

Zurich University
of Applied Sciences



プロジェクトレポート
(翻訳版)

懸濁トランスフェクション CHO 細胞の異なるポンプにおける
機械的ストレス分析

(磁気浮上ポンプ対ペリスタポンプ)

2011年1月

Stephan Kaiser
Dieter Eibl

本書は Levitronix Japan 株式会社において、弊社ポンプの特性を理解していただくため、ZHAW によって作成されたレポートを日本語化した文書です。本書の内容は、オリジナルの文書を便宜的に翻訳して記載しておりますが、その内容について保証するものではありません。詳細な内容に関しては、弊社ホームページよりダウンロードできるオリジナルの英語版をご参照ください。

目次

1. 緒言	3
2. 材料及び方法	4
2.1. ウェーブミックスシステムでの細胞増殖.....	4
2.2. 振とうフラスコでの予備的試験.....	5
2.3. 細胞密度及び生存率測定.....	6
2.4. 細胞死動力学の決定.....	7
2.5. 試験装置及び構成部品.....	8
3. 結果及び考察	11
3.1. 流速.....	11
3.2. BPS-200 ポンプのポンプ特性.....	12
3.3. 活力アッセイ評価.....	13
3.4. 機械的ストレス実験結果.....	14
3.4.1. 第1のテストケース.....	14
3.4.2. 第2のテストケース.....	16
3.4.3. 第3のテストケース.....	18
3.4.4. 第4のテストケース.....	20
3.4.5. 機械的ストレスの追加指標.....	23
3.5. 細胞死力学による機械的ストレス評価.....	24
4. 結論と展望	26
5. 参考	28
6. 付録	30

1. 緒言

ポンプは一般に、バイオテクノロジー産業において、上流及び下流のプロセスの種々の用途に使用される。これら全てのプロセスにおいて、細胞は異なる種類及び強度の機械力にさらされる。ほとんどの場合、機械的ストレスはせん断ストレスとして一般化されるが、細胞は垂直勾配によってもまた、損傷し得る [Langer & Deppe (2000)]。特に動物細胞培養液は、動物細胞の細胞サイズと形態により、機械的ストレスに敏感であると考えられている [Chisti (1993)]。細胞破壊は、生物活性の消失に加えて、細胞成分の流出と培地における細胞残屑の高濃度化をもたらす。それゆえ、多数の研究が、種々の細胞系の臨界せん断値を得るためになされてきた。せん断力と動物細胞生存率の相関を見つけるために、ほとんどの場合、毛管 [McQueen et al. (1989) ; Mollet et al. (2004) ; Thomas (1993)] 又は粘度計 [Mardikar et al. (2000)] 等の単純な試験システムが使用されてきた。

ポンプとバルブが細胞に与える影響を調査する研究は、わずかなものしかなされてこなかった [Vandanjon et al. (1999) ; Alas et al. (2004) ; Jaouen et al. (1991)]。Jaouen ら (1999) は種々のポンプから生じる、微細藻類細胞懸濁液のせん断ストレスを調査した。著者らは、微細藻類の運動性消失を細胞損傷の指標として使用することが可能であることを示すことができた。遠心ポンプ、回転翼型容積ポンプは細胞損傷をひき起こすが、偏心ロータポンプ又はペリスタポンプでは影響は観察されなかったことが、実証された [Jaouen et al. (1999)]。Kamaraju ら (2010) は、回転容積ポンプにおいて、異なる回転速度及び滑り条件が懸濁 CHO 細胞に与える影響を研究した。彼らは、滑り流速がポンプ速度よりシビアに CHO 細胞の生存率に影響することを示すことができた。さらに、細胞損傷を、層流に対するナビエ・ストークス方程式の解析解に基づき予測する、新規な数学的モデリングアプローチが示された [Kamaraju et al. (2010)]。ここ数年の間に、それまでにはない新しい、連続フロー遠心方式ロータリーポンプ、製品名 CentriMag が Levitronix 社により開発された。そのポンプは、可逆性心室障害を持つ患者に血流力学的補助を提供して、血液を輸送するために設計された。CentriMag 血液ポンプは磁力によって浮上させたインペラを利用し、従来の血液ポンプで用いられるシャフトとシールの使用を回避している。従って、発熱、シール周辺での血栓形成及び感染などの従来のポンプに付随する問題を効果的になくすることができる [Chua et al. (2006)]。内部の流体流れを数値流体力学 (CFD, computational fluid dynamics の略称) を用いて調査した。CentriMag 血液ポンプの主要な構成部品内は完全な層流場となっていることが示された [Zhang et al. (2006)]。さらに、溶血性の研究が 5.0 L/min の流速と [Zhang et al. (2006)]、3.4 L/min の流速で [Hahn (2010)] 実施された。溶血性試験及び CFD シミュレーションは、いずれも深刻な高せん断ストレス領域がないことを示した。

本プロジェクトの目的は、磁気駆動の遠心ポンプ Levitronix BPS-200 が、懸濁 CHO 細胞にもたらす機械的ストレスの評価である。この目的のために、1500~6000 rpm の範囲において異なる回転速度で調査を行った。2つのペリスタポンプを比較対象として用いた (セクション 2.5 を参照)。更に、CHO 細胞を、せん断ストレスがごくわずかであると想定できる、振とうさせていない振とうフラスコ内で培養した (静置培養と称されている)。

2. 材料及び方法

2.1. ウェーブミックスシステムでの細胞増殖

シングルユースウェーブミックスシステム BioWave® 20 リットル中で、浮遊細胞 (CHO XM111-10) を、最大ワーキングボリューム 10 リットルで培養した (図 1 を参照)。既知組成培地 (HP-1, Cell Culture Technologies, スイス) を使用した。振とうフラスコから、開始時のワーキングボリューム 2.0 L、 0.5×10^6 cells/mL の細胞密度で、細胞をバイオリアクターに播種した。培養を流加培養モード (新鮮な媒質を、細胞増殖並びに基質及び代謝産物濃度に応じて添加する) により達成した。最大ワーキングボリューム 10 リットル、かつ全細胞密度 3.5×10^6 cells/mL に到達すると、ストレス実験用細胞懸濁液を回収した。しかし、少量 (約 0.5 L) を BioWave® 内における次の培養サイクルの接種材料として残しておいた。詳細な手順は、Methods in Biotechnology (Humana Press, Inc., Totowa, NJ) の第 24 巻、Animal Cell Biotechnology : Methods and Protocols、第 2 版、R. Pörtner 編の章「Disposable bioreactors for inoculum production and protein expression」に、Eibl 及び Eibl により記載されている (2007)。

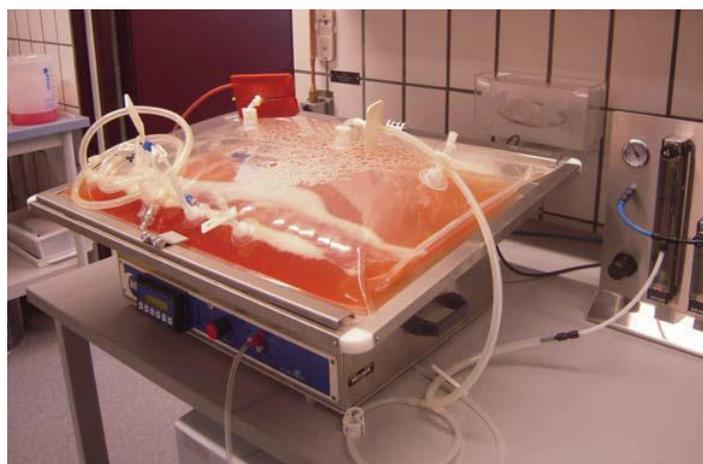


図 1: 細胞増殖用培養システム BioWave® 20 L の写真

プロセス中の制御を行うため、細胞増殖及び媒質添加に応じて、約 2 mL のサンプルを滅菌済シリンジで少なくとも 1 日に 2 回採取した。生存率及び全細胞密度をセクション 2.3 にて記載の通り決定した。更に、マルチバイオセンサーアナライザー BioProfile 100 Plus (Labor-Systeme Flükiger AG, スイス) を使用して、グルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸及びアンモニア濃度並びに pH 値を定量化した。

2.2. 振とうフラスコでの予備的試験

プロジェクト計画に記載されているように、Chemometec 社により提供される活力アッセイの適合性を確認するために、250 mL 振とうフラスコでの実験が行われた。活力アッセイにより、アポトーシス細胞又は他の病理学的プロセス下にある細胞において引き起こされる、細胞内の（還元型）チオール濃度の変化が検出可能となる。培養は 80 mL のワーキングボリュームで行い、初期の細胞密度は 1.0×10^6 cells/mL に設定した。振とうフラスコを、7.5%の CO₂ が供給されるインキュベーター内で、37°C に保温した。振とう周波数を 120 rpm に設定した。自動セルカウンター Cedex HiRes (Roche Innovatis AG) 及びマルチバイオセンサーアナライザー BioProfile 100 Plus (Labor-Systeme Flükiger AG, スイス) で、細胞増殖並びに基質及び代謝産物の濃度プロファイルを分析した。

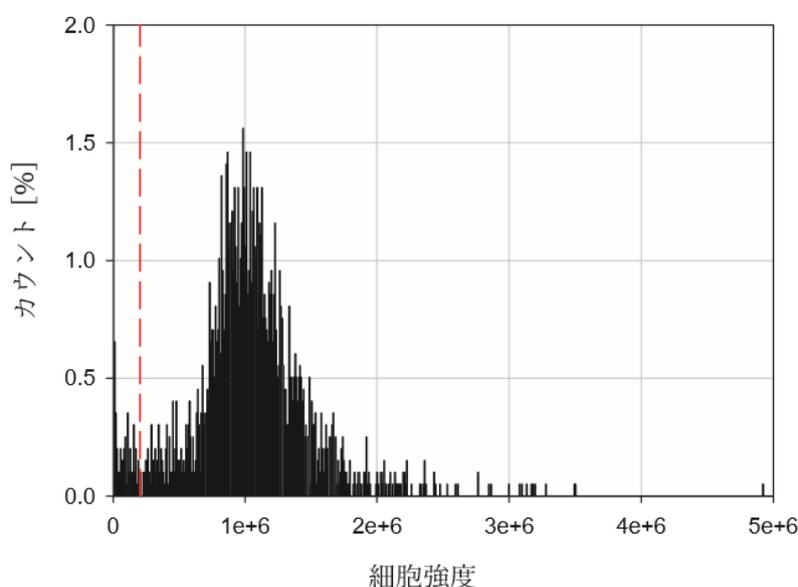


図 2： NC-3000 を使用した活力アッセイ結果。VitaBright-48 強度をヒストグラムで示す。チオール濃度が低い細胞（アポトーシス細胞）はヒストグラムの左端に見いだされる。赤色マーカーは、ユーザーにより配置されたものであり、細胞集団を 2 つの部分母集団に分ける。

活力アッセイを、Chemometec 社により提供されたアプリケーションノート 3005（付録参照）に記載されているように行った。典型的な細胞懸濁液の分量を、試薬溶液（VB-48・PI・AO, VitaBright-48）と混合し、30µL の本溶液を NC-Slide A2™ のチャンバー内に投入した。自動セルカウンター NC-3000 により細胞の蛍光を定量化し、VitaBright-48 強度を付属のソフトウェアにより表示させた。マーカーをヒストグラム（図 2 参照）中に配置することで、細胞集団を 2 つ（又はそれ以上）の部分母集団に分けることができる。

2.3. 細胞密度及び生存率測定

全細胞密度及び生細胞密度を、セルカウンターNucleoCounter® NC-100 (ChemoMetec, デンマーク) 及び Cedex HiRes (Roche Innovatis AG, ドイツ) (図3 参照) で、自動測定した。NucleoCounter®は、DNA に結合した蛍光染料ヨウ化プロピジウムの蛍光検出に基づく。NucleoCounter®の測定結果は、サンプル調製に応じて、全細胞密度又は死細胞密度のいずれかを表す。Cedex HiRes デバイスでは、一般的なトリパンブルー排除方式を適用した。生存及び死細胞密度に加えて、高解像度デジタル画像認識により凝集率、細胞形態及び細胞残屑を検出した。

