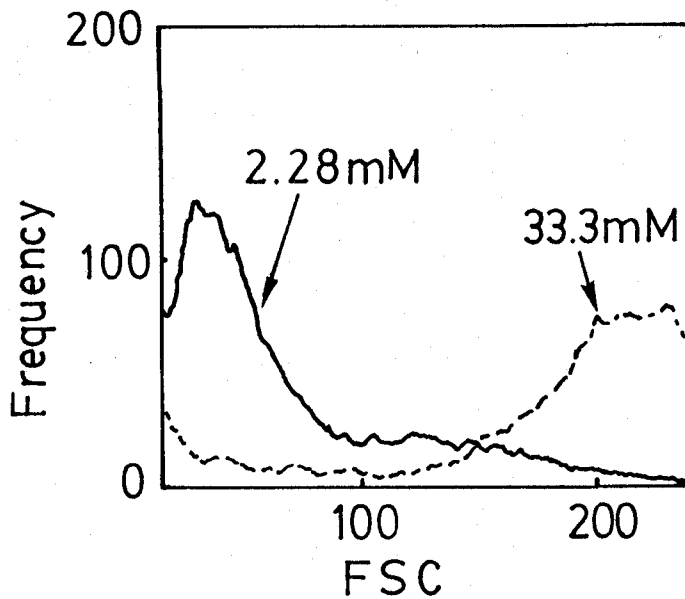


Fig. 2-8 The cell size distribution at normal (2.28 mM) and high (33.3 mM) glutamine medium during fed-batch operation.

この様に、高グルタミン濃度を維持する事は、酸素消費、細胞の大きさ等と密接に関連があり、結果として抗体生産を促進していると考えられる。さて、実際の培養法の観点からみると、高グルタミン濃度を維持し、同時にアンモニアによる阻害効果を軽減するためには、灌流培養、ホロファイバーなどの様な低分子の代謝産物を除去するかもしくは適当な方法で無害化する様な培養法が有効であると考えられる。

第4節 要約

培養中において消費がみられたアミノ酸(Asp, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Val, Thr, Gln)およびグルコースの濃度を増加させ、細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響について静置培養を用いて検討した。その結果、グルタミン濃度を増加した場合のみ抗体比生産速度の上昇がみられた。この現象を定量的に検討するため、グルコース濃度を指標としてグルコース、グルタミンの2基質の濃度を一定に保つ流加培養法を考案し、この方法を用いてグルタミン濃度の影響を実験的に検討した。グルコース濃度0.9 g/L、グルタミン濃度0.4~33.3 mMの範囲で検討した結果、比増殖速度はグルタミン濃度の増加にともなってやや低下したが、抗体比生産速度は上昇し、グルタミン濃度25 mM付近で最大値を示した。また、酸素比消費速度も抗体比生産速度同様に最大値を示した。さらに、細胞の大きさをフローサイトメーターを用いて調べた結果、高グルタミン濃度下(33.3 mM)において細胞の大きさが通常培地に比較して大きくなっている事がわかった。

第3章 成長因子のモノクローナル抗体生産に及ぼす影響

第1節 緒言

近年、Satoは血清の主な役割を成長因子の供給にあるとし、血清の代りに幾つかの細胞成長因子を用いて無血清培養を試みた^{11, 12)}。これらの考え方に基づき、村上らはハイブリドーマの培養に必要な細胞成長因子としてエタノールアミンをみいだし、ハイブリドーマの無血清培養に有効なRDF-ITES培地を考案した^{13, 14)}。現在のハイブリドーマの無血清培養はこれらの成長因子ITES(Insulin, Transferrin, Ethanolamine, Selenium)を用いて培養がおこなわれている。これら細胞成長因子の主なものは高分子の蛋白質であり、無血清培地を用いて培養を行う場合のコストの大部分を占めている。これらの成長因子は培地中のコストの大部分を占め (Table3-1)、これら成長因子の細胞増殖、抗体生産に及ぼす定量的な影響の検討は重要になっている。そこで、3章では、灌流培養によってこれらの成長因子の抗体生産に及ぼす影響を検討した。

Table 3-1 High molecular weight components in RDF-ITES medium

	M. W.	Medium Cost(%)
Transferrin	75,000	40%
Bovine serum albumin (BSA)	69,000	30%
Insulin	5,500	15%
Vitamine B ₁₂	1,400	--

Product: anti-RNaseA monoclonal antibody M. W. =150,000

第2節 実験材料および方法

2. 1 使用細胞株および使用培地

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとしてRNase Aモノクローナル抗体(IgG)を産生するマウスマウスハイブリドーマ3A21株を用いた。培地としてはRDF培地よりグルコースおよびグルタミンを除いた組成のRDF(HO)培地(極東製薬 RDF(HO))に、第1章で述べたと同様に成長因子として ITESを、タンパク成分として牛血清アルブミン(BSA)を、pH緩衝剤としてHEPESを添加したものをを用いた。この培地に適宜グルコース(和光純薬工業 041-00595) およびL-グルタミン(和光純薬工業 074-00522)を添加した。また、通常用いているBSA(Sigma A-4503)には脂肪酸が混入しているため、BSAのリノール酸運搬効を検討する実験においては、脂肪酸を取り除いたBSA(Fatty acid free BSA;Sigma A-6003)に適宜リノール酸(Sigma L-1376)を添加した。

2. 2 分析方法

生細胞および全細胞濃度は第1章と同様にしてトリパッフルを用いた色素排除法にて測定した。また、グルコース、乳酸、アンモニア、抗体濃度も第1章と同じ方法を用いて測定した。さらに、インシュリン濃度については、ELISA法を用いたインシュリン測定用キット(東洋紡績株式会社 Immunoball IRA-500)を用いて測定した。

2. 3 培養方法

静置培養は、第1章の方法に従って、5% CO₂, 37°Cインキュベーターを用いて行った。さらに、分離膜を用いて成長因子をとじ込める灌流培養については、第1章で用いたスピナーフラスコにFig. 3-1に示す様な細胞沈降管、分離用ホロファイバーを接続した装置を用いて行った。

灌流培養を行うにおいて、スピナーフラスコに直接分離用ホロファイバーを接続した場合は、細胞による分離膜の目づまりによって、長時間の培養が不可能になる。従って、ここでは、スピナーフラスコ本体に細胞と培地を分離する円錐型の細胞沈降管を設け、この

沈降管によって一旦細胞を分離し、その後、分離膜を通して培養液を系外に抜出すシステムを構築した。ここで、分離用ホロファイバー膜（50%分画分子量5,000 Nipro FB-90T）への循環速度は100 mL/hとした。この分離用ホロファイバーによって系外に低分子の代謝産物（乳酸、アンモニア等）を拔出し、その他の高分子成分は槽内にふたたび戻される。また、分離膜から拔出された培地はウエイトセンサーを用いてその重さを測定した。

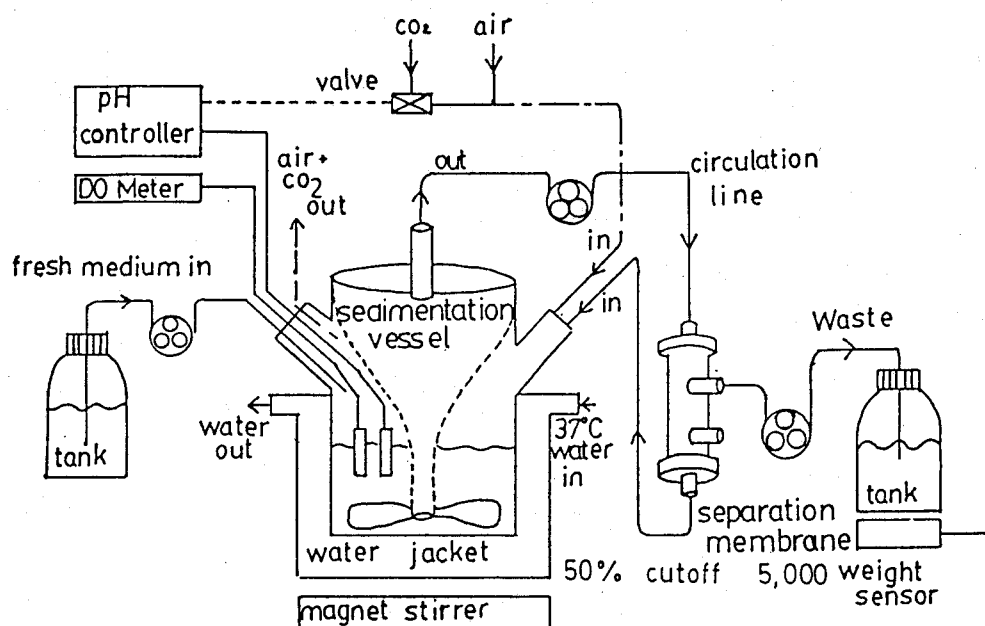


Fig. 3-1 The perfusion culture system with cell sedimentation unit and a separation unit composed of a hollow-fiber module

2. 4 解析方法

静置培養中の比増殖速度 μ 、比死滅速度 K_d 、グルコース比消費速度 ρ_g 、乳酸比生産速度 ρ_L 、抗体比生産速度 ρ_{Ab} は第1章の方法を用いて算出した。

さらに、灌流培養については沈降管内では細胞はほぼ完全に沈降し、その上部では細胞は存在しないとし、かつ沈降管内にある全細胞数はスピナーフラスコと同じ体積の細胞数に等しいと仮定した。

各比速度算出のための概念図をFig. 3-2に示す。

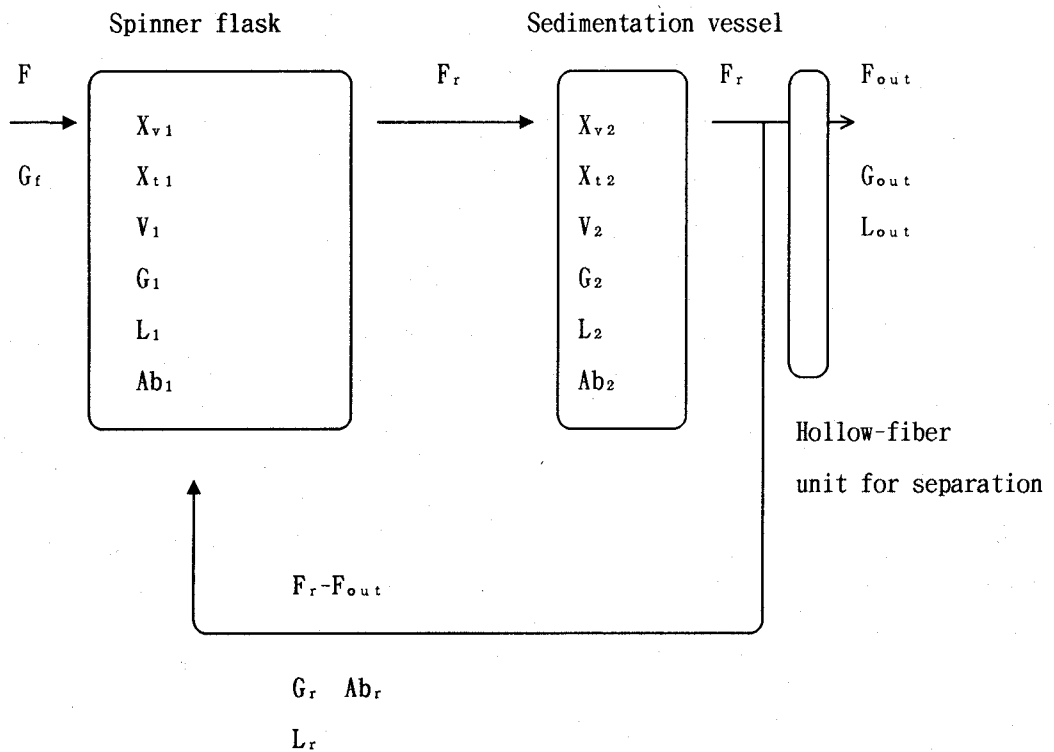


Fig. 3-2 The concept for data analysis in perfusion culture

スピナーフラスコおよび沈降管内をあわせた細胞についての物質収支式は、

全細胞数について

$$\frac{d(V_1X_t+V_2X_t)}{dt} = \mu(V_1X_v+V_2X_v) \quad (3-1)$$

生細胞について

$$\frac{d(V_1X_v+V_2X_v)}{dt} = (\mu-Kd)(V_1X_v+V_2X_v) \quad (3-2)$$

(3-1)、(3-2)式において先に示した仮定に基づき、 $X_t=X_{t1}=X_{t2}$ 、 $X_v=X_{v1}=X_{v2}$ とし、1章で示した方法に基づいて積分することによって比増殖速度、比死滅速度が算出できる。

さらに、スピナーフラスコ液中でのグルコース、乳酸、抗体についての物質収支は、

$$\frac{d(V_1G_1)}{dt} = FG_f - F_rG_1 + (F_r - F_{out})G_r - \nu_G(V_1X_{v1}) \quad (3-3)$$

$$\frac{d(V_1L_1)}{dt} = -F_rL_1 + (F_r - F_{out})L_r - \rho_L(V_1X_{v1}) \quad (3-4)$$

$$\frac{d(V_1Ab_1)}{dt} = -F_rAb_1 + (F_r - F_{out})Ab_r - \rho_{Ab}(V_1X_{v1}) \quad (3-5)$$

低分子分離用ホロファイバーの分画分子量(50% cutoff)は5,000と、グルコース及び乳酸の分子量に比較して大きいので、 $G_r=G_{out}$ 、 $L_r=L_{out}$ が成立する。従って、上記の(3-3)、(3-4)式を変形すれば、

$$\frac{V_1G_1 - \int \{FG_f - F_rG_1 + (F_r - F_{out})G_{out}\} dt}{dt} = - \nu_G \int (V_1X_{v1}) dt + (V_1G_1)_0 \quad (3-6)$$

$$\frac{V_1L_1 - \int \{-F_rL_1 + (F_r - F_{out})L_{out}\} dt}{dt} = \rho_L \int (V_1X_{v1}) dt + (V_1L_1)_0 \quad (3-7)$$

