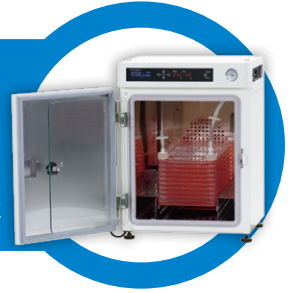


アプリケーションデータシート #034

強制通気式CO<sub>2</sub>/マルチガスインキュベーター *Prescyto MG-71C/M-A* No.1

多層式培養容器を用いた大量培養における強制通気の効果



多層式培養容器における自然通気と強制通気の違いを可視化し、培養結果でも比較する

強制通気 (AGV) について

『強制通気 (Active Gas Ventilation; 以下、AGV\*)』による培養容器内のガス交換は、弊社が精密なガス分岐の要となる装置上の構造に関して特許を持っている手法である。弊社はこれまでに〈カスタムバイオシェーカー CO<sub>2</sub>-BR〉シリーズで、AGVによって微生物や哺乳類細胞の培養効率や物質生産量が向上することを示してきた。CO<sub>2</sub>インキュベーター〈プレサイト MG-71〉シリーズにも、AGVに対応したタイプをラインナップしている。今回はこの強制通気式CO<sub>2</sub>インキュベーター〈プレサイト MG-71C-A〉による多層式培養容器を用いた哺乳類細胞の大量培養事例をご紹介します。

〈MG-71C-A〉は、振とう機を入れれば三角フラスコの、低速スターラーを入れればスピナーフラスコのAGV培養に使用可能だ。しかしながらいずれも振とうやプロペラ攪拌を伴う浮遊系培養であり、自然通気 (Normal Gas Ventilation; 以下、NGV\*) でも結果に一定の満足をしている研究者も多い。逆に多層式培養容器は接着系の静置培養であり、その名の通り培養トレーを複数重ねたような構造上、NGVでは各層とも効率よくガス交換されているのか疑問である (実際、製薬の研究開発や生産の現場で多層式培養容器による培養結果が芳しくないとの話を耳にした際、確認するとNGVである場合が多かった)。また、ガス交換が不足していても、それが培養に悪影響を与えるのかという疑問もある。よって非破壊酸素センサーによりNGVおよびAGVによる多層式培養容器内のガス交換効率をモニタリングした結果と、実際に細胞を培養して両者を比較した結果を併せて示すこととした。

\*『強制通気』の英訳はいくつかあるが、弊社では現在、参考文献<sup>1)</sup>で用いられている英訳 (対となる「自然通気」の英訳も含む) を引用している。

多層式培養容器内のガス置換状況のモニタリング

市販の多層式培養容器には、NGV用とAGV用がある (前者にはベントキャップが、後者にはガス供給用ホースのコネクターが付属)。多層式培養容器に5% CO<sub>2</sub>等を強制通気した場合と、その雰囲気下に静置して自然通気した場合、それぞれ内部の気相が大気組成からどのように変化 (ガス置換) するのかを直接かつ簡便にモニタリングする方法は一般化されておらず、気相の変化に伴う培地のpH指示薬による色変化、もしくは培養結果のよし悪しから通気の具合や要不要を判断する以外になかった。しかし多層式培養容器による細胞培養は非常にコストがかかるため、あらかじめ内部のガス置換に関する知見を得ていたほうが良い。弊社では非破壊酸素センサーを駆使して内部のガス置換状況をモニタリングすることができるので、その結果とpH指示薬の色変化とを併せてご紹介する。結果としては、AGVのガス置換効率の優位性を確認することができた。

①モニタリングの方法と結果：NGV

NGVタイプの多層式培養容器 (10層) に、気密性を損なわないよう非破壊酸素センサーチップを仕込み (上から5層目)、1% O<sub>2</sub>に設定した弊社マルチガスインキュベーター〈プレサイト MG-71M〉の庫内に静置、非破壊酸素センサーチップの信号を多層式培養容器の外から読み取った (図1)。また、もうひとつの同型の多層式培養容器に、細胞培養用の培地に添加されることが多いpH指示薬であるフェノールレッドを加えたトリスバッファーを各層に十分に行き渡る量 (2000 mL) 入れ、5% CO<sub>2</sub>に設定した弊社CO<sub>2</sub>インキュベーター〈プレサイト MG-71C〉の庫内に静置し、トリスバッファーの色変化をビデオ撮影した (図2)。NGVによるガス置換では、静置後24時間が経過してもインキュベーター庫内と同等のO<sub>2</sub>濃度には至らなかった。CO<sub>2</sub>によるトリスバッファーの色変化では、20分後から黄色に変化し始めるものの以降の変化は緩やかで、60分を経過しても完全な黄色にはならなかった。

