

動物細胞培養法による抗体の生産とその応用展開

村 山 敬 一
齋 藤 貴 司
鈴 木 雅 代

Monoclonal Antibody Production Using a Large Scale Animal Cell Culture Technique —Basic Study and Applications—

Keiichi MURAYAMA
Takashi SAITO
Masayo SUZUKI

A large scale culture of animal cells for the monoclonal antibody production has been studied. The work reported in this paper mainly concerns with the optimization of the production of monoclonal antibody. Two types of the reactor systems were used for the monoclonal antibody production of hybridoma; one was a stirred tank reactor equipped with a rotatory filter and the other was a fluidized bed reactor.

The effects of environmental factors on the cell metabolism and antibody production have been examined in detail. The control of dissolved oxygen performed on the both culture systems revealed that the production rate of monoclonal antibody was significantly affected by the oxygen uptake rate. Furthermore, the production of cancer related monoclonal antibodies has been studied, expecting its potential application to the medical uses.

1. はじめに

近年、モノクローナル抗体の医療分野における応用は目覚ましいものがある。

血清検査薬などの体外診断の分野におけるモノクローナル抗体の利用については、世の中に定着し多くの抗原に対する抗体が用いられ大きな市場を形成している。

近年は特に、モノクローナル抗体を体内に投与し、診断や治療に利用しようという研究が進んできた。

体内診断分野としては、ヨウ素、インジウム、テクネチウムなどの放射性同位元素で標識した抗体による核免疫画像診断への適用が、癌や心筋梗塞などを中心に研究されており、一昨年末米国 CYTOGEN 社の抗体を用い

た体内診断薬が FDA の認可を受けた。(大腸癌の診断)

大腸癌の体内診断については、日本国内でも臨床試験が行われており、さらに抗ミオシン抗体による心筋梗塞の体内診断についても臨床試験をほぼ終了したとのことである。

治療への適用については、依然開発途上であるが、癌やウイルスなどの感染症、自己免疫疾患などへの適応を中心に臨床試験段階にきているものもいくつかあるようである。日本国内においても臓器移植時の免疫抑制を目的とした抗体医薬が認可されている。

このように将来的にモノクローナル抗体の医療分野における役割はますます重要になると思われるが、その際に大きな問題になってくるのが、抗体の安定かつ経済的

な供給である。

従来モノクローナル抗体の生産は、ハイブリドーマをマウス腹腔内で生育させ、採取した腹水よりモノクローナル抗体を取得する方法により行われてきた。しかしながら工業生産方法として製造や品質の安定性など不安があると考えられる。また欧米では、動物愛護の点からマウス腹水法による抗体生産を規制する動きもあるとのことである。以上のことから、動物細胞大量培養技術の発展に伴いハイブリドーマの大量培養による抗体生産に重点が移ると思われる。

また、抗体の体内への投与ということを考える場合、培養法による生産が必須となろう。

以上述べてきたようなことを背景として、我々は動物細胞培養による抗体生産法に関する研究を行ってきた。

本稿においては、細胞連続培養装置を用いたハイブリドーマの灌流培養による抗体生産の解析結果を紹介し、さらに癌特異的モノクローナル抗体の培養法による生産と抗体の臨床応用を目指した基礎的検討結果について述べる。

2. 連続大量培養システムによるハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体生産の検討

動物細胞の大量培養については種々の装置が開発されてきた。微生物に比べ、増殖速度の著しく遅い動物細胞については、抗体等の物質生産を効率的に行うために近年、各種の連続培養法が研究されている。特に最近は高密度細胞灌流培養による効率的な物質生産が研究課題である。

動物細胞の灌流連続培養装置については種々のシステムが提案されている¹⁾。

ハイブリドーマの高密度培養システムとしては、一般的にタンク培養法とホローファイバー培養法が用いられている。タンク培養法の特長はスケールアップの容易性と装置の大きさに比して設備費が安価であることであり、細胞の高密度性には限界があるものの、回分培養に比べると10倍近い細胞密度が得られる優れた高密度培養法である。しかしながら問題点として細胞と培地の分離をいかに継続的に安定して行い得るかということの技術的な困難さがあげられる。

ホローファイバーを用いた細胞培養法は、タンク培養による灌流培養法に比較して10倍程度の細胞密度が得られる高密度培養法としては非常に優れた方法である。

しかしながら、ホローファイバー培養系においては系内は不均一であり細胞や栄養源等の濃度分布も把握しに

くい。それ故培養の解析や制御が制限されたものになる。

我々は、ホローファイバー培養やタンク培養法とともにこれら培養システムの問題点を解決する可能性のあるものとして、コラーゲンゲルマトリックスの流動床培養システムである Verax System に注目して検討を行っている。

本稿においては、培養状態の解析と抗体生産性向上のための最適培養制御条件の設定手段の構築を主題として行った、タンク培養システム及び流動床培養システムによるハイブリドーマの灌流培養について述べる。