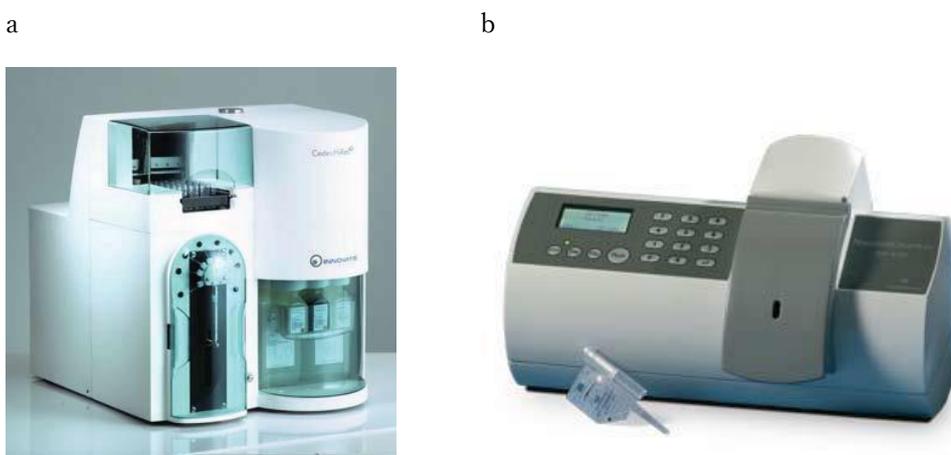


図3: 自動セルカウンター。(a) Cedex HiRes (Roche Innovatis AG, ドイツ) [ソース:<http://www.research-ins.com/>]及び (b) NucleoCounter NC-100 (Chemometec, デンマーク) [ソース: <http://www.licor.com/>]。

生存率は、式1 に示す様に、生きている (生) 細胞密度の全細胞密度に対する比として定義される (式中、LCD, DCD 及び TCD は、生きている細胞の密度、死んでいる細胞の密度、及び全細胞密度を表す)。

$$\text{生存率 [\%]} = \frac{\text{LCD}}{\text{TCD}} = \frac{\text{TCD} - \text{DCD}}{\text{TCD}} \quad [1]$$

2.4. 細胞死動力学の決定

機械的ストレスの定量化及び評価のため、生細胞密度の減衰に関する動力学を、以下の関係式により表される一次速度式で仮定しモデル化した（式中、LCD 及び k_D は生きている細胞の密度及び細胞死係数 (h^{-1}) である。）。

$$\frac{dLCD}{dt} = -k_D \cdot LCD \quad [2]$$

式 2 を $LCD(t=0) = LCD_0$ として積分すると、次式を得る：

$$LCD(t) = LCD_0 \cdot e^{-k_D t} \quad [3]$$

式 4 で与えられるように、この関数を対数線形化すると、時間に対して生細胞密度の対数をプロットした場合の傾きとして、細胞死係数 k_D を得ることができる。

$$\ln(LCD(t)) = \ln(LCD_0) - k_D \cdot t \quad [4]$$

式 5 で定義される決定係数 R^2 により予想細胞死係数の質を評価した（式中、 y_i 及び \bar{y} は測定データとその平均値であり、 f_i は予想値である。）。

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - f_i)^2}{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2} \quad [5]$$

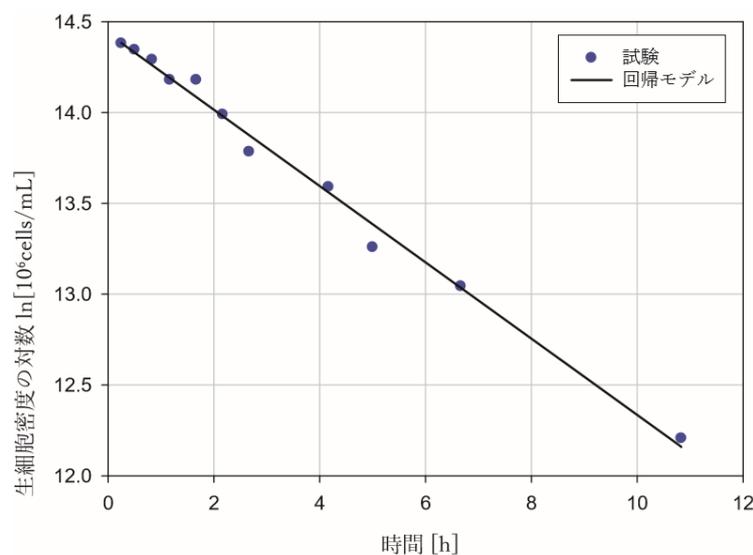


図 4： 細胞死動力学の回帰モデル。時間に対して生細胞密度の対数をプロットし、得られた関数の傾きを決定することで、細胞死係数 k_D は得られる。

2.5. 試験装置及び構成部品

ポンプ試験では、図5及び図6に示すように、3つの異なるポンプを使用した。Levitronix BPS-200に加えて、2つのペリスタポンプ、Masterflex® I/P Easy Load及びMasterflex® L/S Cole Parmerを比較対象として調査した。生物学的実験では、Levitronix BPS-200の回転速度を、1500～5000 rpmの範囲内で変化させた。一定流速3.4 L/minを保証するため、チューブをホースクリップで圧縮することで、背圧を5～465 mmHg (6.5～567 mbarに対応)で変化させた(表1を参照)。細胞懸濁液を、懸濁液が3.3リットル充填され、ウォーターバスで温度調整された3つのビーカーから、閉ループ内で循環させた。ピペットを用いて2 mLの分量を3つの細胞懸濁液貯蔵容器及び静置培養から採取した。流速及び圧力を制御するために、クランプオン式超音波流量センサー及び圧力センサー(Levitronixにより提供された)をそれぞれ使用した。追加的データを伴う、全構成要素を表1にて示す。4つのテストケースで使用されたパラメータを、表2にまとめている。前述したように、Levitronix遠心ポンプの回転速度を、流速を3.4 L/minの値で一定に保ちつつ、4つの異なる値に設定した。ポンプ試験の間、生細胞密度及び全細胞密度、加えて細胞形態及び栄養素濃度を定期的に決定した。

表1: ポンプセットアップの構成要素

番号	部品名	説明
1a	Levitronix BPS-200	<ul style="list-style-type: none"> ・再利用可能ポンプヘッド ・ベアリングレスモーター ・コントローラ LPC-200.3 (ファームウェア C7.48 R05) ・手動操作パネル
1b	Masterflex® I/P Easy Load	<ul style="list-style-type: none"> ・PSFハウジング/CRSローター ・Masterflexチューブ 06435-26 PharmaPure®
1c	Masterflex® L/S Cole-Parmer	<ul style="list-style-type: none"> ・デジタル駆動 600 rpm ・白金処理シリコンチューブ L/S® 36
2	圧力センサー	Netech Digimano 1000
3	クランプオン式流量センサー	Transonic Systems Inc、H9XL、超音波式
4	スチールパイプコイル	-
5	ホースクリップ	テストケース2、3及び4でのみ用いた
6	細胞懸濁液収容容器	プラスチックビーカー
7	ウォーターバス	-

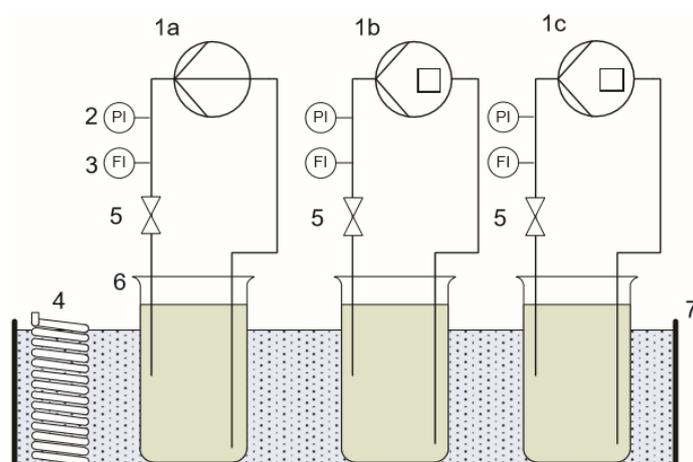


図5： 試験装置の概略図。細胞懸濁液を、閉ループ内の3つのポンプ、Levitronix BPS-200 (1a)、Masterflex® I/P Easy Load (1b) 及び Masterflex® L/S Cole Parmer (1c) により、サーモスタットに接続されたパイプコイル (4) で調整されたウォーターバス (7) 中のビーカー (6) から循環させた。流速及び圧力を、超音波クランプオン式流量センサー (2) 及び圧力センサー (3) により監視した。チューブの締め付けは、テストケース 2、3 及び 4 において、ホースクリップ (5) で達成した。

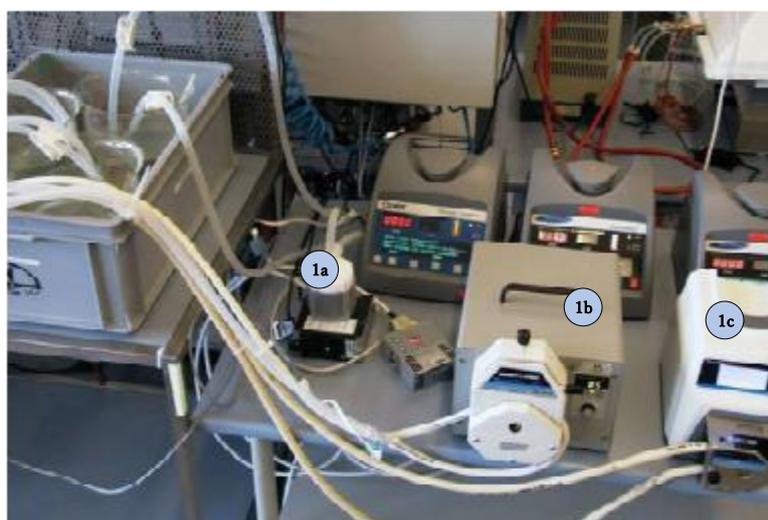


図6： 試験装置の写真。Levitronix BPS-200 (1a) を、2つの比較対象ペリスタポンプ Masterflex® I/P Easy Load (1b) 及びマス Masterflex® L/S Cole Parmer 社製 (1c) と対照して試験した。

表2： 調査したテストケースのパラメータ

特性	単位	試験 1	試験 2	試験 3	試験 4	注
流速	L/min	3.4	3.4	3.4	3.4	<ul style="list-style-type: none"> 目標流速；実験の間、クランプオン式流量センサーを使用し、流速を定期的に制御した。 わずかな変動（約±5%）があった。
背圧	mmHg mbar	5 6.5	190 253	288 253	465 567	<ul style="list-style-type: none"> チューブをホースクリップで締め付けて、圧力を調節した。
Levitronix BPS-200 の回転速度	rpm	1500	3500	4200	5000	<ul style="list-style-type: none"> 値は一定に保った
チューブの締め付け	--	無し	ホースクリップ	ホースクリップ	ホースクリップ	<ul style="list-style-type: none"> 圧力及び流速を一定に保つために、チューブの圧縮を定期的に再調節した。
ビーカー内の細胞培養液量	L	3.3				<ul style="list-style-type: none"> 培養液量及びチューブ回路内の液量の合計は約 3.4 リットルとした。
細胞培養温度	°C	37				<ul style="list-style-type: none"> サーモスタットに接続されたスチールパイプコイルにより一定に保った。
測定した特性	--	細胞密度、生存率、細胞形態（直径、密度、凝集率）、基質及び代謝産物（グルコース、グルタミン、グルタミン酸、乳酸、アンモニア）				<ul style="list-style-type: none"> 細胞密度及び生存率をCedex HiRes及びNucleoCounter® NC-100で見積もった。必ずしも全ての測定を各サンプルについて行わなかった。 基質及び代謝産物濃度をマルチバイオセンサーアナライザー BioProfile 100 Plusで分析した。必ずしも全ての測定を各サンプルについて行わなかった。

3. 結果及び考察

3.1. 流速

4リットルをビーカーから送り出すのに必要な時間を測定すること及び流速をクランプオン式流量センサーで測定することにより、ポンプパラメータに依存する流速を求めた。図7に示すように、全ての調査したケースにおいて、2つの測定技術間で約10~15%のばらつきが見られた。これらのばらつきは、測定技術及び流量センサーの両方の結果である。流量計は作製され、広範囲のチューブ寸法及び材料に特化して較正される [Transonic systems (2010)] が、適用したチューブを使用する際の計測精度については、個別の情報は見つけられなかった。ばらつきがあったため、クランプオン式センサーで測定された流速値を、ストレス実験の間に得られた因子で補正した。

