

細胞大量培養技術

Large Scale Cultivation of Mammalian Cells

藤 吉 宣 男*

Nobuo Fujiyoshi

動物細胞大量培養技術は今までワクチン用ウイルスを増やすための手段として用いられてきた。しかしながら、動物細胞は、インターフェロン、リンフォカイン、抗原、抗体、酵素、ホルモン、細胞増殖因子などを産生しており、これらの中には学問的にも臨床的にも重要な生理活性物質が含まれている。従来、これらのものは、臓器または血液からしか採ることができなかったが、これら生理活性物質を生産する手段として動物細胞培養技術が注目を集めてきた。ワクチンは動物細胞によって作られた中では大きな市場であり、動物ワクチンとしては口蹄疫、ヒトワクチンとしてはポリオ、風疹、狂犬病、麻疹、脳炎などが作られている。¹⁾ インターフェロンは風邪やある種のがんに対するの応用、モノクローナル抗体は診断・治療・物質精製面への応用が期待されている。口蹄疫ワクチンの生産²⁾ インターフェロンの生産³⁾ モノクローナル抗体の生産⁴⁾ においては、それぞれ2,000 l, 8,000 l, 1,000 lという工業的規模で培養されている。

1. 細胞大量培養の必要性

動物細胞によって産生される蛋白性生理活性物質の量は、きわめて少なく比活性の高いものが大部分である。ホルモンの場合で0.1~50ng/10⁶ cells/日であり、酵素の場合でも0.1μg程度である。このような物質を大量生産する方法としては、動物細胞を大量に培養し直接その物質を単離する方法と遺伝子工学によって微生物に大量に作らせる方法とがある。大腸菌を中心とする微生物を用いた物質生産は、生産性において有利であるが、いくつかの問題が指摘され始めた。たとえば糖鎖が蛋白質と結合し、それが物質の活性・安定性に重要な役割を果している場合、蛋白質の三次元構造の正しい保持が必要な場合などがある(表1)。そのような場合、動物細胞できればヒト細胞を大量に培養し

表1 Problems of Genetically Engineered Bacteria

Carbohydrate-free proteins.
Intracellular location
Diffrent steric configuration
Plasmid instability
Pharge
Proteolytic inactivation
Bacterial proteins
Toxins
Post translational modification
Plasmid stability
Biological activity

て採取せざるを得ない。動物細胞を微生物と比べた場合の欠点としては生育速度が遅いこと、培地が高価なこと、生産性が低いことなどがあげられる。今まで生産性向上のために、pH・O₂・温度・培地などによる細胞生育環境の至適化、ホルモン・増殖因子・代謝制御・ウイルスによる誘発や生産能の増大、灌流培養による細胞収量の増大などがなされてきた。動物細胞培養による物質生産は今後、高密度維持培養法の開発、無血清培地の開発、組換え動物細胞株の使用などにより十分対処できるであろう。

ヒト細胞由来の新規生理活性物質の遺伝子を効率よく取出して塩基性配列を調べるためにも先ず動物細胞培養が必要であり、上述のように動物細胞による物質生産においても動物細胞大量培養技術の重要性はますます高まりつつあるといえる。

2. 動物細胞培養技術

動物細胞大量培養は、基本的には微生物大量培養技術が応用できるものの、動物細胞は微生物より大きくて剪断力に弱く、栄養要求性が複雑であり、血清あるいは増殖因子依存性があるため多くの工夫が必要となってくる。

* 協和発酵工業(株)東京研究所主任研究員(農学博士)

〒194 東京都町田市旭町3-6-6

動物細胞の生育様式は二つのタイプに分けることができる。大部分の細胞は固体表面に付着して単層状に生育する。一方、血液やリンパ組織に起源をもつ細胞、ハイブリドーマ細胞、いくつかのがん細胞やトランスフォームした細胞の場合は浮遊した状態で生育することができる。浮遊細胞の方が大量培養は容易である。van Wezel⁵⁾ や Levine⁶⁾ によってマイクロキャリアが開発されたことにより壁付着性細胞も浮遊細胞培養と類似の方法で大量培養ができるようになった。

