

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04800

研究課題名（和文）超高密度細胞培養に資する酸素供給技術の開発

研究課題名（英文）Development of oxygen-supplying method for ultra-high density cell culture

研究代表者

長森 英二（NAGAMORI, Eiji）

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：70394898

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：懸濁細胞培養で作られる製品をより低コスト化するには、高濃度培養を可能にする基盤技術の開発は重要である。高密度に集積した細胞組織を培養する技術の実現も求められる。これら双方のボトルネックのひとつとなっているのは、培養細胞に酸素を不足なく供給する技術の開発である。本研究では、液中への酸素供給速度を高めるアプローチとして、人工酸素運搬体等の活用を目指し、まず酸素律速が発生したことを検出可能な高密度培養状態を組織培養と懸濁培養で実現することに取り組んだ。現在は構築した実験系を用いて酸素運搬体サンプルの影響を共同研究者らと評価している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低酸素状態でGFP発現すMOI30#8株を用い、平面培養（2D）において画像情報から実溶存酸素濃度を推定できる可能性を示した。この技術を活用して三次元組織（3D）内の実溶存酸素濃度を非侵襲的に簡便に明らかにする技術が初めて構築された。この技術は将来の組織培養技術開発において基盤的な評価技術となり得る。無血清培地で懸濁培養が可能なCHO細胞の高濃度培養技術について検討する中で、気泡 細胞懸濁液分離技術を、半導体加工技術で作製された微細孔ステンレスメッシュを活用して構築した。通気培養において、気泡と細胞懸濁液を簡便に分離する技術は他用途への展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：To reduce the cost of products made from suspension cell cultures, it is important to develop fundamental technologies that enable high-density culture. The realization of technology for culturing highly concentrated cellular tissues is also required. One of the bottlenecks in both of these areas is the development of technology to supply cultured cells with oxygen without shortage. In this research, as an approach to increase the rate of oxygen supply to the liquid, we aimed to utilize artificial oxygen carriers, etc., and first worked to realize high-density culture conditions in tissue culture and suspension culture in which the occurrence of oxygen rate-limiting events can be detected. Currently, we are evaluating the effects of oxygen carrier samples using the constructed experimental system with collaborators.

研究分野：生物化学工学

キーワード：培養工学 溶存酸素 非侵襲計測 組織培養

### 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬製造や再生医療用細胞製造など、動物細胞培養技術がモノづくりに資する時代となった。懸濁細胞培養で作られる製品をより低コスト化するには、高濃度培養を可能にする基盤技術の開発は重要である。高密度に集積した細胞組織を培養する技術の実現も求められる。現時点で、これら双方のボトルネックのひとつとなっているのは、培養細胞に酸素を不足なく供給する技術の開発である。図1に示すように、細胞培養で広く用いられる平面接着培養では、到達細胞濃度は  $10^6$  cells/mL 程度であり、仮に外部から酸素供給が無い場合には、培地中の飽和酸素濃度を使い切るのに数十分を要する計算となる。実際にはこの間に十分な酸素が気液面から供給されるため酸素不足になることは稀である。懸濁培養の到達細胞濃度は  $10^7$  cells/mL と10倍以上高く、比気液界面積が減少する大型(数十リットル以上)培養槽ではスパージングなどを用いて適切に酸素供給されなければ酸素枯渇を招くものの、発泡やシェアストレスの問題が付きまとう。組織培養に至っては、培養液中の酸素は瞬時に消費し尽くされ、現在の技術では経験的に、組織表層から  $100\ \mu\text{m}$  以上の深部になると酸素供給が滞り、細胞死が誘導されるとされている。組織内部に自在に血管様管腔構造を作る技術に加えて、その内部を循環させる培地に高濃度の酸素を含ませなければならない。

外部から $O_2$ 供給が無い場合、細胞群(比酸素消費速度 $Q_{O_2}$ :  $2-3 \times 10^{-12}$  mg- $O_2$ /s cell)は、飽和 $O_2$ 濃度 $C^*$ : 約7 mg/L (37°C付近)を何分で消費し尽くすか?

