The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

〔生物工学会誌 第80巻 第2号 70–77. 2002〕

総合論文

動物細胞培養に特異的な環境因子に関する培養工学的研究

（平成13年度 日本生物工学会照井賞受賞）

高木 睦

Process Engineering Study on Specific Environmental Factors of Mammalian Cell Culture —Monograph—

MUTSUMI TAKAGI (*International Center for Biotechnology, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871*)
Seibutsu-kogaku **80**: 70–77, 2002.

The effects and control of specific environmental factors on mammalian cell culture and control of their factors were investigated. (1) After studying the basal environmental factors such as temperature, pH, and dissolved oxygen (DO) and developing a low-serum medium, a novel aeration strategy of supplying dissolved oxygen without cell damage in a large scale culture, which involves the usage of an air-spray system and pressurization, was proposed. A practical method for the on-line measurement of respiration rate as an index of the physiological state of cells was developed and applied to a shift of control mode of a microcarrier culture of human embryo lung cells producing the tissue plasminogen activator (tPA). (2) A novel carrier of chemically modified starch particles was developed with the aim of convenient cell separation during medium change in suspension culture of tPA-producing Chinese hamster ovary (CHO) cells. Another cell separation method employing a low centrifugal force was effective in maintaining the specific tPA production rate at high levels during suspension culture. (3) The change in the morphology of adhesive cells and the increase in energy metabolism, which major substrate shifted from glucose to glutamine, were considered to correlate with the increase in the specific production rate of proteins under a high osmotic pressure. The gradual increase and cyclic change of osmotic pressure during culture were found to increase the production of proteins such as monoclonal antibody (MAb) and tPA. Static pressurization at 0.9 MPa increased MAb production by hybridoma cells. These results may be useful to solve specific problems in industrial processes of mammalian cell culture.

[**Key words**: mammalian cell, process engineering, respiration, centrifugation, osmotic pressure, static pressure, animal cell]

はじめに

動物細胞培養プロセスは，1980年代初頭からインターフェロン，インターロイキン，血栓溶解剤ティッシュープラスミノーゲンアクティベーター (tPA) などのタンパク製剤の工業生産手段としてその開発の必要性が，特に高まってきた．この動物細胞培養には発酵工学，微生物培養工学で培われてきた技術の多くを応用できるものの，主として微生物細胞と動物細胞の性質の差異に起因する動物細胞培養特有の工学的課題 (Table 1) が多く存在することが明らかとなってきた．これらの多くが未解決の状態であったことから，本研究者らは培養工学的見地から動物細胞培養における基盤的技術の開発を行った．

本稿では，特に動物細胞の培養における環境因子の影響とその制御に関する研究の中から，(1) 酸素供給など基

著者紹介 大阪大学生物工学国際交流センター（助教授） 〒565-0871 吹田市山田丘2-1
TEL. 06-6879-7456 FAX. 06-6879-7454 E-mail: takagi@icb.osaka-u.ac.jp http://www.icb.osaka-u.ac.jp
1981年大阪大学大学院工学研究科前期課程修了，工学博士 専門分野：動物細胞培養工学，再生医用培養工学

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 1. Engineering subjects regarding mammalian cell cultivation.

	Characteristics		
	Microbes	Mammalian cells	Engineering subjects
Growth	Suspension	Adhesion (contact inhibition)	Cell adhesion carrier (e.g., microcarrier) Adaptation for suspension culture
Reproduction	Infinite	Finite (～ 50 PDL)	Freeze preservation Immortalization
Cell density	High	Low (～ 10^6 cells/ml)	Dense culture Optimization (temp., pH, DO)
Generation time	Short (h)	Long (d)	Highly aseptic operation
Agitation	～ 1,000 rpm	～ 100 rpm	Low shear agitation
Sparging	Possible	Impossible	Surface aeration (e.g., air spray, pressurization)
Osmotic pressure	Tolerance	Sensitive	Osmolarity control
Nutrient demand	Simple	Complicated (e.g., serum)	Serum-free medium Medium change technique
Monitoring of respiration rate	Common	Difficult	On-line measurement

本的培養制御，(2) 培地交換による環境制御，(3) 浸透圧および静圧の制御について報告する．

1. 酸素供給など基本的培養制御

温度，pH，溶存酸素などの環境因子は動物細胞培養においても制御すべき基本的環境因子として重要であり，なかでも酸素供給の方策は動物細胞の脆弱さゆえに解決の困難な課題の一つである．高密度培養において細胞あたりの生産性をいかに維持するか，また，低血清培地あるいは無血清培地開発も重要な動物細胞培養特有の課題の一つである．特に後者は生産性のみならず生産物の品質保証の点に深く関わってくる．さらに，これら種々の環境因子の制御を実行する際に細胞の生理状態を把握するための重要な指標となる呼吸速度のオンライン測定も解決すべき重要な基本的課題であった．これらについて，ヒト胎児肺細胞のマイクロキャリアー培養による血栓溶解剤ティッシュープラスミノーゲンアクティベーター (tPA) 生産を例にあげて検討した．

