

# 高密度動物細胞培養装置

## High Density Animal Cell Culture System

医薬品や診断薬としてのタンパク質生産用として浮遊性動物細胞を高い生産性で培養する装置を開発した。高密度および連続培養を達成するために、(1)液中通気を可能にする消泡ネット、(2)連続培地交換を可能にする細胞分離膜、(3)細胞のダメージを軽減するエアリフトかくはんを採用し、これらを自動滅菌の可能な装置として構成した。この装置を用いたマウスーマウス ハイブリドーマ細胞(STK1)の27日間連続培養実験により、 $4 \times 10^7$  cell/mlの細胞密度および100 mg/(l·h)のIgG(モノクローナル抗体)生産速度を得た。

村上 聖\* *Sei Murakami*  
中野隆盛\* *Ryūsei Nakano*  
南 寿夫\*\* *Hisao Minami*  
松崎晴美\*\*\* *Harumi Matsuzaki*

### 1 緒 言

遺伝子組換え技術を用いた大腸菌などの微生物による有用物質生産は、すでに多くのものが工業化されており、日立製作所でも遺伝子組換え菌培養技術の開発<sup>1)</sup>とともに多種類の遺伝子組換え菌培養プラントを製作、納入してきた。しかし、微生物には高分子タンパク質の生産や糖鎖修飾の機能がないこと、もしくは限られているため、動物細胞によってだけ生産可能な有用物質も多く存在する。この動物細胞による物質生産の工業化を妨げている最大の理由は、生産性の低さにある。これは、以下の動物細胞培養特有の問題に起因する。

#### (1) 複雑な栄養要求性

動物細胞は成長、生存および分泌のために多くの栄養素を必要とし、さらに成長因子として血清を必要とするものが多い。血清は生産コストを引き上げるとともに、液中通気での発泡の原因物質となる。

#### (2) 物理的脆弱性

微生物や植物細胞のように細胞壁で覆われていないため、動物細胞はかくはんや液中通気によるダメージに弱い。

#### (3) 遅い成長速度

微生物の世代時間(増殖してもとの密度の2倍になるのに必要な時間)が数十分から数時間であるのに対し、動物細胞の世代時間は1日程度である。そのため、生産性の向上にはいったん増殖させた動物細胞の活性をできるだけ長く維持する必要がある。

#### (4) 代謝物毒性

動物細胞は乳酸やアンモニアをはじめ、各種の阻害物質を代謝する。これらはある一定以上の濃度に蓄積されると、生育阻害を示すため培地中から除去する必要がある。

#### (5) 低い生産能力

微生物に比べて細胞当たりの生産能力が非常に低い。大腸菌などの微生物では、プロモータの最適化などによって全可溶性タンパク質の40%に達する目的タンパク質を生産させることができる<sup>2)</sup>のに対し、動物細胞ではそこまでの人工的な生産能力の向上は達成されていない。

これらの問題に対して多くの対策が提案されている<sup>3)</sup>が、まだ完全に解決されてはいない。日立製作所はこれまでに実績のある微生物培養技術を基礎にして、動物細胞培養技術の開発を進めてきた<sup>4)~7)</sup>。今回、新技術を取り込んで浮遊性動物細胞の高生産性培養を目的とした高密度培養装置を開発した。本稿では、製品開発した装置の概要とそれを用いた実験結果について述べる。

### 2 高生産性培養

動物細胞培養による物質の生産性は、前述のような問題から微生物培養に比較して非常に低い。生産性向上のための手段としては大別すると生物学的手法と化学工学的手法がある。前者は細胞自身のタンパク質分泌能を向上させることであるが、各生産物に応じて個別に対応する必要があるため汎(はん)用性に欠ける。後者は培養技術の革新あるいは改良によって生産性を向上させるもので汎用性は高い。この培養技術の革新あるいは改良手段としては次のようなものがある。

#### 2.1 高密度化

細胞を高密度化することによる生産性の向上への効果としては、培養槽の小形化による装置コストおよび設置面積の低減があげられる<sup>3)</sup>。また高密度状態では、細胞の自己分泌物に

\* 日立製作所 笠戸工場 \*\* 日立製作所 機電事業部 \*\*\* 日立製作所 日立研究所 工学博士



含まれる増殖因子と阻害因子の影響も無視できなくなるため<sup>8)</sup>、各細胞ごとに高密度化による効果は異なる。ここで培養槽の小形化による効果は、局所的な細胞密度の向上ではなく培養槽内全体の容積効率の向上によって評価されなければならない。また、高密度状態でのスケールアップが容易であることも重要である。

この高密度化のためには、細胞の活性を維持するため酸素の供給を増大する必要がある。しかし、微生物培養で一般的に用いられている液中通気(スパージング)では、培地中の血清などのタンパク質成分による強い発泡のため、細胞を含む培養液が培養槽外に流出するという問題があった。また、消泡剤を培地中に添加した場合には、気泡が培地表面で消滅する際に細胞にダメージを与える<sup>9)</sup>ことが懸念された。

## 2.2 灌(かん)流培養<sup>※)</sup>

一時的な細胞の高密度化では、生産性の向上はそれほど期待できない。装置の不稼働時間や培養初期の立上りで、低細胞密度の時期が全体としての生産性を低下させるからである。したがって、高密度状態を長く維持する必要がある。これには、酸素供給速度の増加に加えて、栄養成分の供給と老廃物の除去を連続的に行う灌流培養が必要である。しかし、浮遊性動物細胞培養の場合は、老廃物の除去の際に細胞と培地を分離することが困難であった。

## 3 装置の構成と機能

### 3.1 要素技術

今回開発した装置で高生産性培養を達成するために以下の各要素技術を開発した。

#### (1) 消泡ネット

液中通気によって発生した泡は、そのままでは排気ノズルからあふれ出し、ベントフィルタの閉そくや雑菌汚染などの原因になる。培養槽内の気相部にシリコン系の物質で澆(はっ)水性処理を施した消泡ネットを設けることによって泡を破壊することができる<sup>5)</sup>。消泡ネットによる泡のあふれ出し防止効果を図1に示す。この消泡ネットによる破泡は機械的な破泡手段に比べて構造が簡単で、スペースをあまり必要としないという特長がある。この澆水性処理を施した消泡ネットは、一定量の泡を破壊した後に消泡ネット表面が親水性の膜で覆

※) 灌流培養(Perfusion Culture)：細胞を培養槽内に残したまま、新鮮培地の供給および使用済み培地の抜き出しを行う培養方法を言う。したがって、抜き出した培地中には基本的に細胞は含まれない。一方、新鮮培地の供給を行うとともに、培養槽から培地と細胞の混合液を抜き出す培養方法(Chemostat<sup>10)</sup>)を連続培養(Continuous Culture)ということもあるが、本稿での「連続」とはバッチ培養に対しての一般的な連続式(灌流培養も含む。)の意味である。

われるため破泡能力が消滅する。この消泡ネットの破泡能力の維持時間(寿命)と通気量の間には相関があり、その一例を図2に示す。

#### (2) 細胞分離膜

浮遊性細胞と培地の分離手段としては遠心分離、重力沈降、膜分離などの方法がある。この中で膜分離では、細胞やその内容物による膜の目詰まりの問題がある。そこで分離膜への細胞やその内容物の付着を防止するため、疎水性の分離膜を用いた。分離膜としてはフッ素系樹脂を多孔性膜に成形した



