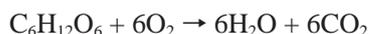


培養細胞への酸素供給

黒澤 尋

はじめに

液体培地で好気性微生物や動物細胞を培養するとき、効率的な培養を実現するためには十分かつ適正な酸素供給が行われなければならない。いうまでもなく、大部分の生物にとって酸素は生命活動を営むために必須のものである。生物は呼吸を行い、グルコースなどの糖類や脂肪を酸化して得たエネルギーでATPを合成し、これを利用して生命活動を行っている。呼吸を化学量論的に考えれば下記の反応式より、180 gのグルコースを完全に酸化するには192 gの酸素が必要であることがわかる。



グルコースは水に易溶な物質で、水100 mL (25°C) に対して約90 gも溶けるが、酸素は難溶性のガスであるためその溶解度はきわめて低く、大気下で通常の培地(30°C)に溶ける酸素量は、せいぜい $8 \times 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{O}_2 \cdot \text{m}^{-3}$ (8 ppm)程度である。これは、通常の微生物培養系においては、新たな酸素供給がなければ数分で消費されてしまう酸素量である。このため、培地への酸素供給は連続的に行う必要がある。この講座では、液体培地で細胞培養を行う際に知っておきたい酸素供給に関する基礎知識を紹介する。

溶存酸素

ヘンリー (Henry) 定数 H の単位に注意 一定量の液体に溶けるガスの量には限度がある。この限度をガスの溶解度という。難溶性ガスである酸素の培地への溶解度を論ずるときは、Henry定数 H を用いるのが一般的である。いま、気相中の酸素分圧を p_{O_2} 、気相の全圧を p 、酸素のモル分率を y_{O_2} とすると、酸素分圧 p_{O_2} と液相へ溶解する飽和酸素濃度 $C_{\text{O}_2}^*$ の間には式(1)のような比例関係がある。ここで、 H はHenry定数で、その単位はたとえば $[\text{atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{kg} \cdot \text{O}_2^{-1}]$ であり、ガスの溶け難さを表している。したがって、難溶性のガスほど大きな値をとる。 H は温度の関数なので、その値は温度により変化する。もし、一定温度において p あるいは p_{O_2} が高くなると、 $C_{\text{O}_2}^*$ もまた高くなる。

$$p_{\text{O}_2} = p y_{\text{O}_2} = H C_{\text{O}_2}^* \quad (1)$$

$$C_{\text{O}_2}^* = \frac{1}{H} p_{\text{O}_2} \quad (2)$$

International Critical Tables, vol. IIIを参照すると、30°Cにおいて酸素の水に対するヘンリー定数は、 $H = 26.1 \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{kg} \cdot \text{O}_2^{-1}$ となる¹⁾。この H の逆数は酸素分圧が1 atmのときにどれくらいの酸素が液中に溶けるか、すなわち酸素の溶解度($\text{kg} \cdot \text{O}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{atm}^{-1}$)を表している。 H の逆数を H' と表すこともあるが、 H のままで用いている場合もあるので、使用にあたっては H の単位に注意する必要がある。また、 p_{O_2} はあくまでも酸素の圧力であり、大気圧ではないことにも注意したい。学生の計算結果が5倍ほど違うときは、空気と酸素の区別が曖昧で、 p_{O_2} の値を勘違いしている可能が大である。

酸素電極 (溶存酸素計) 溶存酸素を測定する手段としては酸素電極が広く利用されている。電極内部には2種類の金属(作用電極と対極)が配置され、電解液が満たされている。電極先端は酸素を通過させるがイオンは通さないテフロン膜で覆われている(隔膜式電極)。膜を通過した酸素によって、電極内部では金属の酸化還元反応が起こり、通過酸素量に相当する電流が流れる。膜を通過する酸素の量は測定液中の溶存酸素濃度に比例するので、電流値を測定すれば溶存酸素濃度を求めることができる。隔膜式電極には、外部から一定電圧(0.5~0.8 V)をかけるポーラログラフ式と外部からの電圧を加えないガルバニ電池式の二つの方式がある²⁾。図1に隔膜式電極の構造を示す。両電極の構造に大きな違いはないが、作用電極と対極に使用される金属の組合せや電解液が異なる。

酸素電極は酸素を消費する 酸素電極を使用する際に気をつけたいことは、以下の点である。

①電極は使用前に必ず校正する

5% 亜硫酸ナトリウム溶液を調製し、溶存酸素濃度がゼロの状態をつくり、0点校正を行う。次に、純水に空気を吹き込んで(通気して)、大気の p_{O_2} で平衡化させ、飽和点校正を行う。飽和溶存酸素濃度は温度によって異なるので、この操作は一定温度下で行う。溶存酸素濃度をパーセントで表示する酸素モニターでは、空気による

