

『苦勞を楽しめ』—動物細胞を培養するわけ—

高木 睦

苦勞を楽しめ

私事で恐縮だが、旭化成工業の入社研修冒頭の社長講話の一節に『苦勞を楽しめ』という言葉があった。新しいことに積極的にチャレンジせよ、といった意味だったと思う。しかし、入社後に取り組んだ動物細胞培養による医薬品生産プロセスは世界的にもほとんど前例がなく、苦勞の連続であり、苦勞を楽しむ余裕はなかった。具体的な苦勞話は後ほどお話することとする。しかし、その当時まったく予想しなかったことだが、いわば“苦勞だらけの問題技術”であった動物細胞培養が、今や世界の花形技術となっているのである。たとえば、次世代の医療として期待されている再生医療の中核技術は動物細胞培養技術である。また、世界中の医薬品の売り上げトップ10の中の約半数は動物細胞培養で生産されている。やはり、『苦勞を楽しめ』は正しかったのかもしれない。

動物細胞のどこが苦勞なの？¹⁾

シャーレと寒天培地を使って微生物を培養したことがある人の多くがコンタミ（コンタミネーション、雑菌汚染）を経験されたことがあると思う。本来、目的の菌のみの純粋培養であるべき培養において、目的外の細菌やカビなどの微生物（雑菌）が増殖することであり、培養の失敗を意味する。しかし、雑菌の増殖速度が目的菌の増殖速度よりずっと遅く、雑菌の数が目的菌の数に比べて十分に少なければ、コンタミの影響が無視できる場合もある。

では、動物細胞培養に細菌がコンタミしたら、どうなるか？典型的な動物細胞培養用の容器（100 mm直径のディッシュ）にはほぼ飽和状態の 1×10^7 cellsの動物細胞が培養されているところに、1 cellの細菌が混入したとする。この時点では、動物細胞の数が細菌の数より圧倒的に多いが、24 h後にはどうなるか？ここで、動物細胞の平均倍化時間が短い場合の24 hとし、細菌の平均倍化時間をやはり短い場合の20 minとする。24 h後、動物細胞はやっと2倍に増えて 2×10^7 cellsとなるのに対して、細菌は $24 \times 3 = 72$ 回も分裂し、実に 4×10^{21} cells

にもなる。こうなるともはや動物細胞の培養ではなく細菌の培養となる。要するに、動物細胞培養にはたった1 cellの細菌の混入も許されない、パーフェクトな無菌操作が求められるのである。

筆者の経験から言っても、このパーフェクトな無菌操作は、一般実験室内での火炎法では達成できない。これが可能になるのは、クリーンルーム内に置かれたクリーンベンチが使える場合だけである。これらクリーンルームやクリーンベンチは、特殊なフィルターでろ過した外気を内部に送り込むことにより、雑菌が付着する粒子の空中浮遊が非常に少ない環境、すなわちコンタミがきわめて発生しにくい環境を実現できる。この特殊なフィルターは半導体製造でも使用されているHEPAフィルター（ヘパフィルター、high efficiency particulate air filter）である。このように、動物細胞の純粋培養には、このような高価なクリーンルームとクリーンベンチを兼ね備えた施設が必要だが、それでも無菌操作手技が未熟であるとコンタミが頻発し苦勞させられる。

そこまでして動物細胞を培養するわけは？²⁾

そのような苦勞をしてまでなぜ動物細胞を培養するのか？動物細胞でないと生産できない有用な医薬品があるから、というのが最大の理由であろう。ヒトなどの動物の体内には、免疫作用などのように病気を治そうとするメカニズムが備わっている。そういったメカニズムで中心的な働きをするのは、サイトカインや抗体などと呼ばれるタンパク質（生理活性タンパク質）である。そのような生理活性タンパク質を大量生産して患者に投与すると病状が大幅に改善されることが1970年代頃からわかってきた。

生理活性タンパク質は本来、動物体内で動物の細胞が作っている。動物の細胞では、遺伝子の情報が転写・翻訳され特定のアミノ酸配列のタンパク質ができる。その後、そのタンパク質は「折り畳まれ」、さらに「糖鎖修飾」されて、生理活性タンパク質が完成する。転写・翻訳により作られるいわば“線状”にアミノ酸が連なったタンパク質の中で、特定のアミノ酸同士が相互作用しあって、球状などの“立体的な形”になることが「折り畳む」と

いうことであり、生理活性タンパク質が特定の活性を示すためには必須である。また、アミノ酸が連なったタンパク質の中のセリンやアスパラギンなどの部分に糖がたくさん連なって結合することを「糖鎖修飾」といい、これも生理活性タンパク質の活性に必須である。

