

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	<a href="https://doi.org/10.11501/3097842">https://doi.org/10.11501/3097842</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏 名	高 木 睦
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 工 学 )
学 位 記 番 号	第 1 1 5 2 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 8 月 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	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
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉 田 敏 臣  教 授 今 中 忠 行    教 授 山 田 靖 宙    教 授 大 嶋 泰 治 教 授 卜 部 格    教 授 菅 健 一    教 授 塩 谷 捨 明

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、マイクロキャリアー動物細胞による血栓溶解剤 TPA の効率的生産を目指して、基本的な培養条件の最適化、実用的な培養装置の設計に必要な通気・攪拌方法の総合的な検討、培養の安定化のためのオンライン計測制御システムの開発、血清添加量を低減化するための培地組織に関する検討など、一連のプロセス工学的研究をまとめたものであり、緒論と総括のほか本論5章よりなる。

緒論では、動物細胞培養の工学的問題点を述べるとともに、それを解決するために通気攪拌の検討、安定化のための制御および血清添加量の低減化について検討を行う必要があることを述べている。

第1章では、細胞増殖培養ならびに TPA 生産培養の培養条件として培養温度、溶存酸素濃度、pHの影響を検討し、両培養フェイズそれぞれの最適値がいずれも異なること、特に生産培養では増殖最適温度37℃よりも低温が適していることを示している。

第2章では、TPA 生産培養において高速攪拌が細胞に悪影響を及ぼすこと、生産培地にデンプンを添加することによって低攪拌でも均一な培養が可能になることを述べている。さらに低攪拌の条件の高い酸素供給速度を確保するためにエアースプレーシステムおよび加圧培養が有効であることを明らかにしている。

第3章では、これまで困難とされていた動物細胞培養における連続的酸素消費速度測定法を検討し細胞への悪影響を与えない新しい方法を開発し、その実用性を確認した結果について述べている。

第4章では、増殖培養から生産培養への最適移行時間が培養バッチごとに異なることを示すとともに、酸素消費速度と細胞密度の測定値および過去の培養データを用いた重回帰分析による最適移行時期のオンライン推定法を示している。

第5章では、増殖培養への牛血清添加量を低減化するため、ウシ血清アルブミンおよび硫酸第一鉄を用いた培地を開発するとともに、当該培地で増殖した細胞によって牛血清を用いた場合に相当する TPA 生産が可能であることについて述べている。

総括では、以上の結果を要約し、本研究で得られた主たる結論を総括している。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、動物細胞培養によってタンパク製剤を工業的に生産する技術に関する基盤的研究として、血栓溶解剤 (tissue plasminogen activator : 略称 TPA) の生産に関するプロセス工学的諸研究をまとめたもので、以下に要するよういくつかの新しい提案を行うとともに二、三の重要な知見ならびに結論を得ている。

- (1) 細胞膜を有さず機械的衝撃に弱い動物細胞の培養における攪拌の問題について、実用的な解決法を見いだす方向で、種々検討を行なっている。まず、攪拌速度が高くなると TPA 生産が低下することを実験的に見いだしている。一方、攪拌が限界値より低くなると、細胞が付着生息している担体であるマイクロキャリアが沈降堆積する。この堆積層における酸素移動の理論解析から堆積層の限界厚みを求めるとともに、マイクロキャリアが沈降するのを避け懸濁状態を保つための限界攪拌速度を実験的に求めている。デンプン添加によって懸濁限界攪拌速度を下げることができさらに TPA 生産量を高めている。低攪拌条件下でも表面通気による酸素供給を充分ならしめる方法として、エアースプレー法と加圧培養法を提案し、その有効性を検証している。
- (2) 培養中の細胞の生理状態を把握しプロセスを適正に制御するため、呼吸速度をオンライン計測する方法と TPA 生産能を予測する方法を開発している。まず、溶存酸素測定と廃棄ガス分析を併用し酸素に関する物質収支式に基づいて酸素消費速度をオンラインで推定する方法を提案している。この測定値と細胞密度の測定値ならびに過去に行った培養のデータを併用することによって、重回帰分析から細胞の TPA 生産能を推定できることを示し、これを用いて増殖培養から生産培養への切り換えを的確に行える方法を提案している。
- (3) 動物細胞培養において必須培地成分として用いられる牛血清は高価で品質の安定性にも問題があることから、可能な限りその使用を抑えることが必要である。150 種に及ぶ種々の成分を検討した結果、ウシ血清アルブミンと硫酸第一鉄が増殖促進効果を有することを見だし、これらを用いた低血清培地を得ており、TPA 生産も牛血清培地の場合に劣らないことを確かめている。

以上のように、本論文は動物細胞培養のプロセス工学について価値ある知見を得ており、培養工学ならびに生物プロセス制御の分野に貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。