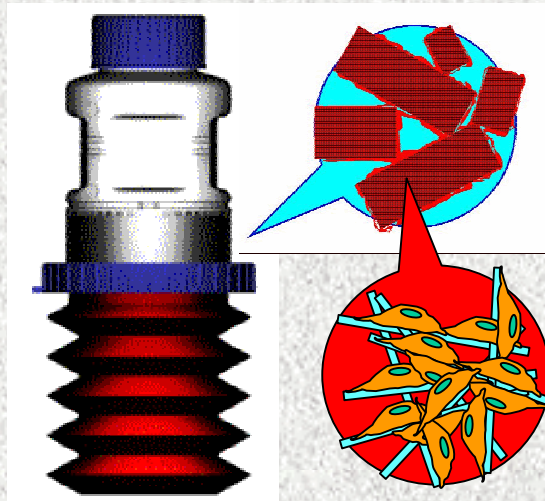
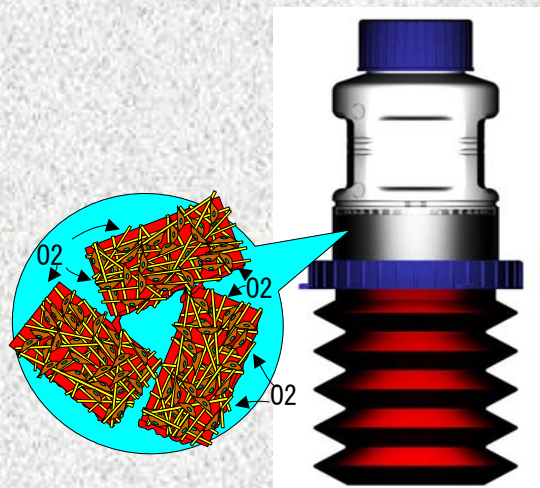


# BelloCell<sup>®</sup>とは？

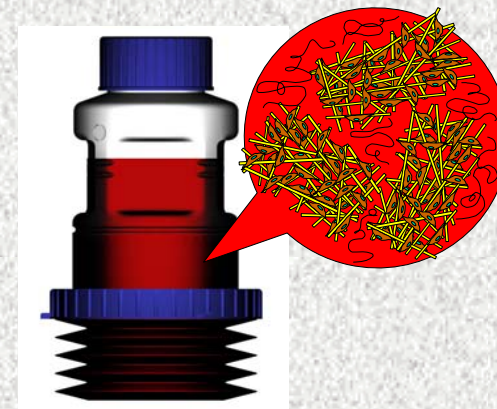


BelloCell<sup>®</sup>は上下二つの部分から成り、上部は細胞を固定するための多孔マトリックスが入っており、下部は圧縮できる構造で、培地を入れるスペースとなっている。

原理は、下部ボトルを上下運動させることであり、それはマトリックスに付着した細胞への栄養供給やエアレーションを可能にする。マトリックスが培地に浸かっている間、細胞が栄養を吸収し、代謝産物を排出する。マトリックスが露出している間、細胞が酸素を吸収し二酸化炭素を排出する。



