

2021年6月22日

キーワードまたはキーフレーズ：

超純水、細胞培養、培地と緩衝液の調製、
組換えタンパク質、モノクローナル抗体（mAb産生）、
治療用タンパク質の製造、PER.C6 EpCAM細胞

水が命： 細胞培養に用いる超純水

Anil Kumar Rathod¹, Sheokant Diwakar¹, Dr. Ashok Mundrigi¹, Dr. Elmar Herbig²

¹ Sartorius Stedim India Pvt. Ltd., Bangalore, India

² Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Goettingen, Germany

要約

水はすべての細胞培養培地の主成分であり、培地、緩衝液、添加物の調製や加熱、冷却、洗浄、すすぎなど多くの補助的な機能を果たすためにも必要なものです。そのため、水質は細胞培養実験の結果を得るうえで重要です。

はじめに

細胞培養に使用する水の汚染物質には、細菌、酵母、カビなど多くの種類があります。これらの汚染物質は通常、目視できるか光学顕微鏡によって検出できます。しかし、化学物質や生物由来物質による汚染が培養細胞の増殖、形態、挙動に影響を及ぼすことがあります。これらの物質は肉眼で確認できません。そのため、細胞培養に使用する水は微生物を含まず、エンドトキシン、無機イオン（鉛、亜鉛などの重金属）、有機化合物（フミン酸類、タンニン、農薬など）を特に含有しないものでなければなりません。詳細については参考文献をご覧ください^{1,2}。水道水中の標準的な不純物と細胞培養に使用するための目標値の例を表1に示します。

パラメーター	水道水	細胞培養用の水	減少率 (%)
導電率 (μS/cm)	50 ~ 900	0.2	99.95
カルシウム (mg/L)	20 ~ 150	<0.01	>99.99
ナトリウム (mg/L)	20 ~ 150	<0.01	>99.99
鉄 (mg/L)	0.01 ~ 0.1	<0.001	>98
重炭酸塩 (mg/L)	30 ~ 300	<0.01	>99.99
塩化物 (mg/L)	10 ~ 150	<0.01	>99.99
硫酸塩 (mg/L)	1 ~ 100	<0.01	>99.98
TOC (mg/L)	0.2 ~ 5	0.1	96
遊離塩素 (mg/L)	0.1 ~ 0.5	<0.01	>97
細菌 (CFU/100 mL)	100 ~ 1000	<10	>98
エンドトキシン (IU/mL)	1 ~ 10	<0.1	>98
濁度	0.1 ~ 2	<0.01	>99

表1：標準的な水道水中の不純物と細胞培養用の目標値²

今回の一連の試験の目的は、アリウムPro UFで製造した超純水が問題を伴わずに細胞培養アプリケーションに簡単に使用できるかどうかを評価することとしました。本研究では、既製品のCDM4PERMab (Hyclone) 培地を対照にして、試験目的にアリウムPro UFで製造した超純水 (UF水) およびRO水をそれぞれ用いてCDM4PERMab (Hyclone) 粉末培地から調製した培地でPER.C6 EpCAM細胞を培養しました。このアプリケーションノートに記載するRO水のデータは、現行のアリウムAdvanceシステムの前モデル (アリウムRO) を使用して得ました。個々の培養結果を使用してアリウムPro UFで製造した超純水がPER.C6 EpCAM細胞の培養に適しているかどうかを評価しました。

一連の試験で使用したPER.C6細胞株はヒト網膜芽細胞に由来するもので、組換えタンパク質やモノクローナル抗体 (mAb産生) の発現、治療用タンパク質やモノクローナル抗体の製造にも今日使用されています。

超純水製造装置

この装置 (図1) は、前処理水から微量の残留汚染物質を取り除くことによって超純水を製造するように設計されています。超純水の製造には連続的な再循環と一定の流量が必要です。圧力を制御するポンプシステムが、この動作を担います。装置の供給水口と採水口 (精製水) の両方で水の導電率が測定されています。

