



Title	マイクロキャリアー動物細胞培養による血栓溶解剤生産のプロセス工学的研究
Author(s)	高木, 睦
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3097842
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

マイクロキャリアー動物細胞培養による
血栓溶解剤生産のプロセス工学的研究

1994年

高木 睦

目 次

緒論	1
第一章 増殖および生産のための基本的培養条件の設定	7
第一節 緒言	7
第二節 実験材料および実験方法	7
2.1 細胞	7
2.2 培地	7
2.3 細胞増殖培養(700mlスケール)	8
2.4 TPA生産培養(700mlスケール)	8
2.5 分析	9
第三節 結果と考察	9
3.1 細胞増殖に対する最適条件	9
3.2 TPA生産に対する最適条件	12
第四節 要約	17
第二章 攪拌効果および通気方法の改良	18
第一節 緒言	18
第二節 実験材料および実験方法	18
2.1 細胞	18
2.2 培地	18
2.3 細胞増殖培養(700mlスケール)	19
2.4 TPA生産培養(700mlスケール)	19
2.5 ジャー培養槽での培養	19
2.6 培養のDOコントロール	20
2.7 マイクロキャリアー沈降速度の測定	21
2.8 マイクロキャリアー密度の測定	21
2.9 エアースプレーシステム	21
2.10 分析	22

第三節 計算	22
3.1 マイクロキャリアー沈降層の臨界厚み	22
第四節 結果と考察	24
4.1 攪拌速度のTPA生産性に対する影響	24
4.2 マイクロキャリアー沈降速度に対するポリマー添加の影響	25
4.3 でんぷん添加のTPA生産性への影響	27
4.4 エアースプレーシステム	30
4.5 加圧培養	32
第五節 要約	35
第三章 酸素消費速度の連続測定	36
第一節 緒言	36
第二節 実験材料および実験方法	36
2.1 細胞	36
2.2 培地	36
2.3 細胞増殖培養(ジャー培養槽)	37
2.4 k_{La} 測定	37
2.5 グルコースオキシダーゼ反応	38
第三節 計算	39
3.1 培養液中での飽和 DO 濃度の推定	39
3.2 酸素消費速度(I_{O_2})	40
第四節 結果と考察	42
3.1 I_{O_2} 測定値は細胞の呼吸速度	42
3.2 I_{O_2} 測定に対する外乱	43
3.3 I_{O_2} の連続測定	45
3.4 連続法による I_{O_2} 測定値の定量性	46
第五節 要約	47
第四章 増殖から生産への最適移行時期のオンライン推定	48
第一節 緒言	48

第二節 実験材料および実験方法	48
2.1 細胞	48
2.2 培地	49
2.3 細胞増殖培養(ジャー培養槽)	49
2.4 小スケールでのTPA生産培養	49
2.5 分析	49
2.6 TPA生成活性の迅速測定	50
第三節 結果と考察	50
3.1 種々の長さの増殖培養の後に行なったTPA生産培養	50
3.2 TPA生成活性の経時変化	52
3.3 TPA生成活性の推定	53
3.4 細胞密度の推定	55
3.5 オンライン推定実験	58
第四節 要約	59
第五章 低血清培地の開発	60
第一節 緒言	60
第二節 実験材料および実験方法	60
2.1 細胞	60
2.2 培地	61
2.3 FCS代替物のスクリーニング培養	61
2.4 ディッシュを使用した細胞接着テスト	62
2.5 マイクロキャリアー培養(30mlスケール)	62
2.6 分析	62
第三節 結果と考察	63
3.1 FCS代替物のスクリーニング	63
3.2 代替物の細胞接着への影響	66
3.3 TPA生産のための低血清マイクロキャリアー培養	67
第四節 要約	71

総括	-----	72
引用文献	-----	76
本論文に関係のある報告	-----	79
謝辞	-----	80

緒 論

医薬品の中でも、蛋白製剤は蛋白質を主成分とするものであり、抗生物質等の製剤とは分子量、構造の複雑さなどの点で各段に相異なる。近年ヒト体内における代謝の生化学的メカニズムが解明されるにつれて、体内で種々の調節を行なっている蛋白因子を蛋白製剤として投与して、疾病の予防や治療を行なうことが多くなっている。その対象となる疾病には、日本人の死亡原因の上位を占めるガン、心筋梗塞、脳血栓などが含まれている。この蛋白因子のほとんどは分子量が極めて大きく、さらに蛋白質とシアル酸などの糖との複合体（糖蛋白）であるので、遺伝子組み替えの技術を用いてもこれを大腸菌、枯草菌などの微生物によって直接に生成することは非常に難しい。したがって、工業的な動物細胞培養の技術が必要と言われている^{1,2)}。これら蛋白因子の動物細胞培養による生産の例として、種々のインターフェロン^{3,4)}、エリスロポエチン⁵⁾、組織プラスミノゲンアクティベーター（TPA）⁶⁻⁸⁾、抗体⁹⁾、ワクチン¹⁰⁾などを挙げる事ができる。

動物細胞培養プロセスを工業生産技術として微生物培養プロセスと比較してみると、その主たる長所は上述のように糖蛋白を生成できることにある。一方その短所は大別して4つある。動物細胞は細胞壁を持たないために剪断力に弱く、溶存酸素供給のための強い攪拌が許されないことが第一の短所であり、これが実用化に必要な高効率生産を可能にする実装置の設計を困難にしている。第二の短所は高密度細胞培養の困難さである。この原因としては、上述のように溶存酸素供給能力が装置的に制限されたり、アンモニアや乳酸などの老廃物の細胞への悪影響が低濃度で生じることがあげられる。第三の短所は培養時間が長いことならびにバッチ毎に培養経過が異なるという培養の不安定さである。工業的に用いられている微生物の平均世代時間が20～60分であるのに対して、動物細胞は最短でも24時間と増殖が極めて遅く、増殖に長時間を要する。また、増殖させた細胞を維持しつつ目的の蛋白を生産させなければならない場合が多く、増殖と蛋白生産をあわせた全体の培養期間は1～2ヶ月におよぶ。さらに第四の短所としては、培養基成分として高価な牛血清が必要なことがある。動物細胞は、微生物に比べてホルモン、ビタミン、アミノ酸などの栄養要求が複雑であるために、これらを満たすための培地成分として高価な牛血清を培地に添加する必要がある。

従って、動物細胞培養プロセスを工学的に見た場合、これらの短所を克服して有用な糖蛋白の生産性を向上させることが大きな課題となる。これに対する個別の課題は種々考えられるが、現在重点的に検討すべきものとしては次の様な課題が上げられる。まず、培養条件を最適化した上で、

①細胞へ機械的損傷を与えずに溶存酸素供給能力を上げるように

通気攪拌を最適化し、培養装置のスケールアップおよび細胞の高密度化を行なう

(通気攪拌の検討)、とともに

②この長期間の培養をいかに自動化し安定に制御するか

(培養の安定化)、

③次に、培地や増殖因子の検討を行い、いかに培地中の牛血清濃度を減らして培地コストを低減化させるか(培地の低血清化)、である¹¹⁾。

以下、これらの課題に関する研究の現状について述べる。

①通気攪拌の検討

細胞壁を持たない動物細胞は、微生物細胞に比べて機械的な力に弱いため、攪拌による剪断力は言うまでもなく気泡の破裂により生ずる細胞損傷からも細胞を守る必要があると言われている¹²⁻¹⁵⁾。従って、攪拌槽を用いた動物細胞培養プロセスでは、通常の微生物培養のように培養液に通気して溶存酸素を供給する方法は適用できず、通気は培養液の表面からだけ行なわれている(表面通気)。ところが、表面通気による溶存酸素供給速度を決定するひとつの因子である培養液体積当りの培養液表面積は培養槽のスケールアップとともに小さくなるので、スケールアップに際しては攪拌速度を上げるなどして酸素供給速度を上げる必要がある。

ところで、培養液の攪拌の目的は細胞やマイクロキャリアを浮遊させることおよび通気空気から培養液に酸素を溶解させることであるが、上述のように細胞の機械的強度が低いため許容される攪拌回転速度は低く、たとえば通常の微生物培養の場合の約1/10である。したがって、スケールアップに際して低攪拌でも一定の酸素供給速度を確保することを目的として種々の通気技術が研究されている。たとえば、表面通気に改良を加えた液面攪拌法¹⁶⁾、液面発泡法¹⁷⁾、シリコンチューブを用いた方法^{18,19)}、スパージング²⁰⁾などがある。しかし、これらの研究では、溶存酸素供給速度の向上に関する議論は十分になされているが、動物細胞の増殖速度や蛋白生成能などの生化学的活性に対する通気方式の影響

についてはほとんど論じられていない。特に後の2者はいずれも膨大な長さのチューブが必要である、泡により細胞が損傷するなどの欠点があり、実用的とは言えない。

したがって、高攪拌のデメリットと酸素供給の必要性の両面から総合的に検討し、蛋白生産のための最適な通気攪拌方法を議論することが重要と考えられるが、それを行なった報告は見られない。

②培養の安定化

蛋白を動物細胞培養によって安定に生産するためには、pH、DO、温度や培地濃度などの培養環境因子を培養中の細胞の生理的状态に応じて最適に設定することが必要であるが、その生理的状态の指標として呼吸速度すなわち酸素消費速度はきわめて重要である²¹⁻²⁴⁾。酸素消費速度は、微生物培養においては排気ガスの酸素濃度分析により容易に測定されているが、動物細胞培養では微生物培養に比べて細胞密度が低く酸素消費速度の絶対値が微小であるため排気ガス分析では測定が非常に困難である。これに対して、一時的に培養槽気相中のガスを酸素分率が既知である窒素などの特定のガスに置換してその時のDOの変化速度から計算する方法が提案されている^{19, 25)}。しかし、この方法では、その際のDO変化が細胞へ悪影響を与えること、測定頻度に限界があることおよび測定方法が不安定であるため、実用的とはいえず、より実地的な酸素消費速度の測定方法の開発が待たれている。

またこれが実現されると、酸素消費速度を指標として培養環境因子を設定することも可能となる。一般に、動物細胞培養による蛋白生産プロセスの多くは、細胞を高密度に増殖させるための増殖培養工程と、増殖した細胞の活性を長期間維持して目的とする蛋白を生成させるための生産培養工程とからなる。増殖培養工程と生産培養工程とでは、最適な培養環境因子が異なっていると考えられ、増殖培養工程で増殖中の細胞がある生理的状态になったときに生産培養に対する最適値に変更する必要があると言われている²¹⁾。しかし、増殖培養中の細胞の重要な生理的因子である蛋白生産活性も細胞毎あるいは培養フェーズ毎、培養バッチ（ロット）毎にばらついている²¹⁾。従って、増殖培養工程を終了して生産培養工程へと移行するためには、細胞密度が高いことだけでなく、細胞の蛋白生産活性が高い生理状態になっていることを確認する必要がある。しかし、細胞の蛋白生産活性をリアルタイムで測定する方法はないので、細胞密度だけを指標にしているのが現状である。

③培地の低血清化

牛血清は高価なうえにロット間の品質のバラツキも大きいので²⁶⁾、牛血清の一部または全部を安価な添加物で代替することで牛血清の添加濃度を減らす必要がある。従来、無血清培地や低血清培地が開発されてきたが、その多くは代替添加物としてホルモンやビタミンなどの高価なものを含んでいる²⁷⁻³⁰⁾。しかも、これらは全て、牛血清のもつ細胞増殖促進作用の代替にのみ注目しており、血清濃度を下げると蛋白の生産性が低下するという1、2の報告^{12,13)}を除けば、これらの低血清培地で増殖した細胞の蛋白生産性に留意した研究はほとんど行なわれていない。

したがって、動物細胞培養をプロセス工学的に見たときに、①攪拌の蛋白生産への影響を考慮し、かつスケールアップおよび細胞密度の高密度化にも対応できる通気攪拌政策が課題として残っている。また、②培養の安定化のためには、生理状態の指標としての酸素消費速度のリアルタイムなモニタリング方法を開発し、それを利用することによって、増殖培養のバッチ毎のバラツキにより生ずる後半の生産培養の不安定さを改善できるような制御の研究が課題である。さらには、③増殖細胞の蛋白生産性も考慮した低血清培地も工業化のためには不可欠な課題である。

本論文では、マイクロキャリアー動物細胞による血栓溶解剤TPA生産プロセスをとりあげ、これらの課題の解決法について研究した。細胞培養によるTPA生産方法の概略は、ヒト胎児肺細胞を牛血清含有増殖用培地で増殖させた（増殖培養工程）後、TPA生成促進作用をもつプロテオースペプトンを含有する無血清生産用培地に培地交換して長期間にわたってTPAを分泌生産させる（生産培養工程）というものである。なお、生産培養工程の間、細胞密度は短期間維持された後、指数関数的に減少する。

第一章では、具体的に研究を始めるにあたって、まず、細胞増殖性およびTPA生産性の両面から、培養環境因子の最適値について総合的に検討した結果を述べている。増殖培養では、溶存酸素濃度が30%飽和未満になると比増殖速度が低下した。35℃以下の温度や至適値から0.2～0.3はずれたpHでは、比増殖速度も最高到達細胞密度も低くなった。一方、生産培養では、37℃以下の低温培養で細胞を長期間維持することにより生産性が向上した。結局、増殖培養に対しては溶存酸素濃度30%飽和以上、温度37℃、pH7.4が最適であり、生産培養ではpHの至適値は6.8、溶存酸素濃度の至適範囲は20～30%飽和、至適温度は33℃であった。

第二章では、TPA生産に適した通気攪拌方策を総合的に検討した結果を述べている。マイクロキャリアがほぼ均一に分散し溶存酸素濃度を一定に維持できる70 rpm以上の攪拌速度での生産培養においては、細胞減少速度に差が表れなくても、攪拌速度が低いほどTPA生産量は高かった。これは、細胞へ加わる機械的な力の大小に依ると考えられた。しかし、攪拌速度をさらに下げてマイクロキャリアが培養槽底部に厚さ0.77 mm以上沈積すると溶存酸素の拡散律速が生じると計算できた。そこで、でんぷんなどのポリマーを培養液に添加して培養液の比重を増大させれば、20 rpmのような低攪拌でも沈積を防げた。静置培養では

でんぷんはTPA生産性には影響しないが、でんぷんを添加してマイクロキャリアの沈降を防止した20 rpmの培養では70 rpmよりもTPA生産量が高かった。

20 rpmのような低攪拌条件下で、表面通気によって溶存酸素供給速度を上げるための第一の方法としてエアースプレー法を採用し、通気速度の最適化により k_La を単純な表面通気の約2.3倍に増大できた。第二の方法として加圧培養をとり上げ、槽内を通常圧力の $0.2 \text{ kg/cm}^2\text{-G}$ から $1.5 \text{ kg/cm}^2\text{-G}$ まで加圧しても細胞増殖には全く悪影響を与えないばかりか、TPA生産性は僅かに向上した。以上により、TPA生産に有利な低攪拌でもスケールアップが十分に可能であることを示した。

以下の章では、培養の安定化に関して検討した結果を述べている。

第三章では、不必要なDO変化の様な外乱を細胞に対して与えない、酸素消費速度の連続測定方法を検討した結果を述べている。培養液表面の泡が酸素消費速度の測定値に大きな外乱を与えることを、 k_{La} に対する泡の影響から説明し、発泡を防ぐことによって測定値がきわめて安定化することを示した。一方、培養槽内気相を窒素などの特定の測定用のガスに置換することなく、排気ガス分析を併用すれば酸素消費速度の連続測定が可能であることを示した。この方法で得られた測定値の定量性をグルコースオキシダーゼを用いたグルコースの酸化反応系によって証明した。

第四章では、増殖培養から生産培養への最適な移行時期をリアルタイムに判断する方法を研究した結果を述べている。増殖培養を終了して生産培養へ移行する際の最適な切替時期は、細胞密度が最高に到達した時期とは必ずしも一致していなかった。これは細胞当りのTPA生産活性が増殖培養の進行にともなって変化するためであり、増殖培養のバッチ毎にそれが最大になる時期が異なることが判明した。一日に一回サンプリングして測定する細胞密度と酸素消費速度のオンライン測定値および過去の培養データとを用いた重回帰分析によりTPA生産活性を連続的に推定出来ることを示し、増殖培養から生産培養への最適切替時期のオンライン判断を可能にした。

第五章では、本プロセスの工業化に必須な課題として、安価な代替添加物による低血清培地の開発およびこの低血清培地で増殖した細胞のTPA生産性について研究した結果を述べている。血清に代わる増殖促進物質をスクリーニングした結果、BSAと硫酸第一鉄とがそれぞれ単独で顕著な増殖促進効果を持つことが判明した。これらの細胞接着への影響を調べたところ、BSAは細胞が担体へ付着するのを阻害することが判明した。しかし、細胞がマイクロキャリア担体に接着し終わってからBSAを添加することによりこの問題を回避でき、BSAと硫酸第一鉄の添加により血清濃度を10%から3%に低減化したマイクロキャリア攪拌培養に成功した。さらに低血清増殖した細胞のTPA生産性が10%血清で増殖した細胞と比べて低下していないことも確認した。

総括では、本論文の結果をまとめるとともに、動物細胞培養による蛋白生産プロセスの開発における本論文の意義について総括した。

第一章 増殖および生産のための基本的 培養条件の設定

第一節 緒言

動物細胞培養において培養pHは7.0～7.8が適していると一般にいわれているが細胞によって異なっている³¹⁻³⁴⁾。また、通気ガスの酸素分圧の影響を論じたものは多いが^{18, 35-40)}、DO濃度の実測に基づく直接的かつ詳細な検討はまだなされていない^{21, 41, 42)}。また、これらは細胞増殖のみを考えたpHとDOの最適化であり、細胞による蛋白生産に注目した最適化はまだ検討されていない。さらに、温度の影響に言及した研究は非常に少ない^{3, 43, 44)}。また、これら3つの培養環境因子の最適値について総合的に研究した例は無い。

本章においては、TPA生産を目的としたHEL細胞の培養プロセスにおいて、温度、pH、DOの3つの培養環境因子の最適値について、細胞増殖性だけではなくTPA生産性の面からもあわせて、総合的に検討した結果を述べる。

第二節 実験材料および実験方法

2.1 細胞

TPA生産細胞として接着依存性の正常二倍体繊維芽細胞であるヒト胎児肺細胞（HEL、MA社）を用いた⁸⁾。なお、本細胞は、株化細胞ではないので40～50代までしか増殖できず、接着依存性でもあるので、連続培養などによる解析実験は行なえなかった。

2.2 培地

10%FCS（牛胎児血清、GIBCO社）および硫酸カナマイシン（明治製菓社）50 mg/Lを含むMEM培地（GIBCO社）を細胞増殖培養用培地として用いた。一方、細胞増殖培養の後に無血清条件下で行なうTPA生産培養用の培地として、TPA生成を顕著に促進するプロテオースペプトンNo.3（DIFCO社）⁸⁾10 g/Lおよび硫酸カナマイシン（明治製菓社）50 mg/Lを含む199培地（GIBCO社）を用いた。

2.3 細胞増殖培養

1 L 容球形ガラス製スピナーボトル（シバタハリオ社）を用い、マイクロキャリア（Cytodex1、ファルマシア社）3 g/Lを含む全容700 mlの増殖用培地に細胞を 1×10^5 /mlの割合で播種し、70 rpmで攪拌増殖培養（回分培養）を開始した。恒温水槽にスピナーボトルを浸し培養温度を37℃に制御した。

通気は表面通気だけとした。空気を通気するとDO濃度が常に100%飽和になるので、DO濃度を15～60%飽和の任意のレベルに制御できるように、常時の通気としては空気の代わりにN₂を1 L/minおよびCO₂を50 ml/minの速度で通気した。その上で、DO電極（エイブル社）およびDOコントローラー（エイブル社）を用い、DO制御用のO₂通気（300 ml/min）をON-OFFすることによって、DOを空気に対する飽和値の15～60%の範囲内の一定レベルに制御した。

pH電極およびpHコントローラー（東京理化社）を用い、50 ml/minの速度でCO₂をON-OFFモードで断続供給することによってpHを7.4に制御した。増殖培地は2日毎に交換した。

pH、DOコントロールの互いの干渉によるコントロールの乱れや、細胞密度の経時的な増加による制御性の悪化は特には認められず、およそDOは±5%飽和、pHは±0.1以内の制御幅でコントロールできた。