この(3-6)、(3-7)式の下線部をプロットする事により、グルコース比消費速度、乳酸比生産速度を求めた。

また、抗体については循環液中には細胞は存在しないと仮定しており、さらに抗体の分子量は約150,000であり分離用ホロファイバーを通過できないので、 $(F_r - F_{out})Ab_r = F_r Ab_i$ が成立し、(3-5)式は以下の様に変形できる。

$$\underline{V_i Ab_i} = \rho_{Ab} \int (V_i X_{V_i}) dt + \underline{(V_i Ab_i)_0} \quad (3-8)$$

この式の下線部をプロットすることによって、抗体比生産速度を算出した。

第3節 結果および考察

3. 1 インシュリンおよびトランスフェリンの影響

まず、細胞成長因子としてのインシュリンおよびトランスフェリンの細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響について検討した。インシュリンは分子量5,500のペプチドホルモンであり、生体内作用としては血糖値を低下させる働きがある^{74, 75)}。生体内においては、細胞のインシュリンレセプターに結合することによって糖、アミノ酸等の取込促進、蛋白質合成促進などの様々な作用を引き起こす。その細胞増殖作用は様々な細胞株において確認されているが、作用機構はまだ十分には解明されていない。一方、トランスフェリンは鉄を体内に運搬する役割を担っている分子量75,000の蛋白質であり、ほとんどの動物細胞の増殖、成長、分化に必須の因子である^{76, 77)}。これらの因子はハイブリドーマの培養においても必須の因子であり、培地コストの大部分を占めている。しかし、その培養工学的な挙動についての報告は少ない¹⁹⁾。ここでは、これらの因子について細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響を検討した。

インシュリン、トランスフェリン、B S Aのいずれも含まない培地を用いて静置培養をおこない、その細胞増殖に対する影響を検討した。その結果、細胞は増殖するが、死滅速度も大きく、生細胞濃度は上昇しなかった。この結果、インシュリン、トランスフェリン、B S Aのいずれかもしくは複数が細胞増殖に必須であることが示された。そこで、成長因子としてまずインシュリンのみを10 mg/L含む培地にて培養を開始し、その後、培養中にトランスフェリンを添加し、その影響を検討することにした。Fig. 3-3に培養経過を、Table 3-2にトランスフェリン添加前後の各比速度の値を示す。

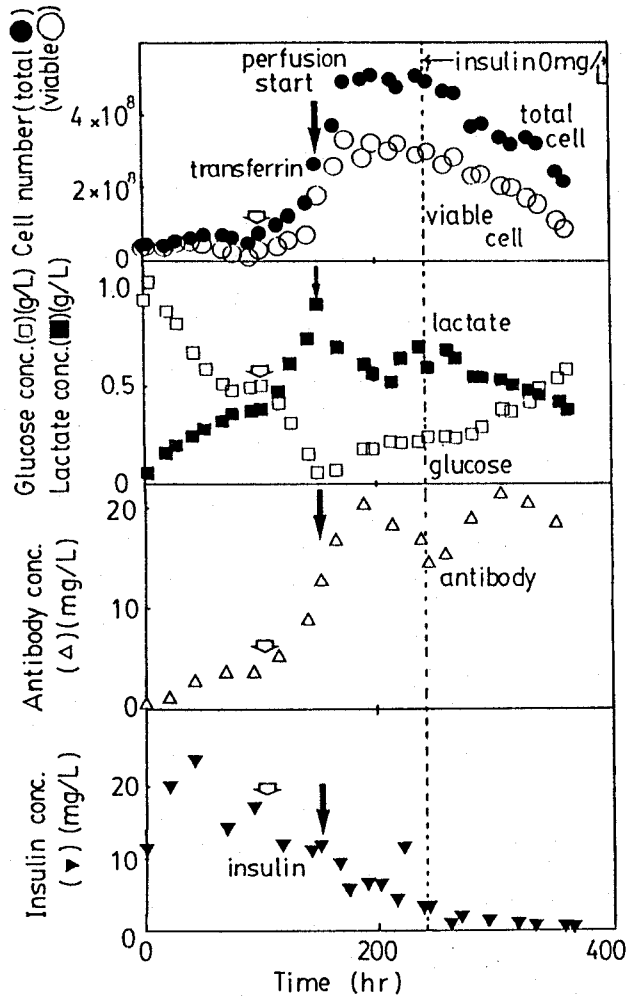


Fig. 3-3 The effects of transferrin and insulin on cell growth and antibody production

Table 3-2 The effect of transferrin shot on kinetic parameters

	Before shot	After shot	Ratio (after/before)
Specific growth rate(1/h)	0.0192	0.0482	2.5
Specific glucose consumption rate(g/cell·h)	1.52×10^{-10}	1.37×10^{-10}	0.9
Specific lactate production rate(g/cell·h)	0.81×10^{-10}	1.11×10^{-10}	1.4
Specific antibody production rate(g/cell·h)	1.35×10^{-12}	1.35×10^{-10}	1.0

これらの図、表に示される様に、トランスフェリンを培養中に添加すると細胞増殖は著しく促進され、比増殖速度は急激に上昇した。しかし、グルコース比消費速度、乳酸比生産速度、抗体比生産速度はほとんど変化せず、これらの比速度に対するトランスフェリンの影響は見られなかった。さらにトランスフェリンを連続添加せず、成長因子としてインシュリンのみを10 mg/L含む培地を用いて灌流培養をおこなった。その結果約150 hにわたって生細胞濃度が維持できた。この結果、トランスフェリンは分離膜によって系内に維持され、活性を保っていると考えられた。さらに、灌流操作中に流入培地中のインシュリン濃度を0 mg/Lに減少させることによって、インシュリンの細胞に対する影響を検討した。

その結果、入口インシュリン濃度を0 mg/Lとした後、約80 h後には槽内濃度は2 mg/L以下になり、それに伴って生細胞濃度は減少した。従って、この灌流培養システムではインシュリンを系内に保持できないことが示された。

この結果、インシュリン、トランスフェリンともに細胞増殖に必須であることがわかった。

3. 2 BSAの影響

1. 静置培養における影響

BSAの細胞増殖促進作用は、アルブミン自身の作用とアルブミンに含まれる不純物の作用とに分けて考えられている⁷⁸⁾。このアルブミンの作用については細胞に対する脂肪酸供給の担体としての作用が報告されているが、通常この作用と、混入している物質の作用と合せて一般に細胞増殖促進作用とされている⁷⁹⁾。そこで、本研究では、静置培養において初発BSA濃度を0, 5, 10, 20 g/Lに変化させ、その初期代謝速度に及ぼす影響について検討した。その結果をFig. 3-4に示す。この図に示されるように、BSA濃度が変化しても細胞の増殖、抗体生産には影響を及ぼさなかった。

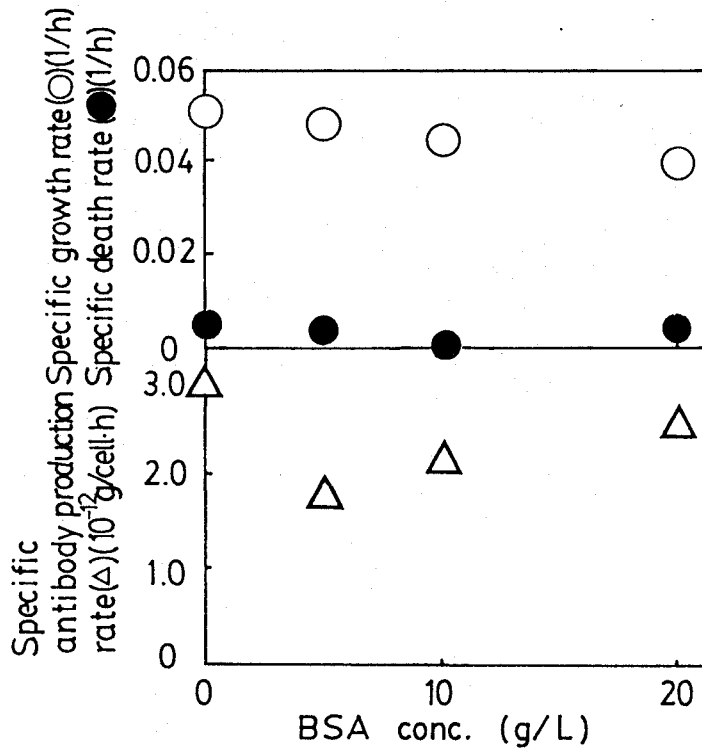


Fig. 3-4 The relationship between initial BSA concentration and kinetic parameters in static dish culture

2. 灌流培養における影響

分離用のホロファイバーを用いて系内にBSAを保持して培養ができる灌流培養により、細胞増殖、抗体生産に及ぼすBSAの影響について検討した。分離用のホロファイバーを用いた灌流培養において灌流中に流入培地中のBSA濃度を0, 2, 5 g/Lに変化させ、その細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響について検討した。その培養経過をFig. 3-5に、各比速度の値をTable 3-3に示す。

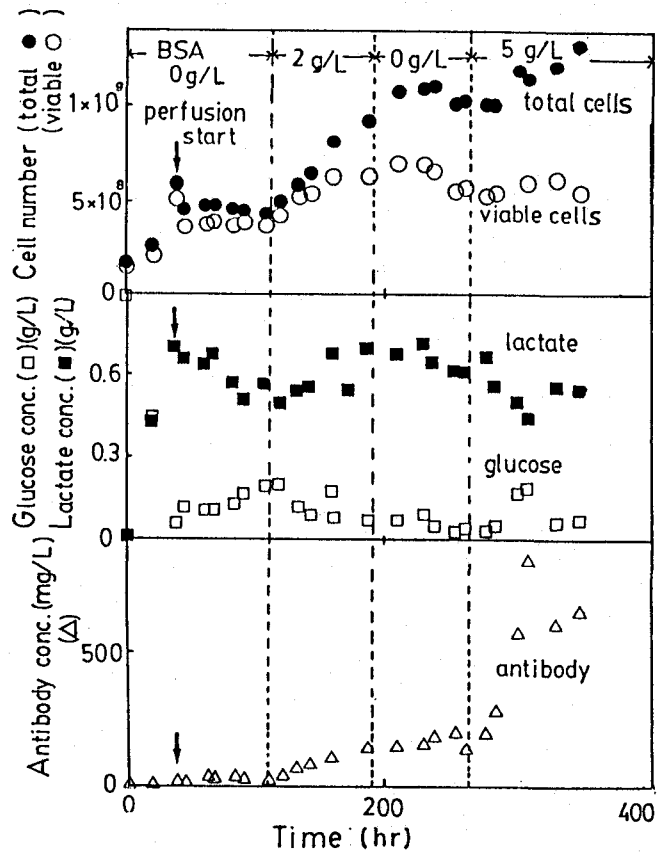


Fig. 3-5 The effect of BSA feeding on the cell growth and antibody production in perfusion culture

Table 3-3 The kinetic parameters in perfusion culture

BSA concentration in feed medium (g/L)	0	2	0	5
Specific growth rate (1/h)	0	0.012	0	0.007
Specific death rate (1/h)	0	0.011	0	0.007
Specific glucose consumption rate (g/cell·h)	0.359 $\times 10^{-10}$	0.359 $\times 10^{-10}$	0.359 $\times 10^{-10}$	0.221 $\times 10^{-10}$
Specific lactate production rate (g/cell·h)	0.222 $\times 10^{-10}$	0.222 $\times 10^{-10}$	0.222 $\times 10^{-10}$	0.105 $\times 10^{-10}$
Specific antibody production rate (g/cell·h)	0.867 $\times 10^{-12}$	1.89 $\times 10^{-12}$	0.737 $\times 10^{-12}$	21.6 $\times 10^{-12}$

成長因子としてBSAのみを含まない培地を用いて回分培養を開始し、グルコースを消費し尽くした時点で灌流操作をおこなった。その結果、細胞濃度は灌流を開始した後は、一定値に保持された。その後、流入培地中のBSA濃度を2 g/Lに上昇させた結果、BSAは分離用ホロファイバーを通過できないために、BSAを含む培地を流入している間は系内のBSA濃度は上昇し続けた。流入培地中のBSA濃度を2 g/Lに上昇させた結果、生細胞、全細胞濃度は上昇した。しかし、さらにBSAを含まない流入培地に切り換えた場合、細胞増殖は停止した。ここで、流入中のBSA濃度を5g/Lとした結果、全細胞濃度および抗体濃度は流入培地中のBSA濃度にもなって増加した。Table 3-3の各比速度の値に示される様に、灌流操作中、BSAを添加している場合に比増殖速度の上昇が見られた。さらに、抗体比生産速度はBSAの添加にもなって上昇した。しかし、BSAの連続添加を中止すると、抗体比生産速度の上昇は停止し、BSAの連続添加が抗体生産上昇に必要であることが示された。

3. BSAの影響解析

動物細胞培養におけるBSAの役割は主として脂肪酸の供給にあると報告されている^{79, 80, 81}。ここで用いたRDF-ITES培地中にも脂肪酸としてリノール酸が含まれている。この脂肪酸は通常容易に酸化され、細胞に利用できなくなるが、BSAはその酸化を防ぎ、細胞にリノール酸を供給する役割を担っている。上記においても新鮮なBSAの供給が抗体生産を増強していた。そこで、BSAの抗体生産増強効果の原因は培養中の新鮮なリノール酸の供給とBSA蓄積にあるのではないかと考え、リノール酸とBSAの抗体生産に及ぼす影響について静置培養を用いて検討した。まず、培地に添加するリノール酸濃度を通常の0.02 mg/Lから200 mg/Lの範囲内で様々に変化させ、その比増殖速度、抗体比生産速度に対する影響を検討した。その結果、濃度の非常に高い100 mg/L以上の濃度になると細胞増殖を阻害し、抗体比生産速度については若干上昇させた。しかし、通常の濃度範囲(≤ 50 mg/L)では、細胞増殖、抗体生産に影響を及ぼさなかった。そこで、リノール酸単独ではなく、脂肪酸を含まないBSAとともに添加し、その抗体生産に及ぼす影響を検討した。その結果をFig. 3-6に示す。

