

〔生物工学会誌 第74巻 第6号 435-441. 1996〕

# 精密ろ過ホローファイバー培養装置を用いた組換え BHK 細胞による tPA の連続生産

棚瀬 高明<sup>1,2\*</sup>・池田 靖典<sup>1</sup>・岩間 潔<sup>1</sup>・橋本 明<sup>1</sup>  
片岡 恒彦<sup>1</sup>・小林 猛<sup>2</sup>

エーザイ(株),<sup>1</sup> 名古屋大学大学院工学研究科生物機能工学専攻<sup>2</sup>

<sup>1</sup>〒300-26 つくば市東光台5-1-3

<sup>2</sup>〒464-01 名古屋市千種区不老町

(平成8年6月5日受付 平成8年8月2日受理)

## Continuous Production of tPA by Recombinant BHK Cells in a Micro-Filtration Hollow Fiber Bioreactor

TAKAAKI TANASE,<sup>1,2\*</sup> YASUNORI IKEDA,<sup>1</sup> KIYOSHI IWAMA,<sup>1</sup> AKIRA HASHIMOTO,<sup>1</sup> TSUNEHICO KATAOKA,<sup>1</sup>  
and TAKESHI KOBAYASHI<sup>2</sup> (*Eisai Co. Ltd., 5-1-3 Tokodai, Tsukuba 300-26<sup>1</sup> and Department of  
Biotechnology, Faculty of Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-01<sup>2</sup>*) *Seibutsu-kogaku*  
74: 435-441, 1996.

Continuous cultivation of recombinant Baby Hamster Kidney (BHK) cells producing tissue plasminogen activator (tPA) was carried out in a micro-filtration hollow fiber (MFHF) bioreactor using Dulbecco's Modified Eagle's medium with serum. Stable, continuous cultivation for 66 d was possible, compared with a stoppage of cultivation at 40 d in the case of an ultra-filtration hollow fiber (UFHF) bioreactor. After the cells were fully grown, the serum concentration was decreased from 5% to 1%, but the tPA productivity remained at the same level continuously. The mean tPA concentration was 17.1 mg/l and the mean daily tPA production was 590 mg/d. The tPA productivity was 150 mg/d/m<sup>2</sup> in the case of the MFHF bioreactor. As the medium in the MFHF bioreactor was evenly supplied from the intra-capillary to the extra-capillary space, the tPA productivity of this bioreactor was 16% better than that of the UFHF type. The simplified culture system of the MFHF bioreactor make it suitable for commercial-scale tPA production.

[**Key words:** mammalian cell culture, micro-filtration hollow fiber, BHK cells, tPA production]

遺伝子組換え技術の発展に伴い、多くのタンパク質が遺伝子組換え細胞の培養によって工業生産されるようになってきた。これらのタンパク質のうち、糖鎖が付加されているタンパク質の場合には動物細胞を培養して生産<sup>1)</sup>されている。たとえば、インターフェロンなどであるが、これらの医薬品の生産のために数千リットル規模のタンクによる培養生産<sup>2)</sup>が報告されている。しかし、この方法は細胞密度を高くすることが難しく、血清の所要量が大きくなり、目的のタンパク質

の生産性が低く、また酸素の供給方法などにも問題がかかっている。

物質生産を考えた場合の培養法としては、高い細胞密度が得られ、均一な条件で培養でき、装置がコンパクトであることが望ましい。近年、種々の高密度細胞培養法<sup>3-12)</sup>が開発されてきた。これらの培養法の中で、Knazek ら<sup>4)</sup>によって開発されたホローファイバー培養法がもっとも高い細胞密度<sup>5,13)</sup>が得られると考えられたので、我々は組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA) を生産する遺伝子組換え Baby Hamster Kidney (BHK) 細胞のホローファイバー培養法による生産

\* 連絡先, Corresponding author.

