

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)特許公報 (B 2)

(11)特許番号

特許第2997771号

(P 2 9 9 7 7 7 1)

(45)発行日 平成12年 1月11日(2000.1.11)

(24)登録日 平成11年11月 5日(1999.11.5)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
C12N 5/10		C12N 5/00 B
5/02		5/02
5/06		5/00 E

請求項の数 6 (全 8 頁)

(21)出願番号	特願平10 - 182450	(73)特許権者	591006335 金沢大学長 石川県金沢市角間町 (番地なし)
(22)出願日	平成10年 6月29日(1998.6.29)	(72)発明者	吉本 谷博 石川県金沢市平和町 3丁目 4 - 11
(65)公開番号	特開2000 - 4876(P 2000 - 4876 A)	(72)発明者	高松 博幸 石川県金沢市額谷 2 - 37
(43)公開日	平成12年 1月11日(2000.1.11)	(74)代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦 (外 5名)
審査請求日	平成10年 6月29日(1998.6.29)	審査官	六笠 紀子
		(56)参考文献	特開 平 1 - 165374 (J P , A)
		(58)調査した分野(Int.Cl. ⁷ , D B名)	C12N 5/00 - 5/28 B I O S I S (D I A L O G) C A (S T N)

(54)【発明の名称】細胞の懸濁培養方法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞の培養方法であって、
(1) 培養液にレクチンを添加した後または添加する前に、該培養液に細胞を懸濁して該細胞を培養するステップと、
(2) 前記培養液中のレクチンの作用によって凝集した前記細胞と前記培養液を分離し、前記培養液の一部または全部を除去するステップと、
(3) 前記細胞に培養液を新たに補充し、任意の時点で該培養液にレクチンを添加して前記細胞を培養するステップと、
(4) (2) および (3) に記載された操作を任意の回数反復するステップとからなる細胞の培養方法。
【請求項 2】 請求項 1 に記載の方法のステップ (2) において、細胞と培養液の分離を行うために重力による

2

自然沈降を用いる方法。

【請求項 3】 請求項 1 に記載の方法であって、前記細胞が動物細胞であることを特徴とする方法。
【請求項 4】 請求項 1 に記載の方法であって、前記細胞がハイブリドーマであることを特徴とする方法。
【請求項 5】 細胞の培養方法であって、
(1) 培養液に、レクチンのタンパク質部分をコードする遺伝子が導入された組換え細胞を懸濁して該細胞を培養するステップと、
(2) 前記培養液中のレクチンの作用によって凝集した前記細胞と前記培養液を分離して、前記培養液の一部または全部を除去するステップと、
(3) 前記細胞に培養液を新たに補充し、前記細胞を培養するステップと、
(4) (2) および (3) に記載された操作を任意の回

数反復するステップとからなる細胞の培養方法。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の方法であって、前記組換え細胞が大腸菌であり、且つ前記レクチンがフィットヘマグルチニンであることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、天然の凝集活性物質を用いる灌流培養方法に関する。

【0002】

【従来の技術】細胞の大量培養によって、ホルモン、サイトカイン、モノクローナル抗体などの有用な生理活性物質を大量に産生する技術が従来から切望されている。工業的大量生産を考えた場合には、スケールアップの容易性から、細胞を培養固定化担体に付着させることなく、液体培養液中に浮遊させた状態で増殖させる懸濁培養が最も有利であると考えられる。

【0003】しかし、細胞培養においては、細胞から生育阻害物質が排出されるので、該生育阻害物質を含む培養液を除去しなければ、比較的低い細胞密度で細胞の成長増殖が停止する。従って、細胞を大量且つ高密度で培養するためには、生育阻害物質を含む古い培養液を槽外に適宜排出しながら、新しい培養液に交換する灌流培養が不可欠となる。

【0004】灌流培養を行うためには、培養液中の生細胞を迅速に沈降せしめ、該生細胞と古い培養液の分離を効率的に達成した上で、古い培養液を培養槽外に排出することがきわめて重要である。

【0005】従来、培養液と生細胞を分離するために、(1) フィルターを用いる方法、(2) 重力による方法、(3) 遠心分離器による方法、(4) 細胞を担体に

【0006】しかし、(1) の方法ではフィルターの目詰まり、(2) の方法では動物細胞の比重が 1.1 程度であることによる分離効率の低さ、(3) の方法では装置の複雑さ、細胞に対する遠心力の悪影響、および(4) の方法には固定化の煩雑さ・スケールアップの点での困難性などの問題があり、細胞を大量培養するための方法としては、何れの方法も満足すべきものとはいえない。

