

T121

高効率上下動攪拌培養装置” VMF Rector “の開発と製品化

○(佐竹化学) (正)加藤好一*・(法)金森久幸・(法)丹生徳行・(理研) 植木雅志・(愛媛大)加藤英政

1. はじめに

ラボレベルでの細胞培養では、主に細胞培養ディッシュ等の2D 培養（静置培養）や、小容量の揺動フラスコ、ウェーブ・バッグ、回転式培養装置等による3D 浮遊培養装置が用いられているが、生産性や効率を重要視しない研究段階では、これらの培養装置に対する問題は生じていない。一方、動物細胞を用いたバイオ医薬品生産や、取分け再生医療における iPS 細胞培養等の産業化を図る上では、安定した品質の生産物が大量に得られる3D 浮遊培養装置が求められる¹⁾。この産業化という視点から、小スケールから大スケールまで、安定した生産を実現し得るスケラブル攪拌培養装置を開発・上市するためには、従来の培養装置の概念を見直し、用途に適した作用について培養（Wet）と計算（Dry）の相関関係を丹念に検討することで、培養槽内において細胞が受ける物理的作用と培養結果との相関関係を明らかにすることが肝要である。

我々は、従来からの培養装置の問題を明らかにし、細胞培養に適した上下動攪拌培養装置“VMF リアクター”を開発した(図1)。ここ最近、動物細胞培養から iPS 細胞分化誘導培養まで、実用面での成果も得られつつあり、公開可能なこれらの取り組みについて紹介する。



図1 VMF リアクター

2. 各種培養装置の特徴と課題

ラボレベルで通常用いられる2D 培養（静置培養）は、商用生産を目指す大量培養に適さないことから、産業化を目的とした3D 浮遊培養装置が必要不可欠となる。従来の3D 浮遊培養装置では、ウェーブや揺動方式でのスケールアップが困難であることから、回転式攪拌培養装置が多用されているが、攪拌翼の回転数制御のみで混合作用と剪断作用をコントロールすることは非常に困難である。ここに、効率化を目指す産業化の面で、回転式攪拌培養装置の限界が存在する。回転式攪拌培養装置による、白血病細胞株 HL60 (Human promyelocytic leukemia cells) のバッチ培養結果を図2に示す。

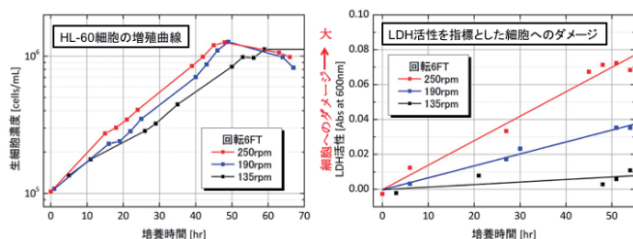


図2 HL60細胞を用いた回転式培養装置の培養評価

また、図3に CFD による本培養における培養槽内の剪断応力分布を示す。実測物性値・細胞条件を網羅した固-液混相流解析結果である。

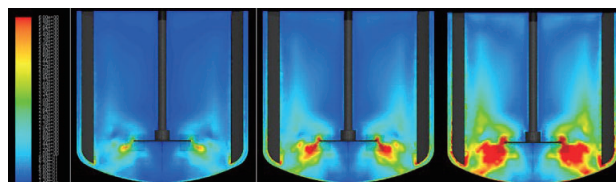


図3 回転式攪拌培養装置の剪断応力分布

回転数が増すに従い、翼近傍における剪断応力が高くなると共に、槽内全体の剪断応力分布のバラつきが著しくなることが分かる。一方、ダメージを抑制するために回転数を低くすると、培養槽内の流動性能は低下し、細胞や DO の不均一が生じるなど、攪拌培養装置としての根本的な機能に障害が生じる。このことから、回転式攪拌培養装置では、回転数を「速くするか」「遅くするか」でしか培養状態を制御することができない点が、効率的な攪拌培養装置の開発・製品化に向けた課題であるといえる。この様な培養検討を繰り返した結果、回転式攪拌培養装置の限界が示唆された。²⁾