について検討した。

ホローファイバー培養法のメリットは、1) コンパクトな装置で高密度に細胞を培養できる、2) 細胞が攪拌などによる機械的なダメージを受けない、3) ベッドボリュームが小さいのでシステム内の培養液の滞留時間を調節できる、4) 細胞と生産物の分離が容易、5) ホローファイバー培養装置の数を増減することによってスケールを大きくできる、などである。特に、限外ろ過 (ultra-filtration; UF) ホローファイバー<sup>14)</sup>を用いることにより、細胞あたりの目的タンパク質の生産性が低い場合でも、ホローファイバー外側 (extra-capillary space; ECS) で目的タンパク質を濃縮できる。また、血清やフェリチンなどの高価な高分子成分の使用量が削減でき、<sup>15)</sup> アンモニアなどの低分子老廃物が ECS からホローファイバー内側 (intra-capillary space; ICS) に排出され、細胞の生育環境が良好に保持できる、とされている。しかし、ECS のいわゆる Starling Flow により培養液の流れが常に一方方向の場合には、目的のタンパク質や抗体が出口側に局在化<sup>16)</sup>するといった欠点も報告されている。また、これまでは診断用のモノクローナル抗体の生産といった比較的小規模の生産量でよい場合についてのみ研究されており、tPA のような治療用のタンパク質生産といった大規模な生産量が要求される場合の研究はなかった。

tPA を生産する場合、tPA はタンパク質分解活性を本質的に有することを考慮する必要がある。したがって、tPA を培養環境中に長時間滞留させることは tPA の自己消化の危険性を高める原因となり、tPA の質と量の低下をもたらすことになる。そのため、UF ホローファイバー培養装置を用いると、たとえベッドボリ

ュームが小さくても、生産された tPA は ECS で濃縮されて長時間滞留することとなり、tPA の生産にとっては好ましくない状況になると予想された。培地を ICS から ECS にのみ供給することによって、tPA の培養環境下での滞留時間を短くすること、および培地成分の均一な供給と老廃物の除去が可能である。そこで、我々はすべての培地成分が膜を通過することが可能な精密ろ過 (micro-filtration; MF) ホローファイバーを用いる培養システムを考案した。

血清含有 DME 培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Media) で tPA を生産する BHK 細胞の連続培養を MF ホローファイバー培養装置を用いて実験し、UF ホローファイバー培養装置を用いた実験と比較検討し、その有用性が見いだされたので報告する。

## 実験方法

**実験材料** 細胞としては、tPA を生産する組換え BHK 細胞<sup>17)</sup>を用いた。tPA 遺伝子の発現は上流にあるメタロチオネインプロモーターによって支配されている。<sup>17)</sup> 培地としては、DME 培地 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) を基本とし、牛胎児血清を添加し、 $\text{NaHCO}_3$  を 2.5 g/l、グルコースを 3.0 g/l、フルクトースを 1.5 g/l に調製し、ろ過滅菌をして用いた。

培養装置に用いたホローファイバーには、UF ホローファイバーの場合には Endotronics 社製の Acusyst P/3X 用 (再生セルロース製、膜面積 0.8 m<sup>2</sup>, EC 容量 100 ml, 分子量カット 8,000) のものを 6 本使用し、また、MF ホローファイバーの場合には旭メディカル社製のカルチャーフロー L01 (ポリエチレン製、膜面

