III. 培養細胞計測の現状と問題点†

北 野 一 昭

(武田薬品工業株式会社醸酵生産物研究所)

細胞の増殖や代謝を定量的に把握することは、細胞生理学的研究はもとより、細胞培養による物質生産においても、きわめて基本的かつ重要な課題である。その方法は、培養細胞を集団として認識し、その変化を定量的に捉えるマクロな計測法と、個々の細胞間の相違を識別したり個々の細胞内での変化を捉えるミクロな計測法に大別される。ここでは細胞培養による物質生産に関連して、動物培養細胞の増殖またはその活性を定量化するための機械的ならびに化学的計測法について述べ、次いで非破壊的立場の方法の現状とその問題点についてまとめる。

III-1. 培養細胞の機械的計数法

細胞培養において、細胞数の変化は培養の状態を表わす最も基本的なパラメーターであり、通常、血球計算盤を用いて顕微鏡下で直接計数される⁽¹⁾。この方法では、生細胞と死細胞を色素で染め分けることにより分別して計数できる利点がある。すなわち、トリパンブルー、エリスロシン、エオシンYやニグロシンなどは生細胞膜を透過できないが死細胞膜を透過するので、死細胞のみ染色される。これに対し、ニュートラルレッドでは生細胞のみ染色される。一方、細胞の自動計数法も開発されており、コールターカウンター（米国コールター社製）が最も一般に用いられる⁽²⁾。この器機では細胞の大きさも自動的に算定でき、培養のもう1つの指標になりうる。しかし、生細胞と死細胞を区別できず、培養液中に混在する細胞屑なども一緒に数えてしまうので測定条件を厳密に設定しないと過大評価される場合がある。とくに機械的損傷を受けやすい大容量攪拌培養などでは注意が必要である。

一般に、培養細胞の物質生産性は生細胞数に比例する

と考えられている。図 III-1 は、マウス・ヒト・ヒトヘテロハイブリドーマを長期浮遊灌流培養した場合のヒトモノクローナル抗体産生の経過⁽³⁾を示す。全細胞数当りの抗体産生速度は徐々に低下するのに対し、生細胞数当りの抗体産生速度は全培養期間を通じてほぼ一定であった。すなわち、長期灌流培養では抗体産生は明らかに生細胞数に依存した。しかし、同じ細胞株を回分培養した場合には、培養後半に生細胞数が著しく減少するにもかかわらず抗体産生はある期間持続し、全細胞数のほうがより良い指標となった。すなわち、色素で染色される細胞でもかなりの時間は物質生産性を維持しているものと考えられた。このように、細胞増殖の指標として全細胞数と生細胞数のいずれを採用すべきかは、生産物や培養方法によって異なり、適宜選択が必要である。

接着依存性細胞の計数には、トリプシンやキレート剤で処理して細胞を遊離させたのち、血球計算盤または自動計数装置で計数する方法が用いられる。しかし、酵素処理中に一部の細胞が崩壊するので、これに対処する目的で核染色により核数を計測する方法⁽⁴⁾も実用化されている。ただし、多核細胞では実際の細胞数より高い値となるので注意が必要である。

その他、計数法ではないが細胞の体積を沈殿管で計測する方法⁽⁵⁾も凝集性の強い細胞などでは簡便法として使用される。

III-2. 培養細胞の化学的計測法

細胞量の生化学的な計測法を表 III-1 にまとめる。細胞の DNA 量は、マクロには細胞数に比例するので、細胞増殖の良い指標となる。DABA はプリンヌクレオチドのデオキシリボースと、抗生物質ミスラマイシンやフルオロクローム色素は2本鎖 DNA とそれぞれ反応して特定波長の蛍光を出すのでそれを定量する。細胞を *in situ* で可溶化したのち直接定量する迅速定量法も確立されており、アガロースで固定化したハイブリドーマの計数などに応用されている⁽⁶⁾。

† III. Measurements of Mammalian Cell Growth.
Kazuaki KITANO (Microbiology Research Laboratories, Research and Development Division, Takeda Chemical Industries, Ltd., Yodogawaku, Osaka 532)

