

## マイクロバブルの培養への適用

### “Microbubble” for Microbial Culture

奥村大成\*1、小島秀藏\*2、田原直樹\*3

Taisei Okumura\*1, Shuzo Kojima\*2, Naoki Tahara\*3

\*1 技術開発本部技術開発部、\*2 技術開発本部技術戦略部

\*3 産業・国内プロジェクト本部ライフサイエンスエンジニアリング部

\*1 Technology Development Department, Research & Development Division, \*2 Technology Strategy Department, Research & Development Division, \*3 Life Science Engineering Department, Industrial & Domestic Energy Project Division

#### 要旨

細胞培養の高密度化を支える高効率な酸素供給システムを実現するために、シラス多孔質ガラス(SPG)膜を利用したマイクロバブルスパージャーを宮崎県工業技術センターとの共同研究により開発した。このマイクロバブルスパージャーは酸素供給および微生物培養結果において、一般的に使用されるオリフィススパージャーよりも優れた能力を示し、バイオリアクターに適用できる高効率な酸素供給システムであることを明らかにした。今後は動物細胞培養へのマイクロバブルの適用試験を実施し、細胞培養のための高効率な酸素供給技術を確立する。

#### Abstract:

To realize a high-density culture of mammalian cell by achieving the highly-efficient oxygen supply, JGC and MITC (Miyazaki Prefecture Industrial Technology Center) have jointly developed a micro-bubble sparger using SPG (Shirasu Porous Glass) membrane. The sparger is superior in performance in terms of oxygen supply, creating an excellent environment for microbial culture, compared with a conventional means such as orifice sparger. JGC will apply the micro-bubble sparger to mammalian cell culture in the future.

#### 1. はじめに

近年、医薬品開発では、抗体医薬を代表とするバイオ医薬品の開発機運が高まっている。また、ワクチン製造では、パンデミックインフルエンザに対応するために、より効率的な製造方法として、従来の鶏卵法から細胞培養法への転換が図られている。これらの細胞培養技術のニーズの高まりに伴い、培養技術の高度化が求められている。特に、細胞濃度の高密度化に起因する培養槽の酸素要求量の増大に対応した高効率な酸素供給技術が必要となる。

一般的な培養槽への酸素供給法としては、培養槽内に気泡通気し、培養液を攪拌する羽根のせん断力により気泡を微細化する方法がある。この方法は、培養液単位体積あたりの気液界面積を増大させ、酸素供給量を向上させることができる。しかしながら、バイオ医薬品製造に使用する動物細胞を培養する場合、動物細胞の物理的強度が非常に低いため、攪拌羽根のせん断力により細胞が損傷を受け、死滅することが懸念されている。そこで当社は、攪拌に依存せず

に微細気泡を培養槽内に発生することができる技術として、医療や環境などの広範な分野で適用検討がなされているマイクロバブル技術に注目した。マイクロバブルは気泡径が微細であることによる気液界面積の増大という特性に加えて、気泡内圧力の増加および液中滞留時間の増加といった酸素供給の効率化に寄与する特徴を有している。これらの特徴により培養液への酸素供給性能の著しい向上が期待できるため、新規の高効率な酸素供給システムとしてマイクロバブルスパージャーを開発することとした。

## 2. マイクロバブルおよびその生成方法

マイクロバブルには厳密な定義はないが、一般に数  $\mu\text{m}$ ~100  $\mu\text{m}$  程度の直径を有する微細気泡とされている。通常の気泡（ミリバブル）と比較して以下の特徴が知られている<sup>1)</sup>。

- 単位ガス体積あたりの気液界面積の増加
  - 気泡内圧力の増加
  - 液中滞留時間の増加
  - 表面電位特性による気泡合一の回避
- また、マイクロバブルを生成する手法としては主に以下の5つがある<sup>1)</sup>。
- 気液二相流体混合・せん断方式
  - 圧力加減制御方式
  - 超音波方式
  - 超高速旋回方式
  - 細孔方式

このうち、細孔方式以外では、液相に対してせん断力、圧力変動または超音波振動を付加してマイクロバブルを生成している。外力により破壊しやすい微生物細胞および動物細胞に対して、このような外力を与えるマイクロバブル供給方法は適していない。そこで、微生物細胞および動物細胞にストレスを与えることなくマイクロバブルを供給できる細孔方式を採用した。

細孔方式によるマイクロバブル生成方法の模式図を図1に示す。細孔方式は、多孔質膜にガスを加圧供給し、膜表面の細孔を介してガスを液相にマイクロバブルとして分散させる方法である。この方式の特徴は、気泡径が細孔径に比例し、気泡の発生する圧力が細孔径に反比例する点である。

マイクロバブルスパージャーの開発では、多孔質膜として細孔径がシャープに制御可能であり、単分散の気泡径のマイクロバブルを生成可能なシラス多孔質ガラス(SPG: Shirasu Porous Glass)膜を採用することとした<sup>2)</sup>。そのSPG膜の製造方法および細孔方式によるマイクロバブル生成方法に知見を有する宮崎県工業技術センターと共同研究開発を実施している。