動物細胞の大量培養を試みる場合、そのモデルとして理想的条件があるとすれば、それは生体そのものと

いうことになる。大量培養に際しては培地、pH、溶存酸素、攪拌と剪断力、老廃物の除去などを考慮する必要がある。詳細は成書^{7,8)}を参照していただくとして、ここでは無血清培地と高密度培養化についてとりあげてみる。

2.1 無血清培地の開発

動物細胞の培地としてはアミノ酸、ビタミン、無機塩類および糖などから成る基礎培地のほか万能薬として動物の血清が5～10%加えられている。血清の役割としてはホルモン、増殖因子、微量栄養素、微量金属イオンの供給、接着因子やトリプシンインヒビターの

表2 Commercially Available Serum-free Medium and Serum Replacements

Manufacture		Supplements	Serum or Albumin	Additive protein content (mg/ℓ)
Nu-serum	Collaborative Res. Lab.	Insulin, Transferrin, EGF ECGF, Progesteron, Teststerone Hydrocortisone, Estradiol Phosphoroethanolamine, T ₃ Selenium	FCS (2.5%)	1,347
HB 101	Hana Media	Insulin, Transferrin, Ethanolamine, Asparagine	BSA	765
HB 201	"	"	BSA	120
HB 301	"	"	BSA	25
HB 102	"	Insulin, Transferrin Ethanolamine, Selenium Ethanolamine, Selenium Mercaptoethanol, LDL Oleic acid		
HB 103	"	Transferrin	HSA	700
SerXtend	"	Insulin, Transferrin, EGF FGF, Hydrocortisone, T ₃ Ethanolamine, Selenium Mitogenic GF	BSA	2,308
HL-1	Ventrex Lab.	Insulin, Transferrin Teststerone, Selenium Ethanolamine, Fatty acids		<30
Nutridoma	Boehringer Manheim		HSA	46
KC 2000	KC Biological	Transferrin, Fetuin Fatty acids	BSA	250
Nutricyte	J. Brooks Lab.	(9 components)		40
Serumless	GIBCO	Insulin	LA	2,000
Ultrosor G	LKB	Insulin	BSA	860
Nutriclone	Techniclone			

* protein content of FCS 10%—4300 mg/L

含有、緩衝作用、保護作用などをあげることができる。無血清培地の開発に際しては、これらの点を考慮すればよい。G.Satoらによって提唱された方法⁹⁾すなわち血清を増殖因子やホルモンの組合せで置換するという方法が多くの研究機関で応用されている。現在市販されている血清代替培地(表2)の多くは、血清成分である血清アルブミン(BSA)を含んでおり完全な無血清培地とは言い難い。それでも血清含有培地と比べると蛋白含量が少ないということで使用されている。無血清培地の必要性は培養目的によって異なってくる。たんに細胞を採るのであれば、chemically definedでなくても安価であればよい。精製を容易にするためであれば、無血清が望ましいが、BSAが入っていても、また少量の血清を加えてもよいであろう。しかし、コンディションドメディウム中より生理活性物質を単離するためには、chemically definedが必須となる。動物細胞が産生する生理活性物質はきわめて微量であり、そのため現状の血清含有培地からの採取では血清由来の異種蛋白が混入し分離精製を困難にしている。現在、無血清培養が可能とされている多くの細胞はインシュリン、トランスフェリン、セレンウムを要求しているけれども、それらの既知増殖因子の組合せだけでは血清と同等の効果を示すには不十分な場合が多い。そのため新規な細胞増殖促進物質を探索する必要がある。無蛋白培地で生育できる細胞株はautocrineな増殖因子を産生し利用して生育していると考えられる。事実、筆者らは、白血病由来無蛋白培地生育株の培養液中から汎用性ある因子を見出している¹⁰⁾これらが無血清培地の改良に結び付くかも知れない。今後は、このような新規細胞増殖因子の探索、微量金属イオンの再検討、生育阻害物質除去剤の検討が行われ、最終的にはオートクレーグ可能で且つ低コストの無血清培地が開発されるであろう。