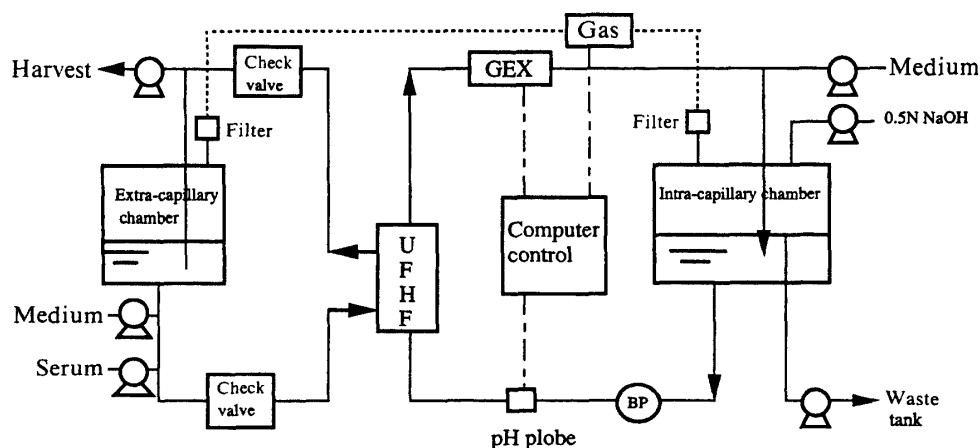


Fig. 1. Schematic diagram of ultra-filtration hollow fiber bioreactor system. UFHF, Ultra-filtration hollow fiber bioreactor; GEX, gas exchanger; BP, bellows pump.

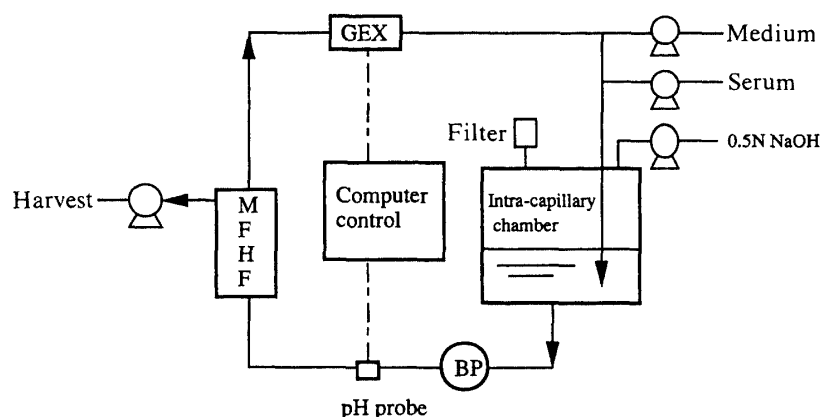


Fig. 2. Schematic diagram of micro-filtration hollow fiber bioreactor system. MFHF, Micro-filtration hollow fiber bioreactor; GEX, gas exchanger; BP, bellows pump.

積  $0.65 \text{ m}^2$ , EC 容量  $72 \text{ ml}$ , 最大孔径  $0.4 \mu\text{m}$ ) 6本を用いた。ガス交換器 (ポリプロピレン製ホローファイバー) は, Endotronics 社製の Acusyst P/3X 用を用いた。

UF ホローファイバー培養装置としては Acusyst P/3X を用い, 基本的な培養操作は Acusyst のマニュアルに従った。この培養システムは, Fig. 1 に示すように 2つのチャンバーを交互に加圧することにより, ECS と ICS の間で培地が交互に移動する (RISE-FALL) 方式のため, ECS 循環ラインには液が逆流しないように, 逆止弁が設置されている。培地は ECS と ICS から供給され, IC チャンバーから廃液を系外に排出し, ECS から連続的に培養液を回収した。

MF ホローファイバー培養装置としては, Fig. 2 に示すようにチャンバーを1つにした。この場合には ECS と ICS の間で培地が交互に移動するようなことはなく, 培地は常に ICS に供給され, 同じ流速で ECS から培養液を回収した。

**6 well plate 培養** 6 well plate (Falcon 3046; Becton Dickinson 社製, Lincoln Park, NJ, USA) の各 well に  $1 \times 10^5$  個の BHK 細胞を接種し,  $5\% \text{ CO}_2$  インキュベーター中で,  $36^\circ\text{C}$  で培養した。生細胞数は, トリパンブルー染色後, 血球計算盤を用いて算出した。

**ホローファイバー培養** UF ホローファイバーを使用する場合も MF ホローファイバーを使用する場合も, ホローファイバーに  $10^8$  個の細胞を  $300 \text{ ml}$  の培地に懸濁して均等に接種し,  $36^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 7.2$  で培養した。血清濃度は, まず  $5\%$  で培養を開始し, グルコース消費量がほぼ一定になってから  $1\%$  に下げた。培地は, 培養液中のグルコースが枯渇しないように供給した。培養液の  $\text{pH}$  は, ガス交換器を使って調節したが,