【0007】さらに、凝集剤としてポリアクリル酸とキトサンの混合物を培養液中に添加することにより細胞を凝集せしめて、細胞と培養液の分離効率を改善する方法が、特開平 1 - 165374 に開示されている。該方法によれば、前記方法に伴う欠点は全て解決され得るが、該方法においてはポリアクリル酸という非生物物質を用いており、細胞毒性を示す可能性があるという欠点を有する。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、天然の凝集活性物質であるレクチンを用いて細胞を凝集させること

により、培養液と細胞を分離せしめ、以て効率的且つ簡易な灌流培養を可能にする方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するために本発明は、細胞の培養方法であって、(1) 培養液にレクチンを添加した後または添加する前に、該培養液に細胞を懸濁して該細胞を培養するステップと、(2) 前記培養液中のレクチンの作用によって凝集した前記細胞と前記培養液を分離し、前記培養液の一部または全部を除去するステップと、(3) 前記細胞に培養液を新たに補充し、任意の時点で該培養液にレクチンを添加して前記細胞を培養するステップと、(4) (2) および(3) に記載された操作を任意の回数反復するステップとからなる細胞の培養方法を提供する。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明では、培養液中にレクチンを添加して細胞を凝集させることにより、培養液と細胞を効率的に分離する。本発明の方法は、有用な生理活性物質を産生するハイブリドーマなどの細胞が、レクチンによって効果的に凝集するという、本発明者の発見に基づいてなされたものである。

【0011】本発明において「レクチン」とは、動植物または細菌に見出される糖結合性タンパク質であって、(1) 非免疫学的産物であり、(2) 動植物細胞に対する凝集能を有し、(3) 多糖類または複合糖質を沈降させ、(4) 2 価以上の結合価を有し、(5) 単糖またはオリゴ糖を用いた阻止試験によって、糖類に対する結合特異性を規定し得るタンパク質を意味する。

【0012】このようなレクチンには、本明細書中に記載されているインゲン豆レクチン (Lectin from Phaseolus vulgaris; 以下 PHA-L)、ダイズレクチン (Lectin from Glycine max)、アメリカヤマゴボウ由来レクチン (Lectin from Pokeweed mitogen) の他、タチナタメ (Canavalia ensiformis) レクチン (コンカナバリン A) などが含まれるが、これらには限定されず、上述の定義に合致する糖結合タンパク質は全て含まれる。

【0013】レクチンは糖鎖に対する特異性を有するので、培養する細胞上に存在する糖鎖の種類に応じて、使用するレクチンの種類を決定しなければならない。糖鎖に対する特異性が異なり、且つ特異性が明らかとなっているレクチンは他種類存在するので、使用に適するレクチンのスクリーニングは容易に行い得る。

【0014】本発明の方法において、レクチンは長時間にわたって実質的に細胞毒性を示さない。それ故、本発明の方法を用いれば、レクチンを含有する培養液中で常に細胞を培養することが可能となり、レクチンを交換時に添加する操作は不要である。従って、本発明の方法によれば、灌流培養を工業化および自動化することがきわめて容易となる。

【 0 0 1 5 】本発明の方法に用いる細胞は、有用な生理活性物質を産生し、レクチンの作用によって凝集する任意の細胞であり得る。前記有用な生理活性物質には、サイトカイン、エリスロポエチン、プロテインC、種々の抗体、ホルモン、酵素、受容体などのタンパク質またはペプチド性の物質が含まれるが、これらに限定されず、細胞から採取することが好ましい物質を全て含む。

【 0 0 1 6 】従って、本発明の方法に使用し得る細胞には、リンパ球およびマクロファージを含む免疫担当細胞、ハイブリドーマ、腎細胞、膵臓細胞などのホルモン

10 産生細胞が含まれる。
【 0 0 1 7 】本発明の方法に使用する細胞は、遺伝子工学的的手法によって、前述の有用な生理活性物質をコードする遺伝子が導入された組換え細胞であり得る。さらに、本発明の方法に使用されるレクチンはタンパク質であるため、本発明の方法には、遺伝子工学的的手法によってレクチンのタンパク質部分をコードする遺伝子が導入された組換え細胞を用いることも可能である。このような組換え細胞を用いれば、培養液中にレクチンを添加する

