

植物細胞の高密度用懸濁培養装置について

田 中 秀 夫*

植物細胞および細胞内代謝産物を、短時間で大量に、しかも高密度で得るためには、平面的な固体培養法に比べて、立体的な液体培養法（懸濁培養法）の方が細胞への栄養源および酸素の供給面からみて有利である。そのために、これまで多くの種類の懸濁培養装置が開発され、用いられてきた。

ここではまず、この懸濁培養によって、どの程度までの高密度細胞を得ることが期待できるか、またそのような高密度細胞を実際に得るために必要な懸濁培養装置の条件とはどのようなものかについて考察し、次にそのような条件を満たす高密度細胞用懸濁培養装置とはどのようなタイプの装置であるのかを、著者らの研究を通して紹介したい。

懸濁培養法で得られる高密度細胞とは、どの程度の密度を考えればよいのであろうか？ このような疑問は、有用細胞や細胞内有用代謝産物の工業生産に当って、それらの生産コストを論じる際に、まず生ずる疑問であろう。懸濁培養で得られた種々の生細胞とそれらの乾燥細胞の両密度より計算で求められる、培養液中での生細胞の含水率(容量基準)の例を第1表に示した。増殖の定常期の細胞に注目してみると、イネ細胞のように、含水率が90%前後と小さいものもあるが、ニチニチソウ、ジギタリス、ここには示していないが、タバコ、ハリ桑など、一般的に、94~96%程度である^{1,2)}。したがって、一般的な含水率を有する細胞が増殖し、単位容積において一杯になった場合、容量基準で4~6%に相当する細胞が入る計算になる。しかしながら、実際には、細胞間隙に存在する水分量を考慮しなければならないから、単位容積に懸濁出来る細胞量は、その水分量だけ低く見積る必要がある。それゆえ、これらの植物細胞の懸濁培養において得られる高密度細胞は、3~5% (w/v×100)程度と考えるのが妥当であろう。なお、最近の研究報告¹¹⁾で、8%という高密度のオウレン細胞が得られているが、

この細胞の含水率は、イネ細胞と同程度に小さいものと推定される。

このような高密度細胞を実際に得るために必要な懸濁培養装置の条件とは、どのようなものであろうか。WagnerとVogelmann³⁾は、種々のタイプの培養装置で、*Morinda citrifolia* (ヤエヤマアオキ) 細胞の懸濁培養を行い、細胞の増殖とアンスラキノンの生産について、収量と生産性の比較検討を行い、その結果、通気かく拌培養装置よりも、エアリフト型培養装置のような通気型培養装置の方が好ましいことを明らかにした。さらに、後者の装置において好結果が得られた原因が、培養液が十分混合されるとともに、酸素供給が十分行われ、しかも、酸素供給のために用いられる通気やかく拌の操作に伴って生ずる培養液中での剪断応力が、細胞(集塊)に破壊損傷などの物理的な悪影響を与えることが少ないためであると、彼らは説明している。しかしながら、Wilson⁴⁾は、このエアリフト型培養装置について、低密度細胞培養に適しているが、2%以上の細胞密度になると培養液のみかけ粘度は大きく増大し、通気のみで、機械かく拌を行わないため、高粘性の培養液の均一混合が不可能となり、培養装置としての能力を失うと指摘している。したがって、高密度細胞用の懸濁培養装置の条件は、細胞(集塊)を破壊損傷しないような剪断応力の小さい酸素供給操作で、高粘性の培養液の均一混合を行い、しかも、効率良い酸素供給が可能な機能を備えた装置である、といえよう。

それでは、そのような条件を満たす培養装置、すなわち、高密度細胞用の懸濁培養装置とは、具体的にどのようなタイプの装置であろうか。著者は、培養装置の性能を論じるために、①培養系における酸素供給能の定量的指標^{1,5)}と②酸素供給のために用いる機械的操作の細胞に与える物理的影響の強度の定量的指標⁶⁾、の2指標を確立し、この2指標に基づいて、種々の懸濁培養装置の中から高密度細胞用の培養装置の選定を行ったので、次に紹介する。

