

ペニバナ培養細胞によるビタミンE生産
に関する工学的研究

式 田 俊 哉

1995年 6月

ベニバナ培養細胞によるビタミンE生産
に関する工学的研究

東京大学大学院 工学系研究科
化学生命工学専攻

武田俊哉

目次

| | |
|--------------|---|
| 本研究の目的と論文の構成 | 1 |
|--------------|---|

第1章 緒言

| | |
|-----------------------|---|
| 1-1 植物細胞培養法 | 3 |
| 1-2 操作条件による生産制御 | 4 |
| 1-3 ビタミンEの工業的生産 | 6 |
| (1) 生体内機能と工業的生産の現状 | |
| (2) 天然品の製法 | |
| (3) 植物培養細胞によるビタミンEの生産 | |
| 1-4 ビタミンEの生合成 | 7 |
| 1-5 本研究の目的 | 8 |
| 引用文献 | 9 |

第2章 ペニバナ細胞によるビタミンE生産に対する有効因子の評価と制御

| | |
|---------------------|----|
| 2-1 研究の方針 | 12 |
| (1) 生産性の向上 | |
| (2) 制限因子 | |
| 2-2 基本操作 | 13 |
| (1) 細胞 | |
| (2) 培地 | |
| (3) 培養 | |
| (4) 分析 | |
| 2-3 回分培養 | 15 |
| (1) 実験条件 | |
| (2) 結果と考察 | |
| 2-4 反復回分培養 | 15 |
| (1) 実験条件 | |
| (2) 結果と考察 | |
| 2-5 有効培地成分の抽出と効果の検討 | 16 |
| (1) 実験計画と分散分析法 | |
| (2) 制限因子の抽出と効果の検討 | |
| 2-6 放出生産物の影響 | 21 |
| (1) 実験条件 | |
| (2) 結果と考察 | |
| 2-7 溶存酸素濃度(DO)の影響 | 22 |
| (1) 溶存酸素濃度の推算 | |

| | |
|------------------|----|
| (2) 溶存酸素濃度と比生産速度 | |
| (3) 溶存酸素濃度制御培養 | |
| 2-8 結言 | 25 |
| 引用文献 | 26 |

第3章 構造化モデルによる増殖と生産の解析

| | |
|----------------------------|----|
| 3-1 緒言 | 45 |
| (1) モデル構築の指針 | |
| (2) 植物細胞の二次代謝系 | |
| (3) 植物細胞の構造化モデルに関する既往の研究 | |
| (4) 本研究のモデルの概略 | |
| 3-2 実験方法 | 47 |
| 3-3 モデルの構築 | 48 |
| (1) 回分培養における呼吸速度の評価 | |
| (2) 細胞内リン酸塩の関与 | |
| (3) コンディショニング因子の問題 | |
| (4) 構造化モデルの概略 | |
| (5) 代謝の諸速度過程 | |
| (6) 物質収支 | |
| (7) 生産過程のモデル化 | |
| 3-4 シミュレーション | 53 |
| (1) パラメータの設定 | |
| (2) 回分培養および反復回分培養における増殖 | |
| (3) 回分および反復回分培養におけるビタミンE生産 | |
| 3-5 考察 | 55 |
| 3-6 結言 | 56 |
| 引用文献 | 58 |

第4章 攪拌操作により生じる流体ストレスによる細胞内代謝系の変化

| | |
|----------------------|----|
| 4-1 既往の研究 | 78 |
| (1) 流体ストレスの細胞培養系への影響 | |
| (2) 流れ場の評価 | |
| (3) 気泡の影響 | |
| (4) リアクターの開発 | |
| 4-2 実験方法 | 89 |
| (1) 細胞および培養条件 | |
| (2) 装置 | |
| (3) 攪拌槽での培養 | |
| (4) 分析 | |

| | |
|------------------|-----|
| (5) 物理的ストレスの評価 | |
| 4-3 結果 | 92 |
| (1) 生存率の攪拌強度依存性 | |
| (2) 生存率の経時変化 | |
| (3) ATPおよび細胞膜流動性 | |
| 4-4 考察 | 93 |
| 4-5 結言 | 94 |
| 引用文献 | 95 |
| 第5章 本研究の総括と展望 | |
| 5-1 本研究の総括 | 105 |
| 5-2 今後の展望 | 107 |
| 謝辞 | 108 |

本研究の目的と論文の構成

植物細胞培養法は、脱分化した細胞を用いて植物由来の有用物質を大量かつ環境条件に対して安定に生産する上で有望な方法である。特に、植物の二次代謝産物である薬効成分、染料、食品添加物等の生産法として期待されている。しかしながら、商業的生産に結び付いた例は少なく、また、その生産操作法も経験的な知見に依るところが大きい。

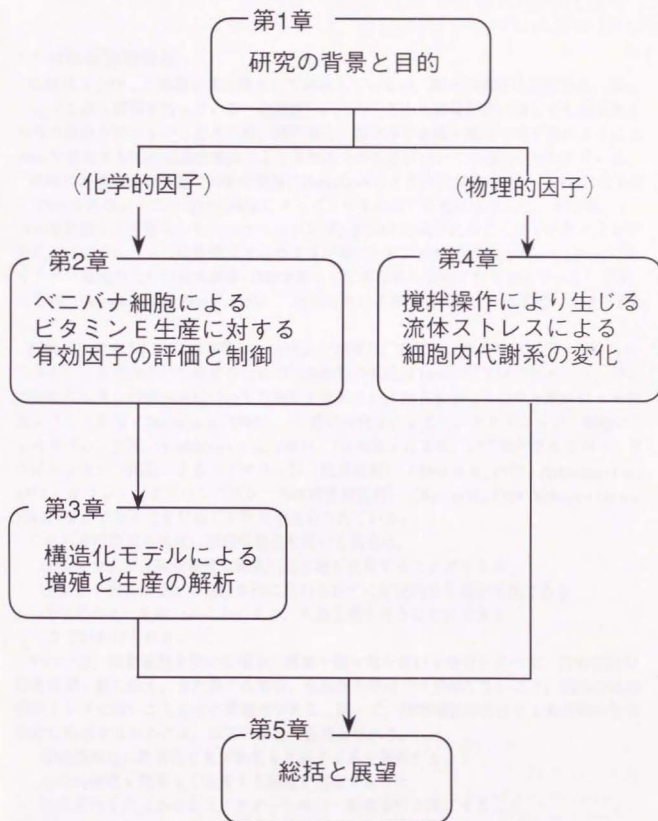
本研究は、植物培養細胞を用いた物質生産を行うバイオリクターシステムについての設計指針を確立することを目的とした。本システムの確立においては、植物細胞における目的物質の生産性、リアクター操作にともなう物理的ストレスに対する植物細胞の耐久性を明らかにする必要があると考えた。

植物細胞の二次代謝生産は、細胞系によって異なり、また様々な環境条件により変化する。そこで、生産に作用する因子の探索、それら因子の作用の速度論的解析が必要となる。また、リアクター中での細胞活性の低下挙動については、死滅の機構が不明であるために、評価の指標も確立されていない。

以上の検討を行う対象として、ペニバナ細胞のビタミンE生産を選択した。後述するように、ペニバナは良質のビタミンEを多く含有するため商業的価値が高く、また既に安定的な脱分化細胞が得られているため、本研究の対象として適していると考えられた。

本論文は5章で構成されている。構成図を次頁に示した。第1章においてはまず、植物細胞培養法とその課題について概観する。第2章においては、ビタミンEの生産性に対して作用する因子について実験的に探索・評価することを試みる。第3章においては、第2章において観察された挙動に基づき、細胞の増殖、二次代謝生産の挙動を記述するための構造化モデルを提案する。第4章は、リアクター中で生じるストレスによる細胞の死滅挙動について、検討を行う。第5章では、本研究を総括し、今後の展望を述べる。

本論文の構成



第1章 緒言

1-1 植物細胞培養法

植物体は分化した細胞の集合体として存在しているが、個々の細胞は形態形成に関して完全な遺伝情報を持っている（全能性）。このことから物質代謝に関しても原植物と同様の情報を持つものと考えられ、植物細胞、器官及び組織を酵素や微生物のように *in vitro* で培養する植物組織培養法による植物成分の生産についての検討が行われている。

植物の単離細胞の培養は20世紀初頭にHaberlandtにより試行が開始され、1930年代半ばにWhiteは酵母エキスをを用いた培地によってトマトの器官培養に成功した。その後、1930年代後半に植物ホルモンのオーキシンが、1950年代後半に同じくサイトカイニンが発見、同定され、さらに無機塩組成の改良が進められ、1962年にMurashigeとSkoogによりタバコ細胞のための培地組成（MS培地として現在最も頻繁に利用されている）が発表され（Murashige and Skoog, 1962）、合成培地による組織培養法は基本的には確立された。

植物が生産する二次代謝産物は、古来より医薬品、香料、色素などに広く用いられてきた。二次代謝産物の生産のための培養細胞の利用は1960年代半ばに始められ、特に1980年代に多くの細胞系についての検討が進められ、現在までにムラサキ細胞による色素シコニン生産（Tabata et al., 1985）（三井石油化学による）、オタネニンジン細胞によるサポニン生産（Yoshikawa et al., 1987）（日東電工による）が工業化されており、さらにニシキジソ細胞によるロズマリン酸（抗炎症剤）（Zenk et al., 1977 Razzaque et al., 1977）オウレンによるベルベリン（苦味健胃整腸剤）（Sato et al., 1984 Nakagawa et al., 1984）などで実用化を目指した研究が進められている。

これら有用物質の生産に細胞培養法を用いる利点は、

- ①化学合成が困難な複雑な構造の化合物を生産することができる
- ②気候や病害虫などの自然条件に左右されずに安定的な生産が実現できる
- ③リアクターを用いることにより、大量生産を行うことができる

ことなどがあげられる。

その一方、植物細胞を用いる場合、酵素や微生物を用いる場合と比べて、目的産物の生産性が一般に低く、また多くの場合、生産物を培地中に分泌しないこと、細胞が物理的ストレスに弱いことなどの問題点がある。従って、植物細胞培養法を工業規模の物質生産に利用するためには、以下の検討が必要とされる。

- ①植物細胞に特異的な有用物質を生産する系を選択すること
- ②目的物質を効率よく生産する細胞を選抜すること
- ③生産性を向上させるリアクターの操作・制御条件を確立すること
- ④生産物を効率よくかつ細胞に対して温和な条件で分離・回収すること

本研究では、特に生産性制御のためのリアクター操作条件の検討を行った。

1-2 操作条件による生産制御

培養条件の最適化に際して、検討対象となる因子は、①物理的因子、②化学的因子、③生物的因子の3種に大別される。さらには、それらの因子の総合である④培養工学的要因も指摘されている。

物理的因子の影響

物理的因子としては、光、温度、浸透圧、流体ストレスがあげられる。

これら物理的因子の作用としては、特定代謝系の誘導のためのシグナルとしての作用と、細胞の含水率や強度などの構造変化に対する作用が考えられる。

二次代謝系を誘導するシグナルとしての物理的因子としては、光照射の影響について多くの研究がある。ニチニチソウ (Knobloch, 1982)、ブドウ (Yamakawa, 1983) やイチゴ (Mori, 1993) 細胞によるアントシアニン生産、コーヒー細胞によるカフェイン生産 (Kurata, 1991) などは光照射により生産が促進されること、その一方ムラサキ細胞によるシコニン生産などは光照射により抑制される (Tabata, 1974) ことが報告されている。

流体ストレスの効果については、第4章で述べる。

化学的因子の影響

化学的因子としては培地成分があげられる。

植物細胞については、Murashige-Skoog培地を始めとして数種の基本培地が提案されているが、植物種、目的生産物によって最適な培地条件が異なる。また、培地中の成分の生産性への影響についての検討も行われている。

リン酸塩については、高濃度での供給が、キナによるキノリンアルカロイドの生産を阻害すること (Payne and Wang, 1988) やブドウ細胞によるアントシアニン生産においてリン酸飢餓条件が生産を促進すること (駒嶺, 1991) などが報告されている。また、一方、細胞の増殖に対しては、リン酸塩の含有量が律速因子になっていることも報告されている (Curtis, 1991)。

また、窒素源についてはアンモニア態と硝酸態の比率が二次代謝生産に影響しているという報告がある。例えばシコニン生産は、アンモニアの存在によって阻害される (Fujita, 1981)。

生物的因子の影響

生物的因子としては分化と遺伝形質があげられる。

植物体における二次代謝は、分化した器官で特異的に生産・蓄積されるので、脱分化したカルス細胞においては、生産能が抑制されることが多い。そこで、脱分化した細胞から分化を誘導することにより、生産性が向上する例がみられる。特に *Agrobacterium rhizogenes* の感染によって誘導される毛状根は、物質生産への利用が多く検討されている。また、遺伝形質の改変のための遺伝子導入についても近年、検討が加えられている。

リアクター操作条件 (培養工学的要因)

連続培養

バイオリアクターの操作は、大別して連続操作と回分操作の2通りの方向がある。連続操作では、反応条件を一定に保つことにより、製品の品質を一定に保つことができる。二次代謝生産は、環境条件に対する応答が鋭敏であるので、連続操作を行うことが一般に望まれる。しかしながら、連続操作は操作が難しく、雑菌汚染などの事故の処理が面倒である。反復回分培養(半連続培養)はその中間に位置し、回分培養の終了時に培養液(細胞を含む)の一部を種細胞として残し、残りを回収しそれと同量の培地を加えて培養を繰り返す方法であり、連続操作に比べて設備や技術の面で簡便であり、雑菌汚染に対する安全性も高い。

特にグルコースやリン酸塩を制限した培養に対しては、連続操作は有効である。Dougallら(1983)は、ニンジン細胞の半連続培養によって、リン酸塩、素素源など制限基質のアントシアニン生産に及ぼす効果を検討している。Schnappら(1991)やvan Gulik (1992)はグルコースを制限した連続および半連続培養によって、増殖における対糖収率、維持代謝速度の評価を行っている。しかしながら、実用を目指した研究は少ない。

二段階培養

細胞の増殖と二次代謝生産に対しては、異なる培養条件が要求されることがある。そこで、増殖を主目的にした培養により細胞を大量化し、その後生産を主目的にした培養を行う二段階培養がZenkら(1975)により提案されている。シコニン生産においても、増殖に適した培地(MG-5)とリン酸塩などを制限した生産に適した培地(M-9)を用いた二段階培養が行われている(Tabata, 1985)。

高密度培養

植物細胞培養法による目的生産物の含有量は一般に低い。そこで、リアクター容積あたりの生産性を高めるためには、細胞の高密度培養を行うことが望まれる。また、植物細胞の含水率は約90~95%程度あり、均一な懸濁状態を維持できるリアクター中の細胞の乾物濃度は、3~3.5%程度といわれている。また、高密度化により懸濁系の粘度が増加すること、物質移動容量係数が低下することが報告されている(Tanaka, 1982)。従って、高密度化の問題は、細胞を破壊しない条件下で物質移動特性を保つ方法の開発にある。

細胞の固定化

酵素や微生物と同様に植物細胞の固定化が試みられている。植物細胞の固定化は、アルギン酸カルシウムゲル(Brodelius 1979)やポリウレタンフォーム(Lindsey and Yeomann, 1984)などのマトリックスが用いられる。細胞を固定化することにより、①攪拌などによる流体ストレスから細胞が保護される、②生産物が分泌される場合には、生産物と細胞の分離が容易であるなどの利点があげられる。さらに、培養系によっては、固定化によって生産性の向上(Ishida, 1988, Lindsey and Yeomann, 1984)や生産物の培地中への放出(Wichers, 1983)が見られる例がある。

固定化は、生産物が分泌される場合に特に有効であり、化学的および物理的な透過処理の利用も併せて検討されている(Brodelius 1988)。

1-3 ビタミンEの工業的生産

(1) 生体内機能と工業的生産の現状

ビタミンEは1922年、EvansとBishopによって抗不妊ビタミンとして発見された。ビタミンEは動脈硬化の原因ともなる過酸化脂質の発生を防ぐなどのため老化防止のビタミンと呼ばれている。動物に摂取されたビタミンEは細胞内のオルガネラ膜に蓄積される。そのためビタミンEの機能については、以下の二説が挙げられている(美濃, 1980)。

- ・生体内非特異的抗酸化作用・・・フリーラジカルを捕集し、生体膜リン脂質の不飽和脂肪酸の酸化を防止する。
- ・膜安定化作用・・・・・・・・・・・・・オルガネラ膜に存在する非ヘム鉄タンパク質の安定化を介して脂質の過酸化を防止する。

ビタミンEには、4種のトコフェロールと4種のトコトリエノールの計8種の同族体が存在する。ビタミンEとしての生物活性はトコフェロール類が高く、またトコフェロール類の中でも α トコフェロールが最も高い生物活性を有する。

現在ビタミンEには天然品と合成品とがある。トコフェロール類には3個の不斉炭素が存在し、化学合成品はラセミ体である。

(2) 天然品の製法

天然ビタミンEは天然抗酸化剤として食品に用いられているほか、医薬品や化粧品用などで年間1500トン程度生産されていると推定される。ヘンケル社、イーストマンコダック社、エーザイが主要メーカーである。

天然ビタミンEの原料としては、植物油の精製行程、特に脱臭行程で副生する油滓が一般的に広く利用されている。最も消費量の多い大豆脱臭油滓が主体である。脱臭油滓にはトコフェロールのほかステロイド、遊離脂肪酸、グリセリドなどが含まれている。これらの成分を効率よく経済的に分離する方法として、溶媒抽出、けん化、結晶化、分子蒸留、吸着などの操作が組み合わされている。

(3) 植物培養細胞によるビタミンEの生産

植物培養細胞としてペニバナ (*Carthamus tinctorius*) 細胞を用いたビタミンE生産についての検討が、これまでに古谷らによってなされている(1987) (Furuya, 1987)。トコフェロール各種の種子に含まれるビタミンEの量を表1-1 (梶本, 1982) に示した。現在天然品の原料として用いられている大豆種子は、ビタミンEを多く含むがその主要な成分は γ 体である。一方、ペニバナは α トコフェロールを多く含むため高いビタミンE活性をもつ。

古谷らはペニバナの未熟花弁よりカルス細胞を誘導し、以下の検討を行った。

①懸濁培養におけるペニバナ細胞の増殖とトコフェロール生産

培地の検討を行い、細胞量とトコフェロール量の経時変化を取った。

②前駆体の投与によるトコフェロール生産量の増加

トコフェロールの前駆体となる物質を培養液に添加し、生産量の変化を調べた。フィートール(100ppm)及びホモゲンチジン酸の添加により生産量の増加が見られた。

表1-1 各種子のビタミンE含有量

| 植物 | ビタミンE [μg/g] | α Toc [μg/g] | 効力 [μg-α/g] |
|------|-----------------|-----------------|----------------|
| 大豆 | 310 | 16.2 | 41.5 |
| 菜種 | 138 | 17.4 | 29.2 |
| ペニバナ | 75 | 72.1 | 73.3 |
| 綿 | 258 | 28.2 | 51.2 |
| ヒマワリ | 61 | 61.0 | 61.0 |
| 落花生 | 185 | 47.0 | 61.7 |

効力は動物実験の結果による

$\alpha:\beta:\gamma:\delta=100:50:10:3$

1-4 ビタミンEの生合成

ビタミンEの生合成は高等植物や微生物によって行われている。ビタミンEはその構造中にクロマン核と鎖状構造を有するが、前者はシキミ酸経路によって合成されるホモゲンチジン酸(HGA)に、後者はメバロン酸経路によるフィトールに由来する。生合成経路を図1-1に示す。

更にフィトールはクロロフィルを構成する化合物であるが、その合成とトコフェロール、クロロフィルへの反応について以下の知見が得られている。

フィトールの前駆体であるゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)からフィチルピロリン酸(フィトールの二リン酸化物)への還元は、葉緑体で、葉緑体包膜(エンベロープ)に存在する還元酵素によって起こる。一方、クロロフィル(Chl)合成におけるGG部位の還元はチラコイドでおこる(Soll, 1983)。ここで、GGPPの還元酵素が存在しない変異体を用いた実験において、クロロフィルは合成されている(Henry, 1986)。従って、クロロフィル合成におけるGG部位の還元は、GGPPがクロロフィリドと反応した後に起こる。以上の概略を図1-2に示した。

また、エンベロープで必要以上につくられたPPPやフリーのフィトール、フィトール・ブール(苗木にみられる)はChl形成にあたってGGPPと競合あるいは代用となる(Soll, 1983)。逆に、Chlの分解により得られたフィトールが、トコフェロール合成に利用される現象もまた老化葉において測定されている(Rise, 1989, Sabater, 1978)。

1-5 本研究の目的

本研究は、再現性よくトコフェロールを高い割合で含有するペニバナ細胞を大量に生産するための指針を示すことを目的とした。

そのために、

- (1) ペニバナ細胞の増殖およびトコフェロール生産に影響する化学的因子の探索、評価
- (2) 細胞の増殖、トコフェロール生産性の制御するうえで有効な培養操作方法の検討
- (3) 広く植物細胞培養系一般に適用可能なモデルの構築
- (4) (1),(2)の実験的検討により得られた化学的因子の増殖、生産に対する影響に関する、
- (3)で構築したモデルを用いた速度論的評価
- (5) リアクター操作において生じる流体ストレスによって細胞内代謝系に生じる変化の評価

について検討を行った。

第1章 引用文献

1. Brodelius, P., Deus, B., Mosbach, K., Zenk, M.H., FEBS Letters, 103 ,93, 1979
2. Brodelius, P., Appl. Microbiol. Biotechnol., 27 , 561, 1988
3. Curtis, W.R., Hasegawa, P.M., Emery, A.H., Biotechnol. Bioeng., 38 , 371, 1991
4. Dougall, D.K., LaBrake, S. and Whitten, G.H., Biotechnol. Bioeng., 25 , 569, 1983
5. Fujita, Y., Hara, Y., Suga, C., and Morimoto, T., Plant Cell Rep., 1, 59, 1981
6. Furuya, T., Phytochemistry, 26 ,2741, 1987
7. Henry, A., et al., Biochem. Soc. Trans., 14, 958, 1986
8. Ishida, B.K., Plant Cell. Rep., 7, 270, 1988
9. 梶本五郎, 長谷部暁子, 栄養と食糧, 35 , 291, 1982
10. Knobloch, K.-H., Bast G., and Berlin, J., Phytochemistry, 21 ,591, 1982
11. 駒嶺 稔, 化学と生物, 29 , 70, 1991
12. Kurata, H., Seki, M., Furusaki, S., and Furuya, T., J.Chem. Eng. Japan, 24, 783, 1991
13. Lindsey, K., and Yeomann, M.M., Planta, 162 , 495, 1984
14. 美濃真, ビタミン学I, 日本ビタミン学会編, 東京化学同人, 1980
15. Mori, T., Sakurai, M., et al., J. Food Sci., 58 , 1993
16. Murashige, T. and Skoog, F., Physiol. Plant., 15 , 473, 1962
17. Nakagawa, K., Konagai, A., Fukui, H. and Tabata, M., Plant Cell Report, 3, 254, 1984
18. Payne, G. F. and Wang, H. Y. Appl. Microbiol. Biotechnol., 27 , 572, 1988
19. Razzaque A. and Ellis B.E., Planta, 137 ,287, 1977
20. Rise, M., et al., Plant Physiol., 89 , 1028, 1989
21. Sabater, B., and Rodriguez, M.T., Physiol. Plant. , 43 , 274, 1978
22. Sato F. and Yamada Y., Phytochemistry, 23 , 281, 1984
23. Schnapp, S.R., Curtis, W.R., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M., Biotechnol. Bioeng., 38 , 1131, 1991
24. Soll, J., et al., Plant Physiol., 71 , 849, 1983
25. Tabata M., Fujita Y., "Biotechnology in Plant Science" Zaitlin M. et al. ed., Academic Press, New York, p207-215 1985
26. Tabata, M., Mizukami, H., Hiraoka, N., and Konoshima, M., Phytochemistry, 13 , 927, 1974
27. Tanaka, H., Biotechnol. Bioeng., 23 , 1203, 1981
28. van Gulik, W.M., ten Hoopen, H.J.G., and Heijnen, J.J., Biotechnol. Bioeng., 40 , 863, 1992
29. Wichers, H.J., Malingre, T.M. and Huizing, H.J., Planta, 158 , 482, 1983
30. Yamakawa, T., Kato, S., Ishida, K., Kodama, T., and Minoda, Y., Agric. Biol. Chem., 47 , 2185, 1983
31. Yoshikawa, T., and Furuya T., Plant Cell Report, 6,449 , 1987
32. Zenk, M.H., El-Shagi, H. and Schulte, U., Planta Med.1975 Suppl.79, 1975
33. Zenk M.H., El-Shagi H. and Ulbrich B., Naturwissen-schaften, 64 , 585, 1977

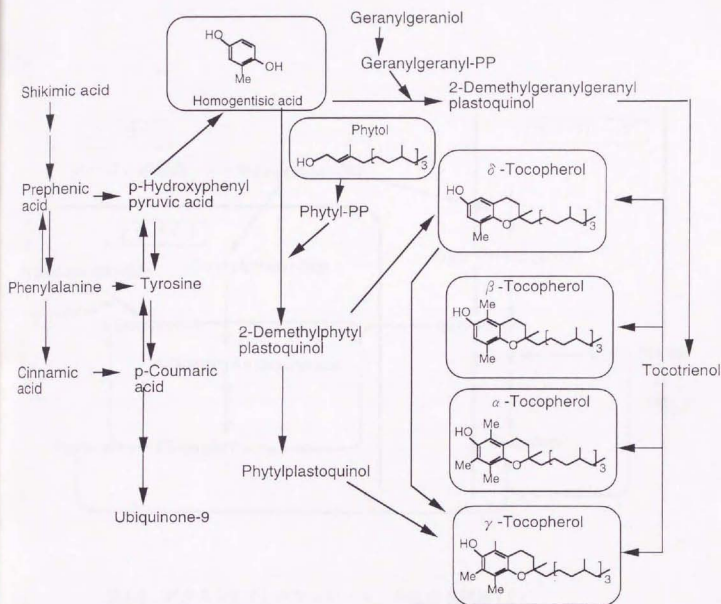


図1-1 ビタミンE (トコフェロール) の生合成経路 (1)