図1 消泡ネットの効果 液中通気によって発生した泡は消泡ネット(左側)によって破壊され、容器外へのあふれ出しを防止できる。

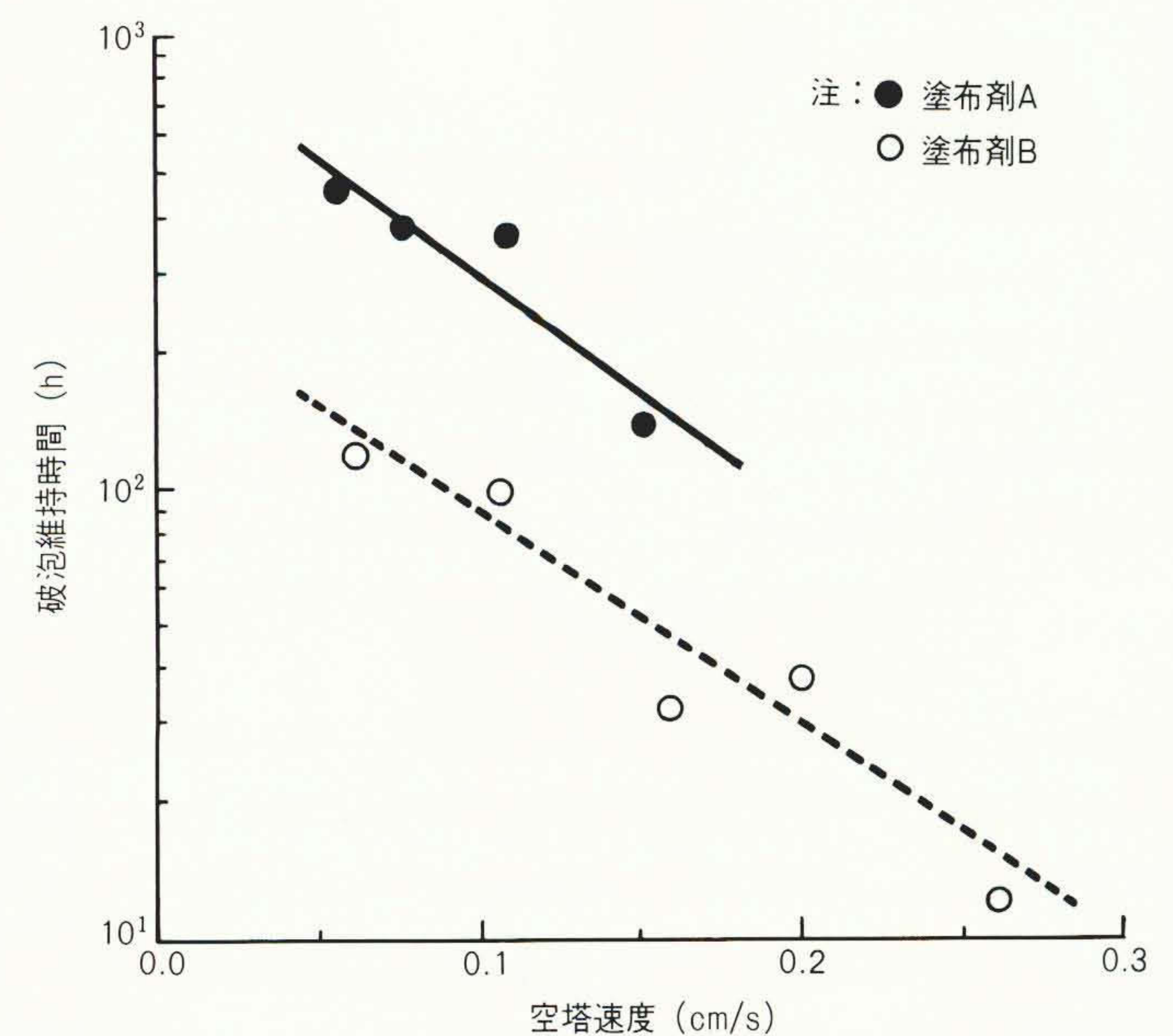


図2 消泡ネットの寿命 消泡ネットの破泡能力維持時間は、通気空塔速度の減少によって延長することができる。



ものを用い、これを容器に収めた細胞分離器を培養槽と別に設置して培地を循環させる方式とした。さらに、膜の目詰まりを防止するため、新鮮培地の供給は培地抜き出しラインから逆流させて行い膜の逆洗を兼ねた。

### (3) エアリフト

細胞へのダメージを低減するため、機械かくはんやポンプはできるだけ使用しないのが望ましい。今回の装置では前述したように液中通気が可能であるため、培養槽と細胞分離器間の外部循環型として、エアリフトによる培地循環と酸素供給を行った。

### (4) 自動滅菌、自動培養

操作の労力を軽減し誤操作を防止するため、生産用装置として自動滅菌および自動培養が可能なものを設計した。また、研究用装置としてオートクレーブ滅菌、必要最低限の制御装置を設けたものも別に設計した。

## 3.2 開発した製品装置の概要

前節で述べた各要素技術を適用して、高密度培養装置を製作した。その基本フローシートを図3に示す。培地調製槽で各成分および血清を混合した後、汙過滅菌を行い、培地貯槽で低温保持する。細胞分離器を経由しての培養槽への新鮮培地の供給と老廃物の除去は、所定の周期で交互に行う。培養槽から抜き出された生産物と老廃物を含む使用済み培地は、回収槽に送り込まれる。新鮮培地の供給と老廃物除去の周期

を設定することによって灌流率(一定時間内に培養槽内の培地が入れ替わる回数)を任意に選ぶことができる。細胞分離器下部および培養槽下部には、空気、酸素、窒素および二酸化炭素の混合ガスを導入し、発生した泡は培養槽上部の消泡ネットによって破壊する。細胞分離器下部からのガスは培地循環用、培養槽下部からのガスは酸素供給用である。したがって、それぞれのガスの流量を設定することにより、酸素供給量と培地循環量を独立に制御できる。これにより、不必要な酸素供給や培地循環を抑えることができ、細胞のダメージ軽減や消泡ネットの寿命延長が可能となる。