本要旨では省略するが、この他、物理的諸量も算出・把握しており、培養目的に対する回転式攪拌培養装置による培養コントロールの困難さを把握した。

3. 高効率攪拌培養装置・上下動攪拌培養装置の開発

前述の通り、回転式攪拌培養装置を最適化しても、より繊細な培養目的に対して完全とは言えない。そこで、培養に適した槽内環境を生み出す装置自体の開発に着手した。2010年に上下往復動式の攪拌方式 VMOVE ミキサー[®]として基本装置開発を行い、2011年～2014年に理化学研究所と“動物細胞培養研究チーム”を結成、産官融合連携共同研究を進め、2014年に VMF リアクターとして開発に至った。³⁾ 図4に VMF リアクターのフローパターンを示す。

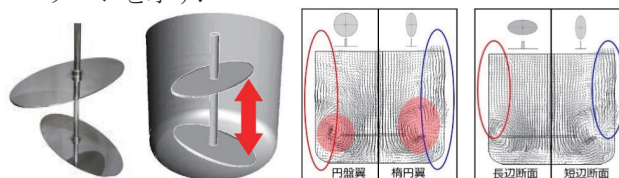


図4 VMF リアクターフローパターン (PTV 流動解析)

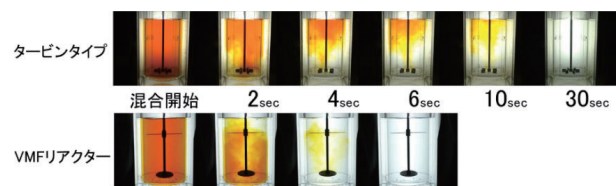
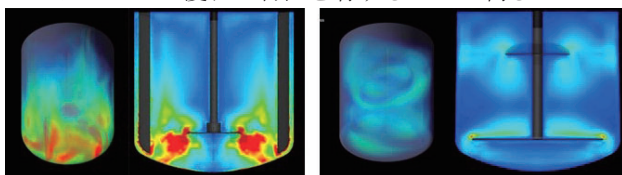


図5 混合テスト比較結果

図4に示す通り、ピッチ付き楕円型インペラを上下往復動させ、図5に示す通り極めて高い混合性能を発揮する。何より、従来の回転式と比べ、図6に示す通り剪断作用が極めて低く、剪断性に弱い細胞を扱うバイオリアクターとして優れた特性を有することが判る。



回転式バイオリアクター VMF リアクター(非定常解析)
図6 CFD シミュレーション結果 (剪断応力)

4. 用途別研究・開発と製品化

動物細胞培養, iPS 細胞培養等, 用途別にて装置の最適化・開発・製品化を行った。

図7に, CHO-S 細胞を用いた培養結果を示す。回転式攪拌培養装置に対し, 上下動式攪拌培養装置の培養結果が優れていることが判る。

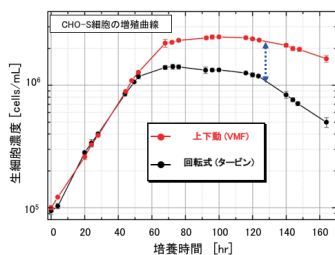


図7 CHO-S 細胞培養結果

動物細胞培養に適していることは把握したが, 高密度培養における酸素供給面で課題を抱えていた。そこで, 日揮(株)との共同開発により, 同社が宮崎県工業技術センターと共同開発したマイクロバブルを発生する“SPG 膜スパージャー”を組み込んだ新型培養装置“VerSus リアクター®”として開発し, 2015年に実用化・製品販売を開始した。⁴⁾

