

## ■技術講座

## 細胞培養培地を長持ちさせる方法—酸素補給水を用いて

### 第2報 酸素補給水による CHO 細胞の増殖、生存率及び抗体産生量の検討

松本 高明<sup>1,2)</sup>, 萩原 敏且<sup>1,2)</sup>, 松本 美弥子<sup>1,2)</sup>

#### 要 旨

弊社が独自の方法で開発した酸素補給水を細胞培養用培地の溶解液に用い CHO 細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）の増殖、生存率および抗体産生への効果を検討した。その結果、対照と比較して良好な成績が得られ、酸素補給水の CHO 細胞培養培地における有用性が示された。

**Key words** 酸素補給水 (WOX), CHO 細胞, 抗体産生量

(WAARM Journal, 2020; 3: 40-42)

#### はじめに

前報<sup>1)</sup>において酸素補給水を細胞培養培地の溶解液として用い CHO 細胞<sup>2)</sup>の増殖および生存率を検討した結果、培養液の液換えを行わなくても8日間継続して培養できる成績を報告した。

本報告は前報<sup>1)</sup>で用いた酸素補給水の性状が安定して使用できるか確認するため、製造日の異なる酸素補給水と対照として2種類の純水を培養液として用い抗体医薬品の製造に有望な CHO 細胞<sup>3)</sup>の増殖、生存率及び抗体産生量について検討した。

酸素補給水を細胞培養用培地として CHO 細胞の浮遊培養に使用した目的についてはすでに前報<sup>1)</sup>で報告した。

#### 材料および方法

材料および方法は前報<sup>1)</sup>に準じた。実験は極東製薬工業株式会社の協力で実施した。

細胞は CHO 細胞 DP-12 遺伝子組み換えヒト IgG 産生株を用いた。

培地は極東製薬工業株式会社製 無血清、無タンパク CHO 細胞用を使用した。

培地の溶解液は製造後24ヵ月と2ヵ月の酸素補給水（製品名：WOX<sup>®</sup>）と極東製薬製のミリQ水と

酸素補給水の原水である RO 水（逆浸透膜処理水以下 RO 水）を対照とした。培養液 25ml と  $3 \times 10^5$  cell/ml に調整した細胞を混合し 37℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下で振盪攪拌培養を行った。

細胞の増殖および生存率は前報<sup>1)</sup>と同様、細胞数は血球計算盤で測定し生存率の測定はトリパン青染色液を用いて検索した。

抗体産生量の測定は培養11日目の培養上清を採取し、ヒト IgG 抗体を酵素免疫測定法 (EIA KIT) で測定した。

#### 結果および考察

##### 細胞の増殖

製造日の異なる酸素補給水群（B 群：24ヵ月後、C 群：2ヵ月後）と2種類の対照群（A 群：ミリQ水、D 群：RO 水）について細胞の増殖を調べた。

前報<sup>1)</sup>と同様に培養4日までは酸素補給水群と対照群の細胞数の差異はみられなかった。しかし8日目以後も酸素補給水群では細胞が増殖した。対照群と比較して細胞の増殖様式に明らかな違いが認められた。さらに、培養液の液換えも行わずに11日まで酸素補給水を用いて培養した細胞数は、培養8日目の細胞数と同様に対照と比較して約2倍の細胞数の増加が観察された（図1）。

<sup>1)</sup> メディサイエンス・エスポア株式会社

<sup>2)</sup> 特定非営利活動法人 QOL サポート研究会

連絡先 住所：〒212-0027 神奈川県川崎市幸区新塚越 1-2 2-502 電話：044-511-2214 e-mail：matsumoto@espoir.com

