

氏名(本籍)	フィデル レイ P. ナイヴェ JR. (フィリピン)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第1,201号		
学位授与年月日	平成6年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	Development of a Selective Ammonia Removal System for Animal Cell Cultivation (動物細胞培養に用いるアンモニアの選択的除去システムの開発)		
主査	筑波大学教授	工学博士	片岡 廣
副査	筑波大学教授	工学博士	田中 秀夫
副査	筑波大学教授	工学博士	松村 正利
副査	筑波大学教授	農学博士	近宗 千城

論文の要旨

動物細胞を培養して医薬等に用いるモノクロナール抗体を生産する場合、培養液中のアンモニア阻害によって生産性の低下が起こる。培養液中のアンモニアを選択的に除去することにより高密度培養が可能となり、モノクロナール抗体の生産性の増大が期待できる。この観点から、本研究では無血清培養液を用い、培養液中に含まれる高価な栄養源を完全に利用すると共に、培養液中のアンモニアを選択的に除去するシステムの開発を目的としている。

まず、アンモニア濃度を阻害レベル以下に制御する方法として吸着剤の選択を行った。種々の吸着剤について吸着容量、栄養源の選択性等に着目して選定を行った。その結果、ゼオライト A-3が最も適すると明らかになった。更に、ゼオライト A-3は、アミノ酸等の培地成分の吸着量が少なく培養液中に含まれるアンモニアの50%以上を除去した。培養液中のアンモニアをゼオライト A-3に接触させる方法として、粉末状及びビーズ状ゼオライトを直後又は間接的に接触させる方法を種々検討した結果、細胞をセラミッククロスフロー濾過装置で分離したのち、濾液中のアンモニアをゼオライト A-3ビーズの充填層に送り、アンモニアを吸着させる方法が最も優れていることが分かり、以後この方法を採用することとなった。培養液中のアンモニア濃度は、細胞の成長についての阻害レベルより低い値の2~4 mmol/lに維持することが可能となった。この系によって、血清添加培地で見られるような高い生存率と細胞密度 10^7 cells/mlの最高生細胞濃度を達成することができた。この細胞株はHBsモノクロナール抗体の生産に関して増殖連動型の性質を持っており、生細胞の高密度化によって、生産性の向上が可能となった。

次に、セラミッククロスフロー濾過装置の採用によって問題となる剪断力の影響について、ハイブリドーマ細胞の増殖の観点から検討した。液流速が29～59cm/secの範囲内での細胞にすぐには損傷を与えなかったが、より早い流速では細胞増殖に阻害を起こした。最適の循環速度として21.2cm/secの液流速が目的に適した循環速度であることが判明した。更に培養に用いたスピナーフラスコにおける攪拌速度の影響についても検討を行った。回転数40～250rpmとして無血清培地を用いて培養を行った。150rpm以上の攪拌速度でのスピナーフラスコ培養においては、生細胞濃度や増殖速度が低くなることが判明した。定量的な指標としてIntegrated shear factor (ISF) を用いて整理したところ 85_{sec}^{-1} 以上で生細胞濃度が低下してくることが明らかになった。また、Kolmogoroffの等方性乱流理論に基づく剪断応力の値が 0.77N/m^2 以上で細胞の増殖速度と細胞濃度が低下する結果が得られた。剪断応力 2.1N/m^2 までの値では細胞の損傷は見られなかったが、モノクロナール抗体の分泌を促進させる最適の剪断力のレベルがあるものと考えられる。

最後に、栄養源であるグルコース、グルタミン、アミノ酸、ビタミン類及び増殖因子を添加した培地による還流培養を行ったところ、ハイブリドーマ TO-405株の細胞濃度やモノクロナール抗体の生産に重要となる濃度の増加は認められなかった。しかし、栄養源の添加とアンモニア除去を組み合わせることにより最大生細胞濃度は $2.5 \times 10^7 \text{cells/ml}$ に達し、培養期間中は 10^7cells/ml を維持し、モノクロナール抗体濃度は約 $2.62 \times 10^6 \text{mIU/ml}$ の高い値が得られた。この値は、従来の還流培養の値より10倍以上高く、マウスの腹水により得られる濃度の約50%に達する高い数値である。

審 査 の 要 旨

本研究は動物細胞の培養により医薬などに用いるモノクロナール抗体を生産する場合に必要なアンモニアの選択的除去システムを確立し、生産性の増大を図ることを目指して行ったものである。

この問題を解決するため、高価な栄養源の吸着量が少なく、かつアンモニアの除去性能の優れた吸着剤としてゼオライト A-3 を探索した。細胞培養液から細胞を分離する装置としてセラミック・クロスフロー濾過装置を考案し、細胞と濾液に分離し、濾液はビーズ状のゼオライト A-3 の充填塔を経てアンモニアを除去して培養槽に返送するシステムを作成した。無血清培地を用い、B型肝炎に薬効のあるHBsモノクロナール抗体を生産するハイブリドーマ TO-401を使用して灌流培養を行い、望ましい細胞濃度である 10^7cells/ml を得た。更に、栄養源の添加とアンモニア除去を組み合わせることによって最大細胞濃度 $2.5 \times 10^7 \text{cells/ml}$ を得ると共に、モノクロナール抗体濃度 $2.62 \times 10^6 \text{mIU/ml}$ という極めて高い濃度を達成した。この濃度は既存の灌流培養法の10倍であり、またマウス腹水から得られる濃度の約50%に相当する高い濃度である。最後に、攪拌によって生ずる剪断応力が細胞増殖や抗体生産に及ぼす影響について理論的検討と実験結果との対比を行い、最適な条件が存在することを明らかにした。

以上、本研究は動物細胞を用いて無血清培地による抗体生産において重要となるアンモニアの選択的除去システムを確立し、高濃度の抗体生産に成功しており、これらの成果は高く評価される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。