ガス交換で  $\text{pH}$  の維持ができなくなった時には,  $0.5 \text{ N NaOH}$  溶液を加えた。

**分析方法** tPA 濃度は, 二抗体サンドイッチ ELISA 法で測定した。<sup>18)</sup> 培養液の  $\text{pH}$  と溶存酸素濃度 (DO) は, ホローファイバー培養装置の入口と出口について, Blood Gas Analyzer Model 170 (Corning 社製, Medfield, MA, USA) で測定した。培養液中のグルコースと乳酸濃度は, グルコースラクトートアナライザー (Model 2000; Yellow Springs Instrument, Yellow Springs, OH, USA) で測定した。グルタミン濃度は酵素処理後に比色法<sup>19)</sup>にて, アンモニア濃度はインドフェノール法<sup>20)</sup>で測定した。

### 実験結果および考察

**細胞特性** まず, 細胞増殖に対する血清濃度の影響を調べた。培地の  $\text{pH}$  を  $7.2$  に固定し, 血清濃度をそれぞれ  $5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0\%$  に調整した DME 培地で 6 well plate 培養した。なお, 接種用の細胞は, 血清を  $5\%$  含む培地で培養後, 血清不含培地で洗浄し, 各条件の培地に懸濁して接種した。Fig. 3 にその結果を示す。血清濃度が  $0.5\%$  以下では生細胞は減少し, 細胞増殖には血清濃度が  $2\%$  以上必要なことがわかった。血清濃度が  $1\%$  の場合には細胞増殖があまり活発ではなく, 生細胞数がほぼ維持できることも判明した。また, tPA の生産量はほぼ生細胞数に比例していた。以上の結果より, ホローファイバー培養では, 細胞増殖期には血清濃度を  $5\%$  とし, 細胞がよく増殖して高密度となり, その生細胞濃度を維持しつつ tPA を生産する時期には  $1\%$  として培養することとした。

次に, 細胞増殖および tPA 生産量に対する  $\text{pH}$  の影響を知るために,  $\text{NaHCO}_3$  の添加量を変えて, 初期

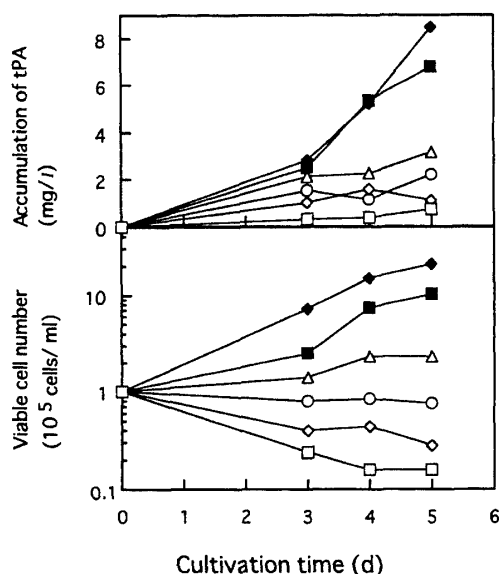


Fig. 3. Effect of serum concentration on cell growth and tPA productivity. Symbols:  $\square$ , 0%;  $\diamond$ , 0.2%;  $\circ$ , 0.5%;  $\triangle$ , 1%;  $\blacksquare$ , 2%;  $\blacklozenge$ , 5%.