(1) 実験方法

供試細胞

マウス IgG 産生マウス-マウスハイブリドーマ

実験装置

①細胞濾過装置を組み合わせたタンク培養
5 L 容量攪拌槽型細胞培養装置 (AXELLON)
ステンレス製 VF 濾過膜 (MEMBEX)

②流動床培養

マイクロキャリア流動床式細胞培養装置
(VERAX SYSTEM ONE)

システムの概要図を Fig. 1 に示した。

基本仕様は以下のようなものである。

流動床容量 約 20 ml

全反応容量 約 100 ml

培養条件

①使用培地

eRDF (極東製薬製) を基本とする組成

②培養条件

(タンク培養)

2 L の培地 (eRDF に牛胎児血清を 3% 添加) を

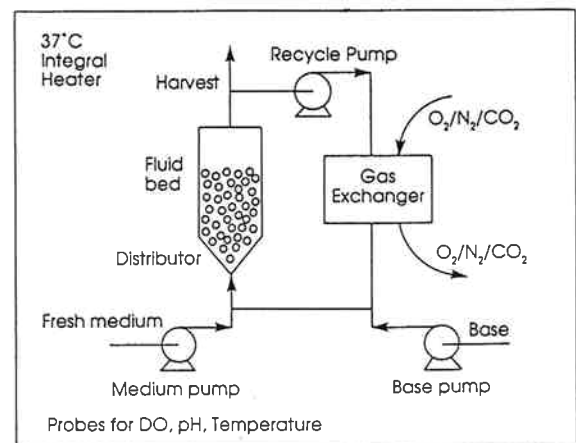


Fig. 1 Schematic diagram of the fluidized bed reactor.

仕込み、初発細胞密度が 10^5 cells/ml になるように細胞を接種した。4日間回分培養を行った後、灌流培養を開始した。(0.5 day⁻¹)

(流動床培養)

1.5×10^8 の細胞を接種し、1%牛胎児血清添加培地にて培養を開始した。培養開始8日目に無血清培地に交換しさらに連続灌流培養を続けた。当初は、溶存酸素濃度を 100 torr、pH 7.2 になるように制御した。

培養制御実験条件 (流動床培養)

上記培養条件にて安定な培養状態が得られた後、溶存酸素濃度あるいは pH の制御値を種々変化させて、基質、代謝物の消長及び抗体生産量などについて分析した²⁾。

分析項目

- 基質；グルコース濃度、グルタミン濃度
- 代謝物；乳酸濃度、アンモニア濃度
- 各アミノ酸濃度
- 生産物；抗体濃度

(2) 実験結果

基質、代謝物の分析結果をもとに基質消費速度、代謝物生成速度を計算した。流動床培養については培養液中への酸素移動速度をモニターした。これらのデータを比較検討して細胞の代謝状態について解析を行った。

タンク培養での培養解析

灌流培養開始後、定常状態に達するまでの経時変化を Fig. 2~Fig. 5 に示した。

培養初期、グルコースは十分量存在しグルコースの消費速度と乳酸生成速度はほぼ等価である。即ちグルコースは解糖系により消費されていることがわかる。細胞密

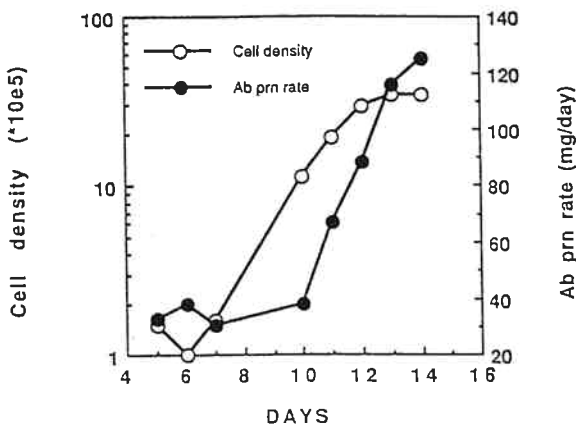


Fig. 2 Growth kinetics and antibody production in suspension culture using stirred tank with VF filter.

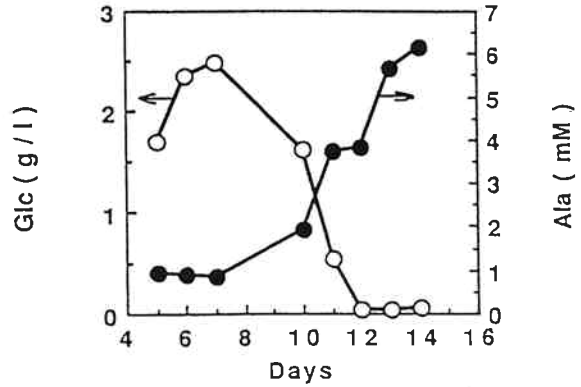


Fig. 3 Time course of glucose and alanine concentrations in suspension culture using stirred tank with VF filter.

