

# シングルユースバイオリアクターにおけるアデノウイルスの生産

Teres Persson, Gustaf Ahlén, Susanne Stier, Mia Bennemo, and Mats Lundgren  
GE Healthcare Bio-Sciences AB, Björkgatan 30, 751 84 Uppsala, Sweden

## はじめに

アデノウイルスベクターは、ワクチンやがん治療にとって有用な送達システムです。安全かつ有効な臨床グレードのウイルスの製造を可能にするには、スケールアップが容易でコスト効率の高い生産技術が求められます。付着細胞では、一般的にローラーボトルまたはセルファクトリーが培養のプロセスで使用されます。しかし、これらの技術を用いたスケールアップは複雑であり、付着細胞が増殖に利用できる表面積によってスケールアップが制限されます。1つの解決法は、マイクロキャリアを用いてスケールアップすることです。別の解決法は、浮遊化させた細胞を使用することで、スケールアップを促進することです。

本報では、浮遊培養に順応させた HEK293 細胞を使用して、シングルユースバイオリアクターにおけるアデノウイルス生産の効率的なプロセスについて紹介します。緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するヒトアデノウイルス 5 をモデル系として使用しました。さまざまな細胞培養用培地 (CCM) を評価し、小スケールでウイルス増殖を最適化することにより、Xcellerex XDR-10 バイオリアクター (培養量 10 L) において、このプロセスを確立することができました。このプロセスにより、生産規模へのさらなるスケールアップが可能になります。本研究のストラテジーを図 1 に示しています。

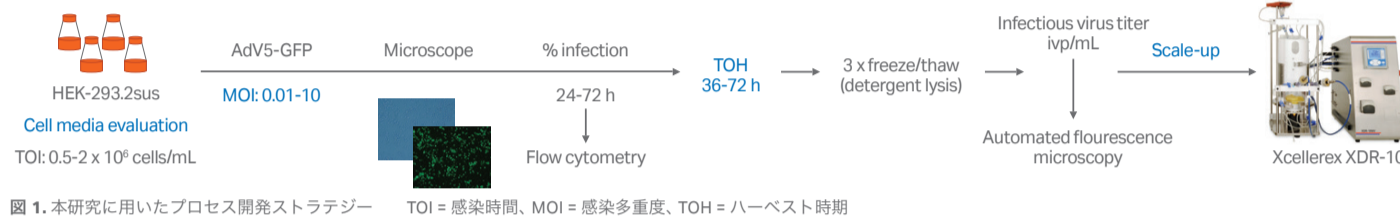


図 1. 本研究に用いたプロセス開発ストラテジー TOI = 感染時間, MOI = 感染多重度, TOH = ハーベスト時期

## 材料と方法

- 細胞株: 異なる CCM に馴化させた HEK-293.2sus (ATCC)
- ウイルス: GFP を発現する組換えアデノウイルス血清型 5 (AdV5-GFP)
- CCM: 5 つの市販の無血清培地 (すべて HEK293 細胞用に開発されたもの)
- 小型培養槽: 125 ~ 500 mL の振とう三角フラスコ
- 大型培養槽: Xcellerex XDR-10 バイオリアクター
- 感染性ウイルス粒子数 (ivp): GFP フォーカス係数自動蛍光顕微鏡で測定
- 総ウイルス粒子数 (vp): qPCR で測定

## 小スケールの最適化

バッチモードにおける細胞増殖を、異なる 5 つの CCM (以下、5 つの CCM をそれぞれを A ~ E とする。すべてが HEK293 細胞用に開発されたもの) で評価しました。異なる CCM で細胞増殖および生存率において違いがみられました (図 2)。培地 B、E のみが  $2.5 \times 10^6$  cells/mL を超える細胞密度に到達することができました。細胞の形態と凝集体形成を測定するために、細胞を顕微鏡観察しました (図 3)。細胞増殖をもっともよくサポートし、凝集体形成が少ない培地は、CCM B、CCM E の 2 つでした。