pHをそれぞれ6.6, 6.7, 7.0, 7.2, 7.4, 7.5に調節した5%血清含有DME培地で6 well plate培養した。接種用の細胞は、血清を5%含むpH 7.2の培地で培養後、pH 6.6の培地で洗浄し、各条件の培地に懸濁して接種した。Fig. 4にその結果を示す。培養中および培養後のpHは、1検体ずつ注射器で培養液をサンプリングし、Blood Gas Analyzerで測定した。初期pH 6.6および6.7の場合には細胞増殖はよくなかった。初期pH 7.2の場合には、培養時間とともにpHが7以下に低下したにもかかわらず、細胞の増殖は良好であったが、tPAの蓄積量が低かった。初期pH 7.5の場合には、pHは培養の途中には7.5より高くなったが、最終的にはpHは7.2まで低下し、細胞増殖もtPA蓄積量も良好であった。初期pHを7.4とした場合がもっとも良い結果が得られたが、最終的にはpHは7.0まで低下した。これらのことを考慮して、pHを一定に制御できるホローファイバー培養の場合には、pHの設定値は7.2とすることにした。

**UFホローファイバー培養** まず、UFホローファイバー培養装置を用いた場合を検討した。tPAを生産するBHK細胞の40日間の培養結果をFig. 5に示す。血清濃度は5%で開始し、26日目に1%に変更した。tPAの生産に関しては、培養開始後徐々に増加し、20日目以降はほぼ一定となった。20日目以降40日目までの1日あたりのtPA生産量は平均621 mg/dで、平均濃度は17.9 mg/lであった。

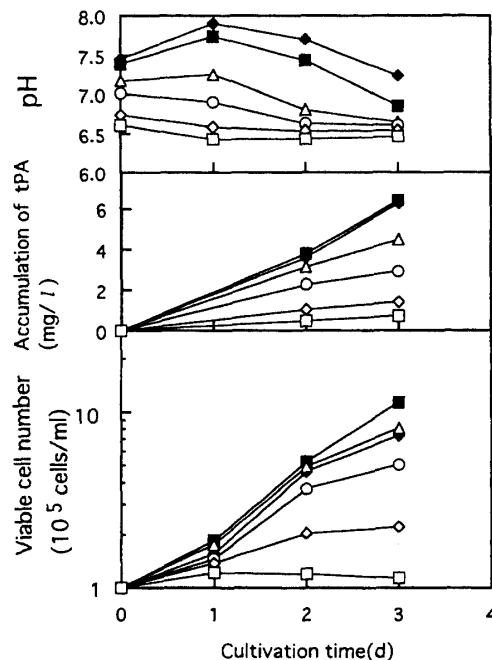


Fig. 4. Effect of initial pH on cell growth and tPA productivity. Symbols:  $\square$ , 6.6;  $\diamond$ , 6.7;  $\circ$ , 7.0;  $\triangle$ , 7.2;  $\blacksquare$ , 7.4;  $\blacklozenge$ , 7.5.

tPAの生産期における培地供給量は平均43.2 l/dであった。老廃物の除去のため、平均7.8 l/dを廃液として排出し、それ以外を培養液として回収した。培養液中のグルタミン濃度はほぼ2 mMであったので、グルタミンが増殖を制限していることはない。BHK細胞は、2 mM以上のアンモニア濃度になると増殖阻害が認められる<sup>21)</sup>が、培養液中のアンモニア濃度は0.15 mM以下であった。培養液中の乳酸濃度は培養終期を除けば3.2 g/l以下で、6 well plate培養の結果では増殖阻害があまり認められない乳酸濃度であった。このことから、培地の供給はグルコース濃度を指標として、グルコースが欠乏しないようにすればよいことが確認できた。また、6 well plate培養におけるグルコース消費量は6 mg/10<sup>6</sup> cells/dであったので、この値がホローファイバー培養の場合にもそのまま適用できると仮定すれば、ホローファイバー培養においては最終到達細胞数は1.6×10<sup>10</sup>個（最終到達細胞濃度として1.6×10<sup>8</sup>個/ml）であったと考えられる。

UFホローファイバー培養の場合、上記したようにRISE-FALLシステムによって培地の流れを交互に交換する。この培地を交互に移動する時間は、培養初期には10分程度で一定であった。培養日数が長くなるに従い、ICSからECSに培地が移動する時間は変わらなかったが、ECSからICSに培地が移動する時間は

