



安定した細胞灌流培養の実現に向けた インライン細胞遠心分離システムの開発

杉内研究室

20NA134 堤 舜



研究背景 -灌流培養への期待-

- ✓ 再生医療
- ✓ 抗体医薬品生産

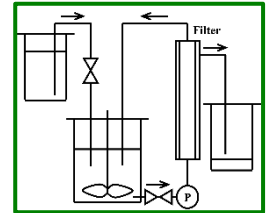


安定かつ効率的な動物細胞培養の要求

■ 培養中に培地の交換を行う **灌流培養** に期待

フィルターによる灌流培養（従来の方法）

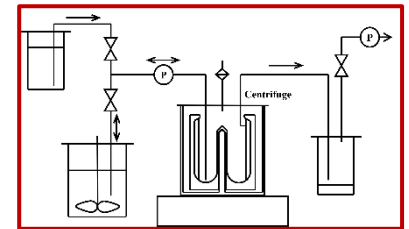
⇒ 目詰まりのリスクで長期の安定培養は難しい



遠心分離による灌流培養

⇒ 長期の安定培養の可能性

分離性能の調整が容易で汎用性が高い





研究背景 -遠心分離による灌流培養の課題-

■ 遠心分離による灌流培養は研究例がほぼない

- ✓ 研究レベルで灌流培養に使用できる小型遠心分離システムがない
- ✓ フィルターを用いた灌流培養の成功例が早くに出ており、
そちらに研究が集中

◆ 遠心分離による細胞灌流培養は実用化に至っていない

□ 灌流培養可能な小型遠心分離システム開発の必要性

- ✓ 研究レベルで使用可能
- ✓ 小型システムそのものに、スケールアップ前の抗体医薬品生産や
将来の再生医療の現場で需要期待



研究目的

最終目標

- 遠心分離による安定的な細胞灌流培養の実用化

本研究の目的

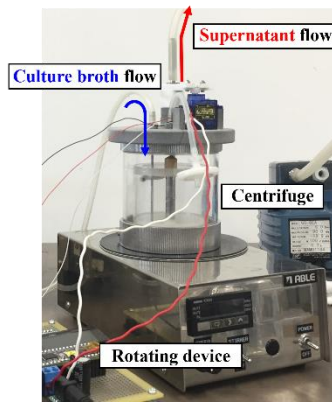
- ✓ 実用的な小型遠心分離機による細胞灌流培養システムの開発

研究内容

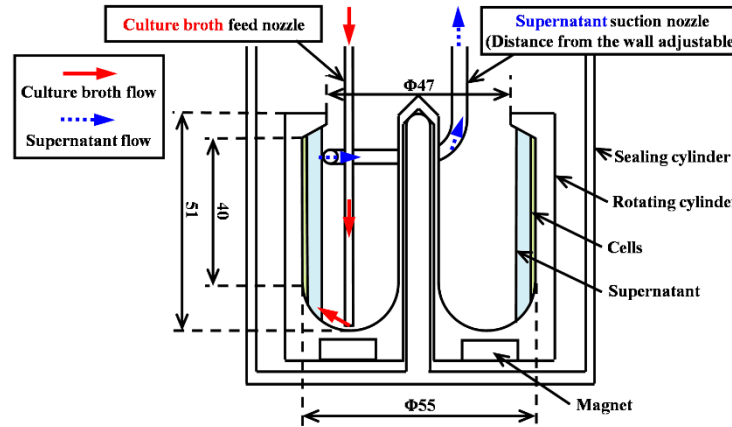
- ◆ 灌流培養システム構築
- ◆ 培地交換プロセスの自動化
- ◆ 分離機内保持液量の計測・制御
- ◆ 遠心分離実験によるシステムの成立性検証

開発した遠心分離機

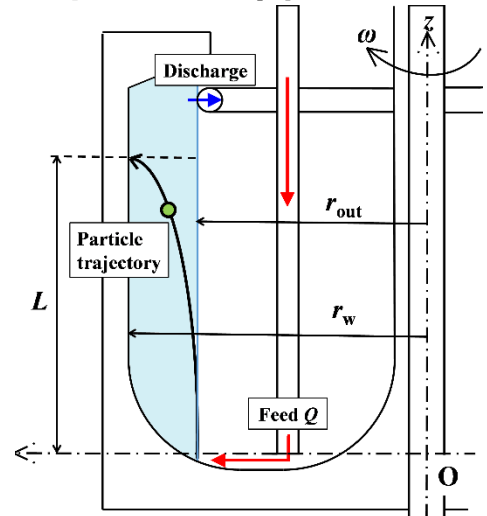
試作機外観



本体断面図の概略



細胞の沈降イメージ



- ✓ 基本的には、遠心力 [G] × 時間 [s] が分離性能を決定づける
 - 基礎理論に基づき、動物細胞の比重や径から概算すれば、開発遠心分離機は十分な分離性能を確保できる設計

