

## 培養バッグを用いたモノクローナル抗体の生産方法の検討

■ なかい ようこ<sup>1)</sup> ・ みたむら さとし<sup>1)</sup>  
 中井 陽子<sup>1)</sup> ・ 三田村 聡<sup>1)</sup>  
 すずき いくみ<sup>2)</sup> ・ まなべ さちこ<sup>3)</sup>  
 鈴木 育美<sup>2)</sup> ・ 眞鍋 幸子<sup>3)</sup>

- 1) バイオゲート株式会社  
 2) 株式会社フコク  
 3) メデイリッジ株式会社



中井 陽子

2004年 岐阜大学農学部 卒業  
 2008年 バイオゲート株式会社に入社  
 主にバイオ関連受託サービス業務の担当責任者。  
 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞作製、  
 ポリクローナル抗体作製など抗体のスペシャリスト  
 として腕を磨く傍ら、品質管理責任者としてGMP  
 製造管理を実施している。  
 今後は、「抗体、タンパク質」をキーワードに、組  
 換えタンパク質・抗体の作製や抗体製造、そこか  
 ら派生する技術の応用発展に取り組んで行こうと  
 意欲を燃やしている。趣味は登山。

Key words : ハイブリドーマ細胞培養, バッグ培養,  
 モノクローナル抗体, 抗体製造

### Abstract

ハイブリドーマ細胞の培養方法として、Tフラスコ法やローラーボトル法などが広く使用されているが、中規模培養に不向きであることや新たな設備投資が必要であるという問題点があった。これらに替わる方法を探していた所、株式会社フコクの協力を得て、2種類の材質の異なるバッグ(PE製, EVA製)を比較検討する機会が得られた。そのため、これらのバッグを使用して自社で取得したハイブリドーマ細胞の培養を実施し、細胞増殖や抗体産生量などを比較した所、2種類の材質のバッグともハイブリドーマ細胞の培養に使用できることが確認できた。更にEVA素材のバッグについては、ガス透過性が高いことから長時間にわたり細胞増殖が良好で、その結果、抗体産生も良好であるという結果が得られた。

### はじめに

近年、モノクローナル抗体(Mab)<sup>1)</sup>は、診断や研究用ツールのみならず、治療用としても一般的に使用されるようになってきた。

Mabの取得方法は、ファージディスプレイ法を用いて取得した抗体遺伝子をCHO細胞に導入しMabを発現する方法もあるが、動物に免疫をしてMab産生細胞をミエローマ細胞と

融合してハイブリドーマ細胞を取得する方法も種々の利点があり、広く使われている。

Mabの取得については、以前は、診断や研究用の抗体の生産は、安価で且つ濃度の高い抗体が得られることからマウスの腹腔で細胞を培養して抗体を取得する方式が用いられることが多かったが、最近では、動物愛護の観点から、細胞培養法が推奨されている。

また、EUを中心に動物を使用した抗体生産が制限されていることから、特にEUを中心とする海外への抗体や研究用試薬または体外診断用医薬品の輸出を考えるとときには、細胞培養法での生産が必須である。

我々は、診断薬や製薬企業またはアカデミアの研究者向けにMab産生のハイブリドーマ細胞を受託で作製しているが、評価用のMabの取得のための小規模多品種製造には、Tフラスコを用いて実施していた。そのため、顧客から抗体の中規模生産(数L~10L規模)の生産の要望がある場合、Tフラスコでは、手間と価格の点で要望には対応が難しく、ローラーボトル法の導入には新たな架台や恒温室などの設備投資が必要になるため、細胞培養

Study of monoclonal antibody production method by culture bag :  
 Yoko Nakai<sup>1)</sup>, Satoshi Mitamura<sup>1)</sup>, Ikumi Suzuki<sup>2)</sup>, Sachiko Manabe<sup>3)</sup>  
 1) BioGate., Ltd 2) Fukoku Co., Ltd 3) Mediridge Co., Ltd