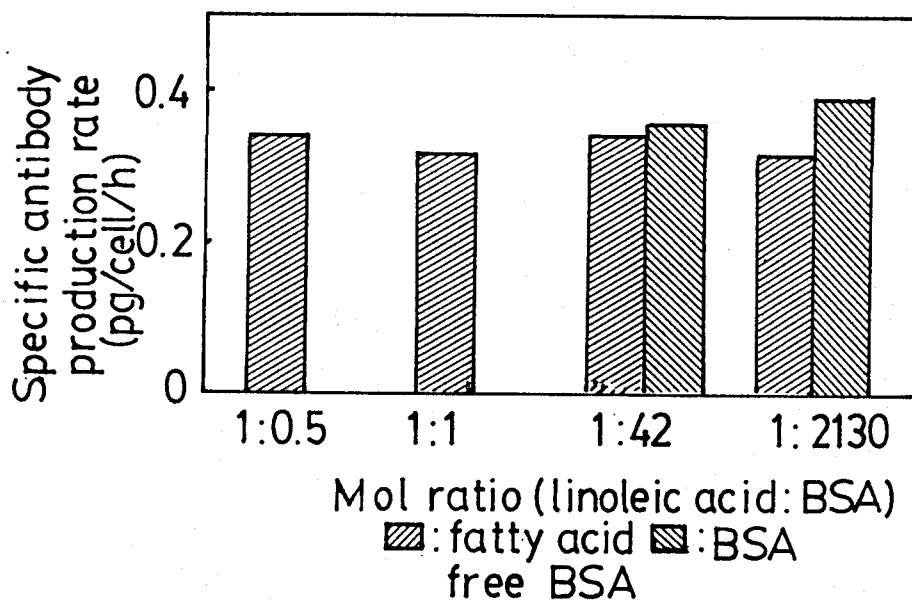


Fig. 3-6 The effects of linoleic acid and BSA on antibody production

mol ratio (linoleic acid:BSA)	linoleic acid conc. (mg/L)	BSA conc. (g/L)
1 : 0.5	1.02	0.12
1 : 1	1.02	0.24
1 : 42	1.02	10
1 : 2130	0.02	10

この図から、BSAによる抗体生産増強効果の原因はBSAを増強することによるリノール酸の供給ではないことがわかった。

第4節 要約

ハイブリドーマの無血清培養における重要な因子である成長因子の影響について検討した。その結果、トランスフェリンおよびインシュリンは細胞の増殖に顕著に影響することが示された。しかし、両因子とも抗体生産に関してはまったく影響を及ぼさなかった。また、分離膜を用いた灌流培養において、トランスフェリンは槽内に保たれると同時にその活性も維持され、その連続供給の必要性は認められなかったが、インシュリンは分子量が小さいため、系外に排出されると同時に分解もおこることから連続供給することが必要であった。

また、B S Aの細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響を静置培養、灌流培養を用いて検討した。その結果、静置培養においてはB S Aを上昇させても抗体生産、細胞増殖に影響を及ぼさなかったが、分離用ホロファイバーを用いて系内にB S Aをとじ込めた灌流培養の場合のみ、B S A 2 g/Lの培地を連続添加した場合、理由の詳細は不明ではあるが、B S Aを添加しない場合に比較して約5倍、5 g/Lの添加の場合には約22倍の著しい抗体生産増強が示された。

第4章 抗体生産に及ぼす細胞周期と収率の影響

第1節 緒言

動物細胞培養において、最大の問題点の一つは、細胞の増殖が通常微生物に比較して遅い（倍加時間が数十時間程度）という点である^{8,2)}。そのため、細胞培養による物質生産を、増殖期と定常期とに分けて行う、すなわち、増殖期において一度増殖させた細胞を定常期において保持し、細胞の維持、物質生産に必要な栄養源、成長因子を連続的に供給する培養法が考案され、実行されている^{17, 18, 19)}。このような定常期（生産期）においては、細胞の細胞周期の回転は遅くなり、細胞周期分布にも変化を生じてくると考えられている^{8,2)}。しかし、このような増殖期と定常期の細胞状態、収率、物質生産能の違いについて検討した報告はほとんどない。そこで、ここではグルコースを律速とした連続培養を用いて増殖期（回分時）と定常期（連続時）における細胞状態、収率の変化および抗体生産に及ぼす細胞周期分布の影響について検討した。

第2節 実験材料および方法

2. 1 使用細胞株、培地および分析方法

細胞株として1章で述べたマウスマウスハイブリドーマ3A21株を用いた。さらに、培地として、3章で述べたRDF-ITES培地を用いた。また、チジソを用いてG1期の細胞を増加させるため培養時にチジソ(Sigma T-1895)を培地に3 mM添加した。

生細胞および全細胞濃度は第1章と同様にしてトリパングルを用いた色素排除法にて測定した。また、グルコース、乳酸、アンモニア、抗体濃度も第1章と同じ方法を用いて測定した。さらに細胞サイズ分布はセルソーター(Beckton-Dickinson FACStar)、細胞周期分布はフローサイトメーター(Beckton-Dickinson FACScan)を用いて測定した。

細胞サイズ分布を測定する場合、細胞を含む培養液を遠心分離(1000rpm, 10min)し、培養液を取り除いた後、Dulbeccoのリン酸緩衝溶液よりCa²⁺、Mg²⁺を除いた緩衝溶液(phosphate-buffered saline; PBS)⁸³⁾に懸濁、さらに遠心分離(1000 rpm, 10 min)を1回繰り返すことによって細胞を洗浄した。そして、細胞を遠心分離(1000 rpm, 10 min)し、PBSに1x10⁶個/mL以上の濃度になるように懸濁した。この液をナイロンメッシュ(NBC工業NNO 420T 380メッシュ/インチ)で濾過し、セルソーター(Beckton-Dickinson FACStar)で前方散乱光および側方散乱光を測定した。

細胞周期分布測定の場合には、細胞をエタノール固定した後にPropidium Iodide (PI; sigma p-4170)で染色して測定した。すなわち、培養液を遠心分離(1000 rpm, 5 min)し、上清を除去した後氷冷PBSで細胞を1回洗浄した。さらにこの細胞懸濁液を遠心分離(1000 rpm, 5 min)し、PBSを除去した後、70%氷冷エタノールに懸濁し、水中に30分間放置した(エタノール固定)。次に、遠心分離(5000 rpm, 3 min)によりエタノールを除き、氷冷PBSによる懸濁、遠心分離(1000 rpm, 5 min)を2回繰り返して細胞を洗浄した。この細胞に、RNaseA-PBS溶液(加熱処理(80°C, 20 min)済RNase A 500 μg/mL)を加え、37°Cで1時間反応させ、細胞中のRNAを分解させた。この処理細胞懸濁液を遠心分離(5000 rpm, 3 min)することによってRNaseA-PBS溶液を除いた後、さらに、氷冷PBSで2回洗浄した。そして、処理細胞を氷冷PBSに懸濁し、PIを50 μg/mLになるように加え、暗所で10min以上放置した。この細胞懸濁液を、ナイロンメッシュで濾過し、フローサイトメーター(Beckton-Dickinson FACScan)をもちいて488 nmのアルゴブルーで励起された赤色蛍光を測定して、細胞周期を解析した。なお、

細胞周期の解析にはSOBR (Sum of Broadened Rectangles)法を用いた⁸⁴⁾。

細胞乾燥重量を測定する場合には、あらかじめ細胞数濃度を測定した培養液を一定量とり、細胞を培養液から遠心分離(10000 rpm, 10 min)した後PBSにて洗浄し、さらに遠心分離(10000 rpm, 10 min)にてPBSを取り除いた後、少量の超純水に懸濁した。また、この懸濁した溶液をアルミカップに移し、70℃で約2日間重さ一定になるまで乾燥させて重量を測定した。細胞の元素組成はこの乾燥細胞を用いて分析した。

2. 2 培養方法

静置培養は、第1章の方法に従って、5% CO₂, 37℃インキュベーターを用いて行った。攪拌連続培養は第1章の装置を用い、培養容量600 mLで、ペリスタリックポンプを用いて培地を一定の希釈率になるように流入した。培地の引き抜きは溢流管を用いて流入速度より大きな速度で引き抜いた。流入培地は流入ボトルの目盛りより、流入培地量を、引抜いた培地はウェイトセンサーを用いてその重さを測定し、引抜き培地量を算出した。そして、流入培地量、引抜き培地量より、平均培地流入、引抜き速度を算出し、この値を用いて希釈率を算出した。

2. 3 解析方法

連続培養中の各比速度は以下の様にして算出した。まず、連続培養中の各物質の物質収支式は、

$$V \frac{dX_t}{dt} = \mu VX_v - FX_t \quad (4-1)$$

$$V \frac{dX_v}{dt} = (\mu - K_d) VX_v - FX_v \quad (4-2)$$

$$V \frac{dG}{dt} = F(G_f - G) - \nu_c VX_v \quad (4-3)$$

$$V \frac{dL}{dt} = \rho_L VX_v - FL \quad (4-4)$$

$$V \frac{dAb}{dt} = \rho_{Ab} VX_v - FAb \quad (4-5)$$

(4-1)~(4-5)式を積分すれば、

$$\underline{\ln(VX_t) - Dt} = \mu \int \frac{X_v}{X_t} dt + \ln(VX_t)_0 \quad (4-6)$$

$$\underline{\ln(VX_v)} = (\mu - Kd - D) \underline{t} + \ln(VX_v)_0 \quad (4-7)$$

$$\underline{G - D \int (G_f - G) dt} = -\nu_G \int X_v dt + (G)_0 \quad (4-8)$$

$$\underline{L + D \int L dt} = \rho_L \int X_v dt + (L)_0 \quad (4-9)$$

$$\underline{Ab + D \int Ab dt} = \rho_{Ab} \int X_v dt + (Ab)_0 \quad (4-10)$$

ここで、

$$D = \frac{F}{V} \quad (4-11)$$

上記の(4-6)~(4-10)式の下線部をそれぞれプロットすることによって培養中の各比速度を求めた。なお、定常状態が達成されている場合には $\mu - Kd - D = 0$ が成立していた。

第3節 実験結果及び考察

3. 1 連続培養中の比速度の変化

流入培地中のグルコース濃度を1 g/Lに減少させ、グルコース律速で連続培養を行い、連続培養の回分時と連続時の各パラメーターの違いについて検討した。グルコース濃度1 g/Lで回分培養を開始し、グルコースを消費し尽くした時点でグルコース濃度1 g/Lの新鮮培地を希釈率0.025 (1/h)で流入、排出した。Fig. 4-1に回分から連続培養への経時変化を示す。また、Table 4-1に回分および連続（定常）における各比速度の比較を示す。図および表に示されるように回分操作から連続操作に切り換えると、グルコース比消費速度が回分培養時の約30%、乳酸比生産速度は回分時の約20%にまで低下した。回分時と連続時では比増殖速度の値が異なるので、それぞれの場合の比増殖速度およびグルコース比消費速度の比より、グルコースあたりの細胞収率を計算した。その結果、連続時のグルコースあたりの細胞収率は回分時に比較して2.5倍に上昇した。しかし、抗体比生産速度は回分操作時、連続操作時いずれもほとんど差が無くグルコースあたりの抗体収率が3.4倍に上昇する結果となった。この様なグルコース律速の連続培養を合計3回行なったがいずれも同様の傾向を示した。

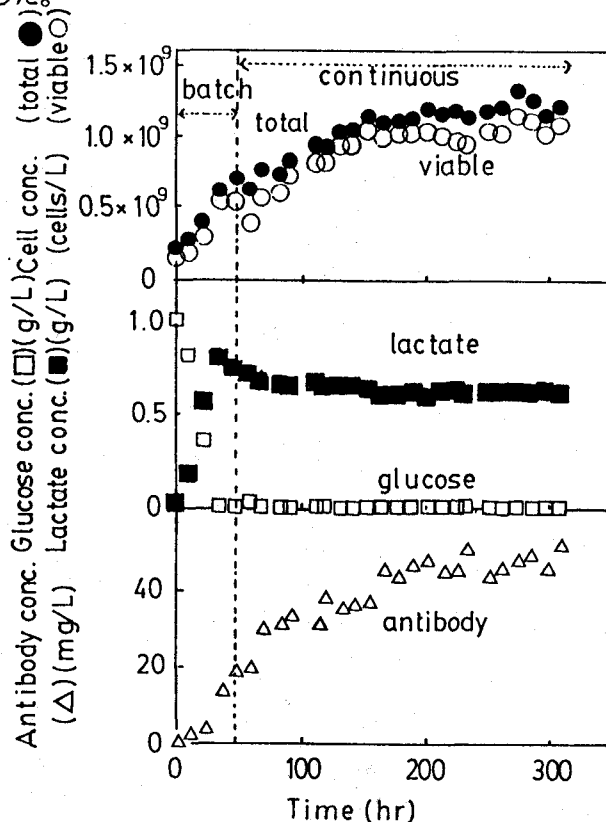


Fig. 4-1 The time course of a continuous culture

Table 4-1 The comparison of the kinetic parameters

	Batch	Steady-state	Ratio (Steady-state /batch)
Specific growth rate (1/h)	0.0428	0.0310	0.72
Specific glucose consumption rate (g/cell·h)	0.972×10^{-10}	0.286×10^{-10}	0.29
Specific lactate production rate (g/cell·h)	0.773×10^{-10}	0.158×10^{-10}	0.20
Specific antibody production rate (g/cell·h)	1.163×10^{-12}	1.162×10^{-12}	1.0
Cell yield (cells/g-glucose)	4.40×10^8	10.8×10^8	2.5
Antibody yield (g-Ab/g-glucose)	0.0120	0.0406	3.4

この様なグルコースあたりの細胞収率の変化をもたらした原因として、①細胞濃度が高密度(1×10^6 個/mLレベル)になると、収率が上昇する、②グルコース律速条件において収率が上昇するの2つが考えられた。そこで、グルコース律速の連続培養中に供給培地中のグルコース濃度、アミノ酸濃度をステップ状に変化させ、その各比速度に及ぼす影響について検討した。Fig. 4-2にステップ変化による細胞収率の変化を示す。