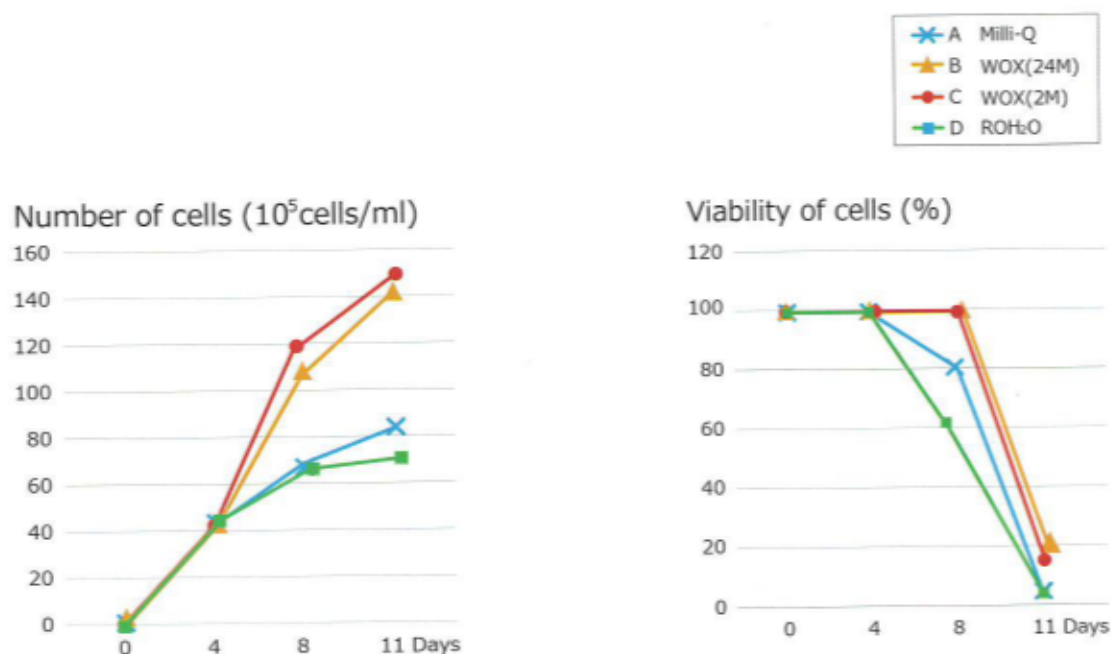


図1 細胞の増殖と生存率の比較検討

### 細胞の生存率

細胞の生存率についても細胞の増殖と同様な成績を得た。細胞の生存率を測定すると培養4日までの成績は両群で差異がみられないが、8日目では対照群の生存率は減少した。培養11日目では酸素補給水群でも生存率は低下したが、対照群と比較すると減少率の違いは明らかであった。(図1)

### 抗体産生量

培養液の液換えをせずに11日まで酸素補給水で培養したCHO細胞の抗体産生量が対照と異なるか培養上清を採取し抗体産生量を測定した。

製造日の異なる酸素補給水群と種類の異なる純水の対照群とを比較検討した結果、酸素補給水がCHO細胞の抗体産生量の上昇に効果を与えていることが判明した(図2)。しかしながら、細胞あたりの抗体産生量では対象群より低い値を示した(図2)。このことは酸素補給水を用いた培地では増殖した細胞が非常に多くなり、細胞が過密状態になったことに起因すると考えられた。したがって、細胞数と抗体産生量との関係等、今後更なる検討が必要である。

