

次世代型培養装置の開発

石川周太郎

概 要

本開発では、pH、溶存酸素 (DO)、濁度の計測と、攪拌速度、通気速度、温度、培地のフィード速度の制御を行う機能を有し、さらに、①基質供給用とpH制御用タンクを本体にワンタッチで接続でき、かつ、②蛍光式DOセンサー、および蛍光式pHセンサーを装着した③50 mL小型容器という特徴を有する新規の培養装置開発を行った。さらに、④これらはすべてシングルユースであるため、洗浄や滅菌が不要である。開発した培養装置を用いてCHO細胞のFedバッチ培養および灌流培養を行った。

装置の概略

装置の外観を図1に示す。(A)：培養槽、基質供給用タンク、およびpH制御 (アルカリ供給) 用タンクを一体化したものである。(B)：底面の各機能を表示する。基質供給、アルカリ供給はシリンジで行うが、その駆動には空気圧を用いる。エアーノズルは空気が供給されるノズルである。センサーエリア、サンプリング部は、一体化された容器を培養装置側に接続すると、すべての機

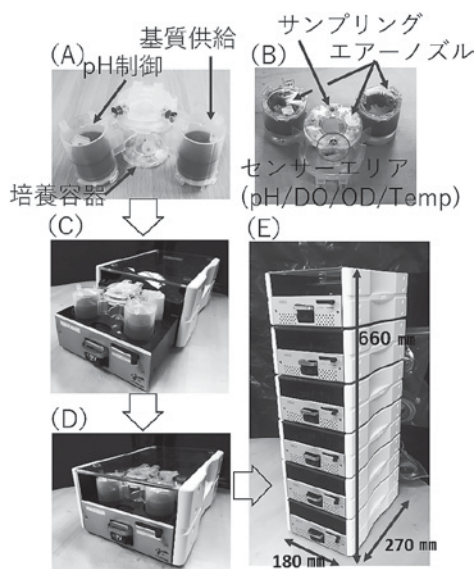


図1. 開発した培養装置概要。(A) 培養容器の構成、(B) 培養容器裏面形状、(C, D, E) 6台積層ユニット。

構が自動的に接続される。全体をラックに入れた状態 (C, D) で、これを6段に積層することが可能である (E)。

開発要素技術とその特性

本培養装置の開発のために、シングルユースセンサー (DO, pH)、濁度計測システムなどの、さまざまな要素技術開発を行ったが、本稿では、①新規フィードシステム、②濁度計測システム、③蛍光式pHセンサーについて、その特性を紹介する。

①新規フィードシステム 図2に新規に開発を行ったフィードシステムの構成と、フィード操作によるシリンジ位置と天秤重量の変化の様子を示す。タンクはシリンジタイプであり、タンクに満たされた供給フィード液は、エアーにより上昇するシリンジに押し出され、培養容器に供給される。シリンジの位置が位置センサーにより測定されることでフィード供給量が推定され、この値を用いて供給速度が制御される。シリンジ位置センサーにより計測されるシリンジ位置と天秤重量に相関が得られたことから、従来の天秤を用いる重量によるフィード方法と同等の性能が得られると判断された。新規フィードシステムは、従来の培養装置での天秤を代替することができるため、天秤の設置スペースを削減でき、かつ、

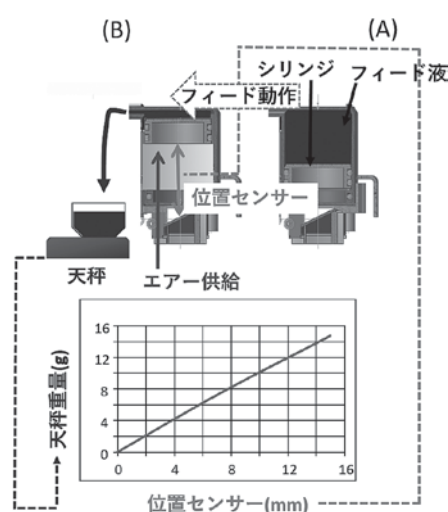


図2. フィード動作時の位置センサーと天秤重量の変化。(A) タンクに充填されたフィード液が(B) フィード動作により、供給される。フィード動作はエアー駆動されるシリンジにより実施される。