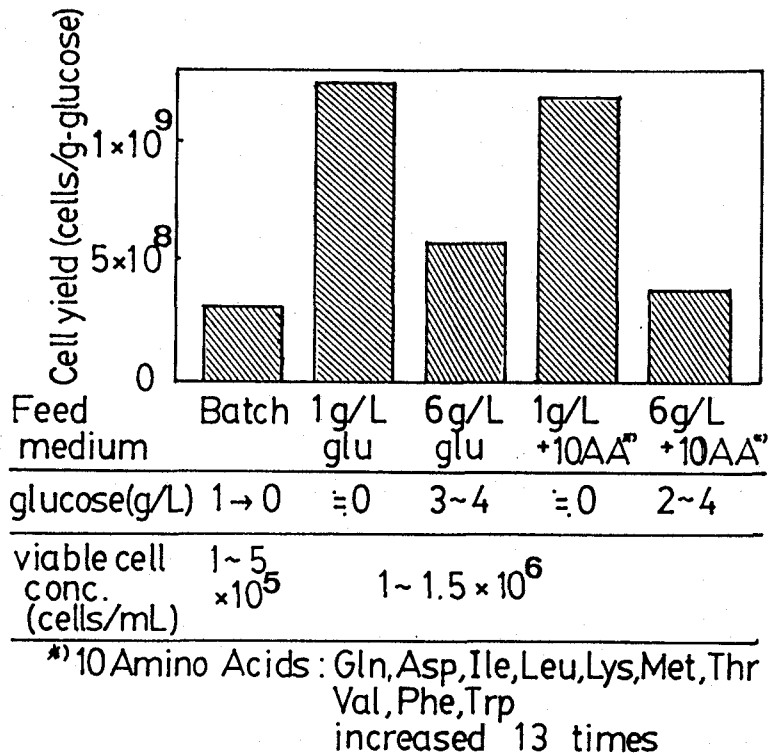


Fig. 4-2 The effects of feed glucose concentration on cell yield in continuous culture

この図に示される様に、連続操作から回分操作へ変更した後、流入培地中のグルコース濃度を6 g/Lに上昇させると、グルコースあたりの細胞収率が低下した。また、培養中に消費される10種のアミノ酸(Gln, Asp, Ile, Leu, Lys, Met, Thr, Val, Phe, Trp)についてもその添加の影響を検討した。その結果、グルコース濃度は細胞収率に大きく影響を及ぼしたが、アミノ酸についてはその効果は認められなかった。従って、細胞収率はグルコース濃度によって影響をうけることが示された。

3. 2 フローサイトメトリーによる解析

フローサイトメーターを用いて連続時と回分時の細胞状態の違いを検討した。フローサイトメーターはシース液の流れによって分離した細胞1つ1つにレーザー光をあて、その透過、反射光によって細胞の状態を分析する装置である。初発グルコース濃度1 g/Lで培養を開始し、回分培養時の細胞を回収した。そして、グルコース濃度が0になった時点で連続操作を開始し、グルコース律速状態を実現した。このグルコース律速状態における生細胞を回収し、両者を比較した。Fig. 4-3に回分時と連続時における前方散乱光分布(FSC)を示す。ここで前方散乱光は細胞の大きさに大きく依存し、細胞の大きさの増大に伴ってFSCは増大した。前方散乱光分布について回分操作と連続操作を比較すると、この図に示されるように連続操作においてFSCの分布は左にシフトしており、細胞の大きさが連続時には小さくなっていることが示された。

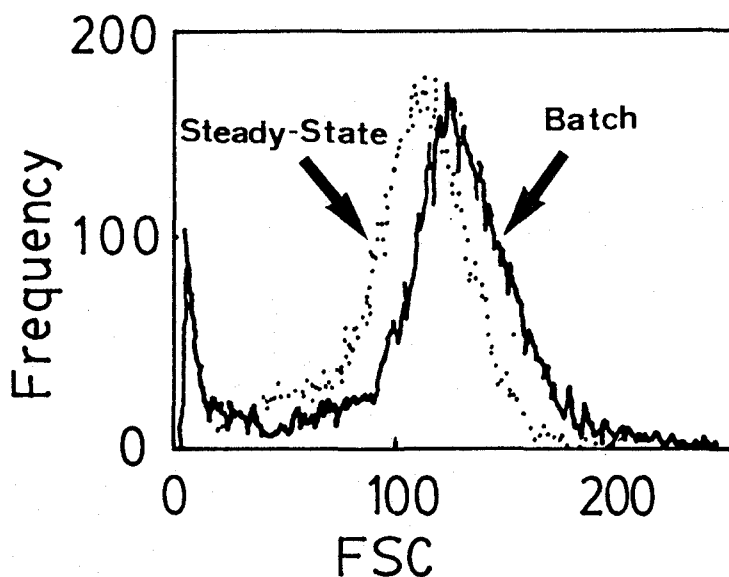


Fig. 4-3 The size distribution by flowcytometer (FACStar)

さらに、回分時と連続時の細胞を回収し、細胞1個あたりの乾燥重量、元素組成を測定した。その結果をTable 4-2に示す。

Table 4-2 Dry cell weight per cell and elementary composition

	Cell yield based on cell number (cells /g-glucose)	Cell yield based on cell weight (g-dry cell /g-glucose)	Dry cell weight (pg/cell)	Elementary composition(Wt%)		
				C	H	N
Batch	6.1×10^8	0.303	497	45.3	7.07	13.6
Steady-State	14.5×10^8	0.460	317	47.2	6.71	14.5

この表に示されるように、細胞の組成は余り変化しないが、大きさのみが小さくなって
いる事が示された。また、細胞重量基準の細胞収率は、連続時において回分時に比較して
小さくなった。この様なグルコース制限条件下では、細胞は必要なエネルギーをグルタミ
ンから補うとの報告があり⁸⁵⁾、本研究でもグルコース律速環境におかれることによって
細胞のグルコース利用効率に変化し、さらに細胞の大きさも変化した。

次に、グルコースの解糖系における利用効率を表す乳酸/グルコース比と細胞収率の関
係について検討した。Fig. 4-4に連続培養及び回分培養における乳酸/グルコース比と細
胞収率の関係を示す。この図に示される様にグルコース律速状態において乳酸/グルコー
ス比は低下し、細胞収率が上昇した。従って、これはグルコース律速条件下において、解
糖系から乳酸に至るグルコースの代謝が、解糖系からTCAサイクルへの代謝に比較して
減少したためと考えられる。

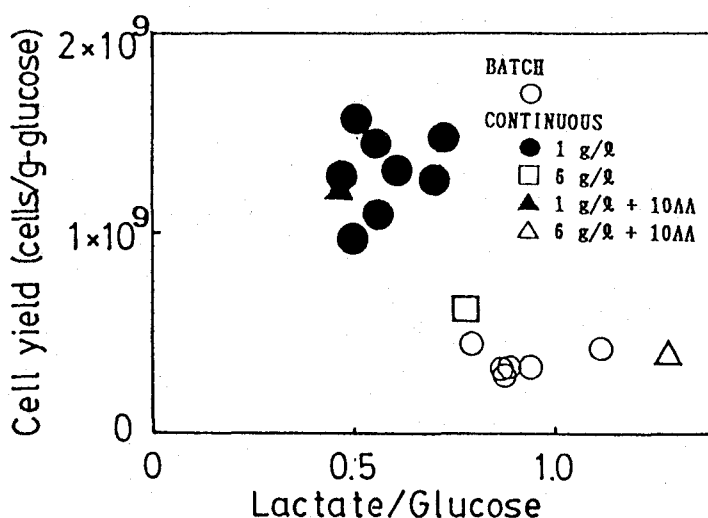


Fig. 4-4 The relationship between lactate/glucose ratio and cell yield

この様な細胞の大きさ及び重さに変化を与える環境因子として Ramirez 及び Mutharasan⁵⁶⁾ は細胞周期分布変化をあげている。本研究でもグルコース律速の連続培養と回分培養における細胞周期分布を測定した。Fig. 4-5 に連続培養の培養経過および細胞周期分布の経時変化を示す。 Ramirez 及び Mutharasan⁵⁵⁾ は、G0+G1期の細胞はS期の細胞に比較して小さく、回分培養初期にはS期の細胞の割合が大きいという結果を示している。この図に示される様に、ハイブリドマ3A21株においても、回分時にはS期の割合が高いいが、連続操作においてはG0+G1期の分布が高くなっている。従って、この様な回分と連続の細胞の大きさの差には細胞周期分布が影響していると考えられる。

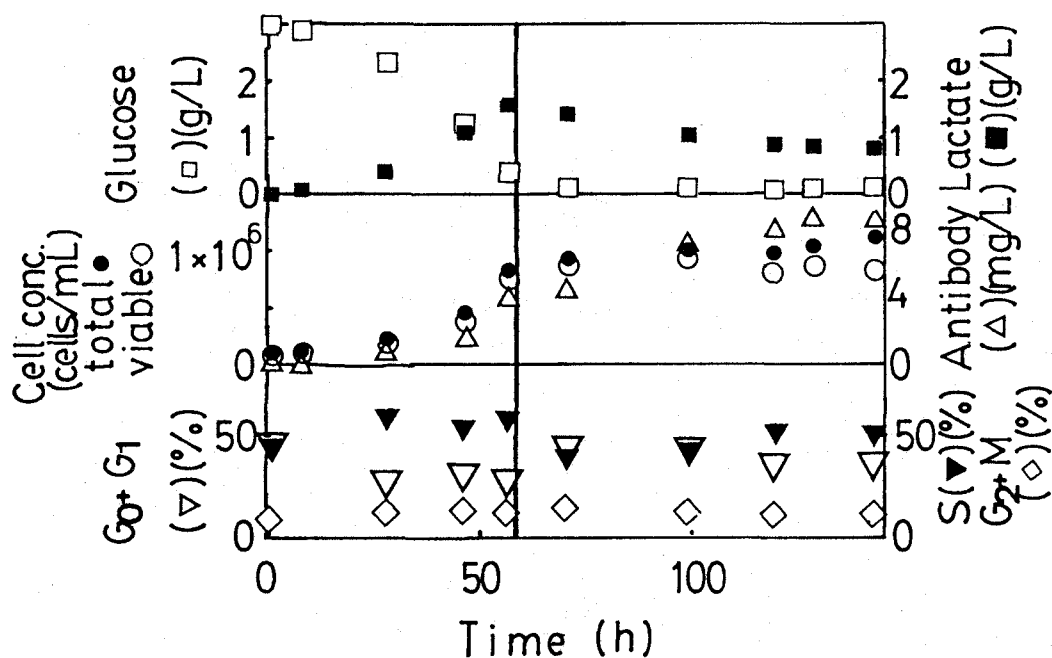


Fig. 4-5 The time course of cell cycle phase fraction

3. 3 抗体生産に及ぼす細胞周期分布の影響

さらに、細胞周期分布と比増殖速度、抗体比生産速度の関係を詳細に検討するために、グルコース律速の連続培養時において希釈率を変化させ、その時の比増殖速度、細胞周期分布、抗体比生産速度の関係について検討した。Fig. 4-6に希釈率を変化させたグルコース律速の連続培養と、その時の細胞周期分布の経時変化、Table 4-3に連続培養時の各比速度の値を示す。

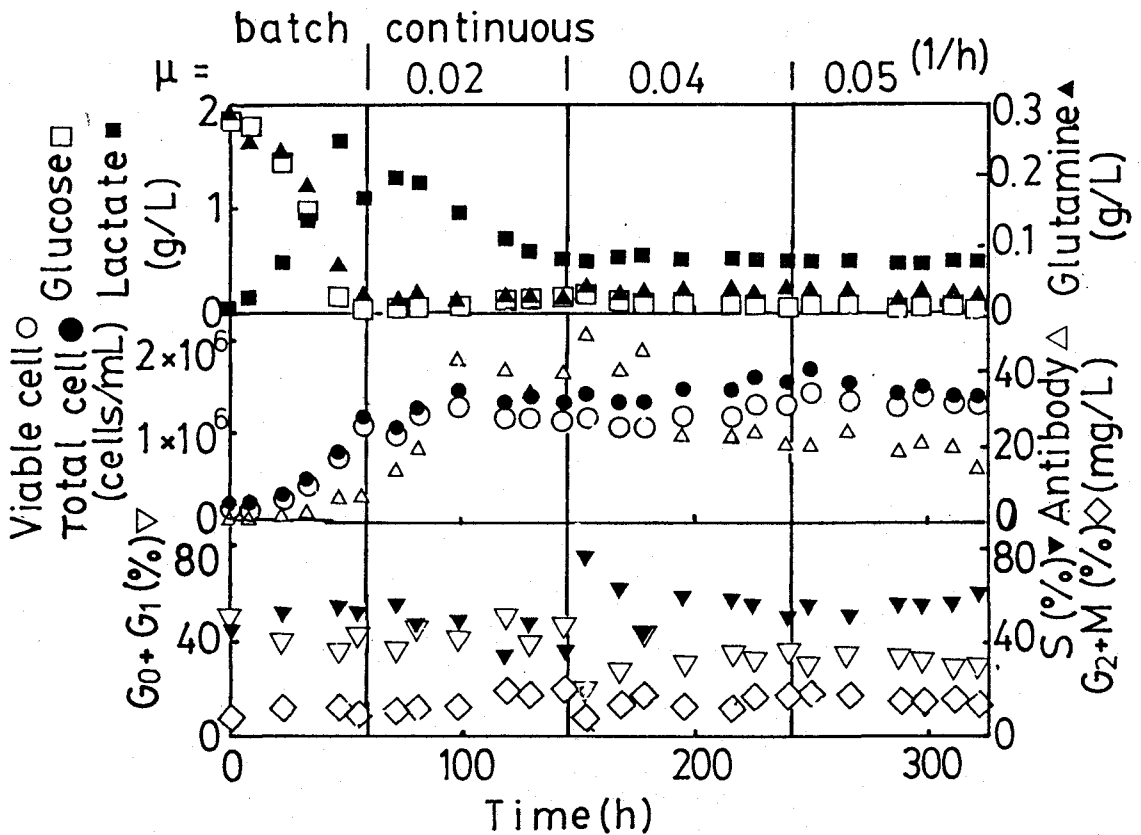


Fig. 4-6 The time course of cell cycle phase fraction in different growth rate

Table 4-3 The kinetic parameters in continuous culture

Specific growth rate (1/h)	0.0181	0.0423	0.0456
Specific glucose consumption rate (g/cell·h)	0.103 $\times 10^{-10}$	0.262 $\times 10^{-10}$	0.298 $\times 10^{-10}$
Cell yield (cell/g-glucose)	17.5 $\times 10^8$	16.2 $\times 10^8$	15.5 $\times 10^8$
Specific antibody production rate (pg/cell·h)	0.830	0.510	0.626