本報告は、製造後24ヵ月と2ヵ月の酸素補給水を用いて、酸素補給水が細胞培養の培地液として有効

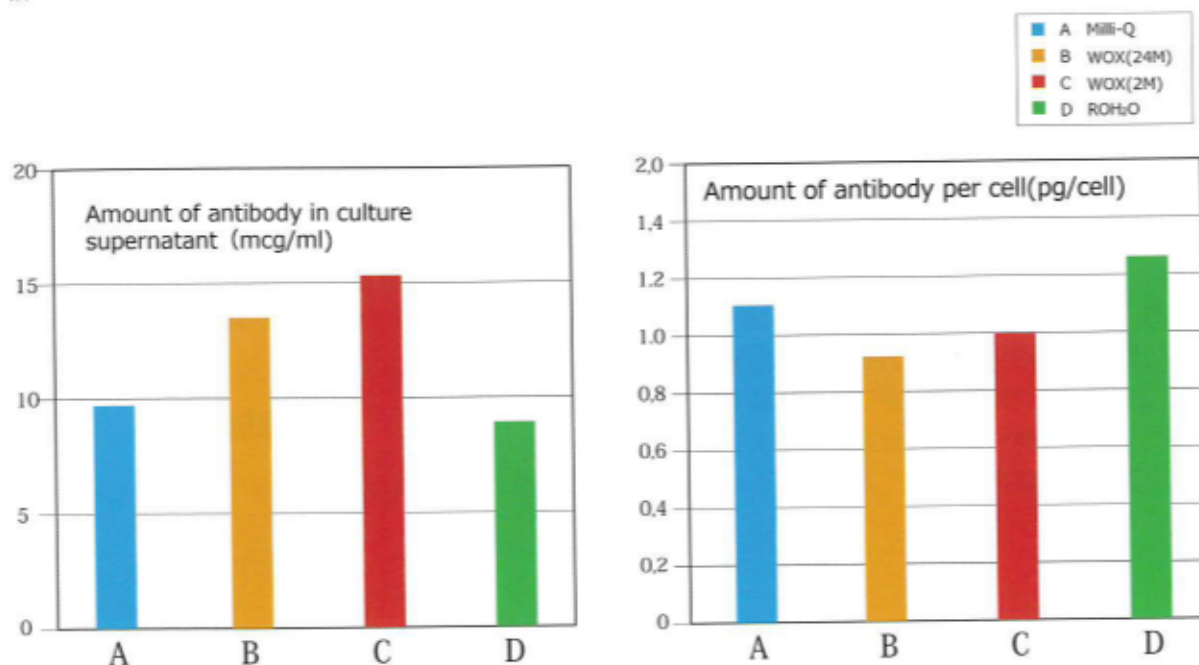


図2 細胞の抗体産生量の比較検討

であるかを CHO 細胞の増殖と生存率、更に抗体産生量から検討した結果である。酸素補給水は製造後の期間の違いにもかかわらず性状が安定し、長期保存もできる細胞培養に有効な製品であることが確認された。

現在、CHO 細胞は動物細胞のなかでも抗体医薬品の製造に用いられ<sup>4)</sup>、近年国産の CHO 細胞の新規樹立<sup>5)</sup>が報告された。今後抗体医薬品の製造、開発には CHO 細胞の有用性が評価され、進展が期待されている。

本報は酸素補給水を無血清、無タンパクの培地の溶解液として、CHO 細胞の培養に用い細胞の増殖、生存率、抗体産生量について検討した。細胞当たりの抗体産生量については解決されていないが、CHO 細胞の浮遊細胞の培養に必要な酸素補給<sup>6)</sup>及び酸素補給装置<sup>7)</sup>を用いる必要もなく酸素補給水が細胞培養培地の溶解液として利用され、抗体医薬品の製造や開発への有利な一つの技術法になることを期待してやまない。

さらに、CHO 細胞のみならず、他の細胞の培養にも酸素補給水が使用されることにより、手間のかかる細胞培養が容易になることを期待している。

## 謝 辞

本報告にご協力をいただきました板東製薬工業株式会社に深謝いたします。

## 利益相反自己申告

申告すべきものはありません。

## 参考文献

- 1) 松本高明, 萩原敏且, 松本美弥子. 細胞培養培地を長持ちさせる方法 - 酸素補給水を用いて. 国際抗老化再生医療学会雑誌. 2019; 2: 41-43.
- 2) Wurm FM: Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 2004; 22: 1393-1398.
- 3) Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks. *Nature Biotechnology*. 2014; 32: 992-1000.
- 4) 大政 健史. バイオ医薬品生産におけるプロダクションサイエンス. *生物工学*. 2013; 91: 9: 507-510.
- 5) 大政 健史. 国産技術による次世代バイオ医薬品製造技術基盤の開発 (2) [https://www.amed.go.jp/pr/amedsympo2017\\_12-02.html](https://www.amed.go.jp/pr/amedsympo2017_12-02.html)
- 6) 黒沢 尋. 培養細胞への酸素供給. *生物工学*. 2013; 91: 646-653.
- 7) 田中 秀夫. 培養装置の開発とその実用的利用. *生物工学*. 2006; 84: 2-15.