2.2 高密度培養化

動物細胞の大量培養の目的は、できるだけ大量の細胞を得ること、目的とする生理活性物質を含有するコンディションドメディウムを得ることである。細胞濃度と生理活性物質の産生は、ある程度相関していると考えられるので高密度な細胞が得られるような培養システム・装置を考えて生産効率の向上をめざす必要がある。高密度化が可能となればタンク建設費の節減はもちろんのこと、生育速度が遅いことによる雑菌汚染の機会も少なくなる。

通常の培養法では、細胞の単位培養液当りの密度が

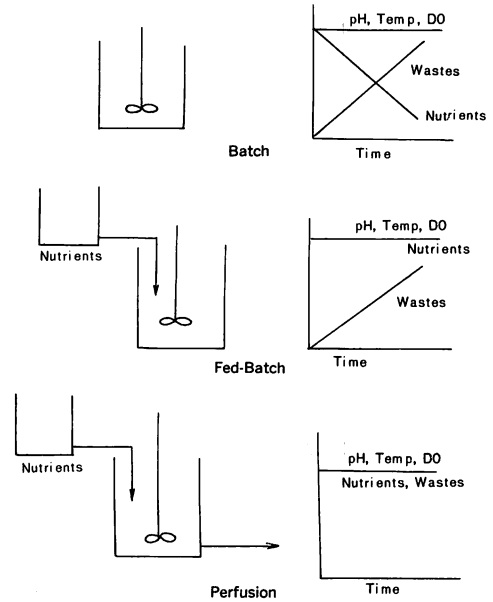


図-1 Environmental characteristics of batch, fed-batch, and perfusion cultures. (Glacken, M. W. et al., 1983)³⁾

生体に比べて小さい。細胞高密度培養の制限因子としては生育阻害物質の蓄積、必須栄養源の枯渇、溶存酸素の枯渇、急激なpHの低下などをあげることができる。細胞生育阻害物質を除去し新鮮な培養液を補給することにより高い細胞密度が得られる^{11,12)}そこで、連続的に生育阻害物質を系外に排出し新しい培養液を系内に導入する方式が当然考えられてくる。この方式は灌流培養システム(Perfusion)と呼ばれ、生体内細胞の血液循環システムにより近い状態といえる。灌流連続培養の長所を図-1、表3に示す。各種の培養装置を用いて灌流培養を行って高密度な細胞が得られている(表4)。細胞を固定化する方法で高密度な細胞が得られて

表3 Comparison of Costs of Batch vs. Continuous Process of production of Mammalian Cells

	Batch	Continuous
Fermentor volume (ℓ)	10	10
Maximum cell population(x10 ⁹ /ml)	1.4	10
Day of first harvest	2 - 3	5 - 6
Number of harvest days	11	8
Total cells harvested(x10 ⁹)	38.5	800
Grams cell yield/week(g)	22.5	467
Total serum used (ℓ)	6.5	12
Cost of serum-free medium (\$)	85.41	157.68
Cost of serum (\$)	52.00	96.00
Total medium cost (\$)	137.41	253.68
Cost/grams of cells(\$)	6.11	0.54

(W. F. McLimans, 1979)¹⁴⁾

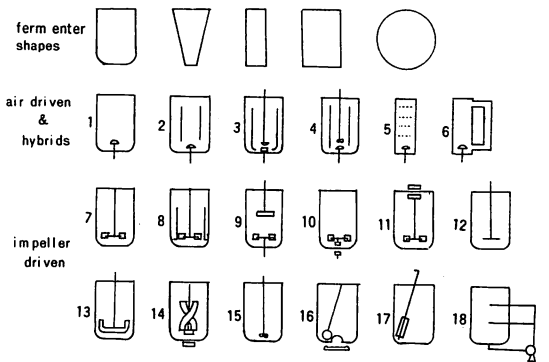
表4 Suspension Culture Systems

system	method	cell yield/ml
Stirred reactor	Medium change or Continuous flow	5×10^6
Airlift	"	5×10^6
Spin filter	Perfusion	7×10^6
Cone sedimentation	"	1×10^7
Encapsulation	"	1×10^7
Membroferm	"	2×10^7
Fibre entrapment	"	1×10^8
Acusyst - P	"	1×10^8