20 必要がなくなり、コスト面で非常に有利である。レクチン遺伝子の配列および該配列を細胞に導入する方法は公知であり、当業者であれば容易に該組換え細胞を作出することができる。

【 0 0 1 8 】遺伝子工学的的手法によってレクチンのタンパク質部分をコードする遺伝子を導入した細胞に、さらに前述の有用な生理活性物質をコードする遺伝子を導入することもできる。

【 0 0 1 9 】さらに本発明の方法は、組織および臓器の培養に適用することも可能である。本発明の方法には、培養細胞に適した培養液であって、レクチンによる該細胞

30 の凝集を実質的に阻害しない任意の培養液を使用することができる。このような培養液には、細胞培養に一般的に使用されるダルベッコの改変イーグル培養液、HAT 培養液などが含まれるが、これらに限定されない。
【 0 0 2 0 】さらに、必要であれば、このような培養液にはレクチンによる該細胞の凝集を実質的に阻害しない任意の添加物を添加し得る。本発明の方法では、当業者に周知である任意の方法によって、細胞と培養液を分離することができる。このような方法には、レクチンにより凝集した細胞を自然沈降せしめる方法、フィルターを用いる方法などが含まれ得るが、操作が簡便であり、細胞に物理的な刺激を与えないため自然沈降を用いる方法が好ましい。フィルターを用いる場合には、レクチンによって生じた細胞の凝集塊の大きさが約 1 0 0 ~ 1 5 0 μm であるので、5 0 μm 以下の口径を有するフィルターを用いることが好ましい。フィルターは市販のものを適用することができる。

【 0 0 2 1 】細胞と培養液を分離した後に、培養液の一部または全部を除去し、適切な量の培養液、好ましくは除去した量と同量の培養液を新たに補充する。本発明の

方法は、好ましくは灌流培養に適用される。

【 0 0 2 2 】灌流培養に使用する装置は当業者に周知であり、典型的には、培養液を吸入するための吸入口および前記培養液を排出するための排出口を有し、吸入用のポンプおよび排出用のポンプをさらに具備する。通常該装置には、気体濃度（とりわけ二酸化炭素濃度）を調節するために、さらに気体の吸入口および排出口も併せて配設されている。該装置には、培養液を攪拌して該培養液の組成を均一に保つための攪拌翼を設置することが好ましい。

【 0 0 2 3 】前記装置は、所望の培養規模に適合する任意の大きさであり得る。前記装置の構成は簡易なものであり、容易に培養規模を拡大し得ることは、当業者であれば自明であろう。

【 0 0 2 4 】

【実施例】以下、本発明の実施例を詳述する。

[実施例 1] 本実施例では、半径 4 1 mm、高さ 1 4 0 mm、全容積 5 0 0 mL のスピナーフラスコを用いた。該フラスコは内部に攪拌翼を有し、培養容積は 2 0 0 mL であった。ダルベッコ変法イーグル培養液に、1 0 % のウシ胎児血清を添加したものを培養液として使用した。さらに本培養液には、0 . 5、1 または 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の PHA-L を添加した。

【 0 0 2 5 】以下、図 1 を参照しながら、培養方法および結果について記す。予めオートクレーブで滅菌した 2 0 0 mL の培養槽に、濾過滅菌した培養液を入れ、次にマウスミエローマ SP2 とマウス B 細胞を融合して得られたマウス \times マウスハイブリドーマ LOX-2 株を 2 \times 1 0⁵ 細胞/mL となるように播種した。該細胞は、IgG（抗 1 2 リポキシゲナーゼ抗体）を産生するものである。

【 0 0 2 6 】該培養槽を二酸化炭素 - 空気が充填された 3 7 のインキュベーター内に設置した。前記培養槽には攪拌翼が取り付けられており、攪拌速度は 9 0 rpm に設定した。培養液の pH の上昇を防ぐために、播種直後は 7 % 二酸化炭素 - 空気で培養を開始した。