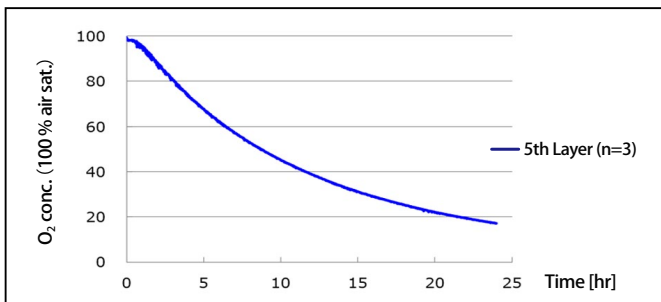


図1. NGVによる多層式培養容器内のO<sub>2</sub>濃度の変化

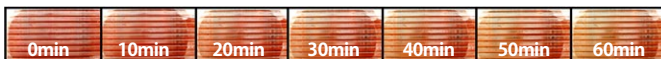


図2. NGVによる色変化 (映像のキャプチャー画像、彩度調整済)

②モニタリングの方法と結果：AGV

AGVタイプの多層式培養容器 (10層) に、気密性を損なわないよう非破壊酸素センサーチップを仕込み (上から1、5、10層目)、弊社窒素ガス発生装置 (N2 GENESIS 200) をフローメーターを介して接続、流量500 mL/minで窒素ガスを強制通気した。そして非破壊酸素センサーチップの信号を多層式培養容器の外から読み取った (図3)。また、もうひとつの同型の多層式培養容器に、①と同様にフェノールレッドを加えたトリスバッファーを入れ、5% CO<sub>2</sub>・500 mL/minに設定した弊社強制通気式CO<sub>2</sub>インキュベーター〈プレサイト MG-71C-A〉の庫内に設置し、トリスバッファーの色変化をビデオ撮影した (図4)。AGVによるガス置換では、通気開始後2~4時間で速やかに低酸素化できた (層によって多少の差があるのは、用いた多層式培養容器の構造的な要因と推測される)。CO<sub>2</sub>によるトリスバッファーの色変化では、10分後から黄色に変化し始め、60分経過する頃には完全に黄色になった。

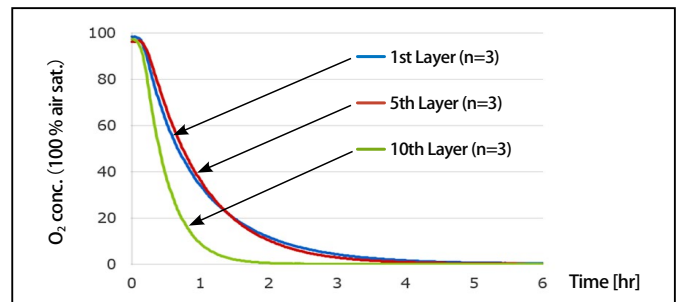


図3. AGVによる多層式培養容器内のO<sub>2</sub>濃度の変化



図4. AGVによる色変化 (映像のキャプチャー画像、彩度調整済)

**多層式培養容器を用いた細胞培養におけるAGVの効果の確認**

●材料と方法

細胞：Vero (アフリカミドリザル腎臓由来、接着細胞)、培地：EMEM with 10% FBS and antibiotics、1.5 L  
 容器：Cell Factory (NGV用)およびCell Factory with Active Gassing (AGV用)、いずれも10層、Thermo Fisher Scientific製  
 開始時細胞密度：4.0×10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>、培養条件：5% CO<sub>2</sub>、+37℃、培養時間：約90時間、評価項目：細胞密度、生存率  
 細胞の回収方法：培地回収後に容器内をPBS(-)で洗浄し、トリプシン-EDTAを加えて+37℃で20分間インキュベート  
 比較対象：φ6 cmの細胞培養用ディッシュで従来通りの培養 (NGV) も行って二者と比較