いるものの、これらはスケールアップに難があり、スケールアップが容易な型での高密度化が望まれている。

3. 細胞培養法および装置

培養においては、図-2に示すような培養槽、攪拌方式が考えられるが、スケールアップが容易なこと、プロセス制御が簡単で培養経過がモニターできること、均一性ある培養、高密度化ができることが必要である。壁付着性細胞に対しては、さらに培養容積に対する表面積が大きいこと、トランスファーが容易であること、基質の再使用性などが要求されてくる。壁付着性細胞の場合は、培養表面積/容積 (Surface to Volume : S/V) の増大がポイントであり、これまでS/Vを上げるために種々の工夫がなされてきた (図-3)。それらの



(M. W. Fowler and R. E. Spier, 1985)¹⁵⁾

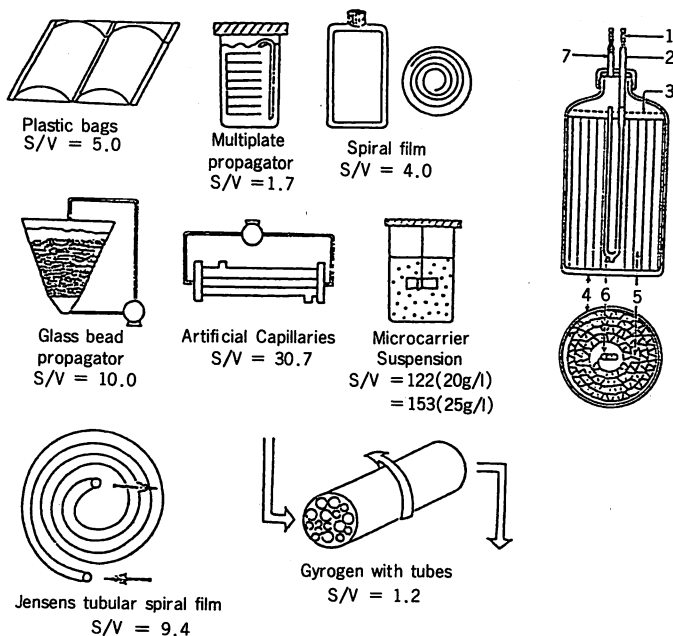
図-2 Bioreactor Conformations

うち、代表的な三つのシステムを比較してみると表5のようになり、高密度化において細胞の固定化、スケ

表5 Comparison of Unit Culture Systems for Anchorage Dependent Cells

	Roller culture	Imobilized fibers	Microcarrier culture
High cell density	-	++++	+++
Scale up potential	-	+	+++
Simple process control	-	++	-
Change area:volume ratio	+++	++	++++
Monitor culture	++	-	++++
Homogeneity	-	-	+++
Re-utilizable substrate	-	(-)	-
Surface area (cm ² /ℓ medium)	3,750	40,000	69,000*
Cell density (10 ⁶ cells/ℓ medium)	1.0	100.0	7.0

* bead 15g/L



Surface-to-volume ratios (cm⁻¹) of various methods to culrue anchorage dependent cells. Glacken, M. W. et al., 1983