- 上清は真空ポンプを用いてノズルから空気と共に吸い取る
- 上清排出ノズルの位置はサーボモータによって調整可能



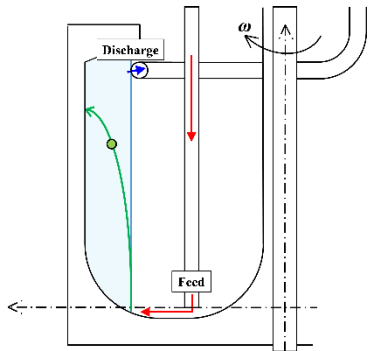
- ◆ 分離機内の保持液量が調整可能
- ◆ 連続運転・バッチ運転どちらも可能

連続運転とバッチ運転の違い

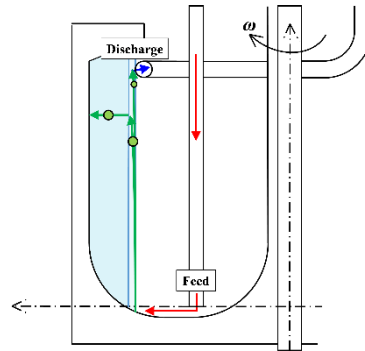
◆ 連続運転

■ 処理液の注入と上清の排出を同時に行う

理想的な沈降パターン



表層を滑るパターン

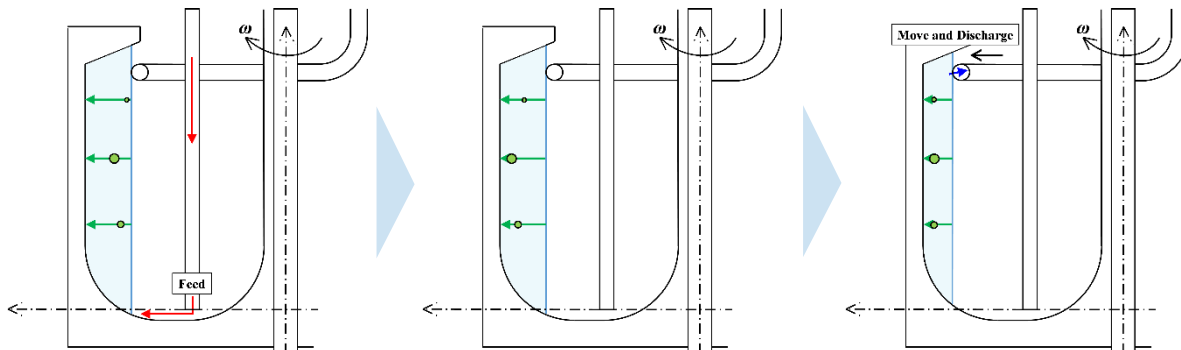


本研究はこちらを対象

- 灌流培養用途では、時間効率の点から理想的
- 軸方向流速が自由表面付近のみに発生することで粒子が表層を滑り、シビアな分離性能は実現できない可能性
 - 連続注排出タイプの既存遠心分離機で実験・数値解析による指摘あり