1-1. 温度，pH，溶存酸素濃度の制御と通気撹拌方策 細胞増殖期とそれに続く tPA 生産期において，それぞれ最適な温度，pH，溶存酸素濃度 (DO) が存在した．生産期には増殖期 (37°C) より低い 33°C が適し，最適な DO は増殖期が30%飽和以上，生産期が20～30%飽和であった．[1]

マイクロキャリアーが沈降しない範囲の低速撹拌（たとえば1 *l* スケールの培養では 20 rpm）を行うことで細胞に損傷を与えずに tPA 生産性を高く維持できた．このような低速撹拌において，溶存酸素供給速度を上げるための第一の方法として，エアースプレー法を採用し k_La を通常の表面通気の 2 倍以上に改善できた．第二の方法として加圧培養を提案したがこれについては 3-2 で述べる．[2]

1-2. 低血清培地開発と高密度培養 動物細胞の増殖には種々の増殖因子の混合物としてのウシ胎児血清の添加が一般に不可欠であるが，ウシ胎児血清が高価なことに加え，これに含まれるタンパク質を医薬タンパク質の精製過程で除去することがきわめて困難なことから，低血清培地あるいは無血清培地の開発が必要となる．そこで，血清の増殖促進活性を代替でき，かつ細胞接着を阻害しない物質をスクリーニングした結果，硫酸第一鉄などを選択することができた．[3]

マイクロキャリアー密度を3 g/*l*から6 g/*l*に上げることによって細胞密度を 2 培濃度まで増殖させてから tPA 生産を行ったが，tPA生産量は約1.3倍にとどまった．種々検討した結果，培養液中における不溶性あるいは難溶性培地成分の濃度を細胞密度に比例して上げることにより生産量は2倍に達した．[4]

1-3. 呼吸速度のオンライン測定と制御への応用 動物細胞培養では，細胞密度が低く培養液量あたりの酸素消費速度が微生物培養に比べて微小なため，排気ガス分

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

析による呼吸速度測定法は適用できない．培養槽内の気相を窒素で置換して溶存酸素濃度の減少速度から呼吸速度を測定するガス置換法が実験室的な方法としてはあるが，培養系に外乱を与える，測定が不連続，大量の窒素ガスを必要とする，などの理由から実用的ではない．

そこで，通常の溶存酸素濃度制御によって生ずる溶存酸素濃度の微小な変化を利用し，排気ガス分析計のみの追加により (Fig. 1), 培養系細胞に外乱を与えないで酸素消費速度をオンライン連続測定できる方法を検討した.[5] 培養液中における溶存酸素濃度の物質収支式は，(1)式で与えられる．

$$\frac{dC}{dt} = k_{La} \times (C^* - C) - Io_2 \cdots\cdots(1)$$

微小時間間隔 Δt の間には k_{La} や飽和溶存酸素濃度 (C*) が変らないと仮定して，(1)式を積分し

$$Io_2 = \frac{k_{La}}{1 - \exp(k_{La} \times \Delta t)} \times \{C(t + \Delta t) \times \exp(k_{La} \times \Delta t) - C(t)\} + k_{La} \times C^* \cdots\cdots(2)$$

となる．すなわち，培養中一定時間間隔 Δt で溶存酸素濃度 C を測定すると共に，排気ガスの酸素濃度分析により C^* を計算し，(2)式に従って酸素消費速度 Io_2 (mmol/l/h) を算出した．この際，培養液への酸素溶解度は培地をイオン溶液とみなして計算した.[6] 本法では，従来のガス置換法と同様な精度の測定値が得られるだけでなく，(Fig. 2) 本法による酸素消費速度測定値の定量性も，グルコースオキシダーゼを用いたグルコースの酸化反応系によって証明された．

ところで，細胞増殖期を終了して生産期へと移行する際の最適な切替時期は，必ずしも，細胞密度が最高に到達した時期とは一致していなかった. (Table 2) これは細胞あたりの生産活性が増殖期の進行にともなって変化す

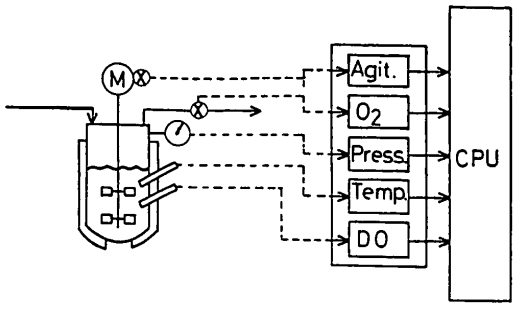

Fig. 1. A continuous measurement system for on-line monitoring Io_2.

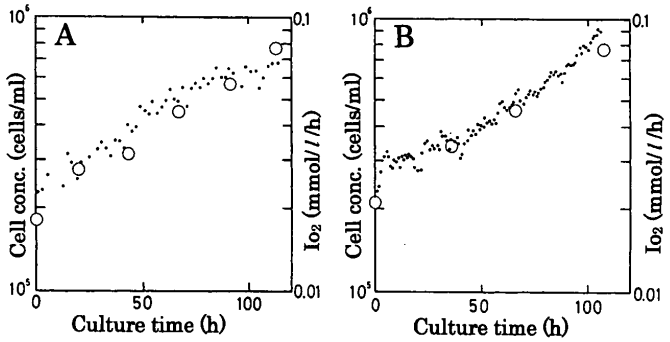

Fig. 2. Comparison of gas replacement and continuous measurement methods for Io_2 monitoring. In culture A, Io_2 was measured by the gas replacement method, while in culture B the continuous method was used. Symbols: ○, cell concentration; ・, Io_2.