2.4 TPA生産培養

10 L 容球形ガラス製スピナーボトルを用いた全容8 Lの細胞増殖培養を行なった後、細胞の接着したマイクロキャリアを生理的リン酸緩衝液（以下PBSと略す）（NaCl ; 8.0 g/L, KCl ; 0.2 g/L, Na₂HPO₄ ; 1.15 g/L, KH₂PO₄ ; 0.2 g/L）8 Lで洗浄した。これを1 L 容球形ガラス製スピナーボトルに分注し、生産培養用培地を用いて全容700 ml、マイクロキャリア密度3 g/Lで培養した。温度37℃、pH6.8、DO50%飽和に制御して、生産培地は2日毎に交換した。

2.5 分析

細胞密度は、脱核染色法の常法⁴⁵⁾に従い、細胞膜をクエン酸で溶解後、細胞核をクリスタルバイオレットで染色することにより計数して求めた。培養液中のTPA活性は、フィブリンプレート法⁴⁶⁾に従い、フィブリン溶解活性として測定した。

第三節 結果と考察

3.1 細胞増殖に対する最適条件

細胞増殖に対する培養条件を最適化するために、DO、温度、pHの影響をそれぞれ調べた。培養中終始15～60%飽和の範囲内で種々のDO濃度に制御した培養では、図1に示したように、培養全期間、細胞密度はほぼ対数的に増加した。細胞密度の測定値に最小二乗法を適用して比増殖速度(μ)を計算した結果、次ページの図2に示すように、DOが30～60%の範囲内では比増殖速度はほぼ一定であるが、DOが15%飽和の培養の比増殖速度は最高値の約78%に低下することがわかった。

15%飽和以下のDOでは比増殖速度が顕著に減少したのに対して、最大細胞密度が変化しなかったのは、低濃度のDOが細胞増殖速度に対して制限基質となったが、継続して酸素を供給すればたとえ低速度でも増殖を続けれるからであると考えた。

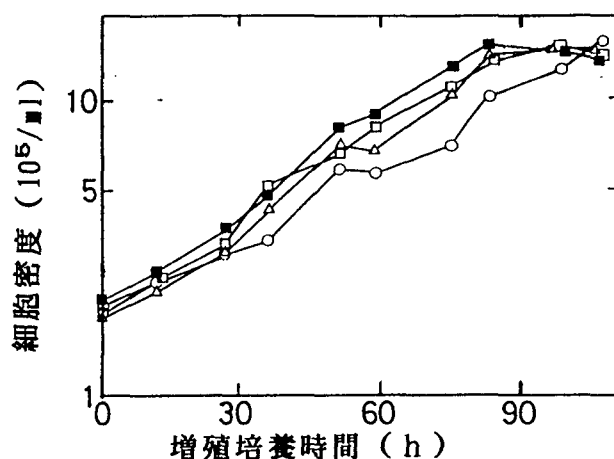


図1 種々のDO濃度での細胞増殖
■;60%飽和、□;45%飽和、△;30%飽和、○;15%飽和

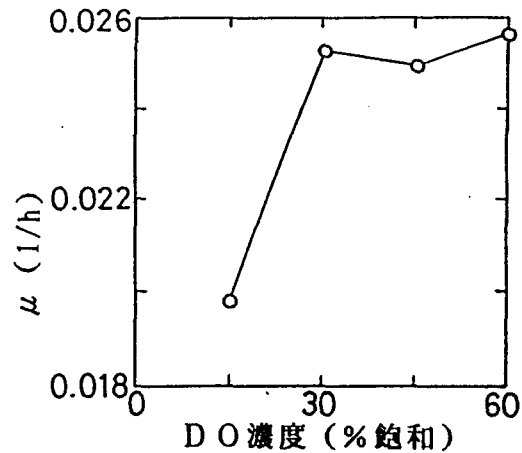


図2 比増殖速度 (μ) に対する DO 濃度の影響

35～39℃の範囲内で種々の温度に制御した培養結果を同様にまとめてみると、図3に示すように、37℃において比増殖速度が最高になった。しかし、39℃でみられた比増殖速度の最低値でも37℃での最高値の95%以上と高く、高温または低温での比増殖速度の低下は殆どないといえる。一方、最大細胞密度は培養温度によって大きな影響を受け、35℃では37℃で示された最高値の55%以下と非常に小さかった。これは、低温では細胞が丸くなりマイクロキャリアから剥離しやすくなることと関連があると推測している。これに対して比増殖速度が温度の影響を殆ど受けないことについての理由の詳細は不明である。

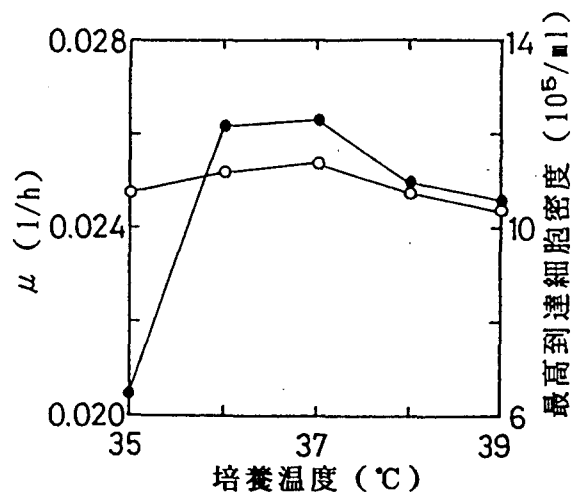


図3 細胞増殖に対する培養温度の影響
○; 比増殖速度 (μ)、●; 最高到達細胞密度

pHをそれぞれ6.9, 7.1, 7.4, 7.6, 7.9, 8.1に制御して増殖培養を行なった結果、図4に示すように、比増殖速度、最大細胞密度の両方共にpH7.4で最高になった。また、比増殖速度、最大細胞密度ともにpHにより大きな影響を受けることがわかった。特に7.9~8.1の高いpHでは、細胞はほとんど増殖できなかった。

最適pHに関しては、Eagleによって詳しく研究³²⁾されているが、これによるとヒト正常繊維芽細胞の増殖最適pHは細胞により7.5~7.8の範囲内にある。また、本研究と同じヒト胎児肺細胞であるWI-38ではpH7.7が最適になっている。いずれも本研究の結果であるpH7.4とは異なっているが、これは細胞種の違いと共に、静置培養と攪拌培養との違いも影響していると考えている。

DOとは異なり、pHと温度は比増殖速度と最大細胞密度との両方に影響した。これは最適範囲以外のpHや温度での細胞蛋白の変化に関係していると、推測している。

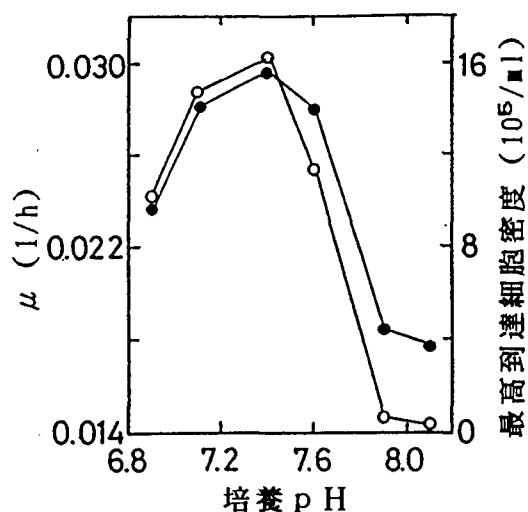


図4 細胞増殖に対する培養pHの影響
○;比増殖速度(μ)、●;最高到達細胞密度

3.2 TPA生産に対する最適条件

次にTPA生産の培養条件の最適値を調べるために、37℃、pH7.4、DO50%飽和で増殖培養した同じ細胞を用いて種々の培養条件で生産培養を行なった。まず、pHをそれぞれ6.5, 6.8, 7.0, 7.3, 7.8に制御してTPA生産培養を行なった結果、図5に示すように、生産培養開始後のある期間細胞密度は一定に維持され、その後ほぼ指数関数的に減少した。

無血清TPA生産培地を用いたTPA生産培養において、本来無血清培地では増殖できないHEL細胞の密度は生産培養開始後すぐには減少し始めず、一定時間維持された。この原因は、細胞内部および表面に残存していた血清成分による細胞維持であると考えられる。

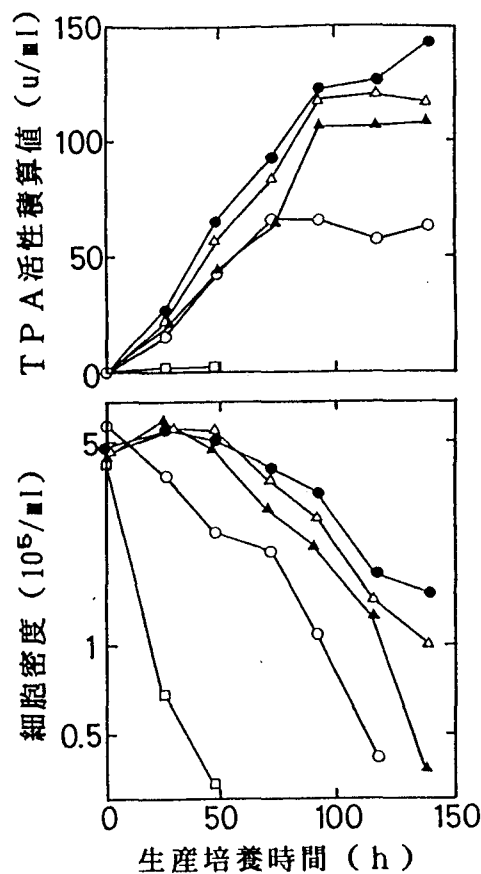


図5 種々の培養pHにおけるTPA生産培養
○; pH 6.5、●; 6.8、△; 7.0、▲; 7.3、□; 7.8

この現象は、次の式で表現できた。

$$dX/dt = 0 \quad (t < \tau) \dots\dots\dots (1)$$

$$dX/d\theta = -k_d \cdot X \quad (t \geq \tau) \dots\dots\dots (2)$$

$$\theta = t - \tau$$

t : 生産培養時間 (h)

τ : 細胞が減少し始めるまでの遅延時間 (h)

X : 細胞密度 (10^5 /ml)

k_d : 細胞密度比減少速度 (1/h)

pH 7.0 を例にとって τ と k_d の決定方法の概略を図 6 に示した。

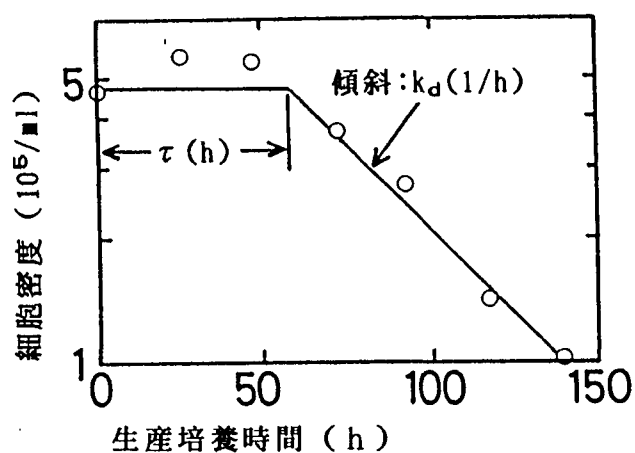


図 6 TPA生産培養における細胞密度の典型的な経時変化パターン

また、それぞれの生産培養の時間区間毎のTPA活性増加分と細胞密度の対数平均値とを用いて、区間毎の比生産速度 ($u/10^6 \text{ cells/h}$) を計算した。さらにそれらの生産培養全期間を通して平均値を算出した。求めたこれらのパラメーターをまとめて図7に示したが、比生産速度に関してはpH7.3が適していたがpH6.8との差が少なく、細胞維持 (k_d) に対しては明らかにpH6.8が適していたので、総合的に見てTPA生産に対する最適pHが6.8になったと考えた。

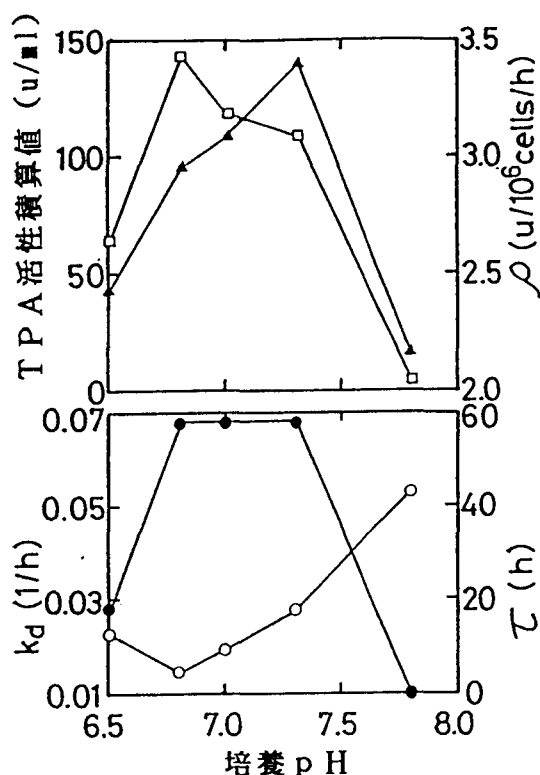


図7 TPA生産培養に対する培養pHの影響
□; TPA生産量、▲; 比生産速度(ρ)
○; 細胞密度比減少速度(k_d)、●; 細胞密度維持時間(τ)

同様にして、10～60％飽和の範囲内の種々のD O 濃度に制御した生産培養の結果から得られた各パラメーターをまとめて図8に示した。細胞密度比減少速度は30％飽和以上のD O で高く、細胞維持時間は20～30％飽和のD O で最高になったので、細胞維持には20～30％飽和が適していた。一方、比生産速度についても20％飽和が最適だったので、総合的にみてTPA生産培養には20～30％飽和のD O が適していたといえる。

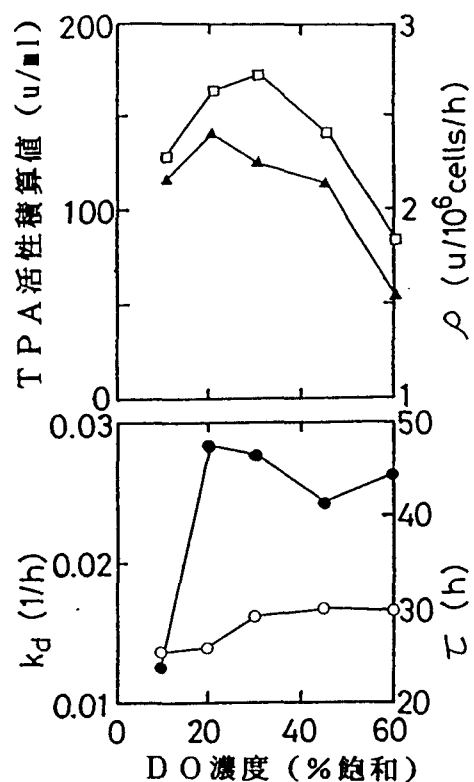


図8 TPA生産培養に対するD O 濃度の影響
□; TPA生産量、▲; 比生産速度(ρ)
○; 細胞密度比減少速度(k_d)、●; 細胞密度維持時間(τ)

さらに31～39℃の範囲内の種々の温度における生産培養のパラメーターを図9に示したが、31℃を除けば温度を下げるにしたがって細胞維持時間が長くなるとともに細胞密度比減少速度が小さくなる傾向があった。また、比生産速度については33～35℃が適しており、結局TPA生産に関する最適温度は37℃より4度も低い33℃であった。

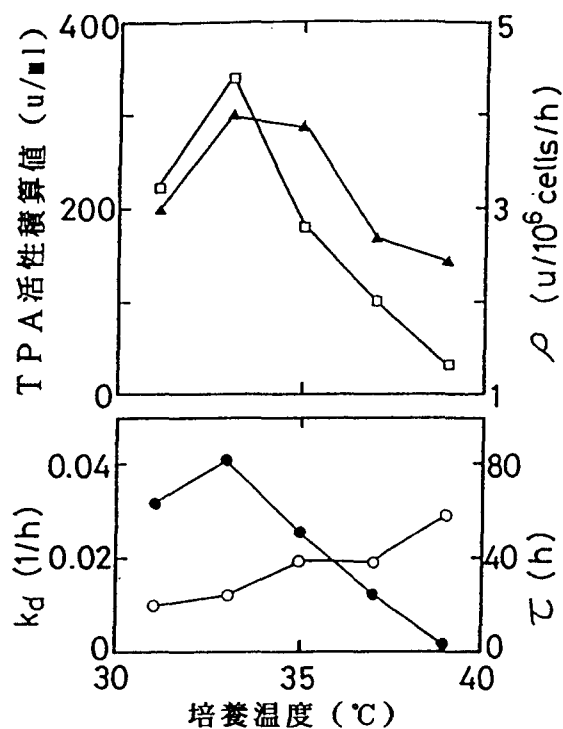


図9 TPA生産培養に対する培養温度の影響
□;TPA生産量、▲;比生産速度(ρ)
○;細胞密度比減少速度(k_d)、●;細胞密度維持時間(τ)

以上のようにして回分培養で得られた細胞増殖培養およびTPA生産培養のそれぞれに対するDO、pH、温度の最適条件を表1にまとめた。これにより、細胞増殖培養とTPA生産培養の最適培養条件が互いに異なることが明かとなった。また動物細胞の培養温度に関しては、27℃ではN-7αフルグルタミン酸の分泌が37℃の25%しかない⁴³⁾、或いは33℃での抗体生産が37℃の43%と低い⁴⁴⁾という報告にあるように、『培養温度は37℃が適している』というのが通説であった。しかし、これに反して本研究では、細胞維持性および比生産速度の両面において37℃よりも4度も低い33℃が適しているという新しい知見が得られた。

表1 細胞増殖およびTPA生産のそれぞれに対する最適条件

	最適条件		
	pH	DO (%飽和)	温度(℃)
細胞増殖培養	7.4	≥30	37
TPA生産培養	6.8	20~30	33

第四節 要約

細胞増殖およびTPA生産の両面から、温度、pH、DOの3つの培養環境因子の最適値について総合的に検討した。増殖培養では、溶存酸素濃度が飽和値の30%未満になると比増殖速度が低下した。35℃以下の温度や最適値から0.2~0.3はずれたpHでは、比増殖速度が低下するだけでなく、最高到達細胞密度も低くなることがわかった。一方、生産培養では、33℃の低温培養で細胞を長期間維持することによりTPAの生産性が向上した。

結局、増殖培養に対しては溶存酸素濃度30%飽和以上、温度37℃、pH7.4が最適であり、生産培養ではpHの最適値は6.8、溶存酸素濃度の最適範囲は20~30%飽和、最適温度は33℃であった。

第二章 攪拌効果および通気方法の改良

第一節 緒言

攪拌槽を用いた動物細胞培養プロセスでは、通気は培養液表面からだけ行なわれている（表面通気）。ところが、培養槽を相似形でスケールアップすると培養液体積当りの培養液表面の面積はスケールアップとともに小さくなるので、スケールアップに際しては攪拌速度を上げるなどして溶存酸素供給速度を上げる方策が不可欠となる。しかし、動物細胞が機械的な力に弱いことから、攪拌速度を上げることは現実的ではないと言われている。

従って、低攪拌でも一定の酸素供給速度を確保でき、しかも動物細胞の増殖速度や蛋白生成能などの生化学的活性に悪影響を与えない通気攪拌方法に関する検討が必要となる。

本章では、通気攪拌の検討を目的として、TPA生産性に対する攪拌速度の影響を明確にした上で、最適な通気攪拌方策を見つけるため溶存酸素供給速度の面と通気方法の動物細胞に与える影響の面の両方から総合的に検討した結果について述べる。

第二節 実験材料および実験方法

2.1 細胞

第一章2.1と同じくヒト胎児肺細胞を用いた。

2.2 培地

細胞増殖培養用培地としては、第一章2.2に示した方法と同様に10%FCS含有MEM培地を用いた。また、TPA生産培養用培地として第一章2.2に示したようにプロテオースペプトンNo.3含有199培地を用いた。培地の比重を上げるための添加物としてでんぷん（可溶性デンプン、和光純薬）を用いた。

2.3 細胞増殖培養(700mlスケール)

第一章2.3に記した方法と同様にして、1 L容球形ガラス製スピナーボトル（シバタハリオ社）を用い、マイクロキャリア3 g/Lを含む全容700 mlの増殖用培地に細胞を 1×10^5 /mlの割合で播種し、70 rpmで攪拌増殖培養を開始した。恒温水槽にスピナーボトルを浸し培養温度を37℃に制御した。

また、後で述べるように空気を表面通気するとDO濃度が常に100%飽和になるので、50%飽和に制御できるように、常時の通気としてはN₂を1 L/minおよびCO₂を50 ml/min通気した。その上で、DO電極（エイブル社）およびDOコントローラー（エイブル社）を用い、DO制御用のO₂通気（300 ml/min）をON-OFFすることによって、DOを空気に対する飽和値の50%に制御した。この設定値は前章の結果に依った。

pH電極およびpHコントローラー（東京理化社）を用い、供給速度50 ml/minのCO₂をon-offモードで断続供給することによってpHを7.4に制御した。増殖培地は2日毎に交換した。