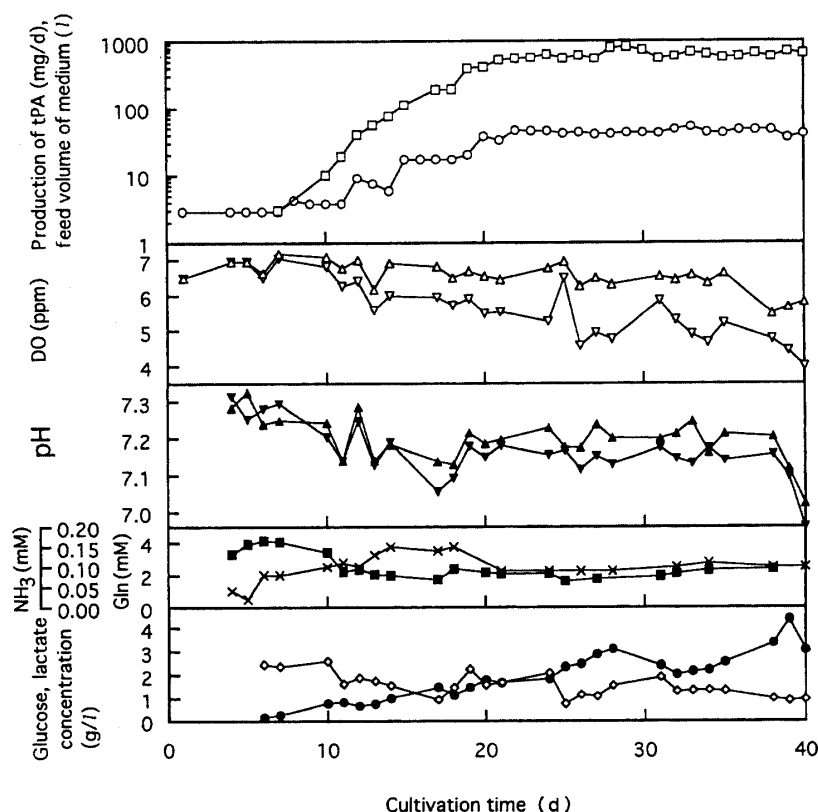


Fig. 5. Culture in ultra-filtration hollow fiber bioreactor system. Symbols:  $\square$ , production of tPA;  $\circ$ , feed volume of medium;  $\Delta$ , inlet DO;  $\nabla$ , outlet DO;  $\blacktriangle$ , inlet pH;  $\blacktriangledown$ , outlet pH;  $\blacksquare$ , glutamine concentration;  $\times$ ,  $\text{NH}_3$  concentration;  $\diamond$ , glucose concentration;  $\bullet$ , lactate concentration.

徐々に長くなり、培養終了時には40分となった。このような状態では、ECS への新鮮な培地の供給と ICS からの老廃物の速やかな除去が困難になる。

この原因としては、培養日数の経過とともに増殖した細胞がホローファイバー上に蓄積した<sup>22)</sup>ため、ECS から ICS への培地の膜通過抵抗が増大したことによるものと考えられる。さらに長期の培養を行う場合、ECS の環境状態の悪化により生細胞数が減少し、tPA の生産量が低下することが推測される。なお別の培養においては、長期間連続培養していると、ECS から ICS への培地移動が16時間以上経過しても終了しないことがあった。長期連続培養し、tPA の生産量を一定に保つためには、個々の細胞の生育環境が良好に維持される必要があるが、UF ホローファイバー培養の場合には増殖した細胞がホローファイバー上に蓄積することは本質的に避けられず、長期間細胞の生育環境を良好な状態に維持することは困難であると考えられる。

