



バイオプロセスへの取り組み

Approach to Bioprocess

伊藤 雅 Masashi Ito

従来、医薬品がヒトに与える影響はヒトや動物の細胞、動物により評価されてきたが、昨今、その結果を疑問視する声やより良い評価系を求める声が出てきており、ヒト細胞を用いた三次元培養研究が活発になっている。

三次元培養のバイオプロセスは流体制御と自動化技術が多く使われるので当社が社会に貢献するよい機会と考えている。

そこで本稿では、バイオプロセスで必須となるバイオリアクターに焦点を当て、三次元培養でニーズがある“かん流バイオリアクター”を紹介する。細胞が生きるために重要な指標であるpHと溶存酸素の制御方法を述べたのち、“かん流バイオリアクター”の実証実験機を用いて得られた三次元組織を観察した結果を報告する。

Conventionally, the effects of pharmaceuticals on humans have been evaluated using human and animal cells and animals. Three-dimensional culture research has become active. The three-dimensional culture bioprocess uses a lot of fluid control and automation technology, so we think it is a good opportunity for us to contribute to society. Therefore, in this paper, we will focus on bioreactors that are essential for bioprocesses, and introduce "perfusion bioreactors" that are in demand for three-dimensional culture. After describing the method of controlling pH and dissolved oxygen, which are important indicators for cell survival, we will report the results of observing three-dimensional tissues obtained using a "perfusion bioreactor" demonstration experiment.

1 はじめに

近年、社会ニーズや社会問題を解決し、持続可能な社会を実現するために“SDGs”が話題になっている。当社においても社会の課題解決に貢献すべく、商品・サービスの技術革新を追求している。そこで本稿ではバイオプロセスへの取り組み事例を報告する。

昨今の世界的なトピックではコロナウイルス流行による行動制限や生活様式の変容による経済ダメージなどが頭に浮かぶ。この未知の病気に対してアメリカの企業が世界で初めてmRNAワクチンを開発し、早期臨床試験を経て上市したことにより、状況が好転したことは記憶に新しい。これは生物学とテクノロジーが融合した一つの事例であり、今後もパンデミック等により従来と異なる医薬品デザインや医薬品開発手法のパラダイムシフトが起こる可能性を示唆している。

また、医薬品開発では以前より動物実験が問題になっている。欧州では2009年に化粧品の評価における動物実験が禁止となり、動物で試験した化粧品の最終製品や原料はEU内で使えなくなっている。このような流れを受けて医薬品開発においても同様の措置が取られると言われており、近年、ヒトの細胞を用いた研究が盛んになっている。

未来に目を向けると、爆発的な人口増加や人類が宇宙へ進出すると言われており、これらを見据えて食料確保に向けた取り組みが始まっている。その一つに動物細胞を使った培養肉研究が挙げられる。この他にも

人々が求める社会のニーズとそれらに応える生物化学工学の事例(Fig.1)を示す。

社会のニーズ	生物化学工学の適用例
環境負荷の少ない化学工業	バイオリアクターによる化学品の生産
健康な生活	動物細胞によるバイオ医薬品の開発と生産 酵素反応による機能性食品の生産
安全で美味しい食品	食品加工での酵素の利用 植物工場での野菜生産
エネルギー問題	バイオ燃料の開発と生産

Fig. 1 社会のニーズと生物科学工学¹⁾

このように生物学や生物化学工学といったバイオ分野は社会の課題解決を進める上で有効かつ、有望な事業領域になる可能性を秘めている。

2 培養方法とバイオリアクター

一般にバイオ分野で使われる技術をバイオテクノロジー、微生物や細胞、酵素を用いたモノづくりをバイオプロセスという。バイオプロセスで細胞を育てることを培養と呼び、平面容器で培養したり、容器内を浮遊させて培養したり、ゲル等の構造支持体上で培養したりと、細胞の性状や実験目的によって様々な方法が実施されている。以下に代表的な方法を示す。²⁾

2-1 静置培養(単層培養)

細胞を培養容器に接着させ、単層の状態での培養する

方法。基本的には正常細胞を培養系に移すと単層状に伸展・増殖する。

単層上に伸展するのでMonolayer Culture(単層培養)と呼ばれ、培養容器の培養面積を覆い尽くすと、過増殖状態となり、形態の変化や死滅の原因となる。

2-2 浮遊培養

細胞を培地に浮遊させた状態で増殖させる培養方法。血球由来の細胞は、培養容器に接着せずに浮遊した状態で増殖する。血球由来の細胞以外にも、癌化した細胞や意図的に浮遊状態での培養を可能にした細胞などがある。