表1 使用したハイブリドーマ細胞のクローン番号と抗体サブクラス

クローン 番号	抗体サブクラス
D	IgG <sub>1</sub> 、κ
E	IgG <sub>1</sub> 、κ
A	IgG <sub>2b</sub> 、κ

法の中規模生産の対応に関して検討の必要を感じていた。

培養バッグを利用した培養法であれば、従来保有している設備であるインキュベータを有効活用して中規模生産の目的を達成することが可能である。そこで、筆者らは、活性化リンパ球療法用途などに使用されている培養バッグを用いて Mab が産生できるかどうか、従来法に比較して産生量に遜色があるかどうかなどを含めて、比較検討することにした。その結果を本稿に示す。

## 1. 材料および方法

### 〈使用機器〉

CO<sub>2</sub> インキュベータ (SANYO 社製)

### 材料

① 細胞：同一抗原から選択・樹立したハイブリドーマ細胞 3 種類 (表1)。

② 培養バッグ 2 種類 (株式会社フコク製)

・ B バッグ TC (EVA バッグ)

・ B バッグ EL (PE バッグ)

600cm<sup>2</sup> (1L) バッグ培養バッグは、2 種類の材質のものを検討した (図1)。

材質は、エチレン酢酸ビニル共重合体 (EVA と略す) および可塑剤の溶出を抑えたポリエチレン (PE と略す) である。

どちらの材質のバッグも、活性化リンパ球

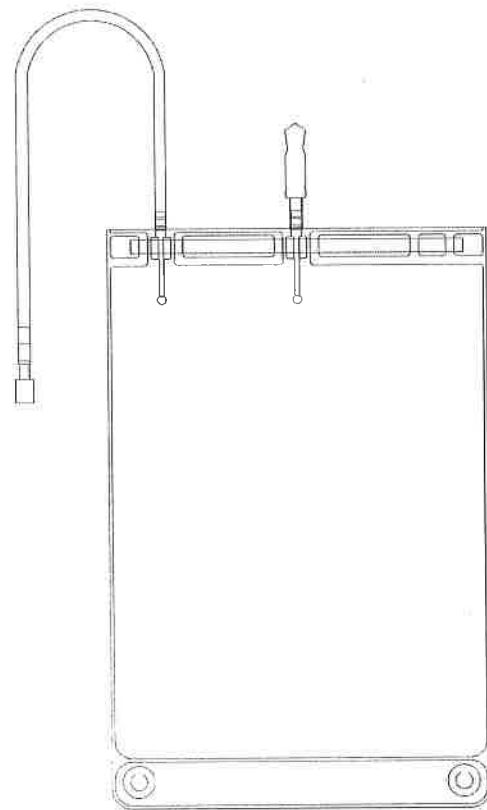


図1 フコク製培養バッグ

療法用として実用的に使用されている。

PE バッグは、既に抗体取得用として検討された実績がある<sup>2)</sup>。

EVA バッグの特徴は、よりガス透過性が高いことにある。

③ T フラスコ (225cm<sup>2</sup> 住友ベークライト社製)

T フラスコは、スケールアップ時の初期培養と、初回培養時の 500mL までの生産に使用した。

④ ローラーボトル (850 cm<sup>2</sup> コーニング社製)

材質は、ポリスチレン製。細胞培養用の表

面処理がされている。

## ⑤ 培地

- ・ 10% FBS 添加 RPMI 培地 (GIBCO 社製)
- ・ ハイブリドーマ SFM (無血清培地 :  
GIBCO 社製, GlutaMax 添加)

## ⑥ 精製担体

プロテイン G (GE ヘルスケア社製)

## 〈方法〉

### 培養

#### ① T フラスコ法

それぞれ 500mL ずつ 10%FBS 含有 RPMI 培地で培養し、抗体産生時にハイブリドーマ SFM に置換して生存率が 10% 以下に低下するまで培養を実施し、回収して、最終的にはプロテイン G を用いてアフィニティ精製を実施した。