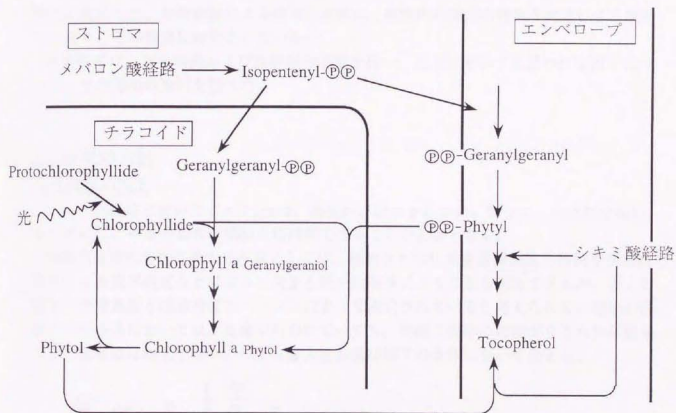


図1-2 ビタミンE (トコフェロール) の生合成経路 (2)

第2章 ペニバナ細胞によるビタミンE生産に対する 有効因子の評価と制御

本章では、ペニバナ細胞によるビタミンE生産について、培養操作に対する応答を実験的に検討した。植物細胞による物質生産性は、細胞内代謝系の複雑な関連による制御下にあり、その機構は解明されていない。

本研究では、回分培養および反復回分培養を行い、有効性を示すと思われる因子について、その効果の検討を行った。

2-1 研究の方針

(1) 生産性の向上

ペニバナ細胞においてビタミンEは、細胞外に放出されない。従って、生産性を高めるためには、多量の高含有細胞を短時間で作ることが必要となる。

細胞内蓄積生産物の最大含有量としては、液胞などの生産物蓄積部位の容積や生産物阻害による限界濃度などによって決まる絶対的限界によることも想定できるが、多くの場合、生産速度と増殖速度のバランスによって決定されていると考えられる。増殖が継続している系においては、生産が行われていても、同時に同率の増殖がなされれば結果として含有量は向上しない。つまり最大含有量は以下の条件において決まる。

$$\frac{dp}{p} = \frac{dx}{x} \rightarrow \frac{p}{x} = \frac{\frac{1}{x} \cdot \frac{dp}{dt}}{\frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt}} = \frac{\pi}{\mu} \quad \dots (2-1)$$

(p : 系内総蓄積量, x : 細胞量, π : 比生産速度, μ : 比増殖速度)

この場合、含有量の上限は培養条件に依存する。

増殖運動とは、主要生体構成成分の代謝経路と生産経路が関連しているということであるが、培養操作条件の問題としては、増殖向上の条件と生産向上の条件が一致しているということであり、増殖または生産に特有の条件を見いだすことによってそれらを分離できる可能性が残される。

従って生産性を向上させる方法の検討は、(1) 単位時間当りの培養でより生産量を向上させる条件を探索する、(2) 生産速度が向上する条件で細胞の増殖が抑制される場合、二段階培養の検討を行う、(3) 細胞の増殖が抑制されない場合、高密度で連続的に細胞を生産する方法の検討を行う、という手順で行うことが有効であると考えた。

本章では、増殖、生産に関与する化学的因子の探索、評価を行い、培養操作の検討を行う。

(2) 制限因子

増殖および生産に対する化学的制限因子は、培養系における存在形態、濃度変化の挙動から以下の4つに類別することができる。

- ①「非揮発性基質」：培地成分；消費により減少する
- ②「揮発性基質」：気相成分；供給と消費のバランスにより濃度が決定される
- ③「非放出生産物」：細胞内に蓄積されるが、細胞内濃度は増殖に伴い変化する
- ④「放出生産物」：培養により培地中に蓄積される

この類別における細胞外の成分である非揮発性基質、揮発性基質（酸素）、放出生産物について本章では順次検討を行った。

2-2 基本操作

(1) 細胞

古谷らが1976年にペニバナの未成熟蕾の花弁より誘導し、約13年継代培養されている安定なカルスを用いた。

(2) 培地

継代培養、液体培養ともに下記の培地（RT-B2KC 培地）を用いた。これは植物培養細胞用の培地として広く用いられている Murashige-Skoog 培地を基本としたもので、古谷らが改良したものである（Furuya, T., 1987）。以下に組成を示す。pHは5.6～5.8に調整した。

1) 無機成分

| | | |
|---|-------|------|
| NH_4NO_3 | 1650 | mg/L |
| KNO_3 | 1900 | mg/L |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 370 | mg/L |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 22.30 | mg/L |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 8.60 | mg/L |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | mg/L |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 440 | mg/L |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | mg/L |
| KI | 0.83 | mg/L |
| KH_2PO_4 | 170 | mg/L |
| H_3BO_3 | 6.2 | mg/L |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | mg/L |
| $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ | 37.3 | mg/L |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 27.8 | mg/L |

2) sucrose 30 g/L

3) ビタミン類

| | | |
|----------------------|--------|------|
| ビタミン B_{12} | 0.0015 | mg/L |
| 葉酸 | 0.5 | |
| リボフラビン | 0.5 | |
| 塩酸チアミン | 1 | |
| リン酸ピリドキサル | 1 | |
| ビオチン | 1 | |
| 塩化コリン | 1 | |
| パントテン酸カルシウム | 1 | |
| ニコチン酸アミド | 2 | |
| myo-イノシトール | 5.5 | g/L |
| カザミノ酸 | 1 | g/L |

4) 成長ホルモン類

| | | |
|--------------|-----|------|
| Kinetin | 0.1 | mg/L |
| IBA（インドール酪酸） | 2 | mg/L |

5) 植物培地用寒天末 8 g/L
（固体培地のみ）

(3) 培養

固体継代培養

カサの継代培養は、100mL 三角フラスコ中に固体培地 40mL を入れたもので行った。25℃のインキュベーター内で培養した。植え継ぎは 3 週間毎に行った。

液体培養

3 週間目の継代培養細胞をピンセットで軽く碎き、300mL フラスコ中の 100mL の液体培地中に移し、綿栓をした。27℃で往復振とう器(88spm)で培養した。

(4) 分析

細胞量

培養系より採取した細胞懸濁液より、吸引濾過により細胞を回収し、その重量を新鮮重量 (fresh cell weight : FCW と略記する) として測定した。また、採取した細胞を凍結したのち真空乾燥を行い、その重量を乾燥重量 (dry cell weight : DCW と略記する) として測定した。

ビタミンEの抽出・分析

- ①細胞を懸濁した培養液を吸引ろ過 (TOYO FILTER PAPER No.2 を使用) にかき、細胞をサンプリングする。
- ②-85℃で半日以上冷凍し、真空乾燥機で乾燥する。(12時間)
- ③乾燥細胞を乳ばちで粉碎する。
- ④細胞粉末を 100mL 三角フラスコにいれ、ヘキサンを 60mL 加える。窒素雰囲気下で 8 時間攪拌し、ビタミンEを抽出する(Furuya, T., 1987)。
- ⑤吸引ろ過 (MILLIPORE 0.22 μ m) にかき、ろ液をビーカーに集める。沈澱を 20mL のヘキサンで洗い、その洗液をろ液に加える。
- ⑥窒素雰囲気下でろ液が数mL になるまでヘキサンを蒸発させ、10mL メスフラスコでメスアップする。
- ⑦HPLC に導入しビタミンEを定量する。

ビタミンE定量のためのHPLCの条件

| | |
|--------|---|
| ・送液ポンプ | : TOSOH CCPE |
| ・カラム | : TSK gel Silica-60 4.6×250mm |
| ・移動相 | : n-ヘキサン-ジオキサン-エタノール (97.6 : 2.0 : 0.4) |
| ・流速 | : 1.0 mL/min |
| ・検出 | : 蛍光検出器 島津 RF-530 (Ex.289nm, Em.325nm) |

糖濃度の測定法 (フェノール硫酸法)

- ①試料および、ショ糖 0.3% 溶液を 1/500 に希釈し、1.0mL を試験管に取る。
- ②5% (w/w) フェノール液 1.0mL を加える。
- ③濃硫酸 5.0mL を速やかに (10~20秒で) 滴下する。
- ④10分放置後、一定温度 (20~30℃) の水浴に一定時間 (10~20分) 保った後、呈する黄色を比色する。(吸光波長 : 490nm)

2-3 回分培養

(1) 実験条件

ペニバナ細胞を100mLの液体培地中で35日間懸濁培養し、その過程において、細胞量およびトコフェロール含有量、pH、糖濃度の測定を行った。ここで糖濃度の影響を比較するために、糖（ショ糖）の初期濃度を1/3にした場合の経時変化を平行して取った。

実験条件：培地条件 : RT-B2K0.1C培地
 初期ショ糖濃度：30 g/L, 10 g/L
 細胞初期重量 : 0.6~0.7 g-DCW/L

(2) 結果と考察

回分培養における細胞の乾燥重量、細胞量当りのトコフェロール含有量、および糖濃度の経時変化を図2-1,2に示す。またショ糖濃度3%の場合の比増殖速度および比生産速度を求めた結果を図2-3に示す。

ショ糖初期濃度3%の場合、細胞量（乾燥重量）のピークは12日目にトコフェロール含有量のピークは9日目および25日目に存在している。細胞量のピークの前後に含有量のピークが見られるというのは、傾向としては古谷らの結果と一致する。ショ糖初期濃度1%の場合、この傾向はみられない。

ここで、比増殖速度（ μ ）および比生産速度（ π ）は下式より求めた。

$$\mu = \frac{LN \frac{X(t+\Delta t)}{X(t)}}{\Delta t} \quad \cdots (2-2)$$

$$\pi = \frac{\Delta P}{X\left(t+\Delta \frac{t}{2}\right) \cdot \Delta t} \quad \cdots (2-3)$$

（X：細胞量（乾燥重量）， P：全トコフェロール量）

比生産速度は大まかには培養時間に伴い、細胞量の増加に従って、減少している。この結果から、消費により減少する非揮発性基質もしくは細胞量に関与する因子（揮発性基質）が、比生産速度に対する制限因子として働いていることが推察される。また比増殖速度は培養開始の時点で低くなっている。誘導期が存在しているといえる。

2-4 反復回分培養

(1) 実験条件

回分培養における挙動より、細胞の環境を培養の初期の状態に保つことにより比生産速度が安定し、生産性が向上するものと考えられたことから、反復回分培養を行った。

ペニバナ細胞を100mLの液体培地中で培養し、所定日数（初期8日、以後6日）毎に細胞を懸濁した培地10mLを新鮮培地90mLに加え、培養を繰り返した。その過程において、細胞量及びトコフェロール含有量の測定を行った。

実験条件：培地条件 ：RT-B2K0.1C培地
初期ショ糖濃度（新鮮培地）：30 g/L

(2) 結果と考察

反復回分培養における細胞量および細胞当りのトコフェロール含有量の経時変化を図2-4に示した。また、比増殖速度、生産速度（フラスコ当り）、比生産速度の経時変化を求めた結果を図2-5に示した。細胞当りのトコフェロール量は全体の傾向としては向上し、天然種子での含有量に当たる7.3mg/100g-DCWの値を越えた。しかしながら、各バッチやバッチ間で比生産速度が安定していない。

2-5 有効培地成分の抽出と効果の検討

(1) 実験計画と分散分析法

培地成分は多様な因子の集合であるため、実験計画法と分散分析の手法を用いた。対象となる因子の設定条件を直交表に従って割り付けて実験を実施することにより、分散分析により各因子の効果を評価した。

分散分析は、ある因子の効果によるデータの変動を誤差変動と比較することによりその因子の効果の有意性を検定する手法である。検定には一般にF値が用いられる。F値が上側5%もしくは上側1%の確率を示す値を超える場合、その因子による変動に有意差があるものと判定される。（F関数の分布は自由度の組合せにより異なる。）

$$F = \frac{(\text{因子Aの変動}) / (\text{因子Aの自由度})}{(\text{誤差変動}) / (\text{誤差の自由度})}$$

(2) 制限因子の抽出と効果の検討

(2-1) 有効培地成分の探索

培養6日目の細胞を懸濁した培養液の20mLをサンプリングした後、同量の条件付き培地を添加して3日間培養を行い、添加培地の効果を調べた。添加培地は、培地成分を、糖（ショ糖）、窒素源、リン酸塩、その他の無機塩、ビタミン類（カサミノ酸、イノシトールを含む）、ホルモンの6種にグループ分けを行い、各因子の有無を2³直交表に従って割り付けて調製した。添加培地中の目的因子は、標準培地の3倍濃度に調製した。

比増殖速度、比生産速度を各因子の効果毎に平均化した結果を、図2-6に示した。F値を算出した結果をあわせて示した。各因子並びに誤差の自由度は1である。上側5%のF値は得られなかったが、F値2以上を示したものについては更に検討を進めることとした。F値=2とは、ここでは上側確率約50%に相当する。

比生産速度に関与する因子として、糖、ビタミン類、比増殖速度に関与する因子として、リン酸塩、比増殖速度、比生産速度では大きな効果は見られなかったものの、含有量で効果のみられた（F値=3.00）窒素源の効果についても検討を行うこととした。このうち、ビタミン、糖、窒素源の効果は、数種の因子が複合していると考えられたため、各因子中の有効因子の探索をまず行った。

(2-2) 有効ビタミン類の検討

液体培養18日目の細胞を用いて、制限培地中で5日間培養を行い、その効果を調べた。上記の検討でビタミン類とした成分を、カサミノ酸、イノシトール、リボフラビン、ニコチン酸アミド、パントテン酸カルシウム、その他の6種にグループ分けをし、各因子の有無を2⁶直交表に従って割り付けて培地を調製した。

5日間の培養における比増殖速度、比生産速度の各因子の効果毎の平均値を、図2-7に示した。各因子並びに誤差の自由度は1である。F値を算出した結果をあわせて示した。カサミノ酸の比生産速度に対する効果において、有意差95%以上である、 $F=207.8$ を得た。カサミノ酸はカゼイン加水分解物であり、アミノ酸を多く含む。アミノ酸添加が二次代謝産物生産を促進することは、ブドウ細胞のアントシアニン生産においてフェニルアラニンが効果を示す例がある(駒嶺, 1991)。

カサミノ酸濃度の生産性への影響についての結果を図2-8に示した。1系列しかなく、有意性の評価は行っていないが、濃度の増加に従い比生産速度が直線的に増加する傾向が得られた。

他の因子についての効果は有意差以下にしか現れなかったため、カサミノ酸を除く他の因子について、同様の手法で検討したが、いずれの因子についても大きな差は認められなかったため、制御因子の対象外とした。

(2-3) 糖の効果の検討

ショ糖として与えられた糖は、細胞外でブドウ糖と果糖に分解され、消費される。そこで、比生産速度に有効に作用する糖の効果としては、糖の種類、糖の濃度の効果が考えられる。さらに糖濃度の効果については、栄養源として作用している可能性の他に、浸透圧の効果が作用している可能性が考えられたため、細胞に分解、摂取されないマニトールを加えた場合の効果を検討した。糖の種類を「ショ糖」と「ブドウ糖、果糖の混合」とし、各条件で濃度30および15 g/L、初期糖濃度15 g/Lの場合についてはそれぞれマニトールを加えた場合、加えない場合の、計6条件を2回試行した。

5日間の培養における比増殖速度、比生産速度を各因子の効果毎に平均化した結果を図2-9に示す。誤差が大きく有意差は検出できなかったが、種類の効果にはほとんど差がないのに対して、濃度の効果では3%のものが1.5%のものの2.6倍となる差が見られた。また、マニトールの有無には分散分析で上側5%確率を示す有意差が見られた。以上の検討により、初期の比生産速度に及ぼす糖の影響は、主に浸透圧の効果によるものであり、マニトールによって代用されることが明らかになった。

30 g/Lのショ糖を含むMS培地の浸透圧は、ショ糖による2気圧、他のMS培地成分による2.5気圧の計4.5気圧程度であることが報告されている(田中, 1992)。糖、培地の消費により1.3気圧まで浸透圧は低下する。糖による浸透圧は、本実験で行った単糖と二糖の10%以下の条件では、浸透圧はvan't Hoffの式(浸透圧=溶質のモル濃度×気体定数×絶対温度)とほぼ一致している(Atkinson and Mavituna, 1991)。今回の検討でショ糖、単糖は同一重量濃度で比較しているが、糖種の効果に差が見られない。これは、ショ糖の分解が早いので、7日間での平均濃度には大きな差が生じないものと考えられる。

(2-4) 窒素源の効果の検討

窒素源は本研究においては、硝酸態40mMとアンモニア態20mMで供給している。培養の過程において、窒素源の濃度は減少すると共に、硝酸態とアンモニア態の比率が変化するものと考えられる。そこで、通常の培地（NH）と硝酸態のみにより通常の培地と等モルの窒素源濃度にしたもの（NR）の間で窒素源の種類の効果を検討し、さらに硝酸態のみの条件下で濃度をNRの1/3にしたもの（N0）とNRとの間で濃度の効果を検討した。各条件について3フラスコで行った。

7日間の培養における各条件に対する比増殖速度、比生産速度の平均値を図2-10に示した。種類、濃度の各因子に対して比増殖速度、比生産速度ともに有意差を示し、比増殖速度については、 $NH > N0 > NR$ 、比生産速度については、 $N0 > NH > NR$ という傾向を示した。濃度条件の効果により、硝酸態窒素は、細胞の増殖、トコフェロールの生産を量的に阻害することがわかった。増殖、生産に対する濃度の効果を更に検討することにより、最大含有量を得るための最適条件が求められることが期待される。NHとNRの差については、増殖に対してはアンモニア態の存在が促進的に作用するといえるが、生産に対してはアンモニア態の効果によるのか、硝酸態が少ないことによるのかは特定できない。

従って、アンモニア態の存在する場合としない場合それぞれにおける、硝酸態濃度の増殖、生産に対する効果を検討しなくてはならない。

(2-5) 生産ストレスのスクリーニング

栄養素として窒素源、リン酸塩、増殖阻害物質としてマロン酸、増殖調整物質としてのホルモン、環境因子としての光の影響を25日間の培養によって検討した。

実験条件：培地条件 ：RT-B2K(0.1 or 1)C培地を基本とした
 初期ショ糖濃度 ：3 g/L
 細胞初期重量 ：0.6~0.7 g-DCW/L

ストレスを加える各培養条件を下記に示す。

- ・窒素源制限 ： NH_4^+ を含む窒素源を無添加。総窒素源は基本培地の1/3に制限
- ・窒素源0 ：窒素源を無添加
- ・リン酸 1/10, 0 ：無機リン酸塩を基本培地の1/10または0に制限
- ・ホルモンフリー ：ホルモン(kinetine, IBA)を無添加
- ・カサミノ酸欠損 ：天然物カサミノ酸（カゼイン加水分解物）を無添加
- ・光照射 ：培養の全期間を通じて光照射を行った。
- ・マロン酸 1, 0.1 ：TCA回路阻害物質マロン酸を1または0.1mg/100mL添加

種々のストレスを加えて培養を行った結果を表2-1に示す。

表2-1. ストレスの生産性に及ぼす影響

| 培養条件 | 増殖比 | | α Toc 含有量 [mg/100g-DCW] | |
|----------|--------|----------|--------------------------------|-----------|
| | K 1ppm | K 0.1ppm | K 1 ppm | K 0.1 ppm |
| 参照 | 9.7 | 9.3 | 1.79 | 1.25 |
| 窒素源制限 | 12.6 | 18.0 | ○ 5.45 | ○ 2.20 |
| 窒素源 0 | 4.3 | — | 0 | — |
| リン酸 1/10 | 8.0 | 10.0 | 1.68 | 0.94 |
| リン酸 0 | 5.6 | 10.3 | 1.11 | 1.74 |
| マロン酸 1 | 12.7 | — | 1.61 | — |
| マロン酸 0.1 | 12.5 | — | 2.06 | — |
| 光照射 | 9.9 | 12.1 | ○ 6.82 | ○ 2.66 |
| ホルモンフリー | | | | |
| 標準 | | 11.5 | | ○ 3.42 |
| カサミノ酸欠損 | | 14.0 | | 1.09 |

この結果より、25日間の培養に対して、窒素源の制限、光照射、ホルモンフリーが生産性の向上に効果があることが分かる。

窒素源の影響

植物は窒素を主として硝酸態のものを、能動輸送によって根から取り込み、これをアンモニア態まで還元し、アミノ酸の合成などに用いる。これは同化的硝酸還元と呼ばれ、硝酸還元酵素と亜硝酸還元酵素が関与している。このように窒素は結局はアンモニア態で利用されるのであるが、アンモニアは高濃度で植物にとって有害であり、一般に植物に吸収されにくいという説がある（桜井, 1980）。組織培養に用いる培地についても、アンモニア塩のみを含む培地では多くの植物でよい生長が見られない場合が多い。それに対し、硝酸塩のみを含む培地では多くの植物材料で比較的良好な生長が見られる。但し、それと同時にアンモニア塩を添加することによって強い生長促進効果の見られることがある（原田, 駒嶺, 1979）。

スクリーニングの結果、本研究ではアンモニア態窒素を添加しない場合の方が、25日間の培養で高い生産性を示したので、硝酸塩濃度の影響についてリン酸塩を添加した場合としない場合について更に検討を行った。

| | |
|-----------|-------------------------|
| 実験条件：基本培地 | ：RT-B2K(0.1)C培地 |
| 初期ショ糖濃度 | ：3 g/L |
| 初期細胞量 | ：0.7～1 g-DCW/L |
| リン酸塩濃度 | ：標準（1.2 mmol/L），0 |
| 窒素源 | ：硝酸塩のみ 0, 20, 40, 60 mM |

最終細胞量と最終含有量を図2-11に示す。リン酸塩を添加しない場合、本実験の範囲内では、硝酸塩濃度の増加に従い最終細胞量は低下し（窒素源 0の場合は除く）最終含

含有量は増加する。リン酸塩を添加した場合では最終細胞量はほぼ一定で、最終含有量は硝酸塩濃度40mMで最大となった。フラスコ中の培地当りの最終トコフェロール量を図2-12に示す。硝酸塩濃度が高いほどフラスコ全体の生産量が高くなり、含有量の比較ではリン酸塩をいれない場合の方が高くなったが、フラスコ当りの量では、リン酸塩を添加した場合の方が高い値が得られた。

ホルモンの影響

スクリーニングでは、ホルモンの条件については、ホルモンフリーが高い値を示している。また、Kinetinが1ppmの場合と0.1ppmの場合を比較すると前者の方が全体として高い生産性を示すと共に、窒素源、光に対してより強い影響を受けている。しかしながら、短期間での培養の結果からは、増殖、生産ともにその影響は認められていない。

一般にKinetinなどのサイトカイニン類は、細胞分裂を促進するホルモンと言われるものである。増殖速度と生産速度の関連している本系に対して有効である可能性は考えられる。

光照射の影響

既往の研究に示したように、フィトールを添加した場合、トコフェロールの生産は促進される。つまりは、ビタミンEの生合成速度をフィトールが律している。第1章に示したように、フィトールは植物の光合成色素クロロフィルの加水分解生成物質である。光照射により、クロロフィルの合成が促進されると、フィトール濃度もまた増加し、トコフェロール生産量が増加すると考えることができる。

生産培地の検討

細胞の増殖と二次代謝産物の生産とを同一の培地を用いて行う培養方式が一般的であるが、田端らはムラサキ細胞の培養について増殖用培地とシコニン生産培地の開発を行い、これら二つの培地を組み合わせた培養方式を採用し、シコニンの大量生産に成功した(Tabata, 1985; 藤田1985)。増殖培地はLS培地を、生産培地はWhiteの培地を改良したものである。本系についても、前章で述べたように、 π/μ を変化させる因子が存在すると考えられる。

2-6 放出生産物の影響

(1) 実験条件

植物細胞培養において、細胞の初期細胞接種量が少ない場合、細胞の増殖速度自体が抑制されることがある。そこで、まずペニバナ細胞について、初期細胞量と細胞増殖の相関を検討した。所定濃度の細胞を7日間培養し、その間の平均比増殖速度を求めた。

実験条件： 初期細胞量 : 0.22~3.21 g-DCW/L

また、培養系における細胞濃度の効果について、細胞から放出される生産物の寄与について検討を行うために、既に細胞を培養した培養液の効果を細胞濃度の効果と併せて検討を行った。所定濃度の細胞を7日間培養した培養液を所定割合で添加した培地を用いて、所定濃度の細胞を7日間培養し、比増殖速度と比生産速度を測定した。

実験条件： 初期細胞量 : 0.17, 0.23, 0.30 g-DCW/L
旧培地添加割合 : 0, 10, 20 %

(2) 結果と考察

初期細胞濃度に対する比増殖速度の関係を図2-13に示した。初期細胞量の増加に伴い比増殖速度が増加すること、初期細胞濃度 1 g/L以上で比増殖速度がほぼ一定になることが観察された。

また、初期細胞濃度、旧培地添加割合に対する比増殖速度、比生産速度の関係を図2-14に示した。各速度は、各因子に関して平均した値を示した。ここで分散分析法を用いて、各因子の有効性を評価したところ、初期細胞量、旧培地量ともに、比増殖速度、比生産速度に影響を及ぼしていることが明らかになった。

この結果より、細胞接種量の減少による比増殖速度の低下を、培養液の添加により抑制することができることがわかる。培地中に放出される増殖促進因子は、コンディショニング因子といわれる(山川, 1990)。これは植物ホルモンとは違うものであると考えられているが、特定されていない。既往の研究ではアミノ酸と揮発成分説 (Stuart, 1969)、アンモニアとアミノプリン類縁化合物説などがあげられている。