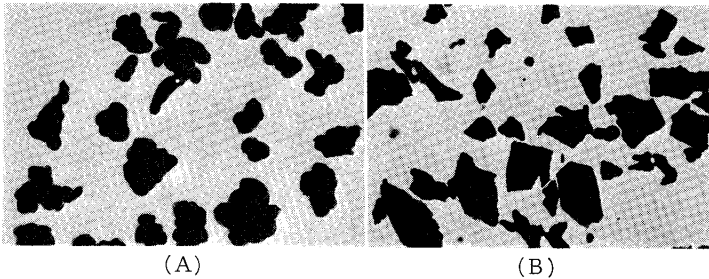
① 培養系における酸素供給能の定量的指標

細胞存在下の培養液における酸素移動速度は次式で示すことができる。

* Hideo TANAKA: Bioreactors for Cultivation of Plant Cells at High Density
筑波大学応用生物化学系培養工学研究室 (〒305 つくば市天王台)
Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba (Tsukuba, Ibaraki-ken, 305)

第1表 種々の培養細胞の生細胞密度, 乾燥細胞密度および生細胞含水率²⁾

植物名	培養時間 (日数)	増殖 phase	生細胞密度 (g/cm ³)	乾燥細胞密度 (g/cm ³)	生細胞含水率 (v/v%)
ニチニチソウ	7	対数増殖期	1.016~1.018	1.28	93.5~94.3
ニチニチソウ	12	定常期	1.014~1.016	1.36	95.6~96.1
ジギタリス	7	定常期	1.013~1.015	1.35	95.7~96.6
ムギ	7	定常期	1.023~1.026	1.30	91.3~92.3
イネ	7	対数増殖期	1.053~1.055	1.33	83.1~83.7
イネ	12	定常期	1.035~1.040	1.42	90.5~91.7

第1図 (A) *Catharanthus roseus* (ニチニチソウ) の培養細胞と (B) 模擬細胞 (5.8% 粒状寒天) の顕微鏡写真⁵⁾ (いずれの資料も, メチレン・ブルーであらかじめ染色)

$$\frac{dc}{dt} = k_{La}(C^* - C) - K_r \cdot M \quad (1)$$

ここで, C は時間 t での溶存酸素濃度, C^* は培養液における飽和酸素濃度, k_{La} は酸素移動容量係数 (酸素供給能の指標), K_r は細胞の比呼吸速度, M は細胞密度である. 実際の高密度細胞培養液の k_{La} の測定に当って, 細胞の酸素消費量項 ($K_r \cdot M$) があるため, 測定が不正確で技術的に問題があり, 解析も複雑となる. そこで, 呼吸活性の欠如した模擬の植物細胞を用いて, 培養系における酸素供給能の測定を行うことにした. まず, 模擬細胞の選定について検討した. この場合, 用いる模擬細胞は, 形状, 大きさ, 比重, 含水量などの諸物性が植物細胞の諸物性と類似するだけでなく, それらを含む懸濁液の流動特性が植物細胞の培養液の流動特性と類似することが, 必要十分条件である. 種々の検討の結果, 模擬植物細胞として, 5.8% の寒天ゲルをホモジナイザーで細かに破碎して, 必要な大きさにふるい分けした粒状寒天が, それらの条件を満たすことが明らかにされた. 実際の植物 (ニチニチソウ) 細胞とこの粒状寒天の模擬細胞の顕微鏡写真を第1図に示した. この粒状寒天の懸濁液において得られる酸素供給能 (k_{La}) をもって, 培養系における酸素供給能の定量的指標とした. なお, k_{La} の測定は, チッ素ガスによる gassing-out 法により, 溶存酸素計を用いて行った⁷⁾.

② 酸素供給のための機械的操作による細胞への物理的影響の強さの定量的指標

植物細胞に与える剪断応力などの物理的影響度を定量的に測定する方法は, これまで開発されていない.