感染多重度 (MOI) が 1 および 10 である CCM B、CCM E について、AdV5-GFP の生産性を評価しました。すべての実験において、培地 B がより高い感染性ウイルス力価を示しました (図 4)。そのため、さらなる最適化を培地 B で行いました。培地 B は CDM4HEK293 (HyClone, Cytiva) です。異なる MOI の効果を 0.01 ~ 10 の範囲の MOI でさらに検討しました (図 5)。MOI 1 と 2 の間で生産性がわずかな上昇に留まったため、より高い MOI では横ばいになると推測しました。MOI 2 以上でみられたより高い力価を確保するために、MOI 10 を選択しました。より高い細胞密度において ivp/cell が失われたため (データは示されていません)、スケールアッププロセス用に感染時間 (TOI)  $1 \times 10^6$  cells/mL を選択しました。

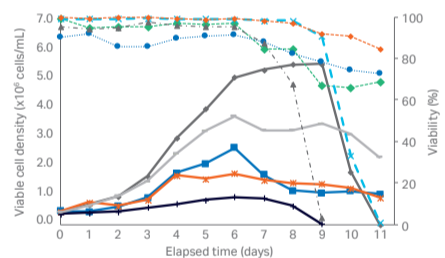


図 2. CCM 評価における細胞増殖と生存率。VCD = 生存細胞密度

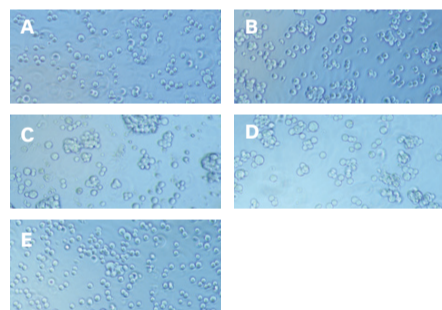


図 3. CCM A ~ E における細胞増殖

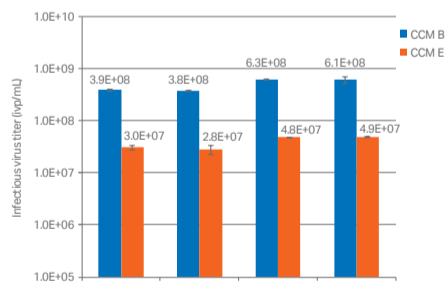


図 4. MOI 1 および MOI 10 を用いて培地 B、培地 E でバッチ培養した感染性ウイルス力価。TOI で培養液を新しい細胞培養培地により希釈。TOI:  $1 \times 10^6$  cells/mL, TOH: 42 時間。各培養を 2 回反復実施 (r1, r2)

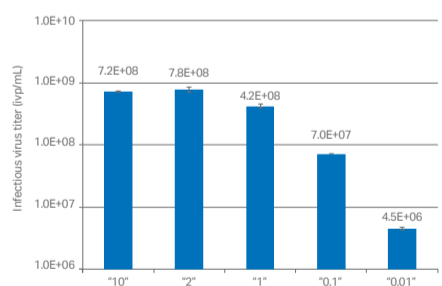


図 5. 感染後 42 時間で異なる MOI を有する感染性ウイルスの力価。細胞を培地 B (CDM4HEK293) で増殖させ、感染前に  $1 \times 10^6$  cells/mL で同じ培地により希釈

## Xcellerex XDR-10 バイオリアクターにおけるスケールアップ

Xcellerex XDR-10 バイオリアクターに  $0.3 \times 10^6$  cells/mL を播種しました。細胞を CDM4HEK293 培地中で  $2 \times 10^6$  cells/mL まで増殖させた後、二倍希釈しました。  $1 \times 10^6$  cells/mL の細胞を MOI 10 で感染させました。感染後 (hpi) 48 時間の時点で、細胞をバイオリアクター内で溶解させました。リアクターの設定とプロセスパラメーターを表 1 に示しています。細胞増殖と生存率を比較するために、2 つの振とうフラスコ対照群を示しました (図 6)。42 ~ 48 hpi では、感染性ウイルスの力価に有意な増加はみられませんでした (図 7)。プロセスがより効率的かつ簡便であることから、今後のハーベストのために 42 hpi を選択しました。図 7 は界面活性剤細胞溶解によって感染性ウイルスの力価が影響されないことも示しています。42 hpi でのバイオリアクター内の全ウイルス粒子と感染性ウイルスの力価との比は約 15 : 1 であり、この比は AdV の規制基準内です (図 8)。振とうフラスコ培養物と比較すると、細胞増殖およびウイルス生産性はともにバイオリアクターのスケールアップにおいて向上しました。