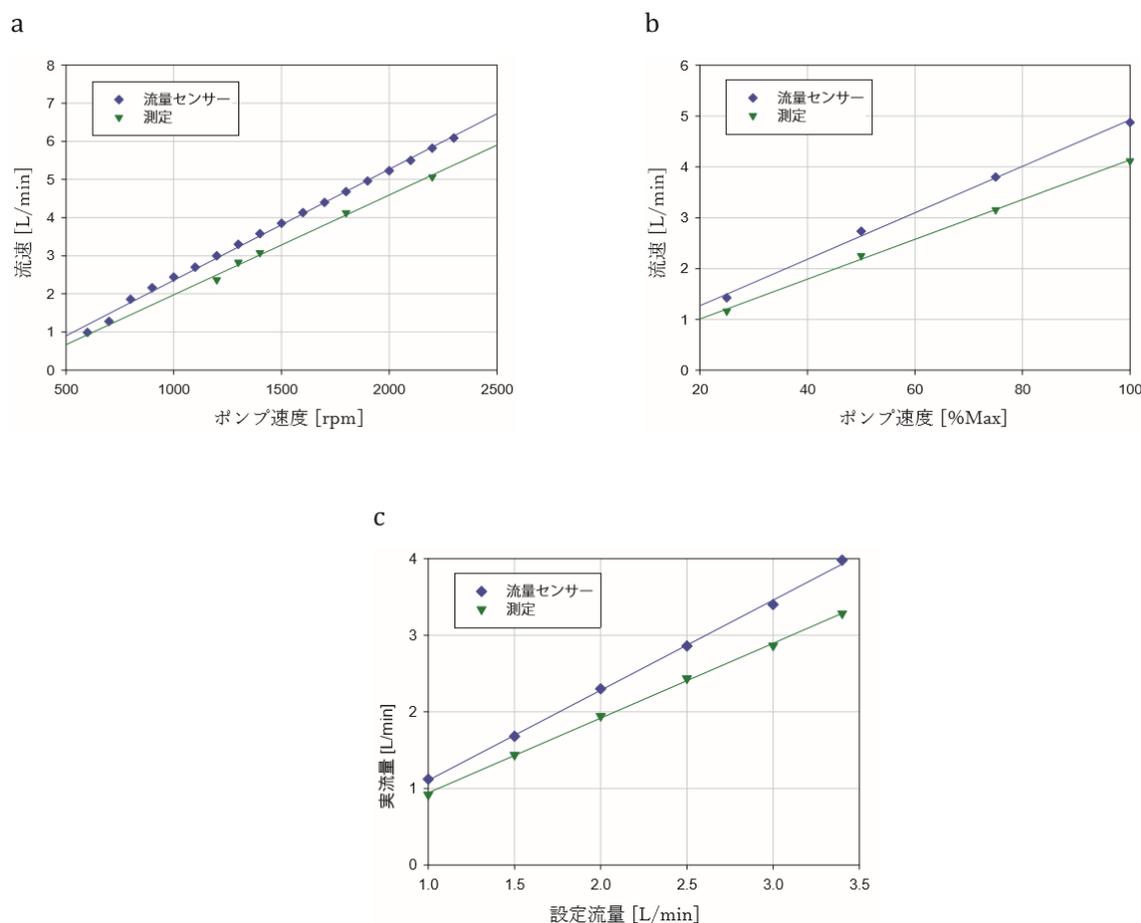


図7: ポンプの設定に応じて、Levitronix BPS-200 (a)、Masterflex® I/P Easy Load (b) 及び Masterflex® L/S Cole Parmer (c) で測定した流速。

3.2. BPS-200 ポンプのポンプ特性

Levitronix BPS-200 ポンプの特性を決定するために、回転速度を 1500 rpm～6000 rpm の範囲内で変化させ、クランプオン式流量センサーで流速を測定した。チューブをストレス実験と同じようにホースクリップで締め付けることで、背圧を変化させた。流量センサーの測定範囲が制限されているため、10 L/min 未満の流速のみ測定できた。図 8 に示すように、実現したポンプ速度では、インペラ駆動ポンプにおいて典型的な、背圧の増加に伴う明らかな流速の低下が見られた。

ポンプの回転速度が高くなると、極小のチューブの締めつけ具合で著しく圧力が変化してしまうので、使用したホースクリップでは圧力を調節することが難しくなった。したがって、本生物学的ストレス実験において、ポンプ速度を 5000 rpm を上回る設定にはしなかった。

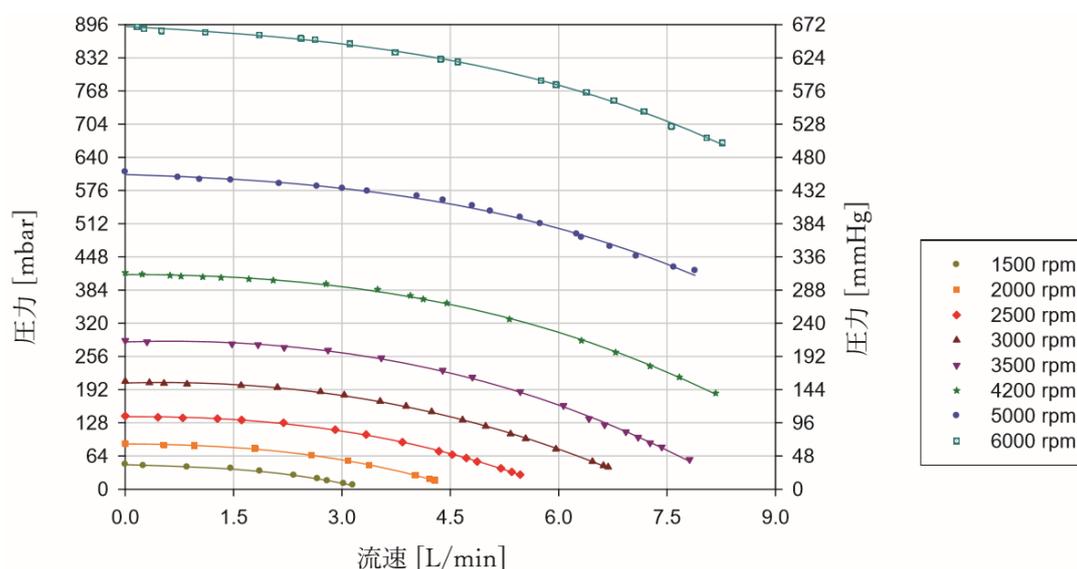


図 8： 1500～6000rpm の異なる回転速度について見積もられた Levitronix BPS-200 ポンプのポンプ特性。記号は測定データを示す。線は、非線形回帰により得た。

3.3. 活力アッセイ評価

セクション 2.2 にて記載の通り、Chemometec 社により提供された活力アッセイは、アポトーシス（プログラム化された細胞死）又は他の病理学的なプロセスの指標である、細胞内の（還元型）チオール濃度の変化を検出するように設計されている [付録を参照]。昆虫細胞（High Five™）について、我々のワーキング・グループでは、活力アッセイが、得られた生存率がまだ高い場合であっても初期の細胞内の変化を示すことを実証した [Ries et al. (2010)]。こうした細胞内の変化は、細胞のストレス応答とみなされている。したがって、活力アッセイが本ストレス実験で使用した懸濁 CHO 細胞にもまた適しているか否かを調査した。

図 9a にて示すように、典型的な増殖曲線が得られた。細胞密度は、23.5 時間で、初期値 1×10^6 cells/mL から約 2.6×10^6 cells/mL へと指数関数的に増加した。増殖期の比増殖速度及び倍加時間を計算し、それぞれ 0.0378 h^{-1} 及び 18.3 h と求めた。これらの値は使用した細胞系（CHO XM 111-10）では、非常に一般的である。我々の実験室では、日常的に 18~24 時間の倍加時間が得られている。約 28 時間後、細胞密度が停滞する静止期に入る。残存するグルコースは、細胞密度が増加することなく消費される（図 9b 参照）。同時に、主要老廃物である乳酸及びアンモニアの濃度は、最大濃度 1.96 g/L 及び 1.58 mmol/L までそれぞれ増加する。基質の完全消費及び高代謝産物濃度により、87 時間後には、生存率は 40 % を切った。

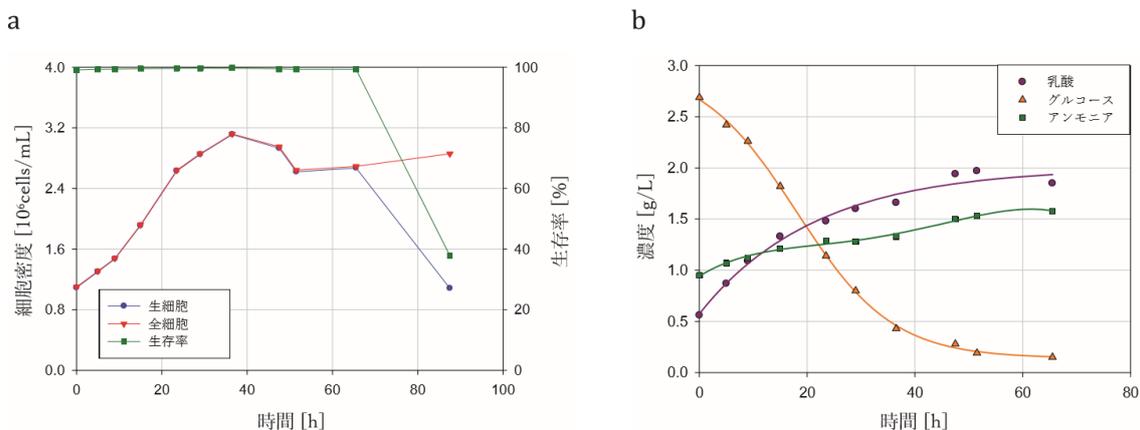


図 9： シングルユース 250 mL 振とうフラスコ内の懸濁 CHO 細胞の増殖動力学。(a) NucleoCounter NC-100 で測定した細胞密度。(b) BioProfile 100 で測定したグルコース及び乳酸濃度。記号は測定データを示し、線は回帰曲線を示す。

典型的な増殖曲線にも関わらず、CHO 細胞の細胞内の変化に関する初期の指標は観察されなかった（図 10）。対数期に 92 % から 86 % へと活力が低下した後、初期値よりも高い、ほぼ 95 % までの増加が、静止期の間に達成された。最後には、サンプルは、その生存率がすでに 40 % にまで低下していたが、84 % の活力を有していた。この挙動は再調査すべきではあるが、本研究としては行わなかった。しかしながら、これらの結果のため、ストレス実験の間、活力アッセイを細胞培養液の健康状態を特徴づけるために使用しなかった。

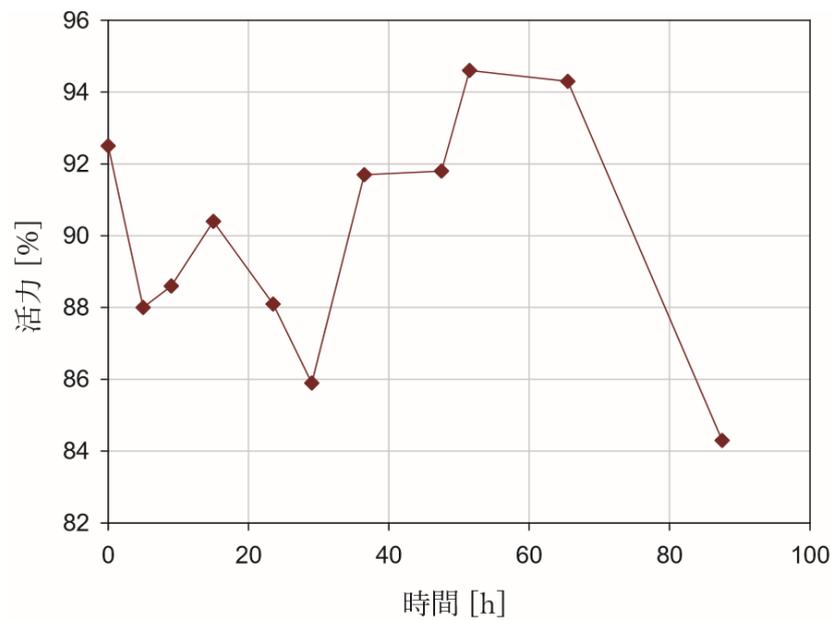


図 10：活力アッセイにより得られた活力の経時変化。活力を評価するため、細胞集団を 2 つの部分母集団に分けた（セクション 2.2 を参照）。1 つ目のサンプルを参照用に使用した。