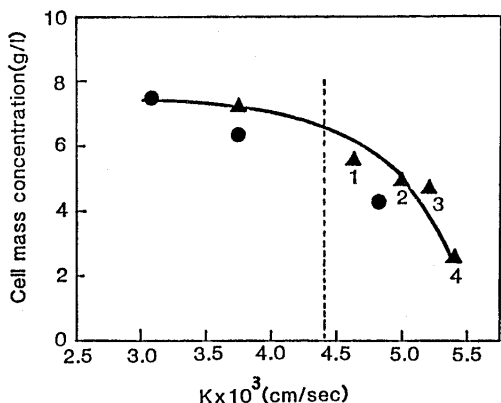
Hixon と Crowell⁸⁾ は, かく拌槽において固体粒子の液中における物質溶解速度係数 (K) が, 用いる装置の操作条件, 構造や規模, 固体や液体の物性, 固体粒子の形状や大きさ等の関数であることから, かく拌系において, K 値の大きさにより, かく拌の強さが比較できることを明らかにした. 固-液系のかく拌において, 固体粒子の溶解速度は次式で表わせる.

$$\frac{ds}{dt} = K \cdot \frac{A}{V} (S^* - S) \quad (2)$$

ここで, S は時間 t における固体の溶解濃度, S^* は固体の溶液における飽和濃度, K は物質溶解速度係数, A は固体粒子の総表面積, V は溶液量, t は時間である. いま, 難溶性の固体の場合, 短時間での溶解による粒子表面積の変化が無視でき, A を一定として (2) 式を積分すると (3) 式が得られる.

$$K = \frac{V}{A \cdot t} \ln \frac{S^*}{S^* - S} \quad (3)$$

所定条件下での K 値は, $\ln (S^* - S)$ と t との直線関係の傾きより求められる. 著者は, 固-液系において, K 値の大小を支配している因子のほとんどが, 細胞 (集塊) の破壊損傷に係わる因子と同じであろうという考えの下に, 細胞に与える剪断応力の物理的影響の強さを間接的な方法で定量的に把握することにした. すなわち, 培養液中の細胞系に変わる類似したモデル系を選定し,

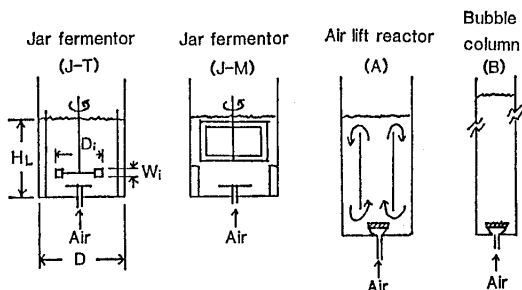


第2図 種々のフラスコ培養条件における *Cudrania tricuspidata* 細胞の15日間培養の増殖細胞量と、それらの培養条件における細胞に与える物理的影響の強さ K との関係⁶⁾
 ●; 500 ml 肩付きフラスコ (液量 100 ml), 85, 100, 120 (往復/分), ▲: 500 ml 三角フラスコ (液量 100 ml), 130 (回転/分) 数値は邪魔板数を示す。

同じ培養装置で、同じ培養条件下で得られる固-液モデル系の K 値をもって、その条件における細胞に与える剪断応力の影響の強さを示す定量的指標とした。なお、植物細胞の模擬細胞として、比重(密度)が植物細胞とおおよそ等しく、水に難溶性の β -ナフトールを選定し、植物細胞-培養系のモデル系として、 β -ナフトール-水系を用いた。植物細胞集塊のうちで、そのサイズが大きいものほど物理的影響を受け易いことから、 β -ナフトールを大きな細胞集塊サイズにほぼ等しい円筒型(径 2.0 mm, 長さ 2.0 mm)の粒子に整形したものを用いた。