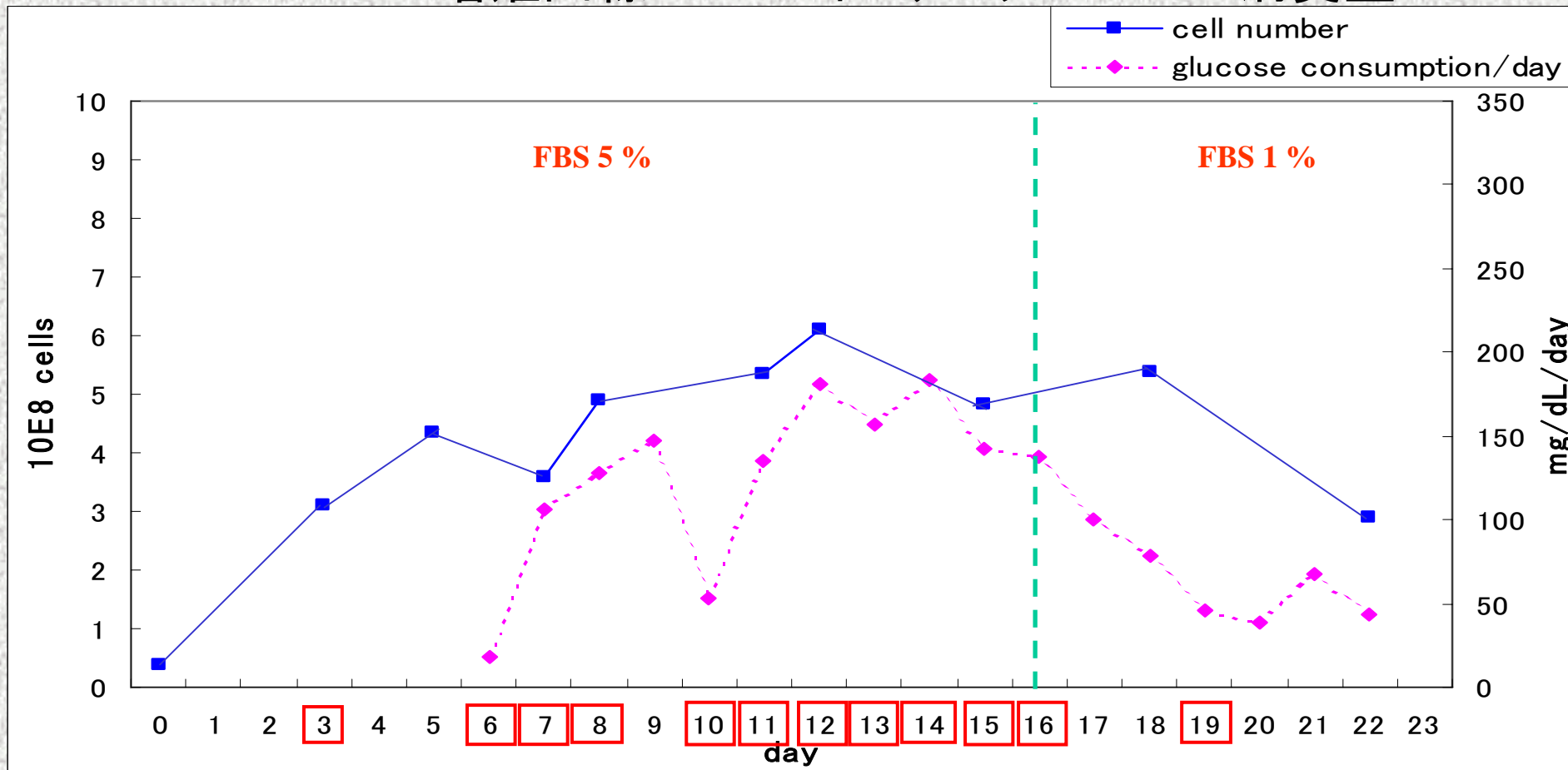
Bottom Holding time(B\_H time)の任意の設定によりガス交換を行う。