るためである．生産活性を簡便に測定する方法を導入して調べたところ，増殖中の細胞の生産活性が最大になる時期が培養のバッチごとに異なることが判明した．したがって，バッチごとに増殖期中の細胞の生産活性の変化をリアルタイムに推定して最適な切替時期を判断する必要があった. (Fig. 3) そこで，一日ごとにサンプリングして測定する細胞密度とオンラインで連続測定した酸素消費速度および過去の培養データをもとにして，増殖期の

Table 2. Change in tPA production rate during growth culture.

Growth culture		Production culture in small-scale	
Time (d)	Final cell conc. (10^5 cells/ml)	Average tPA production rate (u/ml/h) (0-15 d)	Initial tPA production rate (u/ml/h) 0-5 d
3	5.8	0.13	0.37
4	10.0	0.95	0.78
5	15.5	0.80	0.68
6	17.0	0.73	0.65
7	16.5	0.25	0.47

After a certain period of growth culture of human embryo lung cells in an 8-*l* reactor with microcarriers, small-scale tPA production cultures for 15 d were started and tPA production rates were determined.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

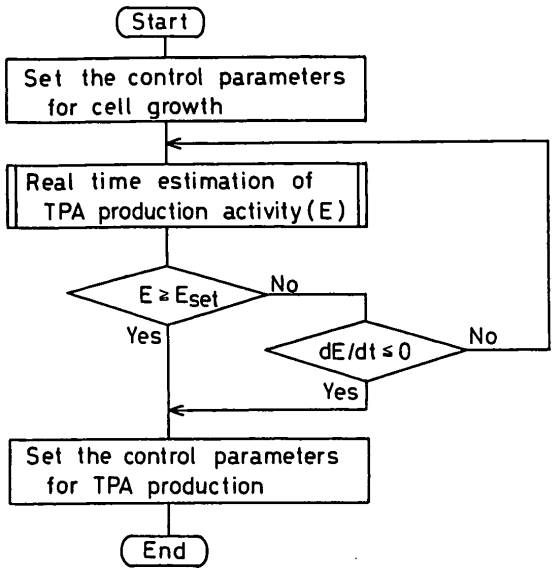

Fig. 3. A shift of control mode of tPA production culture employing real-time estimation of tPA production activity.

細胞のtPA生産活性を回帰的にオンライン推定し，増殖培養から生産培養への最適切替時期のオンライン推定を可能にした.[7] これには呼吸速度のオンライン測定が不可欠であった.

2. 培地交換による環境制御

グルコース，グルタミンなどのエネルギー源をはじめとして培地成分濃度は培養における最も重要な環境因子のひとつであり，特に成分の枯渇に対してはその補給が必須である．微生物培養では補給のためには流加が有効な手段となるが，それに伴う浸透圧上昇を避けるために動物細胞培養では流加培養ではなく，濃厚初発培地の設計のほか，主として新鮮培地への交換，すなわち培地交換が採用される．その際，培養液を細胞と使用済みの培地に分離する必要がある．接着細胞の大量培養にきわめて有用なマイクロキャリアー培養では，マイクロキャリアーの比重が1.03程度と大きいので細胞の接着したマイクロキャリアーは容易に沈降分離される．これに対して，担体材料を必要とせずコスト面で有利な浮遊培養では，細胞と培地との分離は容易ではない．この課題に対して，スピンフィルターなどによるろ過法,[9-14] 傾斜沈降管法[15-16] なども考案されているが，連続遠心分離法[17-21] が最も多用されている．そこで，浮遊細胞の新規凝集培養法および遠心分離法における遠心力の調節による生産性の改善を検討した.

2-1. 新規凝集培養法 安価で後処理も容易な微小なデンプン粒を細胞接着因子で化学修飾して微小担体として用いる新規凝集培養法を我々は考案した．まず，不溶性デンプンの水酸基をN,N'-カルボニルジイミダゾールで活性化し，ここへ細胞接着因子であるゼラチンをアミノ基を介して共有結合した．tPAを産生するCHO細胞1-15500株の培養液に未修飾の不溶性デンプン (10 g/*l*) を添加しても凝集効果は見られなかったが，修飾デンプン（粒径約10 μm）を添加した場合，添加濃度 (1, 10 g/*l*) に応じた凝集促進効果が認められ，細胞の沈降速度も著しく速くなった．増殖期の低濃度 (1.5×10^5 cells/ml) 細胞培養に修飾デンプンを添加しても1次代謝比活性の低下はなかったが，増殖が阻害された．一方，細胞維持期（タンパク生産期）の高濃度 (1.5×10^6 cells/ml) 細胞培養に修飾デンプンを添加すると，直径100–300 μmの細胞凝集体形成が促進されたが，1次代謝比活性，細胞密度，tPA生産量のいずれにも影響は認められなかった.[22]