装置は2種類のカートリッジキットを取り付けた状態で動作します。これらのカートリッジには、それぞれ溶出物を少なくして高純度水を供給できるように開発された専用の活性炭吸着剤と混合床交換樹脂が充填されています。最終マイクロフィルターが通常採水口に取り付けられており、超純水を採水する際にあらゆる粒子状物質や細菌を超純水から取り除きます。水の精製について説明した大まかな工程を図2に示します。

以下に記載する試験のため、アリウムPro UF装置 (前モデル、図1に示した現行のアリウムPro UF装置と同一の技術的設計) への供給水を、アリウムRO逆浸透装置で前処理しました。この構成は、ラボでの小規模細胞培養に適した水の精製処理に関するWhiteheadの方法²に従ったものです。この前処理装置については、本アプリケーションノートにはこれ以上記載されていません。



図1：アリウムPro UF超純水製造装置

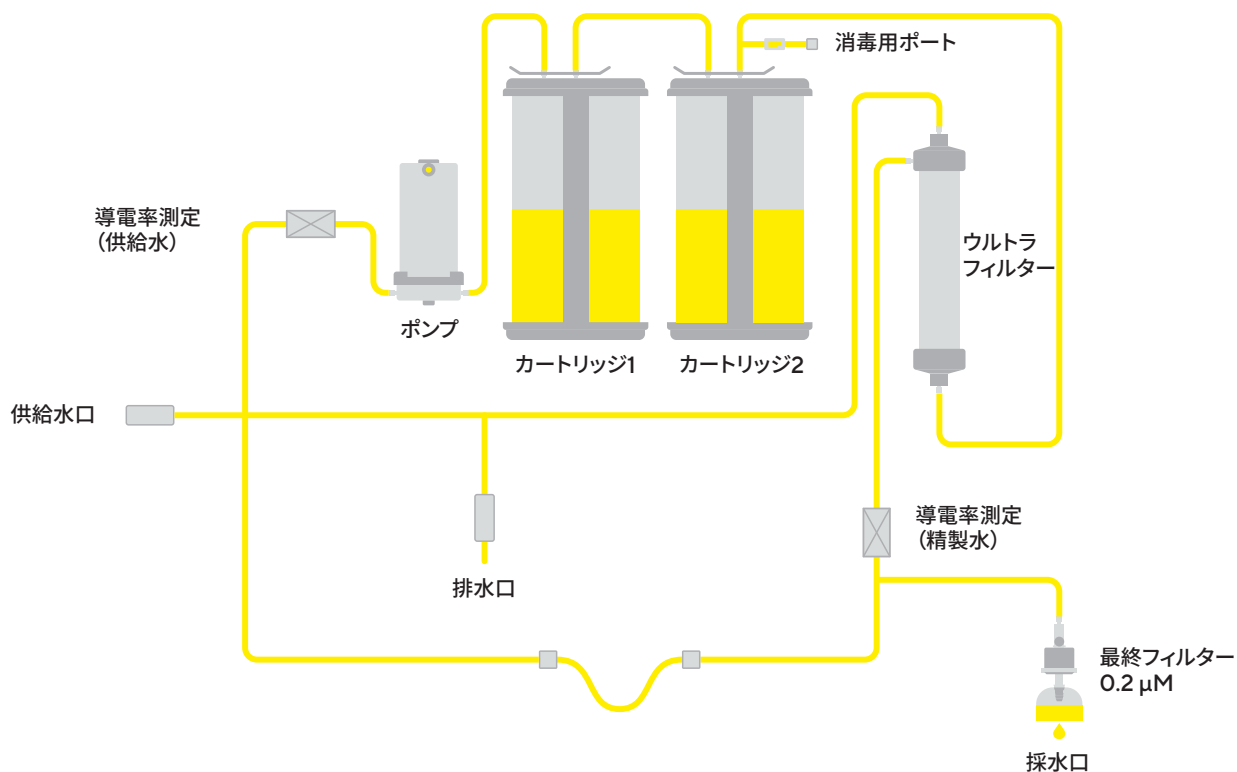


図2：アリウムPro UF超純水製造装置のフロー略図

材料と方法

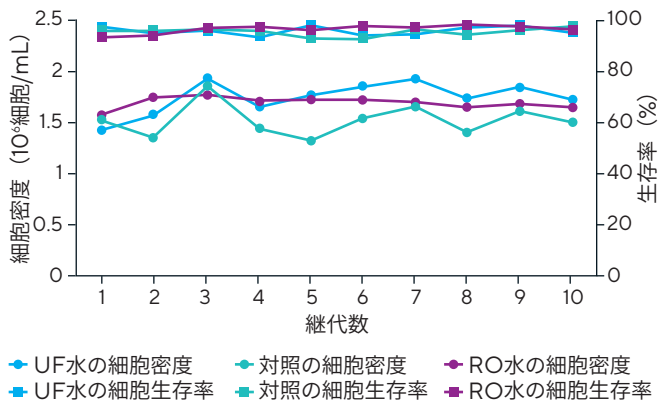
PER.C6 EpCAM細胞（アイキャッチャー）を、ガス交換用の通気性キャップを備えたT-75型フラスコ（Nunc、フラスコ中に培地12 mL、n = 2）中で10代継代培養し、さらに培地50 mLを加えた125 mL容量のスピナーフラスコ（Wheaton、VWR、n = 2）中でも培養しました。PER.C6 EpCAM細胞株を、CDM4PERMabの既製培地（Hyclone）とCDM4PERMab粉末培地（Hyclone）で培養しました。CDM4PERMab粉末培地を、UF水またはRO水のいずれかを用いて再溶解し、4 mM L-グルタミン（Lonza）、炭酸水素ナトリウム（3.2 g/L、Merck）、プルロン酸F-68（0.5 g/L、Sigma）を添加して、1000 mLディスポーザブルろ過ユニット（Sartolab®、Sartorius）を用いて無菌状態で0.2 μm滅菌グレードフィルターを通してろ過しました。