Top Holding time(T\_H time)の任意の設定により栄養供給と代謝産物の排出を行う。

1st trial

# CHO-Lecの増殖曲線と一日当たりのグルコース消費量



CHO-Lec:組み換えインテグリン分泌CHO    Medium change

Start:  $0.37 \times 10^8$  cells Max:  $6.11 \times 10^8$  cells 培養量500 mL

培養開始～3時間後まで inoculation parameter

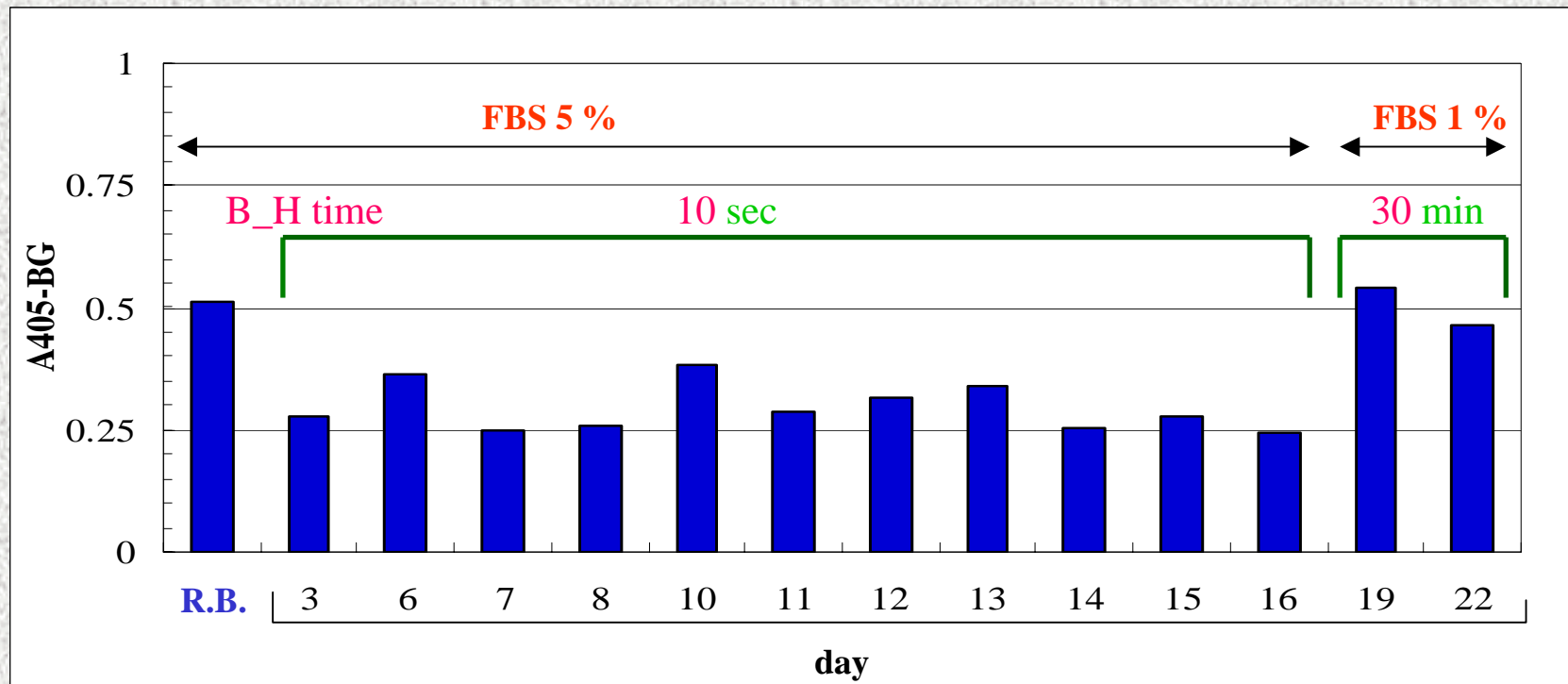
培養開始3時間以降 culture parameter

Rising rate	T_H time	Down rate	B_H time	→	Rising rate	T_H time	Down rate	B_H time
2 mm/sec	20 sec	2 mm/sec	0 sec		1 mm/sec	10 sec	1 mm/sec	10 sec

Day 16; T\_H time :10 sec → 0 sec B\_H time :10 sec → 30 min

1st trial

# ローラー培養とBelloCell®間のインテグリン 産生量の比較(ELISA)



R.B.・・・ローラーボトルを用いた回転培養。培養1週間後に得られた培養上清300 mLのインテグリン濃度  
3~22・・・BelloCell®を用いた500 mLでの培養の各上清回収日のインテグリン濃度

ローラー培養・・・1 time/weekの回収で30  $\mu$ g/mL x 300 mL  
・・・3 times/weekの回収で15  $\mu$ g/mL x 300 mL  
BelloCell®・・・1 time/dayの回収で15  $\mu$ g/mL x 500 mL

1st trial

培養液1 L当たりの産生量はローラー培養とBelloCell<sup>®</sup>で約15 mg/L (3 times/weekで回収した場合)と同等であるが...



BelloCell<sup>®</sup>はローラー培養よりも比較的短期間で**約2.8倍量**の蛋白質を得ることが出来た！

ローラー培養	...	36 mg/2.4 L/29日間	(3 times/weekで回収した場合)
BelloCell <sup>®</sup>	...	100 mg/6.5 L/22日間	