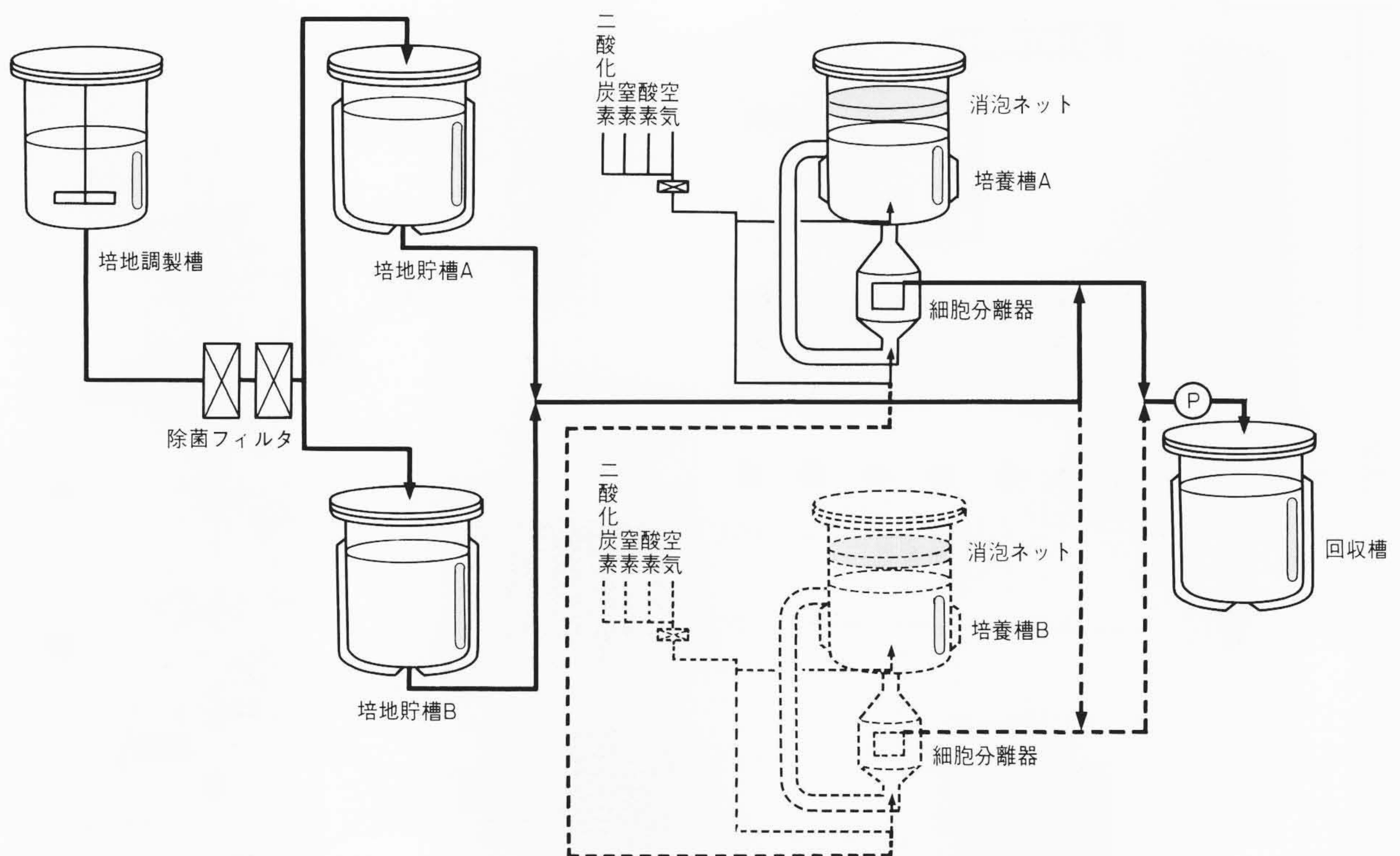
製品装置としては、研究用および生産用の2種類の装置を設計した。それぞれの装置の仕様を表1に示す。

### (1) 研究用装置

本方式に対する目的細胞の適合性を把握し、スケールアップデータを採取するための研究用装置を図4に示す。同図に示すように装置は培養槽本体と制御ユニットだけで構成されており、実験机上に設置できる寸法とした。培養槽および細胞分離器周辺の滅菌は、オートクレーブで行う。培養槽容量は1lとした。高密度化によって細胞密度が従来の10倍になった場合、本装置の1lは従来装置の10lに相当するわけであり、研究用としては十分な容量と判断した。

### (2) 生産用装置

パイロットスケールおよび生産用に対応した5l生産用装



注：-----は、今回の製作に含まれない範囲を示す。

図3 高密度動物細胞培養装置フローシート 新鮮培地供給と生産物回収が行われ、高密度で連続した培養が行われる。



表1 高密度動物細胞培養装置の仕様 研究用および生産用の2種類がある。

| 項 目   | 生 産 用 装 置 |         | 研 究 用 装 置   |         | 備 考   |
|-------|-----------|---------|-------------|---------|-------|
| 機器仕様  | 容量 (l)    | 材 質     | 容量 (l)      | 材 質     |       |
| 培地調製槽 | 30        | SUS316  | ――          | ――      | オプション |
| 培地貯槽A | 30        | SUS316  | 5           | ガラス     |       |
| 培地貯槽B | 30        | SUS316  | ――          | ――      | オプション |
| 培養槽A  | 5         | SUS316L | 1           | ガラス     |       |
| 培養槽B  | 5         | SUS316L | ――          | ――      | オプション |
| 回収槽   | 30        | SUS316  | 10          | ポリプロピレン |       |
| 制御仕様  |           |         |             |         |       |
| pH    | 指示調節記録    |         | 指示調節記録      |         |       |
| 溶存酸素  | 指示調節記録    |         | 指示調節記録      |         |       |
| 温 度   | 指示調節記録    |         | 指示調節記録      |         |       |
| 圧 力   | 指示調節記録    |         | ――          |         |       |
| 通 気 量 | 指 示       |         | 指 示         |         |       |
| 灌 流 量 | 自 動       |         | 自 動         |         |       |
| 滅 菌   | 自 動       |         | 手動(オートクレーブ) |         |       |

置の外観を図5に示す。本装置は培養槽のほかに培地調製槽、培地貯槽、回収槽などの周辺設備を含んでいる。この場合も細胞密度が従来の10倍になった場合、5 lで従来装置の50 lに相当する容量を持つことになり、このままでもパイロットプラントとして最小限の生産ができると判断した。培養槽容量

