

SPG 膜によるマイクロバブルの培養への適用

○奥村大成¹、長田靖久¹、田原直樹¹、小島秀藏¹、久木崎雅人²、田中智博²、黒木泰至²

¹日揮株式会社 〒311-1313 茨城県東茨城郡大洗町成田町 2205 電話: 029-267-0165

Fax: 029-267-0129 E-mail: okumura.taisei@jgc.co.jp

²宮崎県工業技術センター 〒880-0303 宮崎県宮崎市佐土原町東上那珂 16500-2

マイクロバブルを用いた酸素供給に着目し、培養への適用を検討した。宮崎県工業技術センターが開発したシラス多孔質ガラス膜を利用することで、微生物にストレスを与えることのない培養槽へのマイクロバブル供給を可能とした。酸素供給性能および大腸菌培養への適用を実験的に検討した結果、本手法は一般的に使用されるオリフィススパージャーよりも優れていることが確認できた。今後は動物細胞培養へのマイクロバブルの適用試験を実施し、細胞培養の高密度化を支える高効率な酸素供給技術の確立を目指す。

1. はじめに

近年、医薬品開発では、抗体医薬を代表とするバイオ医薬品の開発機運が高まっている。また、ワクチン製造では、パンデミックインフルエンザに対応するために、より効率的な製造方法として、従来の鶏卵法から細胞培養法への転換が図られている。これらの細胞培養技術のニーズの高まりに伴い、培養技術の高度化が求められている。特に、細胞濃度の高密度化に起因する培養槽の酸素要求量の増大に対応した高効率な酸素供給技術が必要となる。

一般的な培養槽への酸素供給法としては、培養槽内に気泡を通気し、培養液を攪拌する羽根のせん断力により気泡を微細化する方法がある。この方法は、培養液単位体積あたりの気液界面積を増大させ、酸素供給量を向上させることができる。しかしながら、バイオ医薬品製造に使用する動物細胞を培養する場合、動物細胞の物理的強度が非常に低いため、攪拌羽根のせん断力により細胞が損傷を受け、死滅することが懸念されている。そこで、攪拌に依存せずに微細気泡を培養槽内に発生させることができる技術として、マイクロバブル技術に注目した。マイクロバブルは気泡径が 100 μm 以下と微細であることで気液界面積の増大という特性がある。さらに、気泡内圧力の増加および液中滞留時間の増加といった酸素供給の効率化に寄与する特徴を有している。これらの特徴より培養への酸素供給性能に関して著しい向上が期待できたため、新規の高効率な酸素供給技術として、マイクロバブルスパージャーを検討した。

2. マイクロバブル生成および検討方法

2.1 マイクロバブル生成方法

マイクロバブルは細孔方式を用いて生成した。この方式を採用した理由は、他の生成方法とは異なり、培養液中の動物細胞に対してせん断力などの外力を負荷しない特徴を有していたからである。図 1 に細孔方式の説明図を示す。細孔方式は、多孔質膜にガスを加圧供給し、膜表面の細孔を介してマイクロバブルとして生成する方法である。多孔質膜は、均一な細孔を有し、マイクロバブルの生成に実績のあるシラス多孔質ガラス (SPG: Shirasu Porous Glass) 膜を採用した[1]。

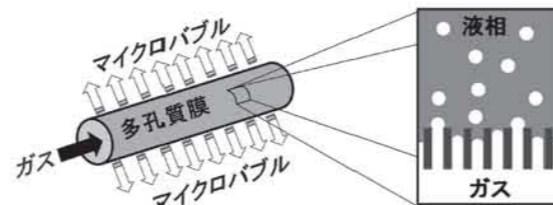


図 1. 細孔方式の説明図

2.2 検討方法

マイクロバブルの培養への適用を検討するために、以下の項目を測定した。(2) および (3) では、全容 3 L の培養槽 (液量 2 L) を用いて、通気流量 150 NmL/min で図 2 に示すマイクロバブルスパージャーと既存のオリフィススパージャーとの対照試験を実施した。