浮遊系細胞の培養は培養容器の接着可能面積に依存しないため、大量培養に有利な細胞として利用され、省スペースでの生産レベルの大量培養に適する。

2-3 回転培養(ローラー培養)

ローラーボトルと呼ばれる回転培養専用の培養容器を緩やかに回転させながら、そのボトルの内壁に細胞を接着させて培養する方法。培養方法の基本としては、単層培養と同じであり培養条件の検討が比較的容易で少量の培地で、効率的なガス交換が可能である。

2-4 旋回培養(振とう培養)

浮遊系細胞の培養方法として利用され、主に菌体や植物細胞の培養等に利用される。リンパ球由来細胞の培養や、スフェロイド形成(細胞集塊)に用いられることも多く、後者については、適切な回転速度で水平に旋回させると浮遊物が中央に集まる性質を利用している。近年、動物細胞の培養にも広く利用される培養方法となっている。

2-5 担体を使用した培養

小さなキャリアー(ビーズなどの担体)の表面に細胞を生着させて、そのキャリアーを攪拌することで、あたかも浮遊培養のような手法で行う接着性細胞の培養方法。大きな培養面積と培養容量が確保できるので、大量培養が可能である。

2-6 三次元培養(多孔性ゲル、微重力 etc)

単層培養などの二次元(平面)での培養とは異なり、高さ方向(厚み)でも細胞を増殖させる立体的な培養方法。細胞の接着及び増殖を支え、立体的三次元構造を維持するための担体をスキャフォールド(足場)と呼び、その足場が作り出す培養環境はより生体内の状態に近く得られた結果も生体内の反応との相関性が高いと考えられる。再生医学研究を進める上で生体内に近い環境での培養は非常に重要である。

各種培養方法を実現するため培養に用いられるタンクやその周辺機器を含む装置はバイオリアクターと呼

ばれ、細胞に栄養や酸素を与え、細胞が育ちやすい環境をつくる機能を有している。バイオリアクターの概略と特徴をTable 1に示す。

Table 1 動物細胞培養用バイオリアクターの概略³⁾

特徴	型式	攪拌器備付式	エアリフト式	ホローファイバー式	セラミックマトリックス式	セルリフト式	重力沈降式	水平円筒回転式
スケールアップ性能	○	○	×	×	×	×	×	△
付着性細胞	○	○	○	○	○	○	×	○
浮遊性細胞	○	○	○	○	○	○	○	○
ずり応力	△	×	○	○	△	△	△	○
培地交換	△	×	○	○	○	○	○	△
酸素供給	△	○	○	○	○	○	○	△
オンブリング	○	○	×	×	○	○	○	○

バイオ分野においてバイオリアクターは極めて重要な装置であり、国内外のメーカーが開発に取り組んでいる。近年注目されているのが三次元培養で、その培養環境は生体内に近く、得られる結果も生体内の反応と相関性が高いと考えられており、ヒトへの影響や効果の測定に適していると言われている。しかし、三次元培養で得られる三次元組織は立体形状となるため中心部の細胞に栄養や酸素が届かずに細胞死(ネクロシス)する問題がある。

そこで、我々は三次元培養に適したかん流バイオリアクターに着目し、開発に取り組んでいるので次の章より紹介する。

3 かん流バイオリアクター

“かん流”とは「注ぎ、流すこと。また、その流れ」、あるいは「体内または臓器・組織・細胞に薬液などが入った液体を流し込むこと」の意味を持ち、「灌流」と表記される。つまり、かん流バイオリアクターとは三次元細胞に培養液を流して培養する装置になる。一般的にヒト細胞を培養する環境条件は37℃、pH7.4と言われている。これは人間の体温と血液のpH正常値から導かれる値である。人間の体内では血液及び血管が酸素、栄養、温度を体の隅々まで届けて体内を安定させる役割をしているので三次元培養でも液体の流れが重要になる。その液体の流れを実現するのが再生医学研究における培養法として用いられてきたかん流バイオリアクターである。