が5 l以上の場合でも装置構成は同様であり、大容量化に対応した設計が容易である。

4 培養実験

開発した装置の有用性を確認するため、5 l生産用装置を用

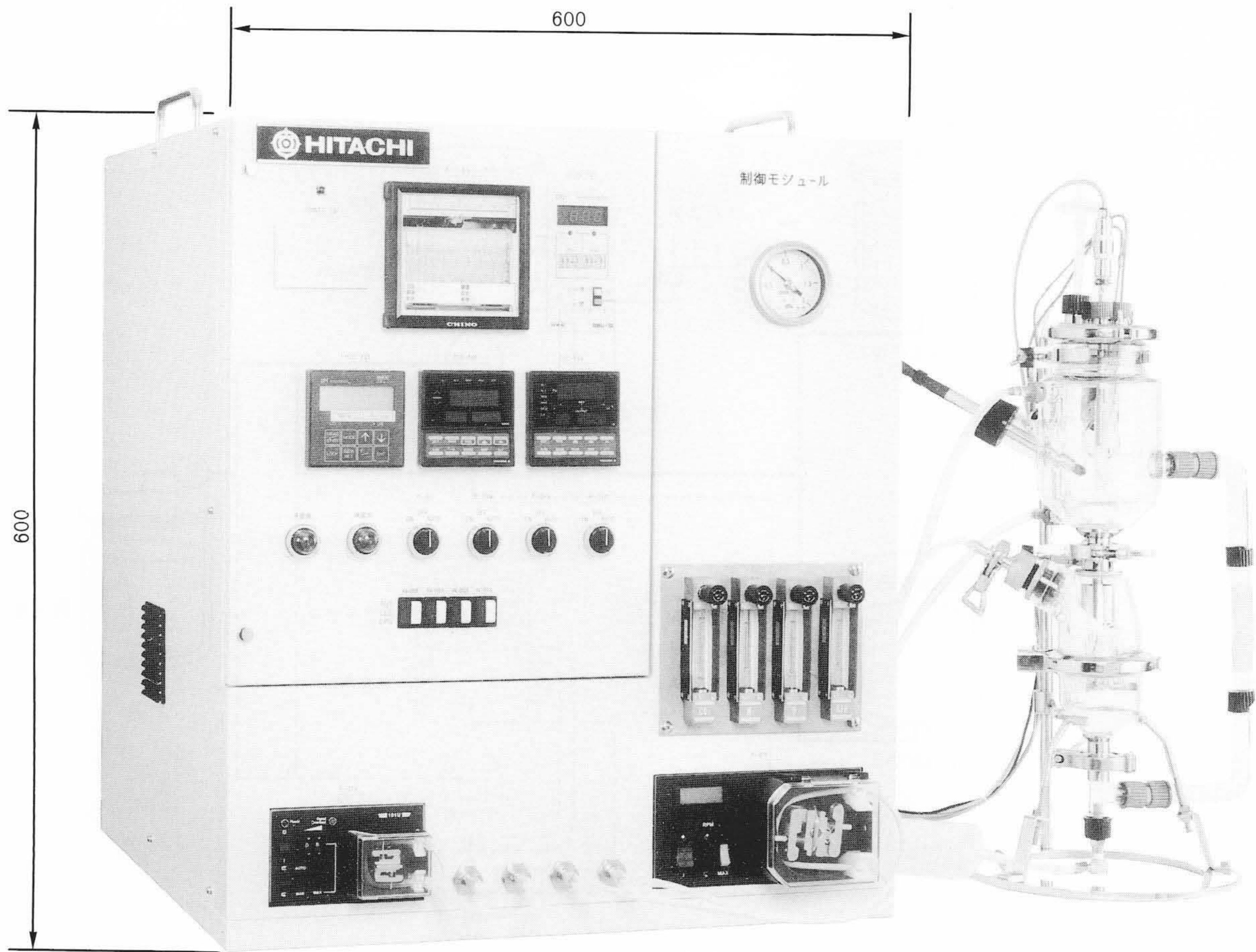


図4 研究用高密度動物細胞培養装置 1 培養槽本体と制御ユニットから構成され、滅菌はオートクレーブで行う。



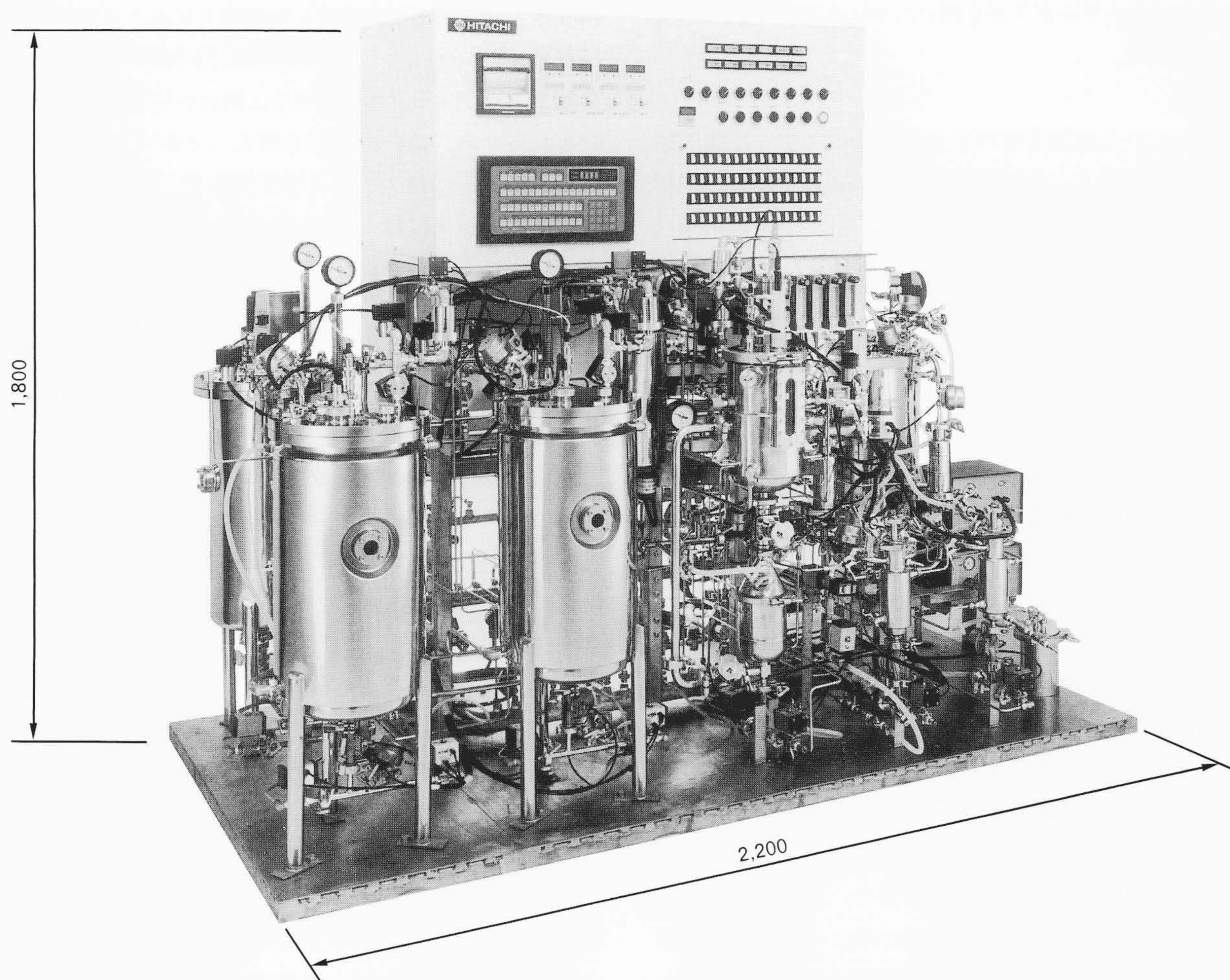


図5 生産用高密度動物細胞培養装置 5 l培養槽を中心として、自動インラインスチーム滅菌，自動培養が可能なシステム構成となっている。

いて培養実験を行った。

#### 4.1 実験方法

##### (1) 供試細胞

マウス—マウス ハイブリドーマ(STK1)

##### (2) 培地

D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)  
10%牛胎児血清

##### (3) 生産物

IgG (モノクローナル抗体)

##### (4) 滅菌操作

自動インラインスチーム滅菌

##### (5) DO (溶存酸素濃度) 制御

空気、酸素および窒素ガスの混合比によって定値制御

##### (6) pH制御

二酸化炭素の混合比によって定値制御

##### (7) 灌流量制御

液面センサによって1回の培地抜き出しおよび供給量を規定し、タイマで抜き出し、供給の周期を設定することによ

て灌流量を制御した。灌流量は細胞密度やグルコース濃度から判断して決定した。

##### (8) 細胞密度測定

培養中に1日1回程度の割合で培養液をサンプリングして、顕微鏡下で細胞計数を行った。サンプリング液にあらかじめトリパンブルーを加えて染色されないものを生細胞とし、染色されたものを死細胞として区別した。