3.4. 機械的ストレス実験結果

3.4.1. 第 1 のテストケース

第 1 のテストケースでは、ホースクリップを使用することなく、Levitronix BPS-200 の回転速度を 1500 rpm に設定した。循環を開始する前の初期の生細胞密度は $2.38 \times 10^6 \sim 2.73 \times 10^6$ cells/mL、生存率は約 97 % であった。グルコース、乳酸及びアンモニア濃度は、それぞれ 0.45 g/L、1.89 g/L 及び 1.36 mmol/L であった（表 3 参照）。

表 3： 循環開始前の細胞密度及び濃度の初期値

成分	単位	値
生細胞密度	10^6 cells/mL	2.57 ± 0.17
全細胞密度	10^6 cells/mL	2.64 ± 0.17
生存率	%	97 ± 0.3
グルタミン	mmol/L	0
グルタミン酸	mmol/L	0.02
グルコース	g/L	0.45
乳酸	g/L	1.89
アンモニア	mmol/L	1.36

図 11 に示すように、2つのペリスタポンプにより循環された培養液の生細胞密度は、初期値 2.5×10^6 cells/mL から、400 分以内にそれぞれ 0.46×10^6 cells/mL 及び 1.2×10^6 cells/mL へと低下した。ペリスタポンプでは、実験の開始時からすぐに、30%に及ぶ生細胞及び全細胞密度の激減が観察された。

この激減の一部（約5~最大10%）は、チューブ内に残留する水による細胞懸濁液の希釈によるものと、説明することができる。加えて、浮遊細胞は表面への細胞接着により機械的ストレスに反応することが知られている [Boccafroschi et al. (2010)]。細胞が壁に付着すると、付着した細胞はサンプリングにより検出されない。本想定は、より高い機械的ストレスが予想される次のテストケース（比較セクション 3.4.2 から 3.4.3）における、細胞密度のより著しい低下によって支持されるであろう。しかしながら、本調査条件下での、CHO の細胞接着についての具体的情報は、見つけられなかった。要約すると、開始時の著しい細胞密度の損失は完全には解明できなかった。したがって、更なる調査が必要である。

ペリスタポンプと対照的に、遠心ポンプでの生細胞密度はかなり一定であり、ある程度の変動はあるものの、これはおそらく測定及びサンプリングの誤差の結果である。実験終了時の BPS-200 遠心ポンプの生細胞密度は、 2.2×10^6 cells/mL であり、2つのペリスタポンプの 82%及び 44%と比較して、初期値よりわずか約 7.5%低下したのみであった。

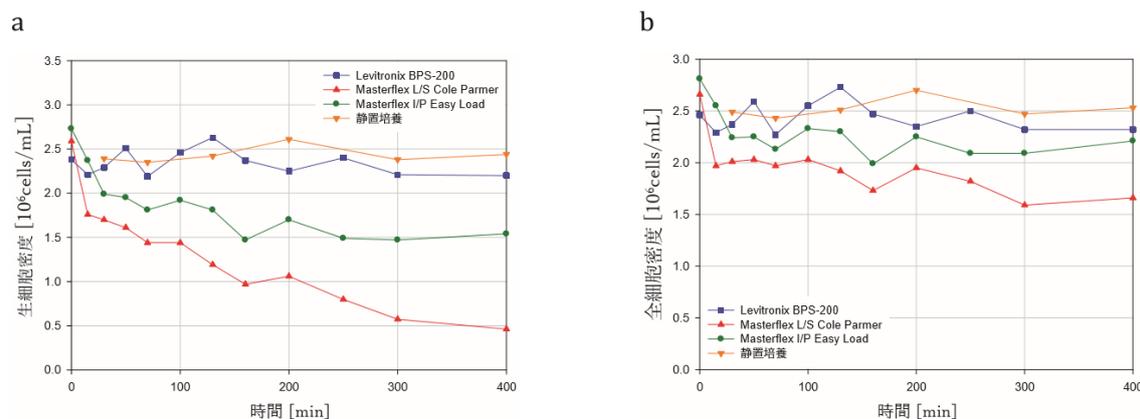


図 11： 3.4 L/min、背圧なしで循環させた細胞懸濁液の生細胞密度 (a) 及び全細胞密度 (b) の時間依存性。静置培養の値も追加した。

興味深いことに、ペリスタポンプでは全細胞密度の低下もまた、見いだされた。その影響は、Masterflex® L/S Cole Parmer においてより顕著であり、実験の終了時に 2.2×10^6 cells/mL が測定された Masterflex® I/P Easy Load に対し、全細胞密度は、 1.6×10^6 cells/mL まで低下した。セクション 2.3 にて記載の通り、NucleoCounter NC-100 での細胞密度測定は、DNA に結合する蛍光染料ヨウ化プロピジウム (PI) による蛍光検出に基づく。したがって、全細胞密度の低下は、損傷した細胞から放出されるプロテイナーゼの活性が引き起こすタンパク質分解の結果である可能性がある、全体的な DNA 含有量の減少を意味する。流速が速いことと、その結果として細胞懸濁液の収容容器内における平均滞留時間が短いこと（約 1 分）により、沈殿による細胞密度の減少は除外できる。

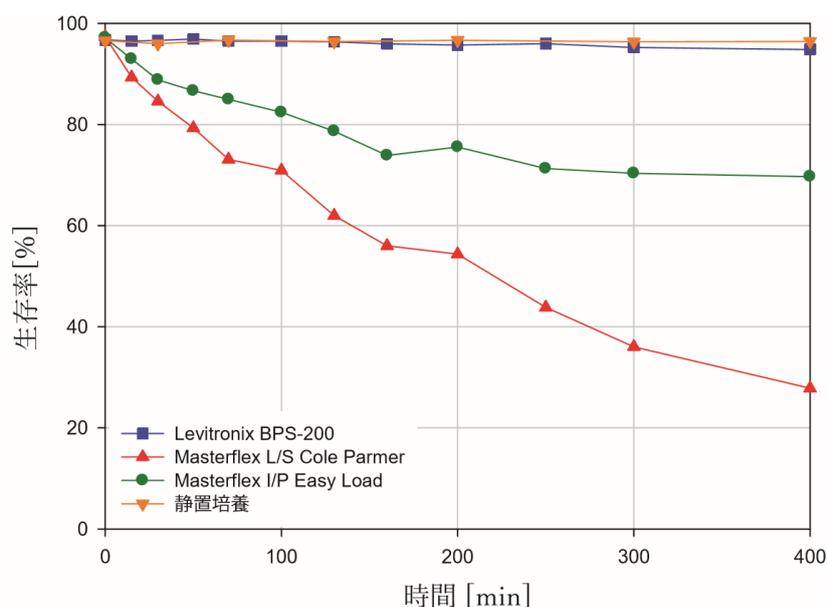


図 12：背圧なし、3.4 L/min で循環させた、細胞懸濁液における生存率の時間依存性。静置培養の値も追加した。

生細胞密度の低下により、2つのペリスタポンプにより循環された培養液の生存率は、400分（ポンプを通過し400周することに相当する）以内で初期値の97%から70~28%の値へと低下した。対照的に、Levitronix BPS-200で循環させた培養液の生存率は、全プロセスに渡って約95%の高い値のままであった（図12参照）。わずかに生存率が低下していることは、培養の最後には、基質、例えばグルコース及びグルタミンが枯渇することと、1.9 g/Lの高い濃度で乳酸が存在することにより説明できる。このことは、静置培養でもまた観察された。

3.4.2. 第2のテストケース

第2テストケースにおいては、Levitronix BPS-200を、背圧190 mmHg (253 mbar)、回転速度を3500 rpmに設定した。この設定では、流速が第1の実験と同様の3.4 L/minになる。循環開始前の初期の生細胞密度は $1.95 \times 10^6 \sim 2.22 \times 10^6$ cells/mLで、生存率は約93%であった。グルコース及び乳酸の濃度は、それぞれ0.18 g/L及び1.96 g/Lであった（表4参照）。

図13に示すように、すべての培養液において、最初の30分以内で、生細胞密度は開始値の約 2.1×10^6 cells/mLから、約 1.5×10^6 cells/mLの値へと低下した。これは全細胞密度の25%、生細胞密度の36%にまで相当する。この実験では、チューブの締め付けがホースクリップにより調節されたとき、短期間の背圧のオーバーシュートが起こったが、これらの圧力オーバーシュートがこのような著しい影響を与えたのかは不確かである。これらの問題を避けるため、チューブの締め付けは、次のテストケースにおける循環の開始前に調節した。

表 4： 循環開始前の、細胞密度及び濃度の初期値

成分	単位	値
生細胞密度	10 ⁶ cells/mL	2.08 ± 0.14
全細胞密度	10 ⁶ cells/mL	2.24 ± 0.13
生存率	%	92.8 ± 0.7
グルタミン	mmol/L	0.02
グルタミン酸	mmol/L	0.11
グルコース	g/L	0.18
乳酸	g/L	1.97
アンモニア	mmol/L	1.65

30～360 分間に、生細胞密度は $0.7 \times 10^6 \sim 1.44 \times 10^6$ cells/mL の値まで低下したが、最も低下が顕著であったのは、再び Masterflex® L/S Cole Parmer であり、Levitronix BPS-200 の低下が最も穏やかであることが見いだされた。図 13b に示すように、全細胞密度において、ポンプ間の差異は、ほぼ見られなかった。第 1 の実験のように、Masterflex® L/S Cole Parmer ポンプで循環させた細胞生存率は、図 14 に示されるように、最も著しい低下を示した。Levitronix BPS-200 では、最初の 2 時間における、約 80 % までのより急速な低下の後、生存率の緩やかな低下がわずかに見いだされた。実験終了時点での生存率は、第 1 の実験時よりも著しく低い 43 %～77 % であり、これは予想と一致していた。

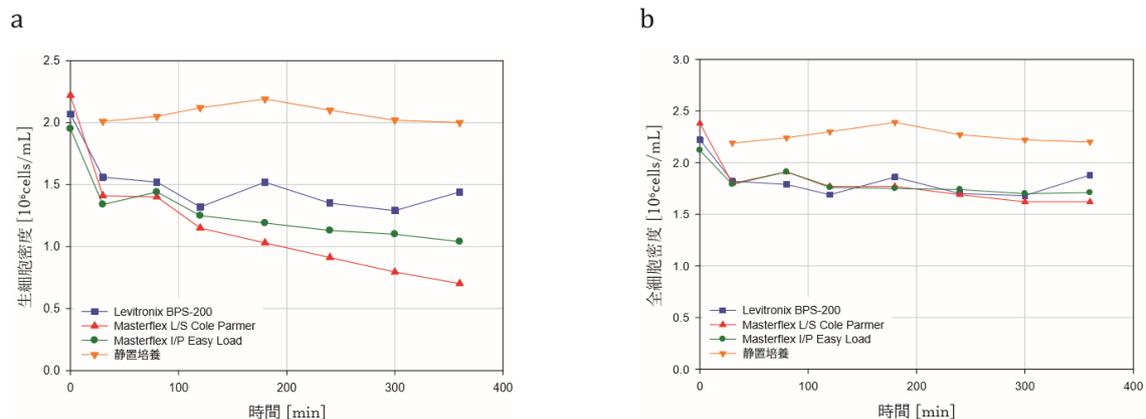


図 13： 3.4 L/min、背圧 190 mmHg で循環させた細胞懸濁液の生細胞密度 (a) 及び全細胞密度 (b) の時間依存性。静置培養の値も追加した。