問題は、どうやって生理活性タンパク質を大量生産するかである。その第1候補は微生物培養である。古くは醸造、食品生産、近年では抗生物質や酵素生産などの手段として、微生物培養は工業的にも大いに実績がある。生理活性タンパク質のアミノ酸配列を調べて、同じアミノ酸配列のタンパク質を遺伝子組換え技術で微生物に作らせるのは、難しいことではない。しかし、生理活性タンパク質のような巨大なタンパク質を、動物の細胞の中と同じように「折り畳む」ことや、動物の細胞の中と同じ糖を「糖鎖修飾」することは、微生物細胞にはできない。したがって、生理活性タンパク質を微生物培養で大量生産することはほとんどできない。しかし、生理活性タンパク質は本来動物体内で動物の細胞が作るものなので、動物細胞を用いれば、転写・翻訳はもちろんのこと、タンパク質を正しく「折り畳み」、正しく「糖鎖修飾」もでき、本来の活性を持った生理活性タンパク質を大量生産することができる。

再生医療も動物細胞培養で¹⁾

苦勞をしてでも動物細胞を培養する第二の理由は再生医療・細胞治療である。1990年代後半から、胚性幹細胞（ES細胞）に代表されるように種々の幹細胞とその分化・増殖の制御に関わる多くの基礎的知見が急速に報

告され、それらに基づく再生医療の実現が社会的にも期待されている。上記の生理活性物質医薬品生産を目的とした動物細胞培養プロセスでは、細胞により分泌された目的タンパク質が生産物であり、目的タンパク質の生産性をもっとも重要なプロセス変数であるが、再生医療にかかわる細胞培養のプロセスでは細胞そのものが生産物である。したがって、どうしても動物細胞を培養せざるを得ないの言うまでもないが、細胞の増殖だけでなく細胞の分化や三次元化などより困難な細胞加工（“セルプロセッシング”）の技術が求められる。さらに、細胞の性質を変化させるような病原性因子は培養プロセスから完全に除外する必要がある。生理活性物質（バイオ医薬品）生産を目的とした動物細胞培養プロセスに比べてより高度な安全性が求められる。

他にもあるある、動物細胞の厄介な点¹⁾

このように動物細胞培養は医薬品生産・再生医療において必須の技術なのだが、コンタミ以外にも、微生物との違いに起因するいくつかの課題がある。（表1、PDL：population doubling level（平均分裂回数））

微生物は浮遊状態で生存できるのに対して大部分の動物細胞は生存に何らかの面への接着を必要とする接着依存性であるため、動物細胞を効率よく接着するための接着担体が必要である。また接着依存性の細胞を浮遊状態で生存できるようにする浮遊化も医薬品生産にとっては重要な工学的課題である。浮遊化するには、一般的に接着細胞をトリプシン処理などで剥離し、スピナーボトルなどで攪拌培養あるいは振とう培養する。大部分の細胞

表1. 動物細胞の特徴と動物細胞培養の工学的課題

	微生物培養	動物細胞培養	工学的課題
増殖	浮遊	接着依存性 (接触阻止)	接着担体（マイクロキャリアなど） 浮遊化
	無限	有限 (~ 50 PDL)	凍結保存 株化
	高密度	低密度 (~ 10 ⁶ cells/ml)	高密度培養 基本条件最適化（温度、pH、DO）
	世代時間 (h)	世代時間 (d)	雑菌汚染防止技術
せん断力	1000 rpm	100 rpm	低速攪拌方法
深部通気	可	困難	通気方法（エアースプレー、加圧など）
浸透圧	耐性	敏感	浸透圧制御
栄養要求	単純	複雑（血清など）	無血清培地 培地交換技術（特に浮遊培養）
呼吸速度	測定容易	測定困難	オンライン連続測定法

は浮遊状態に置かれて死滅するが、死滅しなかった細胞が増殖を開始するので、これらを選別する。浮遊化した細胞を用いる浮遊培養はもとの接着細胞とは、浸透圧への感受性など挙動が異なることがある³⁾。

微生物が無限に増殖できるのに対して動物細胞は有限回数しか分裂できないため、動物細胞を一時的に凍結保存する技術が必要であり、特に医薬品生産にとっては無限回数分裂できるように動物細胞を株化することも重要である。動物細胞が分裂すると染色体の末端にあるテロメアが短縮し、長さが一定以下になると分裂できなくなる。たとえば、ヒト骨髄から分離された間葉系幹細胞(MSC)を移植に十分な量になるまで増殖させると、増殖するにつれてテロメアが短くなることが報告されている。MSCドナーであるヒトの年齢が高いほど分離された時点のテロメアも短い、年齢に応じてテロメアが短くなる割合よりも、培養中に分裂回数に応じて短くなる割合のほうが急速であった⁴⁾。