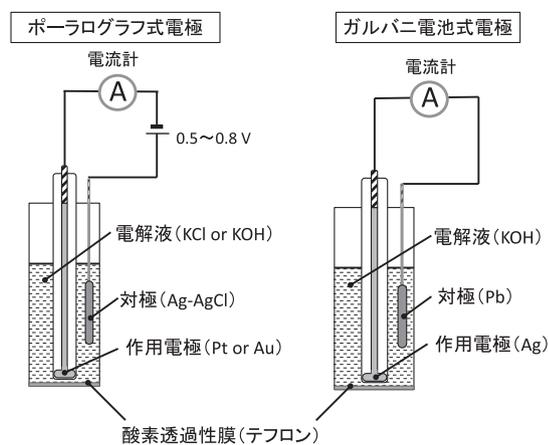


図1. 隔膜式酸素電極の構造

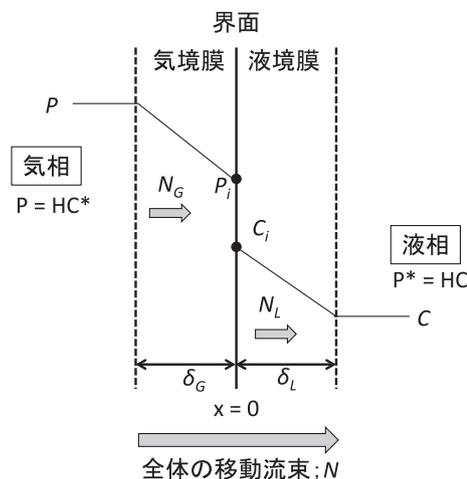


図2. 二重境膜説に基づく酸素移動

飽和溶存酸素濃度を100%と表示する機種と21%と表示する機種があるので注意が必要である。

②電極が酸素を消費することに注意

隔膜式酸素電極は、その原理上酸素を消費する。液が流動していない場合、隔膜近傍の酸素が消費されて、隔膜内外の酸素移動平衡が保たれなくなるので正しい計測ができなくなる。よって、電極先端（隔膜近傍）の液が一定以上の流速で流れるように適切な攪拌を行う必要がある。培養液の容量が小さい細胞培養系で、溶存酸素濃度の減少から細胞の呼吸速度を求めようとする場合には、十分な攪拌が実施されているかが重要なポイントになる。細胞の呼吸速度を測定したつもりが、酸素電極の酸素消費速度を測定していたということになっては大変である。また、隔膜式酸素電極には、その原理上応答遅れがあることにも注意したい。

③電極のメンテナンス

酸素電極を使用していると、隔膜が汚れたり電解液が劣化したりして、出力が低下する。良い測定を行うには、使用する度に隔膜と電解液の交換をすることが望ましいので、交換用の隔膜と電解液は常に準備しておきたい。ここで注意するのは電解液である。隔膜式酸素電極には、前掲の二つのタイプがあって、使用する電解液が異なる場合があるからである。両極間に一定電圧をかけるポーラログラフ式では、電解液が塩化カリウム (KCl) か水酸化カリウム (KOH) が使われている。一方、外から電圧を加えなくてもそれ自体が電池となって電流が流れるガルバニ電池式では、電解液はKOHが使われている。研究室にあった古い酸素電極を使おうとして、電解液を注文する場合は、どちらのタイプの酸素電極なのかをまず確認したい。ガルバニ電池式の電極に、手元にあった

pH測定用のガラス電極のKCl電解液を入れたために、出力が得られなかったという事例もある。

酸素移動

酸素移動速度 (Oxygen transfer rate; OTR)

空気中の酸素が培地などの液体に溶けて溶存酸素 (Dissolved oxygen; DO) になるには、気相の酸素分子 O_2 が液相へ移動しなければならない。培養系への酸素供給の手段は通気攪拌が一般的である。通気管から液中に送り込まれたガスは、攪拌翼で分散されて微小な気泡となって培養液中に一定時間漂う。この間に気泡中 (気相) の酸素が培養液中 (液相) へ移動して溶存酸素となる。この時の単位容積当たりの酸素移動速度 (Oxygen transfer rate; OTR [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$]) は、二重境膜説に基づき式 (3) のように表される。

$$\text{OTR} = k_L a (C^* - C) \quad (3)$$

$k_L a$: 酸素移動容量係数 [s^{-1}]