##### (9) グルコース濃度測定

サンプリング液を1万r/min、5分間遠心した上澄みを酵素法によって測定した(グルコースC-テストワコー：和光純薬工業株式会社製)。

##### (10) IgG濃度測定

サンプリング液を1万r/min、5分間遠心した上澄みをELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) 法によって測定した(マウスIgG用ABCキット：フナコシ薬品株式会社製)。

#### 4.2 実験結果と考察

培養実験の結果は以下に述べるとおりである。なお、比較



のために500 mlローラボトルを用いたバッチ培養実験の結果も合わせて述べる。

### (1) 細胞密度

培養期間中の生細胞密度の変化を図6に示す。培養開始後13日で細胞密度は $1 \times 10^7$  cells/mlを突破し、最大 $4 \times 10^7$  cells/mlに達した。培養期間は27日を超えた。一方、500 mlローラボトルを用いたバッチ培養実験では、細胞密度は最大でも $2 \times 10^6$  cells/mlである。このように本装置の高酸素供給および灌流培養による効果によって20倍の細胞密度が得られた。

### (2) 培養期間

前項で述べたように500 mlローラボトル(バッチ培養)では、培養開始後8日目で細胞密度が低下し始めたために培養を中止せざるを得なかったのに対し、5 l生産用装置(灌流培養)では27日間細胞分離膜が目詰まりなく培養を継続することができた。このように灌流培養の効果によって培養期間を約3倍以上延長できた。培養終了時には消泡ネットの半分以上の部分が消泡能力を失っていた。

ハイブリドーマ細胞によるモノクローナル抗体生産の場合、1か月程度で細胞の抗体生産能力が低下することが多いとの報告<sup>11)</sup>もあり、前記の結果は実用上十分であると考ええる。さらに、長期間の連続培養が要求される場合や、細胞によって消泡ネットや細胞分離膜の寿命が1か月に満たない場合の対応として、消泡ネットの多層化と細胞分離膜の面積増大の組み合わせのほかに、先の図3に示したように培養槽部だけを2系列化して、細胞を含む培養液を交互に移し替えることによって培養期間を延長することができるよう計画している。

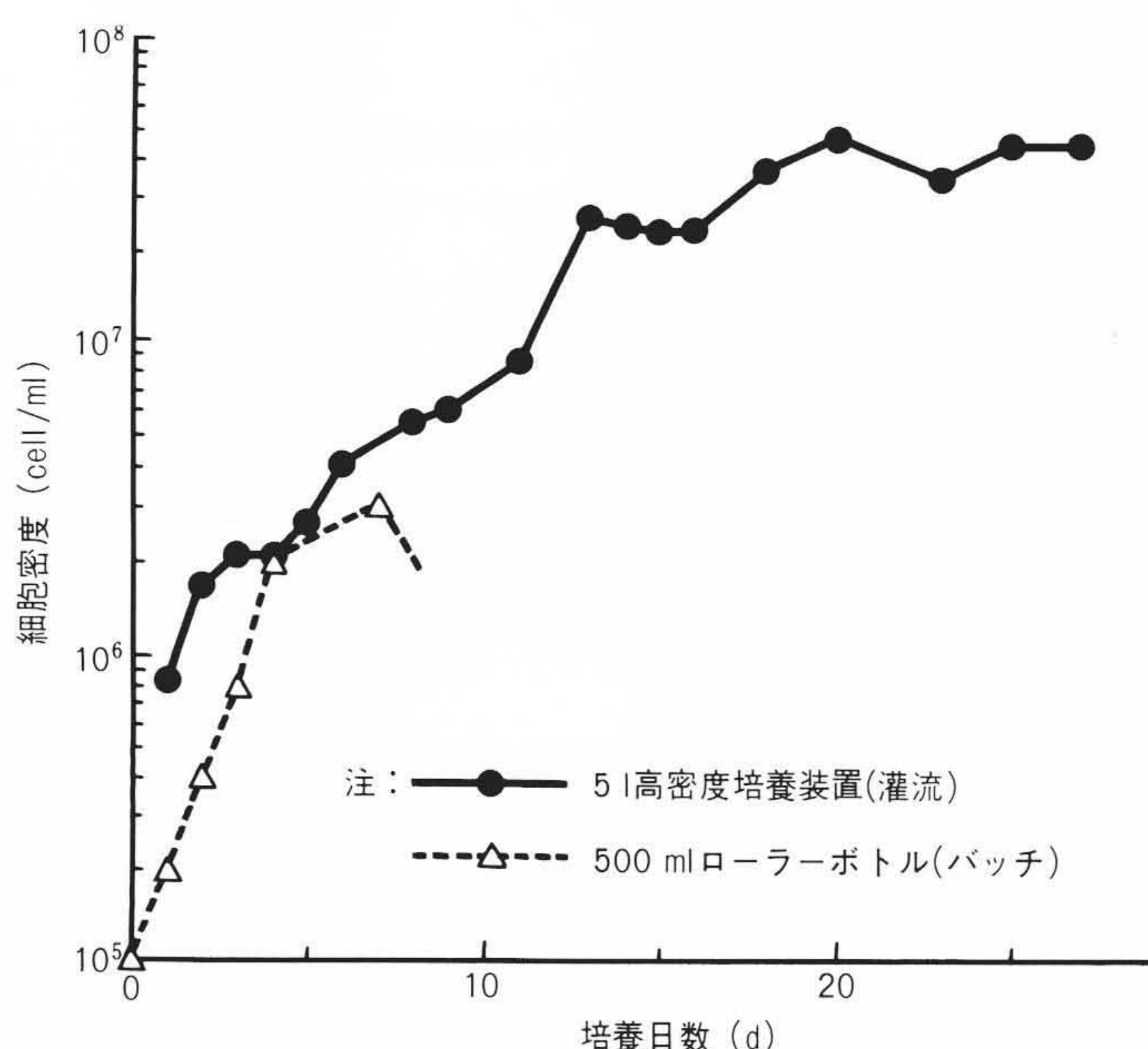


図6 生細胞密度の変化 5 l高密度培養装置では、 $4 \times 10^7$  cell/mlの細胞密度に達した。

培養槽A内で高密度に増殖した細胞を培地とともに滅菌済みの培養槽Bに移送し、その後培養槽A内の消泡ネットおよび細胞分離器を再生する。培養槽Bでは初めから高密度状態で培養が行われるため、高い生産性を得ることができる。培養中に細胞移送による切換えを行う要素実験で、移送に伴う細胞数や細胞活性の損失はほとんどないことを確認した。この培養槽2系列化による効果は、培養槽の休止中に消泡ネット、細胞分離膜に加えて各センサ類や培養槽内部の汚れも除去できることである。この場合でも、培養槽がかくはん機を持たず単純な形状をしていることが装置コストの上で有利に働く。

### (3) 灌流率

灌流培養の目的は、細胞への連続的な栄養成分の供給と老廃物の除去である。この効果をみるため、グルコースおよび乳酸の濃度の変化を図7に示す。5 l生産用装置(灌流培養)ではグルコース濃度は常に2 g/l以上を確保できており、乳酸濃度は逆に2 g/l以下に保つことができた。したがって、少なくともグルコース濃度または乳酸濃度は、細胞生育の制限要因になっていないと推定した。このような効果は、図8に示すように細胞密度の増加に合わせて灌流率を上げていったために得られたものである。