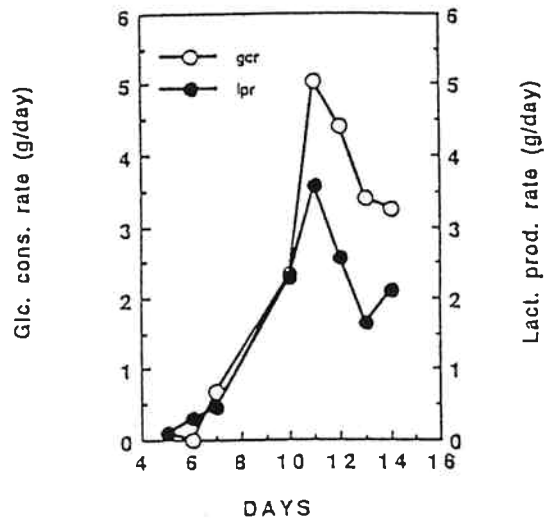


Fig. 4 Time course of glucose and lactate concentrations in suspension culture using stirred tank with VF filter.

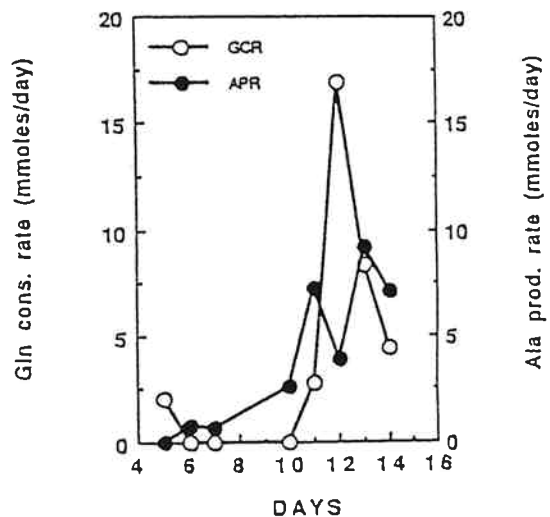


Fig. 5 Amino acids metabolism in suspension culture using stirred tank with VF filter.

度が上昇し、培養が定常状態に達するにつれてグルコースが律速状態になる。その後グルタミンの消費が大きくなりアラニンが生成される。グルコースの消費速度は乳酸生成速度を上回るようになる。他のアミノ酸分析結果も考慮すると、グルタミンはグルタミン酸を経て transaminase によりピルビン酸と反応してアラニンと α -keto-glutarate に変換されると考えられる。

流動床培養における溶存酸素濃度の影響について

溶存酸素濃度については、0~250 torr、pH については、pH 6.5~7.5 という非常に広い範囲で制御設定値を変化させて長期間の培養を行ってその影響について検討した。

培養の経日変化をそれぞれグルコース、グルタミン消費速度、酸素移動速度及び抗体の生産速度について示した。(Fig. 6、Fig. 7、Fig. 8、Fig. 9)

溶存酸素濃度の制御値が低いところでは (20 torr 以下) グルコース及びグルタミンの消費速度は小さい。また酸素の移動速度も小さい。この値は細胞による酸素の

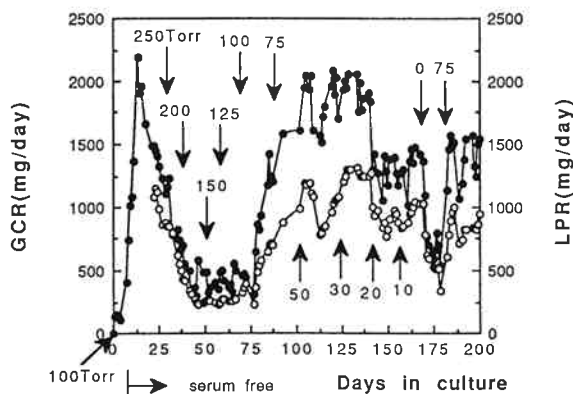


Fig. 6 Time course of glucose consumption and lactate production in perfusion culture using fluidized bed reactor.

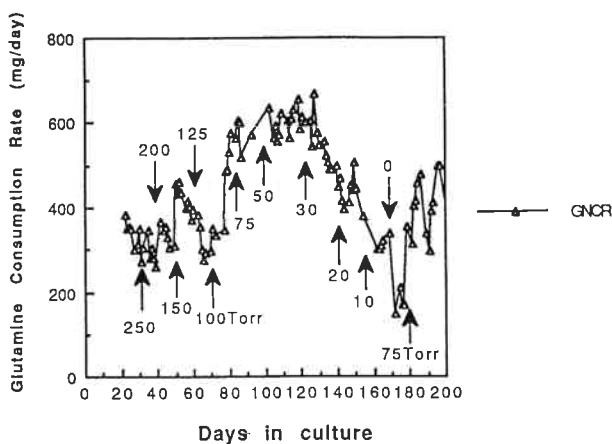


Fig. 7 Time course of glutamine consumption in perfusion culture using fluidized bed reactor.