装置へのワンタッチ接続を可能にした。さらに、アルカリタンクでも同様の方法にて供給を行い、pHを制御できる。

②濁度計測システム 培養液中の濁度の変化は、細胞数の増加と高い相関性を得られる。小スケールでのスクリーニングを目的とした培養では、培養状況の把握のため、生存率の高い増殖期の変化を常時モニターすることは重要である。さらに、高い生存率を維持したまま新鮮な培地を供給する連続培養においては、本機能を用いることで、細胞数の最適化を検討することができる。図3に開発したシステムの概要を示す。

下記に特徴を述べる。

- ・装置に発光部と受光部が設置されているため、プローブなどの培養容器内への設置が不要
- ・オンライン計測が可能
- ・設置位置の工夫により外乱光の影響を受けにくい。

図4にCHO細胞培養時の、生細胞密度と濁度値の相関を示す。高い相関係数が得られている。ただし、本データは、生存率が95%以上の細胞増殖期（培養6日目まで）のものであり、死滅期のデータは除いている。死滅期には死細胞も含めて計測されるため、相関性が低下する。

③蛍光式pHセンサー 培養装置において、pHセンサーは、培養槽内のpHを最適に制御するために欠かせない機能である。しかし、一般的な複合電極センサー

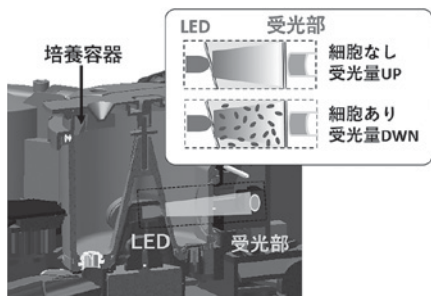
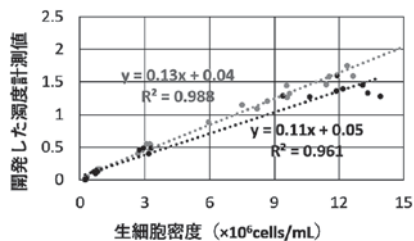


図3. 濁度計測システム概要



主な培養条件：攪拌速度120 rpm、通気速度1.0 mL/min、温度37°C、pH 7.1、フィード液は、5日目から0.05 mL/Hrで供給。

図4. 生存率が95%以上での生細胞密度（培養6日目まで）と濁度計測値

はガラス製であり、構造が複雑なため、シングルユースへの適応が困難である。そこで、シングルユース化が可能な新たなpHセンサーの開発を行い、基本的な特性評価を実施した。図5にガラス式センサーと蛍光式センサーの性能比較を示す。蛍光式pHセンサーは、pHに応答する色素を合成することで作製されるが、合成プロセスが単純で、かつ、安価な材料を用いることを特徴としている。測定原理は、2波長の励起光による蛍光強度の比（ratio）がpHに相関していることである。

CHO細胞培養結果（Fedバッチ培養）

①従来型培養装置（2.0 L）との比較 開発した培養装置を用い、CHO細胞の培養を行った。攪拌速度80 rpm、通気速度1.0 mL/min、温度37°C、pHは7.0に制御した。フィード液は、5日目から0.05 mL/hrで供給した。培養に使用した細胞、培養液、フィード液は、それぞれ、高い抗体生産を目的としたMAB（次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）の開発品である。培養液お

