

バイオリアクターと多孔質粒子



研究ノート

高 木 睦*

Bioreactor with Porous Beads

Key words : Bioreactor, Porous Beads, Immobilization

1. は じ め に

バイオリアクター（生物反応器）は、通常の化学反応器とは異なり、ひとつひとつの反応を生物細胞に由来する酵素蛋白が触媒する反応器であり、常温、常圧、中性付近のpH領域といった極めて穏和な条件下で反応でき、かつ厳密な基質特異性、立体特異性、反応特異性を持っているなど優れた特徴を備えている。このバイオリアクターには生物細胞内から単離精製された酵素を触媒として用いることもできるが、内部に酵素を含んでいる細胞そのものを用いることも多い。その方が、細胞からの酵素精製の手間が省けるだけでなく、細胞内の複数種の酵素を用いるより複雑な反応を行えるという利点がある。細胞としては、細菌、酵母、カビなどの微生物だけでなく、より高等な植物細胞や動物細胞を用いることも可能である。

細胞を触媒として用いて反応を行うとき、細胞をリアクター内にとどめておき、反応基質や生成物だけをリアクターに出したり入れたりすることが、細胞の再利用や利用効率の点からは望ましい。そこで細胞をリアクター内にとどめておくための技術（細胞の固定化技術）が必要

となる。細胞の固定化方法としては主として包括法と担体結合法とがある。前者は、ゲル粒子中の微細な格子やマイクロカプセルの中に細胞を封入する方法であり、固定化物からの細胞の漏れは少ないが、反応液本体と細胞との間の物質移動速度が低いという欠点がある。これに対して後者は、水不溶性の担体表面に細胞を結合させる方法であり、物質移動速度は速いが、液流れと細胞とが直接に接触しているために細胞が担体から脱離しやすいという欠点がある¹⁾。この担体結合法の欠点を補うと考えられているのが多孔質粒子担体への細胞固定化である。すなわち、多孔質粒子の内部孔表面に細胞を吸着あるいは結合させれば、反応液の流れの一部分だけを内部孔にある細胞に接触させるだけですみ、細胞が脱離しにくくなると考えられる²⁾。

以下に、多孔性担体粒子の例としてセルロース多孔性粒子（CPB、旭化成製）を挙げ、CPBに固定化した細胞を用いたバイオリアクターに関する研究を紹介する。このCPBは両親媒性のセルロースを材料とし、孔径6～100 μm の貫通孔を空隙率95%以上で持つ粒径100～500 μm の多孔質粒子である。

2. 固定化微生物細胞による立体選択的ニトリル変換反応

近年、光学活性体を得る反応が盛んに研究されているが、その一例としてS-イブプロフェンを挙げることができる。イブプロフェンは代表的な消炎鎮痛剤であり、現在はラセミ体が市販されているが、S体にのみ薬理作用があると

* Mutsumi TAKAGI

1956年11月13日生

1981年大阪大学大学院工学研究科
醸酵工学専攻前期課程修了現在、大阪大学工学部、生物工学
国際交流センター、助手、工学博
士、培養工学

TEL 06-877-5111(内線3454)



いわれている。土壌から分離されたアシネトバクター細菌は、イブプロフェンのニトリル体のうちS体のみを加水分解しS-イブプロフェンを生成する立体選択的なニトリラーゼ酵素を有している。すなわち固定化したアシネトバクター細菌に基質であるラセミ体のニトリルを加えるとS-イブプロフェンを生成すると共に、R体のニトリルが残存する。このR体のニトリルは反応終了後にラセミ化して再利用できる。

基質ニトリルが水不溶性の油であるのに対して生成物のイブプロフェンが水溶性であること

が、この反応の特徴である。我々は、まずアルギン酸カルシウムゲルや κ -カラギーナンゲルに包括固定化した細菌を用いて反応を行ったところ、固定化しない細菌を用いた場合の反応率(77%)や生成したイブプロフェンの光学純度(99%e.e.以上)に比べて反応率が24%、光学純度が92%e.e.と非常に低下した。なお、光学純度とはこの場合、(S体-R体)/(S体+R体)の濃度比を百分率で表したものである。これに対して表面にDEAE基修飾して+荷電を導入し細胞が吸着しやすくしたCPBには、外表面だけでなく内部表面にも細菌が固定化されており(図1)、この固定化物を用いた反応では反応率、光学純度ともに高い値(74%、99%e.e.以上)が得られ、細菌のCPB担体からの漏れもほとんど認められなかった。ゲル中への包括固定化物の場合は、反応液本体とゲル中との間の物質移動速度が低いため未反応のR体ニトリルがゲル中に高濃度に蓄積し、ラセミ体ニトリルと反応する場合に比べて高頻度でR体ニトリルが酵素によって反応した結果、反応率だけでなく光学純度まで低くなったと考えられる。これに対してCPBへの吸着固定化では、担体内孔への油状ニトリルの出入りおよび水溶性イブプロフェンの排出の両方がスムーズに行われるために、反応率と光学純度がともに高くなったと考えられる³⁾。