2.4 TPA生産培養(700mlスケール)

第一章2.4に示した方法と同様にして、1 L容球形ガラス製スピナーボトルにて、培養液量700ml、マイクロキャリア密度3 g/Lの生産培養を行なった。前章の結果と実験が前後したため温度は最適値の33℃ではなく37℃となっている。また、pH6.8、DO50%飽和に制御して、生産培地は4日または6日毎に交換した。

2.5 ジャー培養槽での培養

ジャー培養槽（50 L，丸菱バイオエンジニアリング社）中で35 Lの培地を用いて700 mlスケールと同様にして増殖培養を行った。攪拌速度は40 rpm、温度は37℃である。空気1.5 L/minとCO₂ 50ml/minを常時通気した。DO制御用O₂(1.5 L/min)をON-OFFすることによって、常にDOを空気に対する飽和値の50%に制御した。さらに、100 ml/minのCO₂をオンオフすることによってpHを7.4に制御した。増殖培養終了後TPA生産培養を行なった。

2.6 DOコントロール

DO濃度は全ての実験の全期間において $50 \pm 5\%$ 飽和に制御されたが、その方法について以下に述べる。培養液中のDOの変化速度は次の式で表される。

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \times (C^* - C) - I_{O_2} \dots \dots \dots (3)$$

C : DO濃度 (mmol/L)

C* : 飽和DO濃度 (mmol/L)

$k_L a$: 酸素移動容量係数 (1/h)

I_{O_2} : 酸素消費速度 (mmol/L/h)

本実験で使用した培養器とその攪拌速度は、1 Lスピナーボトルの70 rpmと20 rpmとさらにジャー培養槽の40 rpmの3種類であるが、それぞれの水系で測定した $k_L a$ は2.10、0.654、0.15(1/h)であった。一方、 I_{O_2} に関しては、本実験の細胞密度が約 10^5 /ml～約 10^6 /mlの範囲内であり、これに応じて I_{O_2} は約0.01から約0.1(mmol/L/h)まで増加した。

この条件下で、DOを50%飽和である0.112 mmol/Lに制御するために必要なC*は、2式で $dC/dt=0$ として、約0.117～0.160 mmol/L(70 rpm)、0.128～0.265 mmol/L(20 rpm)、0.179～0.779 mmol/L(ジャー)と計算される。

このC*が空気に対する飽和濃度以上になる場合には常時空気を通気し、これより小さい場合には常時窒素を通気し、調節用に酸素通気をON-OFFしてDOを制御した。なお、細胞増殖にともなう常時通気ガス成分の変更は行わなかった。具体的には、スピナーボトルの場合には、常時の窒素通気1 L/minに対して11～15%(70 rpm)、12～25 vol%(20 rpm)の酸素通気がon-offされるようにDO制御用酸素の通気量を300 ml/minとした。また、ジャー(0.2 kg/cm²-G)では、常時の空気通気1.5 L/minに対して0～15%が確保されるようにon-off制御に用いる酸素の通気量を1.5 L/minとした。また、ジャー培養槽を用いた加圧培養実験(1.5 kg/cm²-G)では、常時通気を窒素1.5 L/minとして、これに対して7～29%の酸素通気になるように設定した。

2.7 マイクロキャリアー沈降速度の測定

でんぷん、フィコール、食塩などを含んだ 3 g/L のマイクロキャリアー懸濁液 10 ml を 15 ml 容の遠心管に入れ、よく混合した。混合液を静かに置き、マイクロキャリアー層が 1 ml の容積になるまで沈降する時間を測定し、沈降速度の指標とした。

2.8 マイクロキャリアー密度の測定

1 L 容球形ガラス製スピナーボトル中にマイクロキャリアー 3 g/L を含んだ PBS 700 ml を入れ、種々の速度で攪拌した。ボトル中の種々の位置からマイクロキャリアービーズ懸濁液 10 ml をピペットで 15 ml 容遠心管中にサンプリングし、遠心管を静かに直立させたままマイクロキャリアーの自然沈降体積を測定した。完全混合時の沈降体積に対する比率を計算し、マイクロキャリアー密度の指標とした。

2.9 エアースプレーシステム

図10のように、ピペットマンチップを利用して作った下向きノズルのついたリングを培養器内に装着し、これに通気することによってエアースプレーとした。酸素移動容量係数 (k_La) は、10 L 容球形ガラス製スピナーボトルに PBS を 8 L 入れ、37°C に保ちながら窒素を通気し溶存酸素濃度を空気に対して 20% 飽和以下に下げた後、通気ガスを空気に切換えて DO 濃度増加の経過を DO 濃度電極によって追跡し、計算した。

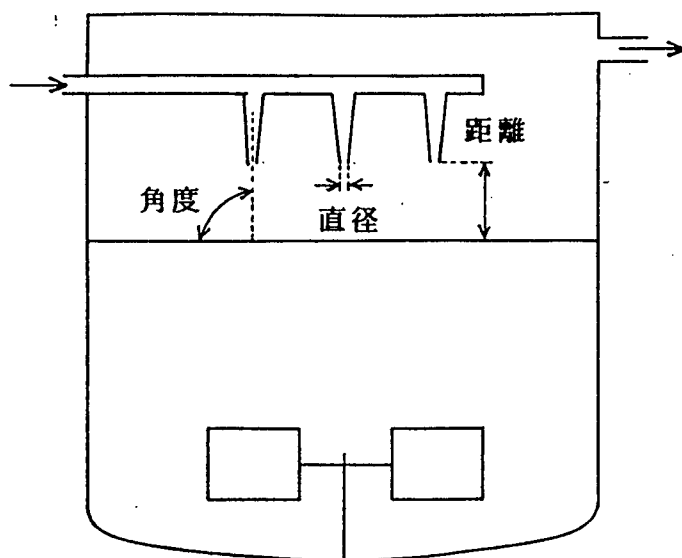


図10 エアースプレーシステムの概略

2.10 分析

細胞密度は脱核染色法⁴⁵⁾により求めた。培養液中のTPA活性は、フィブリンプレート法⁴⁶⁾により測定した。グルコースおよび乳酸濃度の分析は、それぞれムタローゼGOD酵素法（グルコースCテストワコー、和光純薬）、LDH酵素法（ラクテートUVテスト、ベーリンガーマンハイム社）により行なった。

第三節 計算

3.1 マイクロキャリアー沈降層のD O不足を招来する臨界厚み

マイクロキャリアー沈降層の中でD Oがゼロにならないための臨界厚みを次の様にして計算した。沈降層内でのD Oの定常状態に於けるマスバランスから

$$\left(-D \frac{dC}{dz}\right)_{z=z} - \left(-D \frac{dC}{dz}\right)_{z=z+dz} - dz \times q \times X = 0 \dots (4)$$

z : マイクロキャリアー沈降層の厚み (cm)

(底; $z = 0$ 、上面; $z = H$)

C : D O 濃度 (mol/cm³)

D : D O の拡散係数 (cm²/sec)

q : 比酸素消費速度 (mol/cell/sec)

X : 細胞密度 (cell/cm³)

(4) 式を整理すると

$$D \frac{d^2 C}{dz^2} = q \times X \dots (5)$$

$z = H$ において $C = C_0$ 、 $z = 0$ において $(dC/dz) = 0$ という境界条件下で (5) 式を解き、 $z = 0$ で C が正となる沈降層厚み H を求めると、

$$H \leq \left(\frac{2 \times D \times C_0}{q \times X} \right)^{0.5} \dots \dots \dots (6)$$

となる。

マイクロキャリアー 3 g/Lの時に細胞密度は約 1.0×10^6 cells/mlに達するので最大接着細胞密度は約 0.33×10^9 cells/gマイクロキャリアーであった。沈降層体積は $18 \text{ cm}^3/\text{gマイクロキャリアー}$ であったので、沈降層内の細胞密度は約 1.83×10^7 cells/cm³である。一方、細胞の比酸素消費速度は約 1.0×10^{-13} mol/cell/hであったが、これは他の細胞で報告されている値とほぼ同じであった³⁶⁻³⁹⁾。また、沈降層上面での DO 濃度を50%飽和の 1.0×10^{-7} mol/mlとし、酸素の水中での拡散係数を $1.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$ とした。これらの結果、(6) 式は

$$z \leq 0.77 \text{ mm} \dots \dots \dots (7)$$

となった。

従って、 DO 濃度が沈降層内でゼロにならないためにはマイクロキャリアー沈降層の厚みは、0.77 mm以下であるべきと考えられる。

第四節 結果と考察

4.1 攪拌速度のTPA生産性に対する影響

一つの培養器で増殖した細胞を三つの培養器に分注して、それぞれ攪拌速度を70, 90, 130 rpmにして18日間のTPA生産培養を行なった。図11に示すように、細胞密度の減少速度は攪拌速度の影響を殆ど受けなかったが、TPA生産量は攪拌速度が低いほど明らかに多かった。また、生産培養6日毎の細胞当りの比生産速度を調べてみても、いずれの期間でも攪拌速度が低いほど高い値を示した。これは、細胞に加わる機械的な力の大小によると考えられる。

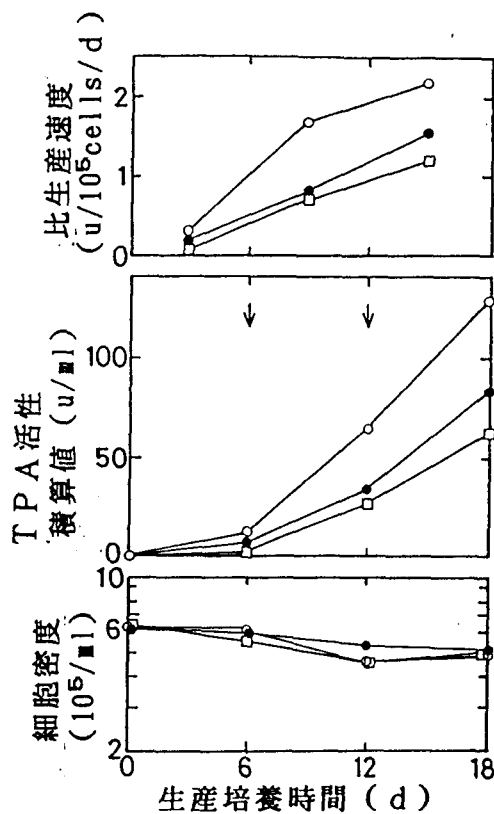


図11 TPA生産に対する攪拌速度の影響
生産培地は、図中の矢印の時点で交換した。
○; 70 rpm、●; 90 rpm、□; 130 rpm

70 rpmよりさらに攪拌速度を下げるとTPA生産性がさらに増大することが期待できたが、低攪拌ではビーズの沈降も生じることが予想されたので、まず図12に示すように攪拌速度を変えてマイクロキャリアビーズの浮遊状態を調べた。その結果、図11の実験の攪拌条件（70～130 rpm）では、攪拌羽根の横の位置のビーズ密度と培養液上部の位置のビーズ密度がほぼ同じであり、しかもその密度が完全混合時の密度にほぼ等しいので、ビーズはほぼ均一に分散していると考えられた。また培養器底部にもビーズ沈積が全く見られなかった。25 rpmでは2つの位置の両方のビーズ密度が完全混合時に比べて明らかに低く、分散は均一とは言えないが、沈積は観察されなかった。しかし、20 rpmではほとんどビーズは浮遊しておらず、顕著な沈積が観察されたので、20 rpmで培養すれば沈降層内においてDO律速が生じる可能性があると考えられた。従って、20 rpmの様な低攪拌においてビーズの沈降を防止する方法を次項で検討することにした。

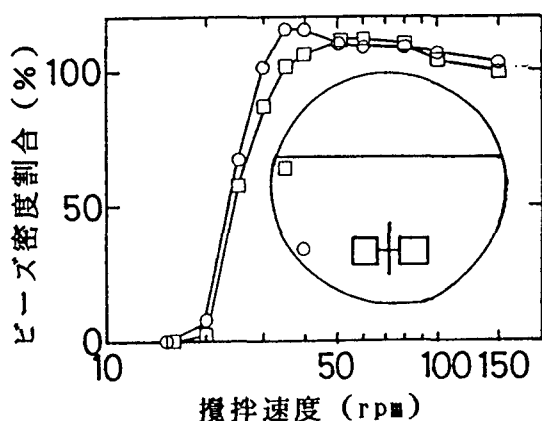


図12 マイクロキャリアビーズの混合に対する攪拌速度の影響

4.2 マイクロキャリア沈降速度に対するポリマー添加の影響

マイクロキャリア粒子の自然沈降速度は、次の式で与えられる。

$$v = \frac{2}{9} \times \frac{(\rho - \rho_0)}{\eta} \times g \times r^2 \dots \dots \dots (8)$$

- | | |
|---|-------------------------------------|
| v : 沈降速度 (cm/sec) | η : 粘度 (poise) |
| ρ : マイクロキャリアの比重 (g/cm ³) | g : 重力の加速度 (cm/sec ²) |
| ρ_0 : 培地の比重 (g/cm ³) | r : マイクロキャリアの半径 (cm) |

ここで、培地比重 ρ_0 を大きくすれば、自然沈降速度 v は小さくなるはずである。そこで NaCl、フィコール、でんぷんの種々の濃度の水溶液にビーズを 3 g/L 濃度で懸濁して、ビーズの沈降時間を測定した。図13に示すように、NaClの場合は水の場合と比べて沈降時間が変化しなかったが、これはNaClがビーズ中に拡散し粒子比重 ρ も培地比重 ρ_0 と同じだけ増加し、その差が変化しないためであると考えられた。これに対して高分子ポリマーであるフィコールやでんぷんの場合は添加濃度に比例して沈降時間が長くなった。これらポリマーはビーズ中へ拡散できないので、添加により粒子比重 ρ は変わらずに培地比重 ρ_0 だけが増加し $(\rho - \rho_0)$ が減少するからだと考えられた。ポリマー添加による粘度の増加は十分に小さいと考えた。また、これらポリマーの添加では沈降時間が、ポリマーの種類には関係無く培地比重 ρ_0 の増加に応じて直線的に長くなった。

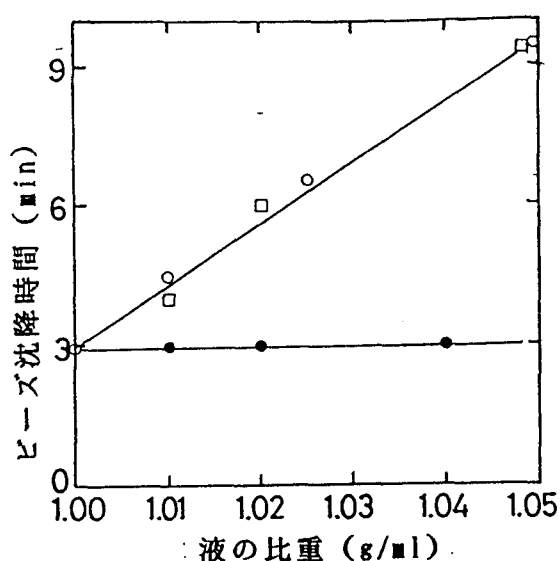


図13 ビーズ沈降時間に対する液の比重の影響
○;フィコール、□;でんぷん、●;NaCl

つぎに実際の培養器でビーズ浮遊に対するポリマーの添加効果を調べた。種々の濃度のでんぷん水溶液にマイクロキャリアービーズ（3 g/L）を懸濁し、20 rpmでの浮遊ビーズ密度を培養器内の2ヵ所で測定した。その結果図14に示すように、完全混合状態でのビーズ密度を100%とした時のビーズ密度の割合は、でんぷん濃度ゼロでは両方の位置で浮遊ビーズ密度がほぼ0%であり、培養器底部にはビーズ沈降層が観察された。しかし、でんぷん濃度を上げるにしたがって両位置で浮遊ビーズ密度が増加してゆき、40 g/Lでは完全にビーズ沈降層が消失し、70 g/Lでは、でんぷんを添加しないときの25 rpmに相当するビーズ浮遊状態になった。

この結果から、でんぷんを40 g/L添加すれば20 rpmでもビーズ沈降層を生じないので溶存酸素濃度律速が発生しないと考えられる。

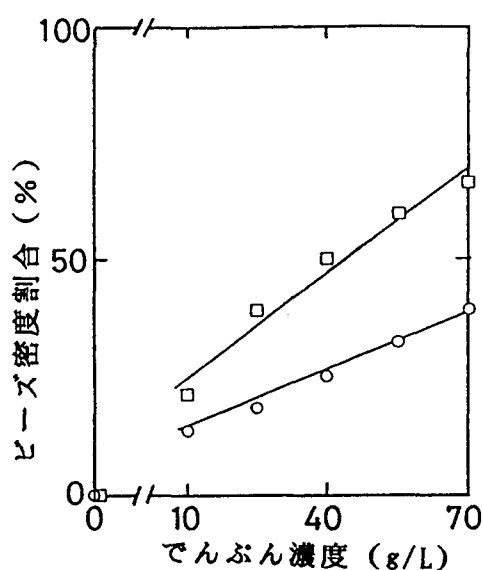


図14 20 rpmでのビーズ混合に対するでんぷん濃度の影響
○;培養液の上部、□;培養液の下部

4.3 でんぷん添加のTPA生産性への影響

でんぷんのTPA生産への直接的な影響の有無を調べるために、マイクロキャリアー増殖培養が終了し細胞が密に接着したマイクロキャリアービーズをディッシュに入れ、種々の濃度のでんぷんを添加した静置生産培地を用いた生産培養を行なった。6日毎に培地を交換して、18日間培養した。その結果表2に示すように、でんぷんの添加はTPA生産量に対して生産培養のどの期間においても影響を与えなかった。

表2 ディッシュ内での静置TPA生産培養に対するでんぷんの影響

でんぷん 濃度 (g/L)	T P A生産量 (u/ml)		
	0～6day	6～12day	12～18day
0	17.8	70.0	71.4
1	17.0	85.1	69.6
10	19.3	75.0	67.6
40	17.2	70.1	82.2

つぎに、マイクロキャリア攪拌生産培養において、70 rpmまたは20 rpmで生産培養した場合とでんぷん添加して20 rpmで生産培養した場合の3通りの条件で得られた結果を比較した。その結果、図15に示したように、20 rpmででんぷん無添加の条件の培養では、70 rpmの培養に較べて細胞密度が急速に減少し、TPA生産量も70 rpmの約3割と低かった。これは、沈積した細胞周辺で溶存酸素濃度がゼロになり細胞が死滅するためと考えられる。これに対して、でんぷんを40 g/L添加した20 rpmの培養では細胞密度が急速に減少することではなく、70 rpmの培養と同様の細胞密度が得られた。これはでんぷん添加によってビーズの沈積が妨げられたことによるものと考えられる。また、でんぷん添加の20 rpmの培養では70 rpmの培養に較べてTPA生産量が約12%高く、これは攪拌速度を低下させた効果であると考えられる。

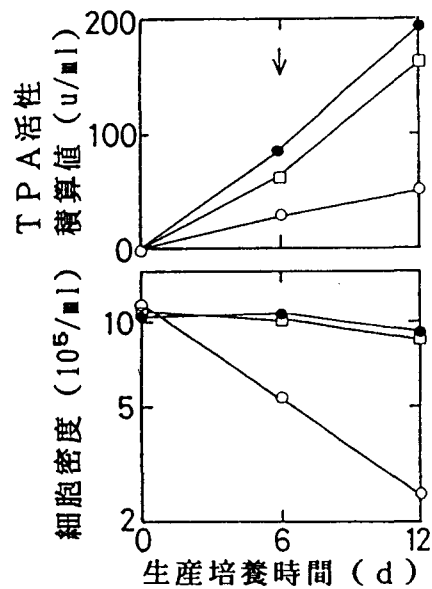


図15 20 rpmでのTPA生産培養におけるでんぷんの影響
 生産培地は、図中の矢印の時点で交換した。
 ○; 20 rpm (でんぷん無添加)
 □; 70 rpm (でんぷん無添加)
 ●; 20 rpm (でんぷん 40 g/L 添加)

細胞の機械的損傷を防ぐためにポリマーを添加することによってビーズを浮遊させるのに必要な攪拌速度を下げ、TPA生産性を向上させる方法を開発したが、ビーズ沈積を防止するだけでよいのなら攪拌速度はさらに低下できるだろう。しかし、マイクロキャリアービーズ培養において攪拌操作は、ビーズの沈積を防止するための操作ではなく、培養液を攪拌して培養液の上にある気相から培養液へと酸素を溶解させるための操作でもある。したがって、特に培養器のスケールが大きくなったときには、攪拌速度を下げて培養するためにはこの様なビーズ浮遊の改良だけではなくて、低攪拌速度でも効率よく気相から培養液へと酸素を溶解させる必要があるが、表面通気法にはスケールアップに限界があるため、通気方法の改良も必要になる。