◆ バッチ運転

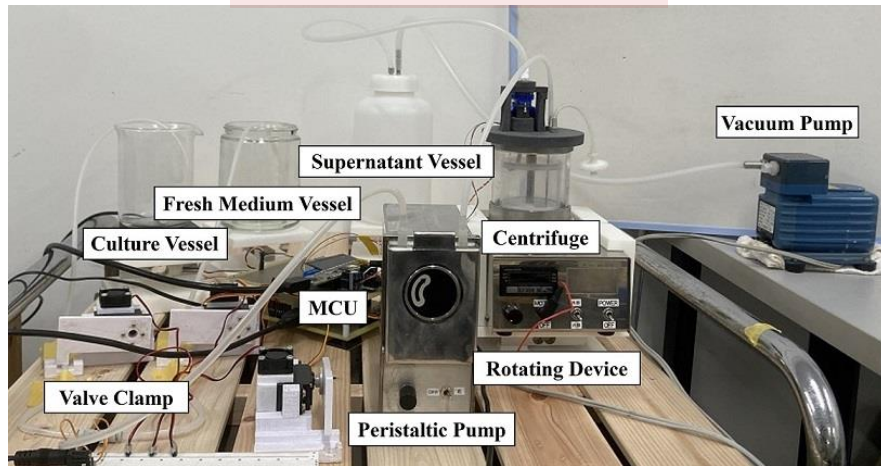
■ 処理液を注入後、一定時間待機してから上清の排出を行う



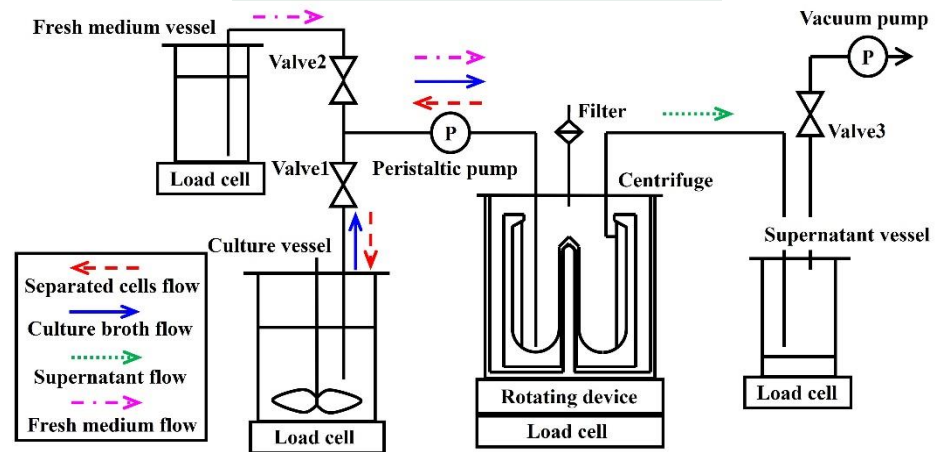
- 原理的には、待機時間の調整で比重差の非常に小さい対象でも分離可能
- 灌流培養用途では、運転時間効率の点がデメリット

開発した灌流培養システム

試作システム外観



システム構成の概略



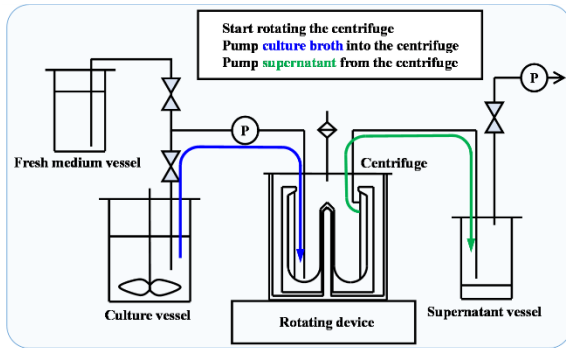
- 卓上スケール（数100[ml]～数[L]）の培養装置への適用を想定
- 培養液や新鮮培地はチューブポンプによって輸送
- 各槽（と分離機本体）の液量はロードセルによって管理



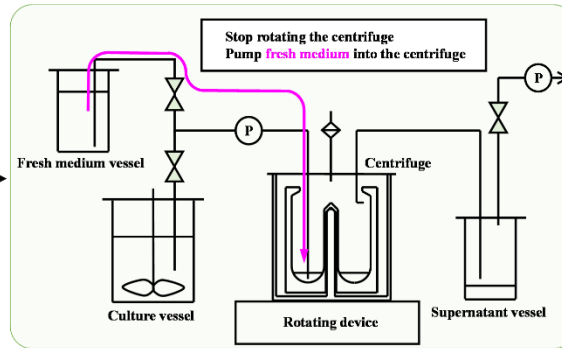
培地交換プロセス

培地交換プロセスの流れ (連続運転)

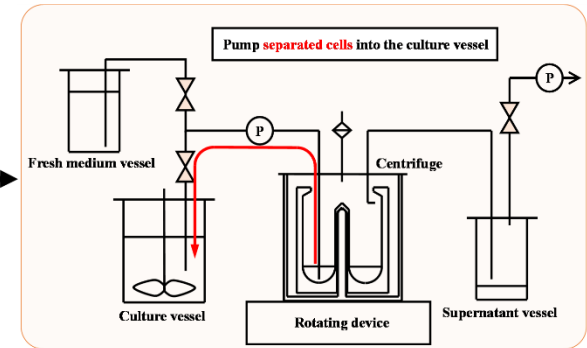
➤ 指定量の培養液を遠心分離



➤ 新鮮培地注入



➤ 培地交換後の液を返送



Wait

➤ 指定時間だけ待機

◆ 実用上は、オペレータの負担軽減のために培地交換の自動化が必要



培地交換の自動化 -提案手法-

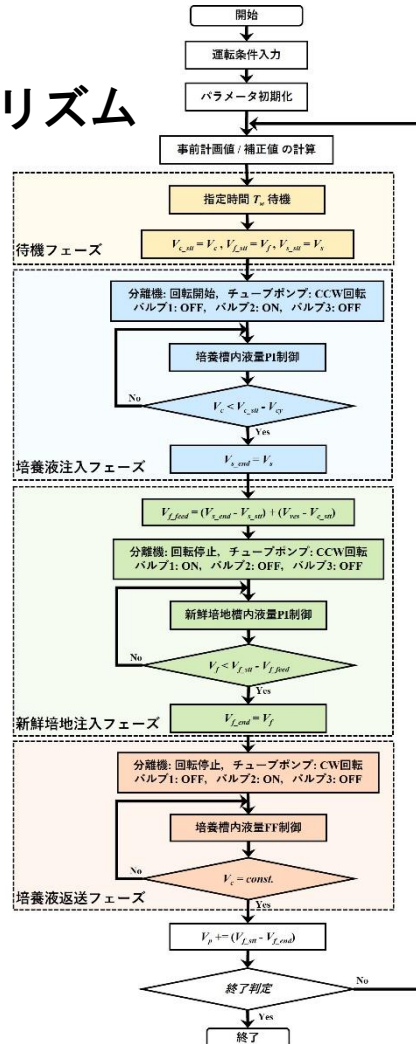
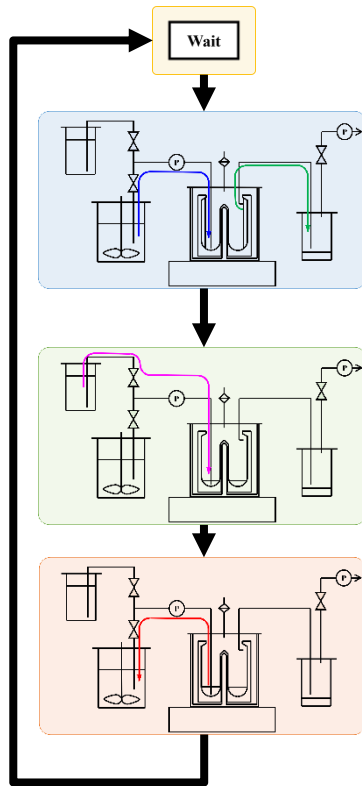
培地交換プロセスの自動化アルゴリズム