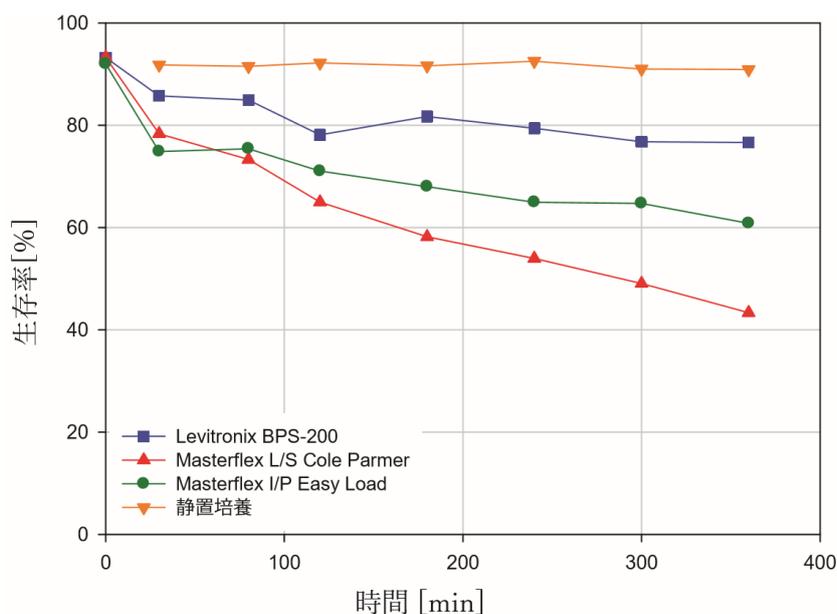


図 14： 3.4 L/min、背圧 190mmHg で循環させた、細胞懸濁液における生存率の時間依存性。静置培養の値も追加した。

3.4.3. 第3のテストケース

第3テストケースにおいては、Levitronix BPS-200 を、流速が最初の2つの実験と同様の 3.4 L/min になるよう、背圧 280 mmHg (385 mbar)、回転速度を 4200 rpm に設定した。循環開始前の初期の生細胞密度は、これまでの実験と比較してより高く、 $2.68 \times 10^6 \sim 3.02 \times 10^6$ cells/mL の値であり、生存率は約 97 % であった。これまでの実験と対比して、培養終了時における培地のグルコース濃度は、ずっと高かった (1.24 g/L)。乳酸濃度はこれまでの試験と同様であり、1.96 g/L (表 5 参照) であった。

表 5： 循環開始前の細胞密度及び濃度の初期値

成分	単位	値
生細胞密度	10^6 cells/mL	2.83 ± 0.18
全細胞密度	10^6 cells/mL	2.92 ± 0.13
生存率	%	96.7 ± 0.1
グルタミン	mmol/L	0.1
グルタミン酸	mmol/L	0.09
グルコース	g/L	1.24
乳酸	g/L	1.96
アンモニア	mmol/L	1.06

図 15 に示すように、生細胞密度は開始値の約 3.0×10^6 cells/mL から 400 分の間に、遠心ポンプの 1.6×10^6 cells/mL、Masterflex® L/S Cole Parmer ペリスタポンプの 0.8×10^6 cells/mL の間で値が低下した（図 15 参照）。最初の 2 つの実験と比較して、初期の生細胞密度の低下はより急激であったが、循環時間が長くなると、ずっと高い機械的ストレスが見込まれるものの、第 2 のケースと同様に低下した。このことは、生存率によってもまた示される（図 16 参照）。細胞培養液が、より高いせん断ストレスに適応することができることは周知であり、例えば、細胞を静置培養から攪拌系へと移送するのにこの適応力が利用されている。しかし、この現象はいくつかの細胞発生において観察されているのみであり、今回のせん断ストレスに対するより高い抵抗を示す理由としては予想されない。

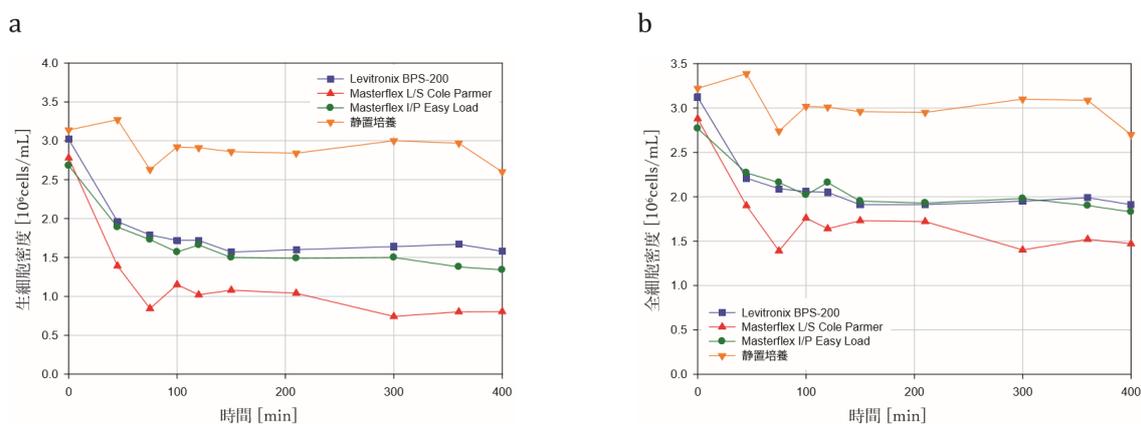


図 15： 3.4 L/min、背圧 288 mmHg で循環させた細胞懸濁液の生細胞密度 (a) 及び全細胞密度 (b) の時間依存性。

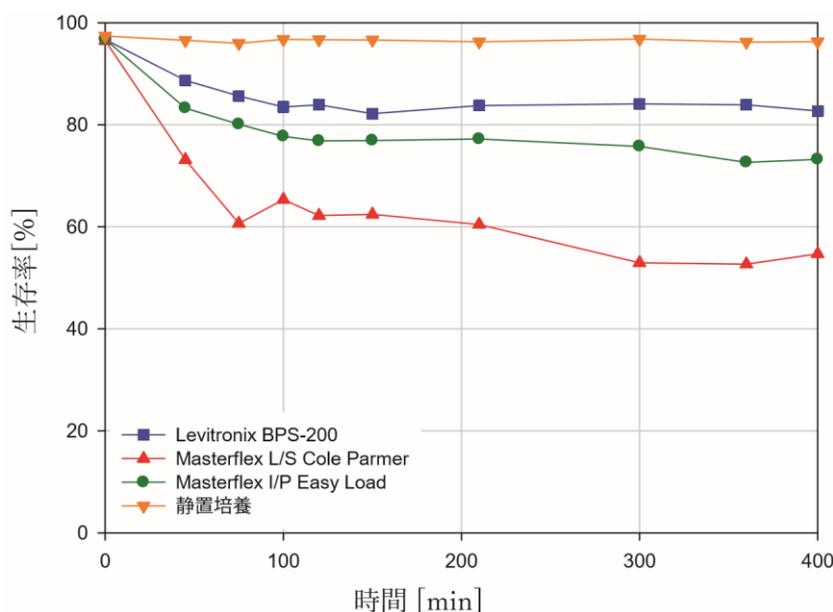


図 16： 背圧 288 mmHg、3.4 L/min で循環させた、細胞懸濁液における生存率の時間依存性。静置培養の値も追加した。

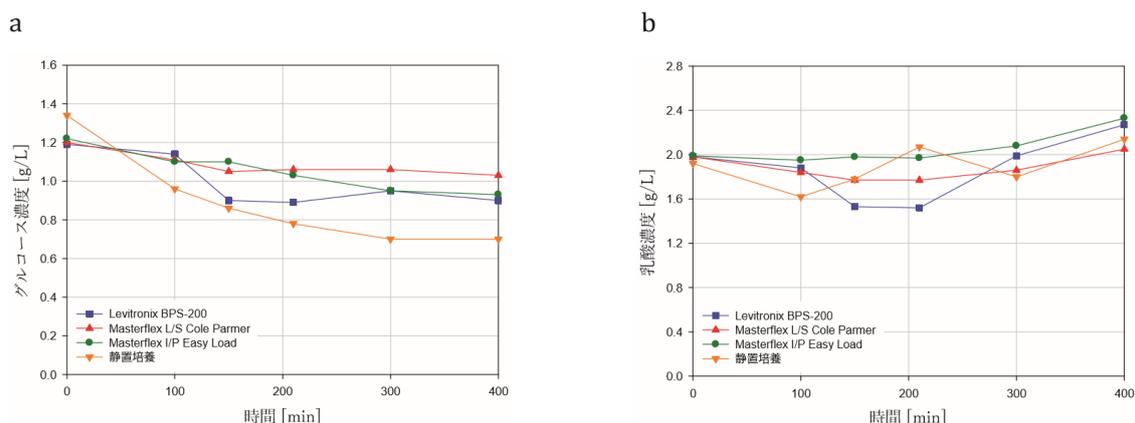


図 17： グルコース (a) 及び乳酸 (b) 濃度の時間依存性。

上述の通り、初期の培地は約 1.2 g/L のグルコースを含有する (図 17 参照)。全プロセスに渡り、全サンプルにおいてグルコース濃度の低下が観察され、最終的なグルコース濃度は 0.7～1.03 g/L であった。BPS-200 遠心ポンプでの、特定の基質の消費速度は約 4 mg/ (10³ 生細胞 * h) であると決定された。これはセクション 3.3 に記載した振とうフラスコ内の培養液に対して求められる消費速度 (データは示さず) のわずか 10 分の 1 である。同時に乳酸濃度は初期値 1.96 g/L から 2.05～2.33 g/L の値へと増加した。しかしながら、細胞増殖は見いだされなかった (静置培養でも見いだされなかった)。

3.4.4. 第 4 のテストケース

第 4 のテストケースでは、背圧 425 mmHg (567 mbar) で、Levitronix BPS-200 の回転速度を 5000rpm に設定した。循環開始前の初期の生細胞密度は第 3 のテストケースと同等で、2.88 x 10⁶～3.26 x 10⁶ cells/mL の値であり、生存率は約 97 % であった。これまでのケースと比較すると、残存グルコース濃度は 1.09 g/L であったが、乳酸濃度の値は 1.39 g/L と、より低かった (表 6 参照)。

表 6： 循環開始前の、細胞密度及び濃度の初期値

成分	単位	値
生細胞密度	10 ⁶ cells/mL	3.16 ± 0.1
全細胞密度	10 ⁶ cells/mL	3.27 ± 0.1
生存率	%	96.7 ± 0.1
グルタミン	mmol/L	0.17
グルタミン酸	mmol/L	0.11
グルコース	g/L	1.09
乳酸	g/L	1.39
アンモニア	mmol/L	1.24

図 18 に示すように、Levitronix BPS-200 及び Masterflex® I/P Easy Load では、最初の一時間以内に、生細胞密度及び全細胞密度の両方が、その約 60 % 及び 50 % と、著しく下落した。Masterflex® L/S Cole Parmer では、更に急激な約 75 % の下落が観察された。その後、細胞密度はかなり緩やかに低下した。Levitronix BPS-200 と Masterflex® I/P Easy Load では、有意差は見いだされなかった。

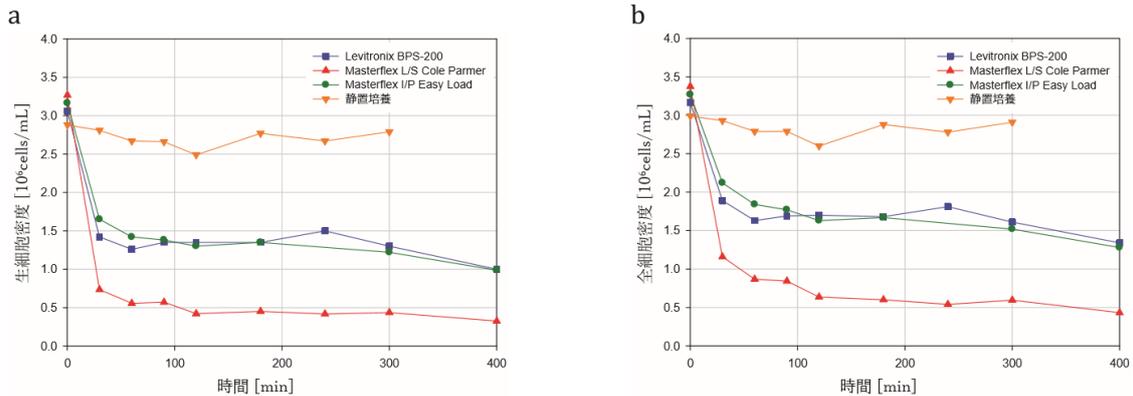


図 18： 3.4 L/min、背圧 425 mmHg で循環させた細胞懸濁液の生細胞密度 (a) 及び全細胞密度 (b) の時間依存性。静置培養の値も追加した。