C^* : 気泡の酸素分圧と平衡な溶存酸素濃度 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$]

C : 培養液中の溶存酸素濃度 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$]

二重境膜説 気相から液相への酸素移動は、気-液界面の両側に境膜を考え、その部分に移動抵抗があるとする二重境膜説 (two-film theory, 定常モデル) (図2) によって説明されている³⁾。すなわち、気相側に厚さ δ_G の境膜を、液相側には厚さ δ_L の境膜を想定し、前提として次の3条件を仮定すると気-液間の酸素移動がうまく説明できる。

1) 気-液界面の近傍には、その両側に乱れのない (流れのない) 薄い境膜 (気境膜と液境膜) が存在し、酸素は両境膜内を分子拡散のみで移動する。気-液界面の液

境膜にもっとも大きい移動抵抗があり、酸素移動速度の律速段階となっている。

2) 両境膜内の酸素濃度分布は時間によらない(定常状態が成立している)。

3) 界面では、気相の酸素分圧と液相の酸素濃度との間に常に平衡関係 (Henry の法則) が成立している。

この定常モデルでは、境膜の外側では濃度が一定で、濃度勾配は境膜内でのみ直線的に存在し、界面における気相側の酸素分圧 P_i と液相側の溶存酸素濃度 C_i との間には相平衡が存在していることになる。

酸素移動流束 (流束は流速ではない) 酸素分子の拡散移動は相間に濃度勾配がある時に起こり、その移動流束は濃度勾配に比例し、移動抵抗に逆比例する。ここで、移動抵抗の逆数を拡散係数とすると、移動流束と濃度勾配との関係は次のように表される。

$$(\text{移動流束}) = (\text{拡散係数}) \times (\text{濃度勾配})$$

余談ではあるが、講義で「流束」と板書すると、「流速」の間違いでないかと学生に指摘を受けることがある。その都度、「流束」はフラックス (Flux) といって、単位面積を単位時間に通過する量であることを再確認している。

ここで、液境膜における酸素移動流束を N_L とする。 N_L は移動する方向に垂直な単位面積を単位時間に通過する酸素量で、拡散係数 D_L と酸素濃度勾配 (dC_x/dx) の積で表される。

$$N_L = -D_L \frac{dC_x}{dx} \quad (4)$$

N_L : 液境膜酸素移動流束 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]

D_L : 液境膜酸素拡散係数 [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]

x : 界面からの距離 (境膜内での位置) [m]

C_x : 位置 x における酸素濃度 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$]

さて、式 (4) を境界条件 ($x=0$ において $C_x = C_i$, $x = \delta_L$ において $C_x = C$) のもとで積分すると、

$$N_L = \frac{D_L}{\delta_L} (C_i - C) \quad (5)$$

ここで、

$$k_L \equiv \frac{D_L}{\delta_L} \quad (6)$$

とおくと、式 (7) の関係が得られる。

$$N_L = K_L (C_i - C) \quad (7)$$

k_L : 液境膜物質移動係数 [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

C_i : 界面における液相側の溶存酸素濃度 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$]

C : 液相の溶存酸素濃度 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$]

δ_L : 液境膜の厚さ [m]

詳細は省くが、同様に気境膜における酸素移動流束 N_G とすると、

$$N_G = \frac{D_G}{RT\delta_G} (P - P_i) = k_G (P - P_i) \quad (8)$$

$$K_G \equiv \frac{D_G}{RT\delta_G} \quad (9)$$

N_G : 気境膜酸素移動流束 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]

k_G : 気境膜物質移動係数 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$]

P_i : 界面における気相側の酸素分圧 [atm]

P : 気相の酸素分圧 [atm]

D_G : 気境膜酸素拡散係数 [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]

R : 気体定数 [$\text{m}^3 \cdot \text{atm} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$]

T : 絶対温度 [K]

δ_G : 気境膜の厚さ [m]

気体定数 R は SI 単位系では、 $8.314 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 、または $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ で表されるが、 $[\text{m}^3 \cdot \text{atm} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}]$ では $R = 8.205 \times 10^{-5}$ になるので、単位には注意したい。

ここで各相における気-液平衡を Henry の法則より関連づけると、界面では、

$$P_i = HC_i \quad (10)$$

気相本体の酸素分圧 P と平衡状態にある溶存酸素濃度を C^* とすると、気相では、

$$P = HC^* \quad (11)$$

液相本体の溶存酸素濃度 C と平衡状態にある酸素分圧を P^* とすると、液相では、

$$P^* = HC \quad (12)$$

式 (10)、(11) を式 (8) に代入すると、

$$N_G = Hk_G (C^* - C_i) \quad (13)$$

ここで、液相濃度基準の全体の酸素移動流束 N を考えると、

$$N = k_L (C^* - C) \quad (14)$$

K_L : 液相濃度基準の総括物質移動係数 [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]

