

外 3-6

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文概要

論文題目

動物細胞用バイオリアクター
による生理活性物質の生産

申請者

満田伸二郎
Shinjiro MITSUDA

平成 3年 5月

理 1487 (1746)

動物細胞の培養により、生理活性物質を工業的に生産させる試みが、近年盛んに行われるようになってきた。それらの主なものにはインターフェロン(IFN)、インターロイキン(ILB)、エリスロポエチン(EPO)、組織性プラスミノーゲンアクトベーター(t-PA)等がある。動物細胞培養法が注目される理由として、この種の物質の大部分は糖タンパク質からなり、その複雑な構造の中に特異性の高い機能を保持していること、また細胞自体の生産する物質であることから、生体内での副反応が少ないと等の点で、従来の医薬品では困難とされていた各種の疾患の治療への応用に期待されたからである。その中で著者はヒト培養細胞を用い、新規な血栓溶解剤としてのt-PAの開発を行った。

従来の血栓溶解剤としてのウロキナーゼやストレプトキナーゼはフィブリンとの親和性が低く、循環血液中という液相での線溶効果が主であった。これに対し、t-PAは固相上での線溶現象を引き起こすので、従来のものと比べ出血、再閉塞等の副作用はなく、より強力な血栓溶解効果をもたらすものと期待されている。

著者は発癌性等の面で安全性に問題なく、かつ天然のt-PAと同一の物質を生産できる可能性のある細胞としてヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞IMR-90を選んだ。IMR-90細胞の培養液より、精製したt-PAの分子量は64～68KDであった。また免疫学的性質として、IMR-90細胞由来のt-PAは、抗t-PA抗体で完全に中和されたが、低分子量ウロキナーゼは中和されなかった。

細胞の生産する高分子物質を工業的に得ようとする場合、次の3条件が満たされる必要がある。1)細胞自身の生産能が高いこと、2)細胞が増殖、物質生産を行うのに適する培地を選択すること、3)効率的な培養システムを確立することである。対象とする細胞は選択決定していることから、2)および3) 中でも培養システムの構築を目的に本研究は行われた。

本論文は序論とそれに続く7つの章より構成されている。

序論では動物細胞を利用した物質生産の意義を述べるとともに本論文の目的を述べている。

第1章ではIMR-90細胞の基礎的な増殖、t-PA生産条件について述べている。すなわち牛胎仔血清(PCS)を添加した培地で増殖は最も良好であり、平板効率は15～25%、比増殖速度は 0.65 day^{-1} 、増殖能は継代数の増加とともに低下し、t-PA誘導剤としてプロテオースペプトンが最も効果的であり、さらに細胞外カルシウム濃度を高めることにより、t-PAの生産は一層促進された。またt-PAの生産は負のフィードバックコントロールによって調節されていることがわかった。

第2章では、不均一系の灌流培養法に用いる細胞の接着担体としての不織布について述べている。すなわちIMR-90細胞はポリエステルやナイロン製不織布に良好に接着、増殖し生細胞数は $3 \times 10^6/\text{cm}^2$ に達した。これはプラスチック表面での単層状増殖と比べ、約7倍の細胞密度であった。また不織布を担体とするリアクターの設計においては、剪断力に鋭敏なIMR-90細胞を担体上に維持させて安定

的な物質生産を行えることを目的に、不織布を貼り付けた円盤状培養皿に、各円盤の中心部に取り付けた焼結金属フィルターを介して培地を循環することを特徴とする装置を設計、試作した。そしてこの装置を用い、約1ヶ月の連続培養を行ったところ、希釀率 $0.22, 0.33, 0.45 \text{ day}^{-1}$ で定常状態の活性は245, 220, 160 IU/mlが得られた。

第3章ではセラミック片を充填したリアクター(CBR)について述べている。セラミックのスクリーニングを行った結果、アルミナ製、3～6 mmの不定形状のセラミックCAIが接着性、増殖性及び細胞の剥がれ難さの点で最も良好であった。またt-PA生産は細胞濃度の影響を受け、高濃度では負のフィードバックコントロールが強く働いて、細胞当たりの生産性は低下し、またセラミック上で接触阻止を受けていない細胞の生産能も低くなる傾向が見られた。さらに細胞外カルシウム濃度を高めることにより活性は上昇したが、プラスチック表面に増殖した細胞で障害をおこした5.4 mMにおいても、セラミック上で培養した場合には全く障害を受けず、1.8 mM濃度の場合の約2倍の生産性の向上が見られた。そしてセラミック充填層と循環槽から構成されるCBRを構築し、セラミック200 gの小規模実験において、約1ヶ月間、安定的なt-PAの生産が確認された。