図-3 壁付着性細胞培養装置

ールアップの点ではマイクロキャリアが優れている。

3.1 細胞固定化培養法

細胞を固定化して培養する方法がいくつか報告されている。培養液中に懸濁され、ゆるやかに攪拌されているマイクロビーズ上に壁付着性細胞を単層状に生育マイクロキャリア培養法¹⁶⁾がある。ビーズは電荷が少なく、比重 1.03、大きさ 200 μ で吸着性の少ないものがいくつか市販されている。¹⁷⁾逆に動物細胞をビーズ内に封入して培養するマイクロカプセル培養法¹⁸⁾もある。動物細胞をアルギン酸ナトリウムのゲル内に包括し、その囲りにポリ-L-リジンの半透過性膜を形成させる。培養液中の栄養物質は自由にカプセル内外を流れるが、カプセル内の細胞によって産生された高分子物質はカプセル内に蓄積されていく。アルギン酸ナトリウム、アガロース、ゼラチンゲルに包括するゲルトラップ培養法¹⁹⁾は産生物質、細胞は培養液中に流出してくる。この場合は連続培養も可能となる。内径 200 μ の中空繊維上に細胞を生育させるホローファイバー培養法^{20,21)}もある。ファイバーの中に栄養物質を、外に炭酸ガスや空気を送って培養する方法であり、かなりの高密度細胞が得られている。またホローファイバーの代わりにセラミック担体に細胞を固定化する培養法²²⁾も報告されている。細胞培養の基質として、より生体の条件に近いコラーゲンゲル上に培養したのち、ゲルを容器から剥離して浮遊させる浮遊コラーゲンゲル培養法²³⁾の場合、剥離したゲルは徐々に収縮して細胞は *in vivo* に近い円柱状に変化する。分化機能を維持させる培養法として有効であろう。

3.2 通気攪拌培養法

この方法は微生物大量培養技術を基盤に確立されてきた。Actonら²⁴⁾は大量培養システムを確立し、種々のリンパ系細胞での培養を試みた。種細胞は、再現性を期すために同一の凍結保存細胞を用い、順次培養規模を拡大していく。ファメンタにはマリブレイド型インペラーを用い、CO₂、O₂、N₂、Airなどで溶存酸素を制御している。現在、この方法で 8kl の規模で実施されている³⁾この方式での細胞到達密度は 2~3 $\times 10^6$ cells/ml 程度であり、半回分培養操作により細胞を入手する方向で検討が進められている。浮遊細胞の培養では、剪断力の減少も一つのポイントであり、インペラーによる剪断の影響を少なくするため Air によって攪拌する気泡塔を採用しているところもある。この方式でも 1kl のスケールで実施されている。⁴⁾

3.3 灌流培養法

高密度に細胞を培養するためには前述したように灌流培養システムが考えられる。最初は 1965 年 Himme-lfarbらによってスピンフィルターとして報告された。²⁵⁾これを発展させて Monsanto 社は 44 l の中規模培養システムを開発した。²⁶⁾彼らは、1~2 μ 穴の垂直状のポールセラインフィルターを用い、目詰りを防ぐためモノフィラメント布を併用した。筆者ら²⁶⁾は、動物細胞が比較的大きく、比重も大きい点に注目し、細胞沈澱管を利用した灌流培養システム (cone sedimentation) を考案し、ナマルバ細胞を 1 $\times 10^7$ cells/ml まで高密度化することができた。

3.4 灌流培養の今後

灌流培養によって細胞は 10⁷ cells/ml に到達するが、高密度になればなるほど生育阻害物質の蓄積は当然多くなり灌流のみでは生育阻害物質の除去は完全でなく、効率的な除去装置を併用した灌流培養システムを開発していく必要がある。とくにアンモニアの濃度は 4mM 以上になると生育阻害が生じる。Holleyら²⁷⁾は 2mM のアンモニアと 11mM の乳酸を加えると細胞の増殖は 30% に減少し、血清濃度が低い場合には、その阻害はより顕著になることを報告している。筆者ら¹⁰⁾は、透析培養することによりアンモニア濃度を 2 mM 以下に保ち、ナマルバ細胞を 3 $\times 10^7$ cells/ml まで高密度化することができ、また培地中のグルタミン濃度を制限することによってアンモニア濃度を低減できることを報告した¹⁰⁾。今後、蓄積老廃物除去法、効率的な酸素供給法の開発がなされなければ、より高密度な細胞が得られるようになると思われる。