摂取速度即ち呼吸速度を表していると考えられる。このように低い溶存酸素濃度で培養を制御することにより細胞の呼吸速度は抑制され、同時に基質消費速度も抑制される。さらに、基質消費と代謝物生成の収支についてみると、グルコースの消費量と乳酸の生成量はほぼ等量であり、このことはグルコースが解糖系により消費されていることを示唆するものである。またもうひとつの主要な基質であるグルタミンの消費速度については、この条件では小さいことがわかる。

溶存酸素濃度の制御値が 125 torr 以上の高いところでも、酸素移動速度及びグルコース消費速度は低い。このことは、高濃度酸素による細胞毒性のあらわれであると考えられる。この条件における抗体生産速度はやはり低いものであった。グルコースの消費速度は、30~100 torr の範囲で高い値を示し、50~100 torr の範囲においてはグルタミン消費速度及び酸素移動速度も高くなっている。さらに、グルコースの消費速度は乳酸の生成速度を大きく上回っており、先のタンク培養における解析結果と照らし合わせると、この条件では、グルタミンは、グルコースから生成したピルビン酸と反応してアラニンを生成しながら TCA 回路にはいって完全酸化されると

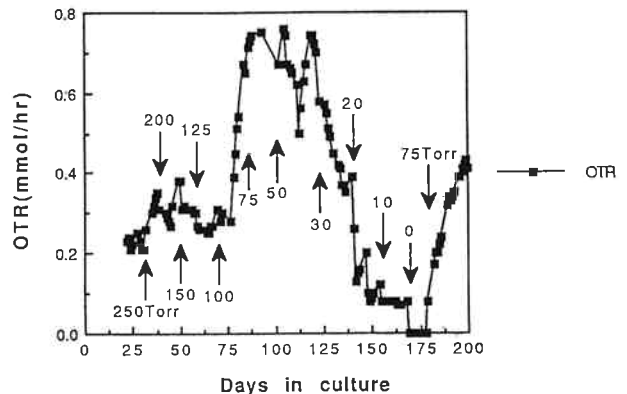


Fig. 8 Time course of oxygen transfer rate in perfusion culture using fluidized bed reactor.

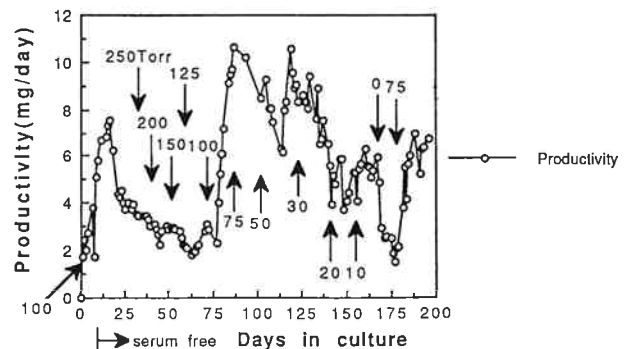


Fig. 9 Time course of antibody productivity in perfusion culture using fluidized bed reactor.

考えられる。この場合の細胞内代謝は酸化的であると考
えられる。この条件では、抗体の生産速度も最大となっ
ている。

そこで、すべての条件にわたって酸素移動速度と抗体生
産速度の関係を求めてみると、Fig.10 に示したように
良好な相関関係が得られた。

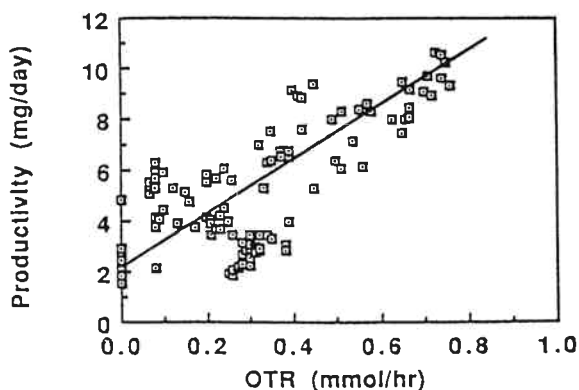


Fig. 10 Effect of oxygen transfer rate on the anti-
body productivity.