【 0 0 2 7 】培養 1 8 時間後に、5 % 二酸化炭素 - 空気に切り替え培養を継続し、生細胞密度が 9 \times 1 0⁵ 細胞/mL に達した時点で（培養 4 1 時間）、PHA-L を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるように添加した。添加直後から、培養槽外部からも凝集塊の形成が確認された。その後、経時的にサンプリングを行い、凝集塊の大きさを顕微鏡下で確認したところ、およそ 2 2 時間で凝集塊の大きさがほぼ一定になった。該時点での凝集塊の顕微鏡像が図 2 に示されているが、凝集塊の直径は約 1 0 0 ~ 1 5 0 μm であった（細胞一個の直径は約 1 5 μm であるので、凝集塊一個には数百個の細胞が含まれていると推定し得る）。

【 0 0 2 8 】培養液の交換を行うために、PHA-L 添加後 2 3 時間の時点で、3 0 分間攪拌を停止し、凝集塊を沈降させて、培養上清 1 0 0 mL を培養槽外部に取り出し、

PHA-L を含まない新鮮な培養液を培養槽内に 1 0 0 mL 供給した。前記取り出した培養上清中の細胞密度は約 1.5×10^5 細胞/mL であった。培養 8 8 時間後の時点でも同様の培養液交換を行ったが、培養上清中の細胞密度には変化は見られなかった。

【0029】その後、さらに培養 1 1 3 時間後の時点で前記と同様に培養上清 1 0 0 mL を取り出したところ、図 1 に見られるように、該上清中の細胞密度が著しく上昇し、且つ細胞凝集塊も小さくなっていったので、培養槽中に残存している培養液 1 0 0 mL に、 $1 \mu\text{g/mL}$ の PHA-L 濃度を有する培養液 1 0 0 mL を加えた。

【0030】さらに培養 1 4 8 時間以降は、図 1 に示されているように、適宜培養液の交換を行った。培養液交換時には、培養槽中の残存培養液 1 0 0 mL に、 $2 \mu\text{g/mL}$ の PHA-L 濃度を有する培養液 1 0 0 mL を加え、該培養液交換は、培養 2 9 0 時間後に実験を終了する時点まで、2 4 時間毎に行った。前記培養液交換時には、凝集塊の再凝集および培養槽外に除去された上清中の細胞密度の減少が確認された。すなわち、培養時に培養液中の PHA-L 濃度を $1 \mu\text{g/mL}$ 以上に維持した場合には、凝集塊が直径約 $50 \sim 150 \mu\text{m}$ で形成され（数十～数百個の細胞で形成されていると推定される）、重力下での自然沈降を用いる前記分離操作により、該凝集塊は容易に沈降した。そして、図 1 にみられるように、培養上清中の平均生細胞密度は 2.0×10^5 細胞/mL であり（図 1 黒三角点線）、培養液中の生細胞密度（図 1 黒丸実線）の僅か 9.3% にとどまっていた。また、その際のもノクローナル抗体の濃度を ELISA 法で確認したところ、約 $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度が維持されていた（図 1 破線 × 印）。

【0031】本実施例により、PHA-L によって凝集せしめた状態で、ハイブリドーマ LOX-2 を培養することが可能であり、且つ該凝集培養下で抗体産生能が維持されていることが示された。

【0032】[実施例 2] 0、1 または $5 \mu\text{g/mL}$ の PHA-L を添加した培養フラスコ内で、実施例 1 において用いたハイブリドーマ細胞 LOX-2 (2×10^5 細胞/mL) を静置培養することにより、PHA-L の細胞増殖および抗体産生能に対する影響をさらに調べた。結果を図 3 および表 1 に示す。

【0033】図 3 は、培養期間中、何れの PHA-L 濃度においても生細胞密度は異ならないことを示しており、PHA-L が長期間にわたって細胞毒性を全く示さないことが明らかである。

【0034】表 1 は、LOX-2 凝集性と PHA-L 濃度との関係、および PHA-L が LOX-2 の抗体産生能に対して及ぼす影響を示している。表 1 から、 $1 \mu\text{g/mL}$ 以上の PHA-L を添加すれば LOX-2 が顕著な凝集性を示すこと、さらに最大 $5 \mu\text{g/mL}$ の PHA-L を用いても LOX-2 の抗体産生能は全く影響を受けないことが分かる。