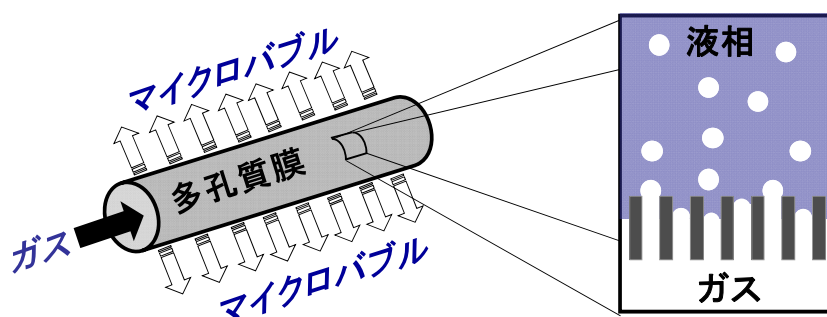


図1 細孔方式によるマイクロバブル生成方法の模式図

3. マイクロバブルスパージャーの酸素供給性能

3. 1 評価方法

酸素供給の性能評価の指標として総括酸素移動容量係数 ( $K_La$ ) を採用した。 $K_La$  は、液相への酸素の溶解速度を表す値であり、培養槽設計においては通気攪拌効果を定量的に評価するため用いられている。マイクロバブルスパージャーの  $K_La$  を比較評価するために、最も一般的なスパージャーの一つであるオリフィススパージャーの  $K_La$  を比較評価対象として測定した。図 2 に各スパージャーの外観を示した。また、測定条件を表 1 に示した。



(A) マイクロバブルスパージャー



(B) オリフィススパージャー

図 2 スパージャーの外観

表 1  $K_La$  の測定条件

スパージャー種類	通気流量	攪拌羽根回転数	液温度	液体積	液種類
マイクロバブル	150	150~650	30°C	2 L	酵母培養用培地
オリフィス	NmL/min	rpm			

3. 2  $K_La$  測定方法

$K_La$  測定方法として、Gassing out 法(Static Method)を採用した<sup>3)</sup>。この測定方法は、溶存酸素濃度(DO : Dissolved Oxygen)を低下させた培養液に対して、空気を通気した際に得られる DO 経時変化プロットを、Eq.(1)で最小二乗法近似した結果得られる傾きを  $K_La$  とする測定法である。

$$\ln \frac{C^* - C_{ini}}{C^* - C_L} = K_L a \times t \quad \text{Eq.(1)}$$

ここで、 $C^*$  : 飽和溶存酸素濃度 [mg/L],  $C_{ini}$  : 初期溶存酸素濃度 [mg/L]  
 $C_L$  : 測定溶存酸素濃度 [mg/L],  $t$  : 時間 [h]

### 3. 3 $K_{La}$ 測定結果

マイクロバブルおよびオリフィススパージャーの  $K_{La}$  測定結果を図 3 に示した。縦軸は  $K_{La}$  を示しており、横軸は攪拌羽根回転数を示している。図 3 より以下の点を確認できた。

- ① マイクロバブルスパージャーの酸素供給性能は、すべての攪拌羽根回転数の範囲においてオリフィススパージャーより優れており、 $K_{La}$  に関しては最大で約 10 倍であった。
- ② マイクロバブルスパージャーは低い攪拌羽根回転数の範囲ほど、オリフィススパージャーより酸素供給性能が優れていた。

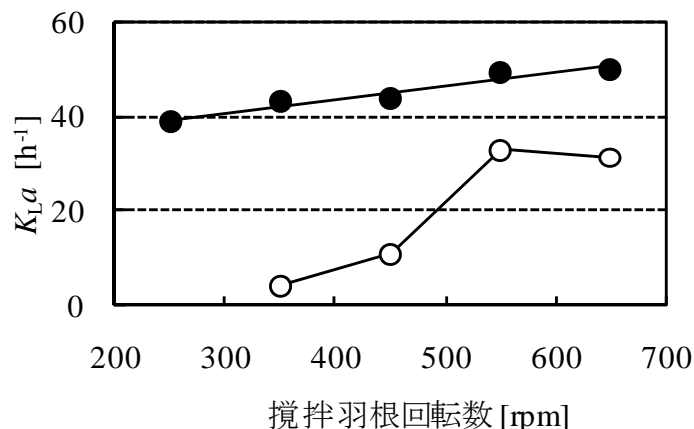


図 3 マイクロバブルおよびオリフィススパージャーの  $K_{La}$  測定結果

## 4. マイクロバブルスパージャーの培養への適用性

### 4. 1 検討方法

マイクロバブルスパージャーの培養への適用性可否を評価するため、マイクロバブルスパージャーと一般的に用いられているオリフィススパージャーを空気供給方法とした培養の比較試験を行った。このとき、大腸菌 (*Escherichia coli*) 培養における菌体増殖量を指標とした。なお、大腸菌を選択した理由は、溶存酸素濃度に依存して増殖量に変化する通性嫌気性菌であるためである。培養条件を表 2 に示した。