培養日数            BelloCell < ローラー培養

蛋白質の収量    BelloCell > ローラー培養

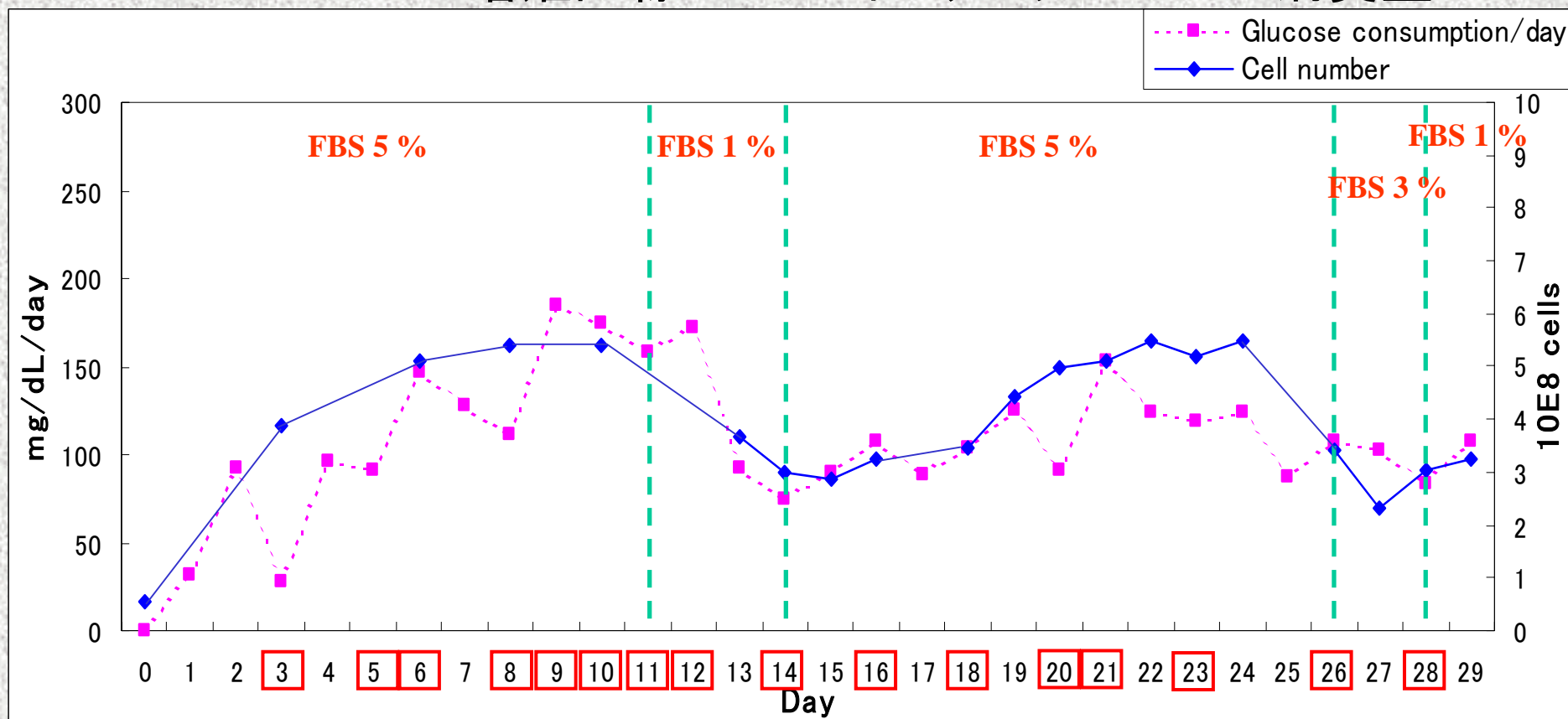
さらに、上清回収時間を延長することで高濃度の蛋白質を回収できることが示唆される (day19,22)。

○上清回収時間を延長するには？

→B\_H timeの延長と低FBS濃度での培養が考えられる。

2nd trial

# CHO-Lec の増殖曲線と一日当たりのグルコース消費量



□ Medium change    **Start:  $0.55 \times 10^8$  cells    Max:  $5.48 \times 10^8$  cells    培養量500 mL** 初期parameterは1st trialと同じ

Day 11; **T\_H time: 10 sec → 0 sec, B\_H time: 10 sec → 3 min**    Day 22; **B\_H time: 20 min → 30 min**

Day 13; **T\_H time: 0 sec → 10 sec, B\_H time: 3 min → 10 sec**    Day 23; **B\_H time: 30 min → 60 min**

Day 18; **T\_H time: 10 sec → 0 sec, B\_H time: 10 sec → 3 min**    Day 24; **B\_H time: 60 min → 90 min**

Day 19; **B\_H time: 3 min → 5 min**    Day 26; **T\_H time: 0 sec → 10 sec, B\_H time: 90 min → 10 sec**

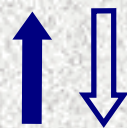
Day 20; **B\_H time: 5 min → 10 min**    Day 27; **T\_H time: 10 sec → 30 sec**

Day 21; **B\_H time: 10 min → 20 min**

2 nd trial

# 培養パラメータの変更が細胞増殖に与える影響

paramete FBS	T_H:30 sec B_H:10 sec	T_H:10 sec B_H:10 sec	T_H:0 sec B_H:3 min	T_H:0 sec B_H:60 min	T_H:0 sec B_H:90 min
5 %	↑↑	↑↑	↑↑	↑	↓↓
3 %	↑↑	↓	↓	↓↓	↓↓
1 %	↑	↓	↓↓	↓↓	↓↓