以上のように確立した2指標を用いて、次に、種々の培養装置の高密度細胞用培養装置としての性能を判定した。

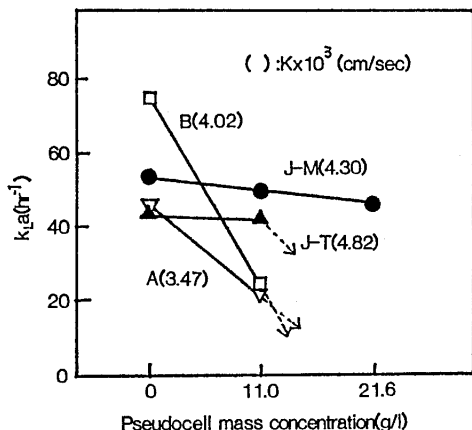
まず、装置の性能判定のための基礎的検討として、種々の培養条件での懸濁培養における細胞増殖と、それぞれの培養条件の細胞に与える物理的影響の強さの関係を検討した。すなわち、植物細胞として、*Cudrania tricuspidata* (ハリ桑) 細胞を例にとり、種々の条件でのフラスコ培養で15日間培養して得られた細胞量と、それらの培養条件における細胞に与える物理的影響の強さ(K)との関係を検討した(第2図)。なお、いずれの培養条件においても、酸素移動速度が細胞増殖の律速因子となっていないことは確認されている。この図から明らかなように、 K 値の増大につれて細胞量の減少が認められ、細胞増殖が、細胞に与える物理的影響の強さに支配されることが示唆された。ハリ桑細胞の場合、細胞への物理的



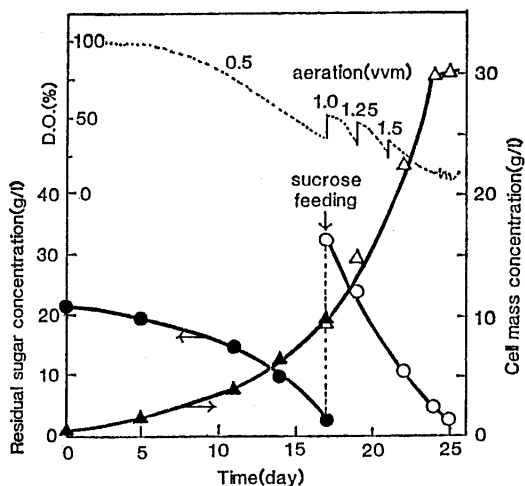
第3図 種々の懸濁培養装置の概略図⁶⁾
 平羽根タービン型インペラー付き培養装置(J-T)、変形パドル型インペラー付き培養装置(J-M)、エアリフト型培養装置(A)、気泡塔型培養装置(B)。装置の規模・培養条件の詳細は文献6)を参照

影響の強さが K 値で 4.4×10^{-3} (cm/sec) 程度までは、ほぼ正常な増殖を示すものと推定された。

次に、このハリ桑細胞の高密度懸濁培養を行うという前提の下で、種々の培養装置が高密度細胞用培養装置として、どの程度の性能を示すかを検討した。用いた培養装置は第3図に示すように、通気かく拌培養装置として、微生物細胞培養に一般的に用いられている、平羽根タービン型インペラー付き装置(J-T)と、著者らが開発した変形パドル型インペラー付き装置(J-M)⁶⁾の2種類、通気型培養装置として、エアリフト型装置(A)と気泡塔型装置(B)の2種類である。これらの培養装置において、ハリ桑細胞が正常な増殖を示す、細胞への物理的影響の強さが、 K 値で 4.4×10^{-3} (cm/sec) 以下の培養条件を設定し、その条件下における高密度細胞懸濁液の混合状態の観察と酸素供給能($k_L a$)の測定を、植物細胞のかわりに模擬細胞(5.8% 粒状寒天)を用いて行った(第4



第4図 種々の培養装置における酸素供給能($k_L a$)におよぼす(模擬)細胞濃度の影響⁶⁾



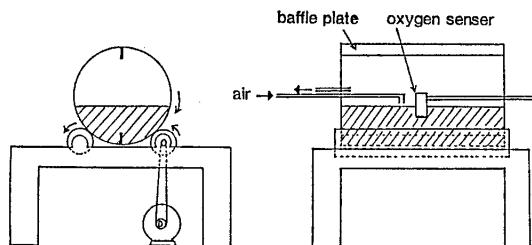
第5図 10 l J-M 培養装置における *Cudrania tricuspidata* (ハリ桑) 細胞の高密度培養⁶⁾