4. モノクローナル抗体の生産

一つの例としてハイブリドーマによるモノクローナル抗体 (mAb) の生産を取り上げてみる。mAb を診断用としてのみ用いるのであれば、g オーダーであればよく、マウス腹水による生産で十分であるが、今後治療用に使用されるとなると、kg の mAb が要求され、マウス 2~3 万匹が必要となる。マウス腹水による生産は、量的な問題のみならずコスト面、endogenous virus のチェックなどの問題がある。したがって、効率的生産法の開発が急務とされている。従来の細胞培養法においては腹水に比べて生産性が低いということが問題であったが、抗体産生量は細胞濃度に比例するので高密度培養を採用することによって効率的に mAb を採取できるようになった (表 6, 表 7)。また、細胞の

表6 Specific Rate of Monoclonal Antibody Production

	Data	Specific rate (molecule/cell/sec)
Ascites	10mg/10day, 10 ⁸ cells/10day, 10days	464
Perfusion (from H. Murakami) ²⁸⁾	930mg/7x10 ⁶ x350ml/12days	1028
Encapsulation (from Damon Biotech)	2.8mg/ml, 10 ⁷ cells/ml, 10days	1300
Cytostat (from Fazekas) ²⁹⁾	56.4mg/day, 10 ⁶ cells/mlx443ml/day	5913

表7 Yield of Monoclonal Antibodies
by Murine Hybridoma

Batch	15 mg/ℓ/day
Semi-continuous	27 mg/ℓ/day
Perfusion	660 mg/ℓ/day

* 390 μg / 2.2 × 10⁷ cells/ml
(S. Reuveny et al., 1985)³⁰⁾

環境条件の改良によっても、その生産性を上げることが可能³¹⁾

Celltech社は deep-tank fermenter を用いた気泡塔培養法を開発した⁴⁾ハイブリドーマ23株を培養し、プロセスの至適化により細胞濃度2×10⁶ cells/ml で mAbを平均102 μg/ml採取でき、1バッチ100gの生産が可能となった。Endotronics社は、ホローファイバーを用いてハイブリドーマを培養しファイバーの内外の圧力を周期的に変える培養法(ACUSYST-P[®])を開発した。培養液を6~24ℓ/日流し、0.5~6.7mg/mlの mAbを1~2ℓ得ることができる。KC Biological社は、ローラーボトル50本分に相当するセラミック培養装置(OPTICEL[®])を開発し、平均175 μg/mlの

mAbが1日当り10~12ℓ得られ、1カ月で10g採取できるとしている³²⁾ Doman Biotech社は、ハイブリドーマを半透過性膜に包括し、mAbをカプセル内に集積する培養法(ENCAPCEL[®])を開発した¹⁸⁾カプセル内に10mg/mlのmAbを集積でき、従来の培養法に比べると50~100倍のmAbが得られ精製も容易であるとしている。Karyon Technology社は、ハイブリドーマをアルギン酸ナトリウムゲル内に増殖させる培養法(GELTRAP[®])を開発し細胞密度は4×10⁷cells/mlになり、mAbを約200 μg/ml得ている。Bio-Response社は、生きた牛のリンパ液を循環させてホローファイバーチャンバー内に送り、ハイブリドーマを培養するシステム(MCT[®])を開発した³³⁾牛1頭1日当り5gのmAbを採取している。各種培養法図-4、表8に示した。

5. 将来の展望

スケールアップの障壁となっている要素のうち、いくつかは解決されてきたが、今後さらに改良されるべき課題としては、(1)効率的酸素供給法、(2)蓄積老廃物

表8 Culture System for Animal Cells

Scale Culture type	small	→	Large
Anchorage dependent cells	• Flask		• Roller bottle • Multitray
↓	"Immobilized cells"		• Membrane [Millipore] • Ceramic [KC Biological] • Hollow fiber [Monsanto, Amicon, Endotronics, Bio-Response] • Encapsulation [Damon] • Entrapment [Kayron, Univ. of Agr.]
Suspension cells	• Flask		• Spinner culture • Microcarrier [Tray, Rijk, Mellieux] • Stirred culture [Wellcome, NCI, Israel] • Airlift culture [Celltech, Univ. of Agr.]