第4章では、CBRを2 kg規模へのスケールアップ条件および灌流培養した結果について述べている。2 kg容量CBRへのスケールアップにおいては、IMR-90細胞の場合、線速度に限界があることから濃度勾配への影響を考慮して、200 g規模と比較して、層径を大きくすることとし、層の直径は15 cm、高さ 15 cmのリアクターを設計した。これを用い、濃度勾配やチャネリングの発生状況を調べ、また細胞接種方法や増殖から生産への移行時の培地交換方法に検討を加えた。

t-PAの生産性は線速度と希釀率とに影響を受け、線速度は 0.2 cm/min 、希釀率は系全体の容積に対して、1日当たり半量交換した場合が最も良好であった。また生産方式として、繰り返し回分法より連続法で1.5倍高い活性を与えた。さらに灌流培養した結果、最高活性550 IU/ml、また40日間の平均で320 IU/ml、560 IU/ $10^6/\text{day}$ という極めて高い生産性が得られた。IMR-90細胞は、少なくとも1ヶ月間はセラミック上、安定的に保持されていた。

第5章では生産物阻害を解除するための、t-PA吸着カラムをCBRとオンラインに接続したシステムについて述べている。t-PAの吸着を行うオートクレーブ滅菌可能な吸着剤として、合成吸着剤Amberlite XAD-8を選んだ。平衡吸着能は、32,000 IU/mlと推定された。また吸着後溶媒に5.7% NaCl-50% エタノール(pH 9.5)を用いることにより、t-PAは95%の回収率で溶出された。さらにCBRにAmberlite XAD-8カラムを連結したリアクターを設計、試作した。これを用いてt-PA生産への影響を調べたところ、吸着カラムを連結した場合には、培養液中のt-PA濃度が35～80 IU/mlと低く抑えられる結果、生産物阻害の影響を受けず、12時間の総生産活性は吸着処理を行わない対照と比べ、2.5倍に高められた。

第6章では、マイクロキャリヤーを用いたI-PA生産について述べている。マイクロキャリヤーとしてCytodex-1 を選び、3 ℥、15 ℥ ジャーファーメンターへのスケールアップ時、混合時間及び剪断力を指標として攪拌数を設定し、培養した結果、いずれも200 mlのプラスコレベルと、ほぼ同等な細胞密度(1.5~2.0 × 10⁶/ml)が得られた。また細胞の増殖形態の違いによりI-PA生産性は変化した。即ちプラスチック表面で単層状、培養表面一杯に増殖した個々のIMR-90細胞は、セラミックに三次元的に増殖した細胞に比べ高いI-PA生産能力を有しているが、より負のフィードバックコントロールを受けやすいことがわかった。

IMR-90細胞はプラスチック表面とほぼ同一な増殖形態を示し、生産開始時に一時的な栄養分の制限を行うことにより、1ヶ月以上細胞はキャリアーに保持され、500 IU/10⁶cell/dayの速度でI-PAを生産し続けた。これは細胞当たりの生産性としては、CBRの結果と比べ幾分低いものであった。

第7章では、セラミック担体のより応用的な発展分野について述べている。層径を3倍、セラミック充填量を10倍にスケールアップした20 kg 規模CBRを稼働させた。均一な細胞接種が達成された結果、パイロットプラント規模においても、連続55日間稼働、平均活性180 IU/mlを得ることができた。

遺伝子組換えの宿主として広く用いられているDHK-21細胞においても、長期間の高密度培養が達成され、CBRの細胞培養用リアクターとしての汎用性が確かめられ、液流方向切り換え機能及び気泡止めユニットを備えたシステムを完成させた。

また不定形セラミック片は、細胞との親和性が高く、細胞を保持しうる構造を有し、かつ洗浄により再使用が可能であるから、定常的な物質生産方法に用いる担体としても優れていた。

第8章は結論であって本研究で得られた結果の要点をまとめた。