本系においては、トコフェロール生産も放出生産物の影響を受けていることが、上記の結果よりわかる。旧培地中の有効因子の候補として前駆体を想定した。前述のように、生産性に寄与する前駆体としてフィトール、HGAがある。そこで培養液の分析により、HGAを、そのヘキサンによる抽出液の分析により、フィトールとその前駆体であるゲラニオール、さらにそれらのエステル化物の検出をHPLCにより試みた。しかしながら、いずれの分析においても該当する物質は検出されなかった。比生産速度は直接的にCFによって影響されるのではなく、CFにより細胞内の状態が一種の分化のように調整されることで、間接的に影響を受けると考えることもできる。

2-7 溶存酸素濃度 (DO) の影響

(1) 溶存酸素濃度の推算

a) 理論

培養液中における酸素の物質収支式として次式がなりたつ。

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) - Q_{O_2} \cdot X \quad \dots (2-4)$$

(C : 溶存酸素濃度, C* : 平衡溶存酸素濃度, X : 細胞濃度

$k_L a$: 酸素の物質移動容量係数, Q_{O_2} : 呼吸速度)

ここで擬定常 ($dC/dt = 0$) と近似することにより (2-5) 式が成り立つ。

$$k_L a (C^* - C) = Q_{O_2} \cdot X \quad \dots (2-5)$$

従って, $k_L a$ と Q_{O_2} を操作条件もしくは溶存酸素濃度の関数として表すことにより (2-5) 式を用いて細胞濃度から溶存酸素濃度を推算することができる。

b) 呼吸速度の測定

遊離細胞における酸素の消費速度を, ダイナミック法により測定した (Furusaki, S. et al. 1988)。実験装置を図2-15に示した。予め空気を吹き込んだ培地液中に, 細胞を投入し, 容器を密閉した後の溶存酸素濃度の経時変化を溶存酸素電極 (DKK DOC-10) により測定した。

| | |
|-----------|----------------------------------|
| 実験条件 : 細胞 | : 液体培養 7日目の遊離細胞 |
| (Toc 含有量 | : 1.94mg/100g-DCW) |
| 細胞濃度 | : 1.79g-DCW/L (0.206g-DCW/115mL) |
| 温度 | : 25℃ |

c) フラスコへの酸素移動

反復回分培養の振盪条件におけるフラスコ内の物質移動容量係数 ($k_L a$) を亜硫酸ソーダ法によって測定した (Cooper, 1944)。

試薬の調製

① 酸化反応液 (A)

0.5M Na_2SO_3 水溶液を調製した (6.3g/100mL)。反応開始前に触媒として, $10^{-3}M$ に相当する $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.025g) を加えた。

② ヨウ素液 (B)

I_2 , KI を各 0.1M 含む水溶液を調製した。密栓, 遮光保存した。

③ 逆滴定液 (チオ硫酸溶液) (C)

0.2M $Na_2S_2O_3$ 水溶液を調製した。

反応と分析

① 反応槽に A を入れ, 一定温度で反応を開始した。

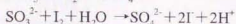
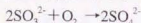
② 所定時間 (30分) 毎に, 反応液 1mL をサンプリングした。

③ サンプリング液に直ちに B を 10mL 添加し, 遮光状態で振盪し, 反応させた。

④③の反応液についてCで逆滴定を行った。滴下量をx mLとする

⑤滴下量の変化速度から物質移動容量係数($k_L a$)を算出した。

反応を下記に示す。



従って、1 molの O_2 の移動は、4 molの $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ の滴下の減少につながる。従って、 $k_L a$ は下式により求められる。

$$k_L a = \frac{\Delta x \times 10^{-3} [\text{L}] \times 0.2 [\text{M}] / \Delta t [\text{h}]}{C^* (\text{平衡溶存酸素濃度}) [\text{mol/ml}]} \times \frac{1}{4} \quad \dots (2-6)$$

d) 呼吸速度、酸素移動速度の測定

振盪培養フラスコ内の培地での酸素の収支を調べるために細胞の呼吸速度および酸素の物質移動容量係数を測定した。

呼吸速度について、図2-16に示したようにMichaelis-Menten型の関係が得られた。よって呼吸速度(Q_{O_2})はDO濃度(C)によって以下のように示される。但し、一定値(0.15ppm)以下のDO濃度においては Q_{O_2} は0になる(一定値以下の濃度の酸素は呼吸に利用されない)ので、以下の計算はDO濃度を補正して行っている。

$$Q_{O_2} = \frac{Q_{O_2 \max} \cdot C}{K_m + C} \quad \dots (2-7)$$

これより

$$Q_{O_2 \max} = 7.32 [\text{mg-O}_2/\text{g-DCW} \cdot \text{h}]$$

$$K_m = 0.456 [\text{ppm}]$$

と求められた。

また、酸素の物質移動容量係数について、亜硫酸ソーダ法により

$$k_L a = 19.1 [\text{h}^{-1}]$$

と求められた。

以上の結果より、(2-5)式を用いて細胞濃度からDO濃度を推算することができる。この推算式より、回分培養におけるDO濃度の値を求めると、約4~7 [mg/L]の範囲であることになり、図2-16の呼吸速度の結果から、呼吸に対する酸素供給は十分な範囲にある。

(2) 溶存酸素濃度と比生産速度

溶存酸素濃度と比生産速度との関係の検討を行うために図2-17に示した気泡塔型リアクターを組んだ。リアクター内の溶存酸素濃度をDO電極(ABLE 10AN)で測定、モニターし、供給通気量を固定し、酸素分圧を調節することでDO濃度を一定に保った。溶存酸素濃度の生産性への影響は、これまでは主にリアクター中の通気速度を変更することで、検討されている(Gao, 1992, Leckie, 1991, Spieler, 1985)。

48時間の培養前後のトコフェロール含有量から比生産速度を求めた。フラスコ内で5

から10日間懸濁培養した細胞をナイロンメッシュで採取し、新鮮培地に投入した。

DO濃度と比生産速度との関係を図2-18に示した。気泡により浮揚した細胞の塔内壁への付着の割合が高いため、比生産速度は下式によって近似した。

$$\pi = \frac{\Delta(P/X)}{\Delta t} \quad \dots (2-8)$$

先に述べた比生産速度(2-3)は、次のように書き直すことができる。

$$\pi = \frac{\Delta(P/X)}{\Delta t} + \mu \cdot (P/X)_{av} \quad \dots (2-9)$$

本実験においては、比増殖速度(μ)の正確な値は取れないが、これまでの結果から0.1~0.3としてよい。このとき(2-8)式を用いることによる誤差は1割以内である。

図2-18よりDO 8ppm付近までは、DOと対応してほぼ直線的に比生産速度が増加している。またこのデータを外挿することにより、0ppmでは比生産速度-2.8 [mg/100g-DCW/d]という値が得られる。この値は細胞内におけるトコフェロールの消費もしくは交替の速度であると考えられる。

トコフェロールは、生体内で抗酸化剤として働き、酸素によって誘導される酸化ストレスから細胞内成分を防御する働きがある(Chow, 1991)。従って、酸素ストレスによって生産が誘導されることは、合目的性に合致している。既往の研究で、植物体中のトコフェロール含有量が過酸化ストレスに応答して、増加するという報告がある(Kunert, 1985)。

(3) 溶存酸素濃度制御培養

DOの効果を直接検討するために、DOを8ppmに制御して30日間の培養を行った。ここで放出生産物の不足が生じないように、初期細胞濃度を2.3g-DCW/Lとした。気泡塔による培養では、発泡、細胞浮上を伴うため、長期培養には適さないので振盪フラスコ培養において上部気相の酸素分圧を制御することにより行った。500mL三角フラスコ中の150mL培地の上部に毎分100mLで通気を行い、27℃、100 spmで培養した。

所定日数毎に細胞を含む培養液を所定量サンプリングし、遠心分離により細胞を分離し、上清をフラスコに戻した。細胞について重量、トコフェロール含有量を測定した。DO制御を行わない培養を同様にして併せて行った。

比増殖速度、比生産速度、DO制御を行わない場合のDOの変化を図2-19に示した。DOを8ppmに制御した場合、制御を行わない場合と比べて6日目までは高い値を示すが、培養初期において低下を示す傾向は変わりなく、また、制御を行わない場合における比生産速度の回復はDOの増加と時期がずれていた。従って、溶存酸素は特に培養初期において比生産速度に影響を及ぼすが、回分培養に見られた比生産速度の低下の傾向に対する主因子ではないことが明らかになった。

2-8 結言

回分培養および反復回分培養で観察された細胞の増殖、ビタミンEの生産の挙動、実験計画法を用いた培地成分の検討より、特に増殖、生産に作用すると考えられた成分について検討を進めることにより、有効因子の効果について評価をおこなった。以下に結論を要約する。

- (1) 回分培養において、ビタミンEの比増殖速度は、培養の極初期に低い値を示したのち最大値を示し、その後細胞量の増加にともない低下する挙動を示した。
- (2) 反復回分培養により、細胞の比増殖速度、ビタミンEの比生産速度がともに高く維持された。また、天然種子を超えるビタミンE含有量をもつ培養細胞が得られた。
- (3) 細胞の増殖、ビタミンEの生産は、細胞濃度が低いときに低下すること、既に細胞を培養した培養液（培養ろ液）の添加により、増殖、生産性が向上することから、一定量以上の細胞放出性の物質（コンディショニング因子）が細胞の増殖およびビタミンEの生産に必要であることを示した。
- (4) 気泡塔を用いて、溶存酸素濃度（DO）を制御した短期的な細胞の培養を行って、ビタミンEの比生産速度の応答を測定した。その結果、溶存酸素濃度の9 ppm までの増加によってビタミンEの生産が促進することが観察された。
- (5) 酸素分圧を調整した空気を上面通気した、フラスコ振とう培養により、DO濃度を8 ppm に制御した30日間の回分培養を行った。その結果、培養の初期においては、対照として行ったDO非制御培養において見られた比生産速度の低下を示さず、高い比生産速度を維持したが、その後対照培養と同様に低下する挙動を示した。
- (6) 培地成分についての評価により、リン酸塩が長期的な細胞の増殖に、糖濃度がビタミンE生産に関与していることを明らかにした。さらに、糖濃度の効果については、主に浸透圧の効果によることを示した。

第2章 引用文献

1. Atkinson, B., and Mavituna, F., Biochemical Engineering and Biotechnology handbook (2nd Edition), Stockton Press, pp972, 1991
2. Chow, C.K., Free Radic. Biol. Med., 11, 215, 1991
3. Cooper, C.M., G.A. Fernstrom and S.A. Miller, Ind. Eng. Chem., 36, 504, 1944
4. 藤田泰宏, 森本悌次郎, 細胞工学, 4, 405, 1985
5. Furusaki, S., T. Nozawa, T. Isohara and T. Furuya, Appl. Microbiol. Biotechnol., 29, 437, 1988
6. Furuya, T., Phytochemistry, 26, 2741, 1987
7. Gao, J., and Lee, J.M., Biotechnol. Prog., 8, 285, 1992
8. 原田宏, 駒嶺穆 編, 植物細胞組織培養, 理工学社, 1979
9. Kunert, J., and Ederer, M., Physiol. Plant., 65, 85, 1985
10. 駒嶺 穆, 化学と生物, 29, 70, 1991
11. Leckie, F., Scragg, A.H., and Cliffe, K.C., Biotechnol. Bioeng., 37, 364, 1991
12. 桜井, 柴岡, 清水, 植物生理学入門, 培風館, 1980
13. Spieler, H., Alfermann, A.W., and Reinhard, E., Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 1, 1985
14. Stuart, R. and Street, H.E., J. Exp. Bot., 20, 556, 1969
15. Tabata M., Fujita Y., "Biotechnology in Plant Science" Zaitlin M. et al. ed., Academic Press, New York, p207-215 1985
16. 田中秀夫, 植物細胞工学, オーム社, pp254, 1992
17. 山川隆, 植物細胞工学, 2, 569, 1990

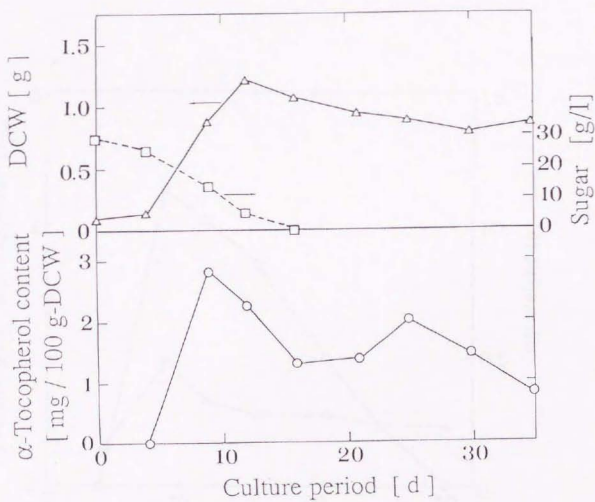


図2-1 回分培養(糖濃度3%) における細胞の乾燥重量
トコフェロール含有量, 糖濃度の経時変化

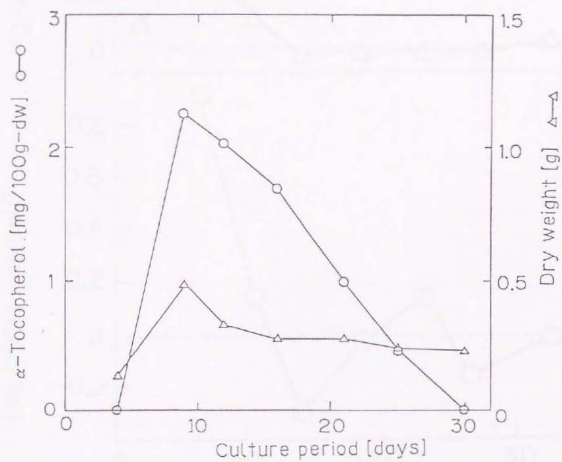


図2-2 回分培養(糖濃度1%) における細胞の乾燥重量
細胞量当りのトコフェロール含有量

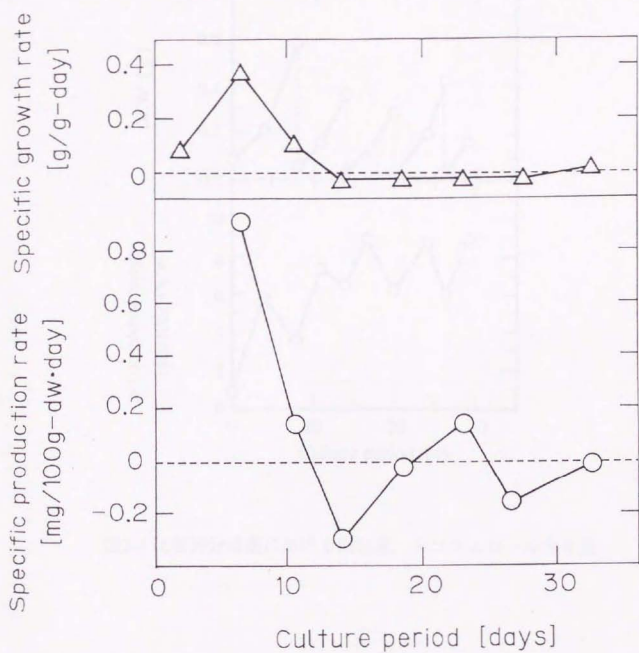


図2-3 回分培養における比増殖速度，比生産速度

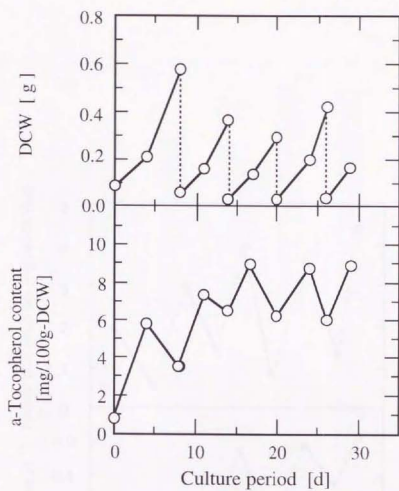


図2-4 反復回分培養における細胞量，トコフェロール含有量

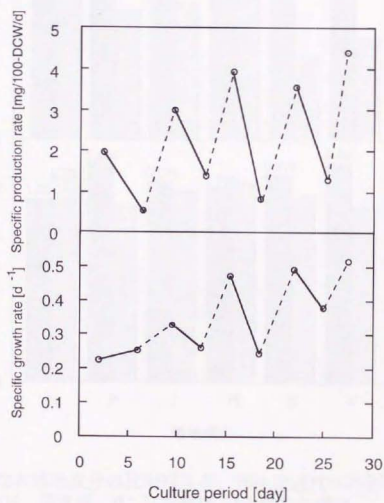


図2-5 反復回分培養における
比増殖速度、比生産速度の経時変化

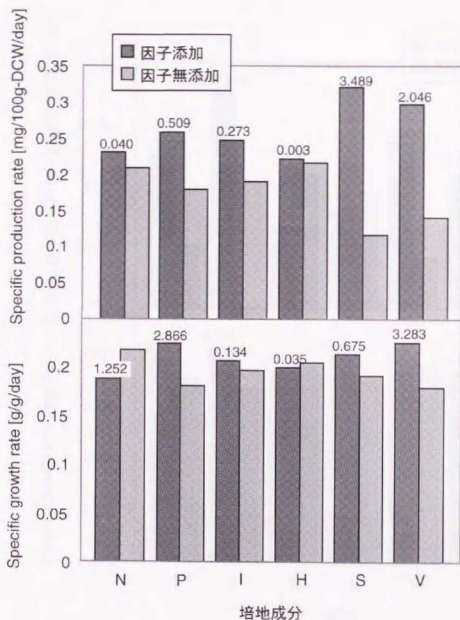


図2-6 培地成分の比増殖速度，比生産速度への影響

(N：窒素源，P：リン酸塩，I：他の無機塩

H：ホルモン，S：糖，V：ビタミン類+カサミノ酸)

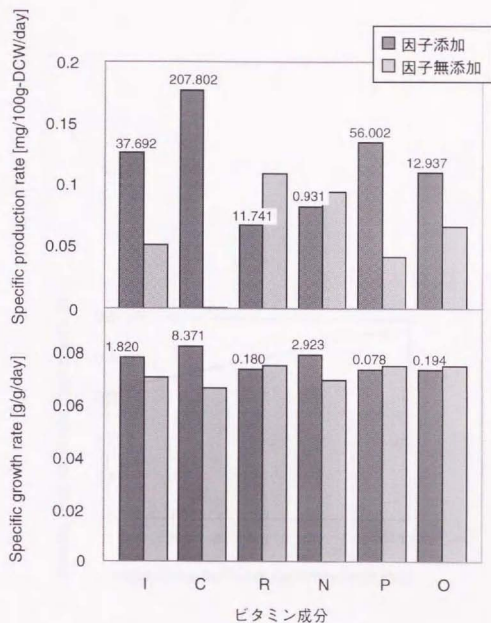


図2-7 ビタミン成分の比増殖速度，比生産速度への影響
 (I：イノシトール，C：カサミノ酸，R：リボフラビン
 N：ニコチン酸，P：パントテン酸，O：他のビタミン類)

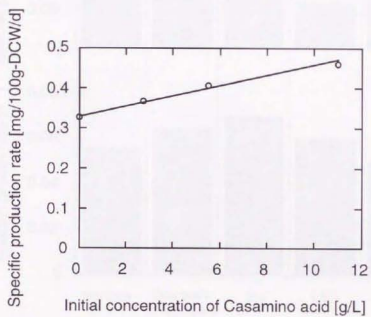


図2-8 カサミノ酸濃度の比生産速度への影響

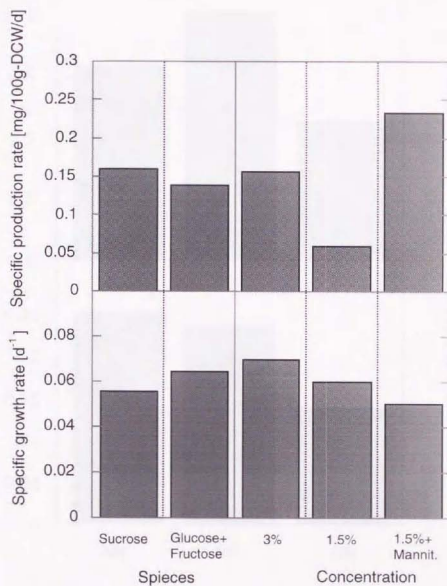


図2-9 糖の比増殖速度，比生産速度への影響

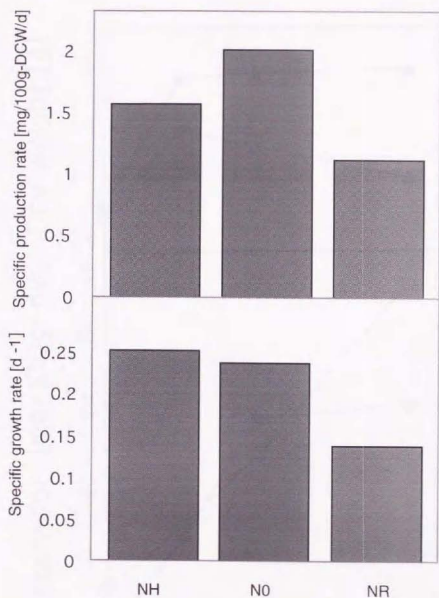


図2-10 窒素源の比増殖速度，比生産速度への影響
 NH：アンモニア態 20 mM+硝酸態 40mM（標準培地）
 NO：アンモニア態 0 mM+硝酸態 20mM
 NR：アンモニア態 0 mM+硝酸態 60mM

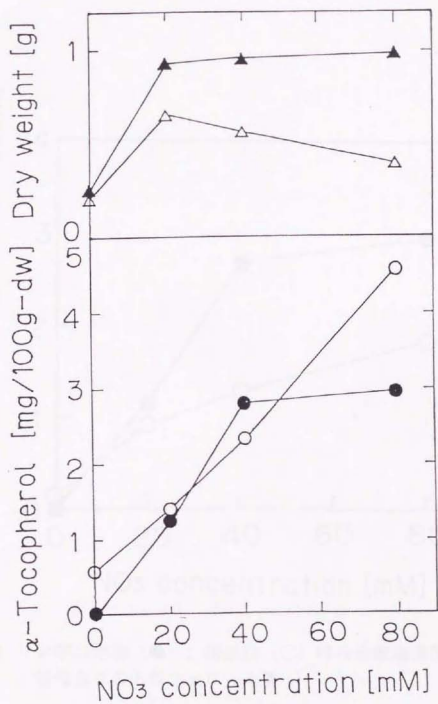


図2-11 リン酸塩添加 (●▲), 無添加 (○△) 時の硝酸塩濃度の影響
: 最終細胞量と最終含有量

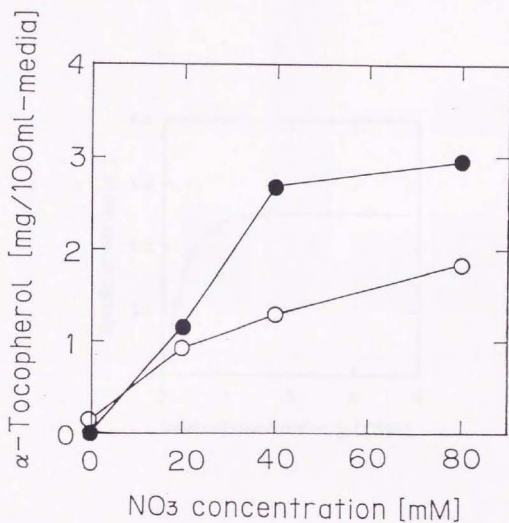


図2-12 リン酸塩添加 (●), 無添加 (○) 時の硝酸塩濃度の影響
: 培地当りのトコフェロール量

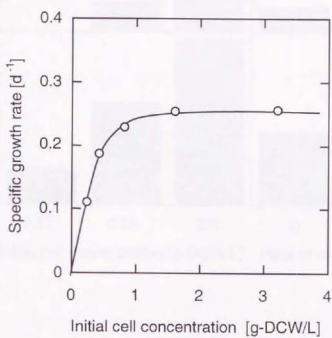


図2-13 初期細胞濃度の比増殖速度への影響

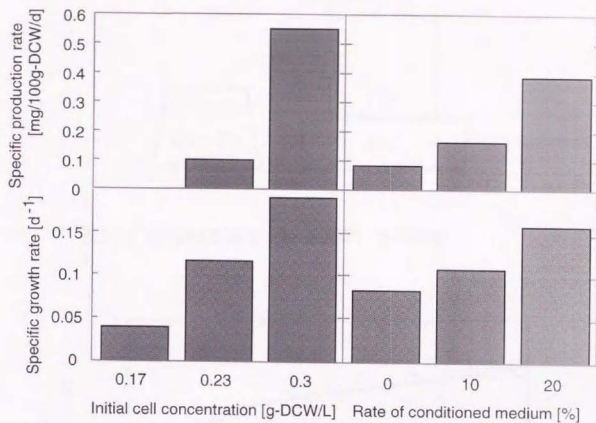


図2-14 初期細胞濃度，旧培地添加割合の
比増殖速度，比生産速度への影響

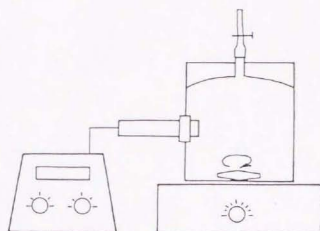


図2-15 酸素消費速度（呼吸速度）測定装置

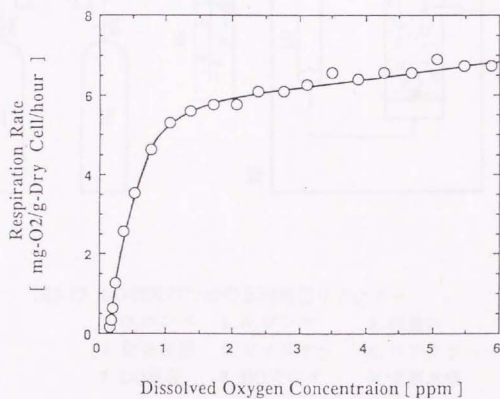


図2-16 呼吸速度

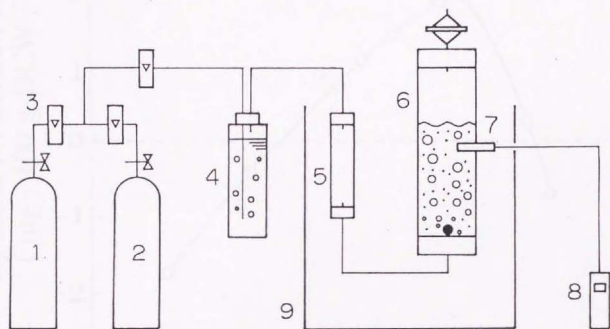


図2-17 DO制御のための気泡塔型リアクター

- | | | |
|-----------------------|-----------------------|----------|
| 1. O ₂ ポンプ | 2. N ₂ ポンプ | 3. 流量計 |
| 4. 加湿容器 | 5. フィルター | 6. リアクター |
| 7. DO電極 | 8. DOモニタ | 9. 恒温水槽 |