図 III-1 マウス・ヒト-ヒトヘテロハイブリドーマの長期浮遊灌流培養

細胞内蛋白量の変化も細胞増殖の1つの指標となる。初期には Lowry 法が用いられたが、コマシー・ブリリアント・ブルーやナフトール・イエロー、ナフトール・ブルー・ブラックなどによる染色がよく用いられる。

細胞の産生する特定酵素の活性を指標に増殖をモニターする方法⁽⁷⁾も検討されており、乳酸脱水素酵素の分泌量による肝細胞増殖の追跡や細胞内酸性フォスファターゼ活性の測定による内皮細胞の計測などが報告されている。しかし、この場合培養条件による活性の変動については十分留意しておく必要がある。

細胞内 ATP をルシフェリン-ルシフェラーゼで測定する方法⁽⁸⁾も生細胞量の計測法として感度の高い方法であり、全自動連続 ATP 測定装置も開発されている。ただし細胞内 ATP の半減期が非常に短いので、*in situ*に近い状態で試料の処理ができないと誤差が大きくなる。

MTT は生細胞内のミトコンドリア内膜中に存在する呼吸鎖に関与する酵素によって開裂され、MTT-フォルマザンが生成される。この化合物はイソプロパノールによって分解を受け呈色するので一定波長下で比色定量することにより生細胞量を求めることができる⁽⁹⁾。また、細胞の増殖を短時間で追跡するためには、通常、放射線標識化合物の DNA への取込み能を測定する方法がよ

く用いられるが、培養のコントロールに使用することはむずかしい。

なお、ここで述べた化学的計測法はいずれも間接的な細胞の計測法であり、それぞれの条件下で細胞数との相関性を十分に求めておくことが大切である。

III-3. 培養細胞の非破壊的計測法

細胞の増殖をオンラインで計測する技術は、培養の解析や自動制御に必須である。微生物の培養においても、その技術は必ずしも十分に確立されているとはいえないが、微生物で検討されてきたいくつかの方法は細胞培養にも利用できる。

a. 浮遊培養における計測

NADH 蛍光法⁽¹⁰⁾は、古くからその利用が検討され菌濃度センサーとして市販されている。蛍光量は、細胞密度以外に各種環境要因（溶存酸素濃度、エネルギー基質濃度、温度、pH など）によって影響を受けるが、これらが十分にコントロールされた条件下では蛍光量と細胞密度の間に直線関係が得られる。しかし、動物細胞の場合は単位容量当りの細胞量が少なく、また培地に高濃度のアミノ酸、B 群ビタミン、核酸等を含むため蛍光の検出感度が低下し、感度よく測定することが困難であった。しかし最近細胞培養にも適用できる感度の高いシステム⁽¹¹⁾も開発されている。

表 III-1 細胞の化学的計測法

(1) DNA assay

a) 3,5-Diaminobenzoic acid (DABA)
(Kissone & Robins, 1958)

b) Mithramycin

(Hill & Whatley, 1975)

c) 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)

(Kapuscinski & Skoczyla, 1977)

d) Hoechst 33258

(Cesarone *et al.*, 1979)

(2) Protein assay

a) Coomassie brilliant blue G-250

(Laughton, 1984)

b) Naphthol yellow S

(Skehan & Friedman, 1985)

c) Naphthol blue-black

(Everitt & Wohlfart, 1987)

(3) Enzyme activity

a) Lactate dehydrogenase

(Jauregui *et al.*, 1981)b) Acid phosphatase (Connolly *et al.*, 1986)

(4) ATP assay

a) Luciferin-luciferase assay

(Scheirer *et al.*, 1987)

(5) Tetrazolium assay

a) MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]

(Mosan, 1983)

細胞の懸濁液にガルバニセル電極を挿入した場合、白金アノードに生細胞が接触すると電流が発生することを利用した菌濃度センサー⁽¹²⁾が開発されているが、細胞培養にも利用可能である。