待機フェーズ

遠心分離フェーズ

新鮮培地注入フェーズ

返送フェーズ



✓ 培地交換プロセスは各槽の液量と経過時間をもとにシーケンス制御によって管理される

✓ 入力パラメータ

- ◆ 培養槽サイズ
- ◆ 灌流速度
- ◆ 分離機回転数
- ◆ 注排出流量
- ◆ 1サイクル処理時間
- ◆ 分離機内保持液量

✓ 計測パラメータ

- ◆ 各槽の液量
- ◆ 経過時間

✓ 入力値から算出
✓ 計測値からサイクル毎に補正

- ◆ 1サイクル処理量
- ◆ 新鮮培地注入量
- ◆ 待機時間



培地交換の自動化 -実験-

■ 水を用いて培地交換アルゴリズムの動作検証実験を実施

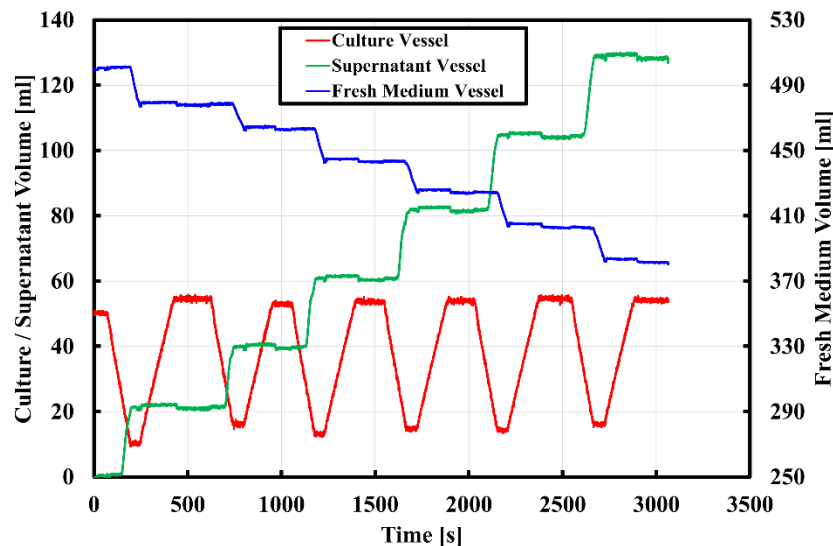
◆ 注排出流量	19 ml/min
◆ 培養槽液量	50 ml
◆ 灌流速度	70 vessel/day
◆ 1サイクル処理時間	5 min