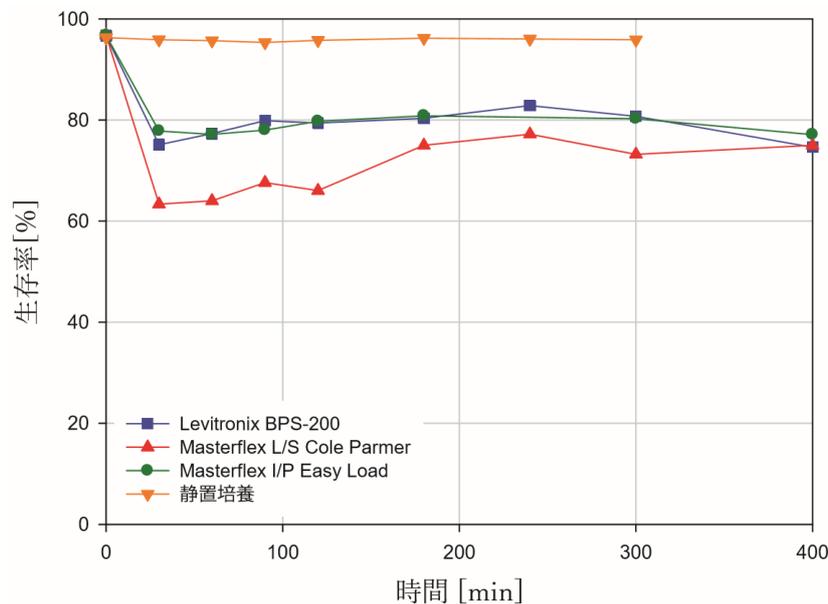


図 19： 背圧 425 mmHg、3.4 L/min で循環させた細胞懸濁液における、NucleoCounter® NC-100 で得られた生存率の時間依存性。静置培養の値も追加した。

NucleoCounter® NC-100 デバイスにより得られた生存率の時間依存過程は、これまでのテストケースに対して明確に異なる。全サンプルは 97 % の値で開始し、Masterflex® L/S Cole Parmer の生存率は、最初の 30 分以内で 64 % まで下落した。その後、約 75 % まで増加し、実験終了までほぼ一定であった。この挙動はこれまでの実験と著しく区別され、論理的ではないように思われるが、合理的説明を見いだすことができなかった。Masterflex® I/P Easy Load 及び Levitronix BPS-200 は、ほぼ同一の曲線が得られた。両方のポンプにおいて、最初の 30 分で生存率は約 80 % まで低下し、その後は 6 時間に渡りほぼ一定であったが、試験終了までわずかな減少を示した。

NucleoCounter® NC-100 での生存率の結果が予想外であったため、追加的に、Cedex HiRes セルカウンターで、生存率を決定した。図 20 にて示すように、Cedex HiRes により得られた生存率は、これまでに記載された結果と区別される。初期の生存率は、NucleoCounter® NC-100 の結果と比較していく分か低く、約 90.5 % の値であった。我々の実験室における培養から、Cedex HiRes® により得られた生存率は、NucleoCounter® NC-100 の生存率よりも約 5~10 % 低いことが知られている。生存率は、最初の 30 分以内に、Levitronix BPS-200 及び Masterflex® I/P Easy Load では約 80 % まで、Masterflex® L/S Cole Parmer ペリスタポンプでは 66.4 % まで下落し、このことは前述のデータと同等である。その後、すべてのサンプルにおいて、実験終了まで、生存率が緩やかに減少することが明らかになった。

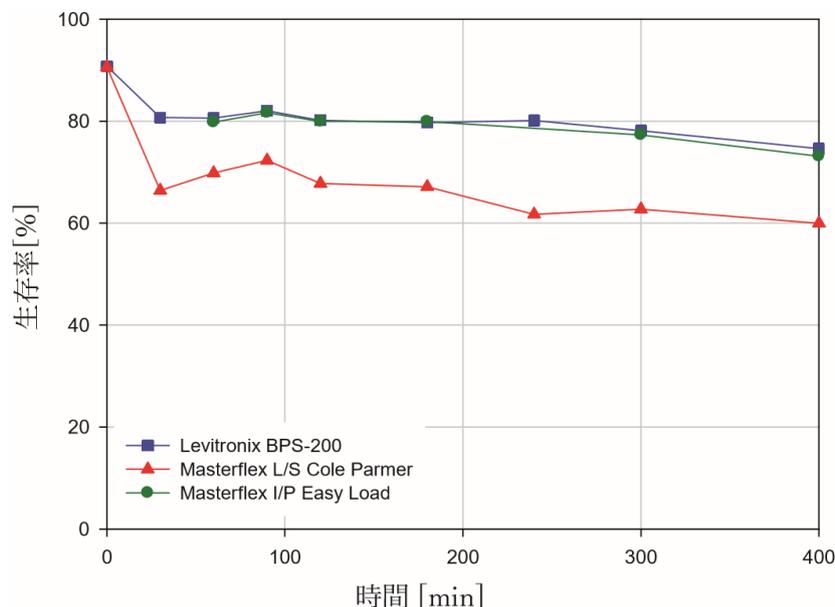


図 20： 第 4 のテストケースにおいて、Cedex HiRes により得られた細胞懸濁液の生存率の時間依存性。静置培養については、追加の測定を実施しなかった。

3.4.5. 機械的ストレスの追加指標

セクション 2.3 にて記載の通り、生細胞及び全細胞密度の他に、凝集率、密度及び平均細胞径等の追加のパラメータを、自動セルカウンター Cedex HiRes により得られた。従って、これらのパラメータが、機械的ストレスの指標に好適であるか否かを評価した。

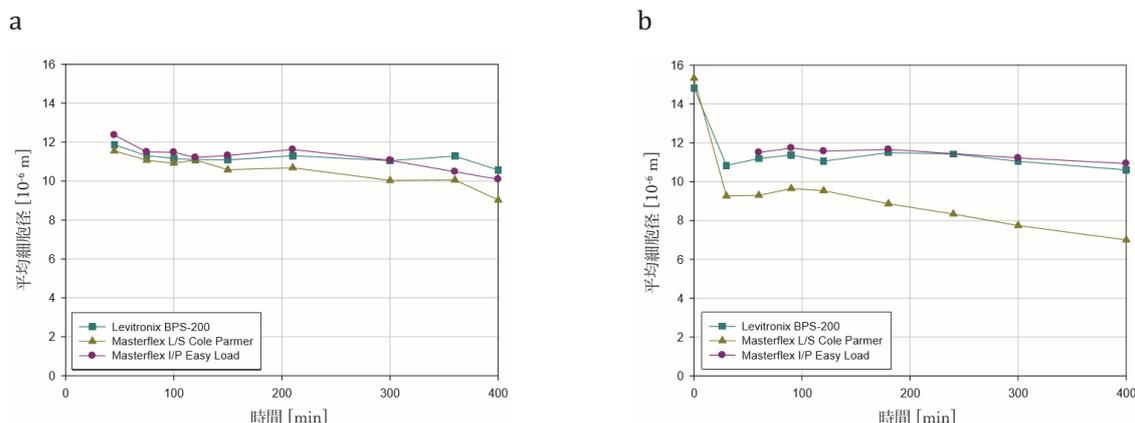


図 21 : Cedex HiRes[®]により第 3 のテストケース (a) 及び第 4 のテストケース (b) について得られた平均細胞径の時間依存性。

平均細胞径の時間依存性の典型的なグラフを図 21 に与える。培養終了時の平均細胞径は約 15 μm で、我々の実験室では、増殖期及び培養システムに応じて日常的にみられる。全調査ケースにおいて、細胞径は循環時間が長くなるにつれて減少することが見いだされた。第 3 のテストケースにおいて、Masterflex[®] L/S Cole Parmer ポンプでは、平均細胞径は約 9 μm まで低下した。背圧が最も高いときは、7 μm を下回る値すら、得られた (図 21b 参照)。一方、第 1 のテストケースにおいて、Levitronix BPS-200 では、わずかな変化しか見いだされず (データは示さない)、その際は、細胞生存率の大幅な差もまた、特定されなかった。換言すれば、細胞径の低下は、細胞のせん断ストレスの増加を意味する。我々の実験室で実現したこれまでの研究において観察されたように、この現象は、使用した CHO 細胞に化学的ストレスを与えた際にもまた、顕在化している。

図 22 に示すように、機械的ストレスを与えられた細胞では、第 2 のピークがヒストグラム中のより小さな細胞径に見られた。これは、2 つの細胞径が頻繁に見つかることを意味する。このことは、細胞破碎及び細胞残屑の形成により説明できる。しかし、機械的ストレスともたらされた細胞径との間に、明確な相関関係は見つからなかった。このような理由により、細胞径は、せん断ストレスの定性的基準としてのみ使用すべきである。

さらに、細胞密度及び凝集率の変化が見られたが、細胞径とは対照的に、これらの 2 つのパラメータについて全体的な傾向は確認できなかった (データは示さない)。従って、それらは機械的ストレスを評価するのに適していないようである。

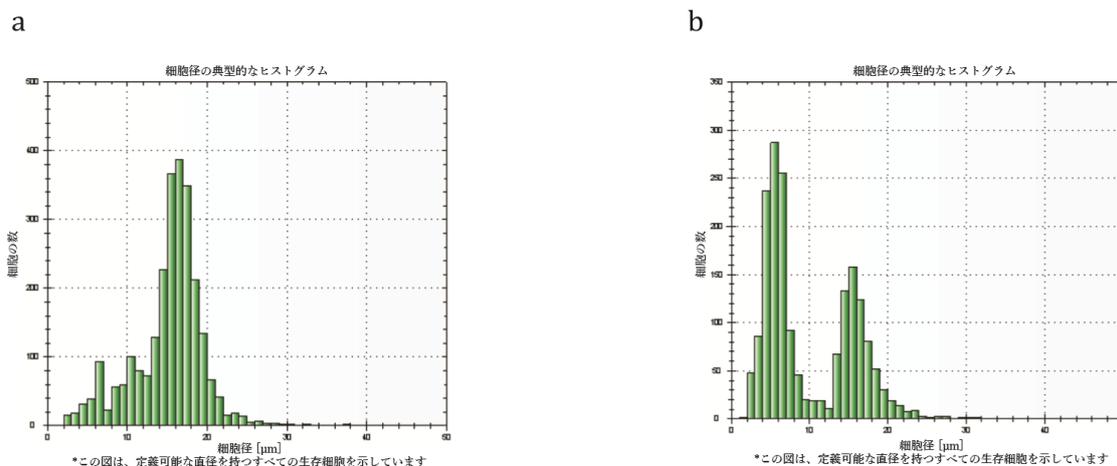


図 22： (a) ストレスを受けていない細胞及び (b) 機械的ストレスを受けた細胞の、セルカウンター Cedex HiRes により得られた細胞径の典型的なヒストグラム。

3.5. 細胞死動力学による機械的ストレス評価

これまでのセクションで述べられたように、懸濁 CHO 細胞にもたらされた機械的ストレスを、生細胞密度、及び生細胞密度の全細胞密度に対する比である生存率の時間依存性によって評価した。しかし、異なる機械的ストレス値を単に経時変化の手法のみで定量的評価及び比較することは難しいので、セクション 2.4 で説明したように、一次の細胞死動力学を仮定し、各実験についての細胞死速度を計算した。

計算した細胞死係数 k_D 及び決定係数 R^2 を表 7 に要約した。概して、BPS-200 遠心ポンプの死定数は、調査範囲全体に渡って、ペリスタポンプの死定数よりも著しく低いことが理解できる。 k_D (生細胞密度の経時変化を対数値の傾きにより表わす) が低い値であるため、回帰モデルでは決定係数が (0.162~0.544) となりむしろ不確実な値となった。対照的に、ペリスタポンプにおいては優れた近似が見られた ($R^2 > 0.85$)、このことは、生細胞密度が一次速度式によって十分に予想されることを示している。

表 7：細胞死動力学の回帰分析結果。

流速 [L/min]	圧力 [mbar]	Levitronix BPS-200		Masterflex® L/S Cole Parmer		Masterflex® I/P Easy Load	
		k_D [h^{-1}]	R^2 [-]	k_D [h^{-1}]	R^2 [-]	k_D [h^{-1}]	R^2 [-]
3.4	6.5	0.009	0.203	0.141	0.903	0.052	0.946
3.4	253	0.020	0.272	0.133	0.982	0.046	0.996
3.4	385	0.017	0.544	0.077	0.894	0.045	0.876
3.4	567	0.013	0.162	0.072	0.769	0.075	0.933