【0035】[実施例 3] 本実施例では、本発明の方法の汎用性を検討するために、PHA-L 存在下で、ハイブリドーマ作成の際に多く使われるミエローマ SP-2 を静置培養して、SP-2 の細胞増殖を調べた。PHA-L を 0 または $1 \mu\text{g/mL}$ 含む培地中に、 2×10^5 細胞/mL の SP-2 を播種して、生細胞密度の経時変化（図 4）および SP-2 の凝集性の PHA-L 濃度に対する依存性（表 1）を測定した。

【0036】図 4 は $1 \mu\text{g/mL}$ までの濃度であれば PHA-L の生細胞密度は全く変化しないことを示しており、表 1 は $1 \mu\text{g/mL}$ 以上の PHA-L により、SP-2 が効果的に凝集することを示している。

【0037】本実施例より、本発明の方法が多様な細胞に適用することができることが明らかである。

[実施例 4] 本実施例では、細胞凝集を引き起こし得る PHA-L の最小濃度を調べるために、0、0.1、0.5、および $1 \mu\text{g/mL}$ の培地を作成し、 2×10^5 細胞/mL の LOX-2 を播種して静置培養を行った。LOX-2 の凝集は顕微鏡下で確認した。

【0038】表 1 に示されているように、0 および $0.1 \mu\text{g/mL}$ の PHA-L では凝集はみられず、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ の PHA-L での凝集も弱いものであった。以上より、LOX-2 の凝集塊を形成させるためには、PHA-L の濃度は $1 \mu\text{g/mL}$ でなければならないことが理解される。

【0039】[実施例 5] 本実施例では、PHA-L の代わりにダイズレクチンを使用して、他の種類のレクチンが LOX-2 を凝集させ得るかについて調べた。用いたダイズレクチンの濃度は 0、1 および $10 \mu\text{g/mL}$ であり、 2×10^5 細胞/mL の LOX-2 を播種して、細胞の凝集性（表 2）および細胞増殖（図 5）を調べた。表 2 からダイズレクチンも細胞の凝集能を有することが明らかであり、図 5 からは細胞増殖の経時変化がダイズレクチンの影響を受けないことが分かる。

【0040】[実施例 6] 本実施例では、レクチンが認識する細胞表面の糖鎖構造には特異性があり、細胞の有する糖鎖構造に応じたレクチンを添加しなければ凝集塊が形成されないことを明らかにした。

【0041】本実施例で用いたレクチンはアメリカヤマゴボウ由来レクチン（PWM）であり、0、1、 $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度の PWM を含む培地に、 2×10^5 細胞/mL の LOX-2 を播種して、細胞の凝集性（表 3）および細胞増殖（図 6）を調べた。図 6 から PWM は細胞増殖に対しては何ら影響を与えないことが分かるが、表 3 から明らかなように、最大 $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度の PWM を用いても LOX-2 は凝集しなかった。

【0042】以上より、レクチンによる糖鎖の認識には特異性があることが明らかであり、使用する細胞表面上の糖鎖の種類に応じて適切なレクチンを選択しなければならないことが示された。

【0043】

50 【表 1】

表 1

PHA-L 濃度 (μ g/mL)	LOX-2 凝集性	LOX-2 抗体産生能 (μ g/mL) ¹⁾	SP-2 凝集性
0	—	11.0	—
0.1	—	未測定	未測定
0.5	+	未測定	未測定
1	++	9.4	++
5	+++	10.8	+++

但し、¹⁾図 3 において培養 1 2 8 時間での測定値。

凝集性

- : 凝集性がみられない
- +
 : 直径が約 2 0 ~ 5 0 μ m の凝集塊形成
- ++
 : 直径が約 5 0 ~ 1 0 0 μ m の凝集塊形成
- +++
 : 直径が約 1 0 0 ~ 1 5 0 μ m の凝集塊形成

【 0 0 4 4 】

【表 2】

表 2

ダイズレクチン濃度 (μ g/mL)	LOX-2 凝集性	LOX-2 抗体産生能 (μ g/mL) ¹⁾
0	—	18.2
1	+	16.6
10	++	15.4

但し、¹⁾図 5 において培養 7 6 時間での測定値。

凝集性

- : 凝集性がみられない
- +
 : 直径が約 2 0 ~ 5 0 μ m の凝集塊形成
- ++
 : 直径が約 5 0 ~ 1 0 0 μ m の凝集塊形成
- +++
 : 直径が約 1 0 0 ~ 1 5 0 μ m の凝集塊形成