※ 上清排出ノズルの位置は固定

※ 実用上の想定条件とは異なるが、培地交換動作としては待機時間以外に大きな違いはない

■ 結果

各液槽の液量時間履歴



✓ 適切に培地交換プロセスが実行されていることを確認



分離機内液量の計測・制御 -アプローチ-

- 上清排出ノズル位置の制御によって分離機内保持液量を調整可能
 - しかし、ガタや寸法・組付け誤差等の影響から、設計値のみでの調整は難しい



◆ 分離機内保持液量を計測する必要性

□ 提案する計測アプローチ

- 直接計測（分離機本体へのロードセル設置など）ができない場合

- 培養槽と上清槽の液量を利用した間接計測

- ◆ サイクル毎の計測・制御（手法A）

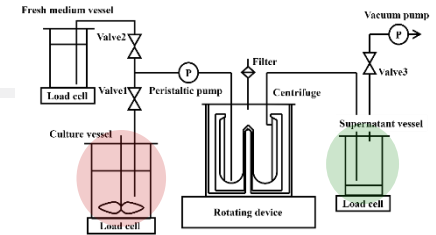
- ◆ リアルタイムの計測（手法B）

- 直接計測ができる場合

- カルマンフィルタの枠組みを利用して計測

- ◆ リアルタイムの計測（手法C）

分離機内液量の計測・制御 -手法A-



◆ サイクル毎の間接的な計測

- 分離前後の培養槽と上清槽の液量を利用して分離機内液量を推定

$$V_{cen} = (V_{c_stt} - V_{c_end}) + (V_{s_stt} - V_{s_end}) - V_{tube_c}$$

※ 分離後の上清槽の液量は、分離終了後一定時間待ってから取得

➢ 上清排出ノズル-上清槽間のチューブ内の液を全て上清槽へ

◆ サイクル毎の間接的な計測値を用いた制御

- 分離機内液量を計画値と一致させるために、サイクル毎に計測値を用いてノズル位置目標値（サーボ目標角）を更新

$$\theta_{ref}^{(n+1)} = \theta_{ref}^{(n)} - k(V_{cen}^{(n)} - V_{cen_ref})$$

※サーボ角度と分離機内液量の関係を線形近似してNewton法を適用

$$\theta = kV_{cen} + \theta_{wall}$$



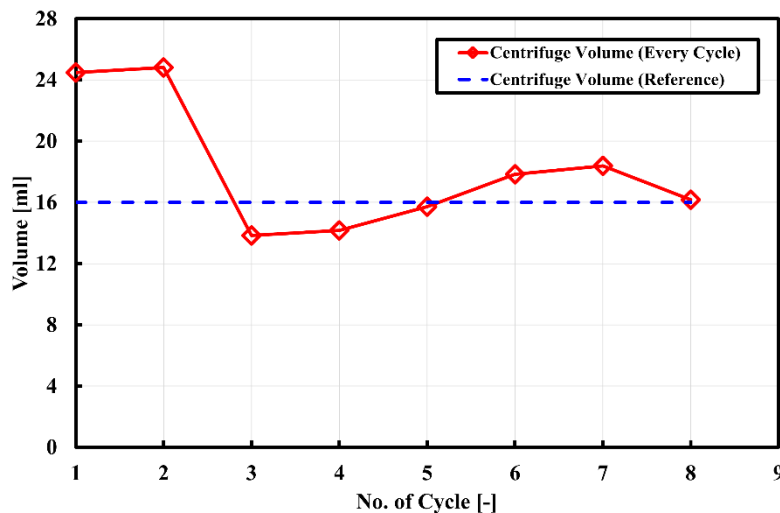
分離機内液量の計測・制御 -手法Aの実験-

- 水を用いて手法A（サイクル毎の間接的な計測・制御）の動作検証実験を実施

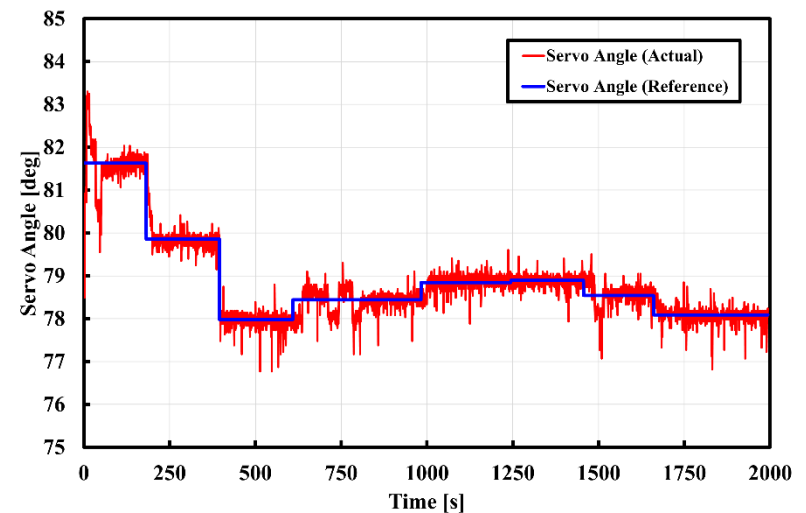
※ 運転条件は、培地交換アルゴリズムの動作検証のときとほぼ同じ

■ 結果

分離機内液量のサイクル毎収束履歴

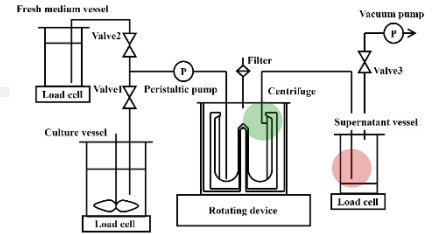


ノズル移動用サーボ角の時間履歴



- ✓ 数サイクル程度でほぼ目標値へ収束することを確認
- ✓ ただし、ロードセルのノイズ等の影響で計測値が±1ml程度揺れるため、目標値の更新も揺れる

分離機内液量の計測 -手法B-



◆ リアルタイムの間接的な計測

- 上清槽への流入流量が一定時刻前の上清排出ノズルへの流入流量と等しいとして，上清排出ノズル-上清槽間のチューブ内液量を推定

$$V_{tube_s}(t) = \int_0^t (Q_n - Q_s) d\tau \approx \int_0^t (Q_n(\tau) - Q_n(\tau - T_L)) d\tau$$