(3) 実験結果の考察

以上の実験結果から以下のことが考察される。

- ①細胞内のエネルギー代謝は、グルコースより乳酸を
生成する嫌気的な解糖系が主体である状態と、グル
コースおよびグルタミンの酸化的な代謝を含む状態
とを推移し、抗体の生産にとってはエネルギー生成
効率の良い後者の状態のほうが望ましいと思われる。
- ②培養環境の最適制御の観点からは、上記の好気的な
代謝状態を保つためには、酸素濃度を適当な値に制
御する必要がある。

3. 癌特異的モノクローナル抗体の培養法による 生産と臨床応用に関する基礎検討

癌特異的モノクローナル抗体を体内診断や治療薬とし
て臨床応用することを目標として、細胞培養による抗体
生産法の検討を行った。

本稿においては、ヒト-マウスキメラ抗体と合成糖鎖
抗原に対する抗体の生産について述べる。

3-1. ヒト-マウスキメラ抗体の培養法による生産

抗体をヒトの体内に投与して、画像診断や治療に用い
ることを考えた場合、マウス抗体では抗原性の問題があ
る。既にマウス抗体の臨床投与例についても、HAMA
(ヒト抗マウス抗体)の出現が報告されている。

しかしながら、ヒトのモノクローナル抗体の入手は現
在のところまだ限定されたものである。

近年、抗体の遺伝子工学的取扱い技術が進歩し、種々
のマウス抗体を遺伝子的に改変することによりヒト型に
近い抗体を作製することが可能となった。その代表的な
ものとして、ヒト-マウスキメラ抗体作製技術がある。

これは、マウス抗体可変領域の遺伝子断片とヒト抗体
不変領域の遺伝子断片を結合させた遺伝子を用いて細胞
を形質転換し、得られた遺伝子組み換え細胞よりヒト-
マウスキメラ抗体を取得しようとするものである。

当社生物学研究所においてもこの技術に関する研究
を行ってきた。その結果としていくつかのキメラ抗体の
作製に成功している³⁾。

しかしながら、その大量生産法の開発を目的とした研
究については、世の中においてもそれほど多くの報告例
はない。

今回我々は、免疫画像診断や治療薬としての臨床応用
が期待できる抗腫瘍抗体 Nd2 のキメラ抗体産生細胞を
取得し、細胞培養法による抗体生産条件の検討を行った。

マウス Nd2 抗体は、腫瘍細胞株 SW1990 より抽出
・精製したムチン糖蛋白質を免疫原として得られた抗体
であり、カリフォルニア大学サンフランシスコ校の
Kim 教授の研究室において作製され⁴⁾、大阪市立大学医
学部の鄭博士らによって腫瘍に対する臨床応用について
詳しく研究されたものである^{5),6)}。免疫組織化学的な検
討で腫瘍組織に対し80%以上の高い陽性率を示し、担癌
モデルマウスを用いた動物実験においても癌に対する高
い集積性を示した^{5),6)}。さらに、大阪市立大学医学部付
属病院において腫瘍の患者に対して本抗体を用いた核免
疫画像診断の臨床適用がなされ、臨床上の有用性が報告
された⁷⁾。

遺伝子組換え細胞による抗体生産性は当初非常に低い
ものであり抗体の大量供給という点で大きな問題となっ
ていた。そこで、臨床応用を目指した研究の材料として
本抗体を提供するにあたり生産性向上の研究に着手した。

ハイブリドーマの増殖と抗体生産性の関係あるいは、
細胞周期における抗体生産期の位置付けについては、多
くの研究例がある^{8),9),10)}。それらによると、必ずしも普
遍的な結論までには至っていないが、増殖がある程度抑
制された状態で細胞の抗体生産能が向上するという報告
が多い。また、抗体生産はG1期の状態にある細胞で行
われるという報告が多い。(G1期の後期あるいはS期
の初期などという報告もある。)

また本来抗体の分泌という機能は、分化した細胞の機
能である。

以上のことを考慮すると、脱分化した細胞であるミエ

ローマ細胞を形質転換した組み換え細胞による抗体生産能力を向上させるためには、細胞分裂を抑制することが効果があるのではないかと考えられる。

そこで各種の細胞増殖阻害剤につき検討した結果、いくつかの研究例がある n-酪酸の添加が抗体生産能の向上に効果があることがわかった。また、クローン選別により抗体生産能に優れたクローンを得た。

以下これらの結果について報告する。

(1) 実験方法

供試細胞

遺伝子組み換えマウスミエローマ細胞 HCNd8A

(ヒトマウスキメラ Nd2 抗体産生)