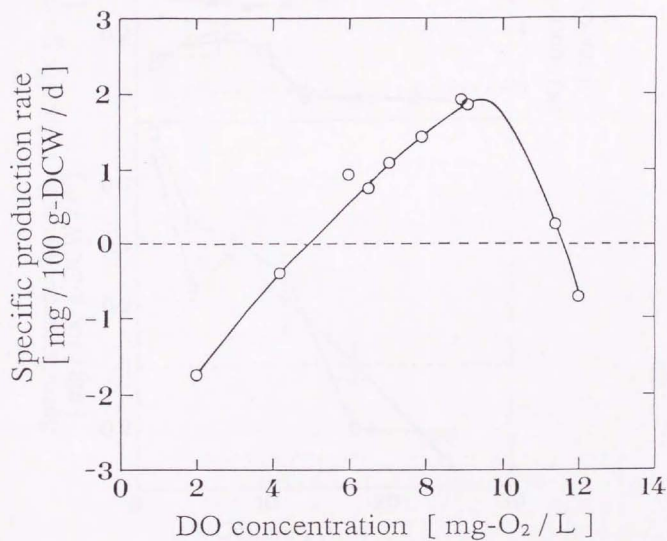


図2-18 DO濃度と比生産速度との関係

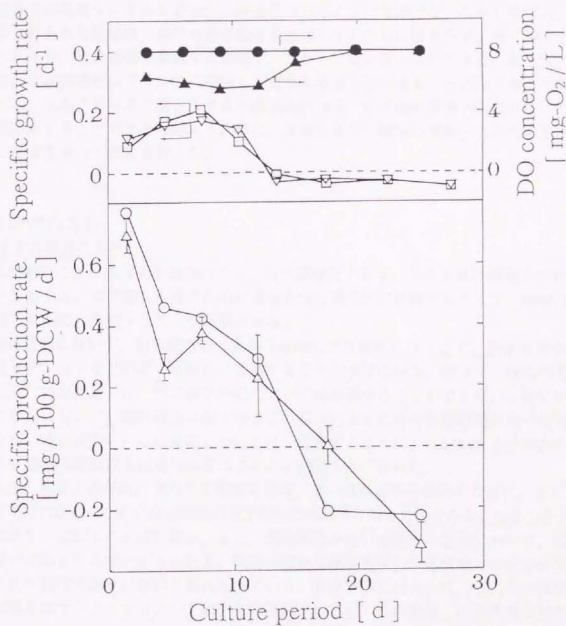


図2-19 DO制御培養における比増殖速度，比生産速度，DO濃度
 (□○●) DO制御 (8mg/L)
 (▽△▲) DO非制御

第3章 構造化モデルによる増殖と生産の解析

前章では培養システムを漸進的に改良する方法について述べた。しかしながら、その過程で得られた結果は、操作の部分的改良に寄与するのみに留まらず、更に深く考察を行うことで、生産機構を解説する基礎データとして用いることができる。従って、本章では、生産機構を系統的に把握し、更なる生産方法の改良へと適用することを目標とする。本章における生産システムの構造的把握は、植物細胞培養一般に対して十分な意義を有することであると考える。特に、連続培養での細胞の挙動、二次代謝生産の記述に重点をおいて検討を行った。

3-1 研究の方針

(1) モデル構築の方針

植物細胞における目的生産物は主に二次代謝産物であり、その生産は細胞内の状態により変動する。有用物質生産のために環境条件を効率的に制御するうえで、細胞内代謝機構を総括的に把握することが必要となる。

植物細胞において、他の微生物や動物と比較して特徴的な点として、炭水化物などの基質をデンプンなどの形で細胞内に蓄積することが挙げられる。従って、細胞内蓄積物の代謝（内在代謝）は、特に植物細胞については無視することができない。特に回分培養の挙動において、植物細胞は微生物などの場合に見られる対数増殖期の後の定常期を示さない場合が多い。この挙動については、後述するように、van Gulik ら(1992)の検討により細胞内貯蔵炭水化物の消費によることが明らかにされた。

また、基質を連続的に供給する連続培養は、高い増殖速度の維持のために、また二次代謝生産の安定のための培養環境の恒常化のためにも有用な方法である。しかしながら、希釈率を一定以上に上げた場合、また、細胞濃度が低い条件での培養において、細胞の増殖が抑制される傾向がみられる。細胞の増殖に細胞由来の分泌成分の存在が必要であることが既往の研究において報告されている。前章で示したように、これらの細胞分泌性の因子はコンディショニング因子と呼ばれているが、その組成、作用機構は解明されていない。

植物細胞の連続的培養の解析のためには、細胞の内在代謝および、コンディショニング因子の効果を考慮に入れたモデルの開発が望まれる。前章では、ベニバナ細胞の培養系においてコンディショニング効果が生じることを確認するとともに、簡易な仮定により、その効果の定式化を行った。このモデルは、培養液中に分泌される因子のみを考慮に入れ、細胞により持ち込まれる量はパラメータとして扱った。しかしながら、連続操作に適用するにあたって、細胞の存在量・培地の希釈率を制御するためには、細胞内に蓄積されている割合を評価する必要があると考えられる。

(2)植物細胞の二次代謝系

植物細胞における二次代謝を含む主な代謝経路を図3-1(真野 1992より)に略記した。植物の二次代謝経路は、大きく次の5経路に分けられる。①メバロン酸経路、②シキミ酸経路、③メバロン酸+シキミ酸経路、④シキミ酸経路+マロニルCoA、⑤オルニチン経路。本研究で対象としているビタミンE(トコフェロール)は、第1章で示したように、シキミ酸経路由来のホモゲンチジン酸とメバロン酸経路由来のフィトールから生成される。

これらの二次代謝経路は、出発物質として解糖系の終端部に存在するホスホエノールビルビン酸やアセチルCoA、またはTCAサイクルの構成化合物をもつ。従って、二次代謝系の生産速度を記述しようとする場合、酵素や構成蛋白質、膜組織などからなる「細胞構造体」や、糖、タンブンなどの細胞内の「貯蔵炭水化物」と区別して、細胞内の正味の一次代謝中間体として「呼吸基質」の量を評価する必要があるといえる。

(3)植物細胞の構造化モデルに関する既往の研究

Baileyら(1989)は、細胞の死滅を考え併せたモデルにより増殖、生産の挙動を解析することを提案している。このモデルにおいて、構造化は、特に糖取り込み後の過程を細胞の死滅とその分解として解釈しており、植物細胞において往々にして視られる糖取り込み停止後の物質生産に対して有効なモデルとはなっていない。

細胞の内在代謝の記述には、細胞内の構造を区分けしたコンパートメントモデルが適していると考えられる。植物培養細胞に対するこの型のモデルとしては、Hookerら(1992)、van Gulikら(1993)によって提案されているモデルがある。特にvan Gulikのモデルでは、リン酸塩の代謝系制御への作用、細胞内蓄積多糖類の存在を考慮に入れることにより、植物細胞特有の内在代謝の解釈を行っている。しかしながら、このモデルでは、基質の細胞内への取り込みや呼吸基質の所在を多元化するなど、生化学的知見とは異なる面がある。また、二次代謝生産の明確な記述を与えていない。

一方、細胞分泌性物質を考慮したモデルとしては、Frazier(1989)は、糖取り込みと増殖について分泌性の中間体を考慮したモデルを提示している。しかしながら、その対象は回分培養にとどまっており、コンディショニング効果が最も重要な役割を示す連続系の記述には適用していない。本報告では、コンディショニング因子作用について、Fraizerの仮定を取り込んだモデルを提案し、半連続操作における増殖の挙動を評価した。

(4)本研究のモデルの概略

本研究では、細胞内の重要な組成として、解糖系やTCAサイクルを形成する呼吸基質を考慮に入れた。細胞外から取り込まれた糖は、細胞内で呼吸基質を経由して、呼吸により消費されるとともに、さまざまな細胞内での構成要素の産出に供される。従って、呼吸基質を考慮に入れることにより、基質の流れを簡略化することができるとともに、細胞の二次代謝産物の生産を記述することができると考えた。

3-2 実験方法

モデルを構築するにあたり、細胞の増殖および生産の挙動と細胞内構成について、実験的検討を加えた。

細胞量の測定

細胞数 : 細胞懸濁液を3mL採取、細胞塊を分解するため、ペクチナーゼ0.1mLを添加し2時間振盪した後、血球計算盤を用いて計数した。

新鮮重量 : 採取した細胞を吸引濾過し秤量した。

乾燥重量 : 凍結した細胞を真空乾燥し秤量した。

リン酸塩濃度 : モリブデンブルー法によって測定した。

溶存酸素濃度 : 溶存酸素電極により測定した。

呼吸速度の測定

ダイナミック法により行った。溶存酸素電極を設置した容器中に細胞懸濁液を投入し、空気により酸素を飽和させた後、容器を密閉した。懸濁液中の溶存酸素濃度の最大減少速度により最大呼吸速度を評価した。

TTCによる細胞内呼吸活性の分析

TTC (triphenyl-tetrazolium chloride) は、細胞内の呼吸活性酵素量を評価するための試薬である。TTCは細胞内の電子伝達系で還元され、赤色素formazanを合成する。

TTCを用いることにより生存率を測定する。測定法は、染色（培養）、エタノールによる抽出、吸光度（485nm）測定のステップからなる。基本的にはTowill&Mazur（1975）により提示された分析条件に従った。しかしながら、染色に関してはTTCの拡散が律速になることによる誤差を防ぐため、窒素ガス封入後、恒温室（25℃）内で振盪することによって行った。また、染色におけるTTCの濃度に関しては細胞種により至適条件が異なることが指摘されているため、予備実験として、ペニバナ細胞に対する至適なTTC濃度を選択し（実験1）、その条件において生存率の測定が可能であることを確認した（実験2）。以下にその実験条件と結果を示す。

予備実験1. 生存率分析に対する至適TTC濃度の選択

以下に示す実験条件で、染色におけるTTC濃度を0~1.2%で変化させて、一定量の細胞に対する抽出液の吸光度を比較した。

| | |
|--------------|---------------------------|
| 実験条件 : 前培養条件 | : RT-B2K液体培地にて6日間培養 |
| 細胞量 | : 0.25g（新鮮重量 : FCW）/2mL |
| TTC濃度 | : 0, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2 % |

結果を図3-2に示す。結果には誤差が見られるが、概ねTTC 1.0%で最も高い吸光度が得られた。以下の実験にはTTC 1.0%の条件を採用することにした。

予備実験2. TTCによる生存率分析

TTC1%の条件において、細胞の生存率が測定できることを確認するために、死滅細胞を含む細胞懸濁液を用いて生存率に対する抽出液の吸光度の対応を調べた。サンプリングした細胞懸濁液の一部を死滅処理し、生存細胞と死滅細胞の比率の異なるサンプルを用意した。実験条件を以下に示す。

実験条件：前培養条件：RT-B2K液体培地にて7日間培養

死滅処理条件：90℃の湯浴で3分間処理

細胞量：0.24g-FCW/2mL

生存細胞比率：0, 1/6, 2/6, 3/6, 4/6, 5/6, 1

結果を図3-3に示す。細胞の生存率の増加に従って吸光度が増加している。

生存率3/6までは直線性が得られたが、それ以上では外れてきている。その理由として、抽出効率も考えられたため、抽出後のサンプルについて再抽出を行った。その結果からは各測定値における誤差レベルの吸光度しか得られなかったため、抽出効率の問題ではないと考えられた。直線性からのずれは生存細胞が多い場合、TTC濃度の減少の効果が大きいためであると考えられる。このことから懸濁液の細胞濃度は0.12g-FCW/2mL以下に抑える方がよいといえる。

3-3 モデルの構築

(1) 回分培養における呼吸速度の評価

細胞はペニバナ細胞、培地はRT-B2K培地を用いた。固体培地上で3週間毎に継代したカルスを100mLの液体培地に移し、2週間毎に二回懸濁培養（前培養）を行った後、実験に用いた。10本の300mLフラスコ（培地90mLを含む）に同一フラスコ内の細胞懸濁液を10mLを加え、27℃、暗所、88spmの条件で38日間振盪培養を行った。その過程において、所定量の細胞懸濁液を採取し、細胞数、乾燥重量、新鮮重量、TTC呈色、呼吸速度、培地中の糖濃度の測定を行った。

回分培養における細胞乾燥重量、新鮮重量、細胞数、糖濃度、最大呼吸速度および、TTC還元色素濃度の経時変化を、図3-4～9に示す。細胞乾燥重量および新鮮重量は糖が消費される培養22日まで増加し、その後低下した。一方、細胞数は培養32日目まで増加を続けた。乾燥重量の新鮮重量に対する比率は培養経過とともに低下しているが、この傾向は他の培養でもみられる。この比率と、細胞外糖濃度との相関を図3-10に示す。ほぼ直線的な対応がみられることから、細胞の膨張率が浸透圧に大きく依存していると考えられる。

TTCおよび呼吸速度は培養22日目まで乾燥重量の増加と同様に増加し、その後低下した。乾燥重量あたりのTTCの値とTTCあたりの呼吸速度の変化を図3-11,12に示す。乾燥重量あたりのTTCは培養18日目から低下している。その一方、TTCあたりの呼吸速度は培養期間を通じてほぼ一定であった。TTCの値は、呼吸基質の異化速度に対応していると考えられる。従って、呼吸過程は呼吸基質の代謝速度に律速されていると考えられる。

そこで、本研究では、呼吸速度が細胞内の呼吸基質の量によって規定されるものと仮定した。また、既往の研究において呼吸速度と増殖速度が相関していることが報告されていることから、細胞構造体の合成速度は、呼吸速度によって規定されるものとした。

(2)細胞内リン酸塩の関与

既往の研究において、リン酸塩が細胞の増殖速度に寄与していることが報告されている (Curtis, 1991)。細胞内のリン酸塩はエネルギー物質や核酸の主要な原料である。また細胞内の呼吸基質や細胞構造体には一定量のリン化合物が含まれる。リン酸塩濃度の増殖速度への関与は、①エネルギー代謝速度による、②細胞内核酸量の調節による、③呼吸基質量や酵素活性の調節によるという可能性が考えられる。

細胞におけるエネルギー生産は呼吸であり、エネルギー消費の主要な部分は、タンパクなど細胞構造体の合成に用いられる。既往の研究においても、呼吸速度は増殖速度に大きく依存することが示されているが、細胞構造体の合成によるものと考えられる。細胞内のATP存在量は数 μ mol/gのレベルであり、細胞の糖消費速度はg-Sugar/g/dで1gの糖によって約200mmolのATPが生産される。従って、ATPは秒のレベルの代謝回転をしていることになる。呼吸、細胞構造体合成速度は、ATPの回転速度に対応するもので、ある程度のリン酸塩濃度においては、その濃度に律速されるものではないと考えられる。

細胞内の貯蔵炭水化物はリン酸塩を要さない。つまり、貯蔵炭水化物の存在は、細胞内の炭水化物のみならずエネルギー物質、核酸原料として有効なリン酸塩の維持のための役割を有している。従って、核酸量、呼吸基質、細胞構造体量を間接的に調節するために、貯蔵炭水化物の調節にリン酸塩が作用しているものと仮定した。既往の研究においても、細胞内リン酸塩濃度が細胞内貯蔵炭水化物量の調節に関与していることが報告されている (Portis, 1982, Giaquinta, 1980)。本モデルでは、貯蔵炭水化物と呼吸基質量の比率の制御にリン酸塩濃度が関与するものとした。

(3)コンディショニング因子の問題

前章で示したように、培養ろ液を添加した際にも増殖促進効果がみられることから、細胞外に分泌される物質が増殖促進に関与しているといえる。但し、有効成分の細胞内に取り込まれた量が、細胞内で作用すると考えられる。

そこで、細胞外分泌とともに細胞内蓄積も存在するものと仮定した。従ってその定式化は、Frazierのモデルと同様に、①細胞の比増殖速度は、細胞内に蓄積されたコンディショニング因子の量により決まる。②コンディショニング因子の、細胞内蓄積量は細胞外濃度と比例した平衡状態にあるものとした。

コンディショニング因子の生産速度は、二次代謝生産の非構造化モデルである Leudeking-Piretモデルの二つの項、つまり増殖量比例生産と細胞量比例生産の各々の場合を想定した。

この仮定に基づいて、以下のように定式化を行った。

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \quad \dots (3-1)$$

$$\mu = \beta \cdot q \quad \dots (3-2)$$

$$C_T = q \cdot C_x + C_M \quad \dots (3-3)$$

$$C_M = K \cdot q \quad \dots (3-4)$$

$$\frac{dC_T}{dt} = \alpha_l \frac{dC_X}{dt} \quad \dots (3-5-1)$$

もしくは

$$\frac{dC_T}{dt} = \alpha_r C_X \quad \dots (3-5-2)$$

以上の基礎式より，細胞濃度 (C_X)，コンディショニング因子の細胞内蓄積量 (q) は下式より求めることができる。

$$\frac{dC_X}{dt} = \beta \cdot q \cdot C_X \quad \dots (3-6)$$

$$\frac{dq}{dt} = \frac{\left(\frac{dC_T}{dt} - q \frac{dC_X}{dt} \right)}{C_X + K} \quad \dots (3-7)$$

本研究での構造化モデルでは，増殖量はコンディショニング因子のみによっては決まらないため，(3-6)式はコンディショニング因子のパラメータ (K , α , β) の決定の際にのみ用い，構造化モデルでは糖取り込み過程に導入した。またここで，細胞内蓄積量 q^* で平衡に達している培養系より，細胞を C_{X0} ，培養濾液を v_T 添加した場合，平衡に達した後の q は下式で示される値をとる。

$$q = q^* \frac{C_{X0} + K \cdot V_T}{C_{X0} + K} \quad \dots (3-8)$$

(4) 構造化モデルの概略

本研究で想定したモデル構造の概略を図3-13に示す。細胞内構造を，呼吸に用いうる基質（「呼吸基質」）を中心にして，その前段階物質として蓄積されている「貯蔵炭水化物」，そして呼吸には用いられない「細胞構造体」とに分けて考えた。ここで，細胞の諸代謝機能の中心をなす酵素は，細胞構造体に含まれるものとした。

また，細胞外の制限基質としては，糖，リン酸塩のみを考慮した。リン酸塩が制限基質となっていることは，多くの植物細胞培養用の培地においてみられていることであり，増殖速度がリン酸塩の含有量により規定されていることについては，多くの報告がある。また，回分培養後期における細胞増殖の停止，細胞の最大濃度は，ほぼ糖濃度により決定されている。

(5) 代謝の諸速度過程

取り込み速度

細胞外の糖 (Se)，リン酸塩 (Pe) の濃度に対して，Michaelis-Menten型で仮定した。また，特に糖の取り込みに対してコンディショニング因子含有量 (q) が作用するものとして，その効果を加えた。取り込みに関与する細胞成分は，細胞構造体 (B) とした。

糖取り込み速度 (r_1)

$$r_1 = k_1 \frac{q}{q_{\max}} \left(\frac{C_{Se}}{K_S + C_{Se}} \right) C_B \quad \dots (3-9)$$

リン酸塩取り込み速度 (r_2)

$$r_2 = k_2 \left(\frac{C_{Pe}}{K_P + C_{Pe}} \right) C_B \quad \dots (3-10)$$

呼吸速度および細胞構造体合成

呼吸速度は、細胞内の呼吸基質濃度に比例するものとした。また、呼吸によって生じたエネルギーのうち、維持代謝に用いられるものを差し引いたものが、細胞構造成分の合成に用いられるものとした。

呼吸速度 (r_3)

$$r_3 = k_3 C_N \quad \dots (3-11)$$

細胞構造成分合成速度 (r_4)

$$r_4 = \frac{(r_3 - \delta C_B)}{\gamma} \quad \dots (3-12)$$

蓄積炭水化物と呼吸基質のバランス

蓄積炭水化物 (C) への呼吸基質 (N) の変換速度 (r_5) は、細胞内の呼吸基質量の増加によって促進され、蓄積炭水化物およびリン酸塩の増加によって抑制されるものとした。逆に、蓄積炭水化物の呼吸基質への変換速度 (r_6) は、細胞内の呼吸基質量の増加によって抑制され、蓄積炭水化物およびリン酸塩の増加によって促進されるものとした。

$$r_5 = \left(k_5 \frac{C_N / C_S}{(C_C / C_S)(C_P / C_S)} \right) C_B \quad \dots (3-13)$$

$$r_6 = \left(k_6 \frac{(C_C / C_S)(C_P / C_S)}{C_N / C_S} \right) C_B \quad \dots (3-14)$$

(6) 物質収支

以上の関係および速度式より、以下の物質収支式が得られる。

$$\frac{dC_{Se}}{dt} = -r_1 \quad \dots (3-15)$$

$$\frac{dC_{Pe}}{dt} = -r_2 \quad \dots (3-16)$$

$$\frac{dC_N}{dt} = r_1 - r_3 - f_4 - r_5 + r_6 \quad \dots (3-17)$$

$$\frac{dC_G}{dt} = r_5 - r_6 \quad \dots (3-18)$$

$$\frac{dC_B}{dt} = r_4 \quad \dots (3-19)$$

(7)生産過程のモデル化

本モデルの理論から、また、ビタミンEの前駆体のフィトールが解糖系終端のアセチルCoAにホモゲンチジン酸がシキミ酸に由来するものであることから、基質としては細胞内呼吸基質を用いるとした。但し、前章の検討において、カサミノ酸が生産に大きく関与していることから、前駆体のいずれかは細胞外から供給されるカサミノ酸に依存しているものとした。カサミノ酸は天然物であり、組成中の有効成分は特定されていない。有効成分の取り込み速度は、簡便のため細胞外での濃度に比例するものとした。さらに取り込まれた有効成分と細胞内呼吸基質の細胞構造体に含まれる酵素を介した反応によって、トコフェロールが合成されるとした。ビタミンEの消費・分解速度は、簡便のため存在量に比例するものとした。また前章において、生産速度に浸透圧が作用していることを示した。従って、ビタミンEの生産に関与する呼吸基質の濃度は細胞容積を代表する細胞新鮮重量基準でとることとした。新鮮重量の推算は先に示した乾燥重量との相関から

$$C_F = \frac{C_X}{\frac{C_{Se} + Sp}{\rho}} \quad \dots (3-20)$$

(C_F : 新鮮重量, C_X : 細胞乾燥重量, C_{Se} : 細胞外糖濃度,

Sp : 最小乾燥重量比, ρ : 比重)

という関係式でモデルに導入した。

生産に対するコンディショニングについては、特別の速度式を設定しなかった。増殖に設定したコンディショニングの効果は、生産物の基質として設定した細胞内呼吸基質の含有量に関与するため、間接的に生産速度に関与することになる。

以上より、培地から供給される有効成分の細胞外濃度 (P_m)、および細胞内に取り込まれた量の培養液基準の濃度 (P_r)、最終生産物ビタミンEの濃度 (P_v) の変化は以下の式で表される。 P_m , P_r , P_v の単位は便宜的に $1 \mu g$ のToc生産に必要な量を1Unitとした。

$$\frac{dP_m}{dt} = -h_1 \cdot P_m \cdot C_B \quad \dots (3-21)$$

$$\frac{dP_r}{dt} = h_1 \cdot P_m \cdot C_B - h_2 \cdot \frac{P_r}{C_F} \cdot C_N \quad \dots (3-22)$$

$$\frac{dP_v}{dt} = h_2 \cdot \frac{P_r}{C_F} \cdot C_N - h_3 \cdot P_v \quad \dots (3-23)$$

3.4 シミュレーション

(1) パラメータの設定

取り込み速度

既往の研究において、糖並びにリン酸塩の取り込みの速度は細胞の全重量基準で与えられる。また、その値は、培養系によって大きく異なっている。本モデルにおいては、取り込みは細胞構造体基準で進行するとしているが、細胞構造体の定量的評価を行っていないため、実験によるこれら速度の決定はできない。そこで、実験結果より、全細胞重量基準の糖およびリン酸塩の最大取り込み速度を決定し、その細胞構造体基準の値との比率をパラメータとした。また、文献値より各ミカエリス定数を決定した。ここで糖取り込みのミカエリス定数は、細胞系によって1.5~6 g/L (van Gulik, 1992, Schnapp, 1991) の範囲で変化しているが、本研究の範囲で大勢に影響しないので、中間的な値を採用した。

リン酸塩の最大取り込み速度は、リン酸塩濃度を1.25, 2.5, 5 mmol/Lの培地による反復回分培養を行い、細胞外のリン酸塩の取り込み速度を測定することにより決定した。その結果、各条件において0.086~0.124 mmol/g-DCW/dの範囲で変化した。実験精度から、この値には有意差はない。そこで、最大リン酸塩取り込み速度は約0.1 mmol/g-DCW/dとした。一方、糖の取り込み速度については、数回の回分培養において最大値が0.8 g/g/dであったが、この数値は細胞増殖の挙動に大きく影響するので、パラメータとした。

増殖速度と呼吸速度の関連

呼吸速度と比増殖速度の関係は、細胞系によらずほぼ同様な相関を示しているため、文献値より決定した。但し、ここでも与えられている値は全乾燥重量基準であるので、細胞構造体基準の値に前述のパラメータによって変換した。