この表に示される様に抗体比生産速度は細胞の比増殖速度の低い場合に高くなった。また、比増殖速度が低い[0.0181 (1/h)]場合は高い場合[0.0423 (1/h), 0.0456 (1/h)]に比較してG0+G1期の割合が高く、逆に、比増殖速度が高い場合はS期の割合が比増殖速度の低い場合に比較して相対的に高くなった。この結果は、同調培養を用いてG1後期からS期始めに抗体生産が増強されるという他の研究者による実験結果^{86, 87, 88)}とも一致する。このような細胞増殖同調作用をもたらす物質としてチジンを知られている^{88, 89)}。チジンを過剰に培地に添加すると細胞のDNA合成を妨げ、細胞周期のS期への進行を阻害し、G1期の割合が増加する。ここでは、抗体生産について、過剰のチジン(3 mM)を含む培地を用い、通常の培地と静置培養により比較検討した。Fig. 4-7にチジンを用いて細胞のG1期の割合を増やした培養の経時変化および抗体濃度の経時変化、Fig. 4-8に細胞周期分布解析の例、Table 4-4に抗体比生産速度を通常培地と比較して示す。

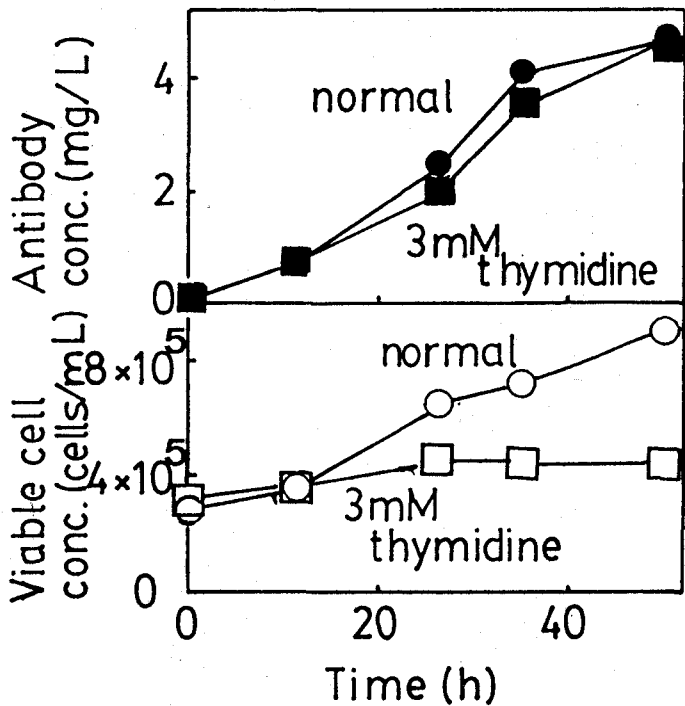


Fig. 4-7 The effect of thymidine on antibody production

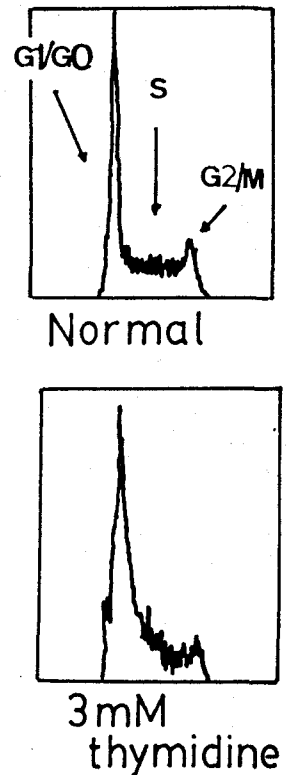


Fig. 4-8 DNA distribution by PI staining(14h)

Table 4-4 The comparison of specific antibody production rate

	Normal medium	3mM Thymidine
Specific antibody production rate (pg/cell·h)	0.170	0.308

Fig. 4-7、4-8に示される様に、過剰のチミンを添加することによって細胞の増殖は停止し、G0+G1期の割合が増加している。一方、この時抗体濃度の経時変化は両者でほとんど変化せず、Table 4-4に示される様にG0+G1期の割合が多いチミン添加培地での抗体比生産速度は通常培地に比較して高い値を示した。この結果より、グルコース律速の連続培養において比増殖速度の低い場合に、G0+G1期の割合が上昇し、結果として抗体比生産速度が上昇したと考えられる。

第4節 要約

グルコース律速の連続培養を用いて増殖期（回分時）と定常期（連続時）における細胞状態、収率の変化および抗体生産に及ぼす細胞周期分布の影響について検討した。その結果、細胞はグルコース律速の連続状態においてグルコースあたりの細胞収率が上昇することが示された。

さらに、この状態において細胞当りの抗体比生産速度は変化しなかったことより、抗体生産に関してはこの状態を維持して操作することが有利であることが示唆された。また、この原因についてフローサイトメーターおよび乾燥細胞重量、元素分析をもちいて解析した結果、細胞の大きさ、重さの減少、グルコース利用の効率の上昇、がグルコース律速条件下における細胞収率の上昇に関与していることが示された。

また、連続培養時における細胞周期分布を測定した結果、比増殖速度が低い場合に抗体比生産速度が高くなり、G0+G1期の割合が増加した。さらに、 α ジソンを用いた静置培養実験より、G0+G1期の割合を増加させると抗体比生産速度が上昇することが示された。

第5章 ホロファイバー培養システムによるモノクローナル抗体生産

第1節 緒言

ホロファイバー培養法は、Knazekら²⁰⁾によって1975年に開発された血管を模した中空繊維の表面に細胞を保持し、中空繊維を通じて培地を細胞に供給し、生体内に近い状態で細胞培養を行う方法である。生体内の細胞濃度は 1×10^9 個/mLのレベルであるといわれているが、通常用いられている培養方法では細胞濃度は $1 \times 10^6 \sim 10^7$ 個/mLのレベルまでにしに到達しない。しかし、ホロファイバーを用いた細胞培養は 1×10^8 個/mLの濃度まで細胞濃度を上昇させることが可能であり、培養方法としてもすぐれている^{22, 23)}。さらに、ホロファイバー培養法は中空繊維の表面に細胞を保持するため、培養液と細胞が分離され、代謝産物の除去、栄養源の供給が容易に行える。さらに、分子量分画能を持つ中空繊維を利用すれば、系内に生産物をとじ込め、生産物の回収の面からも役立つ。しかし、このホロファイバーに関する研究は、系内の細胞濃度が直接測定できないため解析が難しく、培養工学的に研究した例は少ない^{23, 24, 90)}。ここでは、これまでの知見より、ホロファイバー培養におけるモノクローナル抗体生産について培養工学的に検討した。

第2節 実験材料および方法

2. 1 使用細胞株、培地および分析方法

細胞株として1章で述べたマウスマウスハイブリドーマ3A21株を用いた。さらに、培地として、3章で述べたRDF-ITES培地を用いた。

生細胞および全細胞濃度は第1章と同様にしてトリパングルを用いた色素排除法にて測定した。また、グルコース、乳酸、アンモニア、抗体濃度も第1章と同じ方法を用いて測定した。さらにホロファイバー培養終了後、EC側の各部分（培養ユニット及び分離ユニット中のホロファイバー、ECチャンバー、ベローズポンプ内部）に分けてそれぞれの細胞濃度を実測した。また、各ファイバーに付着した細胞は、ファイバーを分離後トリプシン処理(37°C、10 min)して細胞を分離して計測した。また、各部分の培養液量も実測した。

2. 2 培養方法

ホロファイバー培養システムとしてFig. 5-1に示す装置を用いた。50%分画分子量30,000のホロファイバーを有するホロファイバーユニット(Amicon Minivitafiber MVF0004)を培養器として用い、50%分画分子量5,000のホロファイバーを有するホロファイバーユニット(Nipro FB-90T)を低分子代謝産物分離のため培養器に並列に接続した。

さらに、培養器の内側(innercapillary side; IC側)と外側(extracapillary side; EC側)培養液の流れのバランスを保つためICおよびEC両側に培養液をためるチャンバーを設けた。系の温度制御はポンプを除く系全体を37°Cインキュベーター内に設置することで行った。系内の溶存酸素、pHはIC側に接続したpHおよびDOセンサーで測定した。pHの制御はIC側に設けたガス交換器への空気中の炭酸ガス濃度を変えることで行った。さらに、EC側にはベローズポンプを設け、分離用ホロファイバー内部に圧力をかけることによって、分離用ホロファイバーからの液の抽出し、IC、EC間の液の循環をはかった。

また、IC、EC各チャンバーにはウエイトセンサーを取り付け、チャンバー内液量を測定した。さらに、このウエイトセンサーの値に基づいて、ICもしくはECチャンバーに圧力センサー、電磁弁、加圧ポンプを用いて一定の圧力をかけ、両チャンバーの液量を

一定に維持した。系内の循環は I C 側 1200 mL/h、E C 側 150 mL/h、ペローズポンプ 2300 mL/h でおこない、系内の濃度分布が一定になる様に操作した。

培養用ホロファイバーの内側 (I C 側) より新鮮培地を流入し、ホロファイバーを通して細胞の存在するホロファイバー外側 (E C 側) へ流入した。さらに、高分子成分であるトランスフェリン、B S A などはホロファイバーの内外から適宜供給した。また、細胞により排出された乳酸、アンモニア等の低分子成分は E C 側に接続された分離用ホロファイバーユニットを通して系外に排出された。さらに、生産物である抗体は分子量が 150,000 と大きいいため、この 2 つの膜を通過できず、系内 (E C 側) に蓄積された。

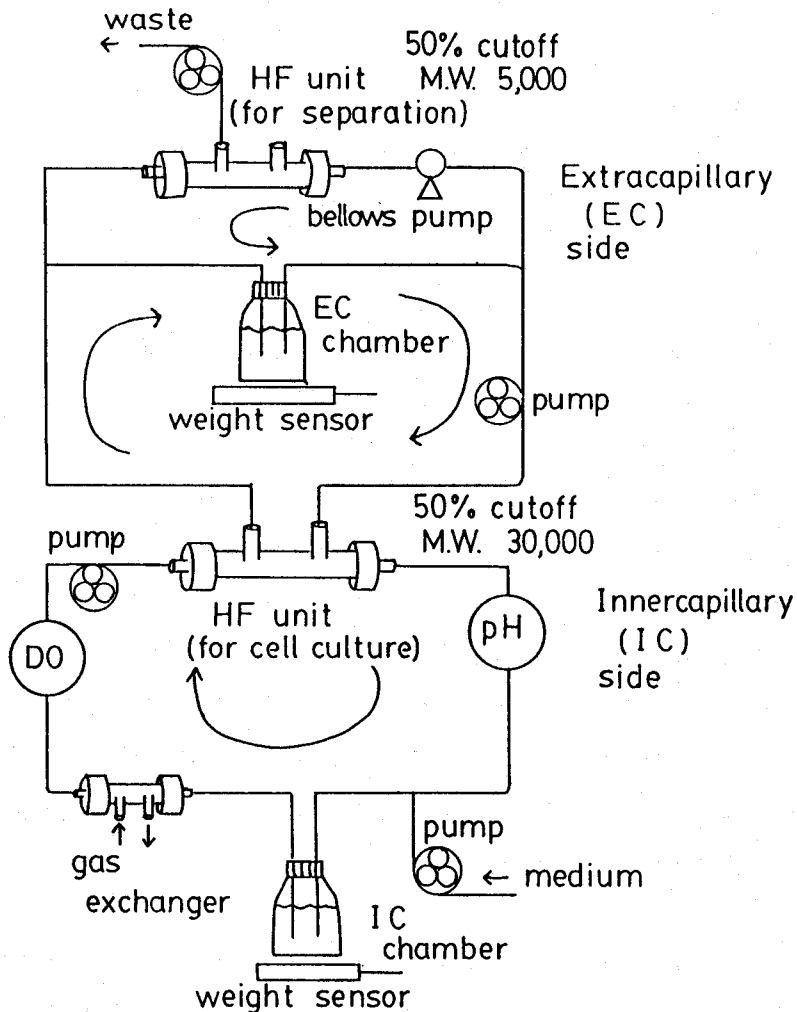
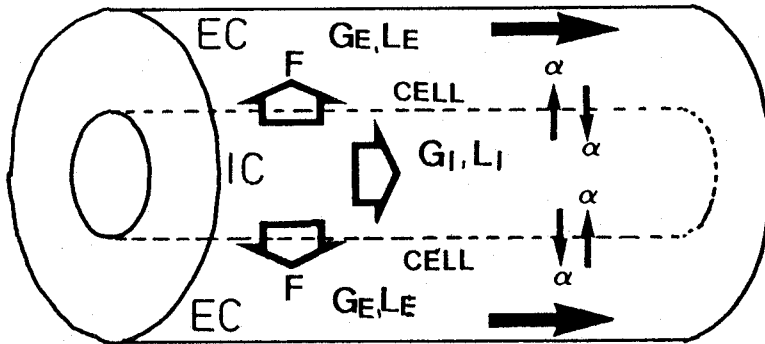


Fig. 5-1 Hollow-fiber (HF) cell culture system

2. 3 解析方法

ホロファイバー培養における各消費、生成速度の算出は以下の様にしておこなった。

ここで用いたホロファイバー培養システムは、IC、EC内を通じて培養液を高速で循環させ、系内を混合させている。系内のいくつかよりサンプルを取りだし、その、グルコース、乳酸、抗体濃度を測定したところ、IC、ECのそれぞれの中での濃度差はほとんど生じていなかった。また、細胞の存在しないIC側にも代謝産物である乳酸が存在していた。従って、IC、EC内はそれぞれ完全混合とみなせるので、IC、EC間のBulk以外の流れを(5-6)、(5-7)式に示す様に考慮して、Fig. 5-2の様なモデルを考えた。この図に基づいた各成分についての物質収支は、



$$\phi_G = \alpha(G_I - G_E)$$

$$\phi_L = \alpha(L_I - L_E)$$

Fig. 5-2 The concept for data analysis in HF culture

$$V_1 \frac{dG_1}{dt} = F(G_0 - G_1) - \phi_G \quad (5-1)$$

$$V_1 \frac{dL_1}{dt} = -FL_1 + \phi_L \quad (5-2)$$

$$V_E \frac{dG_E}{dt} = F(G_1 - G_E) + \phi_G - R_G \quad (5-3)$$

$$V_E \frac{dL_E}{dt} = F(L_1 - L_E) - \phi_L + R_L \quad (5-4)$$

$$V_E \frac{dAb}{dt} = R_{Ab} \quad (5-5)$$

$$\phi_G = \alpha(G_1 - G_E) \quad (5-6)$$

$$\phi_L = \alpha(L_1 - L_E) \quad (5-7)$$

ここで、 ϕ_G 、 R_G が一定と仮定し、(5-1)、(5-3)式を積分すれば、

$$\phi_G t = \int F(G_0 - G_1) dt + V_1 G_1 - (V_1 G_1)_0 \quad (5-8)$$

$$(R_G - \phi_G) t = \int F(G_1 - G_E) dt + V_E G_E - (V_E G_E)_0 \quad (5-9)$$

この式の下線部をそれぞれプロットすることにより ϕ_G 、 $R_G - \phi_G$ を算出し、 R_G 、 α を求めた。また、同様の手法を用いて、乳酸生産速度 R_L 、抗体生産速度 R_{Ab} を算出した。