同図に示すように培養開始後4日目までは灌流を行わず、その後細胞密度とグルコース濃度から判断して灌流率を段階的に上げていった。最終的には灌流率は4.8回/dとなり、1日に24 lの新鮮培地を消費しながら、同量の使用済み培地を回収した。本実験では灌流率の最適化は行っていないが、生産プロセスへの応用にあたっては灌流率を最適化することによって使用培地当たりの収量をさらに向上させることができるも

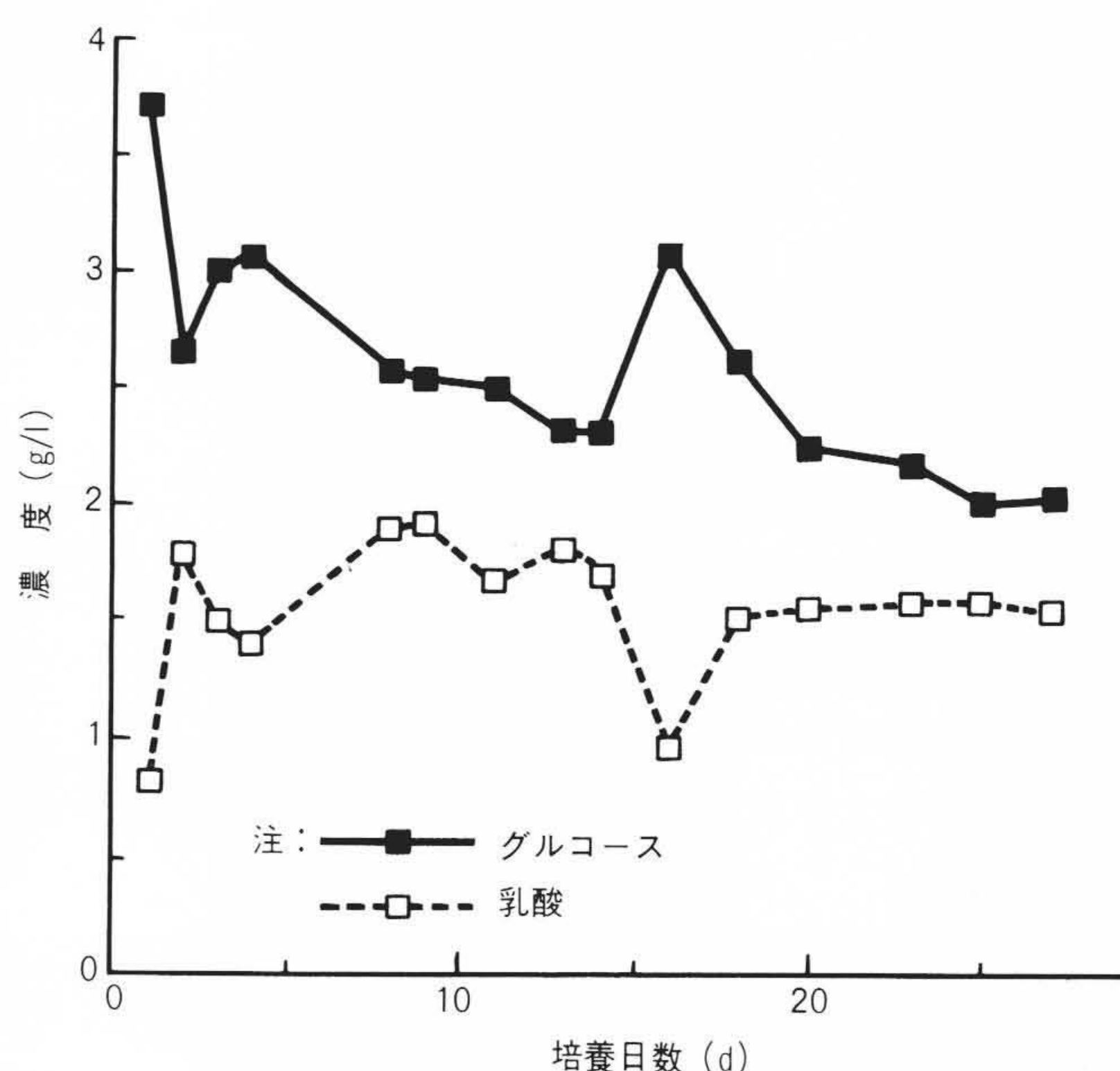


図7 グルコース、乳酸濃度の変化 灌流培養の効果により、グルコースおよび乳酸ともにほぼ一定の濃度に保つことができた。



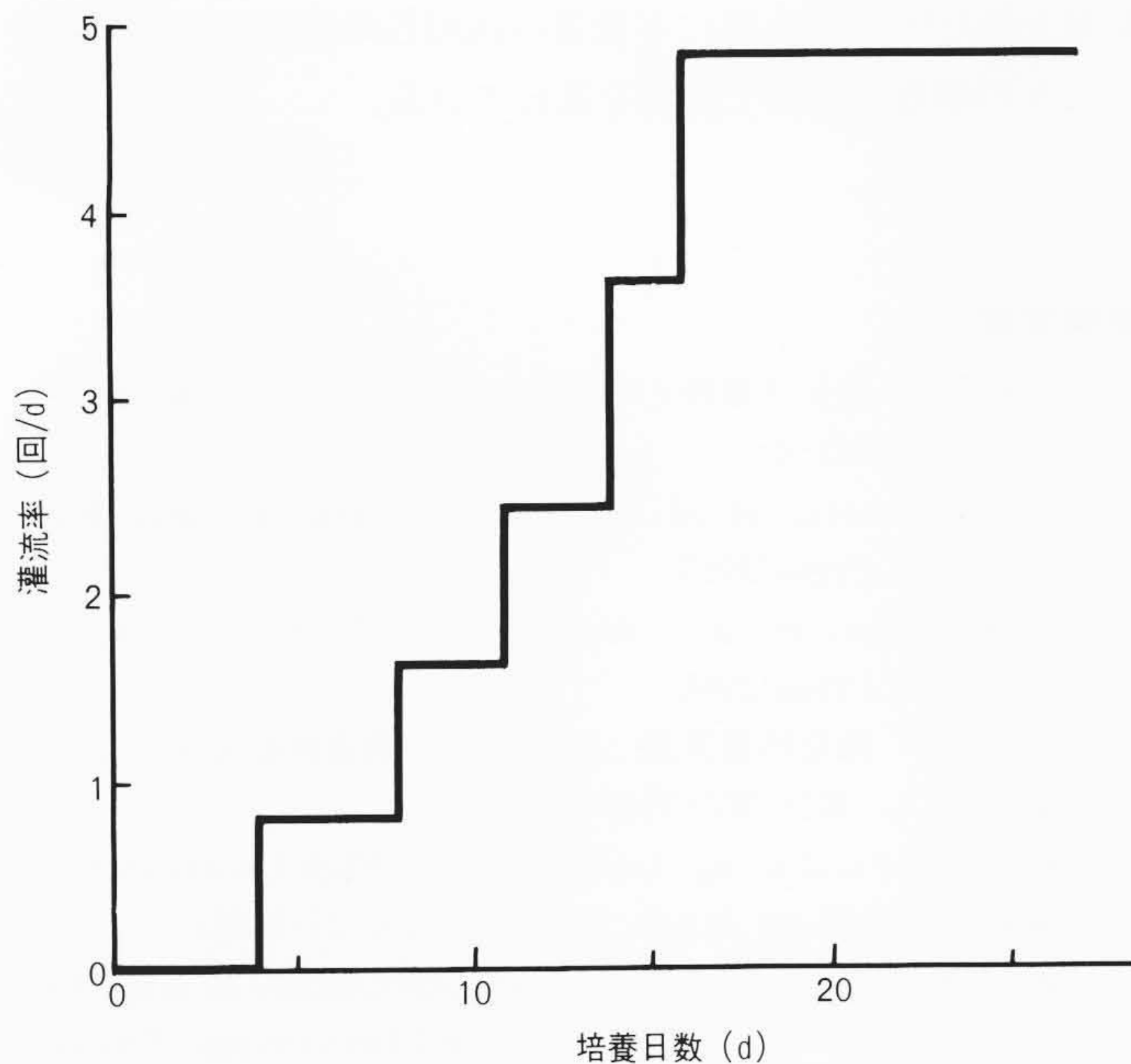


図8 灌流率 細胞密度の増加に合わせて灌流率を上げていった。

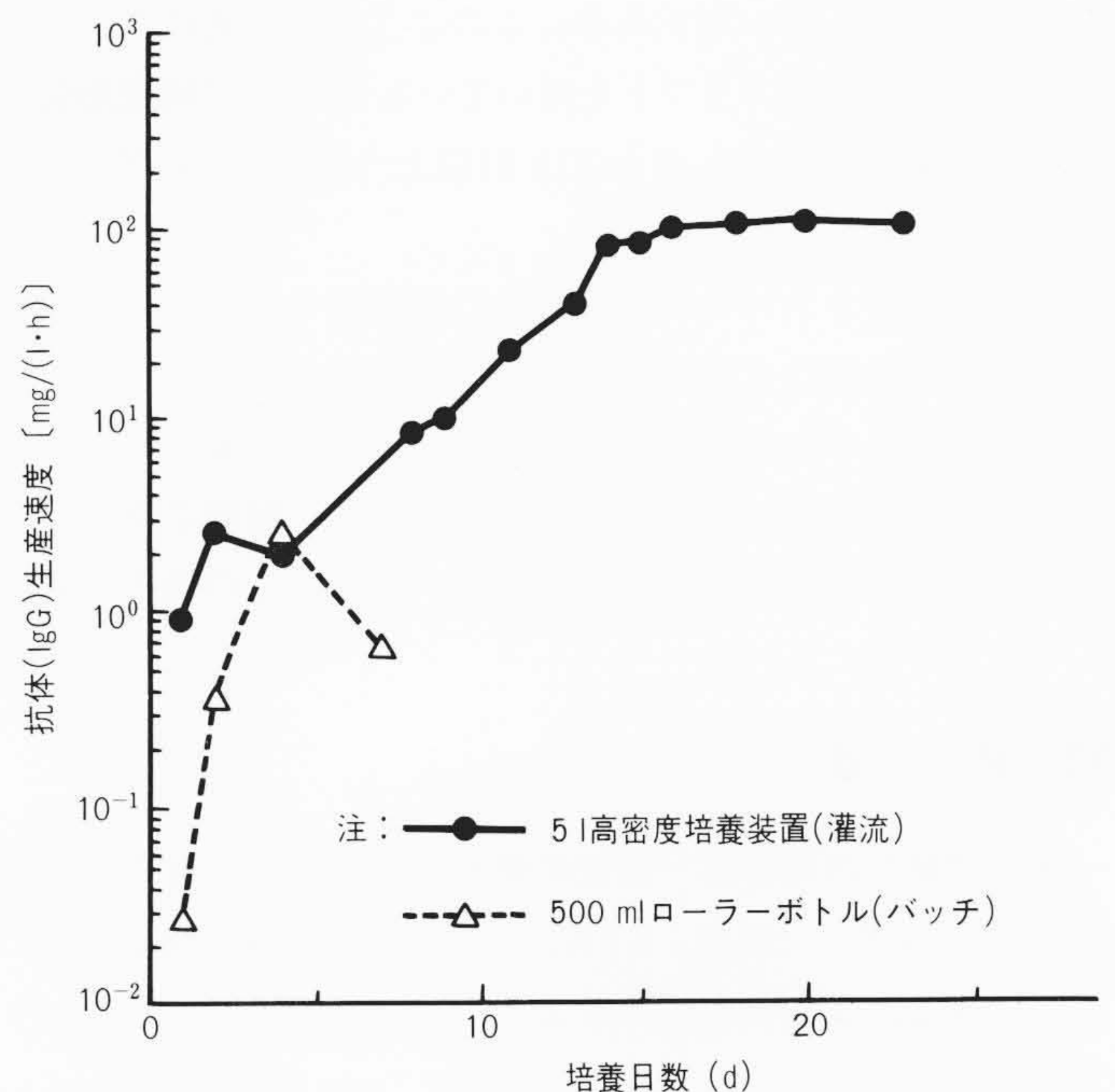


図9 培養槽容積当たりの抗体生産速度 高密度化の効果により、バッチ培養の50倍近い抗体生産速度を得た。

のと思われる。

#### (4) 抗体生産性

高密度、連続(灌流)培養の最終的な目的は、高い生産性を得ることである。この高生産性の指標として、培養槽単位容積当たりの抗体生産速度を求めた結果を図9に示す。