#### ② ローラーボトル法

上記 3 クローンのうちのクローン名 A について、ローラーボトル法にて 5L 培養を実施した。培養に先駆けてハイブリドーマ SFM 培地に無血清馴化培養を実施した。

#### ③ バッグ培養法

培養に先立ち、ハイブリドーマ SFM 培地に無血清馴化培養を実施した。

上記 3 クローンの細胞を用いて、材質による抗体産生の比較検討のために EVA および PE の 2 種類の材質のバッグを使用して培養を実施した。

培養環境は、37℃, CO<sub>2</sub> 5% (v/v) の培養条件で CO<sub>2</sub> インキュベータ内に 6 × 10<sup>6</sup> cells/30mL を各培養バッグに入れて 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 下で静置培養をした。

スケールアップについては、細胞密度が 2 × 10<sup>6</sup> cells/mL なるまで培地を添加しながら培養を実施し、スケールアップから抗体産生培養に移行してからは、生存率 10% 以下になることを目安に培養を継続した。生存率については、生/死細胞数はトリパンブルー色素排除法によりカウントした。また、セルカウントは連続した 5 日間について実施した。

バッグについては、クローン D とクローン E はそれぞれ EVA バッグ 2 個, PE バッグ 3 個の培養を実施し、クローン A については EVA バッグ 1 個, PE バッグ 4 個の培養を実施した。

抗体収量については、バッグごとにプロテイン G 精製を実施し、各バッグの抗体収量の比較を実施した。

## 2. 結果

### ① それぞれの方法での産生量の比較 (表 2)

#### ② バッグ培養法

##### タイムコース

各クローンを培養したバッグ毎の細胞増殖の経過を図 2 ~ 4 に示す。

表 2 各培養法での抗体産生量の比較 (平均値) (mg/L)

クローン名	バッグ培養法	バッグ培養法	ローラーボトル法	T フラスコ法 (参考値)
	EVA	PE		
D	15.66	11.81	—	6.66
E	13.88	10.73	—	7.32
A	3.15	2.63	1.48	6.08