4.4 エアースプレーシステム

これまで述べたように低攪拌に保つことがTPA生産に有利なことがわかったが、この際に溶存酸素供給速度を攪拌速度以外の手段で高めることを目的として、エアースプレーシステムと加圧培養を検討した。

まず、エアースプレーシステムにおいて、ノズルの開口直径、液面からの距離、角度を種々に変えて k_{La} を測定したところ、表3に示したように、開口直径は1 mmが適しており、距離は7 cm以下であれば余り影響しなかった。また、角度は 90° が 45° よりも適していた。

表3 種々のエアースプレーノズルの k_{La} におよぼす影響

エアースプレーノズル			k_{La} (1/h)			
角度	直径 (mm)	距離 (cm)	1 4 rpm	1 9 rpm	3 0 rpm	4 0 rpm
4 5	1	2	0.70	0.76	0.96	1.58
9 0	1	2	0.84	0.91	1.31	1.98
9 0	2	2	0.48	0.60	1.02	1.31
9 0	3	2	0.43	0.59	0.97	1.27
9 0	1	1	0.82	0.93	1.18	1.90
9 0	1	3	0.94	0.94	1.20	1.85
9 0	1	5	0.90	0.94	1.09	1.85
9 0	1	7	0.81	0.91	1.12	1.71
9 0	1	16	0.49	0.60	0.97	1.60
エアースプレーノズルなし			0.32	0.48	0.84	1.15

さらに、ノズルの本数、通気速度などを変えて実験したところ、図16に示すようにノズルの本数には関係なく合計の通気速度が7 L/min以上になると k_{La} が顕著に増加したが、さらに20 L/min以上に通気速度を上げてても k_{La} は殆ど増加しなかった。最適条件では、表面通気の2.35倍の k_{La} が得られた。但し、スケールアップに伴って培養液上面面積が増加した場合、 k_{La} が増加するために必要な通気速度の範囲は変化することも推測される。

エアースプレーにより k_{La} が増加するのは、ガスが吹きつけられることによって液面が波立ち^{16,17)}、液面の面積が増加すること、および、液表面での乱れによってガス側の境膜移動抵抗が低下し、ガス移動速度が高くなったためと考えられる。このことから、たとえば7 L/min以上の速度のガスが液表面に当ることによって、液表面が振動しはじめ、 k_{La} が増加することが推測できる。そして、ガス供給速度の増加とともにガス側境膜移動抵抗が減少するが液側の抵抗はほとんど減少しないために、20 L/min以上では液側の抵抗が支配的となり k_{La} が殆ど変化しなくなると、推測している。

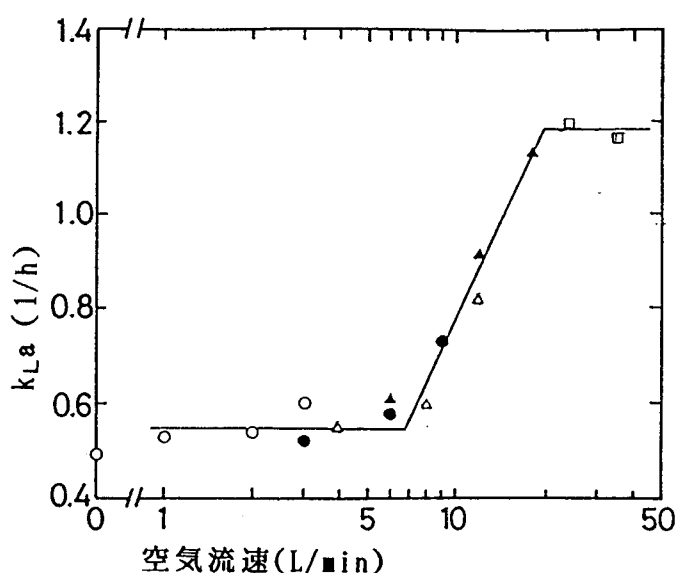


図16 k_{La} に対するエアースプレーの通気量の影響
○;ノズル1本、●;3本、△;4本、▲;6本、□;12本

4.5 加圧培養

加圧培養で溶存酸素供給速度が高くなるのは明らかであるが、大気圧以上の圧力の細胞への影響が不明なので調べた。ジャー培養槽の内圧を通常の $0.2 \text{ kg/cm}^2\text{-G}$ および通常より加圧した条件の $1.5 \text{ kg/cm}^2\text{-G}$ の2種類の圧力で、それぞれ増殖培養および生産培養を行なった。その結果、図17に示すように、増殖培養における細胞増殖速度、生産培養における細胞減少速度には、両者の間で差異は認められなかった。しかし、TPA生産量は、 $1.5 \text{ kg/cm}^2\text{-G}$ に加圧した方がすこし高かった。また、グルコース消費速度は圧力が低い方が高かった。

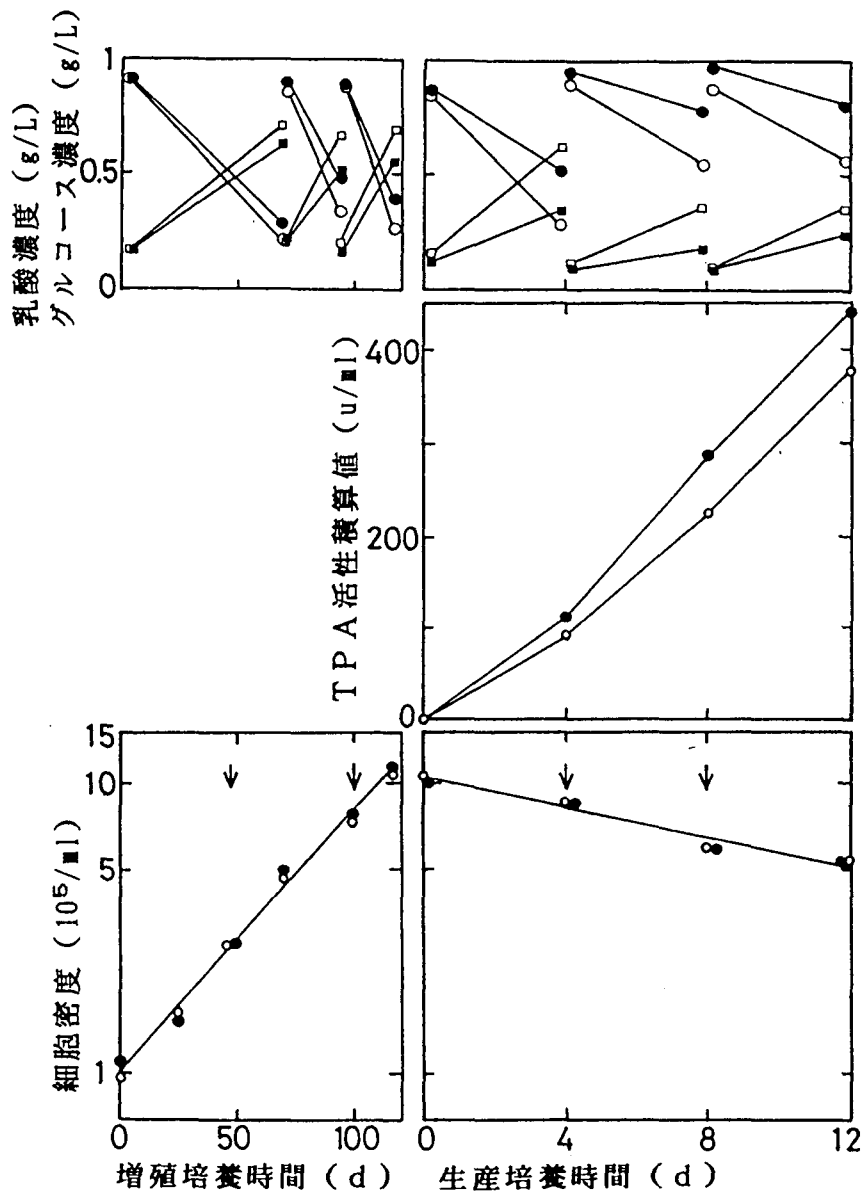


図17 加圧培養による細胞増殖とTPA生産

○(細胞密度、TPA量、グルコース濃度)、□(乳酸濃度)； $0.2 \text{ kg/cm}^2\text{-G}$
 ●(細胞密度、TPA量、グルコース濃度)、■(乳酸濃度)； $1.5 \text{ kg/cm}^2\text{-G}$

この現象を考察するために、この培養におけるグルコースから乳酸への変換率、増殖培養における消費グルコースに対する細胞の収率、生産培養における消費グルコースに対するTPAの収率を計算した。その結果、表4に示したように、増殖培養、生産培養のいずれにおいても、1.5 kg/cm²-Gの方がグルコースから乳酸への変換率が低かった。また細胞収率、TPA収率のいずれも1.5 kg/cm²-Gの方が少し良かった。このことから、加圧培養ではグルコースがより高い割合で完全燃焼されグルコースのエネルギー利用効率が高いために、グルコースの消費速度が低くても十分なエネルギーが得られると考えられる。従って、一定量の細胞を合成したり一定量のアミノ酸を合成してTPAを生成するにも、より少量のグルコースで足りると考えられる。このことが、加圧培養においてTPA生産性が少し高かったことの原因の一つであると推測している。

表4 グルコース変換率、細胞収率、TPA収率に対する培養圧力の影響

	圧力 (kg/cm ² -G)	増殖培養	生産培養		
			0～4	4～8	8～12day
乳酸からグルコースへの変換率 (g-lactate/g-glucose)	0.2	0.83	0.84	0.71	0.84
	1.5	0.77	0.64	0.59	0.74
細胞収率 (10 ⁷ cells/mg-glucose)	0.2	5.29	—	—	—
	1.5	6.29	—	—	—
TPA収率 (10 ² u/mg-glucose)	0.2	—	1.66	3.80	4.81
	1.5	—	3.11	10.24	8.16

以上のエアースプレースystemと加圧培養の効果の総合的な評価を試みた。まず、前述の式(3)において、I_{O2}が0.1 mmol/L/h(細胞密度が約10⁶ cells/mlの時)で、DOを0.1125 mmol/L(50%飽和)にコントロールする場合に必要な最低限のk_{La}を計算してみる。通気ガス中の酸素濃度を90%まで上げて、しかも1.5 kg/cm²-Gまで加圧したとすると、大気圧の空気に対する酸素の水への溶解度が0.225 mmol/Lであるので、dC/dt=0として、

$$k_{La} = I_{O_2} / (C^* - C)$$

$$= 0.1 / (0.225 \times (90/21) \times (1 + 1.5) - 0.1125) = 0.041 \text{ (1/h)} \quad \text{となる。}$$

さらに、エアースプレースystemにより、単なる表面通気に比べてk_{La}が2.35倍になるとすると、単なる表面通気のk_{La}が0.041/2.35=0.017(1/h)であるスケールまで攪拌槽を大きくできることになる。

この0.017(1/h)は、本実験で用いた50 L ジャー (40 rpm) の k_{La} (0.15) の約1/10である。これから、どの大きさまでスケールアップできるか正確に判断するのは不可能である。しかし、本実験で用いた1 L ボトル (0.7 L仕込、70 rpm) の k_{La} (2.10) が50 L ジャー (35 L仕込、40 rpm) の k_{La} (0.15) の14倍であることから推測すると、 $10/14/(35/0.7)=36$ であるので50 L からさらに36倍のスケールアップが可能である。また、相似形を保ったスケールアップの場合に液量あたりの表面積が液量比の1/3乗の割合で減少することから推測すると、約1,000倍のスケールアップの可能性もある。いずれにしても、36~1,000倍すなわち $1.8 \sim 50 M^3$ までのスケールアップの可能性を示唆している。

スケールアップと同様に蛋白生産性を上げるための有力な手段である高密度培養に関しては、一般に目的とする蛋白の細胞比生産速度が細胞密度の増加につれて低下する問題が現時点では十分に解決されてはいない。しかし、高密度の細胞に酸素を供給する手段としてもエアースプレーシステムと加圧培養は、有用であると考えられる。

高攪拌速度が動物細胞による蛋白生産に悪影響をおよぼすことは、微生物培養による物質生産の多くの知見から容易に推測できる。動物細胞に関する報告を調査すると、例えばLakhotiaらのBEK細胞のマイクロキャリア細胞培養に関する研究では、100 mlスケールのスピナーフラスコで120~160 rpmの様な本研究に比べて高攪拌の範囲では攪拌速度の増加と共に細胞密度の減少速度が大きくなった¹⁴⁾。また、ディッシュ底面に接着した細胞の上に培地を流した層流の実験系でも、 9.7 N/m^2 より 12 N/m^2 の剪断応力が細胞に加わった場合の方が細胞の死滅速度が大きいことが報告されている¹⁵⁾。しかし、いずれも細胞密度の維持に対する攪拌強度や剪断力の影響に留まっており、本研究の様に蛋白生産への影響を具体的に示した報告はほとんどない。

また、ポリマー添加によるビーズ浮遊の改善、加圧培養はいずれも原理そのものは自明と言ってもいいが、この高攪拌による悪影響の問題に対する具体的な解決策として提示して、実証し、総合的に論じた報告は他にはまだみられない。他方、雑菌汚染防止のために保たれる 0.2 kg/cm^2 -G程度の通常の圧力を越える圧力で動物細胞を培養したときに見られた細胞のエネルギー代謝の変化は全く新しい知見と言っても良いと考えているが、その機構はほとんど全て不明であり今後の研究が待たれる。

第五節 要約

TPA生産性に与える攪拌速度の影響を明確にした上で、最適な通気攪拌方策を総合的に検討した。マイクロキャリアがほぼ均一に分散し溶存酸素濃度を一定に維持できる70 rpm以上の攪拌速度では、生産培養中の細胞密度の減少速度は攪拌速度によらず同じであったが、TPA生産量は攪拌速度が低いほど明らかに高かった。しかし、攪拌速度をさらに下げた培養でマイクロキャリアが培養槽底部に厚さ0.77 mm以上沈積すると溶存酸素の拡散律速が生じることが計算から予測できた。そこで、マイクロキャリア内部に入り込めないポリマーを培養液に添加して培養液の比重を増大させればマイクロキャリアの沈降速度が減少して、20 rpmのような低攪拌でも沈積を防げることを示した。ポリマーとしてでんぷんを添加しても静置生産培養ではTPA生産性には影響を与えないことを確認した。一方、攪拌生産培養では、マイクロキャリアがほぼ均一に分散する70 rpmでの培養に比べてマイクロキャリアが沈積する20 rpmでの培養では細胞密度の減少も激しくTPA生産量も極めて低かったが、同じ20 rpmでもでんぷんを添加してマイクロキャリアの沈降を防止した培養では70 rpmでの培養よりもTPA生産量が高かった。

20 rpmのような低攪拌条件下で、表面通気によって溶存酸素供給速度を上げるための第一の方法としてエアースプレー法を採用し、通気速度の最適化により k_{La} を単なる表面通気の約2.3倍に増大できた。第二の方法として、加圧培養をとり上げ、槽内を通常の $0.2 \text{ kg/cm}^2\text{-G}$ から $1.5 \text{ kg/cm}^2\text{-G}$ まで加圧しても細胞増殖および細胞維持には全く悪影響を与えないだけでなく、TPA生産性は少し向上し、グルコースの利用効率が明らかに改善された。以上の結果は、生産に有利な低攪拌でもスケールアップが十分に可能であることを示している。

第三章 酸素消費速度の連続測定

第一節 緒言

蛋白を動物細胞培養によって安定に生産するためには、pH、DO、温度あるいは培地濃度などの培養環境因子を最適値に制御することが有効であるが、その値は培養の目的に応じて変化させる必要がある。例えば、細胞を盛んに増殖させているような状態、増殖速度を低下させて主として蛋白を分泌させている状態などである。それぞれの目的に応じて別々に最適値があることは第一章で既に述べた。

そこで、具体的に、今の最適設定値を次の最適設定値に”いつ”変更すればよいかが問題となる。それに対しては、細胞自身の生理的な状態に応じて”いつか？”を決める方法が合目的的と考えられる。

その生理的状态の指標とするために、動物細胞培養における呼吸速度すなわち酸素消費速度の実用的な測定方法の確立が望まれている。

本章では、酸素消費速度測定の安定化とともに、通常の溶存酸素制御によって生ずる溶存酸素濃度の小刻みな周期的変化をそのまま利用した、細胞に外乱を与えない、酸素消費速度の連続測定方法を検討した結果について述べる。

第二節 実験材料および実験方法

2.1 細胞

第一章2.1に示したようにヒト胎児肺細胞を用いた。

2.2 培地

細胞増殖培養用培地として、第一章2.2に示した方法と同様に10%FCS含有MEM培地を用いた。

2.3 細胞増殖培養（ジャー培養槽）

第二章2.5に示した方法と同様にジャー培養槽を用いて35 Lスケールの増殖培養を行った。pHを7.3に制御し、DOは空気に対する飽和値の50%に制御した。増殖培地は2日毎に交換した。また、細胞密度は脱核染色法⁴⁵⁾により求めた。

2.4 k_{La} 測定

後述する酸素消費速度測定の計算に用いるために、細胞を含まない培地の k_{La} を予め測定した⁴⁸⁾。攪拌培養槽中にPBS35 Lを入れ、37℃に調節した。一定の攪拌速度に調節し、 N_2 通気によりDOを20%飽和以下に一度下げてから、空気通気に変更してDO濃度の増加変化から k_{La} を測定した。その結果、図18に示すように k_{La} は攪拌速度の増加に対応して直線的に増加することがわかった。

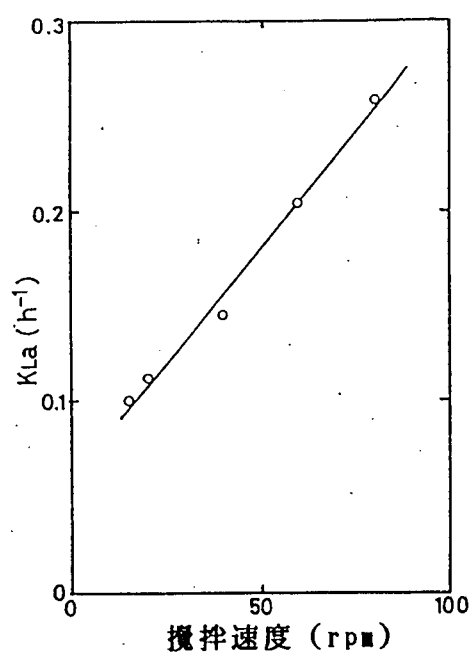
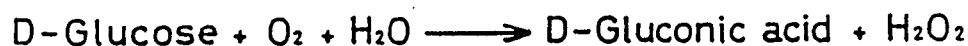


図18 k_{La} に対する攪拌速度の影響

2.5 グルコースオキシダーゼ反応

測定した酸素消費速度の定量性を証明する手段としてグルコースオキシダーゼ反応を用いた。すなわち、培養槽にグルコースおよびグルコースオキシダーゼ（TOYOB0社、Glucose oxydase(II) 112 u/mg）をそれぞれ2 g/L-PBS、2～20 u/L-PBSになるように無菌的に注入し、37℃で攪拌しながら表面通気を行ない、図19に示すようなグルコースの酸化反応を行なった。経時的に槽内の液をサンプリングし、反応によって生成した過酸化水素の濃度を、直ちにパーオキシダーゼによるジメチルアニリン（DMA）とメチルベンゾチアゾリノンヒドラジン塩酸塩（MBTH）との呈色反応（590 nm）⁴⁹⁾により定量した。

グルコース酸化反応



グルコースオキシダーゼ

過酸化水素濃度の定量反応

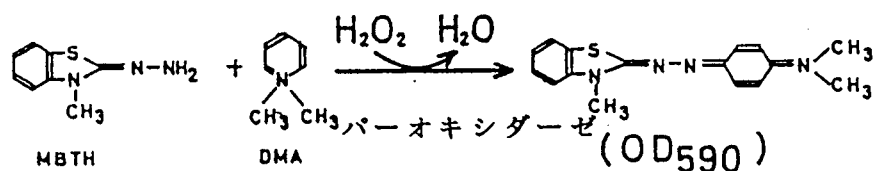


図19 酸素消費速度測定値の定量性試験に用いた反応

第三節 計算

3.1 培養液中での飽和D O濃度の推定

培養液中での飽和D O濃度 (C^*) は、培地をイオン溶液とみなして次の式によって求めることができる⁵⁰⁾。

$$\log (C_{O^*}/C^*) = \sum H_i \cdot I_i \dots \dots \dots (9)$$

$$I_i = C_i \cdot Z_i^2 / 2 \dots \dots \dots (10)$$

C_{O^*} : 水への飽和D O濃度 (mmol/L)