**MF ホローファイバー培養** MF ホローファイバー培養装置を用いた BHK 細胞の66日間の培養結果

を Fig. 6 に示す。UF ホローファイバーの場合と同様の条件で培養し、27日目から血清濃度を5%から1%に変更した。培養液中の乳酸濃度は培養期間中2.5 g/l 以下に保たれていた。pH も若干変動しているが、ほぼ7.2に制御された。tPA の生産はUF ホローファイバーの場合より短い培養期間で高い値に達し、9日目には208 mg/dであった。28日目以降のtPA 濃度は平均17.1 mg/l で、生産量は平均590 mg/dであった。なお、28日目から41日目までの平均生産量は586 mg/dであり、42日目から66日目までの平均生産量は592 mg/dであった。このようにtPA の生産量は培養時期によらず一定で、安定していることが明らかになった。培養を66日で停止したが、安定した運転状況からさらに長期間の培養も可能と考えられる。

培地供給量は平均34.4 l/dであるが、UF ホローファイバー培養と膜面積あたり同じ量とした。したがって、グルコース消費量と培養液中の乳酸濃度も同じレベルに維持された。tPA の生産が安定している期間における膜面積あたりのtPA の生産量を比較すると、UF ホローファイバー培養の場合には129 mg/d/m<sup>2</sup>で

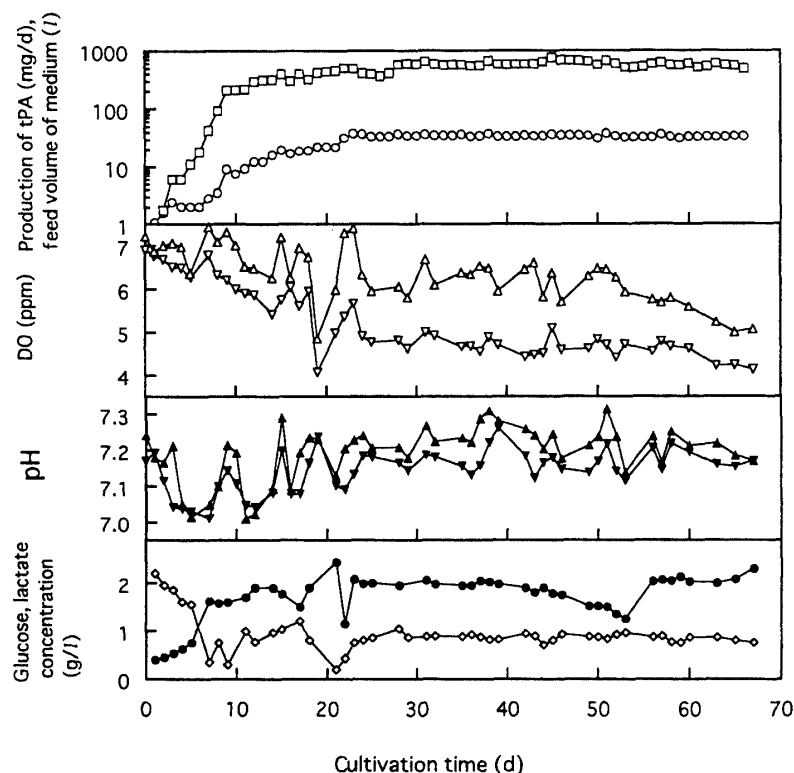


Fig. 6. Culture in micro-filtration hollow fiber bioreactor system. Symbols are the same as in Fig. 5.

あり、MF ホローファイバー培養の場合には 150 mg/d/m<sup>2</sup> であった。後者の生産量が膜面積あたり 16% 改善された。この原因としては、RISE-FALL システムによる培地の供給方法よりも、ICS に培地を供給し ECS から培養液を連続的に回収する方法のほうが、付着細胞に対して均一な培地の分配が可能になるためと考えられる。すなわち、MF ホローファイバー培養の場合にはグルコースと乳酸の ECS と ICS の濃度差は最大で 0.03 mM であり、ほとんど同じ濃度であった。また MF ホローファイバーでは、培地の流れがファイバーの内側から外側への一方向だけであったため、debris などが孔に入り込み閉塞しなかったと考えられた。