- 上清排出ノズルへの流入流量は，分離機への注入流量とノズル移動速度（サーボ角速度）から決定

$$Q_n = Q_c + \frac{dV_{cen}}{d\theta_m} \dot{\theta}_m \approx Q_c + \frac{\dot{\theta}_m}{k}$$

※サーボ角度と分離機内液量の関係を線形近似

$$\theta = kV_{cen} + \theta_{wall}$$

- 最終的に，培養槽・上清槽・チューブ内の液量を用いて分離機内液量を推定

$$V_{cen}(t) = (V_{c_stt} + V_{s_stt} - V_{tube_c}) - (V_c(t) + V_s(t) + V_{tube_s}(t))$$

※一定値

※リアルタイムに変化する値



分離機内液量の計測 -手法C-

◆ カルマンフィルタによる計測

■ 分離機本体へのロードセル設置などによって直接計測もできる場合,

✓ 状態変数 $\mathbf{x} = [V_c, V_s, V_{tube_s}, V'_{cen}]^T$

- ◆ 培養槽液量 V_c
- ◆ 上清槽液量 V_s
- ◆ チューブ内液量 V_{tube_s}
- ◆ 分離機内液量 V'_{cen}

✓ 観測量 $\mathbf{y} = [V_c, V_s, V'_{cen}]^T$

- ◆ 培養槽液量 V_c
- ◆ 上清槽液量 V_s
- ◆ 分離機内液量 V'_{cen}

✓ 入力変数 $\mathbf{u} = [Q_c, Q_n, Q_s]^T$

- ◆ 分離機への注入流量 Q_c
- ◆ 排出ノズルへの流入流量 Q_n
- ◆ 上清槽への流入流量 Q_s

※ $V'_{cen} = V_{cen} - (V_{c_stt} + V_{s_stt} - V_{tube_c})$

$$\mathbf{x}_{k+1} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ -1 & -1 & -1 & 0 \end{bmatrix} \mathbf{x}_k + \begin{bmatrix} T_s & 0 & 0 \\ 0 & 0 & T_s \\ 0 & T_s & -T_s \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \mathbf{u}_k + \mathbf{v}_k$$

$$\mathbf{y}_k = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \mathbf{x}_k + \mathbf{w}_k$$

とした線形時不変システムに対してカルマンフィルタを適用して, 分離機内液量を推定

分離機内液量の計測 -手法Bと手法Cの実験-

■ 水を用いて手法Bと手法C（リアルタイムの計測）の動作検証実験を実施

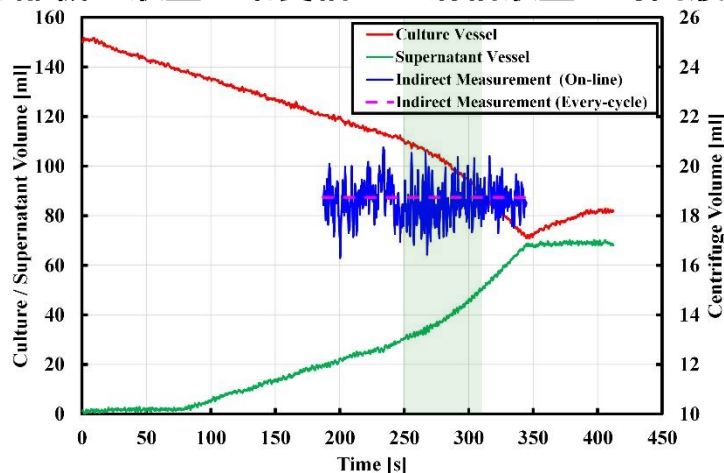
- ◆ 条件.1 分離機への注入流量のみを，60秒間で 10 ml/min から 30 ml/min にランプ変化
- ◆ 条件.2 ノズル移動用サーボ角のみを，60秒間で 169 deg から 179 deg にランプ変化

■ 結果

※ 推定周期 20 ms

条件.1

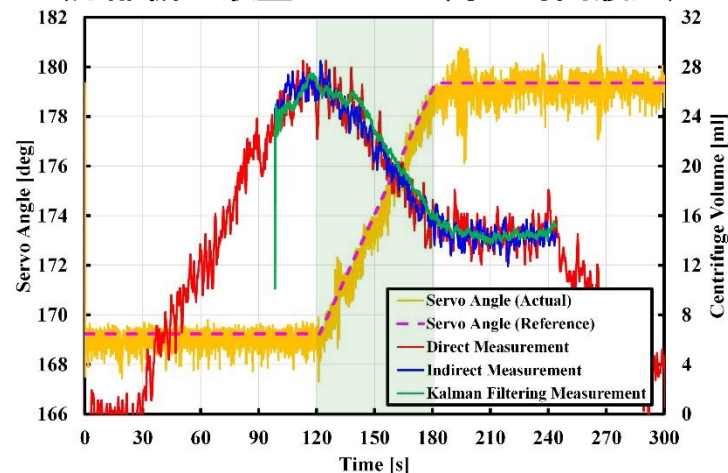
(分離機内液量と培養槽・上清槽液量の時間履歴)