3. 固定化肝細胞を用いた人工肝臓

微生物細胞によって抗生物質やアミノ酸を生産できるように、医薬品原料を動物細胞を用いて工業的に生産できる。しかし、動物細胞はそれだけではなく動物個体の持っているより高度な機能を一部代替できる可能性がある。体内の臓器はそれぞれが化学プラントにおける装置と見なすことができる。例えば、心臓はポンプ、肺はガス交換器、腎臓はろ過器の役割を果たしている。なかでも肝臓は100種類以上の反応を同時に行っているといわれており、それ自体を高度なバイオリアクターと考えることができる。そこで、外来の肝細胞を固定化して、肝機能を代替できるバイオリアクター(人工肝臓)を構築し、肝機能の低下した患者を救命することが

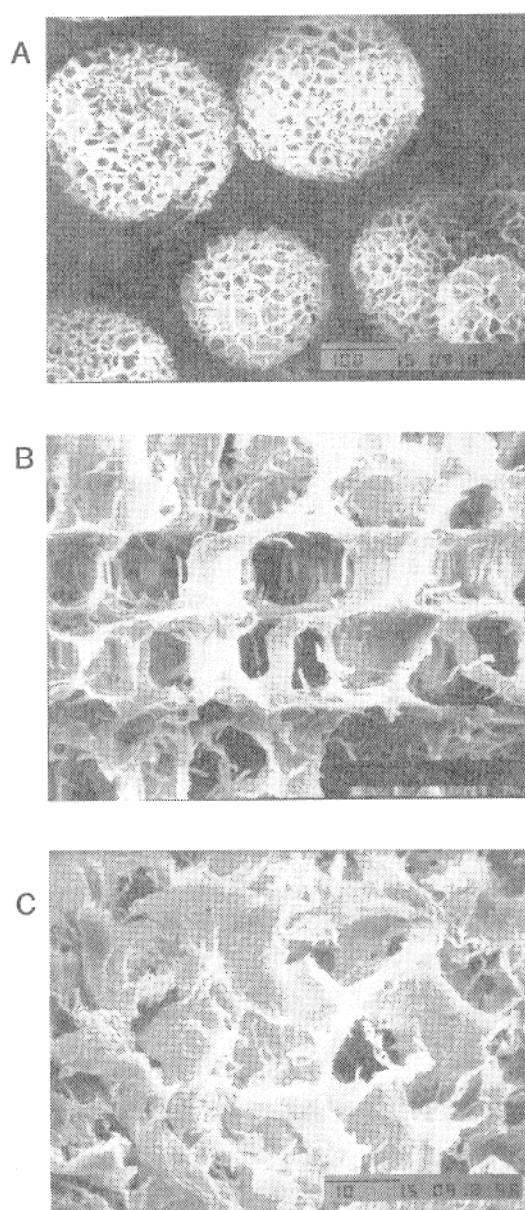


図1 セルロース多孔質粒子(CPB)を用いた細菌固定化物のSEM観察
A; 細菌固定化前のCPB
B; 細菌固定化後の外表面
C; 細菌固定化後のCPB内孔表面

考えられている。

葛西らはラットから分離した肝細胞を用い、表面をコラーゲンコートしたCPBに吸着固定化した細胞と通常のシャーレ底面に吸着した細胞についてそれらの形態と機能を比較している⁴⁾。その結果、シャーレ底面に吸着した細胞は扁平に伸展するのに対してCPBに吸着した細胞は球形を保っていた。また肝機能の代表としてアミノニア代謝速度はCPB上の細胞の方がシャーレ上の細胞に比べて2-3倍高かった。これはCPB上で細胞がボール状の立体構造をとるためであると彼らは考えている。

一般に、動物細胞の機能発現には細胞の量だけでなく、細胞の形態や細胞同士の位置関係が重要であるとされているが、CPBに固定化された細胞群は実際の臓器内での肝細胞の3次元的な配置をある程度模倣していると考えられることもできる。

4. お わ り に

細胞の固定化に用いることのできる多孔性担体としては、ここで挙げたセルロース多孔性粒子(CPB)以外にもウレタンフォーム、不織布、セルローススポンジなど種々ある。しかし、いづれの担体の場合にも孔径、粒径、形状、表面の改質などの検討を行うことによってより高度な細胞機能が発現されることが今後期待される。

参 考 文 献

- 1) 田中ら, バイオリアクター実験入門(学会出版センター), 1-43 (1992).
- 2) S. Park et. al., Biotech. Bioeng., 41, 25-34 (1993).
- 3) M. Takagi et. al., J. Ferment. Bioeng., 78, 191-193 (1994).
- 4) 葛西ら, 人工臓器, 22, 159-163 (1993).