第3節 結果および考察

3. 1 ホロファイバー培養の経時変化

培養用および分離用ホロファイバーユニットをもつ培養システムをもちいて、15 mL/hの平均流速でIC側に新鮮培地を流加、排出し約2ヶ月間連続培養を行った。その時のグルコース、乳酸濃度の経時変化をFig. 5-3に示す。

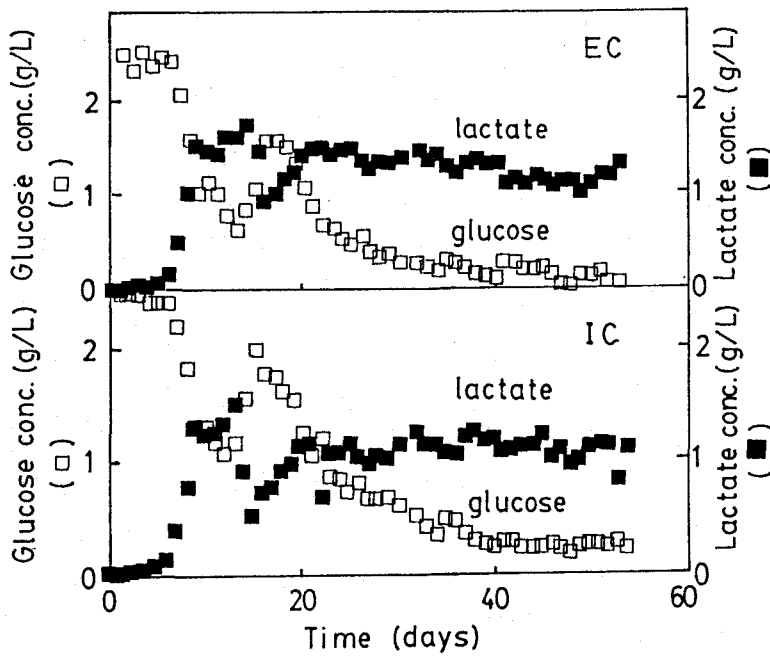


Fig. 5-3 The changes in glucose and lactate concentrations in 60 days' hollow-fiber cultivation (RUN1)

この図は、I C、E C内の平均グルコース、乳酸濃度の経時変化を示したものである。培養開始後、細胞がグルコースを消費して乳酸を生成し、やがて、グルコース濃度約0.2 g/L、乳酸濃度約1.2 g/Lで一定に保たれ、定常状態に達している。また、培地供給側のI C側においても乳酸濃度は約1 g/Lとなっている。この実験結果に基づいて、上記に示したI C、E C間のBulk以外の流れを考慮した物質収支式より、グルコース消費、乳酸生産速度を算出した。

Table 5-1にホロファイバー培養終了時の培養カートリッジ内の生細胞濃度の実測値をしめす。この表に示される様に、2回の長期間培養において、細胞濃度は約 5×10^7 個/mLとなり、この値は回分培養の約50倍であった。

Table 5-1 The viable cell concentration in HF culture

	Viable cell conc. (cells/mL)	Volume(mL)	Viable cell number (cells)
RUN 1 (61 days)	4.25×10^7	4	17.0×10^7
RUN 2 (64 days)	5.01×10^7	4	20.0×10^7

ホロファイバー培養の特徴を把握するためには培養時の比速度の値を推定し、他の培養法と比較しなければならない。そこで、この培養終了時の生細胞濃度の値と、培養終了時のグルコース消費、乳酸生成速度より、グルコース比消費速度、乳酸比生産速度を算出した。また、培養5日目において培養を止め、上と同様に生細胞濃度を測定し、グルコース比消費速度、乳酸比生産速度を算出した。Table 5-2に合計3回のホロファイバー培養における各比速度の値を示す。この表に示される様に、培養初期ではスピナー回分培養とほぼ同じ比速度の値を示したが、グルコースおよび乳酸がほぼ一定濃度になる培養定常期において両比速度は培養初期に比較して低い値を示した。この様な比速度の変化は、Shiraiら⁹⁴⁾による高密度細胞培養における酸素比消費速度の変化やPerry及びWang⁹⁰⁾によるホロファイバー培養における比速度の上昇現象にもみられている。

しかし、ホロファイバー培養において、培養初期(約2 g/L)に比較して、培養終了時ではグルコース濃度が低いレベル(約0.2 g/L)で一定に保たれている。3章の実験よりグルコース濃度を低く保つとグルコース比消費速度がグルコース濃度の高い場合と比較して低下する結果が得られているが、。ここでも、グルコース濃度を低く保った事によってグルコース比消費速度が低下した。

Table 5-2 the kinetic parameters in hollow-fiber culture

	Initial phase	End of cultivation	
	RUN 2 (5 days)	RUN 1 (61days)	RUN 3 (64 days)
Specific glucose consumption rate (g-glucose/cell/h)	1.73×10^{-10}	0.572×10^{-10}	0.718×10^{-10}
Specific lactate production rate (g-lactate/cell/h)	1.67×10^{-10}	0.512×10^{-10}	0.632×10^{-10}

*)Spinner batch culture

$$\nu_G = 1 \sim 2 \times 10^{-10} \text{ (g/cell}\cdot\text{h)}$$

$$\rho_L = 1 \sim 2 \times 10^{-10} \text{ (g/cell}\cdot\text{h)}$$

3. 2 ホロファイバー培養におけるB S Aの影響

灌流培養同様に分離用ホロファイバーによって系内にB S Aを維持できるホロファイバー培養装置によってB S Aの影響を検討した。ホロファイバー培養中に5 g/LのB S Aを含む培地を連続的に流入させ、その抗体生産に及ぼす影響を検討したのがFig. 5-4である。

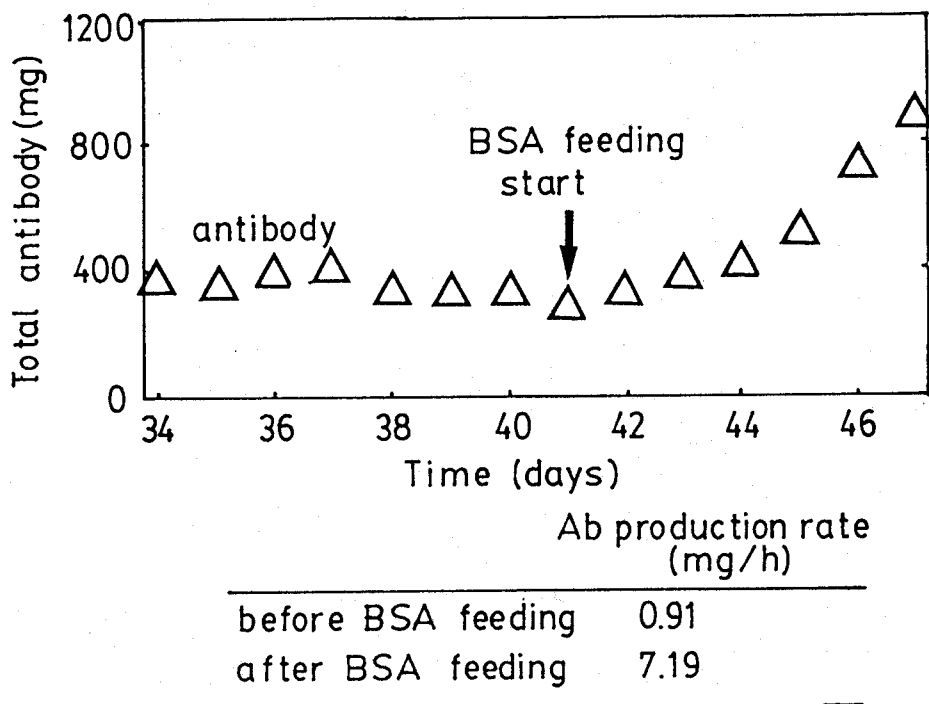


Fig. 5-4 The effects of BSA feeding on antibody production

この図に示される様に、BSAを細胞の存在するEC側に連続添加すると培地中の抗体濃度が急激に上昇した。さらに、抗体生産速度もBSAの添加によって上昇し、BSAの抗体生産促進効果が示された。そこで、EC側とIC側から種々の濃度のBSA含有培地を供給し、抗体生産に及ぼす影響を灌流培養と比較して検討した。Fig. 5-5に灌流培養とホロファイバー培養の抗体生産速度の比較を示す。ここで、灌流培養においてホロファイバー培養と細胞数が同じとみなして示している。

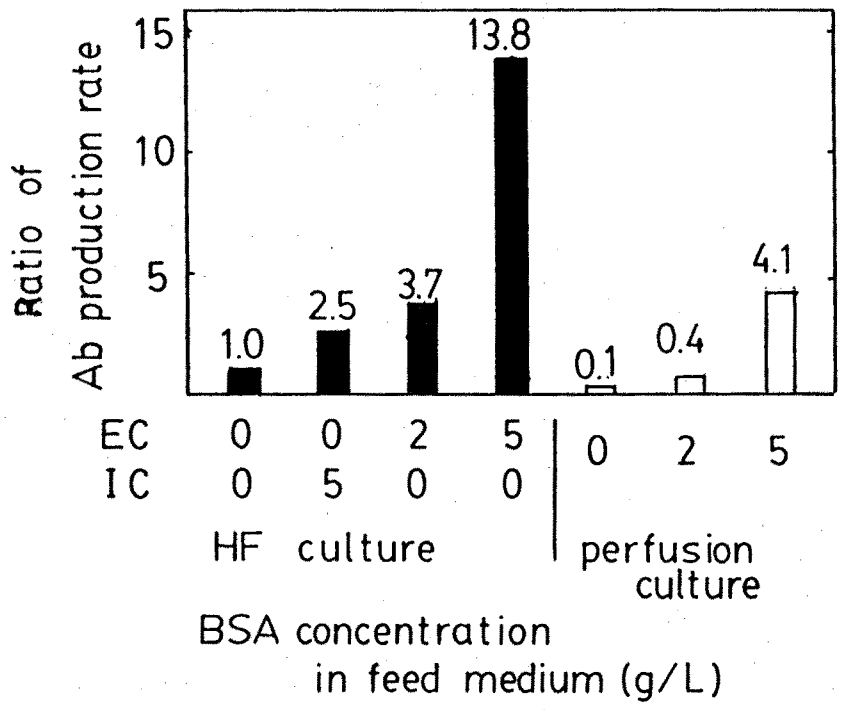


Fig. 5-5 Comparison of BSA effects on antibody production in the different cell culture systems

この図に示される様に、流入培地中のBSA濃度の上昇に伴い、抗体生産速度は上昇した。また、ホロファイバー培養は灌流培養に比較してBSAによる抗体生産増強効果が約3倍になった。

3. 3 ホロファイバー培養における抗体生産

以上の結果に基づいて、ホロファイバー培養システムにおいて効率的な抗体生産を行う為の操作条件について考察した。

ホロファイバー培養に於ける主な操作因子は流入培地中の基質濃度および培地流入速度である。ここでは、供給培地濃度を変化させた場合のホロファイバー培養定常状態における抗体生産について考察した。Fig. 5-6に供給培地濃度と系内の乳酸濃度、細胞数との関係の計算結果を示す。ここで、グルコース比消費速度の値は2回の60日間にわたるホロファイバー培養の平均値 0.645×10^{-10} g/cell \cdot hを用い、流入培地中のグルコース濃度および流入速度より系内へのグルコース流入速度を算出し、この値をグルコース比消費速度で割る事によって系内生細胞数を算出している。また、乳酸については(5-2)、(5-4)式を用いて定常状態として計算している。

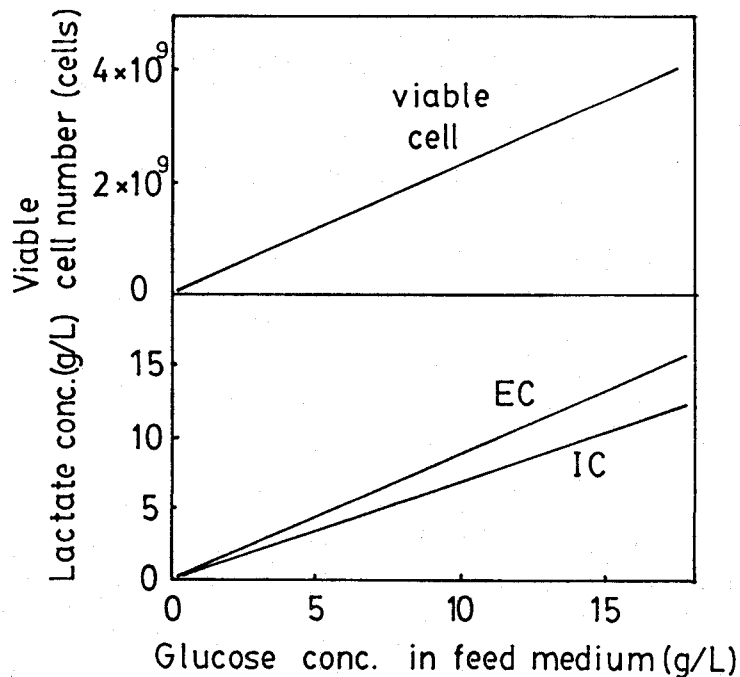


Fig. 5-6 The effects of glucose concentration in feed medium on viable cell concentration and lactate concentration (constant feed rate ;0.015(1/h))