一方, Merten ら⁽¹³⁾は、赤外線センサーを用いてハイ

ブリドーマの培養をオンラインでモニターしているが、全細胞数との間に非常に良い相関関係を得ている。また、レーザー光を利用した濁度計⁽¹⁴⁾も幾種類が開発され、細胞増殖のモニターにも使用できる。しかし、これらの方法では生細胞数はモニターできない。

b. 固定化培養における計測

動物細胞をホローファイバーやセラミックマトリックスなどに固定して培養する技術が開発されているが、この場合細胞の増殖を上述の方法で直接モニターすることができない。通常、グルコースや酸素の消費速度から細胞の増殖の程度が推定されるが、グルコースはオンラインでの分析法が十分確立されているとはいえず、酸素のほうが指標としてよく用いられる⁽¹⁵⁾。すなわち、リアクターの入口と出口における酸素分圧の差と通気量からリアクター内で消費された酸素量を算出し、細胞の増殖量を推定する。増殖期には細胞量と酸素利用量はよく比例するが、定常期では利用速度が低下し、また培地中のグルコースや溶存酸素濃度などによってもその利用速度が変わるので注意を要する。

c. その他の非破壊的計測法

細胞の発生する微小熱量は、細胞数のみならず細胞の生理的状态を示すパラメーターとなるので熱量測定法は細胞分化などの生理学的研究に有効である⁽¹⁶⁾。微生物培養における熱量測定の利用はより進んだものが示されている⁽¹⁷⁾。フローサイトメトリー⁽¹⁸⁾では、細胞の大きさと細胞数、細胞の生死の判別、さらに細胞構成成分の細胞レベルでの変化等を解析でき生理学的研究に幅広く用いられている。機器価格の低減、専用化が進めばリアクター制御への応用も進むものと思われる。

以上、培養細胞計測法のうち、細胞増殖の指標になるものを中心に概説したが、オンラインでの計測という点からはまだ十分に確立された技術は少なく、今後の発展が期待される。

本報告中、筆者らの研究は、通産省次世代産業基盤技術研究開発制度によりなされたものである。

(1) M. Absher: "Tissue Culture, Methods and Application," ed. by P. F. Kruse, M. K. Patterson, Academic Press, New York, 1973, p. 395.

(2) M. Harris: *Cancer Res.*, **19**, 1020 (1959).

(3) 北野一昭, 新谷 靖, 笹井清二郎, 塚本恭造: 第3回次世代産業基盤技術シンポジウムバイオテクノロジー予稿集, 1985, p. 155.

(4) H. Katsuta, K. Nose: *Exp. Cell Res.*, **87**, 8

- (1974).
- (5) W. R. Tolbert, M. M. Mitt, J. Feder : *Anal. Biochem.*, **106**, 109 (1980).
- (6) K. Nilsson, W. Scheirer, H. W. D. Katinger, K. Mosbach : *Methods Enzymol.*, **121**, 352 (1986).
- (7) H. O. Jauregui, N. T. Hayner, J. L. Driscoll, R. Williams-Holland, M. H. Lipsky, P. M. Galletti : *In Vitro*, **17**, 1100 (1981).
- (8) W. Scheirer, R. Varecka, H. Bachmayer : *Develop. Biol. Standard.*, **66**, 349 (1987).
- (9) T. Mosmann : *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).
- (10) D. T. F. Harrison, B. Chance : *Appl. Microbiol.*, **19**, 446 (1970).
- (11) G. J. MacMichael, W. B. Armiger, G. F. Lee and R. J. Kranse : *BioPharm*, p. 48, May (1988).
- (12) T. Matsunaga, I. Karube, S. Suzuki : *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 125 (1980).
- (13) O. W. Merten, G. E. Palfi, J. Stähli, J. Steiner : *Develop. Biol. Standard.*, **66**, 357 (1987).
- (14) 長棟輝行, 竹松伸一, 井上一郎 : 特開昭 57-201954.
- (15) E. A. Bognar, G. G. Pugh, B. K. Lydersen : *J. Tissue Culture Methods*, **8**, 147 (1983).
- (16) 山村雅一 : 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 356 (1988).
- (17) A. Katarao, T. Mune and K. Takahashi : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2443 (1987).
- (18) 高橋 学 : 化学と生物, **21**, 728 (1983).