他方, VMF リアクターの特性は, 剪断性を極端に嫌う iPS 細胞の未分化培養, 分化誘導培養に適していることから, 2015年より愛媛大学/理化学研究所と共同開発により, iPS 細胞分化誘導効率向上の研究と, 同分化誘導培養装置の開発に着手した。iPS 細胞培養に適した環境を把握すべく, 丹念に CFD シミュレーションと, 分化誘導効率・スフィアの径・バラつき・合一状況との因果関係を探り, 結果として iPS 細胞分化誘導効率の向上を果たした。図8に iPS 細胞分化誘導培養装置“HiD4×4”を, 図9に CFD シミュレーションの一例を, 図10に培養日数ごとの iPS 細胞と, 外肺葉(神経系)への分化結果を示す。



図8 HiD4×4 (製品)

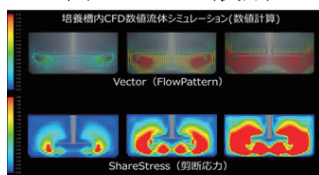


図9 iPS 細胞培養 CFD

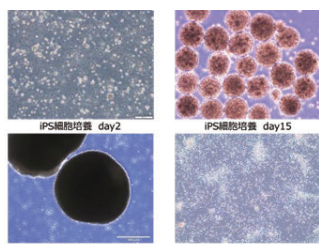


図10 iPS 細胞分化誘導

本研究より, 未分化状態の iPS 細胞の培養と, 分化誘導から分化後の培養に至る過程で, 求められる物理的作用が全く異なることを突き止めた。但し, どのフェーズで, どのような作用が求められるかが重要であり, 単純に一つの装置・一つの運用指標で確立されるものではない。そこで, 未分化培養と, その後の培養における非定常性の研究を進めている。

その他, 現在公開されている研究成果例として, 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 江藤浩之教授・(株)メガカリオン社らとの共同研究に参画する機会を得て, ヒト iPS 細胞から自己複製が可能な巨核球を分化誘導し, 良質な血小板を大量生産するという研究テーマに取り組み, 極めて先進的な成果を得るに至った(図11)。

この研究成果は, CiRA 江藤教授らとの共著者として, 昨年米国科学誌「Cell」に公開された。⁵⁾ここで開発した特殊上下動培養装置は, 江藤教授らの手で VerMESH リアクターとしてフェーズ II (治験)へ進むと共に, 50L シングルユースバイオリアクターを用いた商用生産実証研究が進んでいる。

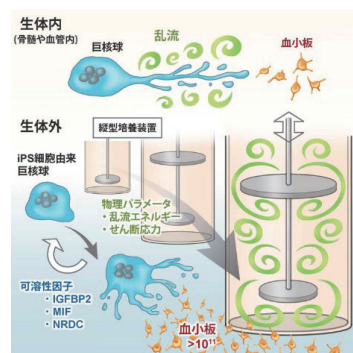


図 11 CiRA で公開されているイメージ図

先進的な細胞技術と, 異分野である当社攪拌技術・流体解析技術の融合により得られた結果は, 化学工学的にも非常に意義深い成果であると判断している。

5. おわりに

当社取り組みは, その殆どが大学機関やユーザー研究部門との NDA 契約に則るものであり, 内容や個別実績の公開は困難であるが, 2017年より当社内にバイオ事業部門を設立, 製品化したバイオリアクターの市場展開を果たし, 実績が増えつつある。今後, 産業化では性能のみならず医療機器としての国際規格も求められることから, 要求に応え得る装置の確立に努めていく。

最後に, 本攪拌培養装置研究開発に対し, ご指導・ご協力を頂いた全ての関係者に, 心から謝意を表します。

参考文献

- 1) 加藤ら, iPS 細胞の安全高品質な作成技術, 4, 11, 情報技術協会, (2016).
- 2) 加藤, 培養装置のスケラブル化と効率的な商用生産の実現, 35, 8, 412~414, BIO INDUSTRY (2018).
- 3) 丹生ら, 上下動攪拌の動物細胞培養への適用, 化学工学会78年会, K307, (2013).
- 4) 丹生ら, 動物細胞培養における VerSus リアクターのスケールアップ, JAACT2017, (2017).
- 5) Koji, E. *et al.*, Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production. *Cell*, Vol173, 636-647, (2018).