この図に示される様に、系内に流入させる基質濃度の増加に伴って、系内の生細胞数は増加し、これに伴って乳酸濃度も上昇している。系内の乳酸の濃度の増加に伴ない、系内の浸透圧 π も上昇してくるので、第1章のFig. 1-8に示される様に、抗体比生産速度 ρ_{Ab} も変化する。この両者の関係(Fig. 1-8)を2次式

$$\rho_{Ab} = -0.945\pi^2 + 2.00\pi - 8.91 \quad (5-10)$$

で近似し、ホロファイバー培養におけるモノクローナル抗体生産速度を算出した。

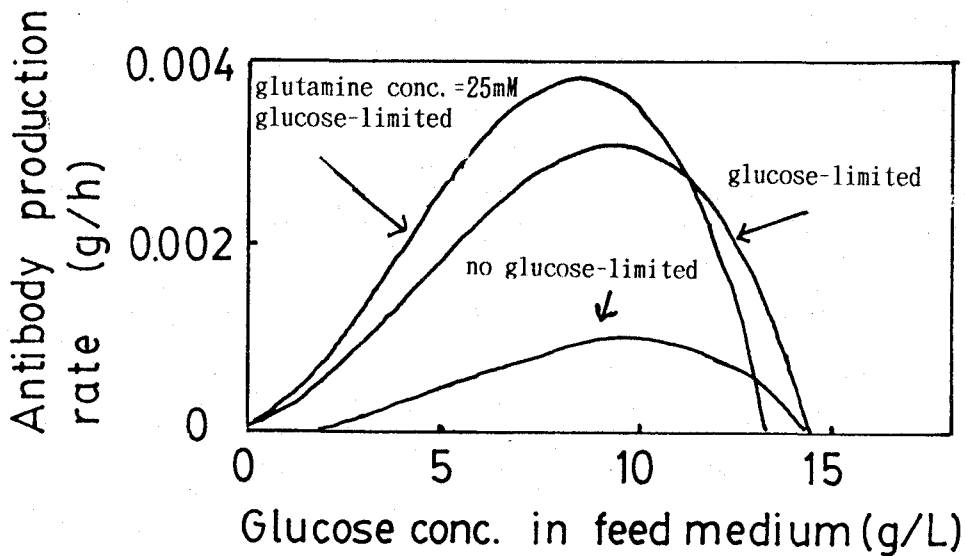


Fig. 5-7 The effect of glucose concentration in feed medium on antibody production rate (constant feed rate ;0.015(1/h)) (Viable cell concentration increases with increase of feed glucose concentration)

Fig. 5-7は、流入培地中のグルコース濃度に対するE C内の乳酸濃度をFig. 4-8の関係を用いて算出し、さらに乳酸濃度と浸透圧の関係及び抗体比生産速度と浸透圧の関係を用いて、抗体生産速度と流入培地中のグルコース濃度の関係を算出し、プロットしたものである。この図に示される様に、系内細胞数の増加に伴って、系内全体の抗体生産速度は上昇する。しかし、ある程度以上のグルコース濃度においては、浸透圧の増加のため、全体の

抗体生産速度は減少するため、抗体生産速度が最大となるグルコース濃度が存在することがわかる。ここで、グルコース律速でさらに系内グルタミン濃度を25mMに保った場合（抗体比生産速度が(5-10)式で示された値の1.44倍となる）、及びグルコース律速でない場合（グルコース比消費速度はホロファイバー培養初期値の 1.73×10^{-10} g/cell・hと仮定）の計算結果も図中に示した。

この図に示される様に、グルコース律速を保たない場合は、グルコース律速の場合に比較して系内細胞濃度の上昇が低いため、抗体生産速度が低くなっている。また、グルタミンを強化した場合は抗体比生産速度の上昇のため、抗体生産速度も上昇する結果になった。しかし、この場合には系内のアンモニア濃度が細胞増殖に障害を及ぼすレベルにまで上昇してくる。従って、この様なグルタミン濃度強化を達成するためには、流加速度を上昇させるか、Nayveらが行っている様にアンモニアのみを特異的に取り除くシステム⁹³⁾を組込む必要があると考えられる。また、同様の考察を系内の細胞数を一定と仮定し、培地流入流出速度を変化させ、この時に細胞の生産する乳酸量から、系内の浸透圧を計算し、さらに抗体比生産速度と浸透圧の関係を用いて、抗体生産速度と培地流入流出速度の関係を算出した結果、抗体生産速度を最大にする培地流入流出速度が存在することがわかった。

ここで用いたホロファイバー培養システム（容量300 mL）における計算上の抗体生産速度最大値は約0.038 g/hであった。モノクローナル抗体をガンに体する治療薬として用いる場合にはマウス1匹あたり数mg程度必要であるとの報告もあり⁹⁴⁾、この程度の生産速度で実用レベルの生産にも充分であると考えられる。

第4節 要約

培養用及び分離用ホロファイバーユニットを有する培養システムによるハイブリドーマ培養について検討した。約60日間にわたる2回の連続培養の結果、細胞濃度は通常の回分培養の約50倍に相当する 5×10^7 個/mLにまで上昇した。さらに、この培養における培養終了時(61日目、および64日目)の細胞数および培養中のグルコース消費速度、乳酸生産速度を用いて、この培養におけるグルコース、乳酸比生産速度を算出し、ホロファイバー培養初期における比速度の値と比較した。その結果、ホロファイバー培養終了時には、グルコース比消費速度、乳酸比生産速度は培養初期に比較して約1/3に低下していた。

また、ホロファイバー培養におけるBSA添加の影響について検討した結果、灌流培養同様、BSAの連続添加が抗体生産を著しく増強した。また、抗体生産速度を灌流培養と比較した結果、BSAによる抗体生産増強効果は灌流培養に比較してホロファイバーでは3倍になった。

さらに、これまで得られた知見に基づいて、ホロファイバー培養システムによる抗体生産について考察した。その結果、抗体生産に最適な供給培地中の基質濃度、供給流量が存在し、用いたホロファイバー培養システムで実生産に十分な性能を発揮できることが示された。

総括

動物細胞培養による物質生産において、細胞株の生理的性質の解明と得られた成果に基づいた装置的検討を組合わせて総合的に研究した報告はほとんどみられない。本研究では、細胞培養による効率的な物質生産法の確立をめざし、その具体例としてマウスマウスハイブリドーマ3A21株による抗RNaseAモノクローナル抗体生産をとりあげ、代謝産物であるアンモニア、乳酸の影響ならびに、基質の主成分であるグルコースおよびアミノ酸、成長因子であるBSA、インシュリンおよびトランスフェリンの影響を検討し、さらに、細胞収率、細胞周期と抗体生産の関係について培養工学的に考察した。さらに、高細胞濃度達成可能な細胞培養システムとしてホロファイバー培養システムによる培養法について検討した。

第1章では、ハイブリドーマ3A21株の培養におけるアンモニア濃度および乳酸濃度の影響について定量的に検討した。その結果、培地中のアンモニアの増加に伴って、比増殖速度の減少、比死滅速度の増加が見られ、8~10 mM付近で急激に細胞増殖が阻害されたが、抗体比生産速度に対する影響はほとんど見られなかった。

さらに、乳酸に関して、乳酸濃度を一定に保つ流加培養法をもちいてその影響を定量的に検討した。その結果、乳酸濃度7.4 g/L以上において、比死滅速度は急激に増加し、見かけの比増殖速度（比増殖速度-比死滅速度）は負の値となり、生細胞濃度は減少した。また、乳酸による細胞増殖阻害の原因を検討するために、塩化ナトリウムをもちいて浸透圧を調節した培養を行った結果、乳酸による細胞増殖阻害の主要原因が浸透圧上昇にあることが示された。また増殖阻害と、グルコース比消費速度に対する乳酸比生産速度の比との関係を解析した結果、乳酸自身による乳酸生成の阻害が認められた。

抗体生産に関しては、抗体比生産速度を最大にする浸透圧が存在し、抗体比生産速度と比増殖速度の関係を考察することによって、抗体生産を最大とする比増殖速度を明らかにした。

第2章では、アミノ酸強化の影響について検討し、培養中において消費されるアミノ酸(Asp, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Val, Thr, Gln)の細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響について静置培養を用いて検討した。その結果、グルタミン濃度を強化した場合のみ抗体比生産速度

が増大した。そこで、グルタミンの抗体生産に及ぼす影響を定量的に検討するために、グルコース濃度を指標としてグルコース、グルタミンの2基質の濃度を一定に保つ流加培養法を開発し、この方法を用いてグルタミン濃度の影響を検討した。グルコース濃度0.9 g/L、グルタミン濃度0.4~33.3 mMの範囲で検討した結果、比増殖速度はグルタミン濃度の増加にともなうやや低下するが、抗体比生産速度は上昇し、グルタミン濃度25mM付近で最大値を示した。さらに、高グルタミン濃度下における細胞の大きさを測定した結果、高グルタミン濃度では細胞の大きさが通常培地に比較して大きくなっている事が示された。

3章では、ハイブリドーマの無血清培養における重要な因子である成長因子の影響について検討した。その結果、トランスフェリンおよびインシュリンは細胞の増殖に顕著に影響することが示された。しかし、両因子とも抗体生産に関してはまったく影響を及ぼさなかった。また、分離膜を用いた灌流培養において、トランスフェリンは槽内に保たれると同時にその活性も維持され、その連続供給の必要性は認められなかったが、インシュリンは分子量が小さいため、系外に排出されると同時に分解もおこることから連続供給することが必要であった。

また、B S Aの細胞増殖、抗体生産に及ぼす影響を静置培養、灌流培養を用いて検討した。その結果、静置培養においてはB S Aを上昇させても抗体生産、細胞増殖に影響を及ぼさなかったが、分離用ホロファイバーを用いて系内にB S Aをとじ込めた灌流培養の場合のみ、B S A 2 g/Lの培地を連続添加した場合、B S Aを添加しない場合に比較して約5倍、5 g/Lの添加の場合には約22倍の著しい抗体生産増強が示された。

第4章では、グルコース律速の連続培養を用いて増殖期（回分時）と定常期（連続時）における細胞状態、収率の変化および抗体生産に及ぼす細胞周期分布の影響について検討した。その結果、細胞はグルコース律速の連続状態においてグルコースあたりの細胞収率が上昇することが示された。さらに、グルコース律速状態を維持して操作すれば供給基質あたりの抗体生産が大きくなることが示唆された。また、この原因についてフローサイトメーターおよび乾燥細胞重量、元素分析をもちいて解析した結果、細胞の大きさ、重さの減少、グルコース利用の効率の上昇、がグルコース律速条件下における細胞収率の上昇に関与していることが示された。

また、連続培養時における細胞周期分布を測定した結果、比増殖速度が低い場合に抗体

比生産速度が高くなり、G0+G1期の割合が増加した。さらに、フジツを用いた静置培養実験より、G0+G1期の割合を増加させると抗体比生産速度が上昇することが示された。

第5章では、培養用及び分離用ホロファイバーユニットを有する培養システムによるハイブリドーマ培養について検討した。約60日間にわたる2回の連続培養の結果、細胞濃度は通常の回分培養の約50倍に相当する 5×10^7 個/mLにまで上昇した。さらに、この培養における培養終了時(61日目、および64日目)の細胞数および培養中のグルコース消費速度、乳酸生産速度を用いて、この培養におけるグルコース、乳酸比生産速度を算出し、ホロファイバー培養初期における比速度の値と比較した。その結果、ホロファイバー培養終了時には、グルコース比消費速度、乳酸比生産速度は培養初期に比較して約1/3に低下していた。

また、ホロファイバー培養におけるBSA添加の影響について検討した結果、灌流培養同様、BSAの連続添加が抗体生産を著しく増強した。また、抗体生産速度を灌流培養と比較した結果、BSAによる抗体生産増強効果は灌流培養に比較してホロファイバーでは3倍になった。

さらに、これまで得られた知見に基づいて、ホロファイバー培養システムによる抗体生産について考察した。その結果、抗体生産に最適な供給培地中の基質濃度、供給流量が存在し、用いたホロファイバー培養システムで実生産に十分な性能を発揮できることが示された。

使用記号

- Ab ;抗体濃度 (g/L)
- C ;溶存酸素濃度 (mol/L)
- C* ;飽和溶存酸素濃度 (mol/L)
- D ;希釈率 (1/h)
- F ;培地流入速度 (L/h)
- F₀ ;サンプリングによる培地引抜速度 (L/h)
- G ;グルコース濃度 (g/L)
- Gln ;グルタミン濃度 (mol/L)
- K_d ;比死滅速度 (1/h)
- k_G ;グルタミン自然分解定数 (1/h)
- k_{L,a} ;酸素移動容量係数 (1/h)
- K_{i,ac} ;乳酸阻害定数 (mM)
- \bar{L} ;平均乳酸濃度 (g/L)
- L*_i ;i番目の流加区間における目標乳酸濃度 (g/L)
- m ;重量モル濃度 (mol/kg)
- n ;乳酸阻害モデル次数
- V ;培地容量 (L)
- V_A ;溶媒の部分モル体積 (L/mol)
- Q_{o₂} ;酸素比消費速度 (mol/cell·h)
- R ;気体定数(=0.08206 (L·atm/K·mol))
- R_G ;グルコース消費速度 (g/h)
- R_L ;乳酸生産速度 (g/h)
- R_{Ab} ;抗体生産速度 (g/h)
- T ;絶対温度 (K)
- X_t ;全細胞濃度 (cells/L)
- X_v ;生細胞濃度 (cells/L)
- w_A ;溶媒の分子量 (g/mol)

Greek letters

- α ; グルコース、乳酸に関する流束 (L/h)
 μ ; 生細胞基準の比増殖速度 (1/h)
 μ_m ; 生細胞基準の比増殖速度の最大値 (1/h)
 ν ; 溶質 1 分子が解離して生じるイオンの数
 ν_G ; グルコース比消費速度 (g/cell·h)
 ν_{Gln} ; グルタミン比消費速度 (mol/cell·h)
 ρ_{Ab} ; 抗体比生産速度 (g/cell·h)
 ρ_{Am} ; アンモニア比生産速度 (mol/cell·h)
 ρ_L ; 乳酸比生産速度 (g/cell·h)
 π ; 浸透圧 (atm)
 ϕ ; 浸透係数
 ϕ_G ; グルコースの物質交換量 (g/h)
 ϕ_L ; 乳酸の物質交換量 (g/L)

subscripts

- 0 ; 初期値
1 ; 灌流培養に於ける培養槽内値
2 ; 灌流培養に於ける沈降管内値
E ; ホファイバー培養に於けるEC側の値
f ; 流加培地中の値
I ; ホファイバー培養に於けるIC側の値
r ; 灌流培養に於ける分離膜からの戻り値
out ; 灌流培養に於ける分離膜を通して拔出される値