培養条件

①使用培地

eRDF (極東製薬製) を基本する組成に SF-02 培地用添加剤を加えたものを基本とした

②培養方法

シャーレに初発細胞密度が 10^5 cells/ml になるように細胞を接種し 37°C インキュベータにて培養を開始。

分析項目

基質; グルコース濃度

生産物; 抗体濃度

その他; 細胞密度、生存率

(2) 実験結果

①限界希釈法による高生産性クローンの選別

限界希釈法により得られたクローンを24穴シャーレで細胞が密になるまで増やし培養上清中の抗体量を測定した。

その結果、Fig. 11 に示したように従来のクローンの数倍の生産性を有するクローンを得た。

② n-酪酸の添加による抗体生産性の向上

n-酪酸を各濃度になるよう添加してシャーレ培

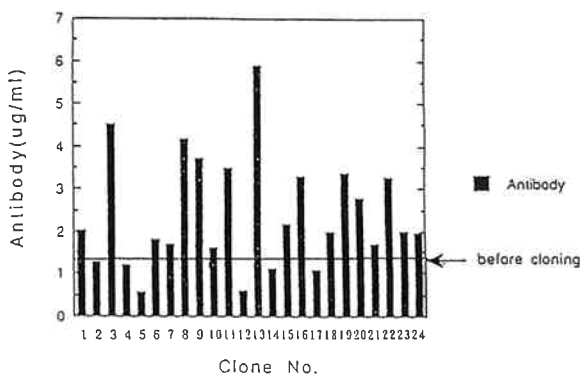


Fig. 11 Selection of high producing clone.

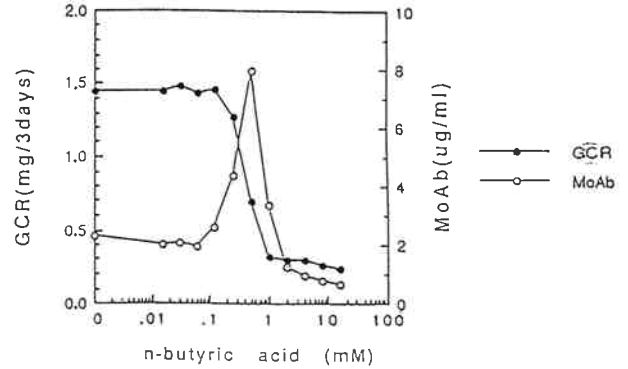


Fig. 12 Effect of n-butyric acid concentrations on the glucose consumption and antibody production. (GCR; glucose consumption rate)

養を行った。先述の実験条件における培養開始後3日目のグルコース消費量と抗体生産量を測定した。結果を Fig. 12 にまとめて示した。

このように n-酪酸の添加濃度上昇に伴い基質であるグルコース消費速度の低下が起こる。このことは高濃度 n-酪酸により増殖が阻害されることを示している。しかしながら、ある濃度範囲では抗体の生産量が顕著に上昇することがわかった。即ち、n-酪酸を適当な濃度になるように添加することによって抗体生産性を向上させ得ることが示されたわけである。

さらに以上の結果に基づいて、n-酪酸濃度 0.5 mM においてシャーレ培養を行い、無添加での培養経過と比較した。結果は Fig. 13 (a~d) に示したように抗体生産性の増加が確認された。

以上述べたように、当初組み換え細胞の培養による抗体生産性は非常に低いものであったが、クローンの選択及び細胞周期制御培養条件の検討により、生産性を大きく向上させることができた。

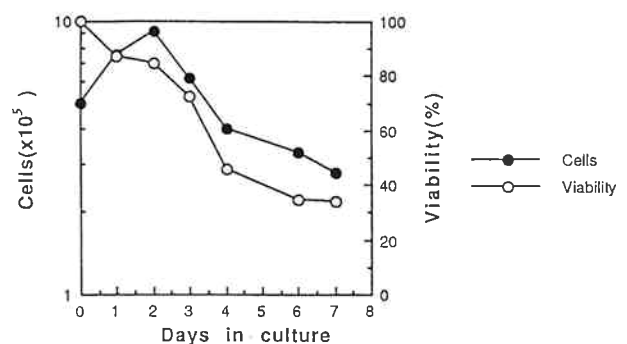


Fig. 13-a Time course of cell density and viability. (without n-butyrate)

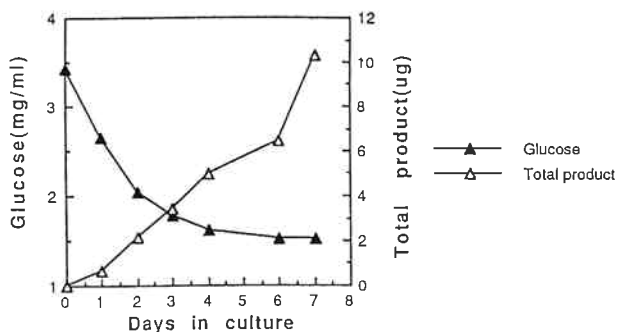


Fig. 13-b Time course of glucose concentration and antibody production. (without n-butyrate)

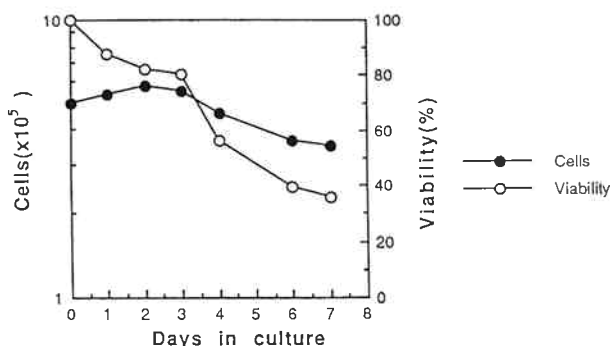


Fig. 13-c Time course of cell density and viability. (with n-butyrate)