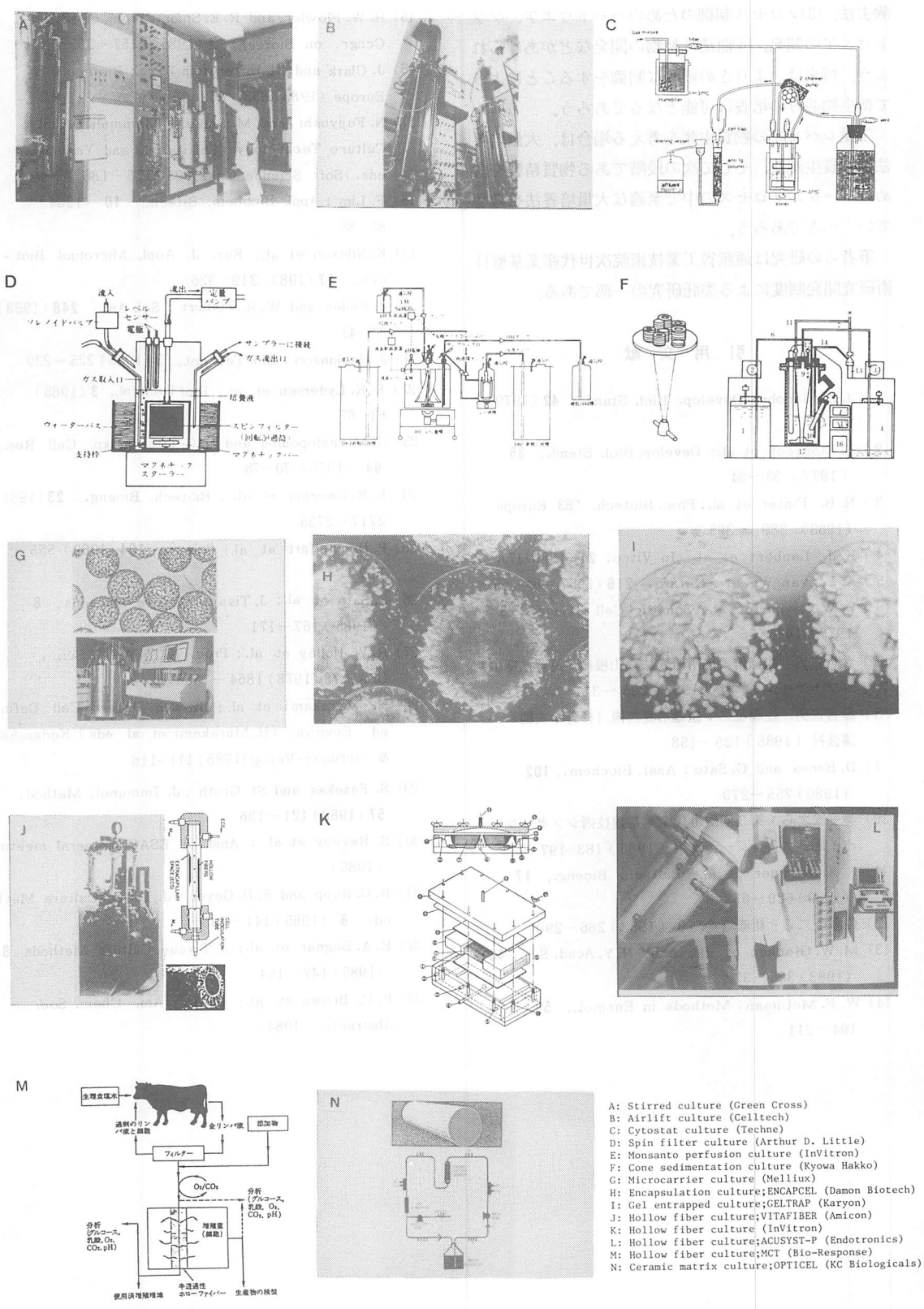


図-4 各種培養法

除去法, (3)プロセス制御のためのハードウェア, ソフトウェアの開発, (4)血清代替物の開発などがあげられよう。将来は, よりきめ細かな制御をすることによって微生物並みの培養は可能となるであろう。