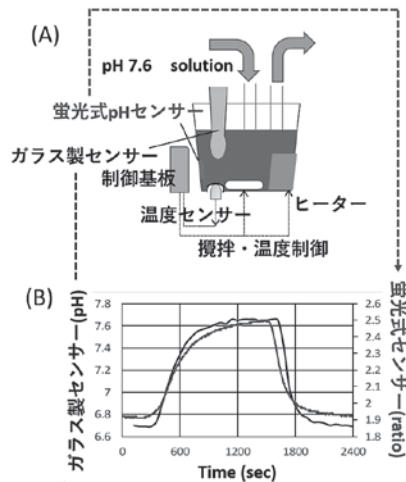


図5. ガラス製センサーと蛍光式センサーの性能比較。(A) PHセンサー性能測定システム (B) ガラスセンサーと蛍光式センサーでの性能比較。

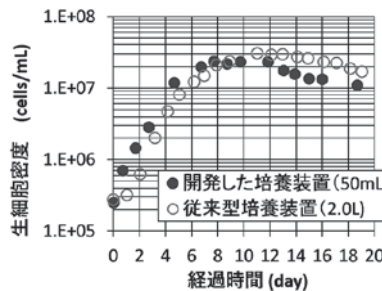


図6. 開発した培養装置と従来型培養装置でのCHO細胞の生細胞密度推移

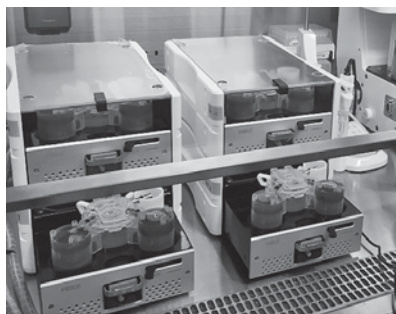


図7. 同等性評価試験中の培養装置4台

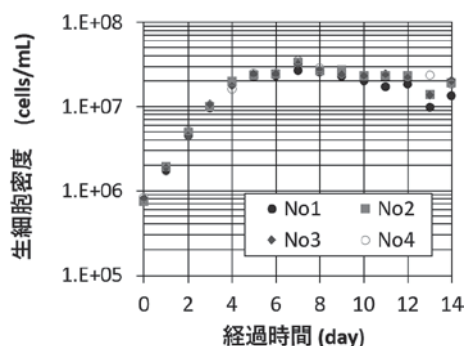


図8. 開発した培養装置4台を用いた同等性評価

よび生細胞数の変化を図6に示す。同様の条件で培養を行った従来型2.0 L（エイブル製BCP）を使用した培養結果と同様の結果を得られた。

②開発品4台の同等性評価 同等性評価のため、開発した培養装置を4台用い、CHO細胞培養を行った(図7)。攪拌速度120 rpm、通気速度0.5 mL/min、温度37°C、pHは7.2に制御した。フィード液は、5日目から0.05 mL/hrで供給した。生細胞数の変化を図8に示す。さらに、4台の培養の同等性を評価するため、島津製作所製液体クロマトグラフ質量分析計LCMS-8060を用いて、96成分の濃度の培養中の推移を測定し、それぞれの培養装置ごとの相関係数(図9)を求めたところ、4台の培養装置で高い相関係数を得られた。

CHO細胞灌流培養結果

開発した培養装置を灌流培養可能な構造に改良し、Fedバッチ培養同様の条件で細胞培養を行った。灌流培養を実施するための細胞と培養液の分離には、沈殿管を用いた細胞沈降法を採用した。開発装置(50 mL)は、従来の培養装置(2.0 L)に比べ、使用する培養液量を大幅に低減できるため、Fedバッチ同様に、培養条件の検討に大変有利となる。図10に、灌流培養とFedバッチ

| | No 1 | No 2 | No 3 | No 4 |
|------|-------|-------|-------|-------|
| No 1 | | 0.976 | 0.953 | 0.988 |
| No 2 | 0.976 | | 0.970 | 0.991 |
| No 3 | 0.953 | 0.970 | | 0.980 |
| No 4 | 0.988 | 0.991 | 0.980 | |

図9. 培養中の濃度(96成分)の各装置間の相関係数

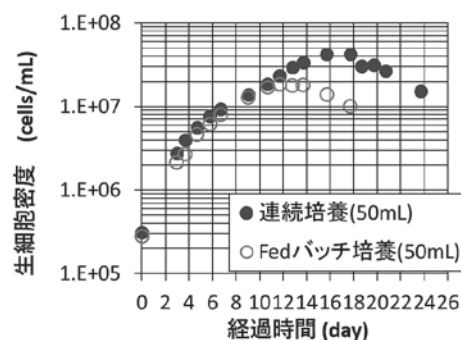


図10. 開発した培養装置を用いたFedバッチ培養と連続培養でのCHO細胞の生細胞密度推移

チ培養での生細胞密度の推移を示す。灌流培養では、高密度かつ長期間の培養を達成することができた。

今後の展望

本開発では、ユーザーが簡単にCHO細胞のリアクター培養を可能にすることを目的とし、センサーを含めたシングルユース化、ワンタッチ接続による煩雑な作業の削減、などを可能にした。今後、これらの要素技術を生かして、①スケラブルな培養装置の開発、また、②小スケールで、灌流培養の培養条件の検討を可能とする培養装置の開発を行う。

謝 辞

本研究の一部は、経済産業省の「平成25年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発(国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術)」及び「平成26年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業(国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術)」、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の課題番号(JP18ae0101057)の支援によって行われた。