- (1) 培地中の気泡径
- (2) 総括酸素移動容量係数 (K_La)
- (3) 大腸菌培養

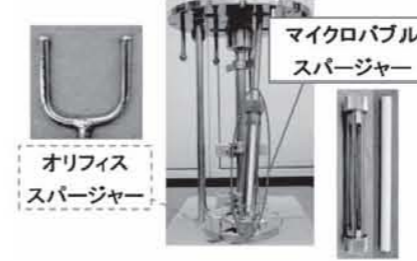


図 2. スパージャーの外観

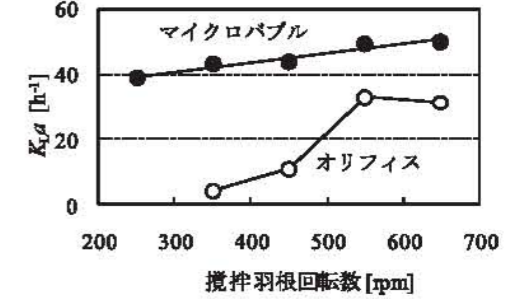


図 4. スパージャーの K_La 測定結果

3. 結果と考察

3.1 培地中の気泡径測定

細孔方式によるマイクロバブルの気泡径は、細孔径および液相の表面張力に大きく依存する[1]。そこで、培養液中におけるマイクロバブル生成可否を調査するために、細孔方式で培地中に生成した気泡の直径を測定した。図 3 に気泡径および細孔径の関係を示す。動物細胞用培地および酵母用培地ともに、100 μm 以下の気泡が測定され、マイクロバブルが生成可能であることを確認した。これは、培地中のタンパク質加水分解物や細胞保護剤といった界面活性成分の作用により、マイクロバブル生成に必要な表面張力が調整されたためであった。

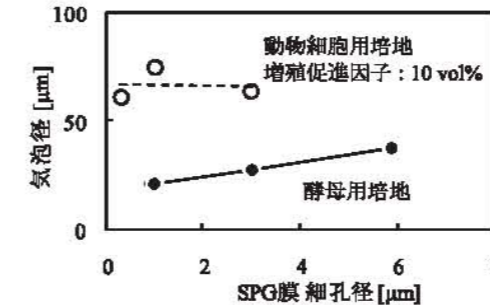


図 3. 培地中の気泡径および細孔径の関係

3.2 総括酸素移動容量係数 (K_La) 測定

マイクロバブルの酸素供給性能を評価する指標として総括酸素移動容量係数 (K_La) を採用した。 K_La は、培養槽への酸素供給速度を定量的に表す値として一般的に用いられている指標である。測定方法は、Gassing out 法 (Static Method) [2] を採用した。図 4 に攪拌羽根回転数をパラメーターとしたマイクロバブルおよびオリフィススパージャーの K_La 測定結果を示す。 K_La に関してマイクロバブルスパージャーをオリフィススパージャーと比較すると、攪拌強度への依存性が低く、その差は最大で約 10 倍であった。これは、マイクロバブルがオリフィススパージャーから生成させる気泡とは異なり、攪拌せん断力で微細化することなく、より広大な気液界面積を有していたためであった。

3.3 大腸菌培養

マイクロバブルの培養への適用可否を評価するため、大腸菌 (*Escherichia coli*) の増殖量を指標とした培養試験を実施した。大腸菌を採用した理由は、増殖が速く取扱いが容易であり、溶存酸素濃度に依存して増殖量が増える通性嫌気性菌であるからである。図 5 にマイクロバブルおよびオリフィススパージャーによる大腸菌培養の菌体濃度の経時変化を示す。培養時の攪拌回転数はともに 350 rpm とした。マイクロバブルが大腸菌培養に適用可能であることを確認し、マイクロバブルスパージャーをオリフィススパージャーと比較すると、効率的な酸素供給により、対数増殖期の増殖速度が 1.8 倍高い結果を得た。

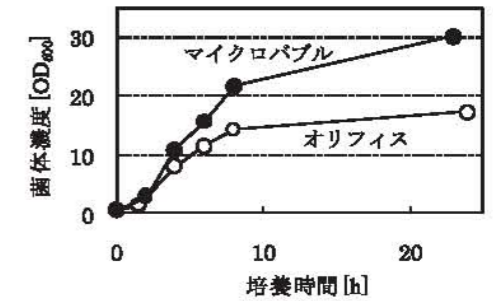


図 5. 大腸菌培養の菌体濃度経時変化

4. 今後の展望

マイクロバブルはオリフィススパージャーと比較して、低攪拌強度でより高効率な酸素供給性能を有していた。本報告ではマイクロバブルの大腸菌培養への適用を紹介したが、低攪拌強度で高い酸素供給性能を必要とする培養は細胞培養に求められている。したがって、今後は動物細胞培養へのマイクロバブルの適用試験を実施し、その効果を検討する予定である。

参考文献

- [1] Kukizaki M, et al.: J. Membr. Sci., 281, 386-396 (2006)
- [2] P. F. Stanbury, et al.: 発酵工学の基礎 - 実験室から工場まで -, 学会出版センター, 173-175 (2004)