かん流バイオリアクターの機能は大きく4つに区分することができる。

- ①送液制御部
- ②調質部
- ③培養部
- ④温調部

それぞれに求められる技術は次のようになる。

- ①血流を模倣する微圧・微流量送液技術
- ②血液の物性を模倣した液中の溶存酸素(以降DO)とpHの調質技術

③三次元組織が適正な圧力下でコンタミネーションせずに長期培養できる技術

④培養部及び周辺部を適温に保つ技術

これらの機能の備えたかん流バイオリアクターの構成をFig.2、制御項目と特性値をTable 2に示す。

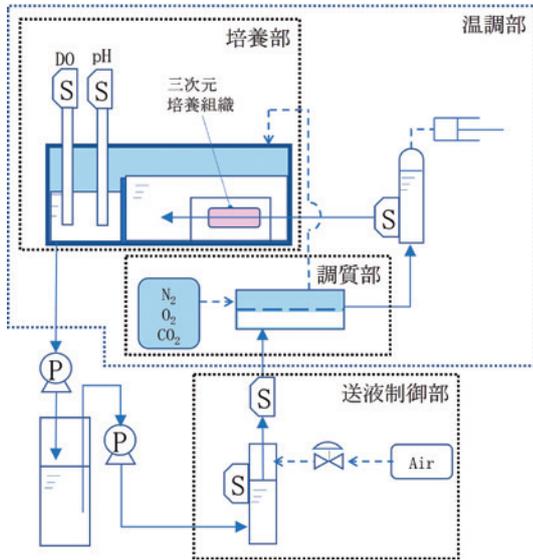


Fig. 2 かん流バイオリアクターの構成⁴⁾

Table 2 かん流バイオリアクターの制御項目と特性値

項目	特性値
培地容量	200~1000mL
送液量 (※)	100~500 μ L/min
送液圧 (※)	~10mmHg
組織圧	~1mmg
pH値	6.9~7.9
DO値	1~8mg/L
培養温度	室温~40℃

※選択式で片方のみ制御対象(他方は従属して変化する)

この中でバイオリアクターの調質部で使われるDO・pH制御技術について述べる。

4 培養液の調質技術

繰り返しになるが培養では細胞を生体環境下に置くことが重要である。一般的に体温は37℃、体内のpH代表値は7.4、酸素濃度は5~7%程度と言われている。そこで細胞培養ではこのような環境を人工的に作り出すためにインキュベータを用いて37℃の温度と内部空間の二酸化炭素濃度、酸素濃度が制御、維持される。インキュベータに収容する細胞を培養する容器は培養液の表面から酸素と二酸化炭素を取り込むことに適した間口が広く底が浅い形状のディッシュが使われる。培養液には二酸化炭素濃度が5%の気体が溶け

込むことでpH7.4になるガス緩衝液を使っており、培養液を容器に注液する際には細胞がダメージを受ける原因となる気泡が発生しないように注意深く作業しなければならない。同様に、かん流培養においても、かん流する培養液に二酸化炭素ガス(以降CO₂)と酸素ガス(以降O₂)を供給しつつ気泡を発生させない培養液のpHとDOの調質方法及び監視が必要になる。

はじめに培養液のpHが決まる仕組みについて述べる。pHとはH⁺(プロトン)の数より求まる。例えばpH7の場合、pH=-log(10⁻⁷)で表され、プロトンのモル濃度は10⁻⁷mol/LになるのでpHを変えるにはプロトンのモル濃度を制御すればよいことがわかる。

培養液はバッファー液が主でそこに培養に必要な栄養素、成長因子などが添加される。バッファー液は主にCO₂バッファーが使われる。多くの動物細胞培養における培養液のpH調整にはFig.3に示す緩衝系が用いられる。この反応式で注目するのはCO₂とH⁺(プロトン)の存在である。

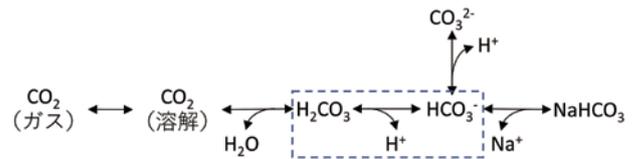


Fig. 3 NaHCO₃-CO₂ガス緩衝系によるpH調節⁵⁾

炭酸水素ナトリウム(NaHCO₃)水溶液の培養液中ではHCO₃⁻とH₂CO₃との間の平衡が支配的である。H₂CO₃モル濃度は気相部から溶解したCO₂モル濃度に等しくなるのでCO₂モル濃度が高い場合、H₂CO₃モル濃度を高くしようとして左方向の反応が進むとプロトンのモル濃度が下がりpHは小さくなる。CO₂モル濃度が低い場合、H₂CO₃モル濃度を低くしようとして右方向の反応が進むとプロトンのモル濃度が上がり、pHは大きくなる。