コンディショニング因子の効果

ここで、コンディショニング因子の単位を、細胞の比増殖速度を単位量増加させることに要するコンディショニング因子量を1単位とした。(3-2)式における $\beta=1$ となるように定義した。

前培養後の細胞内蓄積量、細胞外分泌率(K)、細胞による生産比率(α)をパラメータとして、図2-14に示した実験および図2-13に示した初期細胞濃度を変えた培養の条件について、(3-5)、(3-6)、(3-7)式に従って数値計算により最終細胞量を求めた。実験により得られた結果との対応について、最小自乗法によってパラメータ値を評価した。前述のように生産比率(α)については、細胞増殖量に依存する場合と、細胞量に依存する場合の2種類について検討した。計算により得られた最終細胞量と実測値との対応を図3-14に示した。増殖依存性の生産の場合、 α は0.4 [unit/g]、Kは1 [g/L]で、存在量依存の場合、 α は0.08 [unit/g/d]、Kは0.9 [g/L]で最適であったが、特に存在量依存の場合のKの値は0.4から0.9までではほぼ実験値とのよい相関が見られたため、この実験のみによってKの値を決定することは避け、次に反復回分培養について、簡易シミュレーションを行った。

先の(3-5~8)式を用いて、2日毎に細胞懸濁液の40%を交換した反復回分培養の結果に対してシミュレーションを行った結果を図3-15に示した。その結果、増殖依存のコンディショニング因子生産を仮定した場合、先の検討で得られたパラメータの範囲では実験値と一致しない。その一方、細胞存在量依存の生産を仮定した場合、細胞外分泌率 K を0.4とした場合、実験値と計算値はよい相関を示した。

ここで、式(3-9)に導入するコンディショニング因子の最大値は、生産された因子のすべてが細胞に蓄積された場合の値である。従って、存在量依存の場合 $0.32[\text{unit/g}]$ となり、観測される比増殖速度のレベルにほぼ一致している。

(2) 回分培養および反復回分培養における増殖の挙動 パラメータの評価

上記の検討により、糖取り込み速度定数(k_1)、呼吸速度定数(k_2)、貯蔵炭水化物と呼吸基質の相互変換速度定数(k_3 , k_4)、細胞構造体に対する乾燥重量の比率(C_X/C_B)の5定数をパラメータとして設定し、第2章に示した初期糖濃度3%の場合の回分培養(図2-1)および反復回分培養(図2-4)における細胞重量の経時変化とのフィッティングにより最適値を求めた。決定したパラメータ値を表3-1に示した。

k_1 の値 $1.9[\text{g/g/d}]$ と細胞乾燥重量基準で求めた実験値 $0.8[\text{g/g/d}]$ との比は2.4であり、パラメータとして設定した $C_X/C_B=2$ と近い値になっている。また、シミュレーションにおける対数増殖期の C_X/C_B の値ともほぼ一致する。

回分培養における増殖の挙動

初期糖濃度3%および1%における細胞量および糖濃度、別の初期細胞条件で行った回分培養における細胞量及び細胞内呼吸基質のそれぞれシミュレーション結果を図3-16, 17に示した。細胞量、糖濃度の値は実験値と、よい相関を示した。また、細胞内呼吸基質の挙動は、実験によって得られたTTCの測定値とほぼ同じ挙動を示した。

反復回分培養における増殖

反復回分培養のシミュレーションを、新たに行った培養に対して行った。培養は、由来を同じくする細胞を同濃度で接種した懸濁液を用いて、2日毎に細胞を含む懸濁液の40%もしくは、6日毎に80%を採取し、同量の新鮮培地を添加することにより行った。ここで懸濁液の交換比率は、両条件で希釈率が等しくなる($0.26[\text{d}^{-1}]$)ように設定した。従って、比増殖速度が両条件で同じく一定の値をとる場合、細胞濃度の変化は同様の傾向をとることになる。

図3-18に、各条件での細胞濃度の経時変化について、実験により得られた値、本モデルによる値を併せて示した。培養の経過を通じてほぼ一致しているといえる。

(3) 回分および反復回分培養におけるビタミンE生産

回分培養および反復回分培養におけるビタミンE生産の挙動をシミュレーションにより評価した。回分培養におけるシミュレーション結果を図3-19に示す。細胞量減少期にはビタミンEの量に実験値と計算値にずれが見られるが、この時期は細胞内の微少な呼吸基質量によりビタミンE生産が左右される時期であり、細胞内呼吸基質変化に詳細な

調整項が加えられていないことを考慮するとこの結果は本モデルの十分な役割を示しているといえる。

反復回分培養についてのシミュレーション結果を図3-20に示す。反復の各回分において、ほぼ一致している。このとき、細胞量あたりの含有量は、回分培養での値の3~4倍に至る。また含有量の経時変化を図3-21に示す。前章の反復回分培養(図2-4)にみられた含有量の各回分での増減の挙動と同じ挙動を示した。

以上の結果より、本モデルは、ビタミンE生産を記述するのに有効であるといえる。

3-5 考察

本モデルは、連続培養のためのコンディショニング因子の効果を考慮に入れている点、細胞内構造として呼吸基質を想定している点にオリジナリティを有すると考える。半連続系の細胞増殖の数値計算による評価としては、Schnappら(1991)の研究例が存在するが、そのモデルでは連続操作による細胞増殖速度の変動という挙動を表現できない。また、本研究でのコンディショニング因子の効果は、結果としてFrazierが提案した分泌性基質中間体のモデルと同様な傾向を示したが、このことは、コンディショニング因子として検討されている物質は、細胞膜透過性を有する基質、細胞構造体の全てが含まれていることを示している。

Baileyら(1989)は細胞の死滅を細胞の膨潤、機械的破壊によるものと仮定しているが、次章で検討するように植物細胞はフラスコ振とう培養程度の機械的ストレスでは回分培養の際に見られるような細胞量減少を示すとは考えにくい。本研究では細胞の死滅は考慮していないが、フラスコレベルで見られる細胞生存率の低下は、細胞内の代謝によると考えられる。本モデルにおいて、回分培養終期においては、呼吸基質の消費速度は維持代謝に要求される量を下回っている。細胞の死滅速度はこのような呼吸基質不足によることが考えられる。

本モデルの構造、特に貯蔵炭水化物の考慮は、van Gulik (1993)によるモデルに近いものであるが、彼らのモデルにおいては、呼吸基質の存在を考慮していないため、貯蔵炭水化物の代謝過程が、他の構成成分と独立している。そのため、飢餓培養や二次代謝産物の生産の記述には不足があると考えられる。

二次代謝生産の挙動は非構造化モデルのLeudeking-Piret (1959)のモデルが多用されてきた。生産性を増殖量依存と存在量依存との和から表すこのモデルは、一定条件下での培養挙動を表すには有効であると考えられる。しかしながら、培養条件の異なる場合、異なるパラメータを要することが多い。本研究で構想したのは、内在代謝の寄与を記述することにより、異なる培養環境で適用可能なモデルの構築であった。本モデルでは、呼吸基質以降の前駆体の量や細胞構造体の自己分解による基質供給を考慮していないが、これらを考慮することにより、他の生産系への適用を検討することができると期待される。

3-6 結言

回分培養および反復回分培養における細胞の増殖およびビタミンEの生産挙動について検討を行い以下の結果を得た。

- (1) コンディショニング因子の効果について、簡易モデルを用いた定量的評価を行い、生産速度、細胞外分泌率を評価した。
- (2) 呼吸基質を考慮した構造化モデルを構築した。細胞の増殖（構成成分合成速度）がエネルギー律速であること、呼吸基質と貯蔵炭水化物の相互変換が細胞内リン酸塩による制御を受けていることを仮定した。さらに、コンディショニングの効果を検討することにより、ペニバナ細胞の回分培養および反復回分培養における増殖挙動を記述することができた。
- (3) 呼吸基質を前駆体として設定し、前章で明らかになったビタミンE生産に対する有効因子の効果を検討することにより、ビタミンE生産を記述する構造化モデルを提案した。

以上の成果をもつ本モデルは、連続培養系の記述にも適用可能であり、呼吸基質を考慮した細胞内構造化により二次代謝生産系の記述にも有用な手法を与えるものであると考えられる。

記号一覧

- C_B ; 細胞構造体濃度 [g/L]
 C_C ; 貯蔵炭水化物濃度 [g/L]
 C_N ; 呼吸基質濃度 [g/L]
 C_F ; 新鮮重量濃度 [g/L]
 C_X ; 細胞濃度 (乾燥重量) [g/L]
 C_{X0} ; 初期細胞濃度 (乾燥重量) [g/L]
 C_{SC} ; 培地中糖濃度 [g/L]
 C_{PC} ; 培地中リン酸塩濃度 [mmol/L]
 C_{PI} ; 細胞内リン酸塩濃度 [mmol/L]
 C_T ; 全コンディショニング因子濃度 [unit/L]
 C_M ; 培地中コンディショニング因子濃度 [unit/L]

- h_1 ; 培地中生産基質取り込み速度定数 [L/g/d]
 h_2 ; トコフェロール合成速度定数 [d^{-1}]
 h_3 ; トコフェロール分解速度定数 [d^{-1}]

k_1 ; 糖取り込み速度定数 [g/g/d]
 k_2 ; リン酸塩取り込み速度定数 [mmol/g/d]
 k_3 ; 呼吸速度定数 [g/g/d]
 k_4 ; 呼吸基質の貯蔵炭水化物への変換速度定数 [g/g/d]
 k_6 ; 貯蔵炭水化物の呼吸基質への変換速度定数 [g/g/d]

K ; コンディショニング因子細胞外分泌率 [g/L]
 K_S ; ミカエリス定数 (糖取り込み) [g/L]
 K_P ; ミカエリス定数 (リン酸塩取り込み) [mmol/L]

P_m ; 培地中生産基質濃度 [unit/L]
 P_f ; 細胞内生産基質濃度 [unit/L]
 P_v ; トコフェロール濃度 [μ g/L]

q ; コンディショニング因子蓄積量 [unit/g]
 q^* ; 平衡コンディショニング因子蓄積量 [unit/g]
 q_{max} ; 最大コンディショニング因子蓄積量 [unit/g]

r_1 ; 糖取り込み速度 [g/L/d]
 r_2 ; リン酸塩取り込み速度 [mmol/L/d]
 r_3 ; 呼吸速度 [g/L/d]
 r_4 ; 細胞構造体合成速度 [g/L/d]
 r_5 ; 呼吸基質の貯蔵炭水化物への変換速度 [g/L/d]
 r_6 ; 貯蔵炭水化物の呼吸基質への変換速度 [g/L/d]

S_p ; 最小乾燥重量/新鮮重量比 [g/g]
 t ; 培養時間 [d]
 V_T ; 培地移入率 [L/L]

α_1 ; コンディショニング因子生産速度定数 (増殖比例) [unit/g]
 α_2 ; コンディショニング因子生産速度定数 (細胞量比例) [unit/g/d]
 β ; コンディショニング因子効力 [g/d/unit]
 γ ; 細胞構造体合成/呼吸収率 [g/g]
 δ ; 維持代謝係数 [d^{-1}]
 ρ ; 比重 [g/L]
 μ ; 比増殖速度 [d^{-1}]

引用文献

1. Bailey, C.M., and Nicholson, H., *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 1331, 1989
2. Curtis, W.R., Hasegawa, P.M., Emery, A.H., *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 371, 1991
3. Frazier, G.C., *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 313, 1989
4. Giaquinta, R.T., and Quebedeaux, B., *Plant Physiol.*, 65, Suppl., 119, 1980
5. Hooker, B.S., and Lee, J.M., *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 765, 1992
6. Leudeking, R., and Piret, E. L., *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, 1, 393, 1959
7. 真野佳宏, 植物細胞工学, オーム社, pp261, 1992
8. Portis, A.R., Jr., *Plant Physiol.*, 70, 393, 1982
9. Schnapp, S.R., Curtis, W.R., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M., *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1131, 1991
10. Towill, L. and Mazur, P., *Can. J. Bot.*, 53, 1097, 1975
11. van Gulik, W.M., ten Hoopen, H.J.G., and Heijnen, J.J., *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 863, 1992
12. van Gulik, W.M., ten Hoopen, H.J.G., and Heijnen, J.J., *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 771, 1993

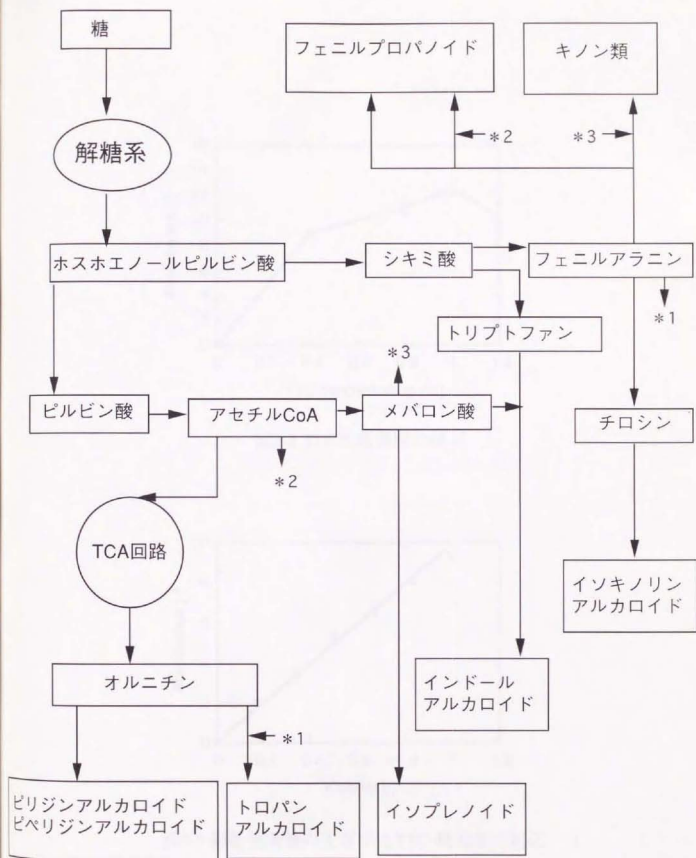


図3-1 植物の一次代謝と二次代謝

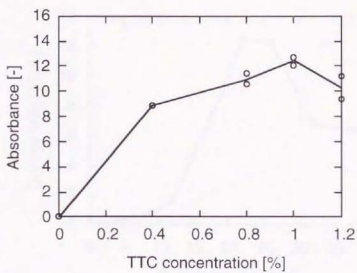


図3-2 TTC至適濃度の検討

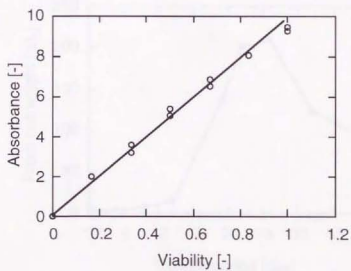


図3-3 細胞懸濁液の生存率とTTC吸光度の対応

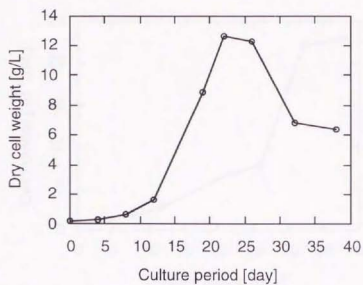


図3-4 回分培養における細胞乾燥重量

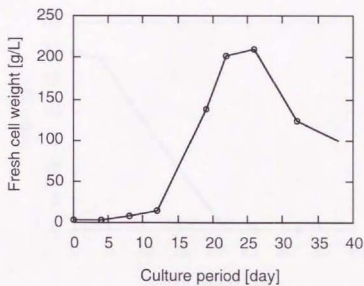


図3-5 回分培養における新鮮重量

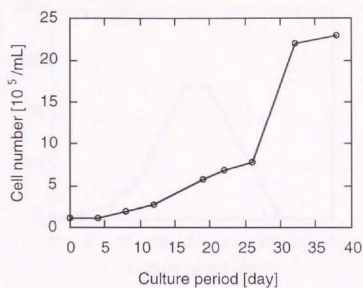


図3-6 回分培養における細胞数

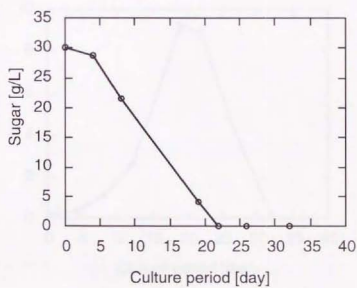


図3-7 回分培養における糖濃度

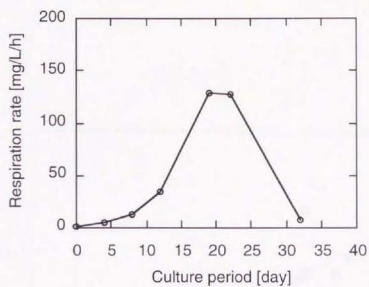


図3-8 回分培養における最大呼吸速度

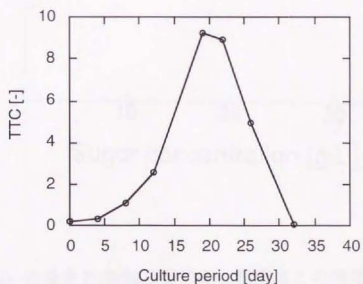


図3-9 回分培養におけるTTC吸光度

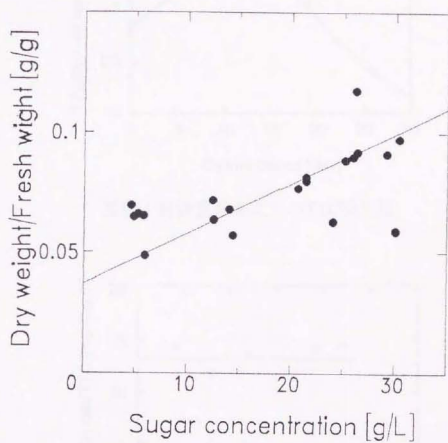


図3-10 乾燥重量/新鮮重量比率と糖濃度との相関

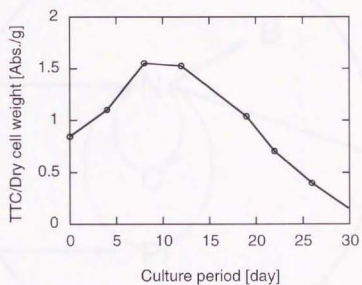


図3-11 乾燥重量あたりのTTC吸光度

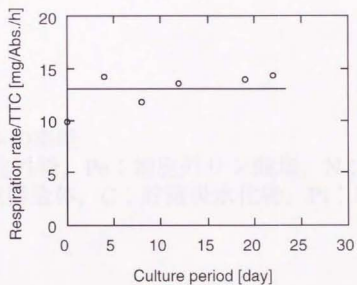


図3-12 呼吸速度/TTC吸光度比率の経時変化

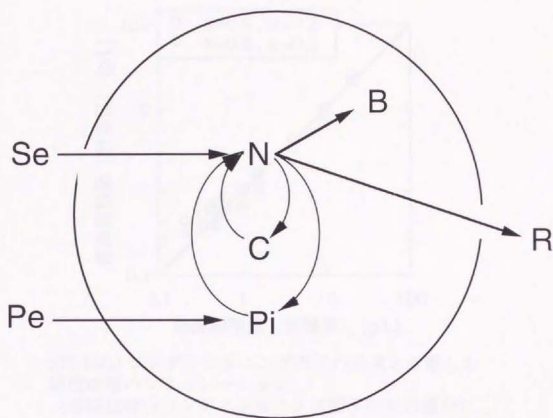


図3-13 本モデルの概略

Se：細胞外糖，Pe：細胞外リン酸塩，N：呼吸基質

B：細胞構造体，C：貯蔵炭水化物，Pi：細胞内リン酸塩

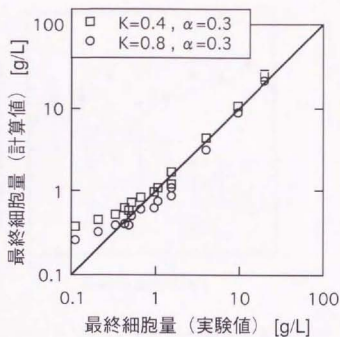


図3-14(a) コンディショニング因子の効果を考慮した
細胞増殖のシミュレーション
(増殖依存のコンディショニング因子生産の場合)

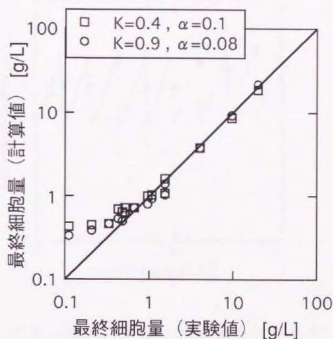


図3-14(b) コンディショニング因子の効果を考慮した
細胞増殖のシミュレーション
(細胞存在量依存のコンディショニング因子生産の場合)

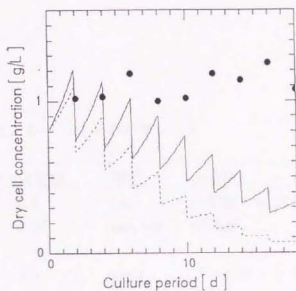


図3-15(a) コンディショニング因子の効果を考慮した
反復回分培養での細胞増殖のシミュレーション
(増殖依存のコンディショニング因子生産の場合)

— $K=0.4, \alpha=0.3$ $K=0.8, \alpha=0.3$

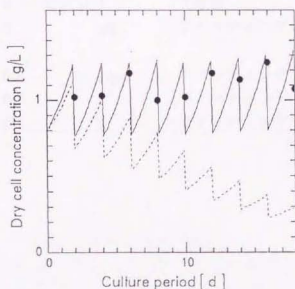


図3-15(b) コンディショニング因子の効果を考慮した
反復回分培養での細胞増殖のシミュレーション
(細胞存在量依存のコンディショニング因子生産の場合)

— $K=0.4, \alpha=0.1$ $K=0.9, \alpha=0.08$

表3-1 シミュレーションのパラメータ

| パラメータ | 決定値 | 単位 | 決定法 |
|------------|------------------------|-----------------|------------------|
| K | 0.4 | g/L | 実験値の範囲でフィッティング |
| α_2 | 0.08 | unit /g/d | 実験値 |
| k_1 | 1.9 | g/g/d | フィッティング (実験値で検証) |
| k_2 | $0.1 \times (C_N/C_B)$ | mmol/g/d | 文献値 |
| k_3 | 1.5 | g/g/d | フィッティング |
| k_5 | 0.05 | d ⁻¹ | フィッティング |
| k_6 | 0.05 | d ⁻¹ | フィッティング |
| K_S | 3 | g/L | 文献値 |
| K_P | 0.0012 | mmol/L | 文献値 |
| γ | $1 \times (C_N/C_B)$ | g/g | 文献値 |
| δ | $0.1 \times (C_N/C_B)$ | d ⁻¹ | 文献値 |
| C_N/C_B | 2 | g/g | フィッティング |
| h_1 | 0.8 | L/g/d | フィッティング |
| h_2 | 0.5 | d ⁻¹ | フィッティング |
| h_3 | 0.1 | d ⁻¹ | フィッティング |

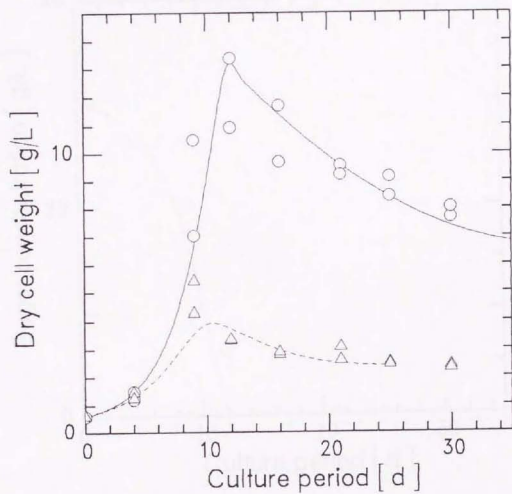


図3-16(a) 回分培養における乾燥重量変化のシミュレーション
 (○; 初期糖濃度 3% 実測値, △; 初期糖濃度 1% 実測値
 —; 初期糖濃度 3% 計算値,; 初期糖濃度 1% 計算値)

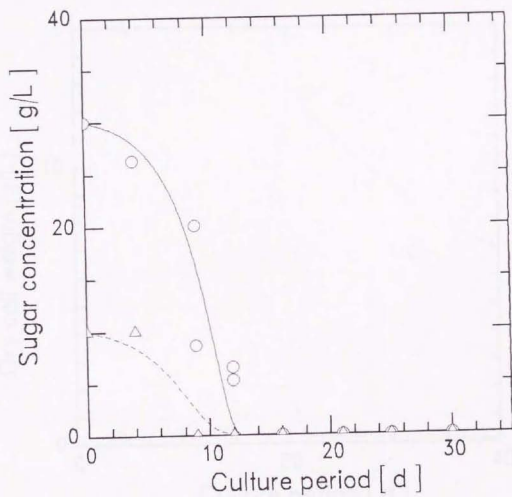


図3-16(b) 回分培養における糖濃度変化のシミュレーション
 (○；初期糖濃度 3% 実測値, △；初期糖濃度 1%実測値
 —；初期糖濃度 3% 計算値,；初期糖濃度 1%計算値)

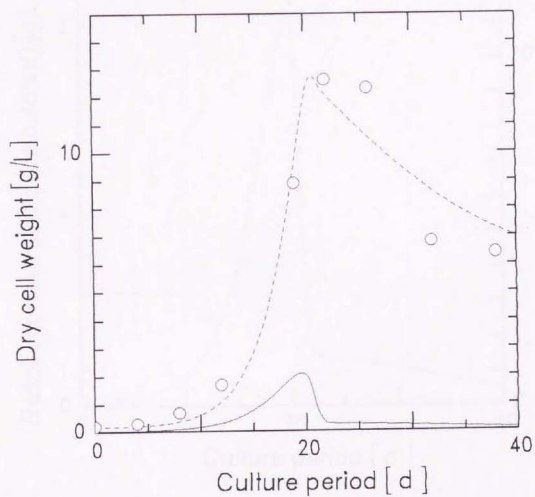


図3-17(a) 回分培養における呼吸基質変化のシミュレーション
(乾燥重量との比較)