定常状態では $N = N_L = N_G$ であるから、式 (7)、(13)、(14) より、

$$k_L(C^* - C) = k_L(C_i - C) = Hk_G(C^* - C) \quad (15)$$

加比の理により,

$$N = \frac{C_i - C}{\frac{1}{k_L}} = \frac{C^* - C_i}{\frac{1}{Hk_G}} = \frac{C^* - C}{\frac{1}{k_L} + \frac{1}{Hk_G}} \quad (16)$$

ここで k_G は通常 k_L に比べてかなり大きく、また、酸素は水に溶けにくいいため H はかなり大きい値となる。よって、 $1/(H \cdot k_G)$ は $1/k_L$ に対して無視できるので、酸素移動流束は式(17)となる。

$$N = k_L(C^* - C) \quad (17)$$

酸素移動容量係数 ($k_L a$ は k_L と a をまとめたもの)

酸素移動を流束 $[\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]$ で取り扱うには、酸素移動の面積(気-液間の接触面積)が明確にされなければならない。しかし、培養槽に通気が行われているときの気液接触面積 A $[\text{m}^2]$ を知ることはきわめて困難である。そこで一般的には、酸素の移動速度は単位面積についてではなく、培養液の単位容積当たりの酸素移動速度(OTR: $[\text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}]$)で表されている。いま、培養液の体積を V $[\text{m}^3]$ としたとき、 A を V で除せば、単位容積当たりの気液接触面積 a $[\text{m}^{-1}]$ が求められる。

$$\frac{A}{V} = a \quad (18)$$

a : 単位容積当たりの気液接触面積 $[\text{m}^{-1}]$

式(17)の両辺に a を乗じると、単位容積当たりの酸素移動速度となる。

$$\text{OTR} = N \cdot \frac{A}{V} = k_L \cdot a(C^* - C) \quad (19)$$

ここで、 k_L (液境膜物質移動係数: $[\text{m} \cdot \text{s}^{-1}]$)と a を一つにまとめて $k_L a$ とすると、先の式(3)となる。 $k_L a$ は酸素移動容量係数(volumetric coefficient of mass transfer)と呼ばれ、その単位の次元は時間の逆数 T^{-1} である。 $k_L a$ は培養槽の酸素供給能力の指標となるため、培養槽の設計や運転条件を設定する上で便利な数値として利用されている。 $k_L a$ は実験的に求めることが可能である。

静的方法 (static method) による $k_L a$ の測定 酸素電極で液中の溶存酸素濃度の変化を測定し、記録紙に記録された溶存酸素濃度の増加曲線を解析することによって、 $k_L a$ を求めることができる。培養槽に窒素ガスを吹き込んで液中の酸素を置換し、酸素レベルを下げておく。この脱酸素した液に通気攪拌を行い、溶存酸素濃度の変化を酸素電極で測定すると、図3のような溶存酸素濃度