DOは次のように考える。例えば水中に大気を送気してバブリングしたまましばらく放置すると水はその温度における酸素飽和状態になる。よって水溶液中のO₂モル濃度が高いとDOは大きくなり、水溶液中のO₂モル濃度が低いとDOは小さくなるのが分かる。

そしてCO₂とO₂は相互作用で変化したり、生成物を作ったりしない独立した関係にある。

以上より、CO₂とO₂のモル濃度をコントロールすることで水溶液のpHとDOの同時制御の可能性が見えてきた。

しかし、供給するモル濃度をCO₂とO₂のみにするとトレードオフの関係になるためpHとDOを同時に制御することができない。そこでトレードオフを解消するためにバッファーとなる物質が必要と考えた。バッファー物質は細胞や培養液、CO₂とO₂に反応しない不

活性ガスが望ましいので大気中に多く含まれる窒素ガス(以降N₂)を選択した。つまりCO₂、O₂、N₂から成る混合ガス全体の体積(モル濃度の分母)を一定にし、そこからpHとDOの設定値に応じたCO₂とO₂のモル数を引き、残りをN₂のモル数で補えばよいと考えた。

気体のモル数を直接制御するのは難しいので制御しやすい他のパラメータへの置き換えを検討するためにAmagatの法則を用いた。

『理想気体において、気体Aと気体Bの混合気体の体積Vは同温・同圧下の気体Aの体積VAと気体Bの体積VBの和に等しい』ことより、同温・同圧下に置いて混合気体の体積Vは気体A、Bの体積VA、VBを用いると

$$V=VA+VB$$

となる。

また、モル数は、『0℃、1atmにおいて気体1molは分子数6.02×10²³個、22.4Lの体積となる』ことより、CO₂、O₂、N₂、その他ガスにおいても成立する。

これらを前提として混合気体の全体積、各気体の分体積、モル数の関係を気体の状態方程式P・V=n・R・Tより考えてみる。

気体Aの体積VAとモル数nA、気体Bの体積VBとモル数nBとし、同温・同圧下とすると

$$P \cdot VA = nA \cdot R \cdot T$$

$$P \cdot VB = nB \cdot R \cdot T$$

$$n = nA + nB$$

より

$$P / (R \cdot T) = VA / nA = VB / nB = V / n$$

となるから

$$nA = VA / V \cdot n$$

$$nB = VB / V \cdot n$$

よって気体A、Bのモル数は混合気体の体積とそれぞれの気体体積の比で表せる。

以上より、モル濃度を制御するには同温、同圧のCO₂、O₂、N₂による混合気体の体積を固定し、各気体の体積を制御すればよいことが分かった。

次より狙いのモル濃度になった混合気体を流れる培養液に溶け込ませる方法について述べる。

気体を水溶液に溶かすにはバブリングが手っ取り早いですが培養においてはバブリングで発生する気泡が細胞近くで破裂すると細胞がダメージを受けるため好ましくない。また、静置培養で使われる気液界面から気体供給する方法は溶存速度が遅く、送液中の培養液にそのまま適用することは困難である。

これらを踏まえて着目したのが気体透過膜を用いる方法である。気体透過膜は気体のみ透過する網目状になった三次元構造の撥水素材であり、液体と気体の間に置くことで液体は気体側に流出せず、気体のみが液体側に流入することが期待できる。ただし、液体に大きな力を加えると液体が気体側に流出する懸念があるが、今回は細胞組織が破壊しないようにかかる圧力は

10mmHg以下と微圧なので手段としては好適である。そこで培養液と混合気体が気体透過膜により隔壁される培養液調質器(Fig.4)を開発した。10mmHg以下で微圧送された培養液はFig.5に示す流路を流れる。気体透過膜を介した反対側の空間にはマスフローで流量をコントロールしたCO₂、O₂、N₂の混合気体を供給する。流れる培養液に溶けやすくするために培養液と気体透過膜が接する気体を広く、培養液の流れによって攪拌が進むように流路深さは浅くなるように設計している。⁶⁾