C^* : 培養液への飽和D O濃度 (mmol/L)

H_i : イオン定数 (1/g-ion)

I_i : イオン強度 (g-ion/L)

C_i : イオン濃度 (g-ion/L)

Z_i : イオンの電荷

本実験で用いた培地では、表5に示した H_i ⁵⁰⁾を用いて計算した結果、式11となった。なお、他のイオンおよびFCS中のイオンはごく少量なので、その影響は無視できるものと考えた。

$$C^* = 0.92 \times C_{O^*} \dots \dots \dots (11)$$

表5 酸素溶解度に関するイオン定数

カチオン	H_i (1/g-ion)	アニオン	H_i (1/g-ion)
Na^+	-0.550	Cl^-	0.844
K^+	-0.596	SO_4^{2-}	0.453
Mg^{+2}	-0.314	CO_3^{2-}	0.485
Ca^{+2}	-0.303	PO_4^{3-}	0.320

したがって、便覧記載の水に対する酸素溶解度の値を37℃の近傍で温度の一次関数として近似し、さらに圧力、酸素分率および11式により補正して、培養中の飽和DO濃度を12式の様求めた。

$$C^* = (1.57 - 0.013 \times T) \times (P/1013) \times \frac{x}{100} \times 0.92 \dots (12)$$

T : 培養液の温度 (℃)

P : 培養槽内の気相圧力 (hPa)

x : 気相中の酸素濃度 (%)

ただし、培養槽内気相をN₂で置換するガス置換法でのI_{O₂}測定の際には、xはゼロとした。連続測定法の場合には、培養槽からの排ガス中の酸素濃度を酸素分析計（富士電気）で分析してxを求めた。

3.2 酸素消費速度 (I_{O₂})

培養液中における溶存酸素濃度の変化速度は、次式で与えられる。

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \times (C^* - C) - I_{O_2} \dots \dots \dots (13)$$

I_{O₂}: 酸素消費速度 (mmol/L/h)

《連続測定法》

微小時間間隔 Δtの間にはk_LaやC*が変らないと仮定して、13式を積分して

$$I_{O_2} = \frac{k_L a}{1 - \exp(-k_L a \times \Delta t)} \times (C(t) \times \exp(-k_L a \times \Delta t) - C(t + \Delta t)) + k_L a \times C^* \dots \dots \dots (14)$$

となる。連続測定法では、次ページの図20の右側の装置を用いて1分毎にI_{O₂}を測定し、10分間の移動平均値を順次算出した。

《ガス置換法》

測定期間のみ培養槽内気相を N_2 で置換するガス置換法での I_{O_2} 測定の際には、前述の様に $C^*=0$ とし、図20の左側の装置を用いて14式にしたがって I_{O_2} を1分毎に測定し、5分間の平均値を算出した。

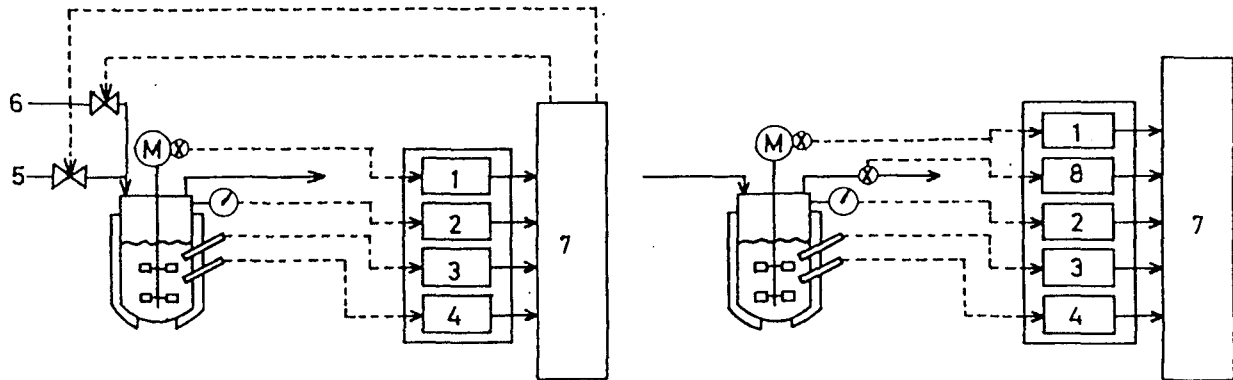


図20 酸素消費速度の測定装置

左側;ガス置換法、右側;連続法

1;攪拌速度計、2;圧力計、3;温度計、4;DO濃度計、
5;空気+CO₂+O₂、6;N₂、7;コンピューター、8;酸素濃度

第四節 結果と考察

3.1 I_{O_2} 測定値は細胞の呼吸速度

I_{O_2} 測定値が細胞の呼吸速度であることを確認するために、ガス置換法によって細胞増殖中の I_{O_2} を経時的に測定するとともに、対照として、培地に細胞を接種しない場合についても I_{O_2} を測定した。その結果、図21に示すように、細胞を接種した場合細胞密度が時間とともに指数関数的に増加し I_{O_2} も細胞密度と平行して増加した。これは細胞当りの酸素摂取速度すなわち比酸素摂取速度が一定であることを示している。一方、細胞を接種しなかった培地では、細胞密度は実験期間中を通してゼロであるとともに、 I_{O_2} 測定値も細胞を接種した培養の1/10~1/100でありほぼゼロで一定だった。したがって、 I_{O_2} 測定値は、細胞の呼吸速度であることが確認できた。

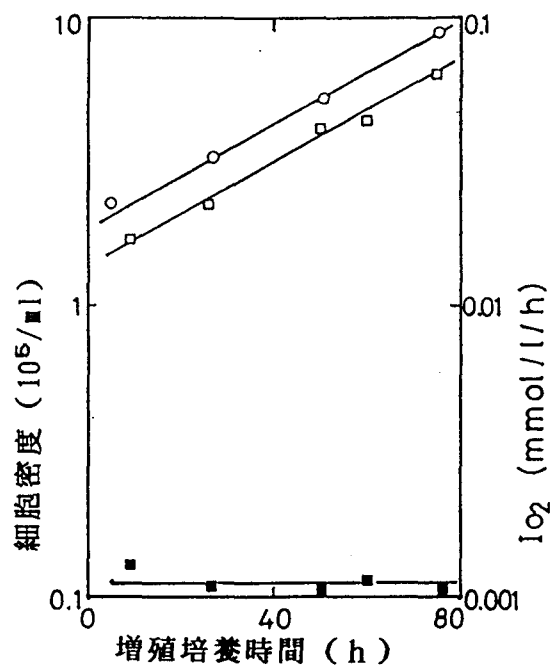


図21 I_{O_2} は細胞による呼吸速度である
○;細胞を接種した培養の細胞密度
□;細胞を接種した培養の I_{O_2}
■;細胞を接種しなかった培養の I_{O_2}

3.2 I_{O_2} 測定における外乱

I_{O_2} 測定の安定性を調べるために、ガス置換法による I_{O_2} 測定の頻度を上げて測定した。その結果、図22に示すように、細胞密度の増加とはほぼ平行して I_{O_2} も増加したが、図中に矢印で示した培地交換の直後に I_{O_2} の値が急に減少し、その後約20時間経過してもとの値付近に戻るといった現象が認められた。細胞密度の増加速度は培地交換によって特に変化する様子は認められなかった。これは、 I_{O_2} の不安定さを示すものであり、解決する必要がある。

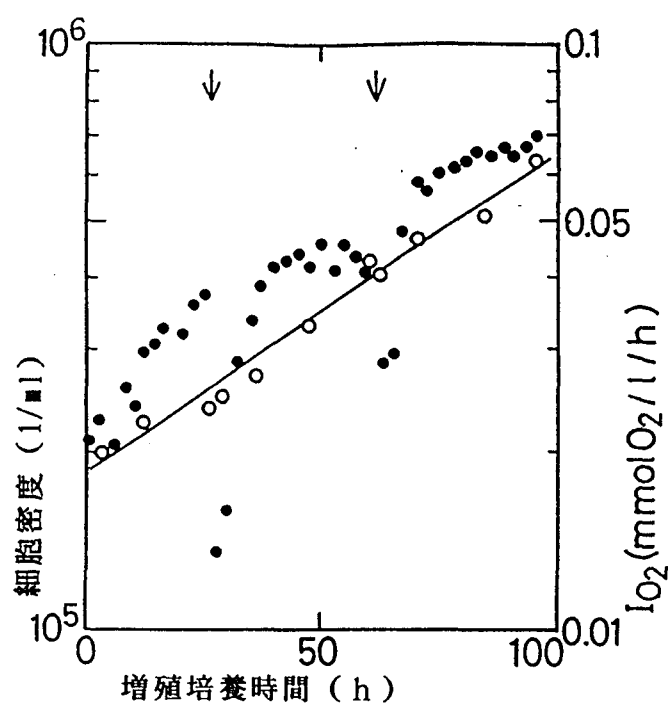


図22 I_{O_2} 測定値に対する培地交換の影響
図中の矢印は、培地交換の時間を示す。
○;細胞密度、●; I_{O_2}

ところで、培地交換の時に、培養槽の内壁を伝って落下する新鮮培地の勢いで培養液表面に泡が発生するが、この泡と I_{O_2} の一時的減少とが関係しているのではないかと推測して、培養液表面の泡の k_{La} への影響を調べた。培地をスピナーボトルに入れ、一時的な深部通気により培養液表面に空気の泡を作って k_{La} を測定した。その結果、表 6 に示すように、培養液表面の泡が無い場合に較べて、泡のある場合は明らかに k_{La} が増大し、泡の量が多いほど k_{La} も大きいことが判明した⁵¹⁾。すなわち、培養液表面に泡があると k_{La} が大きくなるにも拘らず、 k_{La} の値を実際よりも小さい、すなわち泡の無い、ときの k_{La} と見積って、14式にしたがって I_{O_2} を計算するので、 I_{O_2} の計算値が一時的に見掛け上減少すると考えられた。

表 6 k_{La} に対する泡の影響

k_{La} 測定方法	泡の量	k_{La} (1/h)
D O 増加	なし	0.68
	液面の約半分	0.91
	液面の全部	1.45
D O 減少	なし	0.71
	液面の約半分	0.96
	液面の全部	1.25

そこで、これを解決するために、培地交換時に培地を静かに注入することによって培養液表面に泡が生成しないように工夫して培養を行ない、 I_{O_2} を測定した結果、図23の左側に示すように、培地交換の後における I_{O_2} の一時的な減少は認められなかった。

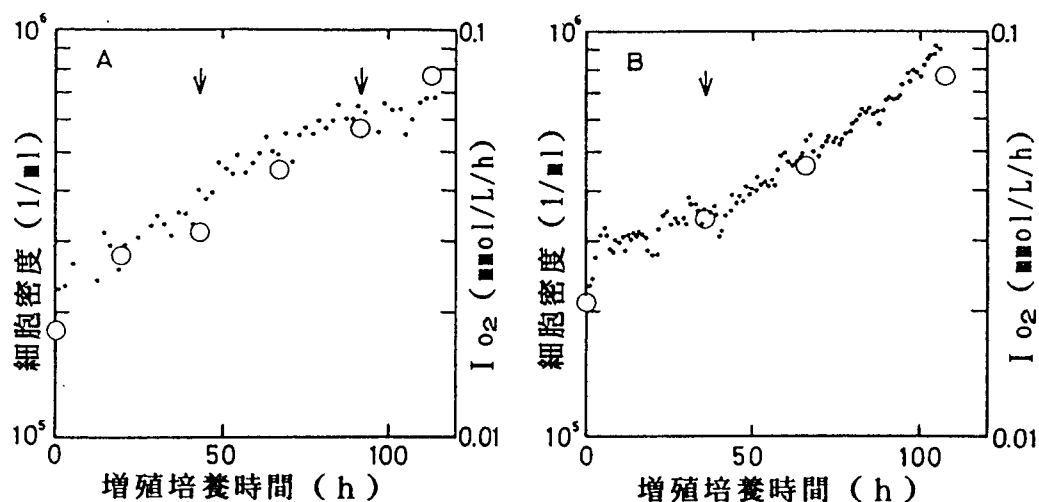


図23 ガス置換法と連続法との比較
A; ガス置換法、B; 連続法
○; 細胞密度、●; I_{O_2}

3.3 I_{O_2} の連続測定

培養中、連続法によって I_{O_2} を測定した結果をガス置換法による測定値と比較して図23の右側に示した。ガス置換法による測定値と連続法による測定値とでは、いずれも細胞密度の増加曲線と I_{O_2} の増加曲線とがほぼ平行になった。すなわち、単位細胞密度当りの I_{O_2} 値もほぼおなじであり、連続法でもガス置換法と同じ量を測定していると考えられた。また、連続法による I_{O_2} 測定データはガス置換法に較べて、測定点の増加にもよるが、正確な安定した I_{O_2} データを与えられたと考えられた。

3.4 連続法による I_{O_2} 測定値の定量性

連続法で得られた I_{O_2} 測定値の絶対的な定量性を確認するために、細胞の呼吸反応の代りにグルコースオキシダーゼによるグルコースの酸化反応を培養槽の中で行ない、連続法で I_{O_2} を測定するとともに、サンプル液中の過酸化水素濃度の経時変化をパーオキシダーゼ反応で追跡することによって酸素消費速度を計算し、両者の相関関係を調べた。その結果、図24に示すように、0.01~0.3 mmol/L/h の範囲内で両者はよく一致し、 I_{O_2} 測定値の絶対値の正しさを確認することができた。

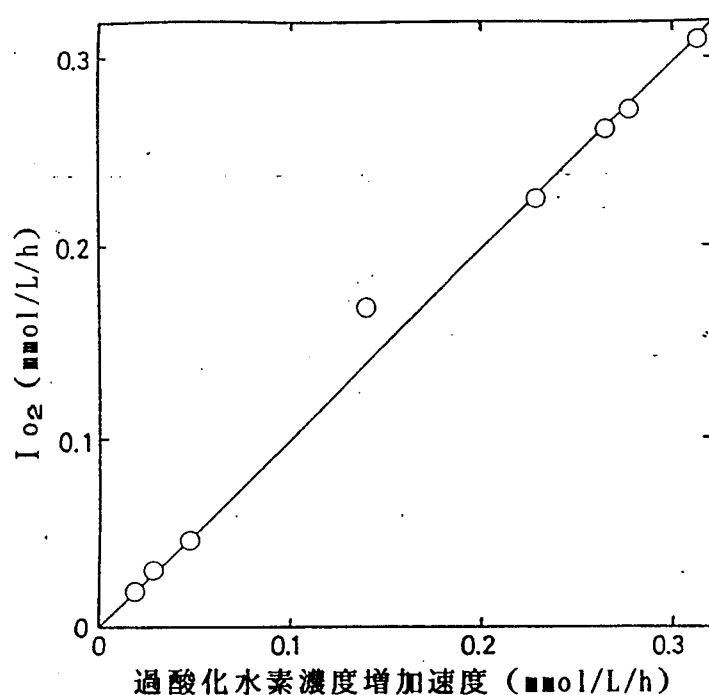


図24 I_{O_2} 測定値の定量性

従来のガス置換法^{19,25)}では、測定用の特別なガスが要ること、測定が不連続になること、測定のために溶存酸素濃度が設定値からズレて大きく変化してしまうことなどの欠点があった。しかし、ここで開発した連続測定法では、通常のDO濃度制御を行ないながら平行して I_{O_2} を測定できる新しい方法である。従って本法には、測定用の特別なガスを必要としない、測定値がほぼ連続的に得られる、また測定のために溶存酸素濃度が大きく変動することが無い、などの長所がある。

第五節 要約

酸素消費速度測定 of 安定化とともに、通常の溶存酸素濃度制御によって生ずる溶存酸素濃度の小刻みな周期的変化を利用した、細胞に外乱を与えない、酸素消費速度の連続測定方法を検討した。すなわち、測定される酸素消費速度は、細胞の呼吸速度であることを明白にした。また、培養液表面の泡が酸素消費速度の測定値に大きな外乱を与えることを $k_L a$ に対する泡の影響から説明し、発泡を防ぐことによって測定値がきわめて安定化することを示した。一方、培養槽内気相を特定の測定用のガスに置換しないでも、排気ガスの酸素分析を併用すれば、酸素消費速度の測定が可能であることを示した。この方法では、培養系に不必要な外乱を与えずに済むばかりでなく、連続測定が可能になった。さらに、この方法による I_{O_2} 測定値の定量性をグルコースオキシダーゼを用いたグルコースの酸化反応を利用して証明した。

なお、動物細胞培養では培養中に攪拌速度や液量が頻繁に変化することは稀であるので、 $k_L a$ が時間的に変化する場合の測定への影響に関しては検討していない。

第四章 増殖から生産への最適移行時期の オンライン推定

第一節 緒言

一般に、動物細胞培養による蛋白生産プロセスの多くは、細胞を高密度に増殖させる増殖培養工程と、増殖した細胞を長期間維持して目的とする蛋白を生成させる生産培養工程とから成っている。第一章で示したように、増殖培養工程と生産培養工程とでは、培養環境因子の最適な設定値が異なっていると考えられる。また、第三章で述べたように、細胞の酸素消費速度などの細胞の生理状態に応じて、増殖培養工程に最適な設定値から生産培養に対する最適値に変更する必要がある。

ところで、増殖培養中の細胞の生理的因子の中で、蛋白生産プロセスにとって酸素消費速度よりも重要なのは細胞の蛋白生成活性であるが、細胞の蛋白生成活性をリアルタイムに測定する方法はまだない。

本章では、増殖培養中の細胞のTPA生成活性を、第三章で開発した酸素消費速度のオンライン測定値および過去の増殖培養データを用いて回帰的に推定することによって、増殖培養から生産培養への最適な移行時期をバッチ毎にリアルタイムで判断する方法を検討した結果を述べている。

第二節 実験材料および実験方法

2.1 細胞

第一章2.1に示したようにヒト胎児肺細胞を用いた。

2.2 培地

細胞増殖培養用培地として、第一章2.2に示した方法と同様にして10%FCS含有MEM培地を用いた。また、TPA生産培養用培地として、第一章2.2に示した方法と同様にプロテオースペプトンNo.3含有199培地を用いた。

2.3 細胞増殖培養（ジャー培養槽）

第二章2.5に示した方法と同様にジャー培養槽を用いて増殖培養を行なった。pHを7.3に制御し、DOは空気に対する飽和値の50%に制御した。増殖培地は2日毎に交換した。

2.4 小スケールでのTPA生産培養

増殖中の細胞のTPA生産活性を調べるために、増殖培養液を少量取り出して小スケールでのTPA生産培養を行なった。すなわち、培養槽から細胞の接着したマイクロキャリアを含む30 mlの培養液を100 ml容スピナーボトル（ウィトン社）に取りだし、これをPBS 30 mlで洗浄した。そして、生産培養用培地を注入して30 mlとして、温度37℃、30 rpm、5%CO₂の雰囲気下での、TPA生産培養を開始した。生産培地は5日毎に交換した。

2.5 分析

細胞密度は脱核染色法⁴⁵⁾により求めた。培養液中のTPA活性は、フィブリンプレート法⁴⁶⁾により測定した。酸素消費速度測定は、第三章で述べた連続測定法により測定した。

2.6 TPA生成活性の迅速測定

増殖中の細胞のTPA生成活性を簡便に実測して評価するために、迅速測定法を設定した。すなわち、増殖培養中の培養液から、細胞の接着したマイクロキャリアを含む1 mlの培養液を細胞培養用試験管（NUNC社、No. 156758）に注入し、沈降したマイクロキャリアを生産培養用培地2 mlで洗浄した。そして、生産培養用培地で2 mlとして、5 %CO₂の雰囲気下で、37℃で4日間静置培養した。最後に、得られた培養液中のTPA活性値を96（hr）で割り、2（ml）を乗じた値を、増殖培養液1 mlに含まれる細胞が1時間にTPAを生成する活性、すなわちTPA生成活性（u/ml/hr）とした。

第三節 結果と考察

3.1 種々の長さの増殖培養後に行なったTPA生産培養

細胞のTPA生成活性の増殖培養中における経時変化を調べるために、7日間の増殖培養を行ない、培養途中の種々の時期にサンプリングした細胞を用いて15日間の小スケールのTPA生産培養をした。増殖培養の結果は、図25に示したように、細胞密度が増殖培養5 dayではば最高値に達し、以後2日間ほぼ一定に維持された。