表 2 大腸菌培養条件

スパージャー種類	通気流量	攪拌羽根回転数	$K_{La}$	液温度	pH	液体積
マイクロバブル	150	350	43 $h^{-1}$	30°C	6.8	2 L
オリフィス	NmL/min	rpm	4 $h^{-1}$			

### 4. 2 検討結果

マイクロバブルスパージャーおよびオリフィススパージャーを用いた大腸菌培養について培養開始直後 (0 h) および 1 日後 (24 h) の培養液の外観を図 4 に示した。大腸菌培養の菌体濃度変化を図 5 に示した。縦軸は濁度による菌体濃度を示しており、横軸は培養時間を示し

ている。図 5 より以下の点を確認できた。

- マイクロバブルによる培養阻害は発生しなかった。
- マイクロバブルスパージャーを用いた大腸菌培養は、増殖速度および最終到達濃度に関してオリフィススパージャーよりも高くなった。

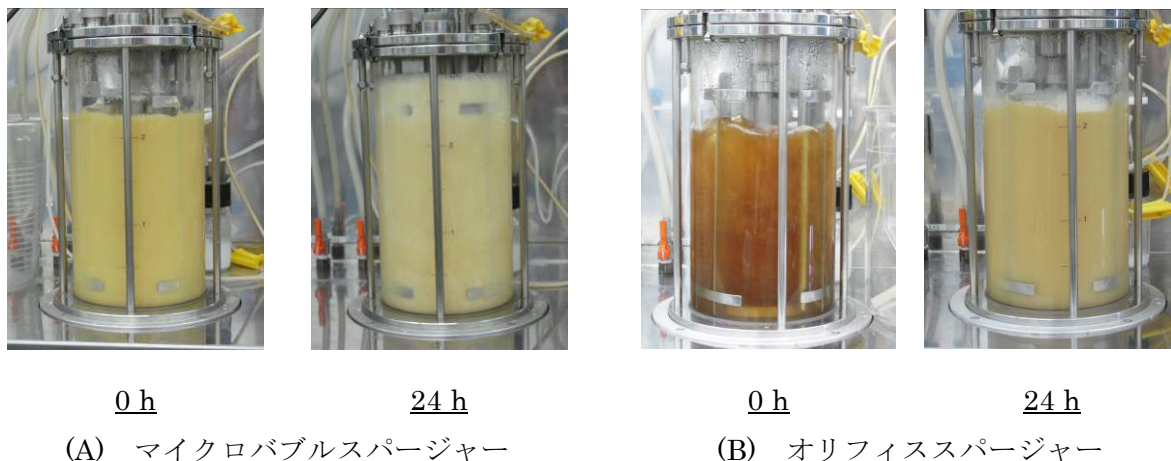


図 4 大腸菌培養の培養液外観

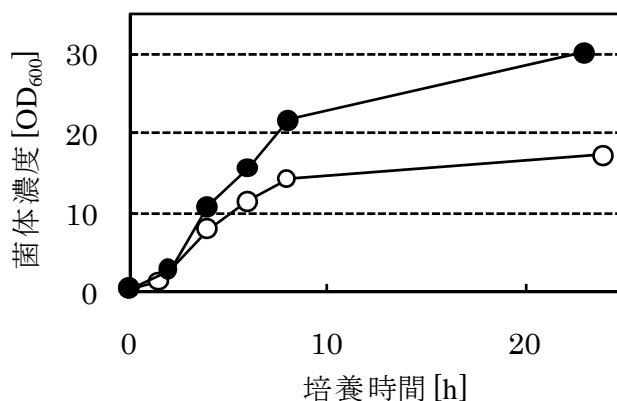


図 5 マイクロバブルおよびオリフィススパージャーを用いた大腸菌培養の菌体濃度変化

## 5. まとめ

細胞培養の高密度化を支える高効率な酸素供給システムを実現するため、マイクロバブルを用いた酸素供給に着目した。総括酸素移動容量係数 ( $K_La$ ) による酸素供給性能評価および大腸菌を用いた培養検討において、一般的に使用されるオリフィススパージャーよりも優れた能力を示し、培養に適用できる高効率な酸素供給技術であることを明らかにした。

今後は、低撹拌強度で高い酸素供給性能を必要とする細胞培養へのマイクロバブルの適用試験を実施し、その効果を検討する予定である。

参考文献

- 1) 石井淑夫他 ; 泡のエンジニアリング, (株) テクノシステム, pp.424-428, pp.463-467, (2005)
- 2) Kukizaki M, et al. ; *J. Membr. Sci.*, **281**, 386-396 (2006)
- 3) P. F. Stanbury, et al. ; 発酵工学の基礎 - 実験室から工場まで -, 学会出版センター, pp.173-175 (2004)