工業レベルでの物質生産を考える場合は, 大量培養法, 物質生産法, そして次の段階である物質精製を含めたトータルプロセスの中で至適な大量培養法を考えていくべきであろう。

筆者らの研究は通産省工業技術院次世代産業基盤技術研究開発制度による委託研究の一部である。

引用文献

- 1) J. P. Jacobs ; Develop. Biol. Stand., **42** (1979) 13-18
- 2) H. Mougeot et al.; Develop. Biol. Stand., **35** (1977) 33-34
- 3) N. B. Finter et al.; Proc. Biotech. '83 Europe (1983) 389-396
- 4) K. J. Lanbert et al.; In Vitro, **21** (1985) 17A
- 5) A. L. van Wezel ; Nature, **216** (1967) 64-65
- 6) D. W. Levine et al.; Somatic Cell Genet. **3** (1977) 149-155
- 7) 藤吉宣男; 組織培養応用研究法 (山根紘, 遠藤浩良編) ソフトサイエンス社 (1985) 295-311
- 8) 藤吉宣男, 佐藤征二; 組織培養技術 (杉野幸夫編) 講談社 (1985) 125-158
- 9) D. Banes and G. Sato ; Anal. Biochem., **102** (1980) 255-270
- 10) 美王宏之ら; 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) 183-197
- 11) R. K. Zwerner et al.; Biotech. Bioeng., **17** (1980) 629-657
- 12) 佐藤征二ら; 組織培養, **9** (1983) 286-290
- 13) M. W. Glacken et al.; Ann. N. Y. Acad. Sci., **431** (1983) 355-372
- 14) W. F. McLiman; Methods in Enzymol., **58** (1979) 194-211
- 15) H. W. Fowler and R. E. Spier ; Proc. of 3rd Ccngr. on Biotech. **4** (1985) 157-205
- 16) J. Clark and M. Hirtenstein ; Proc. Biotech. '83 Europe (1983) 853-862
- 17) N. Fujiyoshi and M. Shikita ; Mammalian Cell Culture Technology (Shikita, M and Yamane, I eds.) Soft Science Co (1985) 175-188
- 18) F. Lim ; Appl. Biochem. Bitech., **10** (1984) 81-85
- 19) K. Nilsson et al.; Eur. J. Appl. Microbiol Biot-ech., **17** (1983) 319-326
- 20) J. Feder and W. R. Tolbert ; Sci. Am., **248** (1983) 36-43
- 21) J. Hopkinson ; Bio/Technol., **3** (1985) 225-230
- 22) B. K. Lydersen et al.; Bio/Technol., **3** (1985) 63-67
- 23) G. Michalopoulos and H. C. Pitot ; Exp. Cell Res., **94** (1975) 70-78
- 24) R. K. Zwerner et al. ; Biotech. Bioeng., **23** (1981) 2717-2735
- 25) P. Himmelfarb et al.; Science, **164** (1969) 555-557
- 26) S. Sato et al.; J. Tissue Culture Methods, **8** (1985) 167-171
- 27) R. W. Holley et al.; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **75** (1978) 1864-1866
- 28) H. Murakami et al.; Growth Differ, Cell Defined Environ. (H. Murakami et al eds) Kodansha & Springer-Verlag (1985) 111-116
- 29) S. Fazekas and St Groth ; J. Immunol. Method, **57** (1983) 121-136
- 30) S. Reveny et al. ; Abst of ESACT general meeting (1985)
- 31) R. G. Rupp and S. D. Geyer ; J. Tissue Culture Methods, **8** (1985) 141-145
- 32) E. A. Bognar et al.; J. Tissue Culture Methods **8** (1985) 147-154
- 33) P. C. Brown et al.; 188th Am. Chem. Soc. Abstracts (1984)