PER.C6 EpCAM細胞を、播種濃度 0.3×10^6 細胞/mLでT-75型フラスコに、また播種濃度 0.7×10^6 細胞/mLでスピナーフラスコに播種しました。T型フラスコとスピナーフラスコをCO₂インキュベーター（Forma direct heat CO₂ incubator, Model 3-11, Thermo Scientific）に入れて、37°C、CO₂濃度5%、湿度85%の条件で培養しました。CO₂インキュベーター内で、スピナーフラスコをマグネチックスターラー（VWR）に載せて80 rpmで攪拌培養し、各スピナーフラスコの側枝のキャップを緩めてフラスコ内のガス交換を促進させました。スピナーフラスコからサンプルを週末（4日目、5日目）を除く毎日、T型フラスコからは3日ごとに採取して生細胞密度を測定しました。生細胞密度の測定は、トリパンブルー色素排出法に従い血球計算盤（Vasa Scientific）を用いて実施しました。細胞培養の基本的な技術に関する包括的な情報については参考文献をご覧ください³。

結果と考察

対照のT型フラスコ（対照として既製培地で培養した細胞）で得られた平均細胞密度は 1.52×10^6 細胞/mLで、これらの対照細胞の平均生存率は95.23%でした（図3A）。T型フラスコを用いてUF水により再溶解した培地で培養した細胞では、平均細胞密度が 1.73×10^6 細胞/mLで、95.7%の平均生存率が得られました。これらの結果と比較して、RO水により再溶解した培地で培養した細胞では、 1.68×10^6 細胞/mLの平均細胞密度と95.59%の生存率が得られました（図3A）。