引用文献

- 1)赤木忠厚他、1982、組織培養の技術（日本組織培養学会編）、1-5、朝倉書店、東京
- 2)光木浩司、源良樹、1985、細胞培養技術（杉野幸夫編）、77-124、講談社、東京
- 3)村上浩紀、1986、細胞制御技術（村上浩紀編）、163-169、学窓社、東京
- 4)Kohler, G., Milstein, C. 1975. *Nature*, 256:495-497
- 5)Harrison, R. G. 1907. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 4:140-143
- 6)Evans, V. J., Bryant, J. C., Fioramonti, M. C., McQuilkin, W. T., Sanford, K. K., Earle, W. R. 1956. *Cancer Res.* 16: 77-86
- 7)Eagle H. 1959. *Science*, 130:432-437
- 8)黒田行昭、1984、細胞成長因子-Growth Factors-（日本組織培養学会編）、217-221、朝倉書店、東京
- 9)加治和彦、1989、無血清細胞培養マニュアル（大野忠夫、村上浩紀編）、1-13、講談社、東京
- 10)Ham R. G., 1974, *In Vitro*, 10:119-129
- 11)Hayashi, I., Sato, G. H., 1976. *Nature* 259:132-134
- 12)Bottenstein, J., Hayashi, I., Hutchings, S., Masui, H., Mather, J., McClure, D. B., Ohasa, S., Rizzino, A., Sato, G., Serrero, G., Wolfe, R., Wu, R. 1979. In: W. B. Jakoby and I. H. Pastan (ed.) *Methods in Enzymology* vol. LVIII. pp. 94-109 Academic Press, London.
- 13)Murakami, H., Masui, H., Sato, G. H., Sueoka, N., Chow, T. P., Sueoka, T. K. 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1158-1162.
- 14)村上浩紀、下村猛、中村卓二、大橋秀哉、篠原和毅、大村浩久、1984、日本農芸化学会誌、58:575-583
- 15)佐藤征二、藤吉宣男、1985、細胞培養技術（杉野幸夫編）、125-158、講談社、東京
- 16)Himmelforb, P., Thayer, P. S. 1969. *Science*, 164:555-557
- 17)Tolbert W. R., and Feder, J. 1983. *Annual Reports on Fermentation Process.* 6: 35-74
- 18)佐藤征二、1988、細胞工学 別冊4:35-47
- 19)渡嘉敷通之、1990、京都大学博士論文

- 20) Kanazek, R. A., Gullino, P. M., Koler, P. O., Dedrick, R. L. 1972. *Science*, 178: 65-67.
- 21) Ku, K., Kuo, M. J., Delente, J., Wild, B. S., Feder, J. 1981. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 79-95
- 22) Hopkinson, J. 1985. *Bio/technology*, 3:225-230
- 23) Altshuler, G. L., Dziewulski, D. M., Soweck, J. A., Belfort, G. 1986. *Biotechnol. Bioeng.* 28:646-658
- 24) Tharakan, J. P., Chau, P. C. 1986. *Biotechnol. Bioeng.* 28:329-341
- 25) Shirai, Y., Hashimoto, K., Yamaji, H., Tokashiki, M. 1987. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:495-499.
- 26) Iijima, S., Mano, T., Taniguchi, M., Kobayashi, T. 1988. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:572-516
- 27) King, G. A., Daugulis, A. J., Faulkner, P., Goosen, M. F. A. 1987. *Biotechnol. Progress.* 3:231-240
- 28) Birch, J. R., Cartwright, T. 1982. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32:313-317.
- 29) Taya, M., Mano, T., Kobayashi, T. 1986. *J. Ferment. Technol.* 64:347-350
- 30) Glacken, M. W., Adema, E., Sinskey, A. J. 1988. *Biotechnol. Bioeng.* 32:491-506
- 31) Miller, W. M., Blanch, H. W., Wilke, C. R. 1988. *Biotechnol. Bioeng.* 32:947-965
- 32) Miller, W. M., Wilke, C. R., Blanch, H. W. 1989. *Biotechnol. Bioeng.* 33:477-486
- 33) McQueen, A., Bailey, J. E. 1990. *Biotechnol. Bioeng.* 35:897-906
- 34) McQueen, A., Bailey, J. E. 1990. *Biotechnol. Bioeng.* 35:1067-1077
- 35) Geaugey, V., Duval, D., Geahel, I., Marc, A., Engasser, J. M. 1989. *Cytotechnology* 2:119-129
- 36) Jo, E., Park, H., Park, J., Kim, K. 1990. *Biotechnol. Bioeng.* 36:717-722
- 37) Sugahara, T., Yamada, K., Murakami, H. 1991. *Cytotechnology* 5:255-263
- 38) Bibilia, T., Flickinger, M. C. 1991. *Biotechnol. Bioeng.* 37:210-216
- 39) Bibilia, T., Flickinger, M. C. 1991. *Biotechnol. Bioeng.* 38:767-780
- 40) Frame, K. K., Hu, W. -S., 1990. *Biotechnol. Bioeng.* 36:191-197
- 41) Goebel, N. K., Kuehn, R., Flickinger, M. C. 1990. *Cytotechnology* 4:45-57
- 42) Griffiths, J. B. 1987. *Develop. Biol. Standard.* 66:155-160.

- 43)竹沢健一、1987、大阪大学修士論文
- 44)岩崎辰夫、安東民衛、市川かおる、保井孝太郎、1983、単クローン抗体 ハイブリドマとE LISA、講談社、東京
- 45)千葉丈、1987、単クローン抗体実験マニュアル(富山朔二、安東民衛編)、105-121、講談社、東京
- 46)千葉丈、1987、単クローン抗体実験マニュアル(富山朔二、安東民衛編)、153-159、講談社、東京
- 47)Kimura, T., Iijima, S., Kobayashi, T. 1987. *J. Ferment. Technol.* 65:341-344.
- 48)Hu, W. S., Dodge, T. C., Frame, K. K., Himes, V. B. 1985. *Develop. biol. Standard.* 66: 279-290.
- 49)Bree, M. A., Dhurjati, P., Geoghegan, R. F. Jr., Robnett, B. 1988. *Biotechnol. Bioeng.* 32:1067-1072.
- 50)Truskey, G. A., Nicolakis, D. P., DiMasi, D., Haberman, A., Swartz, R. W. 1990. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 797-807.
- 51)Robinson, R. A., Stokes, R. H. 1959. *Electrolyte solutions.* Butterworth, London.
- 52)Scrutton, M. C., Utter, M. F. 1968. In: P. D. Boyer (ed.), *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 37. pp. 249-302 Annual Reviews INC., California.
- 53)Holbrook, J. I., Liljas, A., Steindel, S. J., Rossmann, M. G. 1975. In: P. D. Boyer(ed.), *The enzymes*, vol. 11. pp. 191-292 Academic Press, London.
- 54)Miller, W. M., Wilke, C. R., Blanch, H. W. 1987. *J. Cell. Physiol.* 132:524-530.
- 55)Ramirez, O. T., Mutharasan, R. 1990. *Biotechnol. Bioeng.* 36:839-848
- 56)Berg, T. M., Oyaas, K., Levine, D. W. 1990. In: H. Murakami(ed.), *Trends in animal cell culture technology.* pp. 93-97 KODANSHA, Tokyo, VCH, New York.
- 57)Rupp, R. G., Geyer, S. Feb. 9, 1988. United States Patent No. 4, 724, 206.
- 58)Suzuki, E., Ollis, D. F. 1990. *Biotechnol. Prog.* 6:231-236.
- 59)Butler, M., Jenkins, H. 1989. *J. Biotechnol.* 12: 97-110.
- 60)Luan, Y. T., Mutharasan, R., Magee, W. E. 1987. *Biotechnol. Lett.* 9:691-696.
- 61)Tritsch, G. L., Moore, G. E. 1962. *Exp. Cell. Res.* 28: 360-364.
- 62)Lin, A., Agrawal, P. 1988. *Biotechnol. Lett.* 10:695-698.
- 63)Ozturk, S. S., Palsson, B. O. 1990. *Biotechnol. Prog.* 6:121-128.

- 64)Fleischaker, R. J. Jr., Sinskey, A. J. 1981. Eur. J. Appl. Micro. Biotech. 12:193-197.
- 65)Aunins, J. G., Croughan, M. S., Wang, D. I. C., Goldstein, J. M. 1986. Biotechnol. Bioeng. Symp. 17:699-723.
- 66)Fernandez, E. J., Mancuso, A., Clark, D. S. 1988. Biotechnol. Prog. 4:173-183.
- 67)Miller, W. M., Wilke, C. R. Blanch, H. W. 1989. Biotechnol. Bioeng. 33:487-499.
- 68)Flickinger, M. C., Goebel, N. K., Bohn, M. A. 1990. Bioprocess Eng. 5:155-164.
- 69)Newland, M., Greenfield, P. F., Reid, S. 1990. Cytotechnology 3:215-229.
- 70)山根績、1985、細胞培養技術(杉野幸夫編)、1-11、講談社、東京
- 71)Reitzer, L. J., Wice, B. M., Kennell, D. 1979. J. Biol. Chem. 254:2669-2676
- 72)Zielke, H. R., Zielke, C. L., Ozand, P. T. 1984. Federation Proc. 43:121-125.
- 73)Glacken, M. W., Fleischaker, R. J., Sinskey, A. J. 1986. Biotechnol. Bioeng. 28:1376-1389.
- 74)尾崎史郎、1984、細胞成長因子-Growth Factors-(日本組織培養学会編)、112-118、朝倉書店、東京
- 75)佐倉宏、春日雅人、1987、細胞成長因子part II (日本組織培養学会編)、79-82、朝倉書店、東京
- 76)伊井一夫、1984、細胞成長因子-Growth Factors-(日本組織培養学会編)、152-155、朝倉書店、東京
- 77)木村一郎、1987、細胞成長因子part II (日本組織培養学会編)、82-84、朝倉書店、東京
- 78)菅幹雄、1984、細胞成長因子-Growth Factors-(日本組織培養学会編)、155-157、朝倉書店、東京
- 79)Nilausen, K. 1978. J. Cellular Physiology 96:1-14
- 80)Rockwell, G. A., Sato, G. H., McClure, D. B. 1980. J. Cellular Physiology 103:323-331
- 81)Spector, A. A. 1975. J. Lipid Research 16:165-179
- 82)村上浩紀、1987、生体防御、4:139-143
- 83)赤木忠厚他、1982、組織培養の技術(日本組織培養学会編)、13-18、朝倉書店、東京
- 84)CELL FIT™ Software User's Guide, 1990, pp.115-117, Becton Dickinson, CA

- 85)霜田正実、松村正利、片岡廣、1991、化学工学論文集、17:642-648
- 86)Turner, K. J., Plozza, T. M., Holt, P. G. 1985. *Clinical Immunology and Immunopathology* 36:212-216
- 87)Watanabe, S., Yagi, Y., Pressman, D. 1973. *J. Immunology* 111:797-804
- 88)Al-Rubeai, M., Emery, A. N. 1990. *J. Biotechnology* 16:67-86
- 89)牧島房夫、1991、細胞とバイオサイエンス I (日本組織培養学会編)、77-120、朝倉書店、東京
- 90)Perry, S. D., Wang, D. I. C. 1989. *Biotechnol. Bioeng.* 34:1-9
- 91)Shirai, Y., Hashimoto, K., Yamaji, H., Kawahara, H. 1988. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:113-118
- 92)Frame, K. K., Hu, W. -S., 1991. *Biotechnol. Bioeng.* 37:55-64
- 93)Nayve, F. R. P. Jr., Motoki, M., Matsumura, M., Kataoka, H. 1991. *Cytotechnology* 6:121-130
- 94)谷口克、若林正治、1986、モノクローナル抗体 (杉野幸夫編)、129-176、講談社、東京

本論文に関連する報告

1. Effect of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation
Takeshi Omasa, Ken-ichi Higashiyama, Suteaki Shioya and Ken-ichi Suga:
Biotechnology and Bioengineering Vol. 39 (1992) (in press)
2. The enhancement of specific antibody production rate in glucose- and glutamine-controlled fed-batch culture
Takeshi Omasa, Masaru Ishimoto, Ken-ichi Higashiyama, Suteaki Shioya and Ken-ichi Suga:
Cytotechnology submitted
3. The enhancement effects of antibody production on the perfusion and hollow-fiber culture system
Takeshi Omasa, Masaki Kobayashi, Toshio Nishikawa, Suteaki Shioya and Ken-ichi Suga:
in preparation
4. The change of cell yield and antibody production in glucose-limited continuous hollow-fiber culture
Takeshi Omasa, Masaki Kobayashi, Toshio Nishikawa, Suteaki Shioya and Ken-ichi Suga:
in preparation

謝 辞

本研究に対して終始ご懇篤なるご指導を賜りました菅 健一教授に心から感謝の意を表します。さらに、本研究の進行に際し、絶えずご指導と激励を賜りました塩谷捨明助教授に感謝の意を表します。

また、有益なご助言とご鞭撻を賜りました大嶋泰治教授、山田靖宙教授、高野光男教授、吉田敏臣教授、今中忠行教授、二井将光教授に深く感謝致します。

併せて、有益なご助言と激励を頂いた、元大阪大学助教授江夏俊郎先生、現北海道大学木下晋一教授、清水 浩博士に厚く感謝致します。

RDF-ITES培地について御教授を賜りました京都大学工学部化学工学科白井義人先生、フローサイトメトリー分析について御指導、御助言を頂きました大阪大学微生物病研究所中村浩治郎先生、東京大学工学部化学工学科牧島房夫先生に感謝致します。また、ホロファイバー培養装置をご提供頂き、さらに、ホロファイバー培養について共同研究者として御指導、御助言頂きました東洋紡績株式会社、今村嘉男氏、気谷康夫氏、上村影一氏に深く感謝致します。

本研究の共同研究者として御協力頂きました西川登志夫氏、東山堅一氏、小林正樹氏、石元 勝氏、加藤 学氏、柴田慎也氏に感謝するとともに佐藤陽子さんを始めとする大阪大学応用生物工学科菅研究室の皆様に深く感謝致します。

最後に本研究の遂行にあたり生活面、経済面において惜しみないご協力、励ましを頂きました父、大政光三、母、大政恭子に心より感謝致します。