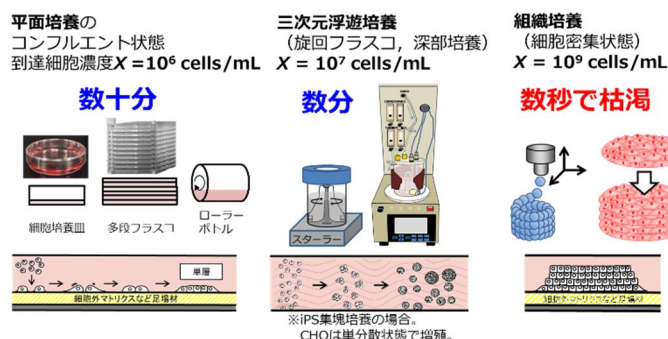


図1 細胞・組織における到達培養濃度と酸素消費

### 2. 研究の目的

本研究では、液中への酸素供給速度を高めるアプローチとして、人工酸素運搬体(パーフルオロカーボンエマルジョン)、人工ヘモグロビン製剤、その他の酸素結合蛋白質類の活用について検討することを目指した。まず低酸素状態で GFP 発現する細胞を培養皿上に積層化し、内部に酸素供給律速が起きていることを検出する実験系の構築を試みた。この評価系を用いた酸素運搬体の評価については、検証半ばであるため本報告書には含まないことを了承いただきたい。

### 3. 研究の方法

マウス骨格筋筋芽細胞 C2C12 M0130#8 株 (Masumoto ら, Journal of Bioscience and Bioengineering . 132. 399-407 (2021)) を用いた。低酸素状態で GFP 発現が確認された株である。培地は 10%FBS を含む DMEM を用いた。二次元培養では、 $37^\circ\text{C}$ 、炭酸ガス 5% をコントロール条件とし、低酸素状態で培養が可能な炭酸ガスインキュベーター (WAKEN TECH CO., LTD.  $CO_2$  Incubator 900 EX) を用いて、設定酸素濃度 20% から 1% で培養を実施した。培養中の培養皿底面近傍の溶存酸素濃度を光学式酸素センサー (PreSens 製, OXY-1 SMA) で計測した。三次元培

養では、積層細胞シートの作製と観察は既報 (Kino-oka ら, Journal of Bioscience and Bioengineering, 113, 128-131. (2012)) に則って行った。三次元的な蛍光観察像の取得と画像解析には、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X800 (キーエンス) の構造化照明による光学セクション機能と 3D 解析アプリケーションを使用した。

#### 4. 研究成果

図 2 のように、平面培養 (2D 培養) ではインキュベーターの設定酸素濃度が低いほど、多くの GFP 発現細胞が観察された。低酸素に反応した GFP の発現が確認されるまでに 2 日間程度かかることが確認された。72 時間の蛍光画像を処理し、横軸を培養皿底部の溶存酸素濃度 (mg/L),

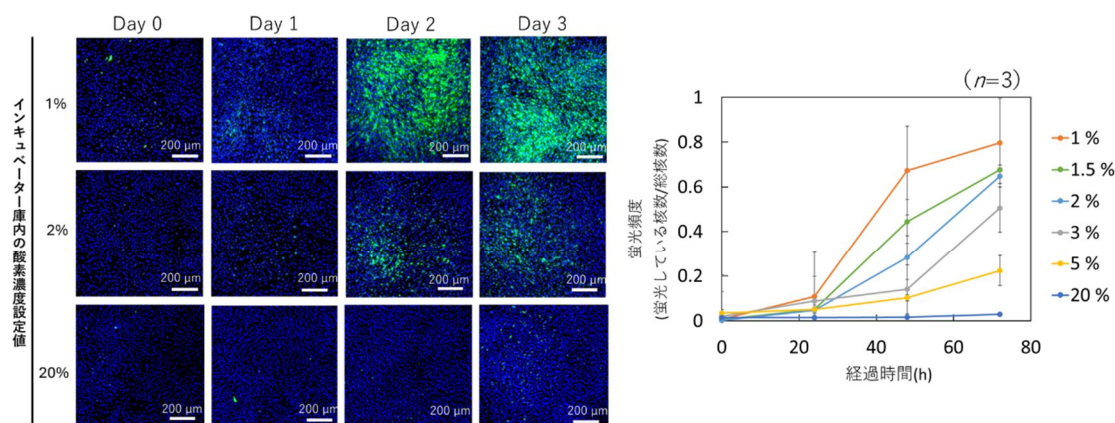


図 2 平面培養 (2D) における GFP 発現挙動 (左) と、各条件の蛍光頻度の経時変化 (右)

縦軸を核当たりの GFP 蛍光面積 ( $\mu\text{m}^2/\text{cells}$ ) で整理したグラフを図 3 に示す。実溶存酸素濃度の低さに依存して GFP 発現が活発であることが明らかになった。対数グラフでは高い直線性が確認され、観察像から実溶存酸素濃度が推定できる可能性が示された。