2-2. 低速遠心分離法 遠心分離法においてタンパク生産性を最大にする操作条件について基礎的検討を行った．CHO細胞1-15500株のスピナーボトルを用いた浮遊撹拌増殖培養において，培養液を卓上型遠心分離機を用いて種々の速度 (17～186 × G) で遠心分離し細胞残渣を新鮮培地で懸濁してスピナーボトルに戻す方法で培地交換を行い，遠心力がCHO細胞の増殖，代謝およびtPA生産性に与える影響を調べた.[23]

沈降細胞の生存率は遠心力が小さくなると顕著に増大した．しかし，遠心力が67 × Gより低くなると細胞回収率が91%以下に低下した．67～364 × Gの範囲の種々の遠心力で7回培地交換した培養(474 h)において，119 × Gより低い遠心力の場合に増殖，グルコース消費，乳酸生成，tPA生成の各比速度が培養期間を通じて高くなった.(Fig. 4) 一方，培地交換しないで67～537 × Gの範囲の遠心力で遠心分離のみ毎日行い，上清もスピナーボトルに戻した場合には，遠心力は各比速度に影響しなかった.

次に，67 × Gの遠心分離で得られた上清からさらに高速の遠心分離により67 × Gの遠心分離で沈降しなかった細胞を回収した．そして，67 × Gの遠心分離で沈降した細胞および沈降しなかった細胞をそれぞれ接種して培養を行った結果，67 × Gの遠心分離で沈降した細胞の培養は，沈降しなかった上清細胞を接種した培養に比べて，明らかに高い代謝比速度が認められた.(Fig. 5) これら沈降細胞，上清細胞の平均直径はそれぞれ17.4，15.5 μmであった．また，沈降細胞の細胞内アミノ酸含量（特に非必須アミノ酸）は上清細胞に比べて高かった.

これらの結果から，サイズが大きくアミノ酸含量と代謝活性が高い細胞が，67 × Gのような低遠心力で選択的に生産系培養中に保持されると考えられた．すなわち，浮遊

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

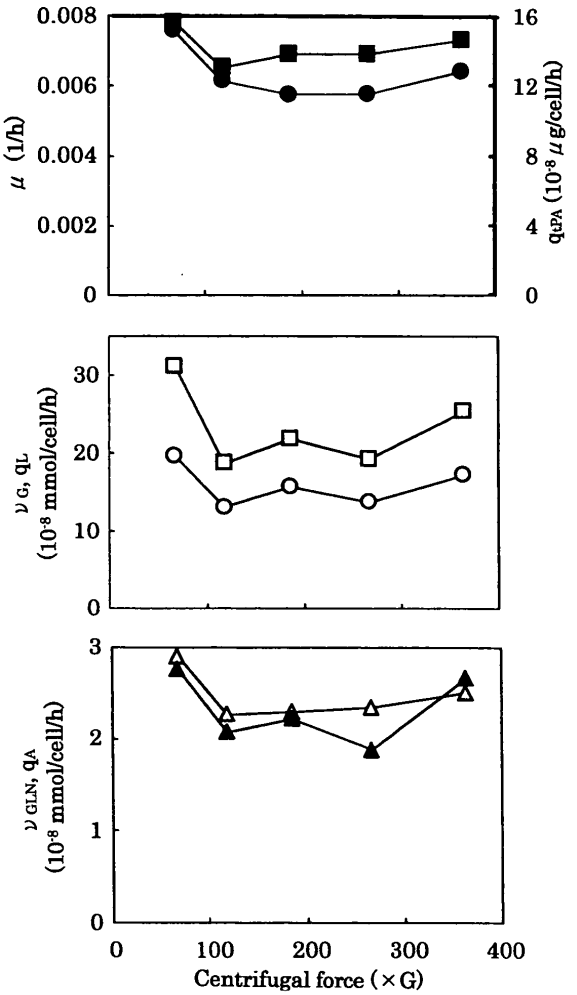

Fig. 4. Effect of centrifugal force applied during a series of medium change on cell activity. The average values of each specific rate during the suspension culture of CHO 1-15500 were calculated and plotted against the centrifugal force applied during medium change. Symbols: ●, μ (specific growth rate); ■, q_{tPA} (specific tPA production rate); ○, ν_G (specific glucose consumption rate); □, q_L (specific lactate production rate); △, ν_{GLN} (specific glutamine consumption rate); ▲, q_A. (specific ammonia production rate).