【 0 0 4 5 】

【表 3】

PWM 濃度 (μ g/mL)	LOX-2 凝集性	LOX-2 抗体産生能 (μ g/mL) ¹⁾
0	—	14.9
1	—	14.6
10	—	24.0

但し、¹⁾図 6 における培養 1 1 2 時間での測定値。

凝集性

- : 凝集性がみられない
- +
 : 直径が約 2 0 ~ 5 0 μ m の凝集塊形成
- ++
 : 直径が約 5 0 ~ 1 0 0 μ m の凝集塊形成
- +++
 : 直径が約 1 0 0 ~ 1 5 0 μ m の凝集塊形成

【 0 0 4 6 】

【発明の効果】本発明の懸濁培養方法では、培養液中にレクチンを添加して細胞を速やかに凝集、沈降せしめて、培養液と細胞を分離することにより、古い培養液の除去および新しい培養液の補充を容易にしている。本発明の方法で用いるレクチンは天然の物質であるので、従来用いられていた人工の凝集活性物質とは異なり、細胞毒性を実質的に示さない。本発明の方法を用いれば、従

来必要とされた複雑な操作または機器が一切不要なため、工業的規模で灌流培養を自動化することが可能となり、モノクローナル抗体およびサイトカインなどの有用な生理活性物質を安価に大量生産できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の培養方法による LOX-2 細胞の連続培養および該細胞によるモノクローナル抗体の産生量を示す図。

【図 2】本発明の培養方法において生じる LOX-2 細胞の凝集塊の顕微鏡写真。

【図 3】PHA-L 存在下での LOX-2 細胞の静置培養の経時変化を示す図。

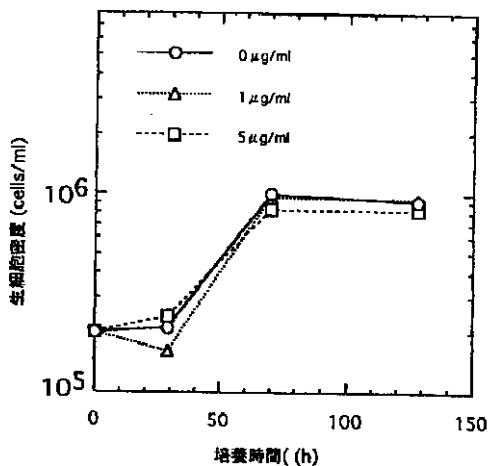
【図 4】PHA-L 存在下での SP-2細胞の静置培養の経時変

化を示す図。

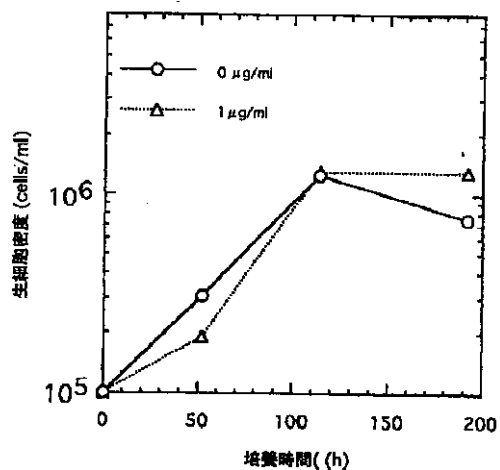
【図 5】ダイズレクチン存在下での LOX-2 細胞の静置培養の経時変化を示す図。