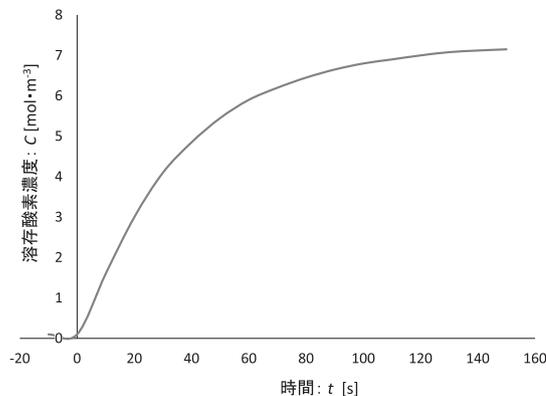


図3. 溶存酸素濃度の上昇経過

の増加曲線が得られる。これを下記の式(21)に従い解析して $k_L a$ を求める方法を静的方法(static method)という。

図3において、溶存酸素濃度曲線の接線の傾き(dC/dt)は酸素移動速度OTRを表す。よって、式(3)より、式(20)が得られる。

$$\frac{dC}{dt} = k_L a(C^* - C) \quad (20)$$

C^* : 飽和溶存酸素濃度 $[\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}]$

C : 溶存酸素濃度(測定値) $[\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}]$

$k_L a$: 酸素移動容量係数 $[\text{s}^{-1}]$

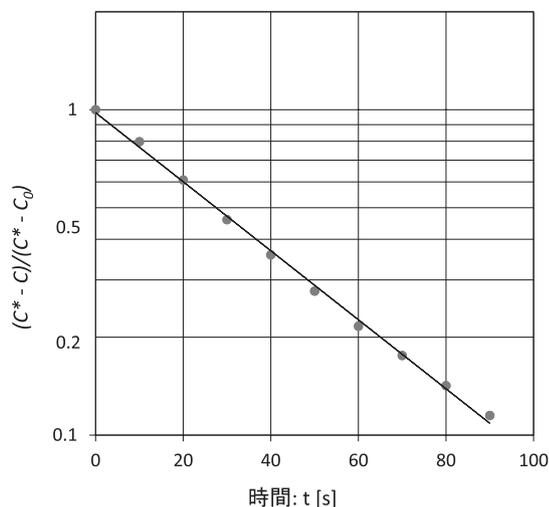
t : 時間 $[\text{s}]$

式(20)を初期条件 $t = 0, C = C_0$ のもとで積分すると、

$$\ln \frac{(C^* - C)}{(C^* - C_0)} = -k_L a \cdot t \quad (21)$$

従って、片対数グラフ用紙の対数軸に $(C^* - C)/(C^* - C_0)$ を、普通軸に時間 t $[\text{s}]$ をプロットすれば図4のような直線関係が得られる。この直線の勾配は $-k_L a$ となる。

酸素供給速度を高める方法 式(20)によると、酸素供給速度を高めるには、 $k_L a$ を大きくするか、酸素濃度勾配($C^* - C$)を大きくすればよいことがわかる。したがって、気液接触面積をふやせば、 $k_L a$ は大きくなる。つまり、通気量は同じでも、気泡を小さく分散すれば、 $k_L a$ を大きくできる。攪拌には気泡を微細化する効果があるので、攪拌速度を高くすることは $k_L a$ を高めるのに効果的である。濃度勾配($C^* - C$)を大きくするには、たとえば、空気を通気する代わりに純酸素ガスを通気して C^* を大きくする方法がある。これによって、 $(C^* - C)$ を大きくとれるようになり、酸素供給速度を高く保つことができる。しかし、溶存酸素濃度 C が C^* に近づくとつれて、濃度勾配は小さくなっていき、 $C = C^*$ となった時

図4. $k_L a$ を求めるための片対数プロット

に $C^* - C = 0$ となるので、見かけ上酸素供給速度は0となる。注意したいのは、攪拌速度を高くしても C^* は変わらないということである。 C^* は通気ガスの酸素分圧に依存し、攪拌速度には依存しない。

酸素供給と酸素消費

通気攪拌培養における酸素供給と酸素消費 微生物の培養中に通気を一時的に停止すると、菌の呼吸により酸素が消費され直線的な C の減少（直線イロ）が起こる（図5）。この直線イロの傾斜からは、菌の呼吸速度 ($r_{O_2} = Q_{O_2} \cdot X$) を求めることができる。ロにおいて通気を再開すると、 C は漸次増加して平衡に達する。ロハ間における C の増加曲線の接線は酸素移動速度 (dC/dt) であり、式 (23) に示されるように培養液への酸素供給速度と菌の呼吸速度の差となる。

$$r_{O_2} = Q_{O_2} \cdot X \quad (22)$$

r_{O_2} : 呼吸速度 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$]

Q_{O_2} : 比呼吸速度 [$\text{mol} \cdot \text{kg} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]

X : 菌体濃度 [$\text{kg} \cdot \text{cell} \cdot \text{m}^{-3}$]

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) - Q_{O_2} \cdot X \quad (23)$$

図5のハの領域では C の変化は緩やかであり、 $dC/dt = 0$ の定常状態近似が成立するので、式 (24) のように左辺の酸素供給と右辺の酸素消費がバランスした状態となる。

$$k_L a (C^* - C) = Q_{O_2} \cdot X \quad (24)$$

ある培養条件において、左辺の C^* と $k_L a$ は定数で与えられるので、酸素供給速度は C の値に依存する。理論上の最大酸素供給速度は $C = 0$ のときである。右辺の Q_{O_2} は、