動物細胞は微生物に比べてせん断力に弱く、低速攪拌で培養液を混合する必要がある。そのうえ、溶存酸素供給の重要な手段である深部通気(バブリング)もほとんど適用できないため、深部通気に匹敵する溶存酸素供給速度を達成できる新しい通気方法の確立も不可欠である。

動物細胞の複雑な栄養要求を簡便に満足するために動物細胞培養用の培地には動物血清を添加するが、これには病原体混入という安全上の問題があり動物血清を添加しない無血清培地の開発が実用化に当たって非常に重要な課題となる。

動物細胞は浸透圧の変化に感受性であり、浸透圧を一定に維持しながら培養することが基本であるが、浸透圧を変化させることによる培養の制御も可能である。そのため、培養中の栄養源枯渇の際に流加を行う際には浸透圧上昇に配慮が必要である。また、簡便な栄養源補充法としては、流加よりも新鮮な培地に置換する培地交換が多用される。工業スケールでは培養液量も大量となるため培地交換を実施するための装置・操作論も大事な工学的課題である。

動物細胞培養の実用化例一苦勞の連続一

ティッシュプラスミノゲンアクティベータ(tPA)とは がんと並んで日本人の死亡原因の上位にある脳血栓、心筋梗塞の治療では、血管に生成する血栓を溶解することが必須である。血栓の成分としてフィブリンと呼ばれる硬タンパク質があり、通常は前駆体であるフィブリンノーゲンとして血液中に存在している。

血栓溶解剤としての治療薬にはウロキナーゼがあった



図1. tPAの1次構造

が、ウロキナーゼにはフィブリンだけでなくフィブリンノーゲンをも分解する活性があり、血栓治療のために多量投与すると出血などの副作用が起きることがある。これに対して、ティッシュプラスミノゲンアクティベータ(tPA)は、フィブリンと結合するとともに、プラスミノゲンと結合してこれをプラスミンに変換し、このプラスミンがフィブリンを分解溶解する。このためウロキナーゼのような副作用がなく、またウロキナーゼに比べて血栓溶解活性が高いことから、優れた血栓溶解剤と考えられた⁵⁾。

tPAは、もともとヒトの血管内皮細胞が産生する。127個のアミノ酸配列からなり、フィブリンに対して親和性を持つクリングル構造を2個有する、60~70 kDaの糖タンパク質である(図1)。血中濃度の維持に糖鎖が必要なこと、分子内にS-S結合を10個以上も形成する複雑な構造を有することから、大腸菌などの微生物での生産は困難であり、動物細胞培養により生産される。旭化成はtPA生産のためにヒト胎児肺細胞の接着大量培養(マイクロキャリア培養)技術を確立し、1988年9月に製造承認申請し、1991年3月日本ではじめてtPA製剤(プラスベータ)の販売を開始した。

動物細胞、それもヒト細胞を大量に安定に培養するプロセスは、それまで世界的にもほとんど例がなかったことから、培養技術の確立は数々の困難を極めた。

汚染防止 すでに述べたように、動物細胞の分裂増殖に要する時間は微生物の場合の数倍以上と長いことから、動物細胞を安定に培養するためにはパーフェクトな無菌化技術が必要となる。パイロットタンクに作製した数百リットルもの高価な培地が、翌朝には雑菌汚染で真っ白になっていることが度々あった。その都度、配管

などの設備および操作方法の改良を繰り返した結果、当初は購入品であったパイロットプラントはタンク缶体本体を除けば隅から隅まで旭化成オリジナルに生まれ変わった。

一般的な微生物よりも恐ろしいマイコプラズマやウイルスというコンタミがある。動物細胞培養用の液体培地は、熱に不安定なために、通常0.2 μm程度のポアサイズの膜で濾過し除菌するが、マイコプラズマやウイルスはこれらを通過するため、一旦混入すれば除去は不可能である。またマイコプラズマやウイルスにより細胞や培地が汚染されても、プロセスに顕著な影響が認められないことが多い。tPA 開発プロジェクトもマイコプラズマやウイルスのために1年程度の期間停滞を余儀なくされたが、厳重な操作および原料品質の管理体制により解決された。