【図 6】アメリカヤマゴボウレクチン存在下での LOX-2 細胞の静置培養の経時変化を示す図。

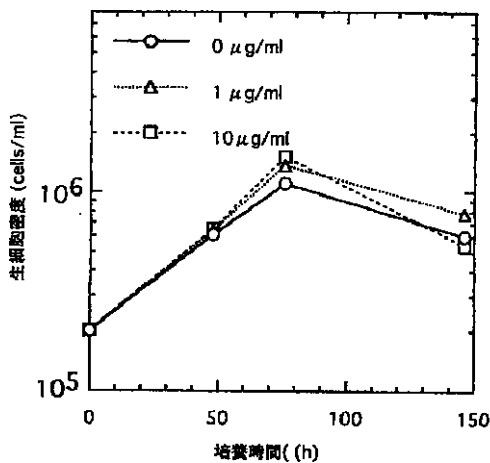
【図 3】



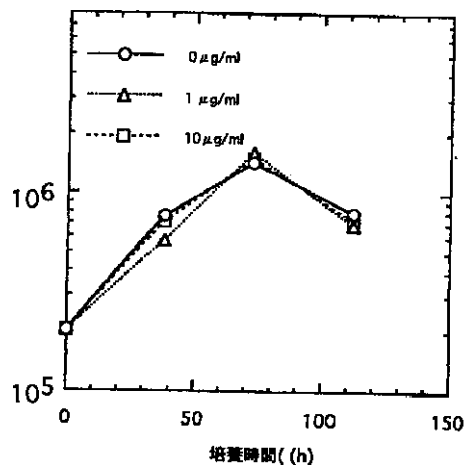
【図 4】



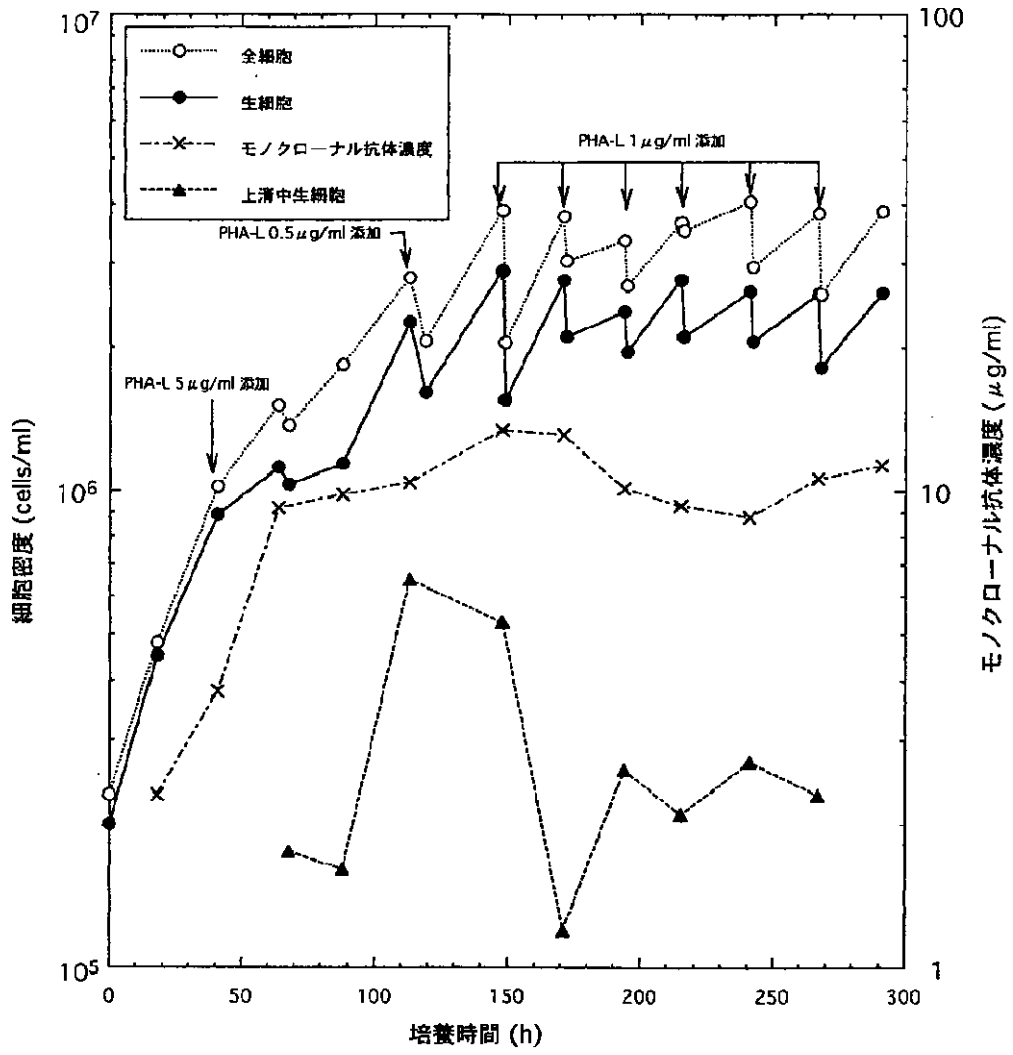
【図 5】



【図 6】



【図1】



【 図 2 】