- ✓ ±1~2ml 程度の揺れはあるが，サイクル毎の間接計測値とリアルタイムの間接計測値はおおよそ同等

条件.2

(分離機内液量とサーボ角の時間履歴)



- ✓ 直接計測値，間接計測値，カルマンフィルタによる計測値はおおよそ同等であり，相補的に妥当性確認
- ✓ カルマンフィルタにより安定した計測を実現



1 サイクル分の細胞生存率・分離性能評価

■ CHO細胞を用いて1サイクル分の遠心分離実験を実施

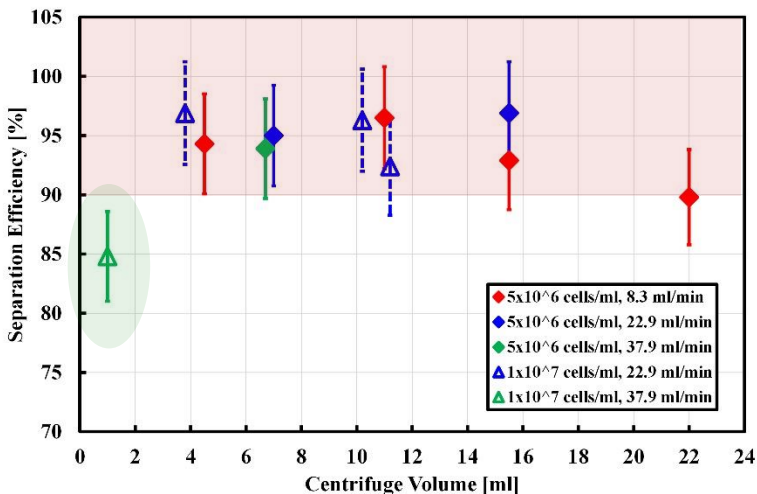
※ 細胞濃度は 5×10^6 or 1×10^7 cells/ml

※ 分離機回転数・注入流量・分離機内液量をパラメータにして実験。新鮮培地の投入や返送は無し。

※ トリパンブルー染色を行ってから血球計算盤を用いて目視で細胞計数し、細胞濃度を算出

■ 結果

分離効率の測定結果 (回転数 2000 rpm)



$$\text{生存率} = \frac{\text{生細胞濃度}}{\text{総細胞濃度}}$$

$$\text{分離効率} = \frac{(\text{分離後の})\text{分離機内生細胞濃度} \times \text{分離機内液量}}{(\text{分離前の})\text{処理液の生細胞濃度} \times \text{処理液量}}$$

- ✓ 分離効率は、**ほぼ 90 %以上を確保**
- ✓ 本実験の範囲では、**流量への依存性はほぼなし**
- ✓ 分離機内保持液量が非常に小さい場合、**安定した沈降領域を確保できず分離効率低下?**

✓ 回転数2000 rpm, **流量37.9 ml/min以下では、統計的に有意な生存率低下はみられない ($p > 0.3$)**

※ t検定による片側検定



複数サイクル分の分離性能評価

■ ドライイーストを用いて複数サイクル分の遠心分離実験を実施

※ 細胞濃度 1×10^7 cells/ml, 分離機回転数 2000 rpm, 注入流量 20 ml/min

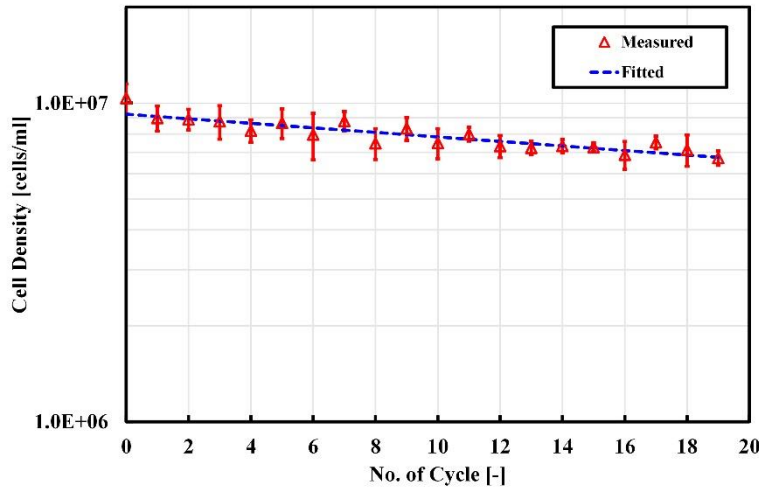
※ 開発した自動培地交換システムによって運転

※ メチレンブルー染色を行ってから顕微画像解析装置 (Countstar) を用いて細胞計数し, 細胞濃度を算出

※ イースト細胞の径 (約 $6\mu\text{m}$) はCHO細胞の径 (約 $12\mu\text{m}$) の半分程度. 分離性能評価としては安全側.