培地原料の水の品質管理も重要である。自社で水を供給する場合には培地に適した水の安定な製造技術の確立も必須で、購入品の場合も、培養プロセスに投入するまでの間での汚染をいかに防ぐかハード、ソフト両面での工夫が必要である。

継代培養設計 保存アンプル（ワーキングセルバンク）1本中には通常 1×10^6 個程度の細胞を入れる。仮に最終スケールが 1 m^3 で播種細胞密度が 1×10^5 個 ml^{-1} の場合、 10^5 倍（ $\approx 2^{16.6}$ 倍）に細胞を増やす必要がある。動物細胞培養における1ステップ当たりの増殖倍率はせいぜい50倍程度であるから、最終スケールで播種するまでに、最低でも3ステップ程度の継代培養と3週間以上の時間が必要となる。この過程をいかに汚染なく、安定に、しかも簡略に行うかの設計は重要であった。

基本的培養条件の設計 動物細胞培養における細胞密度は、溶存酸素供給やせん断力の問題などから最大でも 1×10^7 個 ml^{-1} と低いため培養装置単位体積当たりのタンパク質生産性（リアクター生産性）を上げるためには、細胞当たりの生産性（比生産速度）を上げるか、細胞密度を上げるか（高密度培養）になる。このうちtPAの比生産速度の向上に関しては培地成分、特にタンパク質加水分解物の添加が効果的であった。

細胞増殖後に長期間にわたってtPAを分泌するので、温度、pH、溶存酸素濃度（DO）などの基本操作条件は、細胞増殖とtPA生産の両方についてそれぞれ最適化した。

現在と多少事情は異なっていたものの、ウシ血清はコスト、品質の両面で問題があり、対応が必要であった。

溶存酸素供給、高密度化 動物細胞は微生物細胞と異なりせん断力などの機械的外力に弱いため、高い攪拌速度や深部通気を採用できず、低攪拌・表面通気が基本



図2. tPA 製造培養プラント

である。スケールアップに伴い培養液体積当たりの気液界面積が減少するので、スケールアップや高密度培養に際しては溶存酸素供給が最大の工学的課題であった。

そのため培養槽および攪拌羽根の設計、種々の新規通気方法の検討を行った。それらの中でもっとも効果的な方策の一つが加圧培養であった。ただし、加圧が動物細胞に与える影響は当時ほとんど調べられておらず、それ以降に研究された^{6,7)}。

一方、溶存酸素供給速度を上げ高細胞密度を達成しても、tPAの場合も高細胞密度になるほど比生産速度は顕著に低下した。検討の結果、培地成分中の脂溶性成分が高細胞密度で不足することが見いだされた。

自動化 一般の製造プロセスと同じように、tPA 製造プロセスも最終的には自動化による人件費削減が必須課題であった。培養プロセスの自動化にはシーケンス制御やオンオフ制御の他に、培養状態、特に細胞活性のモニタリングが必要である。

微生物培養プロセスで一般化している酸素消費（呼吸）速度のオンライン測定技術は、微生物培養に比べて細胞密度が非常に低い動物細胞培養には適用できなかった。そこで、培養に外乱を与えず、コストもかからない、動物細胞培養用の酸素消費速度のオンライン連続測定法が独自に開発された⁸⁾。

以上、多くの研究者、技術者の検討の集大成として建設された工場設備の一部を図2に示す。

最後に 一安心してください

動物細胞を培養したことがない方々は、ここまで読まれて「動物細胞の培養は難しいからやりたくない」と思われたかもしれない。しかし、安心してください。ここまで読まれたことの多くが過去のこと。現在は培養技術もずっと進歩し、もはやアートではなくテクノロジーと

呼んでいただろう。そのおかげで、動物細胞培養のニーズは、医薬品生産や再生医療に留まらず拡大している。そこには、新たなチャレンジがあるはずである。やはり『苦勞を楽しめ』である。

文 献

- 1) 高木 睦：セルプロセッシング工学, p. 3, コロナ社 (2007).
- 2) 日本生物工学会編：ひらく, ひらく「バイオの世界」14歳からの生物工学入門, p. 78, 化学同人 (2012).
- 3) Takagi, M. *et al.*: *Cytotechnology*, **32**, 171 (2000).
- 4) Nakahara, M. *et al.*: *Cytotechnology*, **47**, 19 (2005).
- 5) Hasegawa, A. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **150**, 1230 (1988).
- 6) Takagi, M. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 301 (1994).
- 7) Gong, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 79 (2003).
- 8) Takagi, M. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 709 (1994).