A. T型フラスコで培養した細胞の増殖曲線



B. スピナーフラスコで培養した細胞の増殖曲線

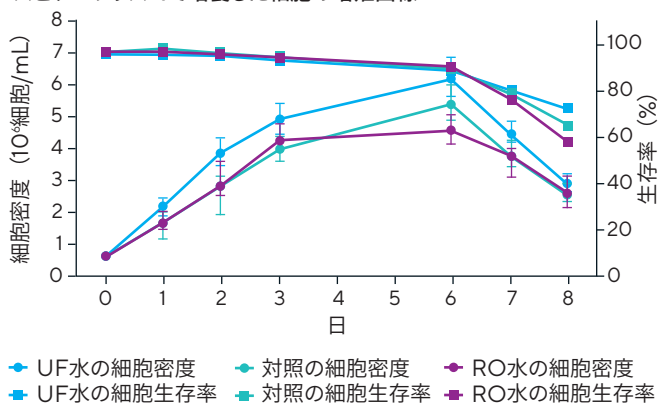


図3：(A) T型フラスコ中でのPER.C6 EpCAM細胞株の増殖曲線
(B) スピナーフラスコ中でのPER.C6 EpCAM細胞株の増殖曲線

別の実験として、PER.C6 EpCAM細胞株を、既製培地（対照）、UF水により再溶解した培地、RO水により再溶解した培地をそれぞれ加えたスピナーフラスコ中で培養しました（図3B）。培養6日目に対照のスピナーフラスコで得られた最大細胞密度は、 5.42×10^6 細胞/mL、生存率は88.47%でした。また、UF水のスピナーフラスコでは最大細胞密度 6.24×10^6 細胞/mLと生存率88.55%が得られ、RO水のスピナーフラスコでは最大細胞密度 4.60×10^6 細胞/mLと生存率89.85%が得られました（図3B）。RO水のスピナーフラスコ中の細胞を顕微鏡観察すると、RO水により再溶解した培地中で増殖した

細胞が、既製培地中やUF水により再溶解した培地中で増殖した細胞と比べて不健康に見えました。RO水により再溶解した培地でスピナーフラスコ培養した細胞では、既製培地中やUF水により再溶解した培地中で培養した細胞と比べ、生存率が急速に低下しました。このような生存率の低下は、T型フラスコで培養した細胞では認められませんでした。スピナーフラスコ内で生存率が急速に低下したのは、RO水中にエンドトキシンや無機塩類が存在し、これらが細胞の増殖と生存率に影響を及ぼした可能性があります。しかし、エンドトキシンと無機塩類によるこれらの有害な影響は、T型フラスコなどによる静置培養（小規模培養）では認められませんでした。静置培養の場合、培地中の O_2 濃度によって細胞の増殖が制限されるためですが、エンドトキシンや無機塩類の濃度による増殖の制限はありません（スピナーフラスコ中での培養と比べると、T型フラスコ中の培養では典型的な増殖曲線が観察されません）。

実際の影響は、スピナーフラスコ中で培養することでより高い細胞密度に達し、 O_2 が増殖の制限要因にならない場合のみに認められます。高い細胞密度に到達できるスピナーフラスコ培養では、RO水により再溶解した培地中により高い濃度のエンドトキシンと無機塩類の影響として、対照（既製培地）やUF水により再溶解した培地のサンプルから得た値よりも増殖速度が低下（低い細胞密度と低い生存率）します。これらの結果は、抗体産生（mAb）の実験でも確認されています。スピナーフラスコを用いてUF水により再溶解した培地で培養した細胞のmAb産生量（図4）は0.84 mg/mL（8日目の例）であるため、対照のメーカー既製培地（0.71 mg/mL）やRO水により再溶解した培地サンプルにより得られたmAb産生量（0.42 mg/mL）よりも多くなります。T型フラスコ中での細胞の抗体産生能（mAb産生量）は測定しませんでした。抗体の量が少な過ぎたため、そのような低値を確実に比較しようとしても統計的に無意味でした。