(○; 乾燥重量 実測値,

.....; 乾燥重量 計算値, —; 呼吸基質量 計算値)

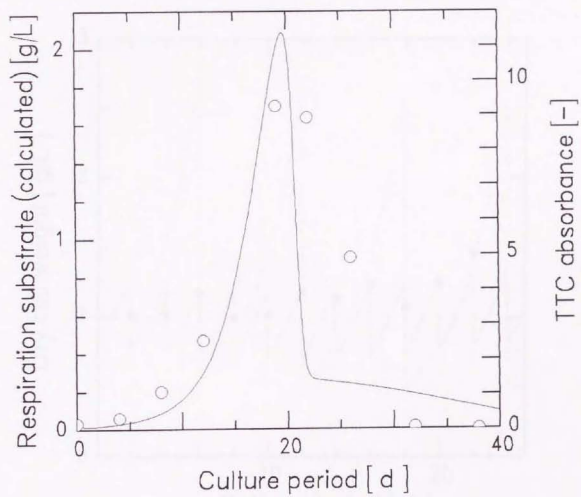


図3-17(b) 回分培養における呼吸基質変化のシミュレーション
(TTCとの比較)
(○; TTC 実測値, —; 呼吸基質量 計算値)

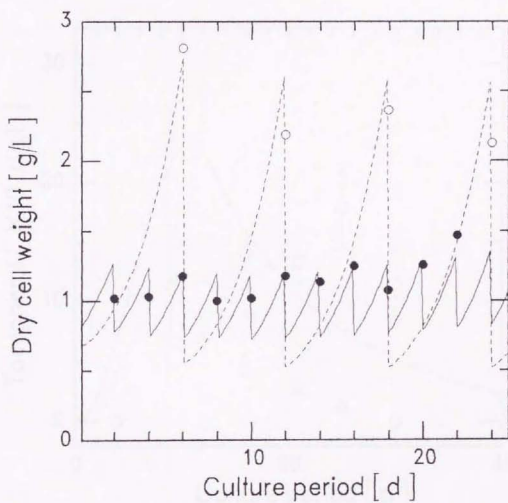


図3-18 反復回分培養における乾燥重量変化のシミュレーション

- — ; 培養サイクル 2日 交換比率 0.4
- ---- ; 培養サイクル 6日 交換比率 0.8
- ; 実測値, — ---- ; 計算値

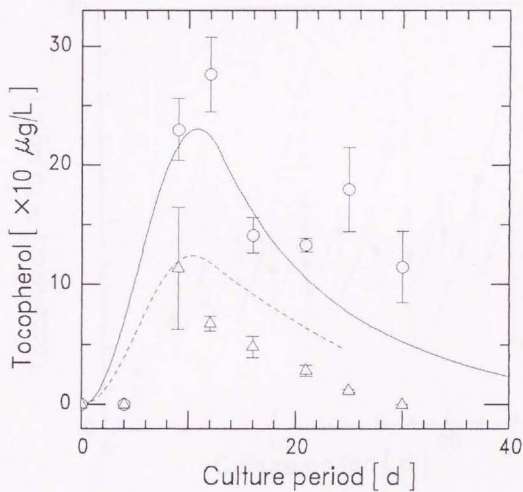


図3-19 回分培養におけるビタミンE生産のシミュレーション
 (○; 初期糖濃度 3% 実測値, △; 初期糖濃度 1% 実測値
 —; 初期糖濃度 3% 計算値,; 初期糖濃度 1% 計算値)

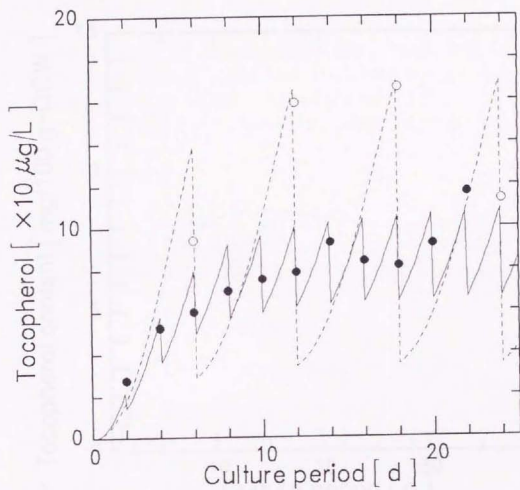


図3-20 反復回分培養におけるビタミンE生産のシミュレーション

- —; 培養サイクル 2日 交換比率 0.4
-; 培養サイクル 6日 交換比率 0.8
- ; 実測値, —; 計算値

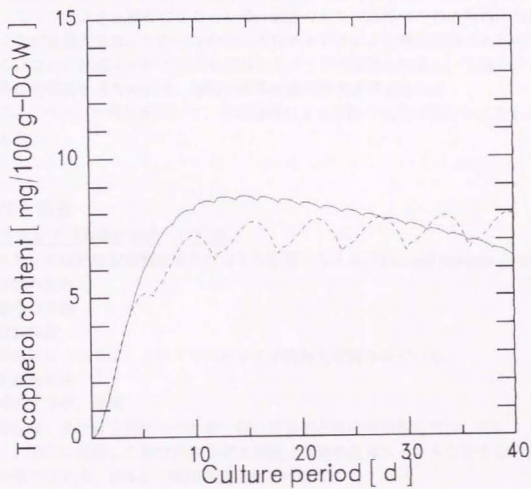


図3-21 反復回分培養におけるビタミンE含有量変化のシミュレーション
(計算値)

.....; 培養サイクル 2日 交換比率 0.4
—; 培養サイクル 6日 交換比率 0.8

第4章 攪拌操作により生じる流体ストレスによる細胞内代謝系の変化

リアクター内での培養を行ううえで、通気攪拌操作により生じる流体ストレスは、流体の混合、細胞の懸濁、主に気体成分の物質移動を実現するうえで必然的に生じる。一方、通気攪拌操作は、多くの場合、増殖性、生産性の低下を起こすことが指摘されている。従って、リアクター操作にあたっては、細胞の生存性維持のための物理的条件を考慮することが必要となる。しかしながら、流体ストレスによる植物細胞の応答機構は解明されていない。流体ストレスによる細胞のダメージの指標を確立し、至適なリアクター操作条件を検討するためには、細胞の応答機構の解明が望まれる。

本章では、ペニバナ細胞を用いて、特に攪拌による細胞の変化を明らかにすることを目的とした。

4-1 既往の研究

(1) 流体ストレスの細胞培養系への影響

流体ストレスは動植物細胞培養系に以下の影響を与える(Bliem and Hermann, 1988)。

- ① 流体の混合
- ② 細胞の懸濁
- ③ 物質移動

以上の項目については、これまでに化学工学的知見が得られている。

- ④ 生産物形成
- ⑤ 細胞生存率、増殖
- ⑥ 細胞間、または支持体への付着（特に付着依存性の動物細胞について）

ここで、④⑤に指摘した細胞の生存率と増殖、生産の流体ストレスに対する応答を知ることが要求される。表4-1に既往の研究をまとめた。

以下に既往の研究より得られた流体ストレスに対する細胞の応答をまとめた。流体ストレスは主にせん断応力に着目して検討が進められてきた。また、植物細胞に対する検討は少ないので、ハイブリドーマなど動物細胞の検討による知見を中心に示す。

せん断応力による増殖の阻害

一般に、攪拌速度の大きいリアクター内では増殖が阻害される傾向がある。しかしながら、これは細胞の死滅、分解による見かけの増殖の減少による効果であるとも、考えられる。

Croughan(1989)らは、マイクロキャリアに付着した動物細胞の培養において、スピナーフラスコを用いて、攪拌速度と細胞の増殖を測定した。細胞の死滅量を培地中に放出されたDNAの量から求め、細胞増殖に対する3通りの仮説（①正味の細胞増殖は攪拌の

効果により阻害されない。②マイクロキャリア上で増殖は接触阻害を受け、剥離後二次増殖をする。③正味の増殖量の減少は増殖阻害のみにより細胞の死滅、剥離によらない。)と比較検討し、細胞の正味の増殖はせん断応力の影響によらないことを示した。

Shuerchら(1988)も、二重円筒型のviscometerで一定のせん断(約4.5N/m²)を負荷した後のハイブリドーマ細胞について、その後の増殖、抗体生産、グルコース消費速度を、せん断処理しないものと比較し、大きな差のないことを示している。

但し、生産性に対しては、各生産物に特異的なものであり、増殖速度に関連する生産物はせん断の影響を受けないと考えられるが、増殖に関連しないものについてはその影響が現れる可能性はある(Croughan et al., 1989)。

そこで、せん断応力に対する培養細胞の応答については、せん断負荷条件での生存率、細胞分解、生産性の影響が特に議論されることになる。上記Shuerchら(1988)もせん断応力に対して細胞の非生存率が一定の関係にあることを、指摘している。

生存率のせん断応力に対する応答

細胞の生存率は、せん断応力の強度、負荷時間に伴い減少する(Petersen, 1988, Abu-Reesh and Kargi, 1989, Hooker, 1988)。

Abu-Reeshら(1989)は、二重円筒型のviscometerを用いて、(乱流状態における)せん断応力に対する生存率の応答が一次の速度式で示される関係にあることを示した(下式)。この研究はハイブリドーマを用いて検討されているが、他の動物細胞(Augenstein, 1971)、植物細胞(Rosenberg, 1987)についても同様の関係が示されていることが本論文に指摘されている。

$$\frac{dV}{dt} = -K_d \cdot V \quad \dots (4-1)$$

ここで、 K_d はせん断応力(τ)の強度に依存する。そこで、1/2~2[h]のせん断応力の負荷による生存率の変化(ΔV)をとり、下記の関係式を得、各条件(せん断応力負荷時間)における n , K を求めた。

$$\Delta V = K \cdot \tau^n \quad \dots (4-2)$$

しかしながら、ここ示された結果の間には相関はない。これは、せん断応力の効果を一次の速度式により表すことに問題があるものと思われる。現象から考察しても、せん断応力には各細胞に対して効果を示す一定の下限が存在すると考えた方が妥当であると思われる。いずれにしても、せん断応力の生存率に及ぼす影響についての定量的評価にはまだ検討の余地が大きい。

なお、ここで生存率としているのは、trypan blue 染色法で確認された膜の完全性であり、狭義の生存率(増殖や特定生産物生産の能力)とは必ずしも一致しない。そこで、むしろ呼吸活性により生存率を測定することを提案している。呼吸に関与するミトコンドリアの脱水素酵素は生存細胞内でしか機能しない。また、細胞の分解についても検討を行っているが、これは細胞内の乳酸脱水素酵素(LDH)の細胞外分泌量により評価を行っている。この方法はPetersenら(1988)も用いている方法であり、LDHが高分子(分子量140000)であるため、細胞膜の透過性が増加するだけでは放出されないことによる。

膜透過性、呼吸活性、細胞分解について比較した結果、呼吸活性→膜透過性→細胞分解の順にせん断応力の影響を受け易いことがわかった。ここで、呼吸活性（生存率）が、膜透過性より早くせん断応力の影響を受けることから、膜構造が破壊される前に、せん断応力が細胞質に伝えられる機構が存在することが示唆された。

せん断感度の変化

以上のように示されたせん断応力の影響の度合（せん断感度）は、細胞種によって異なるが、同種の細胞においても、前培養でのせん断応力負荷の履歴、培養齢、代謝産物の蓄積によって異なることが指摘されている。Petersenら(1988)は、①前培養においてせん断応力が高い環境で培養された細胞はせん断応力に対して耐性のあること、②誘導期、静止期の細胞が対数増殖期の細胞よりもせん断応力に対して弱いこと、③アンモニア、乳酸、pHのせん断感度に対する影響を調べ、特にpHの変化がせん断感度に影響を及ぼしていることを示す結果を得た。特に培養齢の効果について更に検討を進め、培養齢によるせん断感度の変化は、増殖速度の変化（誘導期、静止期は増殖速度が遅い）によるものではないことを示した。

せん断感度を定める細胞内パラメータを特定することが、今後せん断応力の効果を検討していくうえで重要な課題となる。

膜流動性の効果

Rairezら(1990)は、細胞膜の流動性（Plasma Membrane Fluidity=PMF）がせん断感度に関与すると考え、麻酔性ベンジルアルコール、温度、コレステロール富化によって膜流動性を操作し、そのせん断応力に対する生存率の変化を求めた。その結果、PMFが低下するほどせん断感度は低いこと（流動性が増すほど細胞は壊れ易いこと）を示した。ここで、PMFは蛍光プローブの定常蛍光偏光性を測定することで、生存率はtrypan blue 染色法で求めた。

この結果は定量的評価には至っていないが、せん断応力の効果を評価するうえで重要な指針になると思われる。また、この研究では、培養齢、せん断応力負荷によるPMFの変化を検討していないが、今後、重要な課題となるだろう。

植物細胞に対するせん断応力の効果

植物細胞培養に対するこれまでの研究の多くは、せん断応力に対する定量的評価を行わず、通気速度、搅拌速度の影響として捉えている。しかしながら、Hookerら(1988)は、Couette型粘度計を用いることで、細胞の生存率、生産性に対するせん断応力の影響を定量的に評価した。但し、この実験操作（400-800回転/min）においては、装置内の流れ状態は層流状態にはないので、ここで指標として用いた層流と仮定したせん断速度はあくまでも便宜的なものであるとしている。

その結果、せん断負荷初期（1h）において生産物（フェノリクス）濃度は急激に増加であり、更に2hという短期間での放出量の測定を行った結果からも、生存率の低下、分解が起こるより前に細胞外濃度がせん断応力の強度に対応した一定の値に増加すること

が見られた。しかしながら、これはこの系に特異的なストレス応答性（細胞の傷に対する応答としている）であると考えられる。

次に、せん断応力への応答に対する、細胞の培養齢の影響を検討した。生存率については対数増殖期の細胞が誘導期、対数増殖初期、静止期後期の細胞よりもせん断応力に対して弱いと述べている。この結果は前記のPetersenらの結果と矛盾するが、これは各期間の定義の曖昧さによるところが大きく、増殖曲線と対応させることにより、対数増殖期の細胞は対数増殖期後期、静止期前期の細胞よりもせん断応力に対して強いといえる。静止期後期の細胞は対数増殖期の細胞よりも強いという結果は変わらないが、この培養齢の細胞についてはPetersenらの結果はなく、矛盾しない。また、生産物放出については培養齢が高くなるほど、せん断応力の影響が高くなる。

植物細胞に対するせん断応力の効果について検討を行った例は少ない。ハイブリドーマなどで得られた知見をどの程度適用できるかはわからないが、細胞に影響を及ぼすせん断応力の強度についてはBallicaら(1992)の研究において、ハイブリドーマの研究において対象とされている 10^3 dyn/cm^2 のオーダーのせん断応力が植物細胞に対して効果を示していることから、ある程度の相関はあるものと考えられる。Hookerら(1988)の検討におけるせん断速度 (10^3 s^{-1} 近傍) は液の粘度を約 1 cP とおくことにより約 10 dyn/cm^2 程度となる。この値は、著者ら自ら便宜的としているせん断速度によったもので、信頼性は低いが、ハイブリドーマにおける検討と比較してせん断の強度が1桁低い分、その効果が観察される時間は1桁高くなっている。このような傾向から、ハイブリドーマにより得られた結果は植物細胞への効果を検討していくうえで参照に値するものであると思われる。

(2) 流れ場の評価

せん断測定装置

先にAbu-Reeshら(1989)による乱流領域でのせん断応力の影響を示したが、著者らはその層流領域での影響も検討、比較している。この結果から、同じせん断応力でも層流の方が乱流よりもせん断応力の効果が小さいと示された。これと同様の結果は血管内皮細胞についても示されている(Davies, P.F., et al., 1986)。この効果を著者らはレイノルズ応力の存在によるとしているが、その評価は行っていない。

せん断応力の評価には一般に粘度計やそれに類似した装置が用いられる。Abu-Reeshらが用いた粘度計は、二重円筒型である。これは二重円筒の内管と外管の間の薄い間隙を平行板間と同様と見なし、内管の回転によりほぼ一定のせん断速度を生じさせることができるとするものである。既往のせん断応力に関する研究において用いられてきた粘度計は、平行板型、二重円筒型、円錐平板型、コニシリンドリカル型に分けられる。以下に各粘度計について述べる。

- ① 平行板型：付着依存性の血管内皮細胞などの検討に用いられている。平行な流れが得られるため、一定のせん断速度をもつ流れ場を形成することができる。しかしながら、懸濁細胞についてはその流出を避けられないため、適用することができない。
- ② 二重円筒型：上に述べたように、二重円筒間の間隙を薄くすることにより平行板型

と同様の流れ場を円筒型にしたものである。このように移動平行板の間に生じる流れをCouette流という。この二重円筒型およびコニシンドリカル型の粘度計を用いている研究では、Couette型という表現が使われている。二重円筒型において円筒型の流れ場の内径と外径の比を0.99以上にすることで、高いせん断速度まで層流を形成できる。これにより、懸濁細胞に対するせん断応力の検討を行うことが可能になる。

- ③円錐平板型：平板とこれと小さい角をなす円錐面の間に試料液体をいれる。場所によらず均一なせん断速度が得られる。しかしながら他の型に比較して試料の量が少なくなるため、この形式のものは多くは用いられていない。
- ④コニシンドリカル (CC) 型：二重円筒型の底部を円錐平板型にしたもの。二重円筒型で生じる末端効果を解消するもの。

②以降の回転粘度計は、一方が回転し、もう一方のトルクから粘度を測定する器械である。せん断応力の効果の検討においては、内部の流動を既往の理論値より求め、粘度はおおよそその値を用いることで、せん断応力は計算より導出する方法をとることにより、トルクの測定は行えないものを用いることもある。

二重円筒での流れ場

二重円筒型、コニシンドリカル型の粘度計はせん断応力の検討に多く用いられているので、その流れ場（円筒部）について特に述べる。

二重円筒において、その内筒を回転させる場合、その流れ場は以下のようにして求められるテイラー数 (Ta) により評価することができる (Abu-Reesh, 1989)。

$$Ta = \frac{U \cdot h}{\nu} \left(\frac{h}{R_i} \right)^{\frac{1}{2}} = Re \cdot \left(\frac{h}{R_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \dots (4-3)$$

U：円筒近傍の速度 (cm/s)，h：間隙幅 (cm)，

ν ：流体動粘度 (cm²/s)，R_i：内円筒の半径 (cm)

ここで、流れ場は以下のように評価される。

- ① Ta < 41.3 : 層流
- ② 41.3 < Ta < 400 : テイラー渦
- ③ 400 < Ta : 乱流

① (層流) の場合、間隙 (円筒中心からの距離 r) における流速 (V_θ) およびせん断速度 (α) は、連続方程式およびナビエーストークスの方程式より以下のように求められる。

$$V_{\theta} = \frac{\Omega (r^2 - \kappa^2 R_2^2)}{r (1 - \kappa^2)} \quad \dots (4-4)$$

$$\alpha = \frac{2\Omega R_2^2 \kappa^2}{r(1-\kappa^2)} \quad \dots (4-5)$$

(Ω :円筒回転の角速度 (1/s), R_2 :外円筒の半径 (cm), $\kappa = R_1/R_2$)
 ここでせん断速度の平均値 (α_{avg}) は、下式のように求められる。

$$\alpha_{avg} = \frac{4(-LN\kappa)\kappa^2 \cdot \Omega}{(1-\kappa^2)^2} \quad \dots (4-6)$$

層流におけるせん断応力の効果は、上式を用いて回転の角速度から算出することができる。Schuerchら (1988) は、簡便に下式によりせん断速度を評価し、この計算によってもLDA (レーザードップラー分析) による測定と一致する結果が得られると述べている。

$$\alpha = R_1 \Omega / h$$

一方、③ (乱流) におけるせん断応力 (せん断速度) は、テイラーの実験曲線の補間から、求められている。

Bliemら(1988)は、先に示したような層流と乱流におけるせん断応力の効果の違いは、乱流におけるせん断応力の評価が無次元数 (レイノルズ数など) を含む経験式が用いられているに過ぎないことに問題があると指摘している。レイノルズ数などによるせん断応力の評価が、乱流における細胞のダメージを正しく示さない理由として、レイノルズ数はマクロな乱流 (攪拌翼により生じる) の性質を示すが、細胞に対してダメージを与えるのはより小さな渦であるとのべている。(テイラーの実験値も、二重円筒型の粘度計におけるトルクの読みから得られたいわば総合的なせん断応力によるものである。) そこで乱流に関して微小渦に着目した評価ができてきている。

乱流におけるせん断応力

乱流は①3次元の②渦運動である。③非線形現象によって大小様々な渦が形成されるが、大きい渦から小さい渦への運動エネルギーの輸送が行われるため種々の大きさの渦が維持されており、このため④大きな拡散能力をもっている。

大きなスケールの乱流構造は一般に非等方的であるが、小さなスケールの構造では等方性が成り立つ。ここで、等方性とは乱流統計量が特定の方向に偏った性質をもたないことをいう。等方性乱流は最も単純な乱流である。

上述のように大きいスケールの渦のエネルギーは、より小さなスケールの渦へと輸送される。つまり攪拌翼からのエネルギーは、大きな渦のモーメントとして流体に伝えられ、ミクロな渦へと伝達される。渦のスケールの減少にともない運動エネルギーの時間変化 (dE/dt) は減少し0に達する。この状態を普遍平衡状態と呼ぶ。各スケールの渦における運動エネルギーの時間変化は、運動エネルギーの輸送による慣性項と (エネルギーの) 消散項との差として表されるが、普遍平衡状態においては慣性項と消散項が釣り合っている、つまり、輸送された運動エネルギーは全て熱へと消散する。

微小渦によるせん断応力の評価は、乱流のこのような構造に基づき、乱流を一様等方

性乱流と見なせる局所的に普遍平衡状態にある渦によって評価する方法である。この領域にある渦の特性長さを L 、特性速度を V とすると、以下の関係式がKolmogoroffにより示されている(Schuerch, U., et al., 1988, Cherry, R.S., Kwon, K.-Y., 1990)。

$$L = \left(\frac{v^3}{\epsilon} \right)^{\frac{1}{4}} \quad \dots (4-7)$$

$$V = (\epsilon \nu)^{\frac{1}{4}} \quad \dots (4-8)$$

(ν ; 流体の動粘度, ϵ ; エネルギー消失 L ; Kolmogoroff長さ)

Croughan(1987)らは、動力入力がある値を越えると細胞のダメージが急激に増加することから、Kolmogoroff長さか懸濁粒子に対して大きな場合、渦は粒子を駆動するように働き細胞にダメージを与えないが、臨界値より小さくなると渦が粒子に損失を与えたとした。動物細胞を付着したマイクロキャリアについて、微小渦との衝突により細胞破壊が起こるものとして、攪拌槽における細胞破壊のモデル化を行い、細胞破壊定数(q)はエネルギー消失(上式の ϵ)の $3/4$ 乗に比例することを示した。これは、Kolmogoroffの特性長さの式から導かれる渦の密度のオーダーと一致する。また、既往の研究のデータに対してもその関係が満たされることを示した。

Cherryら(1988)も、同様の解析を行っているが、このモデルにおいて扱える粒子はマイクロキャリア(約 $200 \mu\text{m}$)のようなKolmogoroff長さ(約 $100 \mu\text{m}$)と近いオーダーの粒子であり、独立した細胞(数 $10 \mu\text{m}$)に対しては用いることができない。

そこで、Cherryら(1990)は、Kolmogoroff渦内のせん断速度分布を求めることで、渦内部で懸濁粒子(細胞)の受けるせん断応力の時間変化を算出した。このとき、懸濁粒子は渦内での流速勾配のため回転するが、その緯度によって受けるせん断応力が異なるため、粒子上の特定の点の受けるせん断応力は時間的に振動する。

植物細胞に対して乱流場においてKolmogoroff渦を考慮に入れる場合、細胞の状態(凝集状態)により、上記二つの観点(衝突か内部移動か)の使い分けが必要となる。

(3)気泡の影響

気泡ストレスによる細胞の死滅

リアクター内では、以上に示したような攪拌による流体ストレスの他に、通気に伴うストレスが生じていることが指摘されている。リアクターに投入された気泡は、表面の気液界面で破裂する。その際に生ずる物理的ストレスが細胞の死滅に大きく関与するという報告がなされている。

Tramperら(1988)は、昆虫細胞の培養に対し、気泡導入量と細胞の死滅速度の関連を示した。気泡に対して一定の割合の体積の内部にある細胞はすべて死滅するものと仮定し、その体積の割合を気泡筒を用いた培養の結果より実験的に求めた。

また、Handaら(1987)は気泡塔を用いた哺乳類細胞の培養において、一定の通気速度(5 mL/min)で培養を行う場合、液深が小さくなるほど最大生存細胞量が低くなることを示し、気泡破裂の起こる比表面積が増大することが細胞の死滅を増加させることを示唆した。

そこで、これらの知見に基づき、気泡により導入されるエネルギーが気泡破裂に際して気泡近傍の液相で局所的に散逸され、気泡近傍に存在する細胞に強いダメージを与えるものと考えられた。

Cherryら(1992)は、理論的に気泡の破裂による細胞の死滅を評価することを試みた。細胞の死滅は、破裂する気泡により形成される液の薄膜の収縮運動によって起こるものとし、細胞の死滅速度定数を kd とし、次式をたて、各項を実験的に評価した。

$$kd = \left[\left(\text{薄膜における細胞の死滅割合} \right) \times \left(\text{薄膜中の細胞密度} \right) \times \left(\text{気泡当りの薄膜体積} \right) \times \left(\text{気泡発生速度} \right) \right] / \left[\left(\text{バルクの細胞密度} \right) \times \left(\text{全液量} \right) \right]$$

また、この過程において生じるエネルギー散逸速度を理論的に求めた。その結果、破裂する薄膜においては、 $9 \times 10^7 [\text{cm}^2/\text{s}]$ のエネルギー散逸速度があると推算した。但し、この結果は、流れによるエネルギー散逸に対し7桁も大きな値が、気泡の破裂で散逸することになること、このように大きなエネルギー散逸がありながら、その中の細胞が20%しか死滅しないとしていることから、正しい評価であるとは考え難い。