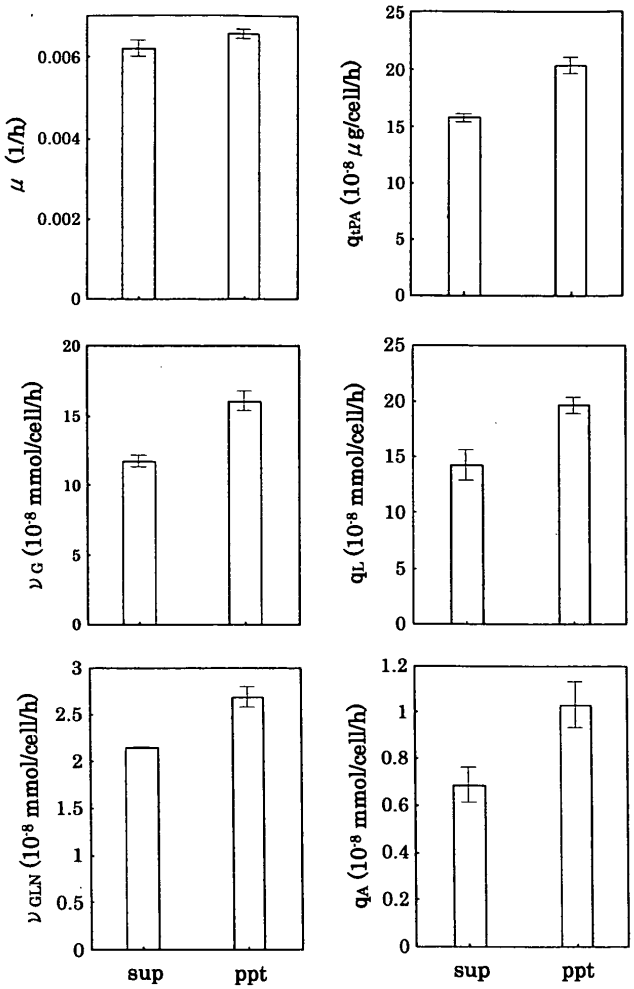

Fig. 5. Comparison of specific activities of cells from the supernatant and precipitate after centrifugation at 67× G. CHO 1-15500 cells in the precipitate (ppt) and supernatant (sup) after centrifugation at 67× G were inoculated into other cultures in duplicate, and the average values of each specific rate during the cultures are shown. Bars indicate the range between duplicates.

細胞の灌流培養において低速遠心分離により培地交換することで細胞の比生産速度を高く維持することが提案された.

3. 浸透圧および静圧の制御

3-1. 浸透圧制御 浸透圧は動物細胞に特異的な環境因子であるとともに，塩の添加などにより比較的操作しやすい操作因子でもある．動物細胞に対して等張(isotonic)または生理的浸透圧は通常290~300 mOsm/kgであるが，これに対して高浸透圧 (450 ~ 500 mOsm/kg) 下で動物細胞を培養すると細胞の比増殖速度は低下するが，抗体などタンパクの比生産速度は増加するために，タンパク生産性は等張より高い浸透圧において最適となることが知られている.[24-26] さらに高浸透圧下で，G1期細胞の割合の増大,[27] グルコースなど1次代謝速度や細胞体積の増大,[24] 細胞内アミノ酸やRNAプールの増大なども報告されている.

ところで，接着培養と浮遊培養からの二者択一は工業的な動物細胞培養プロセスの設計において最も開発初期段階で行うべきことのひとつである．我々は浮遊培養，接着培養の両方が可能なCHO細胞1-15500株を用いて，浮遊培養中の浮遊細胞に比べて接着培養における接着細胞は，高浸透圧に対する比速度の変化が急激でかつ最適な浸透圧が低いことを明らかにした．また，高浸透圧下で接着細胞の形態が非常に扁平になることを見いだし，これが接着細胞の浸透圧高感受性の原因の一つであると考えた.[28] ハイブリドーマ細胞の培養において，高浸透圧下では生理的浸透圧下と比較してエネルギー代謝がグ

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

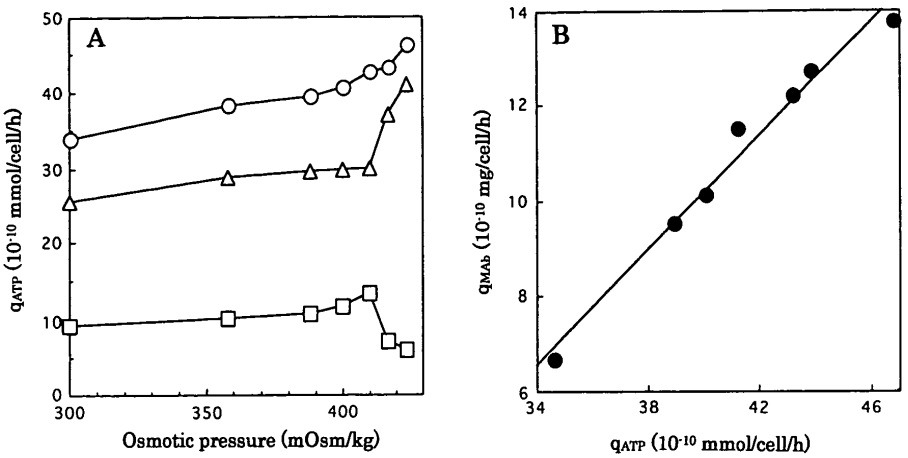

Fig. 6. Flux change in energy metabolism with osmotic pressure and proportional correlation between q_{MAb} and q_{ATP} The specific ATP production rates (q_{ATP}) from glucose (□) and glutamine (△) and their sum (○) were calculated using the data of batch culture of hybridoma cells under each osmotic pressure (A). The specific MAb production rate (q_{MAb}) is plotted against q_{ATP} (B).