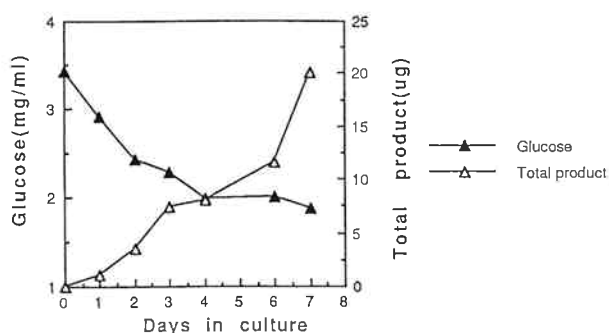


Fig. 13-d Time course of glucose concentration and antibody production. (with n-butyrate)

(3) 抗体の評価

抗体の癌組織に対する特異性

このようにして得られた、ヒトマウスキメラ抗体の膀胱癌組織に対する特異性につき、大阪市立大学医学部第一外科学教室で検討した結果、免疫組織化学的検討及び担癌モデルマウスを用いた各種動物実験において高い癌組織特異性を有することが示された¹¹⁾。

3-2. 合成ムチン糖脂質抗原 F1 α に対する抗体の生産

細胞の悪性化に伴って細胞表面の糖鎖が変化すること

が広く知られるようになり、癌特異的なモノクローナル抗体の中には、糖鎖を含む構造を認識するものも多く報告されている。そこで癌関連抗原の可能性をもつ糖鎖構造を推定し、これを認識する抗体の作製が試みられた。

本稿で報告する合成ムチン糖脂質抗原 F1 α に対する抗体 F1 α 75 は、このようにして得られたものであり詳細は既に堀江らによって報告されている¹²⁾。

我々は、培養法による F1 α 75 の生産について検討した。得られた抗体試料につき臨床応用の可能性を探る目的で大阪市立大学医学部第一外科学教室において免疫組織化学的検討が行われた。その結果、本抗体が特に胃癌に特異性の高い抗体であることがわかった。

(1) 実験方法

供試細胞

合成ムチン糖脂質抗原 F1 α に対する抗体 F1 α 75 産生マウスハイブリドーマ

培養条件

①使用培地

eRDF (極東製薬製) を基本とする組成

②培養装置

Verax System ONE

③培養方法

種細胞 1×10^8 を接種し、1% FCS を添加した血清培地で培養を開始、11日目に無血清培地に交換した。

分析項目

基質; グルコース濃度

代謝物; 乳酸濃度

生産物; 抗体濃度

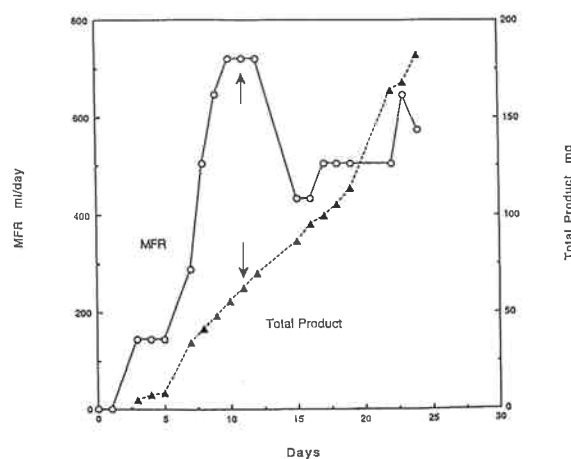


Fig. 14 Time course of the antibody (F1 α 75) production and medium feed rate in perfusion culture using fluidized bed reactor. (MFR; medium feed rate)

(2) 実験結果

培地の供給速度とトータルの抗体生産量の経日変化について Fig. 14 に示した。

(3) 抗体の評価

抗体の癌組織に対する特異性

上記抗体の癌に対する特異性を免疫組織化学的染色の手法により検討した。

これにより、本抗体が癌組織特に胃癌に対する特異性の高い抗体であることが分かった。

以下の研究は、共同研究先である大阪市立大学医学部第一外科学教室において行われたものである¹³⁾。

①実験方法

これらについては、既に大阪市立大学山下好人及び鄭容錫らによって報告されている¹³⁾。

②実験結果

大阪市立大学医学部付属病院第一外科で得られた、ホルマリン固定、パラフィン包埋された胃癌組織110例、膵癌組織73例及び大腸癌組織42例につき免疫組織染色を行った結果、何らかの染色結果が得られた症例

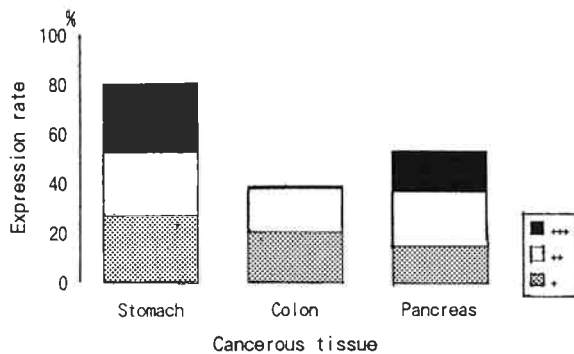


Fig. 15 Expression of F1α in cancerous tissues. The highest expression rate is seen in gastric cancer.