抗体生産速度も細胞密度と同様の傾向を示し、5 l生産用装置(灌流培養)では培養開始後14日目で100 mg/(l·h)近くに達し、その後安定した抗体生産速度を示した。一方、500 mlローラーボトル(バッチ培養)では最大でも1.5 mg/(l·h)止まりであり、培養開始後5日目以降は抗体生産速度が低下していった。このことから、今回開発した装置は小さな容量で大量の生産物を生産できることがわかる。その上、500 mlローラーボトル(バッチ培養)の生産速度はピーク値であるのに対し、5 l生産用装置(灌流培養)では一定期間安定して生産し続けているわけであり、生産性の相違は非常に大きい。このことから、今回開発した装置が生産コストの低減に大きく貢献できると考える。

細胞当たりの抗体生産速度でも、図10に示すように500 mlローラーボトル(バッチ培養)の2倍以上の値を得た。これは細胞に供給される培地の量がバッチ培養と灌流培養とは異なるためと推定され、灌流培養では細胞を有効に利用していると言える。

#### (5) スケールアップ

以上の実験結果は5 lのスケールで行ったものである。動物細胞培養による有用物質生産を工業規模で行う場合にはスケールアップが容易でなければならない。スケールアップの際にはほとんどの場合酸素供給が律速となるが、本方式で用いたエアリフト方式では、スケールアップによる液深の増加が