ルコース代謝からグルタミン代謝へとシフトする傾向があるものの，両者の和としてのATP比生成速度は浸透圧上昇に応じて増大することを示した (Fig. 6).[29] したがって，ATP比生成速度の増大がタンパク比生成速度増加の要因となっていると考えた．

一般に細胞培養プロセスは，前半の細胞増殖期と後半のタンパク生産期に分けられる．そこで培養前半を増殖に適した生理的浸透圧，後半を目的タンパクの生産に適した高浸透圧というように，培養時間とともに浸透圧を段階的に上げることを検討した．その際，浸透圧変化に対する細胞内アミノ酸含量の応答過程の解析から，ある浸透圧に6 h以上滞留した後で，さらに，浸透圧を上げることにより細胞が高浸透圧に適応しやすいと考えた．ハイブリドーマ細胞の培養中における浸透圧の上昇プロファイルを種々検討した結果，生理的浸透圧下での培養に比べて抗体生産量が約1.4倍に増大する結果が得られた (Fig. 7).[30]

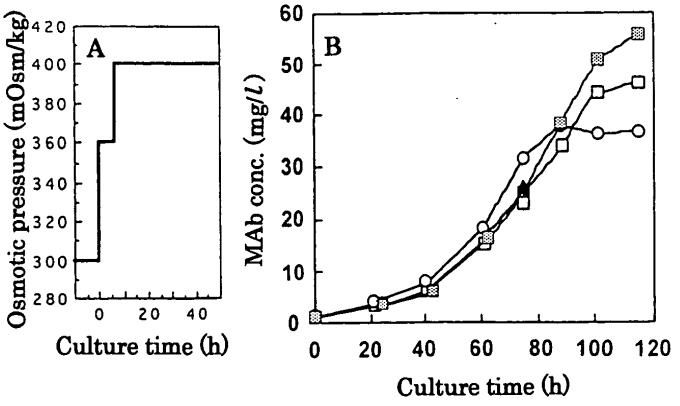

Fig. 7. Effect of gradual increase in osmotic pressure on MAb production. During batch cultures of hybridoma cells (B), osmotic pressure was kept constant at 300 (○) or 400 (□) mOsm/kg and increased gradually according to the profile shown in Fig. 7A (■).

さらに，我々は浸透圧上昇のみならず下降も含めた浸透圧変化のtPA生産に及ぼす影響をCHO細胞の浮遊撹拌培養系を用いて調べた．増殖期では前半 (300, 400 mOsm/kg) と後半 (300, 350, 400 mOsm/kg)，生産期では前半 (300, 500 mOsm/kg) と後半 (300, 400, 500 mOsm/kg)，と各々の浸透圧の組み合わせで培養した．いずれの期でも浸透圧変化後の浸透圧が高いほど浸透圧変化後の比増殖速度は低下した．一方，生産期において浸透圧上昇の場合には変化後の浸透圧が高いほど浸透圧変化後のtPA比生産速度は高くなったが，下降の場合には，変化後の浸透圧が低いほど浸透圧変化後のtPA比生産速度が高くなり，通常の報告とは逆の傾向を示した．また増殖期においても浸透圧変化後1～2日間は生産期と同様に，tPA比生産速度変化は上昇と下降では逆の傾向を示した．そこで，生産期において浸透圧を1日ごとに300⇔500 mOsm/kgと周期的に変化させたところ，浸透圧一定の場合に比べてtPA生産性が約1.15倍に増大した．工業的な細胞培養では10^7 cells/ml前後の高細胞密度で運転され培地交換も1日に1～数回の頻度で行われることを考慮すると，このような浸透圧の上下変化の繰り返しによる生産性の改良策も現実的である.[31]

3-2. 静圧制御　圧力もコストアップを伴わずに容易に操作できる環境因子であり，動物細胞培養のスケールアップ時に問題となる溶存酸素供給速度の不足は加圧による飽和溶存酸素濃度の増大により大幅に緩和されるはずである．しかし，そのためには圧力の上昇に対する動物細胞の挙動に関する知見が必要となる．しかし，血管内皮細胞の繊維芽細胞成長因子分泌や形態への静水圧 (15 cmH_2O) の影響や,[32] マウス骨髄細胞によるマクロ

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

ファージコロニー刺激因子分泌が静圧 (1.37 atm=0.137 MPa) により減少すること[33]などが，これまで報告されているだけで，物質生産に関する工学的研究はほとんどなかった．

そこで，我々は，tPA を産生するヒト胎児肺由来繊維芽細胞の 50 l スケールのマイクロキャリアー培養において，コントロール培養 (0.12 MPa) と加圧培養 (0.25 MPa) とを比較した結果，両者の間に比増殖速度の差は認められないものの，加圧培養ではグルコース比消費速度がコントロールの 85% に低下するとともに tPA 生産量も約 15%増加することを見いだした.[2)]

さらに，ハイブリドーマ細胞のTフラスコ中での浮遊培養において大気圧 (0.1 MPa) から最高 0.9 MPa まで圧力を種々に変えて培養した結果，細胞増殖にはほとんど影響がなかったが，高静圧下ではグルコースから乳酸への変換率が低下し，グルタミン比消費速度など一次代謝速度が圧力に応じて上昇した. (Fig. 8) また，抗体比生産速度も圧力増加にほぼ比例して増加し，0.9 MPa では大気圧下に比べて 20% 増となった.[34)] なお，これらの実験では，静圧にかかわらず培養気相部の酸素分圧，炭酸ガス分圧は一定に設定されているので，培養中の溶存酸素濃度や培養液 pH に圧力は影響していないことが確認されている．