Levitronix BPS-200 に対して得られた細胞死係数は第 2 のケースでは、第 1 のケースより増加した (k_D は 0.009h^{-1} から 0.02h^{-1} へとおよそ 2 倍になっている)。機械的ストレスがより高くなったことには、2 つの理由がありうる。1 つは、より高い機械的ストレスはポンプそのものによりもたらされ得る。CFD シミュレーション [Zhang et al. (2006)] が示すように、ポンプ速度が増すほど、ポンプ内での流体速度は増す。流体速度がより速いこと (ポンプブレードの先端速度がより速いことに対応する) が、レイノルズ数により定量化されるより速い乱流をもたらす。Chua ら (2006) は、レイノルズ数約 78'500 が 2000 rpm の回転速度に対応すると推定したが、このレイノルズ数は、細胞培養プロセス中に観測される典型的なレイノルズ数よりもずっと高い。流体速度の、三次元確率論的時間ゆらぎとして定義される乱流は、多くの場合細胞培養液にもたらされる機械的ストレスの原因となる [Chisti (1993) ; Christi (2000) ; Wollny (2000)] 。

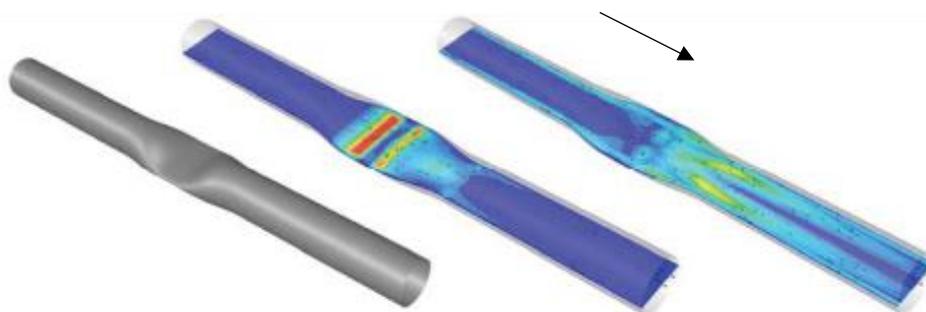


図 23 : CFD で予測した、生物学的実験で使用した形状と同様に締め付けられたチューブ内部の、垂直 (中央) 勾配及びせん断勾配 (右側)。赤色は高い値を表し、青色は低い値を示す。主要な流れ方向は矢印及び流体速度ベクトルにより示されている。

一方では、第 2 のケースにおけるより高い細胞損傷はチューブの締め付けにより説明され得る。同じ 3.4 L/min の流速を達成するためチューブをホースクリップで締め付け、約 250 mbar というより高い背圧を生じさせた。このようにすると、閉ループに、せん断勾配及び垂直勾配が増した追加的な乱流領域が導入される (図 23 参照)。文献中で、細胞は垂直勾配あるいはせん断勾配のどちらかにより強く影響されるかが議論されているが [Wollny (2010)]、乱流に加えて、大きな速度勾配が流体力学的応力の主要な理由と考えられている。しかしながら、2 つのペリスタポンプにより得られた細胞死係数は 2 つの圧力間では、大きく変化しない (図 23 を比較すること)。従って、Levitronix BPS-200 pump について、第 2 のテストケースで得られたより高い流体力学的ストレスは、圧力損失を引き起こす各々の締め付けの結果ではなく、ポンプ内のより高い回転速度の結果であると議論できる。

予想に反して (しかし、すでに活力の経時変化で示されている)、細胞死係数は第 3 及び第 4 のテストケース (より速い回転速度を伴う各圧力を示す) で増加しなかった。Levitronix BPS-200 に対して、算出された k_D は 4200 rpm 及び 5000 rpm に対して、それぞれ 0.017 h^{-1} 及び 0.013 h^{-1} であった。Masterflex® I/P Cole Parmer では、より高いポンプ速度に対して、 k_D の低下すら観察された。ここで、細胞死係数はわずか、約 0.075 h^{-1} であった。

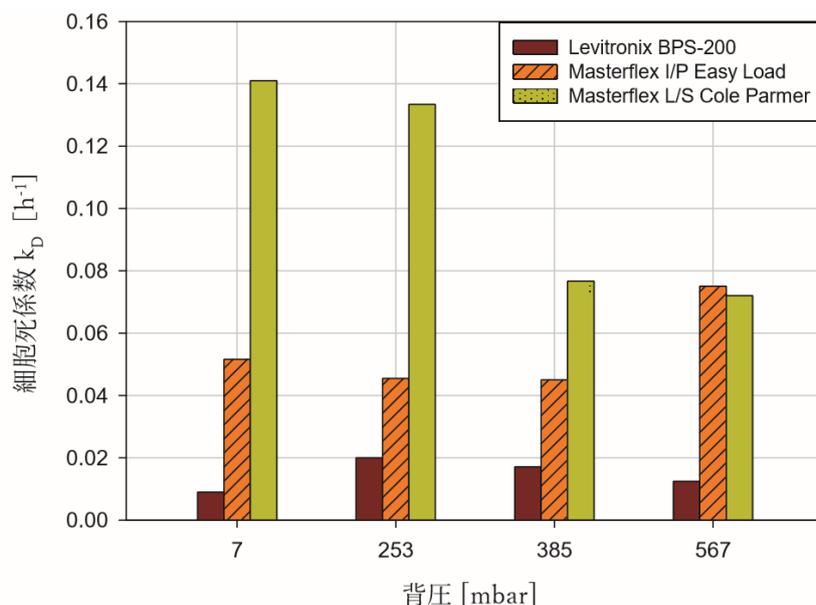


図 24：3つのポンプについて、Levitronix BPS-200 の回転速度と対照して得られた細胞死係数。

セクション 3.4.3 及び 3.4.4 で説明したように、細胞培養に関する主な違いは、循環実験の開始時に対して培養終了時に残存するグルコースがかなり高濃度なことであった。2.0 x 10⁶ cells/mL 及び 2.5 x 10⁶ cells/mL に比べてわずかに高い、3.0 x 10⁶ cells/mL の細胞密度は、結果に有意な影響を有するとは予想されない。セクション 3.4.3 で上述したように、残存するグルコースは消費されたが、細胞増殖は観察されなかった。従って、基質は維持代謝に消費され、このことが、もしかしたら、細胞培養液が流体力学的ストレスに抵抗する上で、潜在的に好ましい効果を有するかもしれないと議論できる。加えて、最初の 2 つの実験に使用された細胞は、おそらくグルタミン及びグルコース濃度が低いことにより、化学的にストレスを受けたのではないと思われる。グルコースはほとんどの細胞系に必須の炭素供給源であり、グルタミンはプリン、ピリミジン及びアミノ糖の合成に重要な供給源である [Kretzmar (2000)]。

アポトーシスは、低基質濃度又は最適以下の pH 値等の化学的ストレスに誘発され、細胞培養液が機械的により損傷を受けやすくなるということは周知である。しかしながら、化学的ストレス及び機械的ストレスの組み合わせについての文献のデータは見つからなかった。従って、これらの現象はさらに検証しなければならない。

4. 結論と展望

本プロジェクトの目的は、磁気駆動の遠心ポンプ Levitronix BPS-200 によって懸濁 CHO 細胞にもたらされる機械的ストレスを評価することであった。この目的のために、1500~5000 rpm の範囲において異なる回転速度で調査を行った。

機械的ストレスを評価するための、異なるパラメータを試験した。予備的試験では、プロジェクト計画において提案されているように、ポンプ試験への適合性があるかを、Chemometec 社により提供された活力アッセイで調査を行った。予想に反して、細胞増殖、細胞死と、活力

(細胞の還元チオール含有量により示される)との間に関係は見いだされなかった。2つの異なる自動セルカウンター、NucleoCounter® NC-100 及び Cedex HiRes により、生細胞密度及び生存率について、より望ましい結果を得た。細胞が機械的ストレスを受けた場合は、生細胞密度の明らかな減少を測定した。平均細胞径及び細胞密度等の追加のパラメータを評価した。細胞径及びその分布は、機械的ストレスの指標に適していることが示されたが、定量的相関を見いだすことはできなかった。

異なるポンプによりもたらされる懸濁 CHO 細胞への機械的ストレスは、概ね、検証することができた。最初の2つの実験では、遠心ポンプについて、ポンプ速度(圧力にも対応する)が増すと、細胞損傷も激しくなることが、細胞死率の増加により示された。第3及び第4のテストケースは、ポンプ速度を更に増加させても、おそらく培地中に残存する基質の結果であるが、さらに細胞損傷が激しくなる訳ではないことを示した。以前に述べたように、化学的ストレスにより誘発されることが知られている、病理学的なプロセス(アポトーシス)が、影響していると予想される。動物細胞の代謝及び動物細胞のせん断ストレスへの応答は、かなり複雑である [Kretzmer (2000)]。従って、これらの現象はさらに検証しなければならない。

異なるポンプと試験条件間で、機械的ストレスを定量化し、定量的に比較するため、一次の細胞死動力学を仮定し、回帰モデルを構築した。ペリスタポンプについては、良好な近似(決定係数で表される)が得られた。Levitronix BPS-200 遠心ポンプについては、細胞死係数は著しく小さい決定係数(R^2)が見いだされたが、これは、調節された回転速度に応じて生細胞密度が低下しない、又はわずかに低下しただけであるので、妥当である。したがって、提案された回帰モデルは機械的ストレスを評価するためのさらなる調査に使用できると言える。

異なる調査では、異なる流速の影響も考慮すべきである。本研究では、すべての試験を流速 3.4 L/min で実現した。細胞収容容器及びチューブ内の全液量は 3.4 リットルにし、細胞が完全ループを1分以内に循環するようにした。血液を使用した実験では、溶血レベルは機械的ストレスの大きさ及び暴露時間の両方に依存することが実証されている [Bludszuweit (1995) ; Giersiepen et al. (1990) ; Yeleswarapu et al. (1995)]。細胞懸濁液のポンプ内部における滞留時間に対応する暴露時間は、異なる流速及びワーキングボリュームにより変化させることができた。

さらに、非生物学的試験システムでの調査も行うべきである。本研究では、機械的ストレスへの応答の変化は、使用される細胞培養液の条件(培養ブロスの組成物等)に起因する可能性があった。文献では、水中油型エマルジョン又は粘土・ポリマー粒子等の異なる試験システムが記載されている [Wollny (2010) , Stintzing et al. (2008)]。粒径又は滴径(分布)は流体力学的力に依存し、機械的ストレスの指標として使用することが可能であることが証明されている。これらのシステムの主要な利点は、生物学的実験と比較して、再現性が高く、コストを低減できることである。

5. 参考

- Alias CB, Lopez MCG, Fernandez FGA, Sevilla IMF, Sanchez JLG & Molina-Grima E. (2004). Influence of power supply in the feasibility of phaeodactylum tricornutum cultures. *Biotechnol Bioeng* 87: 23-733.
- Bludszuweit C (1995). Three-dimensional numerical prediction of stress loading Of blood particles in a centrifugal pump.
- Artif Organs, 19: 590—596 Boccafoschi F, Bosetti M, Sandra PM, Leigheb M & Cannas M (2010). Effects of mechanical stress on cell adhesion: A possible mechanism for morphological changes. *Cell Adh Migr*. 4: 19-25.
- Chisti, Y. (1993). Animal cell culture in stirred bioreactors: Observations on scale-up. *Bioprocess Eng*. 9: 191-196.
- Chisti, Y. (2000). Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends Biotechnol*. 18: 420-432.
- Chua LP, Song G, Lim TM & Zhou T (2006). Numerical analysis of the inner flow field of a biocentrifugal blood pump. *Artif Organs* 30: 467-477.
- Eibl R & Eibl D (2007). Disposable bioreactors for inoculum production and protein expression. In: *Methods in Biotechnolow*, Vol. 24: *Animal Cell Biotechnology*. Methods and Protocols, 2nd Ed., edited by: R. Pörtner, Humana Press, Inc., Totowa, NJ.
- Giersiepen M, Wurzinger LJ, Opitz R & Reul H (1990). Estimation of shear stress-related blood damage in heart valve prostheses — in Vitro comparison of 25 aortic valves. *Int J Artificial Organs*. 13: 300-306.
- Hahn J (2010). Hemolysis study — pump versus bearingless centrifugal pump. Test review, provided by Levitronix.
- Jaouen P, Vandanjon L & Querneneur F (1991). The shear of microalgal cell suspensions (*Tetraselmis suecica*) in tangential flow filtration systems: the role of pumps. *Bioresour Technol*. 68: 149-154.
- Kamaraju H, Wetzel K & Kelly WI (2010). Modeling shear-induced CHO cell damage in a rotary positive displacement pump. *Biocatalysts and Bioreactor Design*. Published online, DOI: 10.1002/btpr.479.
- Kretzmer G (2000). Influence Of stress on adherent cells. In: *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* (ed. T. Scheper), Vol. 67: *Influence Of stress on cell growth and product formation*, Springer: Berlin, Heidelberg.
- Langer G & Deppe A (2000). Zum Verständnis der hydrodynamischen Beanspruchung von partikeln in turbulenten Rührerströmungen. *Chem Ing Tech*. 72: 31-41.