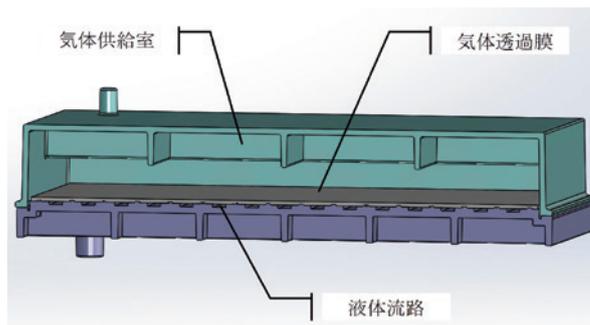


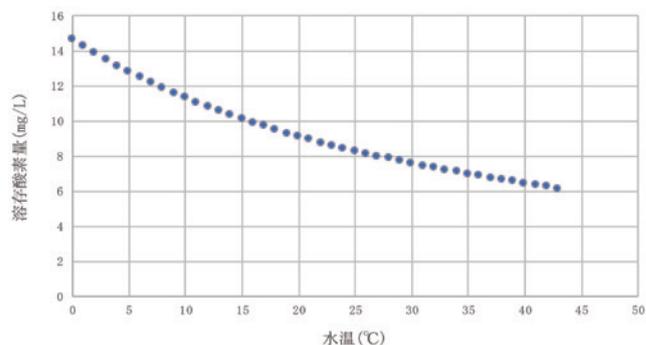
Fig. 4 培養液調質器の断面



Fig. 5 培養液流路

混合気体を供給する際には液体の温度に注意が必要である。水中の飽和溶存酸素量のプロットデータ(Table 3)に示されるように例えば水温が25℃のDOは8 mg/L(読み値)、35℃のDOは7mg/L(読み値)となり、10℃の差でDOは12~13%ほど変化する。O₂ほどではないが、CO₂も同様であり液温に合わせてO₂とCO₂の供給量を変えることが望ましいことが分かる。

Table 3 水中の飽和溶存酸素量



培養中の温度環境は所定温度で一定になるが、培養液を供給し始めた段階や、培養液を交換した直後などでは所定温度に達していないことや、実験内容により所定温度が変わることが考えられるため、温度と供給気体流量のテーブルを作り、液体の温度に対して気体流量を制御している。

Table 4は、培養液のDOが平衡した場合のDOと混合ガスにおけるO₂の各流量と各温度Tとの関係を規定した酸素流量テーブルを示している。例えば、温度T₁においてDO₁(例えば1ppm)で平衡する場合の酸素流量は流量RO₁₁であり、温度T_mにおいてDO_n(例えば10ppm)で平衡する場合の酸素流量は流量RO_{nm}である。流量RO₁₁から流量RO_{n1}へ順に大きくなっており、流量RO₁₁から流量RO_{1m}へ順に大きくなっている。そして、流量RO_{nm}が最も大きくなっている。⁶⁾

Table 4 酸素流量-温度テーブル

温度 [°C]		O ₂ 流量 [mL/min]			
		T ₁	T ₂	...	T _m
DO [ppm]	DO ₁	RO ₁₁	RO ₁₂		RO _{1m}
	DO ₂		RO ₂₁		
	⋮				
	⋮				
	DO _n	RO _{n1}			RO _{nm}

Table 5は培養液のpHが平衡した場合の各pHと混合ガスにおけるCO₂の各流量と各温度Tとの関係を規定した二酸化炭素流量テーブルを示している。例えば、温度T₁においてpH₁(所定のpH値、例えば6.9)で平衡する場合の二酸化炭素流量は流量RC₁₁であり、温度T_mにおいてpH_n(所定のpH値、例えば7.9)で平衡する場合の二酸化炭素流量は流量RC_{nm}である。流量RC₁₁から流量RC_{n1}へ順に小さくなっており、流量RC₁₁から流量RC_{1m}へ順に大きくなっている。そして、流量RC_{1m}が最も大きくなっている。⁶⁾

Table 5 二酸化炭素流量-温度テーブル

温度 [°C]		CO ₂ 流量 [mL/min]			
		T ₁	T ₂	...	T _m
pH	pH ₁	RC ₁₁	RC ₁₂		RC _{1m}
	pH ₂		RC ₂₁		
	⋮				
	⋮				
	pH _n	RC _{n1}			RC _{nm}