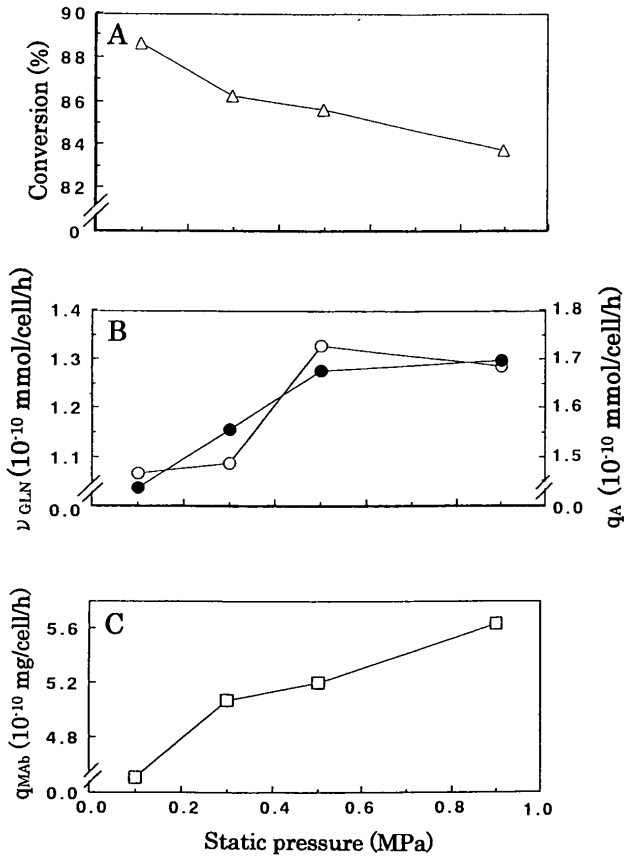

Fig. 8. Effect of static pressure on hybridoma cell culture. Hybridoma cells were cultivated in T-flask under various static pressures for 3 d. Symbols: △, conversion from glucose to lactate; ○, specific glutamine consumption rate (ν_{GLN}); ●, specific ammonia production rate (q_A); □, specific MAb production rate (q_{MAb}).

したがって，高静圧下では比増殖速度がほとんど低下しないが，タンパクの比生産速度が増大することが判明し，加圧培養により溶存酸素供給速度が改善されるだけでなくタンパク生産性の増大の可能性も示された．

おわりに

以上のように動物細胞培養プロセスにおける環境因子の影響および制御について培養工学的研究を行い，工業生産操作への指針を与える結果を得た．しかし，今後も実用化への寄与のためには適切な課題設定とさらなる研究における工夫が必要と考えている．

従来，ヒト体内における生理活性物質である増殖因子，サイトカイン，凝固線溶系物質などタンパク製剤およびワクチンの製造手段として開発されてきた動物細胞培養技術であるが，その品目はそれほど多くなかった．しかし，1998 年頃から抗体医薬の開発が世界的に加速され，わずか数年の間に上市されたものだけでも 10 品目にも達し，臨床開発中も含めるとその数はかなりのものになる．それに応じて，動物細胞培養設備が世界的に不足しており，既存設備の利用のほか，委託製造が医薬品業界の中で注目を集めている．このような情勢を考えると，動物細胞培養技術の重要性はますます大きくなってきたと言えるだろう．

さらに，タンパク製剤の認可基準の変化などがあり，動物細胞培養にかかわる技術課題にも変化がある．たとえば，従来ウシ血清由来のタンパクが最終製品に混入していないことを保証すれば十分であったが，これに加えて狂牛病の原因と考えられているプリオンの混入を完全に否定する必要に迫られている．したがって，従来は，たとえば培養の最終段階で無血清であればよかったが，現在では細胞保存の段階からの無血清化が求められている．また，認可後の製造プロセス変更の許容範囲が狭くなる傾向にあることを反映し，製造プロセスの開発時間の大幅短縮が求められている．このことに関連して使用細胞株の元株の選択あるいは改良などの重要性も高まっている．

また，ここ 1～2 年の間に，ES 細胞など幹細胞やその分化・増殖に関する基礎的知見の発見が相次ぎ，その再生医療への応用が期待されている．その実現の過程における必須技術のひとつが動物細胞培養工学であることは

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

間違いなく，そこには分化制御，三次元培養などの新たな課題が山積している．これに対して，2000年に，生物工学会にセル&ティッシュエンジニアリング研究会が設置され，これらの課題への積極的取り組みも始まっている．このように動物細胞培養の工学研究は医薬品製造のみならず再生医療においても更なる発展が求められている．

本研究は旭化成㈱ライフサイエンス総合研究所および大阪大学生物工学国際交流センター吉田敏臣研究室で行われたものです．旭化成㈱ライフサイエンス総合研究所新薬開発研究部においては林紘部長以下，長谷川明朗，上田一夫，清田隆夫，吉田信幸，小島弘栄の諸先輩方，成瀬寛俊，奥村 広，岡田 隆，小林伸之，田代 茂 諸氏の実験協力者を得て，HAPA グループのみなさん全員と共に，1983～1990 年の前臨床試験，臨床試験，製造承認申請，工場設計，建設と当時としては手本のない研究開発の中で行わせていただいたものです．また，この分野への参加を後押ししてくださいました平野惇氏，北嶋仲雄氏にも感謝致します．