表 1. Xcellerex XDR-10 バイオリアクターにおける培養のためのバイオリアクター設定とプロセスパラメーター

Bioreactor settings and process	
Cell line	HEK293.2 sus
Cell culture media	CDM4HEK293
Additions	4mM L-gln
Starting cell density	$0.3 \times 10^6$ cells/mL
Starting volume	5 L
Final volume	10 L
pH setpoint	7.1
DO setpoint	40%
Temperature	37 °C
Agitation	100 rpm
Sparger	Air, CO <sub>2</sub> 0.5 mm
Sparger 2	Air, O <sub>2</sub> 20 μm
TOI	$1 \times 10^6$ cells/mL
MOI	10
TOH	48 h

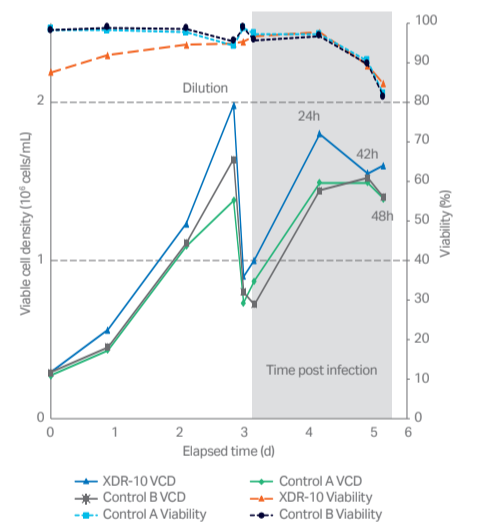


図 6. 細胞増殖と生存率。バイオリアクター培養と振とうフラスコ培養との比較 (対照群 A および対照群 B)。ウイルス力価分析用に、感染の 24、42、48 時間後にサンプルを回収しました

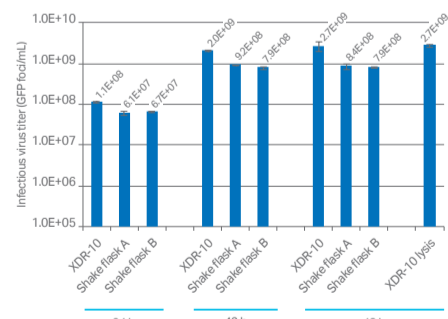


図 7. Xcellerex XDR-10 バイオリアクターおよび対照群において、24、42、48 hpi に自動蛍光顕微鏡を用いて測定された感染性ウイルス力価

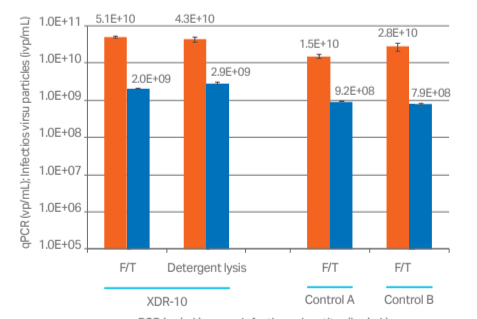


図 8. 感染後 42 時間での全ウイルス粒子 (vp/mL) と感染性ウイルス力価

## 結論

- 培地のスクリーニング検討は、細胞増殖およびウイルス生産性の両方にとって重要です。
- 本結果は、振とうフラスコと Xcellerex XDR バイオリアクターとの間に堅牢な拡張性があることを示しています。
- バッチ培養での最終力価が  $10^9$  ivp/mL の際に Xcellerex XDR-10 バイオリアクターによる AdV5-GFP 生産のスケールアップが効果的であることを示されました。

※記載されている所属は、執筆/取材当時のものです。

**Cytiva (サイティバ)**  
グローバルライフサイエンステクノロジー株式会社  
〒169-0073  
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング  
お問合せ: バイオダイレクトライン  
TEL: 03-5331-9336 FAX: 03-5331-9370  
e-mail: Tech-JP@cytiva.com



掲載されている内容および価格は 2019 年 2 月現在のものです。価格は希望小売価格 (消費税は含まれておりません) であり、単なる参考価格のため、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。