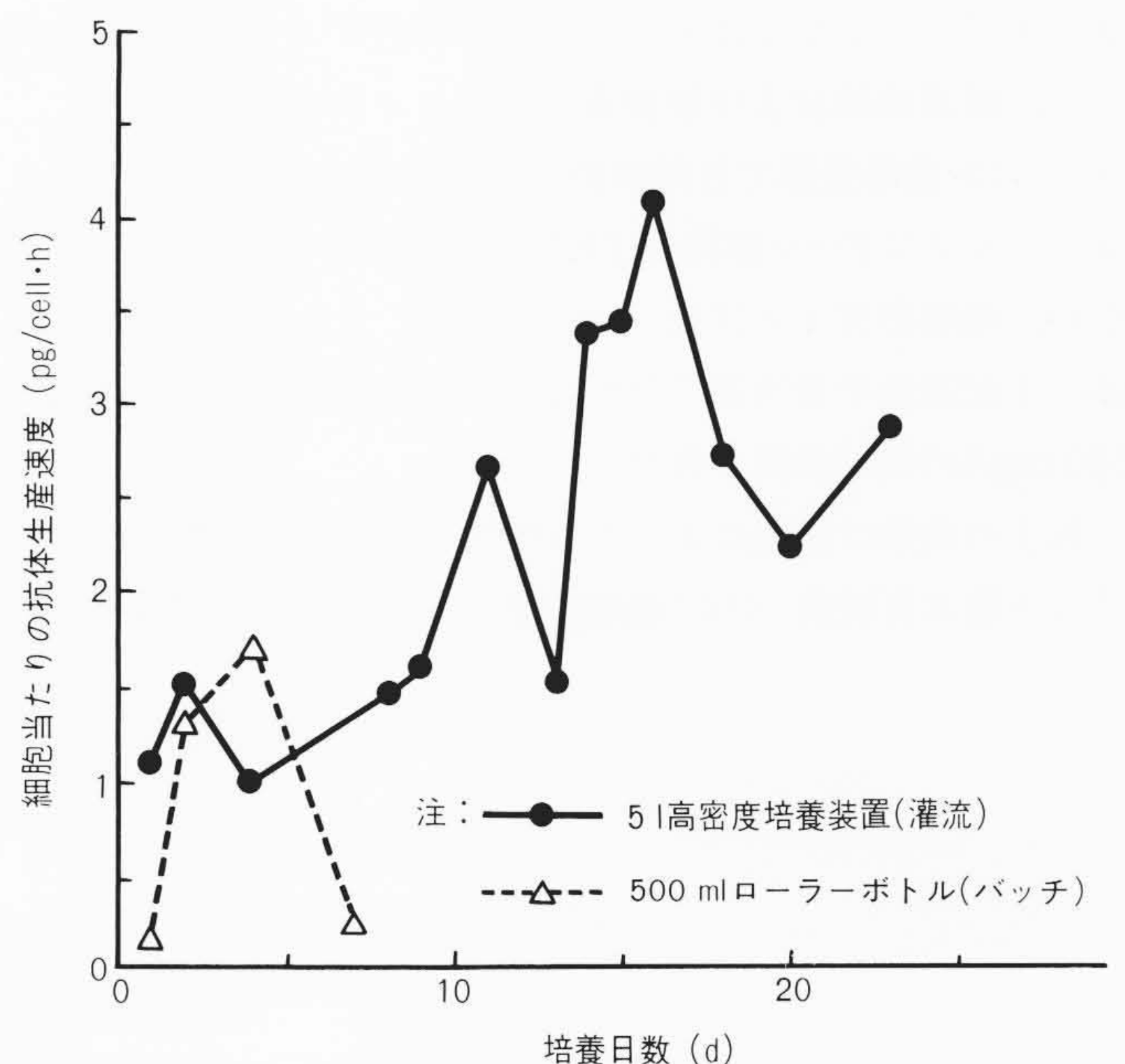


図10 細胞当たりの抗体生産速度 灌流によって新鮮培地を供給したため、細胞当たりの抗体生産速度もバッチ培養を上回った。

酸素供給のための気液接触時間の増加につながるため、有利にスケールアップができる。また、機械かくはんの場合には単位容積当たりの動力を一定に保ってスケールアップを行った場合、かくはん翼の周速度が大きくなり、それに伴うせん断力の増加による細胞へのダメージが問題となるが、エアリフトでは気泡が液中を上昇する際に与えるせん断力は気泡の上昇速度によって決定され、この気泡の上昇速度は培養槽の



スケールによらず一定である。このように本方式はスケールアップ上有利なエアリフトを用いているため、1 l研究用装置から5 l生産用装置へ、さらには5 l以上へのスケールアップの性能予測が容易に行える。

動物細胞を $1 \times 10^7$  cell/ml以上の高密度で、しかも大容量で培養する技術はまだ生産用として確立されていない。この技術が工業化されるためには、構造の単純な装置がコストや信頼性の上で重要である。本方式は機械的可動部を持たないことや容積効率の高いタンク培養という点でこの条件を満たしていると言える。

## 5 結 言

今回開発した高密度・灌流培養装置によって浮遊性動物細胞(ハイブリドーマ細胞: STK1)の高生産性培養を達成することができた。これらの結果をまとめると以下に述べるとおりである。

- (1) 消泡ネットを用いて、液中通気によって発生する泡を効果的に破壊できた。
- (2) 疎水性の細胞分離膜によって目詰まりを防止しながら、培養液中から培地だけを抜き出すことができた。
- (3) エアリフトかくはんによって細胞のダメージを軽減しながら、酸素供給および液循環を行うことができた。
- (4) 5 l生産用装置で自動滅菌、自動培養を可能にした。
- (5) ハイブリドーマ細胞(STK1)を用いて27日間の連続培養を行い、細胞密度 $4 \times 10^7$  cell/mlを達成した。
- (6) 上記連続培養実験で100 mg/l・hのIgG生産速度、および500 mg/lの抗体濃度を得た。

以上の効果は細胞によって当然異なることが予想されるが、ラット腹水肝臓癌(がん)細胞由来の細胞(JTC-1)でも同様の

結果を得た<sup>6),7)</sup>。さらに、本装置の汎用性確認のため、代表的なほかの細胞について実験を重ねている。

## 参考文献

- 1) 清水, 外: 遺伝子組換え菌の培養システム, 日立評論, 69, 4, 295~300(昭62-4)
- 2) M. Rosenberg, et al.: Methods in Enzymology, 101, Academic Press(1983)
- 3) R. E. Spier, et al.: Animal Cell Biotechnology, 3, Academic Press(1988)
- 4) 石橋, 外: 細胞培養装置における新しい酸素供給方法, 日立評論, 69, 4, 301~305(昭62-4)
- 5) System for Culturing Animal Cells in High Concentration, New Technology Japan, JETRO, 16, 25(1988)
- 6) M. Ishida, et al.: Mammalian Cell Culture in High Cell Concentration by Gas Sparging and Defoaming, Proceedings of the Second Annual Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Tsukuba, Japan (1989)
- 7) 石田, 外: 液中通気による動物細胞の培養方法, 化学と工業, 42, 1039~1041(1989)
- 8) T. C. Dodge, et al.: Loss of Viability in Hybridoma Cell Culture—a Kinetic Study, Enzyme Microb. Technol., 9, 607~611(1987)
- 9) A. Handa-Corrigan, et al.: Effect of Gas-Liquid Interfaces on the Growth of Suspended Mammalian Cells: Mechanisms of Cell Damage by Bubbles, Enzyme Microb. Technol., 11, 230~235(1988)
- 10) J. E. Bailey, et al.: Biochemical Engineering Fundamentals, Second Edition, McGraw-Hill(1986)
- 11) K. K. Frame, et al.: The Loss of Antibody Productivity in Continuous Culture of Hybridoma Cells, Biotechnol. Bioeng., 35, 469~476(1989)