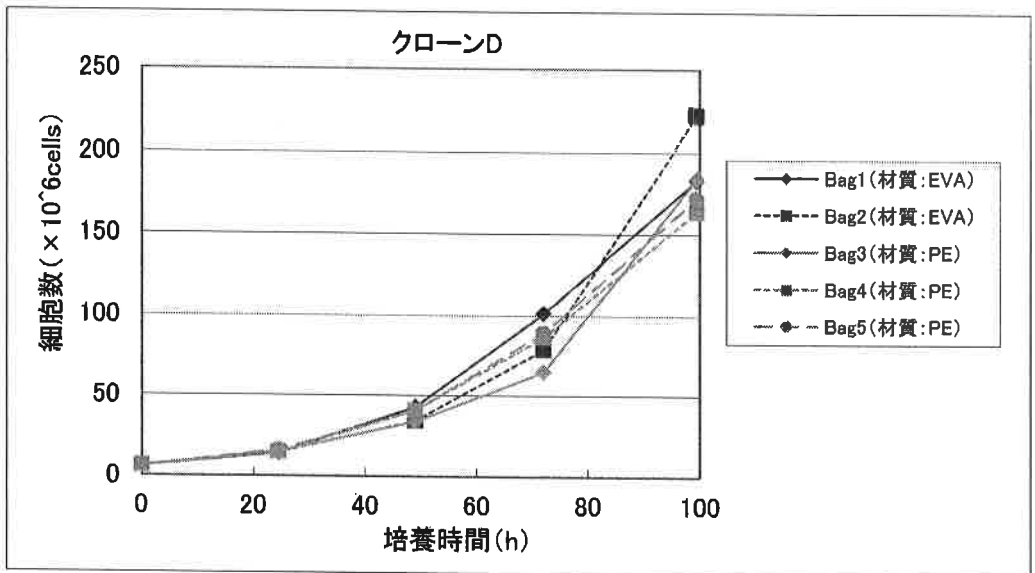


図2  
細胞数推移  
クローンD

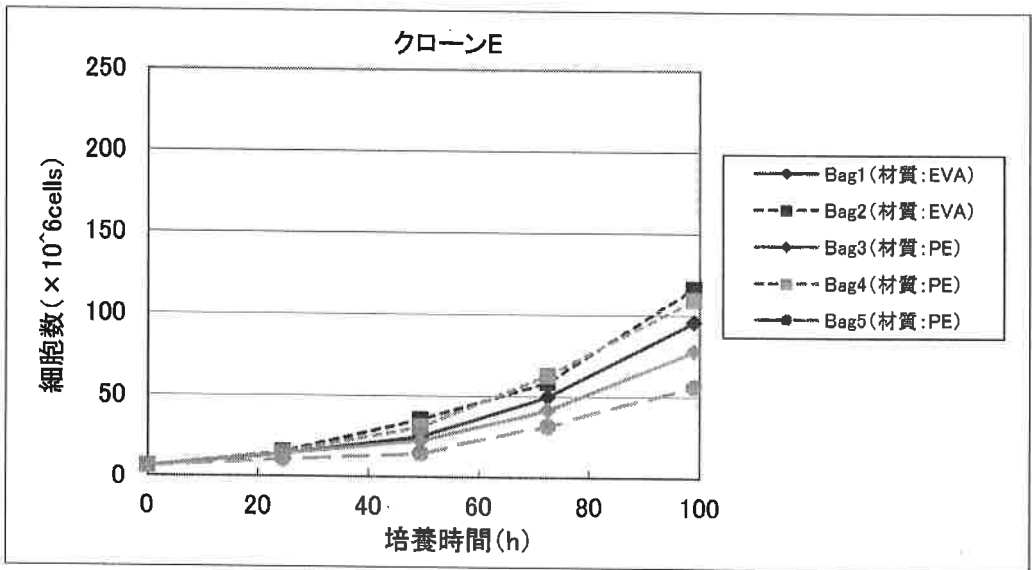


図3  
細胞数推移  
クローンE

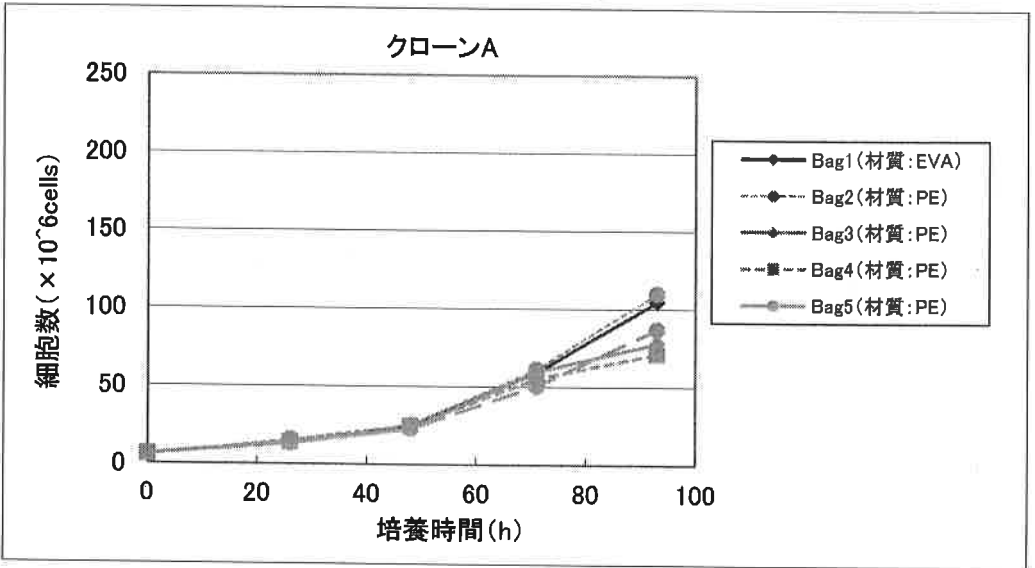


図4  
細胞数推移  
クローンA

細胞の増殖は、クローンDおよびクローンEは、どのバッグも同じような割合で推移したが、培養時間が長くなるにつれてバッグの材質PEの方は、細胞の増殖が頭打ちになるような傾向が見られた。