図). いずれの装置においても, 細胞濃度の増大に伴い, 懸濁液の混合状態が不均一となり, 気泡の分散度が低下することが観察され, その結果, k_{La} は減少した. その減少度合は, 通気型培養装置が, 通気攪拌型装置にくらべ顕著であった. 通気型培養装置 (A) および (B) では, Wilson⁴⁾ がすでに指摘したように, 細胞密度が 2% を越すと, 装置内の混合状態が不完全となり, 溶存酸素の値も正確に得られなくなり, k_{La} 測定が不可能となった. 通気攪拌培養装置のうち, (J-T) も同様に細胞密度が 2% を越すと k_{La} の測定が不可能となったが, (J-M) では装置内の均一性および気泡の分散は十分に保たれ, k_{La} の減少はほんのわずかにすぎなかった.

以上の結果より, 高密度細胞用培養装置としては, 通気型培養装置よりも通気かく拌型装置の方がすぐれており, 特に, 変形パドル型インペラー付き培養装置のような, 大きなインペラーで, 液全体をかく拌するようなタイプの装置が適していることが明らかとなった.

この変形パドル型インペラー付き培養装置を用いて, 高密度細胞培養を実際に行った例として, ハリ桑細胞の培養結果を第5図に示した. 液量 5 l 容培養装置において, K 値が 4.4×10^{-3} (cm/sec) 以上の通気かく拌条件下で培養した. すなわち, かく拌速度は 60 rpm で, 酸素が細胞増殖の律速因子とならないように, 通気量を細胞増殖に合わせて, 0.5~1.5 vvm と段階的に増大させた. 基質 (sucrose) は阻害を避けるため初濃度 2.2% とし, 培養途中で 3% 添加した. その結果, ほぼ 3% の高密度細胞を得ることができた.

このほかに, 高密度細胞用培養装置として, 著者ら⁹⁾ が開発した回転ドラム型培養装置 (第6図) も使用可能



第6図 回転ドラム型培養装置の概略図⁹⁾

である. 三井石油化学 (株) の研究グループは, 変形パドル型インペラー付き培養装置および回転ドラム型培養装置の両装置を用いて, *Lithospermum erythrorhizon* (ムラサキ) 細胞の高密度大量培養によるシコニン生産に成功している¹⁰⁾.

なお, 空気のかわりに純酸素ガスを通気したり, 空気に純酸素を混合して通気したりすることは, (1)式右辺第一項の C^* を増大することになり, 酸素供給能を飛躍的に増大させるのに有効である. この場合, 機械的かく拌に伴う細胞への物理的影響を低減させた培養条件の設定が可能となり, 上記の培養装置と組み合わせることにより, 高密度細胞の懸濁培養がさらに容易となろう.

本著では, 高密度細胞培養について培養装置を中心に述べてきたが, 高密度細胞培養を成功させるためのほかの要因として, 基質阻害や生産物阻害を考慮した培養法を用いることが有効である. 藤田らは¹¹⁾, 灌流流加培養法で 8% のオウレン細胞の高密度培養に成功しており, それが好例であろう. (1987 年 12 月 22 日受理)

文 献

- 1) Tanaka, H., 1982. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**: 425.
- 2) 青柳秀紀, 田中秀夫, 1987. 昭和 62 年度日本醸酵工学会大会講演要旨集, p. 8.
- 3) Wagner, F., H. Vogelmann, 1976. In "Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application" (ed. by Barz, W., E. Reinhard, M. H. Zenk), p. 245, Springer-Verlag, Heidelberg.
- 4) Wilson, G., 1978. In "Frontiers of Plant Tissue Culture 1978" (ed. by Thorpe, T. A.) p. 169, IAPTC, Calgary.
- 5) Tanaka, H., 1982. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**: 2591.
- 6) Tanaka, H., 1981. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**: 1203.
- 7) Yagi, H., F. Yoshida, 1974. *J. Ferment. Technol.*, **52**: 905.
- 8) Hixson, A. W., J. H. Crowell, 1931. *Ind. Eng. Chem.*, **23**: 923.
- 9) Tanaka, H., F. Nishijima, M. Suwa, T. Iwamoto, 1983. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**: 2359.
- 10) 私信.
- 11) 藤田泰宏, 吉岡利紘, 1987. *醸酵と工業*, **45**: 1204.