●結果と考察

多層式培養容器(10層)におけるVero細胞の培養では、AGVがNGVの約3.7倍の細胞密度となり、比較対象である細胞培養用ディッシュ(φ6 cm)に近い結果となった(表1)。多層式培養容器を用いる大量培養で通常のディッシュ並の効率を得るためには、AGVが有効であることが分かった。無論、iPS細胞では1.44倍であったとの報告<sup>1)</sup>がある通り細胞の種類によって細胞密度の増加具合が変化することは明白であるが、前述のモニタリング結果と併せても、AGVが有効に働くことはほぼ間違いないであろう。生存率に関しては、NGVとAGVで差がなく、いずれも細胞培養用ディッシュと同様であった。前述のiPS細胞のAGV培養でも、生存率はNGVのそれと差がなかったと報告されている。

なお、今回の実験ではトリプシン処理の際に多層式培養容器内のVero細胞がなかなか剥がれず、約20分間というトリプシン処理としては長時間のインキュベーションを経ても細胞が塊状のまま分散しにくく、細胞の一部は排出口付近に付着して回収できなかった。このロスにより、細胞培養用ディッシュとの細胞密度の差が生じたものと推測される。別の実験でHeLa細胞を多層式培養容器(10層)で培養した際には10分間程度のトリプシン処理で、本実験よりも細胞培養用ディッシュに近い細胞密度が得られた(表2)。回収時のロスを最小にするためには、細胞の種類によってPBS(-)での洗浄回数やトリプシン濃度を増やしたりインキュベーション時に振とうする等、トリプシン処理条件の最適化が必要かもしれない。なお、多層式培養容器はディッシュやフラスコに比べて培地の注入や細胞の播種および回収に時間を要するため、それが結果的に培養効率全般に影響している可能性もあることを付け加えておく。□

表1. 本実験(多層式培養容器を用いたVero細胞の培養におけるNGVとAGVの比較)の結果

Culture Vessel	Multilayer Culture Plate/NGV	Multilayer Culture Plate/AGV	Culture Dish/NGV
Incubator	MG-71C	MG-71C-A	MG-71C
Surface Area	10-layer, 6320 cm <sup>2</sup>		φ6 cm, 21 cm <sup>2</sup>
Culture Volume	1500 mL		5 mL
Cell	Vero		
Growth Medium	EMEM with 10% FBS and antibiotics		
Seeding	4.0×10 <sup>3</sup> cells/cm <sup>2</sup>		
Time of Culture	96 hr		
Condition	+37℃、5% CO <sub>2</sub> in air	+37℃、5% CO <sub>2</sub> in air、500 mL/min	+37℃、5% CO <sub>2</sub> in air
Yeild	1.2×10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup>	4.4×10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup>	5.0×10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup>
Viability	97%		

表2. 参考データ(HeLa細胞の培養における多層式培養容器と通常の細胞培養用ディッシュの比較)

Culture Vessel	Multilayer Culture Plate/AGV	Culture Dish/NGV
Incubator	MG-71C-A	Competitor's Conventional CO <sub>2</sub> Incubator
Surface Area	10-layer, 6320 cm <sup>2</sup>	φ6 cm, 21 cm <sup>2</sup>
Culture Volume	2000 mL	6.5 mL
Cell	HeLa	
Growth Medium	DMEM with 10% FBS and antibiotics	
Seeding	6.0×10 <sup>3</sup> cells/cm <sup>2</sup>	
Time of Culture	72 hr	
Condition	+37℃、5% CO <sub>2</sub> in air、500 mL/min	+37℃、5% CO <sub>2</sub> in air
Yeild	4.9×10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup>	5.3×10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup>
Viability	98%	94%

好評発売中

- 強制通気式CO<sub>2</sub>インキュベーター(プレサイト MG-71C-A)
  - 強制通気式マルチガスインキュベーター(プレサイト MG-71M-A)
- 各製品の詳細は、『タイテック・オンライン』(<http://taitec.net/>)をご覧ください。

- CO<sub>2</sub>インキュベーター(プレサイト MG-71C)
- マルチガスインキュベーター(プレサイト MG-71M)
- 窒素ガス発生装置(N2 GENESIS 200)

著者・編集

タイテック株式会社  
 企画開発部 宣伝企画グループ  
 〒343-0822 埼玉県越谷市西方2693-1  
 TEL: 048-988-8341 FAX: 048-988-8346 E-mail: senden@taitec.org  
 Web: <http://taitec.net/>

参考文献

1) Tohyama et al., Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes. *Stem Cell Reports* (2017) Vol. 9, 1-9.  
 [2017年11月発行]  
 各製品や本紙の内容に関するお問い合わせは、左記までお願い致します。