- Mardikar SH & Niranjan K (2000). Observations on the shear damage to different animal cells in a concentric viscometer. *Biotechnol Bioeng.* 68: 697-704.
- McQueen A & Bailey J (1989). Influence Of serum level, cell line, flow type and Viscosity on flow- induced of suspended animal cells. *Biotechnol Lett.* 11: 531-536.
- Mollet M, Ma N, Zhou Y, Brodkey R, Taticek R & Chalmers J. (2004). Bioprocess equipment: characterization of energy dissipation rate and its potential to damage cells. *Biotechnol Prog.* 20: 1437-1448.
- Ries C, Riesen N & Eibl R (2010). Usage of the Nucleocounter@ NC-300V for advanced cell analyses in insect cell derived processes. Poster presented at BioTech2010 Conference, ZHAW Wädenswil.
- Stintzing A, Pilz RD, Hempel DC & Krull R (2008). Mechanische Beanspruchungen in Mehrphasenreaktoren. *Chem Ing Tech.* 80: 1837-1842.
- Thomas CR (1993). Review: shear effects on cells in bioreactors. *Process Sol-Liq Suspensions.* 158-191.
- Transonic systems (2010). H-XL sterile tubing flow sensors for the HTI 1 O(R) bypass flow meter. Website, URL: <http://www.transonic.com/flowsensors.shtml>, last request: 09.12.2010.
- Wollny S (2010). Experimentelle und numerische Untersuchungen zur Partikelbeanspruchung in gerührten (Bio-) Reaktoren. (Dissertation) Technische Universität Berlin.
- Vandanjon N, Rossignol N, Jaouen P, Robert JM & Quemeneur F (1999). Effects of shear on two microalgae species. Contribution of pumps and valves in flow filtration systems. *Biotechnol Bioeng.* 63: 1-9.
- Yeleswarapu KK, Antaki JF, Kameneva MV & Rajagopal KR (1995). A mathematical model for shear-induced hemolysis. *Artif Organs,* 19: 576—582.
- Zhang J, Gellman B, Koert A, Dasse KA, Gilbert RJ, Griffith BP & Wu ZJ (2006). Computational and experimental evaluation of the fluid dynamics and hemocompatibility of the CentriMag blood pump. *Artif Organs.* 30: 168-177.

6. 付録

アプリケーションノート - 活力アッセイ



NucleoCounter® NC-3000™

Vitality assay: Analysis of the level of cellular thiols using the NucleoCounter® NC-3000™ system

Product description

The NucleoCounter® NC-3000™ system enables the user to perform automated cell counting and analyses of a broad range of eukaryotic cells.

Application

This protocol for the NucleoCounter® NC-3000™ system enables the user to detect changes in the intracellular level of (reduced) thiols. Such changes may occur in apoptotic cells or cells undergoing other pathological processes. As the intracellular reducing power available to the cell is an indicator of overall health status, this assay provides a very easy and fast way to evaluate cell vitality.

Introduction

This application note describes a method for investigating apoptosis and cell health by determining the level of free thiols such as reduced glutathione. The tripeptide glutathione exists in two forms, a reduced state (GSH) and in an oxidized state; glutathione disulfide (GSSG). In the reduced state the thiol group of cysteine is able to donate a reducing equivalent ($H^+ + e^-$) to unstable molecules such as free radicals. In donating an electron, glutathione itself becomes reactive, but readily reacts with another reactive glutathione to form GSSG. GSH can be regenerated from GSSG by the enzyme glutathione reductase. (See **Figure 1**.)

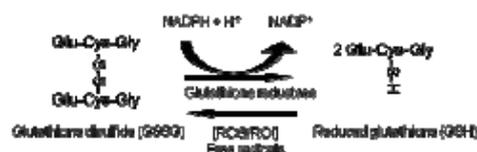


Figure 1. Glutathione redox cycle. The flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent enzyme, glutathione reductase reduces GSSG to GSH. When the cell encounters free radicals, the antioxidant GSH reduces the free radicals, thereby itself becoming oxidized to GSSG.

GSH is the most abundant low molecular weight thiol in animal cells; thus, its oxidation status largely determines the thiol-disulfide status of the cell by thiol-disulfide interchange reactions. Moreover, GSH is involved in many cellular processes including quenching of free radicals, drug detoxification, cell signaling, and cell proliferation. Alterations in the concentration of intracellular GSH have been demonstrated as a common feature of many diseases including AIDS, neurodegenerative diseases, and cancer.

A decrease in cellular GSH concentration is an early hallmark in the progression of cell death in response to different apoptotic stimuli. Studies have shown a correlation between cellular GSH depletion and the progression of apoptosis. The decrease in GSH level in connection to apoptosis seems to be attributed to two mechanisms; A) direct GSH oxidation promoted by radicals and B) export of GSH through an ATP-dependent plasma membrane transport system which is triggered by the initiation of apoptosis. When GSH is depleted, the cytosol is shifted from a reducing to an oxidizing environment, which may lead to a further depletion of GSH.

This assay provides a very easy method to quantify the amount of free thiols at the single cell level. The stain VitaBright-48 (which is a component of **Solution 5**) immediately reacts with thiols forming a fluorescent product. By quantifying the fluorescence it is possible to determine the level of cellular thiols, and thus determine cell health.

Principle

In this application note, a method for measuring the cellular level of thiols is described. The cells to be investigated are mixed with **Solution 5**. The solution contains three different reagents: a stain staining all nucleated cells, a stain staining dead cells only and VitaBright-48™ which stains viable cells in an intensity-dependent manner depending on their level of thiols. A high fluorescence intensity of a particular cell indicates that the cell has a high level of thiols such as GSH.



The stained cells are immediately loaded into a NC-Slide: either the 2-chamber NC-Slide A2™ or the 8-chamber NC-Slide A8™. Samples are analyzed using the NC-3000 system. A fluorescence intensity histogram showing the distribution of thiol levels in all cells are

displayed on the PC screen. By comparing histograms of treated cells to controls the fraction of cells with low vitality (e.g. apoptotic or stressed cells) can be determined.

Procedures

If the cell line to be investigated is adherent or semi-adherent, then start by getting all cells into suspension using the preferred method of your laboratory (e.g. trypsin/EDTA treatment). Although the NucleoCounter® NC-3000™ is able to count aggregated cells, the accuracy is higher for single cell suspensions.

Materials needed

- Cells to be stained ^{1,2}
- **Solution 5** (VB-48-PI-AO)
- **NC-Slide A2™** or **NC-Slide A8™**

¹ Cells provided by the user.

² An untreated control should be included. Preferable, use logarithmically proliferating cells as control.

1. Pipette a representative cell sample from the cell suspension into a microcentrifuge tube. Add one volume of **Solution 5** into 20 volumes of the cell suspension. E.g., if the volume of the cell suspension is 190 µL then add 10 µL **Solution 5**. Mix by pipetting.
2. Engage NucleoCounter® NC-3000™ by starting the accompanying software.
3. Depending on the number of samples a 2-chamber slide (**NC-Slide A2™**) or an 8-chamber slide (**NC-Slide A8™**) can be used.
 - a. **NC-Slide A2™**: Load 30 µl of each of the cell suspensions into the chambers of the NC-Slide. Place the loaded NC-Slide on the tray of the NucleoCounter® NC-3000™ and select "**Vitality protocol**" and sample unit **NC-Slide A2™** and press RUN.
 - b. **NC-Slide A8™**: Load 8 µl of each of the cell suspensions into the chambers of the NC-Slide. Place the loaded NC-Slide on the tray of the NucleoCounter® NC-3000™ and select "**Vitality protocol**" and sample unit **NC-Slide A8™** and press RUN.

Cellular fluorescence is quantified by NC-3000 and the VitaBright-48 intensity is displayed in a histogram. Cells with a low level of thiols (e.g. apoptotic cells) also have a low intensity score, and are thus found in the lower end of the histogram. By placing the marker in the histogram, the user can divide the cell population into two (or more) subpopulations; e.g. divide the cell population into a fraction of cells with a low thiol level and another fraction with high thiol level, and if desired, an intermediate thiol level cell subpopulation. Typically the histogram shows two distinct populations, and in this case the marker is placed in between the two peaks (See example in **Figure 2**). The markers can be stored and retrieved in a new histogram. Thus, the position for the markers can be determined using an untreated control, and then retrieved for the treated cell sample. As nonviable cells always have a very low level of thiols, only the fluorescence intensity of viable cells is represented in the histogram.

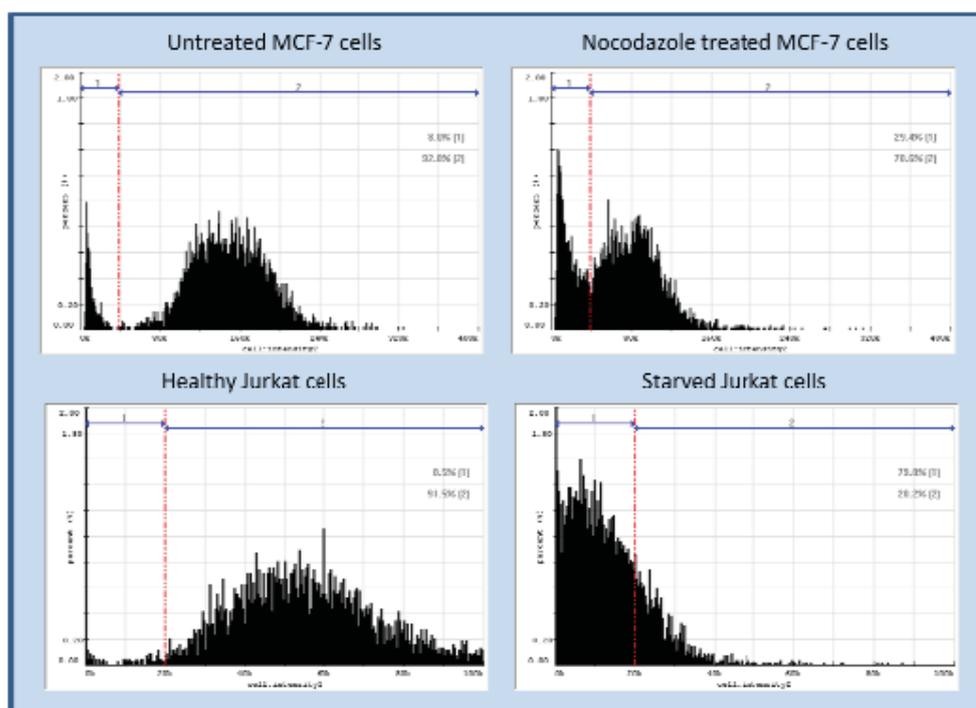


Figure 2. Fluorescence intensity histogram for untreated MCF7 cells (upper left panel) and nocodazole treated MCF7 cells (upper right panel). Nocodazole treatment causes a decrease in the level of thiols in a subpopulation of cells (cells with low fluorescence intensity). The marker is placed in between the two populations in the first histogram (untreated MCF7 cells). Storing and retrieving the stored marker in the second histogram (nocodazole treated MCF7 cells) makes quantitative comparison possible. Below is fluorescence intensity histogram for healthy Jurkat cells (lower left panel) and starved Jurkat cells (lower right panel). Starvation causes a decrease in the thiol level of the cell population seen as a decrease in fluorescence intensity.

Note

To assure reliable results, it is recommended that the total cell concentration of the cell suspension should be in the range of $5 \cdot 10^4$ cells/mL to $5 \cdot 10^6$ cells/mL. If the concentration of cells is below $5 \cdot 10^4$ cells/mL then the cell concentration may be increased by centrifugation followed by resuspension of the pellet using growth media or PBS. The resuspended cell sample is then treated as described above.

If the total cell concentration is above $5 \cdot 10^6$ cells/mL, the cell suspension can be diluted with growth media or PBS to achieve the desired concentration. The diluted cell sample is then treated as described in the procedure.