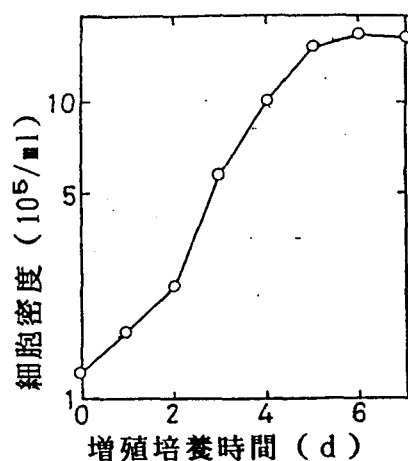


図25 増殖培養における細胞密度の経時変化

それぞれの15日間の生産培養における平均のTPA生産速度は、表7に示したように、増殖培養の指数増殖後期の増殖培養開始後4日経過した細胞による生産培養で最大であり、増殖培養で細胞密度が最大値に達した増殖培養開始後5～7日経過した細胞による生産培養より明らかに多かった。生産初期5日間の初期生産速度についても同様の傾向が認められた。これらのことから、増殖培養開始後4日経過した細胞は、密度は低いが、細胞当りのTPA生成活性が高いために生産速度が高くなったと考えられた。また、生産初期の生産速度が生産培養の全期間を通したTPA生成活性の指標となり得ることもわかった。

表7 増殖培養の種々の時期から開始したTPA生産培養

増殖培養の 時期 (d)	生産培養0～15 d の間の 平均TPA生産速度 (u/ml/h)	生産培養0～5 d の 初期生産速度 (u/ml/h)
3	0.13	0.37
4	0.95	0.78
5	0.80	0.68
6	0.73	0.65
7	0.25	0.47

3.2 TPA生成活性の経時変化

TPA生成活性が最大になる時期が増殖培養毎にどのように異なるかを調べるために、種々の初期細胞密度での培養を行ない、TPA生成活性の経時変化を迅速測定法により測定した。測定結果の一例を図26のAおよびBに示した。Aの培養ではTPA生成活性は、細胞密度が最高になる培養時間100 hまでは増殖曲線とほぼ平行して増大したが、それ以後は細胞密度が一定であるにも拘らずTPA生成活性は増大し続けた。I_{o2}も全期間増加し続けた。一方Bの培養では、100 h以後も細胞密度は増大し続けているにも拘らず、この期間にTPA生成活性は減少した。I_{o2}の増大はおよそ110 hで停止した。

最大のTPA生成活性を得るための培養時間はこれらのバッチ毎に異なっていると同時に、細胞のTPA生成活性は細胞密度だけではなくI_{o2}とも関係があることが推測された。

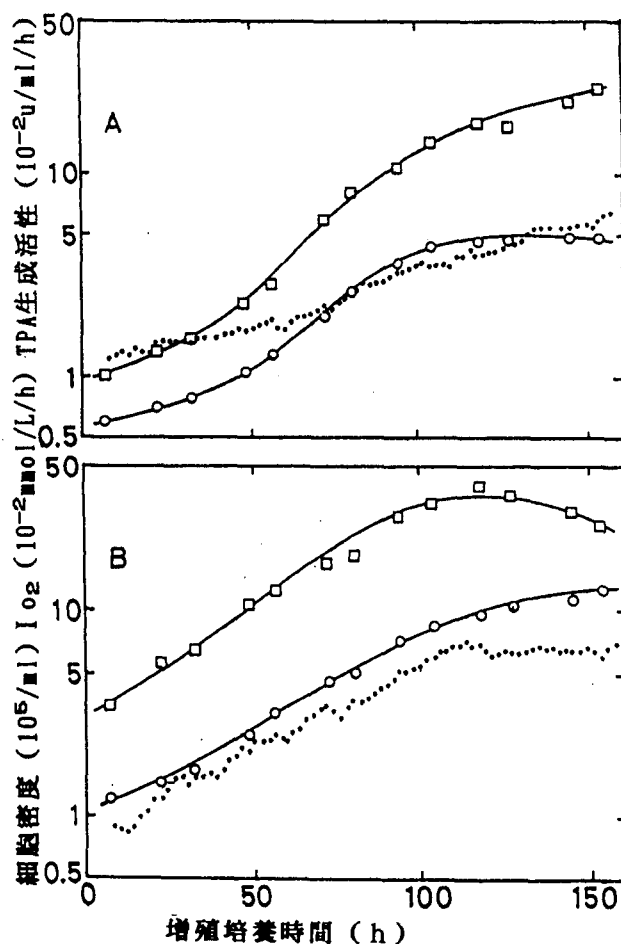


図26 接種細胞密度を変えた増殖培養
A ; 接種細胞密度 0.6×10^5 /ml、B ; 1×10^5 /ml
○; 細胞密度、□; TPA生成活性、····; I_{o2}

従って、実際の生産培養において最大のTPA生産量を得るためには、図27に示すように、増殖培養中の細胞のTPA生成活性をリアルタイムに推定し、これが最大になったと判断されたときに増殖培養からTPA生産培養へと移行する必要があると考えられた。

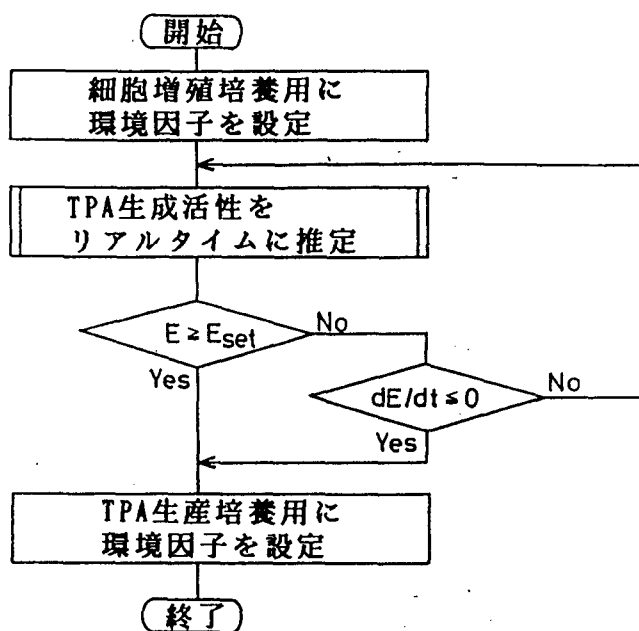


図27 増殖培養から生産培養への最適移行時間を決定するためのアルゴリズム
E:TPA生成活性、 E_{set} :ある一定のTPA生成活性の値(設定値)

3.3 TPA生成活性の推定

15式の様に、TPA生成活性が細胞密度と I_{O_2} との関数であると仮定し、細胞密度と I_{O_2} とからTPA生成活性を推定する方法を検討した。

$$E(t) = f(X(t), I(t)) \dots\dots\dots (15)$$

$E(t)$: t時間におけるTPA生成活性 (u/ml/h)

$X(t)$: t時間の細胞密度 (1/ml)

$I(t)$: t時間の I_{O_2} (mmol/L/h)

次に、図26のような過去の増殖培養実験のE、XおよびIのデータからなるデータ空間中におけるt時間の状態点の近傍では、関数fは一次の線形関数になると仮定すると、

$$E(t) - E_m = a_x \times (X(t) - X_m) + a_i \times (I(t) - I_m) \dots\dots\dots (16)$$

E_m : 近傍におけるTPA生成活性の平均値 (u/ml/h)

X_m : 近傍における細胞密度の平均値 (1/ml)

I_m : 近傍における I_{O_2} の平均値 (mmol/L/h)

なお、係数 a_x および a_i は、現在の状態点 ($X(t)$, $I(t)$) からのユークリッド距離 $L(X_p, I_p)$ を基準にして選択された過去の実験データを用いた重回帰分析により決定した。

$$L(X_p, I_p) = \left((X_p - X(t)) / \rho(X_p) \right)^2 + \left((I_p - I(t)) / \rho(I_p) \right)^2 \dots\dots\dots (17)$$

$L(X_p, I_p)$: ($X(t)$, $I(t)$) と (X_p , I_p) との間のユークリッド距離

X_p : 過去の実験での細胞密度 (1/ml)

I_p : 過去の実験での I_{O_2} (mmol/L/h)

$\rho(X_p)$: 全ての X_p の標準偏差

$\rho(I_p)$: 全ての I_p の標準偏差

具体的には、図26のデータを含む過去の6バッチの増殖培養の、細胞密度、 I_{O_2} 、TPA生成活性のそれぞれの経時データを平滑化した上で培養時間10時間毎に読取り、過去の6バッチに関するこれらのデータセット (X_t , I_t , E_t) を全てコンピューターにインプットした。そして、これらのうち5バッチのデータを使用して、残りの1バッチのTPA生成活性の推定を試みた。計算の中で、TPA生成活性の経時変化を推定したいバッチの現状に近い8組のデータセットを、過去の5バッチのデータの中から選択して回帰分析に使用した。

回帰分析に用いる過去のバッチ数（ここでは5）と現状に近いデータセットの数（ここでは8）により推定の精度が影響されることが予想された。特にバッチ数は多い方が良いと考えられた。しかし本研究では、回帰分析による培養経過のシミュレーションをはじめて行った岸本らの例⁵²⁾を参考にし、シミュレーションの実用性も考慮して次の様に決定した。岸本らは微生物培養に関して5個の独立変数を用いた回帰分析に対して過去の8バ

ッチのデータを採用しその中から現状に近い16点を選択している。動物細胞培養の場合培養期間が長いなどによりバッチの頻度が低いことが予想されたので、実用性を考慮して過去の必要なバッチ数を8バッチから5バッチに低減化した。また、過去のバッチのデータ点が 16×5 (バッチ) = 80と少ないこと、図26の結果からTPA生成活性と細胞密度、酸素消費速度との相関が十分に予想できたので、現状に近い選択データの数を16から8に減らした。さらに、TPA生成活性の推定誤差が経時的に拡大することを予防するために、データセットを選択する際に E_t もしくは E_{t-dt} をユークリッド距離算出に含めなかった。

この計算結果の一例を図28に示したが、TPA生成活性の推定値はその実験値にはほぼ一致しており、培養全体のTPA生成活性の経時変化の傾向も良く一致しているので、本法によってTPA生成活性は十分に推定できると考えられた。もし、オンラインで測定できる I_{O_2} に加えて細胞密度もリアルタイムに定量できれば、TPA生成活性は、リアルタイムに連続的に推定できると考えられた。

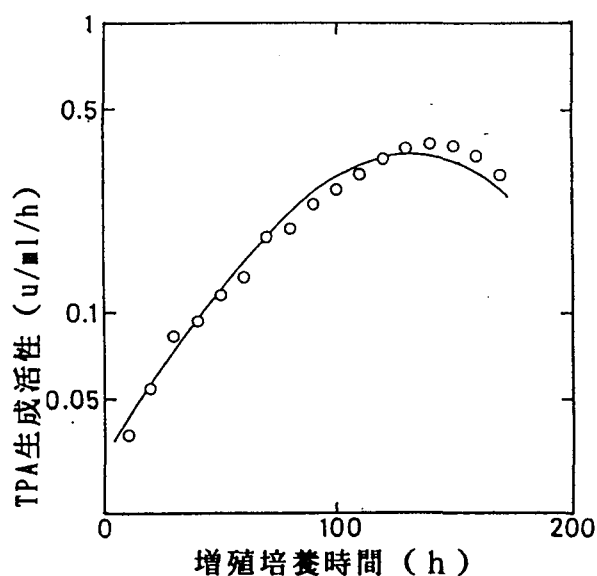


図28 TPA生成活性の経時変化の推定計算結果の例
図中の曲線;実験データ、○;推定値

3.4 細胞密度の推定

次に、細胞密度のリアルタイム推定計算を同様にして試みた。すなわち、細胞密度は10時間前の細胞密度と I_{O_2} の関数として表せると仮定した。

$$X(t+10) = f(X(t), I(t)) \dots\dots\dots (18)$$

$X(t)$, $X(t+10)$: t または $t+10$ 時間の細胞密度 (1/ml)

式16、17の回帰分析の手法を式18に応用して、初期細胞密度、 I_{O_2} の経時変化データおよび過去の5バッチのデータを用いて、目的とするバッチの細胞密度の経時変化の推定計算を試みた。その結果、図29に示すように、実験データと推定値との差異が培養の後半において特に大きかった。

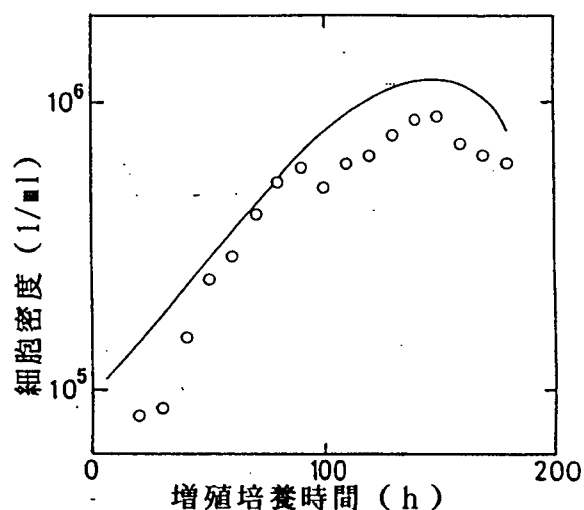


図29 細胞密度の経時変化の推定計算結果の例
図中の曲線;実験データ、○;推定値

この差異を修正するために、図30に示したアルゴリズムに従って、培養期間中1日に1回だけ細胞密度を実測し、それ以外の時点では上記の方法により細胞密度($\tilde{X}$)を推定計算した。そして、それらの細胞密度の値を用いてTPA生成活性($\tilde{E}$)を推定計算した結果、図31に示したように、培養後期においてTPA生成活性に少しの推定誤差が認められるが、培養経過全体に細胞密度もTPA生成活性も精度よく推定できた。

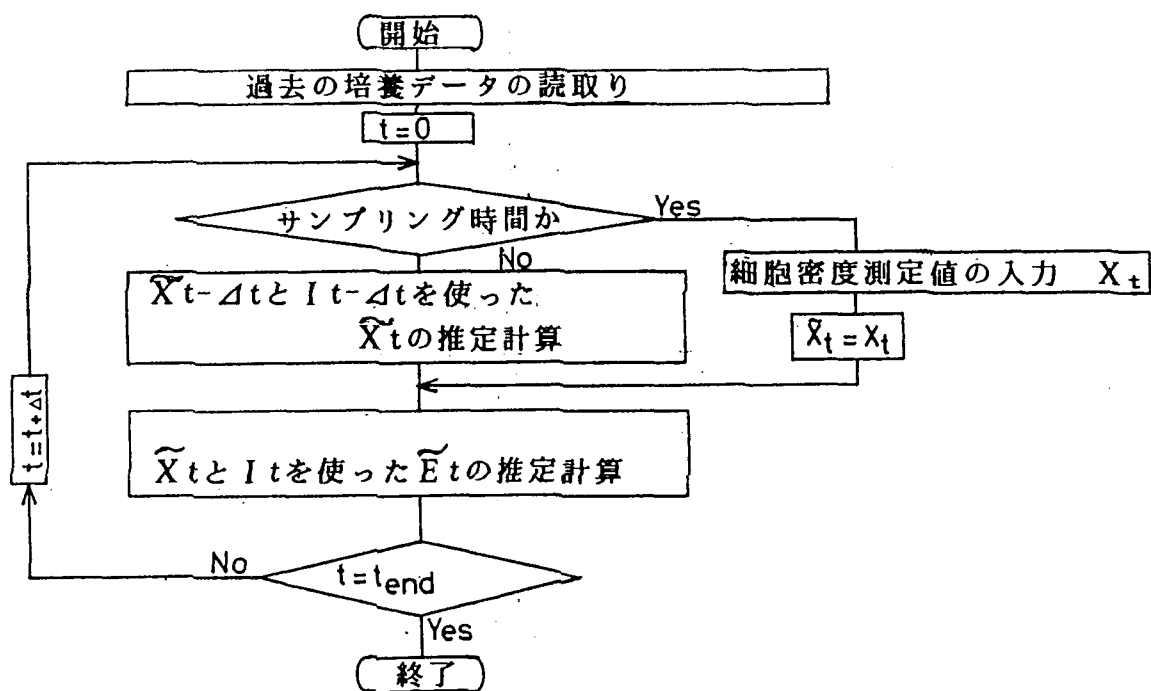


図30 TPA生成活性の推定計算のためのアルゴリズム

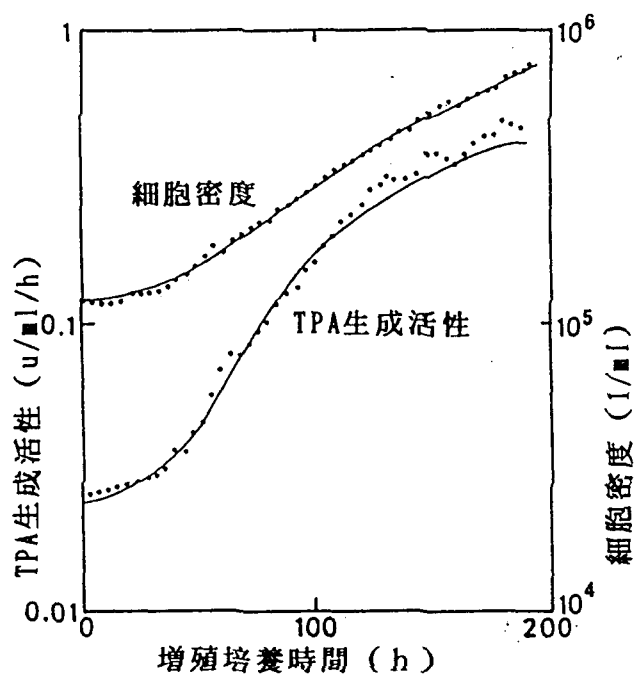


図31 TPA生成活性の推定計算結果の例
図中の曲線;実験データ、.....;推定値

3.5 オンライン推定実験

本法による推定の実際的な正確さおよび図27で提案した増殖培養から生産培養への切換え基準の有効性を確認するために、最新の10バッチの増殖培養データを用いたオンライン推定実験を行なった。ただし、増殖培養から生産培養への切換え基準を、TPA生成活性が増殖培養中12時間以上の間増加しないこと、あるいは最新の10バッチで得られた中で最高のTPA生成活性値の95%である0.56を越えることとした。その結果、図32に示すように、4時間毎にオンラインかつリアルタイムで推定したTPA生成活性は、増殖培養166時間に0.56を越え、170時間に最高値に達した。そして、上記の切換え基準にしたがってコンピューターは、『最適な切換え時間は166時間である。』と推定した。これは、実測したTPA生成活性が最高値に達した168時間にほぼ一致した。したがって、最適な切換え時間はオンラインで推定できたと考えられる。

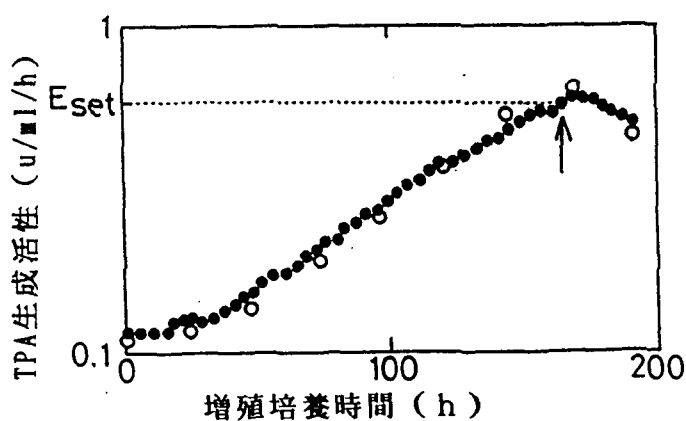


図32 増殖培養から生産培養への最適移行時間のオンライン推定
○;TPA生成活性の実測値、●;TPA生成活性のオンライン推定値
↑;オンライン決定された最適移行時間

動物細胞培養による蛋白質生産プロセスに関するコンピューターを用いた制御研究は、まだほとんど見られない。動物細胞培養のように不安定な要素を多く含むプロセスにおいてこそ、コンピューターを用いた高度な制御が有効になると考えられるが、本章の結果はこの分野における良き前例となると考えている。

また、ここで用いた過去の培養データを用いた回帰分析によるシミュレーション法⁵²⁾は、微生物培養よりもさらにメカニズムが複雑で未知の部分の多い動物細胞には、培養を重ねる毎に過去のデータが蓄積され、データの増加によって推定精度が改善されることにより未知な部分を補えるという、実用的な利点もかねそなえている。