スピナーフラスコでの抗体産生

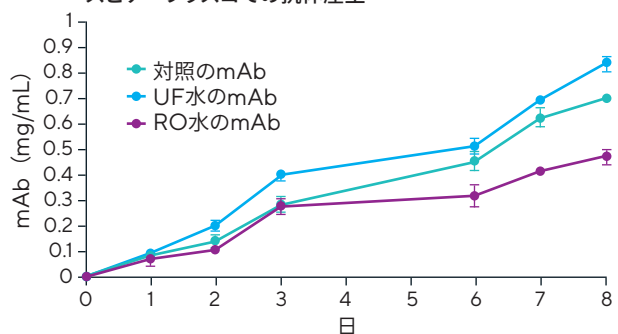


図4：UF水により再溶解した培地（UF水のmAb）、既製培地（対照のmAb）、RO水により再溶解した培地（RO水のmAb）をスピナーフラスコに入れて培養した細胞の抗体産生

結論

上記の結果から、市販の既製培地の代わりに、UF水により再溶解した乾燥培地（CDM4PERMab培地）がPER.C6 EpCAM細胞株の培養用途に適していることが明確に示されました。UF水により再溶解した培地で培養したPER.C6 EpCAM細胞株の増殖特性は、対照に用いたCDM4PERMab既製培地で培養したPER.C6 EpCAM細胞株の増殖特性に類似するものでした。

さらに、培養実験をスピナーフラスコで実施した場合に、UF水により再溶解した培地で培養した細胞株サンプルでは、RO水により再溶解した培地で培養した細胞株サンプルと比較して増殖が促進することを確認しました。この場合には、通常、細胞密度がより高くなり、O₂が増殖の制限要因になりません。その結果、RO水中のより高い濃度のエンドトキシンや無機塩類が細胞増殖の低下を引き起こすと結論付けました。

これらの結果は、スピナーフラスコ中で培養したPER.C6 EpCAM細胞株におけるmAbの産生でも確認され、裏付けられました。PER.C6細胞株によるmAb産生量は、アリウムPro UF超純水により再溶解した培地サンプルで最高値となり、次が対照（既製培地）による値でした。これらの値は、mAb産生量が低下したRO水培地サンプルの値と異なるものでした。

したがって、アリウムPro UF装置から得た超純水がPER.C6 EpCAM細胞の培養に非常に適していると結論付けます。その理由として、この水精製装置は無機イオン、有機化合物などの不純物の含有量を最小限に抑え、特にエンドトキシンを、別の実験で確認されたような極めて低い濃度に低減できることが挙げられます⁴。

参考文献

1. ASTM Standard Guide for Bio-Applications Grade Water D 5196-06 (2018). <https://www.astm.org/Standards/D5196.htm>
2. Whitehead, P. (2007). Water Purity and Regulations. Stacey, G.N., & Davis, J. (Eds.) *Medicines from Animal Cell Culture*. John Wiley & Sons, Ltd.
3. Freshney, I.R. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, Sixth edition*. John Wiley & Sons, Inc.
4. Schmidt, K. & Herbig, E. (2012). Weniger ist mehr—Quantitative Endotoxinbestimmung von Reinstwasser. *Laborpraxis*, 5, 36. Jhg.

謝辞

PER.C6細胞株の写真をご提供いただき、さらに技術面の考察を示していただいたSartorius-Stedim Biotech GmbH（ドイツ、ゲッティンゲン）のAlexander Tappe博士とYvonne Martin博士に感謝を表します。

初版：G.I.T. Laboratory Journal Europe 9-10, Volume 16

ザルトリウス・ジャパン株式会社

東京本社

〒140-0001

東京都品川区北品川1-8-11

Daiwa 品川Northビル4階

Phone: 03 6478 5200 Fax: 03 6478 5494

Email: hp.info@sartorius.com

名古屋営業所

〒461-0002

名古屋市東区代官町35-16


Phone: 03 6478 5204

Fax: 03 6478 5497

大阪営業所

〒532-0003

大阪市淀川区宮原4-3-39

 For further information,
visit www.sartorius.com