さらに大阪大学生物工学国際交流センターでは，吉田敏臣教授に新しい研究の方向性に関して示唆に富んだ御指導をいただき，事務室の皆様方や中嶋幹男博士のほか，1994～2001 年の間，直接，本研究に協力していただいた大原謙一，林 浩正，森山徹広，大野 剛，Hui Ching Hia，Jin Ho Jang，Mohammad Ilias，Jianqiang Lin 諸氏はもちろんのことセンターのスタッフのみなさん全員，研究室の学生のみなさん全員に感謝いたします．

文 献

1) Takagi, M. and Ueda, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 565–570 (1994).
2) Takagi, M., Okumura, H., Okada, T., Kobayashi, N., Kiyota, T., and Ueda, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 301–306 (1994).
3) Takagi, M. and Ueda, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 394–399 (1994).
4) Takagi, M., Kiyota, T., and Ueda, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 269–271 (1994).
5) Takagi, M. and Ueda, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 709–711 (1994).
6) Schumpe, A., Adler, I., and Deckwer, W. D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 145–150 (1978).
7) Takagi, M. and Ueda, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 655–658 (1994).
8) Takagi, M., Hia, H.C., Jang, J. H., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 515–521 (2001).
9) Avgerinos, G. C., Drapeau, D., Socolow, J. S., Mao, J., Hsiao, K., and Broeze, R. J.: *Bio/Technology*, **8**, 54–58 (1990).
10) Yabannavar, V. M., Singh, V., and Connelly, N. V.: *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 925–933 (1992).
11) Yabannavar, V. M., Singh, V., and Connelly, N. V.: *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 159–164 (1994).
12) Deo, Y. M., Mahadevan, M. D., and Fuchs, R.: *Biotechnol. Prog.*, **12**, 57–64 (1996).
13) Mercille, S., Johnson, M., Lemieux, R., and Massie, B.: *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 833–846 (1994).
14) Velez, D., Miller, L., and Macmillan, J. D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 938–940 (1989).
15) Batt, B. C., David, R. H., and Kompala, D. S.: *Biotechnol. Prog.*, **6**, 458–464 (1990).
16) Searles, J. A., Todd, P., and Kompala, D. S.: *Biotechnol. Prog.*, **10**, 198–206 (1994).
17) Hamamoto, K., Ishimaru, K., and Tokashiki, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 190–194 (1989).
18) Tokashiki, M., Arai, T., Hamamoto, K., and Ishimaru, K.: *Cytotechnology*, **3**, 239–244 (1990).
19) Van Wie, J. B., Brouns, M. T., and Elliott, M. L.: *Biotech. Bioeng.*, **38**, 1190–1202 (1991).
20) Johnson, M., Lanthier, S., Massie, B., Lefebvre, G., and Kamen, A. A.: *Biotechnol. Prog.*, **12**, 855–864 (1996).
21) Takamatsu, H., Hamamoto, K., Ishimaru, K ., Yokoyama, S., and Tokashiki, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 454–457 (1996).
22) Takagi, M., Hayashi, H., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 693–695 (1999).
23) Takagi, M., Ilias, M., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 340–344 (2000).
24) Ozturk, S. S. and Palsson, B. O.: *Biotech. Bioeng.*, **37**, 989–993 (1991).
25) Oyaas, K., Ellingsen, T. E., Dyrset, N., and Levine, D. W.: *Biotech. Bioeng.*, **43**, 77–89 (1994).
26) Oyaas, K., Ellingsen, T. E., Dyrset, N., and Levine, D. W.: *Biotech. Bioeng.*, **44**, 991–998 (1994).
27) Martens, D. E., de Gooijer, C. D., van der Velden-de Groot, C. A. M., Beuvery, E. C., and Tramper, J.: *Biotech. Bioeng.*, **41**, 429–439 (1993).
28) Takagi, M., Hayashi, H., and Yoshida, T.: *Cytotechnology*, **32**, 171–179 (2000).
29) Lin, J., Takagi, M., Qu, Y., Gao, P., and Yoshida, T: *J Biosci. Bioeng.*, **87**, 255–257 (1999).
30) Lin, J., Takagi, M., Qu, Y., Gao, P., and Yoshida, T: *Cytotechnology*, **29**, 27–33 (1999).
31) Takagi, M., Moriyama, T., and Yoshida, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 509–514 (2001).
32) Acevedo, A. D., Bowser, S. S., Gerritsen, M. E., and Bizios, R.: *Cell. Phys.*, **157**, 603–614 (1993).
33) Rubin, J., Biskobing, D., Fan, X., Rubin, C., Mcleod, K., and Taylor, W. R.: *J. Cell. Phys.*, **170**, 81–87 (1997).
34) Takagi, M., Ohara, K., and Yoshida, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 619–621 (1995).

NII-Electronic Library Service