またChalmersらのグループは、Cherryらとは異なるモデルで、気泡破裂によるストレス生成を解析的および実験的に検討を行っている。

同グループは気泡近傍におけるストレス発生を解明するために、気泡破裂前後の気泡近傍の液の流れについて、有限体積法を用いて解析を行い、エネルギー散逸速度の分布を示した。気泡破裂による液の流れについては、既往の研究において撮影された結果と一致している。その結果、気泡破裂後、気泡表層を形成していた液相が収縮、中心軸上で衝突し、上方へ突出するという挙動を示す際に、気泡径が $0.77 [\text{mm}]$ の場合、最大約 $10^8 [\text{erg} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}]$ のエネルギー散逸速度を生じるものと求められた(Miguel, 1994)。この最大エネルギー散逸速度は気泡径の増加に伴って減少する。この値は攪拌槽や粘度計を用いた既往の研究において求められた細胞の死滅を起こすといわれている値と比較して、大きなものである。また、上方に突出する液を採取する装置を開発し、その容積および採取液中の細胞の死滅割合を評価した(Trinh, 1994)。死滅細胞は約75%であり、採取液の容積は、Tramperらの示した値とほぼ一致していた。また、この結果より求められる全液相あたりの細胞の死滅速度は、実際の測定値に一致した。

(4) リアクターの開発

リアクターにおける流れ場

リアクター(特に攪拌槽)内のせん断応力の評価の困難は、リアクター内におけるストレスがせん断応力のみでなく複雑であるとともに、リアクター内に生じている乱流によるせん断応力の評価が、先に示したように困難であることにもよっている。そこで、リアクターにおけるせん断応力の評価は主にリアクターの形状、操作条件(攪拌速度、液の流速、通気速度)による影響の検討が多い。

Kawaseらは、気泡塔型(1989)および外部循環型エアリフト(1990)リアクターについてリアクター内の流体の挙動(液流速、軸方向拡散係数、ガスホールドアップ、摩擦係数)の解析を行っているが、懸濁粒子に対するせん断応力については議論していない。

リアクターの性能評価

バイオリアクターの性能を評価するうえで、物質移動速度、せん断応力は主要な因子であり、ともに①リアクターの形状、②細胞濃度および培養液の粘度、③通気・攪拌速度（動力インプット）により、決定される。

特に③の条件については、物質移動の促進は一般にせん断応力の増加を伴う。これは、物質移動が濃度の勾配、せん断応力が流速の勾配により、かつ濃度と流速の勾配の間には一定の関係が存在することから理解される。

田中(1985)は、細胞濃度、リアクターの種類による物質移動と（せん断応力の効果を含む）機械的ストレスの影響を検討している。ここで対象としているのは①通気攪拌槽、②気泡塔、③エアリフト（内部循環）、④変形バドル型インペラー付き通気攪拌槽の4種である。植物細胞の高密度培養を対象としたこの研究において、細胞濃度による培養液の粘性の対応を調べた後、各リアクターにおける物質移動速度(K_La)と機械的な影響とを検討した。細胞濃度に対する K_La は模擬細胞に粒状寒天を用いて測定し、通気攪拌槽(①④)、特に④が細胞高密度懸濁液に対して高い物質移動特性をもつことを明らかにした。また、機械的ストレスの影響については、固体粒子（ β -ナフトール）の液中における溶解速度係数(K)を指標とした。この K と K_La との相関を各リアクターについて検討した。その結果、細胞濃度が低い領域においては、振盪フラスコや通気型(②③)が適していることを示した。しかしながら、細胞濃度が高い領域においては、通気型では K_La の低下が激しいことを指摘している。

また、Moo-Young(1988)は、各種のshear-sensitiveな細胞の培養に対して、リアクターの改良によるshearの回避について検討を行った。細菌に対して攪拌槽(A)、ドラフトチューブ付きエアリフト(B)、およびその結合型(C)について検討し、動力入力一定の条件下での k_La は各リアクターとも同等であるが、生産性は(C)が高いことを示した。ここで、(A)はせん断応力が強く、(B)は粘性の高い液の循環が悪いことにその原因を求めているが、定量的な評価は行っていない。一方、よりせん断応力に対して弱い菌、植物細胞、動物細胞に対しては、エアリフト型を基本にしたリアクターが適していることを示し、高い生産性を示すことを実証した。ここで、植物細胞に対しては傾斜底をもつ擬エアリフトといえる気泡塔リアクターを開発した。

ここで、エアリフトなどの通気型リアクターが通気攪拌型リアクターよりも、低濃度においてせん断応力が低く、高密度において性能低下を示す原因について以下のように定性的に解釈できる。

- ① K_La により示される物質移動速度は気泡および細胞近傍の濃度勾配に大きく依存するが、この濃度勾配は上述のようにそれぞれの速度勾配に関連し、速度勾配はせん断応力を導く。
- ②通気型においては気泡運動が駆動力になっているため、気泡近傍における速度勾配及び濃度勾配が細胞近傍における値よりも大きくなる。一方、通気攪拌型においては、機械的な攪拌動力が主な駆動力になっているため、気泡近傍及び細胞近傍の速度勾配は同程度になる。

- ③気相成分の液相への移動に対しては、界面張力などによる気液界面の物質移動が律速になっているため、気泡近傍と細胞近傍での速度勾配に差のある通気型が攪拌を伴う場合よりも、低いせん断応力で要求される物質移動（特に気相成分について）が得られる。
- ④しかしながら、特に通気攪拌型においては速度勾配の場合（せん断場）は一様ではなく、攪拌翼付近で高いせん断応力を示す。そのため、気泡に対して系の中心におけるせん断とともに攪拌翼付近でのせん断が大きな影響を示す。
- ⑤液の粘度が高まるにつれ拡散係数が減少し、要求される濃度勾配が高くなり速度勾配も増加する。粘度自体の効果も掛け合わされて、系のせん断応力は高まる。
- ⑥通気型においては、その影響を端的に受けることになるが、通気攪拌型においては攪拌翼近傍でのせん断場が保存されるため、そこを通過する気泡を分散させることができる。高密度状態においては、この気泡の分散の効果の全体の物質移動への寄与が高まるため、通気攪拌型が通気型よりも高い物質移動特性を維持することができる。

新規リアクターの開発

上述のように、これまでのリアクターシステム（特に酸素供給）によるのであれば、エアリフト型が最もせん断応力が少ないが細胞の高密度化には適さないことが指摘される。今後、リアクターの開発を行うには、せん断応力と物質移動に関しては、高密度でもせん断応力の低い装置の開発が望まれる。上記の考察にしたがえば、気相成分に関しては予め液相に分散させて供給することにより高い物質移動特性が達成される。また、攪拌条件については、（気泡の分散のためには強い攪拌が要求されるが）せん断応力の分布を少なくするために系全体を緩やかに攪拌することが望まれる。

物質移動特性について特に酸素供給法に関しては多くの研究がなされている(Smith, J.M., et al., 1990, Hegglin, M., et al., 1990, Mano, T., et al., 1990, BioChem. Technology Inc., 1990, Pielh, G.W., et al., 1988)。真野らは、①自由界面通気、②多孔性テフロンチューブ通気、③パーフルオロカーボンの添加、④外部エアレーション（すべて自由界面をもつ条件で操作）という4種の酸素供給法における $K_L a$ の比較を行っている。その結果では、②または③（リアクターのサイズによる）、④、①の順に高い物質移動特性を示した。せん断応力に対する記述はほとんどないのであるが、物質移動特性の高い方法がせん断応力が低くなるであろうことを示唆している。

一方、攪拌操作については、上記の田中の研究と同様、Hookerら(1990)により攪拌翼の形状の改良などが行われている。

攪拌と酸素供給の両条件を改良したリアクターとして、Pielhら(1988)による気泡のない膜攪拌リアクター（コイル状またはバスケット状の多孔性ポリプロピレン中空糸膜により通気を行いつつ攪拌する）の開発がある。

表4-1. バイオリアクター中での流体ストレスの細胞に対する影響に関する既往の研究

(1) 植物細胞

| 著者 | 発行年 | shearの測定 | 検討項目 |
|------------|------|----------|-------------------------|
| Allanら | 1988 | × | 細胞の馴化 |
| Scaggら | 1988 | × | バイオリアクター (総説) |
| Moo-Youngら | 1988 | × | バイオリアクター (総説) |
| Hookerら | 1988 | ○ | 生存率, 分解, 二次代謝 細胞齢の効果 |
| Smithら | 1990 | × | ガス供給制御 (送り側分圧) |
| Souleら | 1987 | ○ | 細胞の増殖 |
| Hegglinら | 1990 | × | 固定化, 酸素富化空気 |

(2) 動物細胞・ハイブリドーマ

| 著者 | 発行年 | shearの測定 | 検討項目 |
|--------------------------|------|----------|--------------------------------------|
| Brennanら | 1987 | × | リアクターによる生産実験 |
| Schuercherら | 1988 | ○ | 生存率, 比増殖速度, 抗体生産, グルコース消費など |
| Petersenら | 1988 | ○ | shear sensitivityの増殖, 培養齢, 代謝産物濃度依存性 |
| Abu-Reeshら | 1989 | ○ | 連続攪拌槽でのshearに対する膜完全性, 呼吸活性, 分解 |
| Ramirezら | 1990 | ○ | shear sensitivityの細胞膜流動性との関連 |
| Bliemら | 1988 | × | バイオリアクター (せん断応力と物質移動に関する理論的総説) |
| Pauliら | 1989 | ○ | リアクター内壁のshear測定法 |
| Manoら | 1990 | × | 酸素供給方法の比較 |
| BioChem. Technology Inc. | 1990 | × | パーフルオロカーボンを用いた酸素供給の改善 |

4-2 実験方法

(1)細胞および培養条件

ペニバナカルスは未成熟蕾の花弁より誘導され、約17年継代培養されたものを用いた。培地はRT-B2KC 培地 (MS培地を基にし、ホルモンとしてIBA, kinetin, 天然物カサミノ酸を含む) を用いた。液体振盪培養は寒天培地上で培養3週目の細胞を300mLフラスコの100mL培地中に懸濁し、暗所、27℃、88spmの条件で行った。

(2)装置

邪魔板(3枚、幅8mm)付き、内径85mmの搅拌槽 (培養液量550mL)、6枚翼ディスクタービン型搅拌翼を用いた。本研究に用いたリアクターの形状を図4-1に示す。

搅拌槽におけるエネルギー消散 (P) に関しては、槽の形状が決まっている場合、動力数 ($N_p = P / (\rho n^3 d^5)$) は、レイノルズ数 ($Re = \rho n d^2 / \mu$) の関数として得られる。本研究で用いた搅拌槽は、Rushtonらのデータを利用できる条件であり、回転数を変えることにより槽内のエネルギー消散を操作した。リアクターは通気を行わずに操作を行ったが、細胞濃度10g-FCW/L、搅拌速度200rpm以上の条件において、リアクター中の溶存酸素濃度は2ppm以上に保たれている。

溶存酸素濃度の制御を行った検討においては、リアクター内の上部気相に空気と酸素の混合ガスを100mL/minで通気した。搅拌槽中の溶存酸素濃度を溶存酸素電極で測定し、酸素分圧を制御することで、溶存酸素濃度を7ppm程度に制御した。

(3)搅拌槽での培養

リアクター内での培養には、液体培養7～10日目の対数増殖期の細胞懸濁液を新鮮培地で1/2に希釈して、1日順化培養を行った後、新鮮培地で1/5に希釈して用いた。リアクター培養は細胞懸濁液550mLで行った。

液体培養7～10日目の対数増殖期の細胞懸濁液を新鮮培地で1/2に希釈して、さらに1日振盪培養を行った後、新鮮培地で1/5に希釈して用いた。搅拌数を200～500rpm、温度を27℃に制御し、24時間培養を行った。同じ前培養条件の細胞を用いて液体振盪培養を行い、対照とした。初期細胞密度は約10g-FCW/Lとした。

(4)分析

細胞量

細胞数は、酵素処理により細胞塊を分解後、Burker-Turk血球計算盤を用いて計数した。乾燥重量は、採取した細胞を凍結・真空乾燥後に測定した。

生存率の評価

生存率評価の手法

生存率は、本来、増殖性の維持として評価される。しかしながら、増殖性の評価には長い時間が必要であると共に、細胞の機能以外にも多くの環境因子が影響する。そこで、比較的短時間に行うことのできる評価法として、生体染色法がとられる。生存率評価の

ための生体染色の試薬としては、①非選択的に細胞内に浸透するが、生存細胞から選択的に排除されるものと、②生存細胞内で濃縮もしくは反応・変化するものがある。前者(①)の例として、Evans Blue, Trypan blueがある。Trypan blueは、微生物等の生存率の分析に広く用いられているが、植物細胞には必ずしも適していない(Zilkah.S. and J. Gressel, 1978)。後者の例として、neutral redやFDA (Fluorescein diacetate), TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride)がある。neutral redは生存細胞により濃縮されるが、pHに対する感度が強いので、生存率の分析に用いるのは困難である。FDAは植物細胞における生存率測定に最もよく用いられている物質である。FDAは細胞内のエステラーゼ作用により脱エステル化され、蛍光物質であるフルオレセインが遊離される。フルオレセインはUV光により励起されて蛍光を発するので、蛍光顕微鏡を用いて生存率を計数法により求めることができる。

TTCは生存細胞内の電子伝達系で還元されて、赤色色素であるformazonが生成する。染色に時間がかかる(18-22h)という短所はあるが、生成された色素を安定的に抽出することができるため、吸光度測定による生存率の測定を行うことができる。他の染色物質を用いる場合は顕微鏡下での計数により評価するのに比べ、TTCによればより多量の細胞における生存性を定量的に評価することができる。

本研究における生存率評価

生存率は、①攪拌後5日間の細胞増殖性、②Evans blue染色計数法による膜透過選択性(Taticek, 1990)、③TTCを用いた染色抽出法による細胞内呼吸活性により評価した。

増殖性の評価

増殖性の評価は、所定のストレス下での培養を行った後の細胞を5日間振盪フラスコ中で培養し、その前後の細胞数を測定することによって行った。その際、生存細胞の比増殖速度は一定と仮定することで、リアクターでの培養終了時における生存率を、対照として行ったフラスコ培養との比として求めた。

Evans Blue

採取した細胞懸濁液1mLに、2%マセロザイム、12%マニトール溶液1mLを添加し、1時間の処理により細胞塊を分解した。処理後の細胞懸濁液2mLに対して2.5% Evans blue水溶液を0.1mL滴下し、細胞染色を行い、顕微鏡下で全細胞数および青く染色された細胞数を計数し、その比率を求めた。約1000細胞の計数を行った。

TTC

TTCによる生存率測定は基本的にはTowill&Mazur (1975)により提示された分析条件に従った。採取した細胞懸濁液2mLに対して、1.5% TTCのリン酸Buffer溶液4mLを添加し、窒素ガス封入後、恒温室(25℃)内で18-22時間、振盪した。細胞を採取後、3mLのエタノールで30分間、抽出を行い、その抽出液の吸光度(485nm)を測定した。

ATP

遠心分離により採取した細胞に、7%過塩素酸水溶液を添加し、粉碎・抽出を行った(Ryll, T. and R. Wagner, 1991)。抽出液は1M炭酸カリウムでpH6.2~6.7に調整し、遠心濾過により沈澱を除いた(De Klerk-Kiebert, Y.M. and L.H.W. van der Plas, 1984)。ATP, ADP濃度はHPLC (DEAEカラム, 溶離液としてリン酸緩衝液 (0.2M, pH 4.6) ; アセトニトリル (4:1)) により分離, 紫外検出器 (260nm) により検出・定量を行った。操作はすべて氷上にて行った。

操作はすべて氷上にて行った。15~20mLの細胞懸濁液を採取し、遠心分離 (0℃, 3000 G, 2分) 後, 上清を廃棄し1.5mLの懸濁液を得た。これに1.5mLの7%過塩素酸水溶液を添加し, テフロンホモジナイザーを用いて細胞を粉碎, 抽出を行った。遠心分離 (0℃, 10000 G, 3分) で残渣を分離したのち, 抽出液を1M炭酸カリウムでpH6.2~6.7に調整し, 遠心濾過チューブ (分画分子量10000) を用いて抽出液を得た。抽出液中のATP, ADP濃度をHPLCにより分析を行った。DEAEカラム, 溶離液として0.2Mリン酸緩衝液 (pH 4.6) /アセトニトリル (4/1) を用い, 紫外検出器により260nmでの吸光度を測定した。

細胞凝集塊サイズおよび細胞径

採取した細胞懸濁液の顕微鏡画像から, アグリゲートサイズを画像処理装置で測定した。細胞径の計測にもこのとき画像処理装置に取り込んだ画像を用いた。

細胞膜流動性

細胞膜流動性は, 蛍光偏光解消法により測定した(Legge, R.L., et al., 1986, Ramirez and Mutharasan, 1990)。細胞懸濁液1mLを採取し, 遠心分離後, 11%マニトール, 0.1%塩化カルシウム溶液で洗浄 (x2), 再懸濁した。膜結合性のプローブ, 2mM ジフェニルヘキサトリエン (DPH) DMSO溶液をDPH濃度が1 μ Mになるように添加し, 5分間培養することにより, 細胞膜に取り込ませた。偏光盤をつけた蛍光光度計 (Ex.357nm, Em.430nm) で入射光面と0度と90度の蛍光強度測定し, 蛍光異方性を求めた。本方法を用いるに当たっては, プロトプラスト化処理を行った細胞とプロトプラスト化処理を行わない細胞での測定を行い, 両者で同等の値を示すことを確認した。

(5)物理的ストレスの評価

攪拌槽におけるエネルギー消散 (P) に関しては, 既に研究がなされている。槽の形状が決まっている場合, 動力数 ($N_p = P / (\rho n^3 d^5)$) は, レイノルズ数 ($Re = \rho n d^2 / \mu$) の関数として得られる。バドル (平羽根), タービンを攪拌翼とする攪拌槽において, 邪魔板のない場合と完全邪魔板状態における N_p の推算式として永田らの計算式がある(永田ら, 1957)。また, Rushtonら(1950)はいくつかの標準的な攪拌槽についてレイノルズ数と動力数の対応をとっている。これら既往の結果を用いることにより, 攪拌槽内のエネルギー消散を推算することができる。本研究では, Rushtonらのデータを利用できる攪拌槽条件で培養を行い, 回転数を変えることにより槽内のエネルギーを操作した。

4-3 結果

(1) 生存性の攪拌強度依存性

攪拌数を200~500rpm, 温度を27℃に制御し, 24時間リアクター中での培養を行った。対照として100mL細胞懸濁液を含む, 300mLフラスコでの振盪培養を行った。初期細胞密度は, 約10g-FCW/Lであった。

培養後の細胞数, 乾燥重量の対照培養との比を図4-2に示した。攪拌速度を変えることによる培養系中への酸素の移動が与える影響を検討するために, 溶存酸素濃度を7ppmに制御した場合の結果も併せて示した。乾燥重量には大きな変化はない。細胞数は, 溶存酸素を制御した場合にも制御しない場合にも共通して, 攪拌強度が低いときにはフラスコ振盪培養におけるより低くなっているが, 攪拌強度の増加に従い増加し, 振盪培養における値を越えるという傾向を示した。

培養後の増殖速度, Evans Blue, TTCからもとめた生存率を図4-3に示した。TTCによる生存率は, 細胞量による変動を考慮して, 乾燥重量で割った値を用いた。ここで対照培養での値を1とした。200rpmにおいて増殖性による生存率が低くなっているが, これは, 200rpmにおいてはリアクター中での溶存酸素濃度が2ppm程度になるため, その影響とも考えられる。また, 増殖性による評価は培養中の様々な因子の影響を受け易いので誤差も大きいと考えられる。その他の場合については攪拌速度の増加に伴い, 各生存率とも滑らかに低下している。また, ここで増殖性生存率, TTCは300rpm以降, Evans blueによる生存率よりも低い値を示している。また, 図4-2に見たように細胞量は, 数, 重量のどちらも攪拌速度の増加に伴う低下を示していない。この結果は, 動物細胞において観察された, 細胞の死滅が細胞内部から進行するという既往の研究に一致する。

また, 培養前, リアクターおよびフラスコでの培養後のアグリゲート面積分布を図4-4に示す。各条件での分布は4種の攪拌条件で得られた値を平均した値として示した。リアクターでの培養を行った細胞においては培養前やフラスコ培養後に見られた大きな面積のアグリゲートが減少し, より小さい面積のアグリゲートに偏る傾向が見られた。また, リアクターおよびフラスコでの培養後の細胞径を顕微鏡下で測定したところ, フラスコでの培養細胞では106 μ m, リアクター培養細胞では94 μ mの平均値が得られた。この結果は各条件20個の細胞の計測より得られたもので, 分散分析により有意な差があることを確認した。

(2) 生存率の経時変化

攪拌速度を500rpm, 温度を27℃に制御した攪拌槽に細胞懸濁液を投入し, 24時間攪拌培養を行った。その過程において4時間毎に細胞懸濁液を採取し, Evans BlueおよびTTCによる生存率の経時変化を測定した。対照としてフラスコでの振盪培養を行った。培養開始時の測定値をそれぞれ基準として規格化した。結果を図4-5に示す。Evans blueについてはフラスコでの値は3%程度の誤差範囲で安定しているのに対して, リアクターでの値は培養12時間目以降, 徐々に低下を示した。しかしながら TTCについては, フラスコ, リアクターでの値とも12時間目までで30~40%まで低下した後, 20時間目までに増

加を示し、その後再び低下した。12時間目までについてさらに細かく測定を行うと、TTC 測定値はより短い期間に増減を示し、その挙動は再現性よく観察された。これは、TTC が細胞内の酵素活性性によるため、細胞内の代謝状況により変動し易いためであると考えられる。従って、経時的な生存率の変化を観察する場合、TTC による測定は信頼性が低いと言える。しかしながらリアクターとフラスコでの差が Evans blue における測定よりも早期に現れていることから、細胞の死滅が細胞内から進行するという先に見られた傾向と一致する。

また、同じ条件でのリアクター培養におけるアグリゲートサイズ分布を10時間目まで2.5時間毎に測定した結果を図4-6に示した。スタート時に見られる $0.5 \sim 1.0 \text{ mm}^2$ の分布は2.5時間目までにはほぼ見られなくなり、5時間目以降では 0.1 mm^2 以下のアグリゲートが全体の65%以上を占めるようになった。

(3)ATPおよび細胞膜流動性

攪拌によるストレスが細胞内因子に伝わる機構を考察するために、細胞内ADP、ATPおよび細胞膜流動性の測定を行った。

攪拌数を200~500rpm、温度を27℃に制御し、24時間、リアクター中での培養を行った。対照として100mL細胞懸濁液を含む、300mLフラスコでの振盪培養を行った。

培養後のADP、ATP測定値を対照におけるADPとATPの和を基準に規格化した。攪拌速度との関係を図4-8に示した。各測定において2~3サンプルの測定を行い、平均値をとった。ここでAMPは測定限界以下にしか検出されなかった。フラスコでの培養におけるATPの割合はほぼ0.9で一定しているのに対して、リアクター培養後の細胞においては攪拌速度の増加にともない、ATP量は $0.63 \mu\text{M}$ まで低下した。この変化は、図4-5に示したEvans blueやTTCによる生存率よりも大きなものである。従って攪拌によるストレスが細胞のATP生産または消費に関与する代謝系に作用すること、生存率の低下はそのような代謝系の変化により生じることが推察される。

同じ培養後の細胞について細胞膜の流動性測定したところ、フラスコでの培養とリアクターでの培養で、誤差を越える差は見られなかった。この結果は採取後の細胞懸濁液での評価であり、リアクター内で培養している時点での膜流動性を示すものではない。従って、リアクター内の流体ストレスにより膜流動性が変化している可能性を否定するものではない。しかしながら、流動性に関与する細胞膜の組成が、24時間のリアクター操作で大きな変化を示さないことは推察される。

4-4 考察

乱流における懸濁粒子に作用する流体ストレスとしては、渦サイズの効果、粘性せん断応力、レイノルズ応力、圧力変動が考えられる。

渦サイズ効果は最小渦のKolmogoroffスケールを用いて評価される。懸濁粒子サイズによって決定された臨界値よりも大きい渦は粒子の回転を誘導するため粒子表面におよぼす正味のストレスが減少する。一方、粒子スケールに対して小さい渦は粒子にダメージを与えると考えられている。本研究の攪拌速度の範囲における乱流渦のKolmogoroffスケール

ールは25.8-51.2 μ mと計算される。この値は平均アグリゲート直径の6-14%にあたる。渦サイズ効果の評価から全てのアグリゲートは流体力学的ダメージを受けることになる。ダメージの度合いについては、この評価からは議論できない。

粘性せん断力、レイノルズ応力、圧力変動の値は各々 $\epsilon^{1/2}$, ϵ , $\epsilon^{1/2}$ に比例する。細胞のダメージの度合いをATP減少により評価することを試みた。ATPの減少は、流体ストレスを直接受けるアグリゲート表面に位置する細胞においてのみ生じると考えた。ATP減少率は、アグリゲート表面に位置する細胞中の、無処理のATP量に対するATP損失率により評価した。攪拌処理を行わない場合の、全細胞ATP量は対照培養中のATP量とした。

アグリゲート表面に位置する細胞の割合は図4-5で示した各々の攪拌速度における攪拌槽培養の後のアグリゲートサイズ分布より決定した。直径Rのアグリゲート中の直径rの細胞数はおよそ $(R/r)^3$ に等しい。細胞の断面積が πr^2 、アグリゲート表面積が $4\pi r^2$ であるから、アグリゲート表面に位置する細胞数はおよそ $4(R/r)^2$ に等しい。従って、アグリゲート表面に位置する細胞の割合は $R > 4r$ という条件下では $4r/R$ となる。アグリゲートサイズが $4r$ より小さいときは全ての細胞がアグリゲート表面に位置すると仮定できる。この仮定に従うと、アグリゲート表面に存在する細胞の割合は全ての細胞の67-88%と推算された。