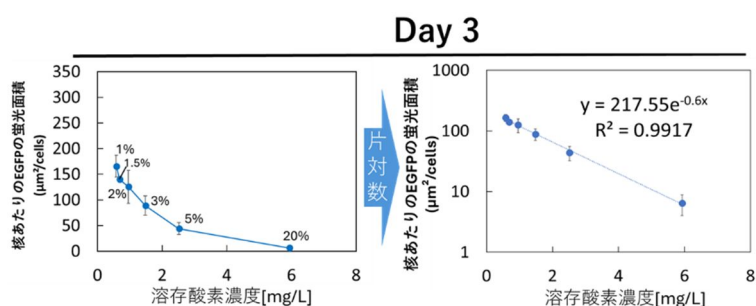


図 3 培養皿底面近傍の実溶存酸素濃度と蛍光頻度の関係

積層細胞シート培養 (3D 培養) では、作製された厚さ約  $50 \mu\text{m}$  の組織内部において、底面から  $20 \mu\text{m}$  あるいは  $30 \mu\text{m}$  までの範囲で GFP 発現細胞が観察された。光学セクション機能を用い、底面からの距離を  $5 \mu\text{m}$  毎に変化させ撮像した蛍光スライス画像を図 4 にしめす。この実験でも低酸素に反応した GFP 発現が

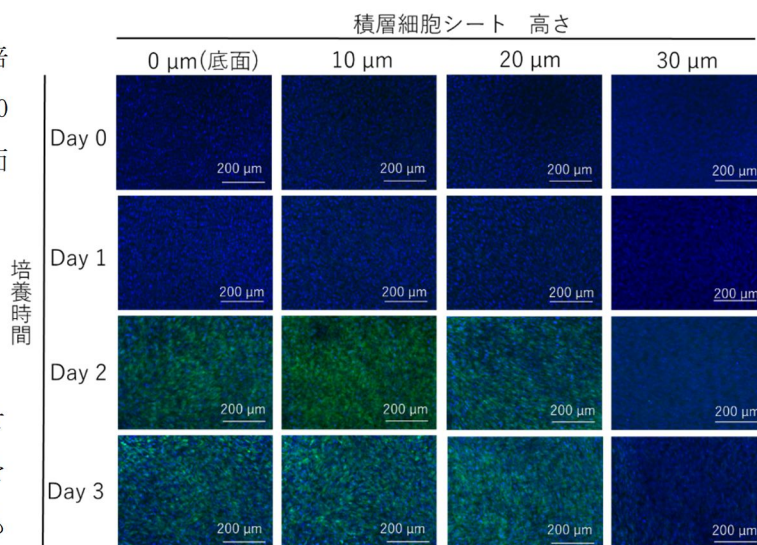


図 4 積層細胞シート (3D組織) 内部における GFP 発現の経時変化

十分に観察できたのは 2 日目以降であった。底面からの距離を 5 $\mu\text{m}$  毎に変化させ撮像した蛍光スライス画像を用いて、上述と同様の画像処理を行った結果を図 5 に示す。定量結果から、組織底部付近は平面培養状態より低酸素になっている可能性が示唆された。現在は構築した実験系を用いて酸素運搬体サンプルの影響を共同研究者らと評価している。