MF ホローファイバー培養システムでは、UF ホローファイバー培養システムに比べ、使用するポンプ数とチャンバーが削減され、圧力調整システムと廃液タンクが撤去できた。制御操作も簡略化され、雑菌汚染と機械的な故障の可能性も少なくなった。工業化レベルの培養を行う場合に、培養装置として MF ホローファイバーを用いることは非常に有用であることが明らかとなった。

## 要 約

MF ホローファイバーを用いた培養システムを考案し、血清含有 DME 培地での組換え BHK 細胞による tPA の連続生産について検討した。連続 66 日間培養し、28 日目以降、血清濃度は 1% に低下させたが、非常に安定して運転できることがわかった。この期間の平均の tPA 濃度は 17.1 mg/l、生産量は 590 mg/d、膜面積あたりの生産量は 150 mg/d/m<sup>2</sup> であった。また、MF ホローファイバーを用いることにより均一な培地成分の供給が可能となり、UF ホローファイバーを用いた場合よりも膜面積あたりの tPA の生産量を 16% 改善することができた。さらに、MF ホローファイバー培養システムは、装置および操作が大幅に簡略化でき、工業的な長期連続培養で非常に有用であることが示唆された。

## 文 献

- 1) 早川堯夫：フェルマシア，27，1143-1147 (1991).
- 2) Pullen, K. F., Jonson, M. D., Phillips, A. W., Ball, G. D., and Finter, N. B.: *Develop. Biol. Standard*, 60, 175-177 (1985).
- 3) Knight, P.: *Bio/Technol.*, 7, 459-461 (1989).

- 4) Knazek, R. A., Gullino, P. M., Kohler, P. O., and Dedrick, R. L.: *Science*, **178**, 65-67 (1972).
- 5) Mancuso, A., Fernandes, E. J., Blanch, H. W., and Clark, D. S.: *Bio/Technol.*, **8**, 1282-1285 (1990).
- 6) Hopkinson, J.: *Bio/Technol.*, **3**, 225-230 (1985).
- 7) 丹羽国守: 組織培養, **18**, 265-269 (1992).
- 8) Lydersen, B. K., Pugh, G. G., Paris, M. S., Sharma, B. P., and Noll, L. A.: *Bio/Technol.*, **3**, 63-67 (1985).
- 9) Mckillip, E. R., Giles, A. S., Levner, M. H., Hung, P. P., and Hjorth, N.: *Bio/Technol.*, **9**, 805-810 (1991).
- 10) 水谷 悟: 組織培養, **18**, 249-254 (1992).
- 11) Knight, P.: *Bio/Technol.*, **7**, 459-461 (1989).
- 12) Ogata, M., Marumoto, T., Oh-i, K., Shimizu, S., and Kato, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **7**, 46-51 (1994).
- 13) Knazek, R. A., Kohler, P. O., and Gullino, P. M.: *Experimental Cell Res.*, **84**, 251-254 (1974).
- 14) 熊沢久子: 細胞工学, **14**, 1344-1350 (1995).
- 15) Hopkinson, J.: *Bio/Technol.*, **3**, 225-230 (1985).
- 16) Piret, J. M. and Cooney, C. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 902-910 (1990).
- 17) アイリーン・アール・マルビヒル, パトリック・ジェイ・オハラ, ビヨルン・アー・ネグゾー, 吉武新次, 池田靖典, 鈴木 豪, 橋本 明, 杠輝明: 日本特許, 特開昭 64-85079 (1989).
- 18) Wang, J., Hata, M., Park, Y. S., Iijima, S., and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 321-326 (1994).
- 19) 田村善藏 (校閲), 由岐英剛 (編集) 生化学分析法, p. 475-477 (1984).
- 20) 田村善藏 (校閲), 由岐英剛 (編集) 生化学分析法, p. 61-63 (1984).
- 21) Butler, M. and Spier, R. E.: *J. Biotechnol.*, **1**, 187-196 (1984).
- 22) Knazek, R. A.: *Federation Proceed.*, **33**, 1979-1981 (1974).