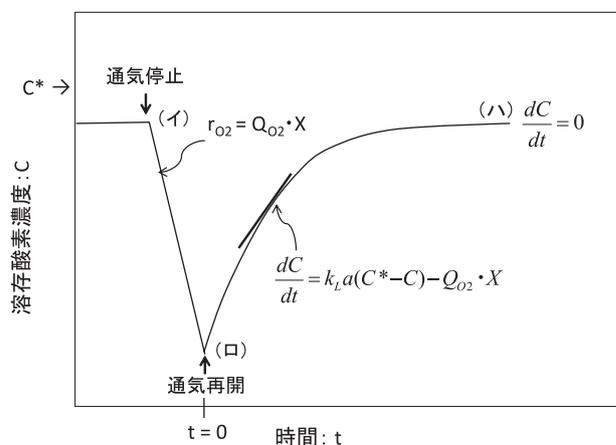


図5. 培養系における酸素濃度変化曲線

培養菌体（細胞）の種類によって決まる定数であるので、所定の培養条件において培養可能な最大菌体濃度を酸素需給の観点から式 (25) によって推定することが可能である。

$$X = \frac{k_L a \cdot C^*}{Q_{O_2}} \quad (25)$$

細胞集塊や固定化細胞への酸素供給 糸状菌のペレットや球状のゲルマトリックス（ゲルビーズ）に包括固定した好気性微生物、および肝細胞スフェロイドなどの細胞集塊への酸素供給では、密集した細胞や固定化担体が物質移動の障害となり、酸素供給不足が生じやすくなる。たとえば、球状細胞塊では、その内部への酸素移動の推進力は分子拡散のみとなるので、酸素は球状塊の周辺部に存在する細胞に消費し尽くされてしまい、中心部分まで到達することができない場合が生じうる。この結果、中心部に存在する細胞への酸素供給不足が生じ、この状態が続くと中心部の細胞は死滅してしまう。よって、細胞集塊への酸素供給は、酸素の拡散移動速度と細胞の呼吸速度を考慮して、中心部に存在する細胞が酸素不足に陥らないような酸素供給条件を設定する必要がある。あるいは、酸素供給不足とならないように細胞集塊のサイズを制御する必要がある。

細胞集塊内部へ酸素が到達するか否かは、細胞の呼吸速度、酸素の拡散係数、細胞密度などの基本情報が得られれば、以下のような条件のもとで定常状態を仮定することによって推算できる^{4,5)}。

- 1) 細胞集塊は球形である。
- 2) 細胞は均一に分布している。
- 3) 酸素が唯一の律速する因子である。
- 4) 細胞の酸素消費に関して一次反応の動力学が適用

できる。

5) 酸素の拡散性は集塊内で一定, 拡散速度はFickの法則に従う。

よって, 酸素の拡散流束 N_A [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] は式 (26) で表される。

$$N_A = D_{Ae} \frac{dC_A}{dr} \quad (26)$$

N_A : 酸素の拡散流束 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]

D_{Ae} : 有効拡散係数 [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]

C_A : 細胞集塊内の溶存酸素濃度 [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$]

ここで, 図6に示すような, 半径 R の球状細胞集塊を考える。そして, バルク培地中の溶存酸素濃度, すなわち細胞集塊表面における溶存酸素濃度を C_{AS} として, 酸素が細胞集塊内部に拡散移動していく状況を想定する。さらに, 任意の半径 r および $(r + dr)$ の球面で囲まれた球殻 (微小空間) を設定し, この部分でおこる呼吸による酸素消費を伴う酸素拡散移動の物質収支をとる。

$$(\text{流入}) - (\text{流出}) + (\text{生成}) - (\text{消費}) = (\text{蓄積})$$

ここで, 細胞集塊内部での酸素の生成と蓄積はゼロと考えられるので,

$$(\text{流入}) - (\text{流出}) - (\text{消費}) = 0$$

流束の式 (26) と呼吸に関する式 (22) より,

$$(4\pi r^2 N_A)_{r+dr} - (4\pi r^2 N_A)_r - 4\pi r^2 dr (r_{O_2}) = 0$$

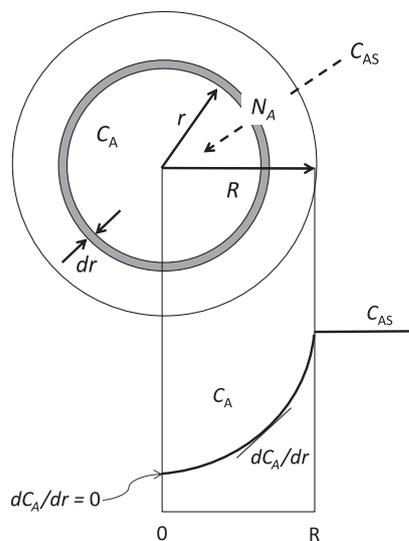


図6. 球状細胞集塊の球殻における物質収支と酸素濃度分布

$$4\pi D_{Ae} \left\{ \left(r^2 \frac{dC_A}{dr} \right)_{r+dr} - \left(r^2 \frac{dC_A}{dr} \right)_r \right\} - 4\pi r^2 dr (r_{O_2}) = 0 \quad (27)$$