第四節 要約

増殖培養中の細胞のTPA生産活性を過去の増殖培養データを用いて回帰的に推定計算することによって、増殖培養から生産培養への最適な移行時期をバッチ毎にリアルタイムで判断する方法を検討した結果を示した。増殖培養を終了して生産培養へ移行する際の最適な切替時期は、必ずしも細胞密度が最高に到達した時期とは一致していなかった。これは細胞当りのTPA生成活性が増殖培養の進行にともなって変化するためであり、TPA生成活性を簡便に測定する方法を導入して調べたところ、増殖培養のバッチ毎にその時期が異なることが判明した。したがって、バッチ毎に増殖培養中の細胞のTPA生成活性の変化をリアルタイムに推定計算して最適な切替時期を判断する必要があった。一日毎にサンプリングして測定する細胞密度とオンラインで連続測定できるようになった酸素消費速度および過去の培養データとを用いて、TPA生成活性を連続的に重回帰的に推定計算できることを示し、増殖培養から生産培養への最適切替時期のオンラインかつリアルタイムな推定判断を可能にした。

第五章 血清添加濃度の低減化

第一節 緒言

牛血清は高価であり、通常の10%の添加濃度でも培養原料費の大半を占めるため、これを低減化することの経済的効果は大きい。またロット間の品質のバラツキも大きく²⁶⁾、ロット毎に培養試験を行ない合格したロットしか使用できない。従って、牛血清の一部または全部を安価な添加物で代替することで牛血清の添加濃度を減らす必要がある。従来、無血清培地や低血清培地が研究されてきたが、それらの中には医学あるいは生化学的研究を目的として経済性を考慮していないため代替添加物としてホルモンやビタミンなどの高価なものを含んでいる培地が多かった²⁷⁻³⁰⁾。しかも、これらは全て、牛血清のもつ細胞増殖促進作用の代替として検討されるにとどまり、安価な低血清培地で増殖した細胞の蛋白生産性に注目した研究はほとんど行なわれていない。

本章では、培地の低血清化を目的として、安価な代替添加物として牛血清アルブミン(BSA)と硫酸第一鉄を見出し、これらを使用した低血清培地の開発およびこの低血清培地で増殖した細胞のTPA生産性について検討した結果について述べる。

第二節 実験材料および実験方法

2.1 細胞

第一章2.1に示したようにヒト胎児肺細胞を用いた。

2.2 培地

細胞増殖培養用基本培地としては、第一章2.2に示した方法と同様に10%FCS含有MEM培地を用いた。FCS代替添加物としては、BSA（ウシ血清アルブミン、Organon teknika社）および硫酸第一鉄（和光純薬社）を用いた。また、TPA生産培養用培地として第一章2.2に示したようにプロテオースペプトンNo. 3含有199培地を用いた。

2.3 FCS代替物のスクリーニング培養

96穴マルチウェルプレート（FLOW社）に、増殖用基本培地500 μ l/ウェルを用いて、細胞を 1×10^4 /mlの密度で植え、5 %CO₂の雰囲気下で、37℃ 1 日間培養した。次にウェル底面に接着した細胞をPBSで洗浄し、0.2%FCSおよび種々のFCS代替添加物を含む増殖培地に交換し、さらに3 日間培養した。培養後、ウェルをPBSで洗浄、乾燥し、ウェル底面の細胞蛋白をグルタルアルデヒド20 μ lで固定した。水洗後、メチレンブルー（0.05%）100 μ lで染色し、さらに水洗後乾燥した。1.2 mlの3 %HClでウェル底面から抽出した色素を665 nmの吸光度で定量して細胞蛋白量を数量化して、細胞密度の指標とした。

添加物の効果を次の式で定義する増殖促進効果（GSE）で示した。

$$\text{GSE}(\%) = \frac{\text{OD}(\text{サンプル}) - \text{OD}(\text{FCS0.2\%})}{\text{OD}(\text{FCS10\%}) - \text{OD}(\text{FCS0.2\%})} \times 100 \dots (19)$$

OD（FCS0.2%）;FCS0.2%を含む培地で増殖した後のウェルの665 nmの吸光度

（0.2%FCSに代替物を添加した場合や10%FCSの場合も同様に示した。）

2.4 ディッシュを使用した細胞接着テスト

種々の培地を使って細胞を6ウェルディッシュ（FLOW社）に接種し6時間培養した。種々の培地のディッシュ底面への影響を調べるために、これらの内いくつかのディッシュは細胞接種の前に予め種々の培地を入れて24時間インキュベートしておいた。平板効率は接種細胞数と接種6時間後に計数したの接着細胞数との比率として計算した。

$$\text{平板効率(\%)} = \frac{\text{接種6時間後に計数したの接着細胞数}}{\text{接種細胞数}} \times 100$$

2.5 マイクロキャリアー培養(30 mlスケール)

スピナーボトル（100 ml、ウイトン社）中の増殖培地30mlに 1×10^5 /mlの細胞を、3 g/Lのマイクロキャリアー（Cytodex1、ファルマシア社）と共に接種した。培養温度は恒温水槽により37℃に制御し、5 %CO₂の雰囲気下で、80 rpmで攪拌した。培地は2日毎に新鮮培地と交換した。細胞増殖の後、マイクロキャリアーをPBSで3回洗浄してから30 mlのTPA生産用培地を加えてTPA生産培養を開始した。生産用培地は4日毎に新鮮培地と交換した。

2.6 分析

細胞密度は、脱核染色法⁴⁵⁾により求めた。培養液中のTPA活性は、フィブリンプレート法⁴⁶⁾により測定した。細胞の接着しているマイクロキャリアービーズと接着していないビーズの比率を顕微鏡観察により求め、細胞接着ビーズ割合とした。BSA、脂肪酸および鉄イオンの濃度は、ブロムクレゾールグリーン法⁵³⁾（アルブミンBテスト、和光純薬社）、アシルCoAシンセターゼーアシルCoAオキシダーゼ法⁵⁴⁾（NEFA Cテスト、和光純薬社）、バソフェナンスロリンスルフォネートキレート法⁵⁵⁾（Fe Bテスト、和光純薬社）によってそれぞれ定量した。

第三節 結果と考察

3.1 FCS代替物のスクリーニング

スクリーニングシステムの感度を調べるために、本システムにおいて試験物質の代りに種々の濃度のFCSを用いて培養した。図33に示したように、本システムでは底面に接着した細胞蛋白の量（蛋白O.D.）はFCS濃度の増加に応じて増加することがわかった。蛋白O.D.の値をGSEに換算した値も示したが、GSEの定義に従って、FCSが0.2%の時GSEは0%、FCSが10%の時GSEは100%となる。

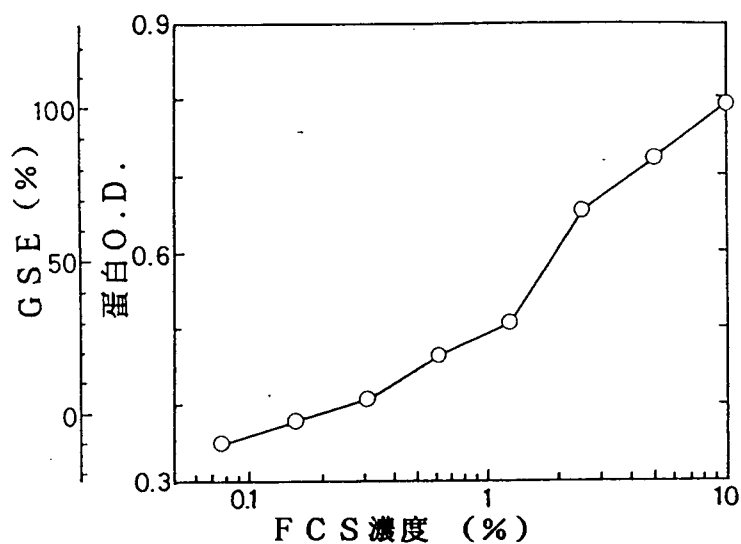


図33 スクリーニングシステムの感度

FCS代替物としての細胞増殖促進性を115種類の物質について試験した。BSAと硫酸第一鉄は図34に示すようにそれぞれ濃度依存的に増殖を促進した。BSAと硫酸鉄のGSEの最高値はそれぞれ4 mg/mlで47%、10 μ g/mlで65%となった。

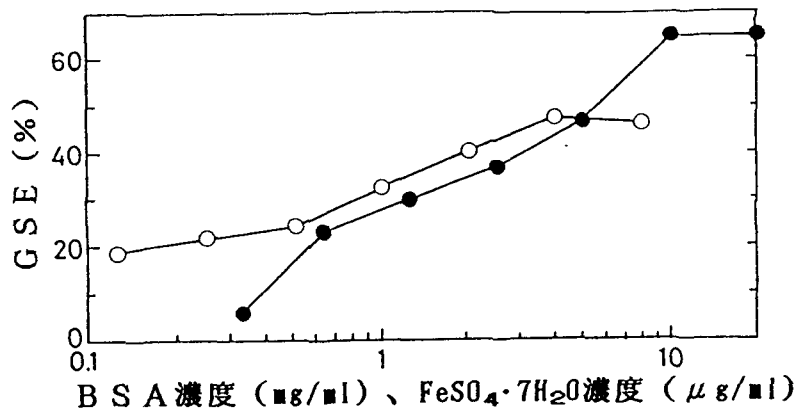


図34 0.2%FCS培地におけるBSAと硫酸第一鉄の増殖促進効果
○；BSA、●；硫酸第一鉄

次に、BSAと硫酸鉄との混合添加効果を調べるために、0.2%FCSと5 mg/mlのBSAを含む培地に種々の濃度の硫酸鉄を添加して培養したところ、図35に示すように、20~40 μ g/mlで97%ものGSEに達した。この時80 μ g/ml以上の硫酸鉄を添加するとGSEは急激に減少した。

硫酸鉄^{56, 57)}とBSAとはそれぞれ65%と47%の増殖促進効果を有していた。硫酸鉄とBSAとを合せると相乗効果を示し、それぞれの単独の場合よりも大きな97%という高い増殖促進効果を達成した。

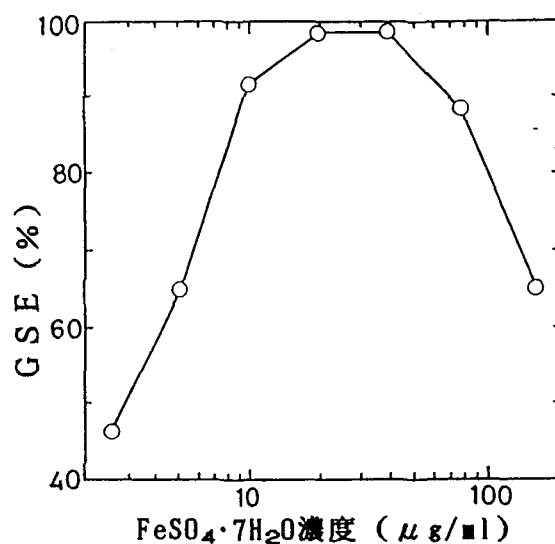


図35 BSA 5 mg/Lを含有した0.2%FCS培地における硫酸第一鉄の増殖促進効果

このスクリーニングで見出されたBSAと硫酸鉄には細胞増殖促進作用があるが、細胞接着促進作用は無い可能性が十分あったので、マイクロキャリア培養で攪拌培養する場合、牛血清濃度は0.2%より高い1～3%を想定した。そこで、基本培地のFCS濃度を0.2%から1%、3%に上げて高いGSEが得られるかどうかを本システムで調べた。但し、GSE算出の際は、19式の中で、FCS0.2%の培養のODの代りに、FCS1%または3%の培養のODを用いた。その結果、表8に示すように、5 mg/mlのBSAと20 μ g/mlの硫酸鉄との混合物のGSEは、いずれも約80%と同じであった。

したがって、3%FCSのマイクロキャリア培養でも、5 mg/mlのBSAと20 μ g/mlの硫酸鉄は十分に増殖を促進できると推測できる。

表8 種々のFCS濃度の培地におけるBSAと硫酸第一鉄の増殖促進効果

F C S 濃度 (%)	G S E (%)
0.2	81.5
1	78.0
3	82.5

3.2 代替物の細胞接着への影響

上述の様に本スクリーニングシステムでは、10%FCSによって細胞をウェル底面に接着させた後に添加物の増殖促進作用を調べるシステムであるので、細胞接着に対する影響に関しては別途調べる必要があった。そこで、BSAと硫酸鉄の細胞接着への影響を調べた。

表9の上段に示したように、プレインキュベートしていない通常のディッシュを用いた場合、10%FCS培地、3%FCS培地および20 μ g/mlの硫酸鉄を添加した3%FCS培地による培養では、いずれも約95%の平板効率に達し、即ち接種した細胞のうち大部分がウェル底面に接着できた。しかし、3%FCS培地に5 mg/mlのBSAを添加すると65%の平板効率しか得られなかった。また、表9の下段に示したように、種々の培地でプレインキュベートしたディッシュに3%FCS培地を用いて細胞を接種した場合も、BSAを含む培地でプレインキュベートしたディッシュの場合だけ平板効率が45%と極端に低かった。

従って、BSAはHEL細胞の接着を拮抗的に阻害すると考えられる⁵⁸⁾。

表9 平板効率に対するBSAと硫酸第一鉄の影響

ディッシュの プレインキュベーション	細胞接種	平板効率 (%)
—	10%FCS	94
—	3%FCS	96
—	3%FCS+硫酸鉄	95
—	3%FCS+BSA	65
10%FCS	3%FCS	87
3%FCS	3%FCS	85
3%FCS+硫酸鉄	3%FCS	89
3%FCS+BSA	3%FCS	45

次に、BSAの細胞接着阻害をマイクロキャリアー培養によっても確認するために、種々の培地を用いて2日間マイクロキャリアー培養を行ない、その間の細胞増殖と細胞接着を調べた。その結果、表10に示すように、3%FCS培地を用いたマイクロキャリアー培養では10%FCS培地の場合とほぼ同じように細胞は増殖し、細胞密度は2日間で 3.6×10^5 /mlに達したが、BSAを添加した3%FCS培地では 2.5×10^5 /mlにしか増殖しなかった。一方、細胞接着の面では、3%FCS培地にBSAを添加すると細胞接着ビーズ割合は65%であったが、これは10%FCS培地や3%FCS培地の場合の91~95%に比べてかなり低かった。

BSAがマイクロキャリアーへの細胞接着も阻害することが確認された。

表10 マイクロキャリアーへの細胞接着に対するBSAと硫酸第一鉄の影響

	細胞密度 (10^5 /ml)	細胞接着ビーズ割合 (%)
10%FCS	3.80	95
3%FCS	3.60	91
3%FCS + BSA	2.50	65

細胞接種密度は、 1.5×10^5 /mlであった。

3.3 TPA生産のための低血清マイクロキャリアー培養

マイクロキャリアー培養では、接種した細胞が培養の初期にマイクロキャリアーに接着し、その後の培養液中には浮遊細胞がほとんど観察されない。このことから、一度マイクロキャリアーに接着した細胞の多くは、その後マイクロキャリアーから完全には離れることなく分裂増殖すると考えた。従って、培養の初期に細胞がマイクロキャリアーに接着した後にBSAを添加すれば、BSAの細胞増殖促進作用だけを利用できると考えて、次の実験を行なった。

すなわち、図36の左側に示すように、3種類のマイクロキャリア培養を行ない、いずれも増殖培養の途中2回の培地交換を行なったが、そのうちの2種類は増殖培養の全期間にわたって、10%FCS培地と3%FCS培地をそれぞれ用いた。3種類目の培養として、最初の2日間は20 μ g/mlの硫酸鉄を添加した3%FCS培地を用い、後の5日間は硫酸鉄と5 mg/mlのBSAの両方を添加した3%FCS培地を用いる培養を行なった。10%FCS培地を用いた培養に比べて3%FCS培地を用いた培養の細胞増殖速度は2日後に低下した。3種類目の培養では培養期間中を通じて10%FCS培地の培養とほぼ同様に一定の増殖速度を保てた。

全ての培養の最初の2日間で細胞接着ビーズ割合が約90%に達した。すなわち、細胞がマイクロキャリアに接着する過程ではBSAが接着を阻害するが、3種類目の培養において既に細胞がマイクロキャリアにはほぼ接着し終わっている2日目以降に添加したBSAは細胞接着ビーズ割合を低下させなかったと考えられる。

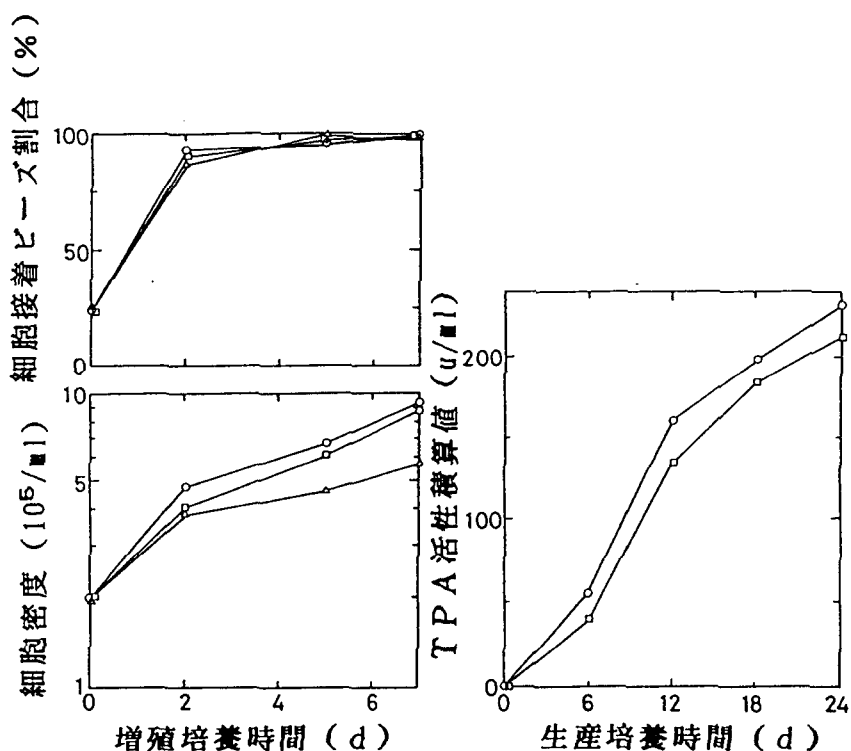


図36 低血清培地によるマイクロキャリア増殖培養と増殖細胞によるTPA生産
 ○; 10%FCS培地
 △; 3%FCS培地
 □; 3%FCS培地+硫酸鉄20 μ g/ml+BSA 5 mg/ml(但し、BSAは2日目以降)

BSAは脂肪酸のキャリアーとして働いていると言われているので⁵⁹⁾、この培養中2～5日のBSA、脂肪酸及び鉄イオンの濃度を調べた。対照として、細胞を接種しなかった低血清培養についても測定した。図37に示すように、低血清培養において、BSA濃度はほぼ一定であったが脂肪酸濃度は培養時間と共に減少した。これらBSAと脂肪酸はいずれも10%FCS培養では検出されなかった。低血清培養では細胞接種の有無にかかわらず始めの1日間で鉄イオン濃度が初期の約25%まで低下した。低血清培養では、BSAに含まれていた脂肪酸は細胞によって消費されたが、鉄イオンの減少のほとんどは非生物的行なわれたと考えられる。

非常に強い増殖促進効果を示した5 mg/mlのBSAは蛋白質含量としては10%FCSとほぼ同じであったが、FCSに含まれる蛋白質のほとんどが α フェトプロテインであることを考慮すると、BSAの効果は単なるFCS蛋白の代替とは考えられない。脂肪酸は10%FCS培地には含まれないが低血清培地にはあり、低血清培養中急速に減少した。したがって、BSAは脂肪酸のキャリアーとして働いていると考えられた。

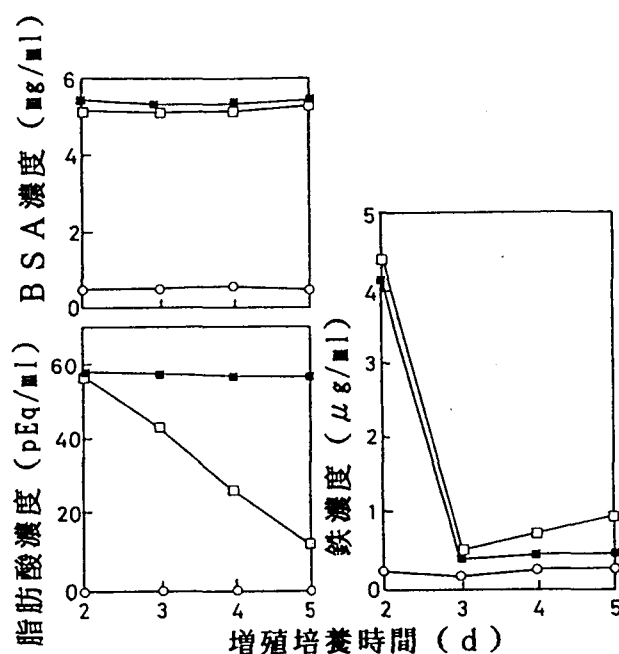


図37 種々の培地による増殖培養中のBSA、脂肪酸および鉄濃度の経時変化
 ○; 10%FCS培地
 □; 3%FCS培地+硫酸鉄20 μg/ml+BSA 5 mg/ml (但し、BSAは2日目以降)
 ■; 3%FCS培地+硫酸鉄20 μg/ml+BSA 5 mg/ml
 (但し、細胞接種は無しで、BSAは2日目以降)