■ 結果

培養槽内の細胞濃度のサイクル履歴



$$M^{(n+1)} = M^{(n)} \left[1 - (1 - \eta) \frac{V_{cy} - V_{other}}{V_{ves}} \right]$$

■ サイクル毎の遠心分離による細胞ロスを定式化

$$\ln M^{(n)} = \ln M^{(0)} + Kn$$

■ 細胞濃度のサイクル履歴データでフィッティング

$$K = \ln \left[1 - (1 - \eta) \frac{V_{cy} - V_{other}}{V_{ves}} \right]$$

■ フィッティングされた K から分離効率 η を算出

✓ 分離効率 $\eta = 86.1 \pm 2.8$ [%]

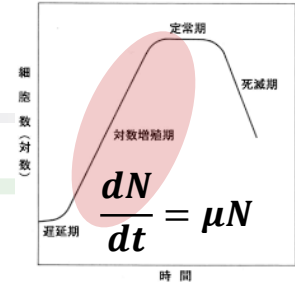


システムの成立性評価

■ 開発した灌流培養システムの成立性を簡易評価

※ 対数増殖期の培養過程について考える

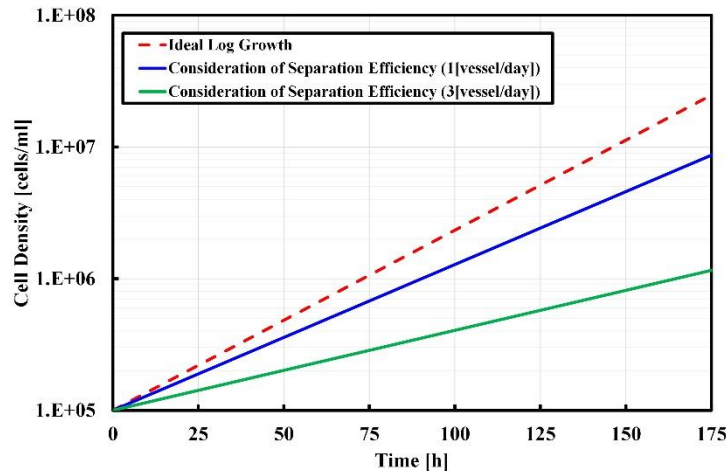
※ 倍加速度は培養環境によらず一定と仮定し、培地交換1サイクルの時間周期ごとに、分離効率と処理液量に従って細胞をロスさせる計算を繰り返す



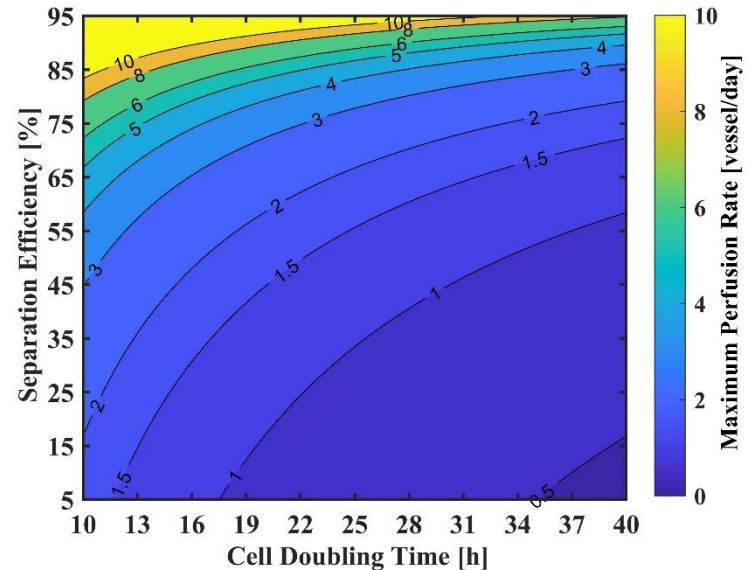
■ 結果

細胞増殖の時間履歴

(培養槽サイズ I L, 分離効率 86%, 細胞倍加時間 22 h)



細胞増殖を阻害しない灌流速度の上限マップ



✓ 遠心分離実験の結果も踏まえると、想定環境では細胞濃度の増加を大きく阻害することはない

✓ 要求仕様である 3 vessel/day 程度は十分に実現可能

✓ 5 vessel/day を超える場合、現状の性能ではやや不十分



まとめと今後の課題

- 実用的な小型遠心分離機による細胞灌流培養システムの構築
- 培地交換自動化アルゴリズムの開発と検証
- 分離機内液量の計測・制御手法の開発と検証
- CHO細胞を用いた1サイクル分の性能評価
- ドライイーストを用いた複数サイクル分の性能評価
- システムとしての成立性評価

今後の課題

- ◆ バッチ運転手法の開発・評価
- ◆ 自動培養装置との連携
- ◆ 開発分離機内部の流れ場把握
- ◆ 灌流培養試験

□ 遠心分離による安定した細胞灌流培養の実用化へ