この両辺を $4\pi r^2 dr$ で割り, $dr \rightarrow 0$ 極限を考えると,

$$\frac{1}{r^2} D_{Ae} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dC_A}{dr} \right) - r_{O_2} = 0$$

$$D_{Ae} \left(\frac{d^2 C_A}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_A}{dr} \right) - r_{O_2} = 0 \quad (28)$$

さらに, 酸素消費反応を一次反応であると仮定すると, 呼吸速度 r_{O_2} は式 (29) のように表すことができる。

$$r_{O_2} = kC_A \quad (29)$$

k : 一次の反応速度定数 [s^{-1}]

酸素消費反応にはミカエリス・メンテン型の動力学を適用するのが最善であるが, ここでは単純化のために一次反応を適用する。したがって, 式 (28) に式 (29) を代入して式 (30) を得る。

$$D_{Ae} \left(\frac{d^2 C_A}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_A}{dr} \right) - kC_A = 0$$

$$\frac{d^2 C_A}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_A}{dr} - \frac{k}{D_{Ae}} C_A = 0 \quad (30)$$

さらに下記の境界条件のもとで積分すると,

細胞集塊表面: $r = R, C_A = C_{AS}$

細胞集塊中心: $r = 0, dC_A/dr = 0$

$$C_A = C_{AS} \frac{R}{r} \frac{\sinh(r\sqrt{k/D_{Ae}})}{\sinh(R\sqrt{k/D_{Ae}})} \quad (31)$$

ここに, 式 (32) で定義されるシーレモジュラス (Thiele modulus; ϕ) という無次元量 (酸素消費速度と酸素拡散速度の比) を導入する。

$$\phi = R\sqrt{k/D_{Ae}} \quad (32)$$

$$\frac{C_A}{C_{AS}} = \frac{R}{r} \frac{\sinh(\phi \cdot r/R)}{\sinh\phi} \quad (33)$$

ここで,

$$C_A^* = \frac{C_A}{C_{AS}}$$

$$r^* = \frac{r}{R}$$

として, 溶存酸素濃度と半径を相対値で表し無次元化すると, 細胞集塊内の酸素濃度分布を与える式 (34) がえられる。

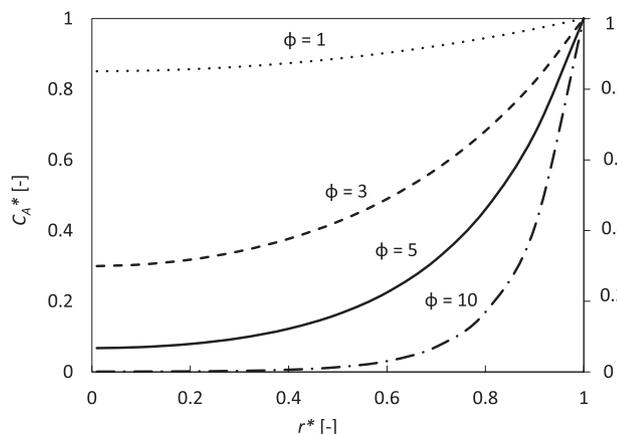


図7. 細胞集塊内の酸素濃度分布

$$C_A^* = \frac{\sinh(\phi \cdot r^*)}{r^* \sinh \phi} \quad (34)$$

式 (34) において, \sinh はハイパボリック・サイン (hyperbolic sine) を示し, $\sinh \phi$ は次のように定義される.

$$\sinh \phi = \frac{e^\phi - e^{-\phi}}{2} \quad (35)$$

式 (34), (35) を利用すれば, 表計算ソフトでも酸素濃度分布を計算することができる. 図7に計算結果の例を示した. r^* を 0.01 ~ 1.0 の間で変化させ, そのときの C_A^* を $\phi = 1, 3, 5, 10$ のときについて計算した. 図7より, ϕ が大きくなるほど細胞集塊の中心部分が酸素不足になりやすいことがわかる. $\phi = 1$ では中心部でも表面の80%以上の酸素濃度が維持されているが, $\phi = 5$ ではそれが10%以下に低下する. $\phi = 10$ では細胞集塊の大部分が酸素不足に陥る. 式 (32) の ϕ の定義より, 細胞集塊の半径 R が大きくなるほど, また酸素消費速度が高くなるほど, 細胞集塊内は酸素不足になりやすいことが分かる. 酸素不足に陥らないようにするには, 細胞集塊のサイズをできるだけ小さく保ち, 酸素の拡散速度を高くする工夫が必要である.