クローンAについては、更にバッグ材質による増殖の差が大きく、培養約70時間を境にバッグ材質PEの方の細胞の増殖率が明らかに低くなっている。

また、図5～7に各クローンについて、バッグ毎の抗体収量を示した。

クローンの性質の差で、クローン毎の抗体収量に差があるものの、すべてのクローンでバッグの材質EVAの方の抗体収量(平均値)が20%～33%高く、良好であるという結果となった。

図5 抗体収量 クローンD

	抗体収量(mg/Bag)	Bag 毎の平均値	EVA/PE
Bag1 (材質: EVA)	13.14	15.66	1.33
Bag2 (材質: EVA)	18.18		
Bag3 (材質: PE)	12.92	11.81	
Bag4 (材質: PE)	9.90		
Bag5 (材質: PE)	12.6		

図6 抗体収量 クローンE

	抗体収量(mg/Bag)	Bag 毎の平均値	EVA/PE
Bag1 (材質: EVA)	16.74	13.88	1.29
Bag2 (材質: EVA)	11.02		
Bag3 (材質: PE)	10.00	10.73	
Bag4 (材質: PE)	10.45		
Bag5 (材質: PE)	11.73		

図7 抗体収量 クローンA

	抗体収量(mg/Bag)	Bag 毎の平均値	EVA/PE
Bag1 (材質: EVA)	3.15	3.15	1.20
Bag2 (材質: PE)	2.83	2.63	
Bag3 (材質: PE)	2.90		
Bag4 (材質: PE)	2.64		
Bag5 (材質: PE)	2.16		

### 3. 考 察

今回の目的は、T フラスコ法やローラーボトル法に替わる培養方法としてバッグ培養法を用いるための検討である。T フラスコ法は無血清馴化なしで抗体産生培養時のみ無血清置換をし、バッグ培養法は無血清馴化を実施したが、その結果と比較してクローン D と E は収量においてバッグ培養の方が良好であった。

クローン A については、無血清馴化によって無血清培地との相性が合わず収量が減っている可能性が示唆されるために単純に培養法として比較できない。しかしながら、EVA 素材のバッグのガス透過性が高いことにより、細胞増殖が比較的長期にわたり持続することによって、収量が増えた可能性が高いと考えられた。

ローラーボトル法については、やや癖のあるクローンだと思われるクローン A の 1 クローンしか実施していないため一概には言えないが、バッグ培養法はローラーボトル法と比較して同

等以上の結果であった。これについては、クローンの性質の問題もあると考えている。

今回の検討の結果、バッグ培養法で特に EVA 素材のものについては、ガス交換性が高いことから、細胞の増殖が培養後期にかけても良好で、結果的に収量の増加に結び付く可能性が高いことが分かったことから、抗体の中規模製造に適することが分かった。このため、今後の細胞培養法での抗体生産の要望にはバッグ培養法 (EVA 素材) を使用していきたいと思っている。

また、現在は、ハイブリドーマ細胞の培養だけでなく、バイオ医薬品研究の拡大に伴い、組換え哺乳動物細胞の培養による抗体取得も増加してきていることから、今後は、CHO 細胞等の培養による抗体取得に関しても検討していきたいと考えている。

#### 文 献

- 1) Köhler, G. and Milstein, C.: Nature, 256, 495-497 (1975).
- 2) 関根 俊昭 他: 生物工学会誌 第 87 巻 第 9 号 437-441. 2009

☆ ☆ ☆