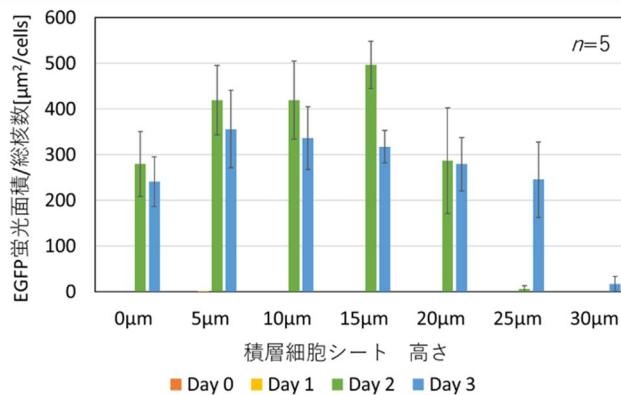


図 5 積層細胞シート (3D組織) 内の GFP 発現頻度

## 5. その他に取り組んだ検討結果と、今後の展望

上述した三次元組織における低酸素状態の検出に加え、無血清培地で懸濁培養が可能な CHO 細胞の高濃度培養技術についても検討を行った。k<sub>La</sub> が低い数十 mL の培養槽で酸素枯渇が細胞増殖の律速となる培養系を構築することができた。小型培養槽内に設置が可能な灌流培養モジュール (気泡 細胞懸濁液分離、および、細胞 培地分離が可能) を構築し、第 23 回再生医療学会総会で発表した。これら要素技術を活用して、組織培養および高濃度懸濁培養を対象に酸素運搬体サンプルの評価を共同研究者らと鋭意進捗中であり、今後に対外発表する計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Dong-Hee Kang ,Fiona Louis , Hao Liu , Hiroshi Shimoda , Yasutaka Nishiyama , Hajime Nozawa , Makoto Kakitani , Daisuke Takagi , Daijiro Kasa , Eiji Nagamori , Shinji Irie , Shiro Kitano, Michiya Matsusaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Engineered Whole Cut Meats Assembled of Cell Fibers Constructed by Tendon-Gel Integrated Bioprinting	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 5059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25236-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hideaki Fujita, Masanobu Horie, Kazunori Shimizu, Eiji Nagamori	4. 巻 132
2. 論文標題 Microarray profiling of gene expression in C2C12 myotubes trained by electric pulse stimulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 417-422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.06.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hideaki Fujita, Keisuke Mae, Kouki Nagatani, Masanobu Horie, Eiji Nagamori	4. 巻 131
2. 論文標題 Effect of hydrogen peroxide concentration on the maintenance and differentiation of cultured skeletal muscle cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 572-578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.12.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長森英二、佐藤貴志	4. 巻 49
2. 論文標題 応答速度に優れた光学式溶存酸素センサーを用いた静的kLa測定法の検討	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 化学工学論文集	6. 最初と最後の頁 142-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1252/kakoronbunshu.49.142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嘉悦勇太、谷原健吾、今井健太、近藤孝志、長森英二
2. 発表標題 微細孔を有する金属製メッシュと沈降分離を併用した浮遊懸濁細胞の分離技術の開発
3. 学会等名 日本生物工学会 2022年10月 オンライン（大阪）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長森英二
2. 発表標題 バイオものづくりの社会実装を加速する人材育成・試作支援拠点の形成
3. 学会等名 関西バイオものづくりフォーラム 大阪（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤貴志、長森英二
2. 発表標題 光学式溶存酸素センサーの活用によるkLa値測定法の検討
3. 学会等名 化学工学会年会 2023年3月 東京農工大
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 巻野滉人、谷原健吾、嘉悦勇太、今井健太、近藤孝志、長森英二
2. 発表標題 微細孔を有する金属メッシュと重力沈降分離を併用した浮遊懸濁細胞の分離技術の開発
3. 学会等名 再生医療学会大会 2023年3月 京都
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長森英二
2. 発表標題 生物工学会培養技術勉強会 第3回 分離精製
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長森英二
2. 発表標題 自動培養装置を導入するにあたって気を付けること
3. 学会等名 池田理化SAITAS DAYS
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤貴志, 長森英二
2. 発表標題 燐光消失式酸素センサーの活用によるkLa値測定法の検討
3. 学会等名 日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 九鬼真奈絵, 長森英二, 四辻史也, 田中和真, 西川美和, 近藤孝志
2. 発表標題 半導体加工技術で作製した微細な「ざる」を用いた培地-細胞分離
3. 学会等名 日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田晃一, 松山勇輝, 友田春香, 上平正道, 長森英二
2. 発表標題 低酸素応答C2C12M0130#8株を用いた溶存酸素濃度モニタリング技術の開発
3. 学会等名 再生医療学会2024年大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 巻野滉人・今井健太・近藤孝志・長森英二
2. 発表標題 微細孔を有する金属メッシュと重力沈降分離を併用した浮遊懸濁細胞の分離技術の開発
3. 学会等名 再生医療学会2024年大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 長森英二 他72名	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 553
3. 書名 バイオプロセスを用いた有用性物質生産技術	

1. 著者名 長森英二、他79名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 532
3. 書名 攪拌技術とスケールアップ、シミュレーションの活用	



1. 著者名 長森英二、他多数	4. 発行年 2021年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 253
3. 書名 代替タンパクの現状と社会実装へ向けた取り組み	

1. 著者名 藤里俊哉、中村友浩、横山奨、長森英二、他多数	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 322
3. 書名 代替プロテインによる食品素材開発	

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪工業大学工学部生命工学科生物プロセス工学研究室 <a href="http://www.oit.ac.jp/bio/labo/~nagamori/index.html">http://www.oit.ac.jp/bio/labo/~nagamori/index.html</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関