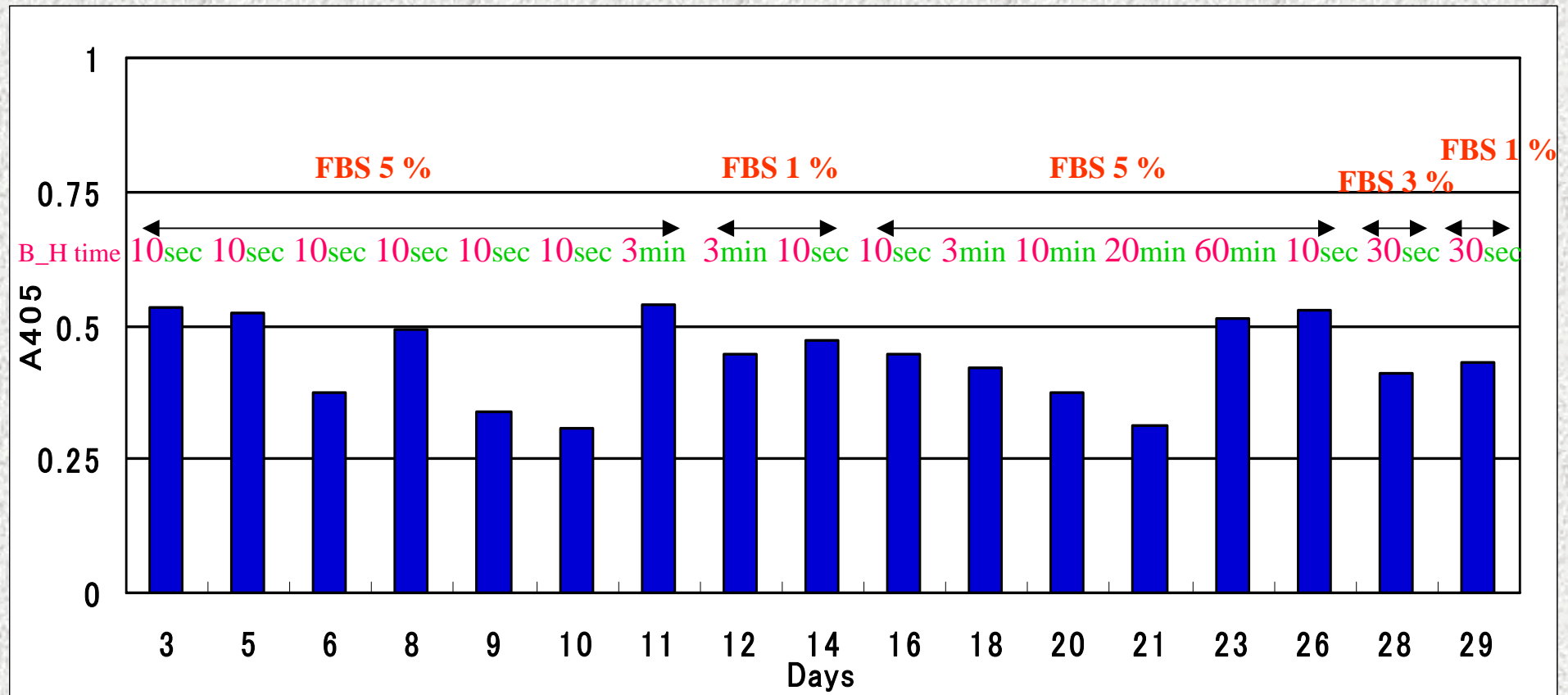
…細胞数の実測値



…予想される細胞数の増減

2 nd trial

## 産生されたインテグリン量の推移 (ELISA)



3~29...BelloCell®を用いた500 mLでの培養の各上清回収日のインテグリン濃度

低FBS濃度またはB\_H timeの増加による産生蛋白質量の変化は見られなかった。

→低FBS濃度での培養が可能。培地交換頻度を抑えることができる。

→低コスト培養・蛋白質精製の簡便化

# BelloCell<sup>®</sup>培養のまとめ

## 細胞(CHO-Lec)の増殖

約 $0.5 \times 10^8$ を植え込み $6 \times 10^8$ まで増殖した。

## インテグリン産生量

ローラー培養と比較して比較的短時間(ローラー29日、BelloCell<sup>®</sup>22日)で2.8倍の産生量(ローラー36 mg、BelloCell<sup>®</sup>100 mg)を得ることができた。

## 培養条件

FBS 5 % でB\_H timeを60 minまで延長することができた。

T\_H time : 30 sec, B\_H time : 10 secで細胞数を減少させることなくFBSを1 %まで下げることができた。