図4-8にATP減少率と攪拌速度より計算された単位質量あたりのエネルギー散逸 ϵ の両対数プロットを示した。ATP減少が粘性応力、あるいは圧力変動に比例すると仮定するとATP減少の対数は $\log \epsilon$ と傾き1/2で比例し、図4-8のプロットより得られた値もそれにほぼ等しい。

Croughan et al.は微生物細胞及びmicrocarrier上の動物細胞の死滅は細胞同士の衝突や乱流渦とともに起こり、比死滅速度は $\epsilon^{3/4}$ に比例すると提唱した。彼らの結果と比較するためには、ATP損失と細胞死の関係についてさらに定量的に検討を行う必要がある。

エネルギー代謝におけるATP消費はATPの加水分解によって起こり、ADPを生産する。本研究ではADPレベルの変化は観察されなかった。流体力学的ストレスによって起こるATP減少は基質としてのATP消費またはATP合成の阻害によるものと考えられる。

4-5 結言

ペニバナ細胞を攪拌槽中で培養し、生存率の流体ストレスに対する応答について検討を行い、以下の結果を得た。

- (1) 攪拌速度の増加に伴い、呼吸活性、膜透過選択性の低下が見られることを示した。
 - (2) 呼吸活性、膜透過選択性の経時変化において、呼吸活性は培養初期より、攪拌操作による低下を示した。細胞破壊が観測されず、膜透過選択性に低下が見られない攪拌条件下において、呼吸活性の低下が見られたことから、植物細胞において流体ストレスの細胞内への伝達機構が存在することを示した。
 - (3) 細胞内のATP含有量を評価したところ、攪拌操作により減少する挙動が見られた。
- 以上の知見により、攪拌操作による細胞の増殖、生産活性の低下は、エネルギー代謝の変化に起因することが推察された。

記号一覧

| | |
|---|--|
| P : エネルギー消費 [$\text{kg} \cdot \text{m}^2/\text{s}^3$] | ρ : 流体密度 [kg/m^3] |
| ϵ : 単位重量当りのP [m^2/s^3] | μ : 流体粘度 [$\text{kg}/\text{m}\cdot\text{s}$] |
| Np : 動力数 [-] | d : 攪拌翼の羽根径[m] |
| Re : レイノルズ数 [-] | n : 攪拌翼回転数 [s^{-1}] |

第4章 引用文献

1. Allan, E.J., et al., J. Plant Physiol., 132, 176, 1988
2. Abu-Reesh, I. and F. Kargi, J. Biotechnol., 9, 167, 1989
3. Augenstein, D.C., Sinskey, A.J., Wang, D.I.C., Biotechnol. Bioeng., 13, 409, 1971
4. Ballica, R., Ryu, D.D.Y., Powell, R.L., and Owen, D., Biotechnol. Prog., 8, 413, 1992
5. BioChem. Technology Inc., 日本公開特許広報, 1990
6. Bliem, R. and Hermann, K., Trends Biotechnol., 6, 224, 1988
7. Brennan, A.J., et al., Biotechnol. Tech., 1, 169, 1987
8. Cherry, R.S., Papoutsakis, E.T., Biotechnol. Bioeng., 32, 1001, 1988
9. Cherry, R.S., Kwon, K.-Y., Biotechnol. Bioeng., 36, 563, 1990
10. Cherry, R.S. and C.T. Hulle, Biotechnol. Prog., 8, 11, 1992
11. Croughan, M.S., et al., Biotechnol. Bioeng., 29, 130, 1987
12. Croughan, M.S., Wang, D.I.C., Biotechnol. Bioeng., 33, 731, 1989
13. Davies, P.F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2114, 1986
14. De Klerk-Kiebert, Y.M. and L.H.W. van der Plas, Plant Sci., Letters, 33, 155-162, 1984
15. Handa, A., et al., Proc. 4th European Congr. Biotechnol., 3, 601, 1987
16. Hegglin, M., et al., Chimia (Ger), 44, 26, 1990
17. Hooker, B.S., et al., Enzyme Microb. Technol., 11, 484, 1988
18. Hooker, B.S., et al., Biotechnol. Bioeng., 35, 296, 1990
19. Kawase, Y., Moo-Young, M., Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 596, 1989
20. Kawase, Y., Biotechnol. Bioeng., 35, 540, 1990
21. Legge, R.L., K.-H. Cheng, J.R. Lepock and J.E. Thompson, Plant Physiol., 81, 954-959, 1986
22. Mano, T., et al., J. Chem. Technol. Biotechnol., 47, 259, 1990
23. Miguel, A., et al., Chem. Eng. Sci., 43, 2301, 1994
24. Moo-Young, M., Chisti, Y., Bio/Technology, 6, 1291, 1988
25. 永田進治, 山本一夫, 横山藤平, 志賀周次郎, 化学工学, 21, 708-715, 1957
26. Pauli, J., et al., Chem. Eng. Technol., 12, 374, 1989
27. Petersen, J.F., McIntire, L.V., Papoutsakis, E.T., J. Biotechnol., 7, 229, 1988
28. Pehl, G.W., et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 29, 456, 1988
29. Ramirez, O.T., Mutharasan, R., Biotechnol. Bioeng., 36, 911, 1990

30. Rosenberg,M.Z.,Doctoral dissertation.Washington Univ.,St.Louis,MO, U.S.A.,1987
31. Rushton,J.H.,E.W.Costich and H.J.Everett,Chem.Eng.Prog.,46,467,1950
32. Ryll, T. and R. Wagner, J.Chromatography, 570, 77-88, 1991
33. Scragg,A.H.,Fowler,M.W.,et al.,Proc.Eur.Conf.Mixing,6th,457,1988
34. Schuerch,U.,et al.,J.Biotechnol.,7,179,1988
35. Smith,J.M.,et al.,Biotechnol.Bioeng.,35,1088,1990
36. Soule,J.C.,et al.,Entropie(Fr).23,24,1987
37. 田中秀夫、発酵工学、63,245,1985
38. Taticek, R.A., Moo-Young, M., and Legge, R.L., Appl. Microbiol.Biotechnol., 33,280, 1990
39. Towill,L. and P.Mazur, Can.J.Bot.,53,1097,1975
40. Tramper,J.,et al., Bioprocess Eng.,3, 37,1988
41. Trinh, Kim., et al., Biotechnol. Bioeng., 43, 37,1994
42. Zilkah,S. and J.Gressel, Plant Sci.Lett.,12,305,1978

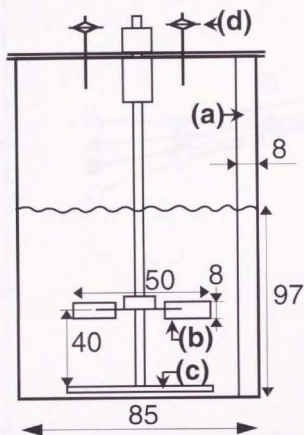


図4-1 攪拌槽の形状

- (a)邪魔板, (b)攪拌翼 (6枚羽ディスクタービン)
 (c)マグネチックプレート, (d)通気フィルター

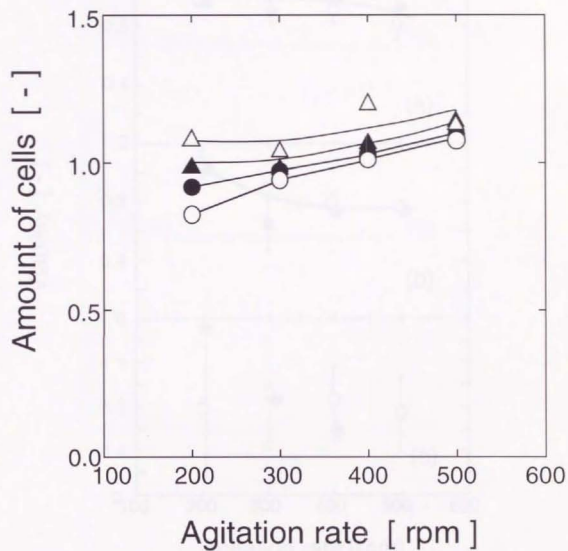


図4-2 攪拌操作による細胞数，乾燥重量の変化

(○●) 細胞数, (△▲) 乾燥重量

(●▲) DO制御, (○△) DO非制御

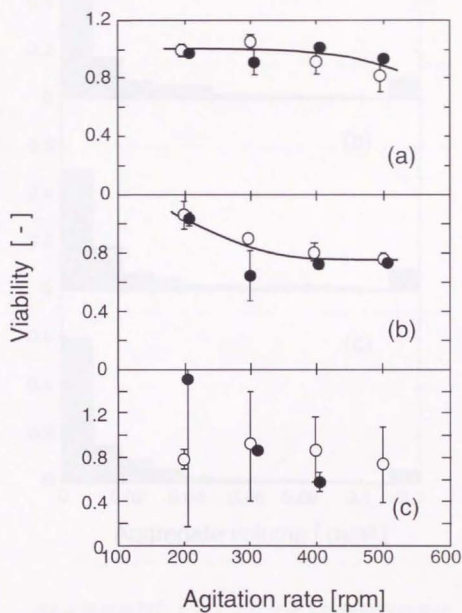


図4-3 攪拌操作による生存率の変化
 (a)Evans blue (b) TTC (c) 増殖活性
 (●) DO制御, (○) DO非制御

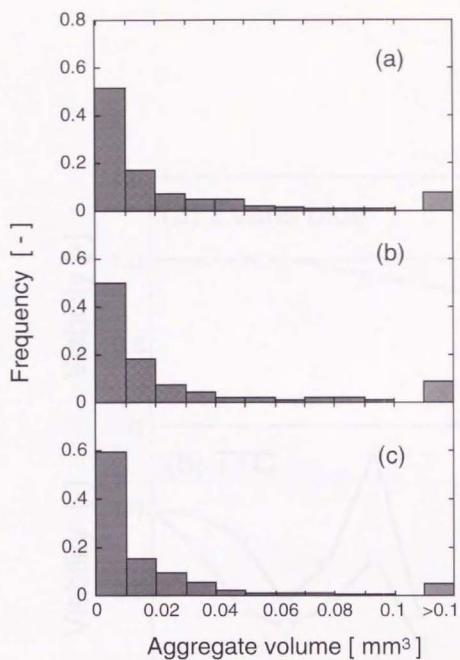


図4-4 攪拌操作によるアグリゲート体積分布の変化
(a) 培養前, (b) フラスコ培養後, (c) 攪拌培養後

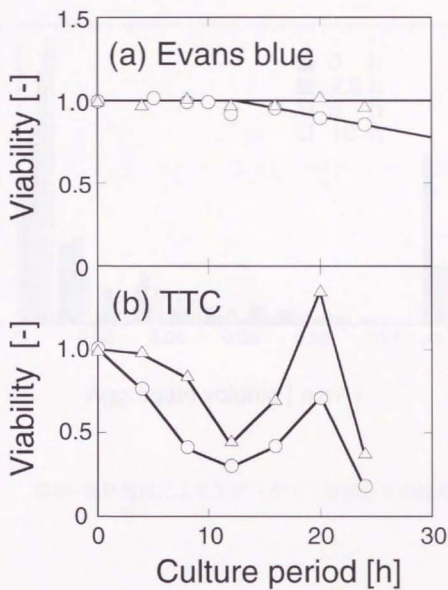


図4-5 Evans BlueおよびTTCによる生存率の経時変化

(a) Evans blue, (b) TTC

○：攪拌槽，△：フラスコ（対照）

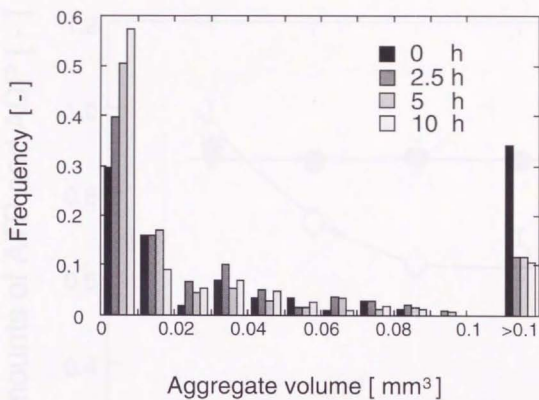


図4-6 攪拌操作によるアグリゲート体積分布の経時変化

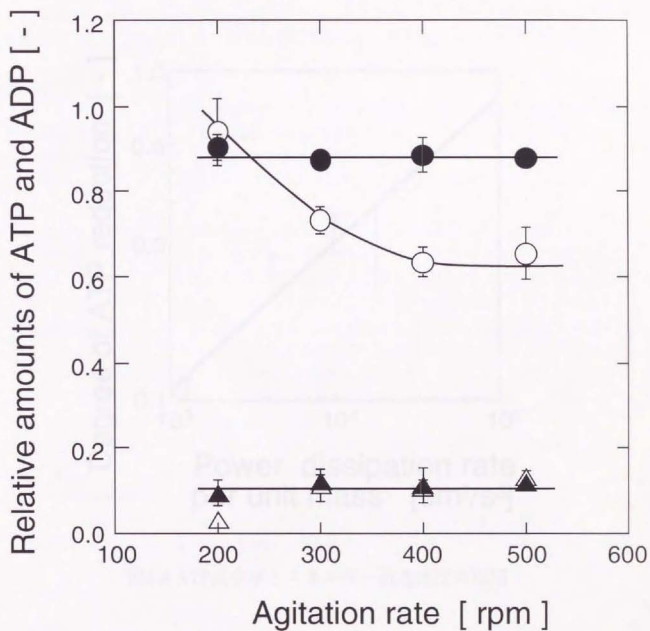


図4-7 攪拌操作によるADP, ATPの変化

(○●) ATP, (△▲) ADP
 (○△) 攪拌槽, (●▲) フラスコ (対照)

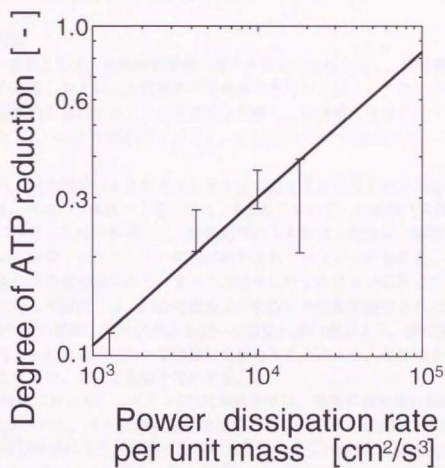


図4-8 ATP減少率とエネルギー散逸速度の相関

第5章 本研究の総括と展望

5-1 本研究の総括

植物細胞における目的物質の生産性制御方法、リアクター操作にともなう物理的ストレスに対する植物細胞の耐久性を評価することを目的として、ペニバナ細胞のビタミンE生産を対象として検討を行った。以下に各章ごとの成果を示し、その意義を述べる。

第1章 緒論

本研究の背景として、植物細胞培養に関する研究の流れを示し、植物細胞培養の課題、特に細胞の増殖、および二次代謝系の培養操作条件およびリアクター中の流体ストレスに対する応答性を解明することの重要性を指摘し、本研究の目的を述べた。また、本研究で対象としたペニバナ細胞およびビタミンEについてその性質を示した。

第2章 ペニバナ細胞によるビタミンE生産に対する有効因子の評価と制御

本章では、ペニバナ細胞によるビタミンE生産について、培養操作条件に対する応答を実験的に検討した結果を示した。植物細胞による物質生産性は、細胞内代謝系の複雑な関連による制御下にあり、その機構は解明されていない。培地組成、ガス環境などの培養操作条件は多成分系であり、すべての成分に対する個々の応答についての検討は能率的ではない。本研究では、回分培養および反復回分培養で観察された細胞の増殖、ビタミンEの生産の挙動、実験計画法を用いた培地成分の検討より、特に増殖、生産に作用すると考えられた成分についての検討を進めることにより、有効因子の効果について評価をおこなった。以下に結論を要約する。

- (1) 回分培養において、ビタミンEの比増殖速度は、培養の極初期に低い値を示したのち最大値を示し、その後細胞量の増加にともない低下する挙動を示した。
- (2) 反復回分培養により、細胞の比増殖速度、ビタミンEの比生産速度がともに高く維持された。また、天然種子を超えるビタミンE含有量をもつ培養細胞が得られた。
- (3) 細胞の増殖、ビタミンEの生産は、細胞濃度が低いときに低下すること、既に細胞を培養した培養液（培養ろ液）の添加により、増殖、生産性が向上することから、一定量以上の細胞放出性の物質（コンディショニング因子）が細胞の増殖およびビタミンEの生産に必要であることを示した。
- (4) 気泡塔を用いて、溶存酸素濃度（DO）を制御した短期的な細胞の培養を行って、ビタミンEの比生産速度の応答を測定した。その結果、溶存酸素濃度の9 ppm までの増加によってビタミンEの生産が促進することが観察された。
- (5) 酸素分圧を調整した空気を上面通気した、フラスコ振とう培養により、DO濃度を8 ppm に制御した30日間の回分培養を行った。その結果、培養の初期においては、対照として行ったDO非制御培養において見られた比生産速度の低下を示さず、高い比生産速度を維持したが、その後対照培養と同様に低下する挙動を示した。

- (6) 培地成分についての評価により、リン酸塩が長期的な細胞の増殖に、糖濃度がビタミンE生産に関与していることを明らかにした。さらに、糖濃度の効果については、主に浸透圧の効果によることを示した。

第3章 構造化モデルによる増殖と生産の解析

操作条件の制御を行う上で、増殖、二次代謝生産の挙動を予測を可能とするためのモデルが必要となる。植物培養細胞における増殖・二次代謝生産についてのモデルは、未だ確立されていない。

培養操作条件に対する植物細胞の応答は、細胞内の構造変化をとともなう。従って、モデル化にあたっては、構造化モデルの構築が必要となる。本研究では、回分および反復回分培養における、細胞の増殖およびビタミンE生産の記述を目的としたモデルを提案した。細胞内の呼吸基質を中心にしたコンパートメントモデルの構築、コンディショニング因子の効果の導入により、増殖および二次代謝生産の記述を可能とした。

植物細胞は、動物微生物細胞と比較して、細胞内にデンプン等の形で呼吸基質原料を貯蔵できる点に特異性を有すること、アミノ酸等の細胞構造体や二次代謝系の前駆体が、呼吸基質を出発物質としていることから、コンパートメントモデルの構築にあたって呼吸基質を考慮する必要がある。細胞内の組成区分を、「呼吸基質」を中心に「貯蔵炭水化物」、「細胞構造体」に分け、呼吸基質と貯蔵炭水化物の相互変換速度をエネルギー質量を代表するリン酸塩濃度の関数とした。また、コンディショニング因子については、細胞量に比例して生産され、細胞内外に一定で分配するものと仮定した。

その結果、回分および反復回分培養における増殖挙動に適合するモデルを構築した。

また、ビタミンEの生産に関しては、前章で得られた実験結果より、前駆体質量が呼吸基質量および培地からの供給成分に対応すると仮定することにより、回分および反復回分培養における挙動を表わすことができた。

第4章 攪拌操作により生じる流体ストレスによる細胞の変化

リアクター内での培養を行ううえで、通気攪拌操作により生じる流体ストレスは、流体の混合、細胞の懸濁、主に気体成分の物質移動を実現するうえで必然的に生じる。しかしながら、通気攪拌操作は、多くの場合増殖性、生産性の低下を生じることが指摘されている。従って、リアクター操作にあたっては、細胞の生存率の流体ストレスに対する応答を知ることが要求される。

植物培養細胞の流体ストレスに対する応答については、報告例は少ない。動物細胞についての検討では、流体ストレスが細胞内に伝達されることが指摘されているが、その機構は明らかにされていない。

攪拌槽中で24時間の培養を行い、細胞量、攪拌操作後の細胞増殖、呼吸活性、膜透過選択性の評価を行った。その結果、攪拌速度の増加にともない、呼吸活性、膜透過選択性の低下が見られた。さらにその過程における、呼吸活性、膜透過選択性の経時変化を測定したところ、呼吸活性は培養初期より、攪拌操作による低下が観察された。細胞破壊が観測されず、膜透過選択性に低下が見られない攪拌条件下において、呼吸活性の低

下が見られたため、植物細胞においても流体ストレスの細胞内への伝達機構が存在することを示した。さらに、細胞内のATP含有量を評価したところ、攪拌操作により減少する挙動が見られた。

ここで得られた知見により、攪拌操作による細胞の増殖、生産活性の低下は、細胞内のエネルギー代謝の変化に起因することが推察された。

5-2 今後の展望

モデルの展開と応用

本研究で提案したモデルは、植物細胞の二次代謝生産一般の記述に使用しうることを目標として、構築されたものである。そこで、本モデルの他の植物系への適用可能性が検討されなくてはならない。本系の場合の生産速度は、基質量律速のモデルで記述することができたが、二次代謝産物の種類によっては、特異的なシグナル（光、物理的ストレスなど）で誘導される酵素の活性に生産速度が律せられる例もあると考えられる。また、生合成の基質として、細胞構造体の合成中間体、分解物などの寄与も想定される。

流体ストレスに対する応答機構の解明

本論文では、流体ストレスに対する細胞の応答について、細胞内のエネルギー代謝が関与することを示したが、ストレスの細胞内伝達機構、ストレスによって誘発されるエネルギー消費反応については解明していない。今後、応答機構の解明をさらに進め、流体ストレスに対する細胞ダメージの指標、リアクターの操作条件の設計指針を確立することが望まれる。

本研究の成果に基づき、昨年度にユーカリ細胞を用いた攪拌ストレス伝達機構について検討を行った。その結果、ストレス伝達に膜電位依存性チャンネルを通してのカルシウム移動が関与していることを示した（北川、武田、関、古崎、化学工学会第60年会（1995））。

また、リアクター培養における細胞の増殖・二次代謝生産の挙動について、構造化モデルを用いた解析を行うことも今後の課題である。

謝辞

本研究は、東京大学大学院工学系研究科の化学工学（1994年から化学生命工学）専攻在籍中の1989年から1995年までの6年間に古崎研究室において行ったものです。

本研究のテーマを下さり、本研究を進めるに当たり暖かく御指導下さいました古崎新太郎教授に心から感謝致します。

関実講師には研究の方針から具体的な実験の進行まで、研究全般にわたって御指導、御助力頂きました。本研究をまとめることができましたのも、関先生に懇切丁寧なディスカッションをして頂いたお蔭です。心より感謝いたします。

斉藤恭一助教授（現、千葉大学）には、卒論において研究生活について基礎から御教授頂き、本研究に取り掛かりましてからも時に暖かく、時に厳しく、御指導、御助言頂きました。ありがとうございます。

本論文の審査にあたり、副査である戸田清教授、長棟輝行教授、鈴木栄二助教授には、専門的な見地から有益な御助言を頂きました。厚く御礼申し上げます。

本研究に用いたペニバナ細胞を提供して頂いた北里大学の古谷力教授（現、岡山理科大学）に心より感謝いたします。

倉田博之助手には、植物細胞培養に取り組む先輩として、有益な御助言を頂きました。ありがとうございます。

試作室の黒木影康氏（現、理化学研究所）には折に触れ暖かい激励の言葉を頂きました。ありがとうございます。貴志和之技官には談話会において有用な議論をして頂きました。

私は卒業研究から、大学院の5年間、そして助手として奉職させて頂いた1年余まで、計7年間余、古崎研究室でお世話になりましたが、その時間をともに過ごした諸氏に感謝します。先輩である山岸秀之氏、上江洲一也氏、Kim Min氏、太田光治氏、岩田秀樹氏、Claire Langeさん、倉橋裕氏には、公私にわたって多くのことを教わり、激励して頂きました。同期に研究室に配属になった、常田聡氏、重松邦彦氏、重信（現、野口）美緒さん、博士課程から同期になった市川創作氏とともに研究生活を送ることができたことを感謝します。

また、後輩に当たる、小西聡史氏、佐野宏充氏、科野宏典氏、片野兼士氏、杉町正登氏、内藤憲一郎氏、戸井田康弘氏、Zhao Yujun氏、王賀年氏、李国慶氏、坂場重昭氏、河合淳氏、岡本芳生氏、芹沢健一氏、小林健次氏、山田英夫氏、廣田真隆氏、全繼紀氏、松村悟氏、河本啓氏、溝田智敏氏、William Lee氏、重田健太郎氏、三宅雄久氏、杉山慎氏、関口浩二氏、鯉淵公備氏、小島淳氏、Michael Kessler氏、劉裕国氏、中村雅之氏、東山真見氏、常川豊吉氏、広川隆彦氏、松浦紀夫氏、香川浩哉氏、伊藤雅教氏、宇井基泰氏、竹内有さん、中嶋麻由子さん、松村邦彦氏、奥田直之氏、武井紀昭氏、長谷川一氏、的場誠二氏、宮永一彦氏、枝広純一氏、大空千晴さん、北川隆徳氏、田中茂徳氏、服部直紀氏、火原彰秀氏、松田健吾氏、新井亮一氏、小野知二氏、漢那慎一氏、黒岩孝仁氏、古山桂太郎氏、武井康次氏、竹内祥訓氏、六反園俊作氏に感謝します。

特に、本論文に関与する研究を行ってくれた、竹内有さん、北川隆徳氏、竹内祥訓氏には特に感謝します。

また、研究員として一緒にいた田中信氏、土居俊房氏、Sebnam Harsa さん、陶国良氏、研究室の秘書を務められました大村知子さん、竹政京子さん、山岸裕子さん、小倉優子さん、浜本美智子さん、伊藤恭子さん、長友美恵さん、山下尚子さん、伊藤智絵さん、長谷川頼子さん、河野知子さん、伊藤恵美さん、お世話になりました。ありがとうございました。

本論文をまとめることができたのは、ここに挙げた方々を始め、化学工学科、化学生命工学科の教職員の方々、友人などの御助言、激励のお蔭であると感謝しています。

最後になりましたが、私の研究生活を暖かく見守って下さった、両親、姉妹弟、そして妻の麻由子に心から感謝します。

1995年6月

武田俊哉