また, ϕ は細胞集塊の酸素充足度を推定する際にも有効である. 触媒有効係数 η ($0 \leq \eta \leq 1$) は, 固定化触媒が有効に機能しているかの指標であるが, η を見かけの呼吸速度 ($r_{O_2, \text{obs}}$) と細胞集塊内の溶存酸素濃度が一樣に C_{AS} であるとしたときの呼吸速度 ($r_{O_2, C_{AS}}$) の比として式 (36) で定義すれば, 球状細胞集塊内で酸素が到達している部分の割合を知ることができ, 酸素充足度の指標としても利用できる. たとえば, $\phi = 10$ では $\eta = 0.27$ となり, 細胞集塊の7割以上が酸素不足になっていることが推定できる.

表1. 各種培養皿の培養面積と標準培地量

種類	培養面積 (概算値) A [cm ²]	標準培地量 V [mL]	液深 h [mm]
90 mm dish	60	12	2
60 mm dish	20	4	2
6 well multi-	10	2	2
12 well multi-	4	0.8	2
24 well multi-	2	0.4	2

$$\eta = \frac{r_{O_2, \text{obs}}}{r_{O_2, C_{AS}}} = \frac{D_{Ae} \left(\frac{dC_A}{dr} \right)_{r=R} \cdot 4\pi R^2}{k C_{AS} \cdot \frac{4}{3} \pi R^3} \quad (36)$$

よって, 式 (31) を r で微分し, 式 (36) に代入すると式 (37) のように, η を ϕ の関数で表すことができる.

$$\eta = \frac{3}{\phi^2} (\phi \coth \phi - 1) \quad (37)$$

$$\coth \phi = \frac{e^\phi + e^{-\phi}}{e^\phi - e^{-\phi}} \quad (38)$$

ここで注意することは, ϕ の定義である. ϕ は式 (39) のように定義されることも多く, その場合, 式 (34) の形が異なってくる. また, 式 (26) や (29) では, 負の符号をつけることもある. これは, 観測者の視点から現象を正負どちらの方向で捉えるかによるので, どちらも可である.

$$\phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k}{D_{Ae}}} \quad (39)$$

培養皿における動物細胞の静置培養 動物細胞や組織の培養では, 通気攪拌が行われることは希で, 培養皿に接着させて静置培養するのが一般的である. 静置培養では, 酸素供給は気-液界面 (その面積は培養皿の面積に等しい) からの酸素移動によってのみまかなわれる. 培養皿の $k_L a$ は, 式 (40) の関係より, 培地の液深 (h ; [m]) が大きくなるほど低下する.

$$k_L a = k_L \cdot \frac{A}{V} = \frac{k_L}{h} \quad (40)$$

標準的な培養では, 表1に示されるように, 液深は2 mmで行われている. 不用意に培地を多く入れて液深を増大させると, 酸素不足が生じる可能性があるので注意が必要である. 理論的には液深を浅くすれば酸素供給は高まるが, 培地からの栄養供給や培養環境を安定的に維持するには不利になる. 細胞の高密度培養が必要なときは, 通常よりも酸素分圧を高めたガスをインキュベータ

へ供給するなどの対策が必要である。

おわりに

多くの細胞培養系において、酸素は培養の成否にかかわるきわめて重要な因子である。しかし、培養温度や培地成分に比べると、酸素供給にはあまり注意が払われていないように思える。生物化学工学や培養工学の素養がないと、溶存酸素や酸素移動を十分に理解することは難しく、酸素が律速因子となって培養に問題が生じていることに気づかないことがある。たとえば、図7に示したように、細胞集塊が大きくなると、培地中の溶存酸素濃度は十分でもその内部では酸素不足に陥ることがある。培養が上手くいかないときは、「酸素は足りているだろうか」と自問することをお奨めする。また、ときには生

物化学工学の教科書を紐解いてみてほしい。そこには、現在の課題を解決するヒント（考え方）が記されていたりする。時代により研究テーマに流行り廃りはあるが、生物化学工学の考え方は、いつの時代にも通用すると思うし、いつも時代も細胞培養には酸素供給が必要である。

文 献

- 1) Doran, P. M.: *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press, p. 207 (1995).
- 2) 相澤陸夫：MS TODAY 2月号, p. 14 (2001).
- 3) 山根恒夫：生物反応工学（第2版）, p. 226 (1991).
- 4) Lee, J. M.: *Biochemical Engineering*, p. 60, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey (1991).
- 5) Doran, P. M.: *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press, p. 300 (1995).