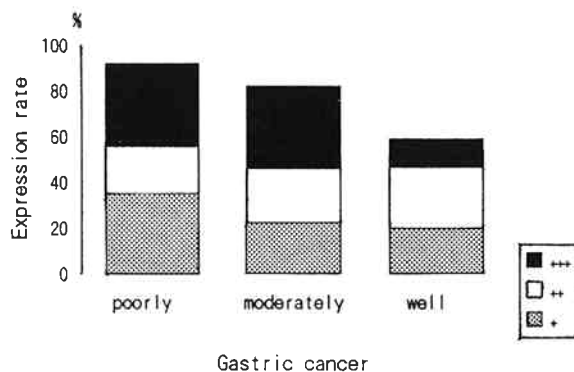


Fig. 16 Expression of F1α according to degree of differentiation in gastric cancer. Poorly differentiated adenocarcinoma cells exhibit strongly positive staining of F1α.

は、以下の割合であった。

胃癌組織80%、膵癌組織52.4%、大腸癌組織38.4% さらに、胃癌の組織型別や進行度別についてもその染色の割合について検討した。

上記に述べた結果について Fig. 15、Fig. 16 に示した¹³⁾。

4. ま と め

我々は、細胞培養法による抗体生産について研究開発を行ってきたが、その目標とするところは高密度細胞による効率的な物質生産技術の開発である。

本報告では、ハイブリドーマによるモノクローナル抗体生産において、懸濁培養と流動床培養との二種類の灌流培養の結果に基づき、種々の培養環境における細胞内代謝の変動と抗体生産性に及ぼす影響について解析した。

この中で、我々は、細胞の好氣的代謝による高エネルギー獲得状態が抗体生産速度の向上につながるということ推察し、さらに酸素制御培養によりそのための至適な酸素濃度範囲の存在を明らかにした。

今後は、この結果に基づきハイブリドーマによるモノクローナル抗体の効率的な生産技術を構築していくつもりである。

モノクローナル抗体の医療分野への応用は今後ますます広がっていくと考えられる。今回報告した、癌関連抗体の応用展開についても今後の進展が期待される。

同時に、遺伝子組み換え抗体の生産技術を含め、培養法抗体生産技術の適用性拡大と大量の抗体を安定かつ経済的に供給するという生産技術としての技術レベルの向上を目指していく考えである。

引用文献

- 1) Broise, D., Lemieux, R., et al Biotechnol. Bioeng., 40 25 (1992).
- 2) Saito, T., Murayama, K., Proceedings of the 6th Annual Meetings of the Japanese Association for Animal Cell Technology, 1993 in printed.
- 3) Kaneko, T., Iba, Y., Yasukawa, K., et al, manuscript in submitted.
- 4) Ho, J. J. L., Kim, Y. S., et al, Cancer Res., 51 371 (1991).
- 5) Sawada, T., Chung, Y., s., Sowa, M., Kim, Y. S., et al, ANTIBODY IMMUNOCONJUGATES AND RADIOPHARMACEUTICALS, 4 493 (1991).

- 6) Chung, Y., S., Kim, Y. S., Sowa, M., et al, Tohoku J. Exp. Med., 168 397 (1992).
 7) 鄭容錫ら, Oncologia, 25 629 (1992).
 8) Ray, N. G., et al, Biotechnol. Bioeng., 33 724 (1989).
 9) Linardos, T., I., et al, Biotechnol. Bioeng., 40 359 (1992).
 10) Reddy, S., et al, Biotechnology Letters, 14 10 (1992).
 11) 金 光司、鄭 容錫ら、日本消化器外科学会雑誌、27 431 (1994).
 12) 堀江隆一ら、東ソー研究報告、37 83 (1993).
 13) Yamashita, Y., Chung, Y., S., Horie, R., Saito, T., Murayama, K., Kannagi, R., Sowa, M., et al, Int. J. Cancer, 58 349 (1994).



著 者

氏名 村 山 敬 一
 Keiichi MURAYAMA
 入社 昭和53年 4月 1日
 所属 東京研究所
 主任研究員



著 者

氏名 齋 藤 貴 司
 Takashi SAITO
 入社 昭和62年 4月 1日
 所属 東京研究所
 副主任研究員



著 者

氏名 鈴 木 雅 代
 Masayo SUZUKI
 入社 平成 3年 3月 26日
 所属 東京研究所
 研究員