低血清培地でマイクロキャリア増殖培養した細胞を用いてTPA生産培養を行ない、TPA生産性を調べた。図36の右側に示したように、低血清培地で増殖した細胞によるTPA蓄積のパターンは、10%FCS培地で増殖した細胞の場合と非常に似ていた。低血清培地の場合のTPA生産性は10%FCS培地で増殖した細胞の場合に比べてわずかに低い、これは低血清増殖培養の最終細胞密度が10%FCS培地の場合に比べて少し低いためであろう。

一般に、無血清培地や低血清培地の研究のほとんど全てが細胞の増殖能にのみ注目して行なわれてきており、無血清培地や低血清培地で増殖した細胞の蛋白生産性に関する報告は非常に少ないが、ハイブリドーマ細胞の浮遊培養による抗体生産に関するポールらによる報告がある。すなわち、FCSを10%から2.5%に減らしても細胞当りの生産性はほとんど低下しないが、2.5%より下げると細胞の生存にはほとんど影響しないにもかかわらず抗体生産は顕著に低下した¹²⁾。

しかし、本研究で開発した3%FCS培地に安価な硫酸鉄とBSAとを添加した低血清培地で増殖した細胞は、10%FCS培地で増殖した細胞とほぼ同じ経過でほとんど同じ量のTPAを生産した。低血清培地で増殖した接着依存性細胞の蛋白生産能が、もとの高濃度（10%）FCS培地で増殖した細胞に比べて低下していないという報告は、他にはほとんど認められない。

第四節 要約

培地の低血清化を目的として、安価な代替添加物による低血清培地の開発およびこの低血清培地で増殖した細胞のTPA生産性について検討した結果を述べた。牛血清（FCS）に代わる増殖促進物質を精度良く簡便にスクリーニングできるシステムにより115種の添加物をFCS濃度0.2%の条件下でスクリーニングした結果、BSAと硫酸第一鉄とがそれぞれ単独で顕著な増殖促進効果を持つことが判明した。それらには相乗効果があり、FCS濃度が1%でも3%でも同様な効果が認められた。

一方、それらの細胞接着への影響を調べたところ、BSAは細胞が担体へ付着するのを拮抗的に阻害することが判明した。しかし、培養の初期にマイクロキャリアーに細胞が接着し終わってからBSAを添加することによりこの問題を解決でき、FCS濃度を10%から3%に低減化したマイクロキャリアー攪拌培養が可能となった。さらに本低血清培地で増殖した細胞のTPA生産性が10%血清培地で増殖した細胞と比べて低下していないことも確認できた。

総 括

本論文では、マイクロキャリア動物細胞による血栓溶解剤TPA生産プロセスをとりあげ、生産技術としての動物細胞培養のもついくつかの課題の解決法についてプロセス工学的に研究した。

それらの課題を要約すると、①攪拌の蛋白生産への影響を考慮し、かつスケールアップや細胞密度の高密度化にも対応できる通気攪拌政策、②培養の安定化(2-1)生理状態の指標としての酸素消費速度のリアルタイムなモニタリング方法の開発、(2-2)これの利用による増殖培養のバッチ毎のバラツキによる後半の生産培養の不安定さを改善できる制御、および③増殖細胞の蛋白生産性にも考慮した低血清培地、である。

緒論においては、生産技術としての動物細胞の現状、問題点を述べることにより本論文の指向する研究方針とその意義を明らかにし、本論文の概要を述べた。

第一章では、具体的な研究を始めるにあたり、細胞増殖性およびTPA生産性の両面から、温度、pH、DOの3つの培養環境因子の最適値について総合的に検討した結果を述べた。増殖培養では、溶存酸素濃度が30%飽和未満になると比増殖速度(μ)が低下した。35℃以下の温度では、比増殖速度が低下するだけでなく、最高到達細胞密度(X_{max})も低くなることが分った。pHが最適値から0.2~0.3はずれると、比増殖速度も最高到達細胞密度も低くなることが分った。

一方、生産培養では、TPAの総生産量を最終的な評価基準としたが、これを細胞密度が減少し始めるまでの時間の長さ(τ)、細胞の比減少速度(μ_d)、TPAの比生産速度(ρ)の各要因の総合値として解析する方法を示した。37℃以下の低温培養で細胞を長期間維持することにより生産性が向上した。結局、増殖培養に対しては溶存酸素濃度30%飽和以上、温度37℃、pH7.4が最適であり、生産培養ではpHの最適値は6.8、溶存酸素濃度の最適範囲は20~30%飽和、最適温度は33℃であった。

以上の様に、細胞の増殖と蛋白の生産という異なった目的を持った培養には、おのずとそれぞれ異なった最適な培養環境が存在することを示した。

第二章では、通気攪拌の検討を目的として、TPA生産性に与える攪拌速度の影響を明確にした上で、最適な通気攪拌方策を総合的に検討した結果を述べた。マイクロキャリアがほぼ均一に分散し溶存酸素濃度を一定に維持できる70 rpm以上の攪拌速度では、細胞減少に差が表れなくても、攪拌速度が低いほどTPA生産量は明らかに高かった。しかし、攪拌速度をさらに下げるとマイクロキャリアが培養槽底部に厚さ0.77 mm以上沈積し溶存酸素の拡散律速が生じることが計算から推測できた。そこで、マイクロキャリア内部に入り込めない大きさのポリマーを培養液に添加して培養液の比重を増大させればマイクロキャリアの沈降速度が減少して、20 rpmのような低攪拌でも沈積を防げることを示した。ポリマーとして溶性デンプンを添加しても静置培養ではTPA生産性には影響を与えないことを確認した。マイクロキャリアがほぼ均一に分散する70 rpmに較べてマイクロキャリアが沈積する20 rpmでは細胞密度の減少も激しくTPA生産量も極めて低かったが、同じ20 rpmでも溶性デンプンを添加してマイクロキャリアの沈降を防止した培養では70 rpmよりもTPA生産量が高かった。

20rpmのような低攪拌条件下で、表面通気によって溶存酸素供給速度を上げるための第一の方法として、エアースプレー法を採用し通気速度の最適化により k_{La} を単なる表面通気の約2.3倍に増大できた。第二の方法として、加圧培養を検討した結果、槽内を0.2 kg/cm²-Gから1.5 kg/cm²-Gまで加圧しても細胞増殖には全く悪影響を与えないばかりか、TPA生産性は僅かに向上し、グルコースの利用効率が明らかに改善されることが明らかとなった。以上により、生産に有利な低攪拌でもスケールアップが十分に可能であることを示した。

攪拌強度に対する感受性は個々の細胞および生産物により異なると考えられるが、ここで示した最適な通気攪拌政策は十分に他の動物細胞培養プロセスに対しても応用できるであろう。

以下の章では、培養の安定化に関して検討した結果を述べた。

第三章では、酸素消費速度測定 of 安定化とともに、通常の溶存酸素濃度制御によって生ずる溶存酸素濃度の小刻みな周期的変化を利用した、細胞に外乱を与えない、酸素消費速度の連続測定方法を検討した結果について述べた。培養槽内の気相を窒素で置換する従来の方法を用いて、測定される酸素消費は、細胞の呼吸速度であることを明白にした。また、培養液表面の泡が酸素消費速度の測定値に大きな外乱を与えることを、 k_{La} に対する泡の影響から説明し、発泡を防ぐことによって測定値がきわめて安定化することを示した。一方、培養槽内気相を窒素ガスなど特定の測定用のガスに置換することなく、排気ガス分析を併用すれば酸素消費速度の測定が、可能であることを示した。この方法では、培養系に不必要な外乱を与えずに済むばかりでなく、連続測定が可能になった。さらに、この方法の定量性をグルコースオキシダーゼを用いたグルコースの酸化反応系によって証明した。

ここで開発した酸素消費速度の連続測定方法は、通気攪拌槽であれば培養自体に何等の影響を与えることなく応用できるため、汎用性に富んだ方法と考えている。

第四章では、増殖培養中の細胞のTPA生成活性を過去の増殖培養データを用いて回帰的に推定することによって、増殖培養から生産培養への最適な移行時期をバッチ毎にリアルタイムに判断する方法を研究した結果について述べた。増殖培養を終了して生産培養へ移行する際の最適な切り替え時期は、必ずしも細胞密度が最高に到達した時期とは一致していなかった。これは細胞当りのTPA生成活性が増殖培養の進行にともなって変化するためであり、TPA生成活性を簡便に測定する方法を導入して調べたところ、増殖培養のバッチ毎にその時期が異なることが判明した。したがって、バッチ毎に増殖培養中の細胞のTPA生成活性の変化をリアルタイムに推定して最適な切替時期を判断する必要があった。一日毎にサンプリングして測定する細胞密度とオンラインで連続測定できるようになった酸素消費速度および過去の培養データとを用いて、TPA生成活性を回帰的に連続的に推定出来ることを示し、増殖培養から生産培養への最適切り替え時期のオンライン推定を可能にした。

本法の利点は、複雑な数学モデルを用いたプロセス定数の同定をしなくても、培養バッチを重ねるたびに過去のデータが増え、推定精度が自動的に上がっていくことであろうと考えている。

第五章では、低血清化を目的として、安価な代替添加物による低血清培地の開発およびこの低血清培地で増殖した細胞のTPA生産性について研究した結果を述べた。血清に代わる増殖促進物質を精度良く簡便にスクリーニングできる方法により種々の添加物を血清濃度0.2%の条件下でスクリーニングした結果、BSAと硫酸第一鉄とがそれぞれ単独で顕著な増殖促進効果を持つことが判明した。それらには相乗効果があり、血清濃度が1%でも3%でも同様な効果が認められた。

一方、それらの細胞接着への影響を調べたところ、BSAは細胞が担体へ付着するのを阻害することが判明した。しかし、細胞がマイクロキャリアー担体に接着し終わってからBSAを添加することによりこの問題を回避でき、血清濃度を10%から3%に低減化したマイクロキャリアー攪拌増殖培養に成功した。さらに低血清増殖した細胞のTPA生産性が10%血清で増殖した細胞と比べて低下していないことも確認した。

実際の他のプロセスを考えると、最適な低血清培地は細胞および生産物により異なることが予想されるが、ここで述べた低血清培地決定の方法論は、種々の培養について応用が可能であると考えている。

以上、工業技術としての動物細胞培養の問題点の解決について、TPA生産を例に取り上げて述べてきたが、これらの研究の内のかなりの部分がTPA生産工場において実用化され、工業生産に寄与していることを、付け加えておく。

引用文献

- 1) Kutsky, R. J.: Handbook of Vitamines and Hormones, Van Norstrand Reinhold Co. (1973).
- 2) Lowy, P. H., Keighley, G., Borsook, H.: Nature, **185**, 102 (1960).
- 3) Giard, D. J., Fleischaker, R. J., Fabricant, M.: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, **170**, 155 (1982).
- 4) Hayter, P. M., Curling, E. M. A., Baines, A. J., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P. G., Tong, J. M., Bull, A. T.: Biotechnol. Bioeng., **39**, 327 (1992).
- 5) 北川泰雄、佐野祐子、岡野正樹、上田正次、佐々木隆造:と生物, **31**, 275 (1993).
- 6) Kluft, C., van Wezel, A. L., van der Velden, C. A. M., Emeis, J. J.: Advances in Biotechnological Processes, **2**, 97 (1983).
- 7) 鈴木明、板垣康治、満田伸二郎、東尾侃二: 日本農芸化学会誌 **65**, 1207 (1991).
- 8) Hasegawa, A., Yamashita, H., Kondo, S., Kiyota, T., Hayashi, H., Yoshizaki, H., Murakami, A., Shiratsuchi, M., Mori, T.: Biochemical and Biophysical Research Communications, **150**, 1230 (1988).
- 9) 橋爪秀一: 化学と生物, **31**, 104 (1993).
- 10) van Wezel, A. L., van der Velden-de Groot, C. A. M., van, Herwaarden, J. A. M.: Develop. Biol. Standard., **46**, 151 (1981).
- 11) 杉野幸夫: 細胞培養技術, P.102, 講談社 (1985).
- 12) van der Pol, L., Bakker, W. A. M., Tramper, J.: Biotechnol. Bioeng., **40**, 179 (1992).
- 13) Martens, D. E., de Gooijer, C. D., Beuvery, E. C., Tramper, J.: Biotechnol. Bioeng., **39**, 891 (1992).
- 14) Lakhotia, S., Papoutsakis, E. T.: Biotechnol. Bioeng., **39**, 95 (1992).
- 15) Krezmer, G., Schugerl, K.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **34**, 613 (1991).
- 16) Hu, W. S., Meier, J., Wang, D. I. C.: Biotechnol. Bioeng., **28**, 122 (1986).
- 17) Ju, L. K., Armiger, W. B.: Biotechnol. Prog., **6**, 262 (1990).

- 18) Kilburn, D. G., Webb, F. C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 801 (1968).
- 19) Fleischaker Jr, R. J., Sinskey, A. J.: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 193 (1981).
- 20) Murhammer, D. W., Goochee, C. F.: *Biotechnol. Prog.*, **6**, 391, (1990).
- 21) Sinskey, A. J., Fleischaker, R. J., Tyo, M. A., Giard, D. J., Wang, D. I. C.: *Annals. N. Y. Acad. Sci.*, **369**, 47 (1981).
- 22) Wohlpart, D., Gainer, J., Kirwan, D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 1050 (1991).
- 23) Wohlpart, D., Kirwan, D., Gainer, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 630 (1990).
- 24) Giard, D. J., Fleischaker, R. J., Sinskey, A. J.: *J. of Interferon Research*, **2**, 471 (1982).
- 25) Yamada, K., Furushou, S., Sugahara, T., Shirahata, S., Murakami, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 759 (1990).
- 26) 守屋宏毅、森田宏子、菅谷幸子、西山英大: *組織培養*, **10**, 195 (1984).
- 27) Shipley, G. D., Ham, R. G.: *Experimental Cell Research*, **146**, 249 (1983).
- 28) Brown, R. L., Griffith, R. L., Neubauer, R. H., Rabin, H.: *J. of Cellular Physiology*, **115**, 191 (1983).
- 29) 菅幹雄、星宏良: *組織培養*, **5**, 221 (1979).
- 30) Walythall, B. J., Ham, R. G.: *Experimental Cell Research*, **134**, 303 (1981).
- 31) Ceccarini, C.: *In Vitro*, **11**, 78 (1975).
- 32) Eagle, H.: *J. Cell Physiol.*, **82**, 1 (1973).
- 33) Fohring, B., Tjia, S. T., Zenke, W. M., Sauer, G., Doerfler, W.: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **164**, 222 (1980).
- 34) Ceccarini, O., Eagle, H.: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **68**, 229 (1971).
- 35) Pace, D. M., Thompson, J. R., van Camp, W. A.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **28**, 897 (1962).
- 36) Taylor, G. W., Kondig, J. P., Nagle, Jr. S. C., Higuchi, K.: *Applied Microbiology*, **21**, 928 (1971).
- 37) Balin, A. K., Goodman, D. B. P., Rasmussen, H., Cristofalo, V. J.: *J. Cell Physiol.*, **89**, 235 (1976).

- 38) Taylor, W. G., Camalier, R. F., Sanford, K. K.: J. Cell Physiol., **95**, 33 (1978).
- 39) Kilburn, D. G., Lilly, M. D., Self, D. A., Webb, F. C.: J. Cell Sci., **4**, 25 (1969).
- 40) Hemert, P. V., Kilburn, D. G., van Wezel, A. L.: Biotechnol. Bioeng., **11**, 875 (1969).
- 41) Brosemer, R. W., Rutter, W. J.: Experimental Cell Research, **25**, 101 (1961).
- 42) Murata, M., Eto, Y., Shibai, H.: J. Ferment. Technol., **66**, 501 (1988).
- 43) Viadutiu, G. D.: Life Science, **24**, 2369 (1979).
- 44) Sureshkumar, G. K., Mutharasan, R.: Biotechnol. Bioeng., **37**, 292 (1991).
- 45) Sanford, K. K., Earle, W. R., Evans, V. J., Waltz, H. K., Shannon, J. E.: J. of National Cancer Institute, **11**, 773 (1950).
- 46) Marsh, N. A., Arocha-Pinango, C. L.: Thrombos. Diathes. haemorrh., **28**, 75 (1972).
- 47) Takagi, M., Yoshida, T., Taguchi, H.: J. Ferment. Technol., **60**, 31 (1982).
- 48) Lavery, M., Nienow, A. W.: Biotechnol. Bioeng., **25**, 368 (1987).
- 49) Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W., Fu, P. C.: Clinical Chemistry, **20**, 470 (1974).
- 50) Schumpe, A., Adler, I., Deckwer, W. D.: Biotechnol. Bioeng., **20**, 145 (1978).
- 51) Ju, L. K., Armiger, W. B.: Biotechnol. Prog., **6**, 262 (1990).
- 52) Kishimoto, M., Yoshida, T., Taguchi, H.: J. Ferment. Technol., **59**, 125 (1981).
- 53) Dumas, B. T., Watson, W. A., Biggs, H. G.: Clin. Chim. Acta., **31**, 87 (1971).
- 54) Shimizu, S., Yasui, K., Yamada, H.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **91**, 108 (1979).
- 55) Jung, D. H., Parekh, A. D.: Am. J. Clin. Path., **54**, 813 (1970).
- 56) Kovar, J., Franek, F.: Biotechnol. Lett.: **9**, 259 (1987).
- 57) Kovar, J.: Hybridoma, **7**, 255 (1988).
- 58) Kan, M., Yamane, I.: J. of Cellular Physiology, **111**, 155 (1982).
- 59) Kan, M., Yamane, I.: Cell Structure and Function, **7**, 133 (1982).

本論文に係る報告

- (1) Comparison of the Optimum Culture Conditions for Cell Growth and Tissue Plasminogen Activator Production by Human Embryo Lung Cells on Microcarriers.
Takagi, M., Ueda, K.: Appl. Microbiol. Biotech., in print, (1994).
- (2) An Oxygen Supply Strategy for the Production of Tissue Plasminogen Activator by Microcarrier Cell Culture in a Large Scale.
Takagi, M., Okumura, H., Okada, T., Kobayashi, N., Kiyota, T., Ueda, K.: J. Ferment. Bioeng., 77(3), 301 (1994).
- (3) On-Line Continuous Measurement of the Oxygen Consumption Rate in Mammalian Cell Culture.
Takagi, M., Ueda, K.: J. Ferment. Bioeng., 77(6), in print (1994).
- (4) On-Line Determination for the Optimum Switching from Growth Phase to Production Phase of Tissue Plasminogen Activator in a Microcarrier Cell Culture.
Takagi, M., Ueda, K.: J. Ferment. Bioeng., 77(6), in print (1994).
- (5) A Low-Serum Medium with BSA and Ferrous Sulfate for the Production of Tissue Plasminogen Activator by Human Embryo Lung Cells.
Takagi, M., Ueda, K.: J. Ferment. Bioeng., 77(4), 394 (1994).
- (6) Effect of the Concentration of Insoluble Medium Component on the Productivity of Tissue Plasminogen Activator by High-Density Cells on Microcarriers.
Takagi, M., Kiyota, T., Ueda, K.: J. Ferment. Bioeng., submitted.

謝 辞

本研究に対し終始御懇篤なる御指導を賜った吉田敏臣教授に衷心より謝意を表します。
また、本論文の御校閲を賜りました菅健一教授、塩谷捨明教授に謹んで感謝の意を表しますとともに、論文の審査に際し貴重な御意見を賜りました大嶋泰治教授、山田靖宙教授、ト部格教授、今中忠行教授に厚く御礼申し上げます。

さらに本研究遂行にあたり多大な御助力をいただいた上田一夫氏、清田隆夫氏を始め旭化成工業株式会社富士医薬工場およびライフサイエンス総合研究所の各位には感謝の意を表します。併せて実験に協力していただいた成瀬寛俊氏、奥村広氏、岡田隆司氏、小林伸行氏に深謝致します。