以上の手段により送液中の培養液に混合気体を供給して調質する方法を開発した。

5 実証実験

DO・pHの調質制御以外にも送液制御や温調制御、細菌汚染対策を施した培養部などを開発してかん流バイオリアクター(Fig.6)と制御コントローラ(Fig.7)の実証実験機を製作した。



Fig. 6 かん流バイオリアクター外観(加工済み)



Fig. 7 制御コントローラ外観(加工済み)

この実験機が実際に数値制御できることを確認したのち、共同研究先の東京女子医科大学 清水達也教授と早稲田大学 坂口勝久准教授の協力により三次元組織が培養できることを確認した。培養する三次元組織は心筋細胞と血管内皮細胞を共培養した細胞シートを複数枚積層したもので樹脂製のハウジングに血管内皮細胞を含むコラーゲンゲルを充填した上に設置する。コラーゲンゲル内部は貫通穴を施しており、かん流バイオリアクターにハウジングを接続して送液することによりコラーゲンゲル内部を培養液が流れる算段になっている。実際にかん流バイオリアクターに接続して一週間培養した血管付心筋組織の外観と墨汁を使った血管の観察結果をFig.8に示す。心筋組織内部を墨汁が網目状に広がっており、血管ができていること、血管が物質輸送で機能していることが確認できた。⁷⁾

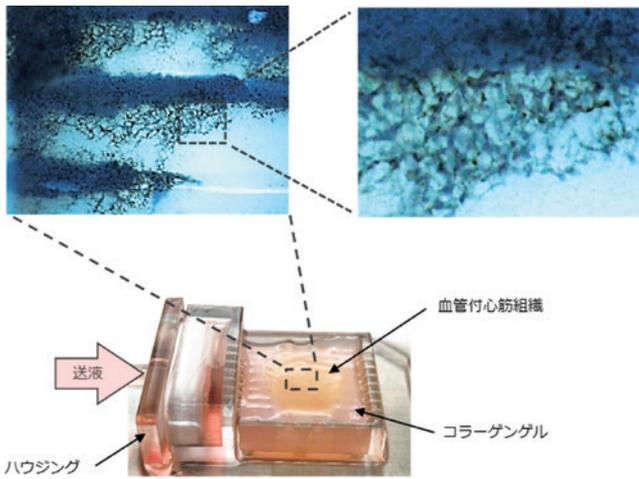


Fig. 8 血管付心筋組織と血管⁷⁾

6 結言

今回、バイオプロセスへの取り組みとしてかん流バイオリアクターについて報告した。初めて経験する分野のため知見が乏しい状態でスタートしたが、多くの人の支援を受けながら活動を推進した結果、実証実験機を製作し、実際に三次元組織を培養できるところまでたどり着くことができた。商品化さらには事業化に至るまでには多くの困難が予想されるが、この成果を早期に社会実装して人々の幸せな社会生活に貢献できることを目標に日々精進していく。

7 おわりに

本稿には東京女子医科大学の清水達也教授、早稲田大学の坂口勝久准教授との共同研究開発の成果を含む。ここに記して謝意を表す。

- 1)松井徹ほか,生物化学工学の基礎,コロナ社,2p(2018)
- 2)培養技術者必見!学生さんにもお勧めしたい細胞培養ガイド | ワケンビーテックWebサイト(wakenbtech.co.jp)より引用し一部改変
- 3)海野肇ほか,生物化学工学,第3版,講談社,210p(2011)より引用し一部改変
- 4)CKD株式会社,堀邦聡,伊藤雅,鈴木仁也,細胞培養システム,特開2022-108647(2022-07-02)より引用し一部改変
- 5)高木睦,セルプロセッシング工学,コロナ社,34p(2007)
- 6)CKD株式会社,伊藤雅,培養液調整装置、及びその製造方法,特開2021-154201(2021-10-07)
- 7)坂口勝久ほか,圧力・流量制御灌流バイオリアクタを用いた血管網付組織の構築,再生医療学会総会(web),21st,ROMBUNNO.SP-03-6(WEB ONLY)(2022)より引用し一部改変

執筆者プロフィール



伊藤 雅 Masashi Ito
新規事業開発室
New Business Development Office