

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 4 連式ダイアフラムポンプ)

2011 年 8 月

Stephan Kaiser
Christian Löffelholz
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. 細胞密度及び生存率の定量.....	5
2.3. 継代培養.....	5
2.4. 反応速度論.....	6
2.5. 試験装置及び構成部品.....	7
2.6. 調製及び試験手順.....	10
2.7. 試験装置の評価.....	11
2.7.1. 流速.....	11
2.7.2. BPS-600 ポンプの特性.....	11
3. 結果.....	13
3.1. 生細胞密度の決定.....	13
3.1.1. 第1のテストケース.....	13
3.1.2. 第2のテストケース.....	16
3.1.3. 第3のテストケース.....	18
3.2. 細胞死速度による機械的ストレス評価.....	20
3.3. 継代培養実験の結果.....	21
4. 議論.....	23
5. 要約.....	26
6. 参考.....	27
7. 付録.....	28

1. 緒言

先の研究では、我々は、Levitronix BPS-200 及び MDP-200 遠心型ポンプが懸濁 CHO 細胞にもたらす流体力学的ストレスを調査した [ZHAW report 2011, ZHAW report 2011a]。生存率及び生細胞数を、2つのペリスタポンプ、マスターフレックス® I/P イージーロード及びマスターフレックス® L/S コールパーマーと比較した。Levitronix ポンプがもたらす機械的細胞損傷は、一定流速 3.4 L/min、背圧約 25~710 mbar で、大幅に低いことが見出された。

以下の研究の目的は最大差圧 3.2 bar で最大 75 L/min と、より高流速を実現するように設計された、磁力によって浮上させた遠心ポンプ Levitronix BPS-600 が懸濁 CHO 細胞にもたらす機械的ストレスを評価することである。この目的のために、先の研究に相当する種々の動作条件を調査した。4 連式ダイアフラムポンプ (Quattroflow 1200-SU) を比較システムとして利用した (セクション 2.5 を参照)。加えて、CHO 細胞を、振とうさせた振とうフラスコ及び振とうさせていない振とうフラスコ (静置培養とも称する) で培養した。フラスコ内部のせん断ストレスは、無視できる程度である。

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

先の研究 [ZHAW report 2011a] と類似の手法で細胞増殖を実現した。要約すると、懸濁 CHO 細胞 (CHO XM111-10) を、シングルユースウェーブミックスシステム BIostat® CultiBag RM 20L (ザルトリウス・ステディム・バイオテック) において、最大ワーキングボリューム 11 リットルで培養した。Pluronic F-68 及びテトラサイクリンを加えた既知組成培地 (HP-1, Cell Culture Technologies, スイス) を使用した。テトラサイクリンは微生物汚染を防止するために補給したわけではなく、細胞株が tet-off 細胞株なので、細胞増殖に強く必要であった。これは、テトラサイクリンは細胞増殖に必要であり、適切な生成物、(SEAP) 分泌物を得るには、テトラサイクリンがないことが保証されなければならない、ということの意味する。しかしながら、タンパク質生成は本研究の一部ではなかった。

振とうフラスコ (最大ワーキングボリューム 200 mL) から、初期のワーキングボリューム 2.0 L、かつ細胞密度約 0.5×10^6 cells/mL で、バイオリアクターに細胞を播種した。培養を、新鮮な媒質を 3、5 及び 2 リットルずつ添加する、流加培養モードで実現した (図 1 参照)。確実に十分な混合及び酸素供給を行うため、充填度に応じて、揺動動作を、揺動角度及び揺動速度が増加するよう変化させた (揺動速度角度は $6^\circ \sim 7^\circ$ 、揺動速度は 15~24 rpm)。

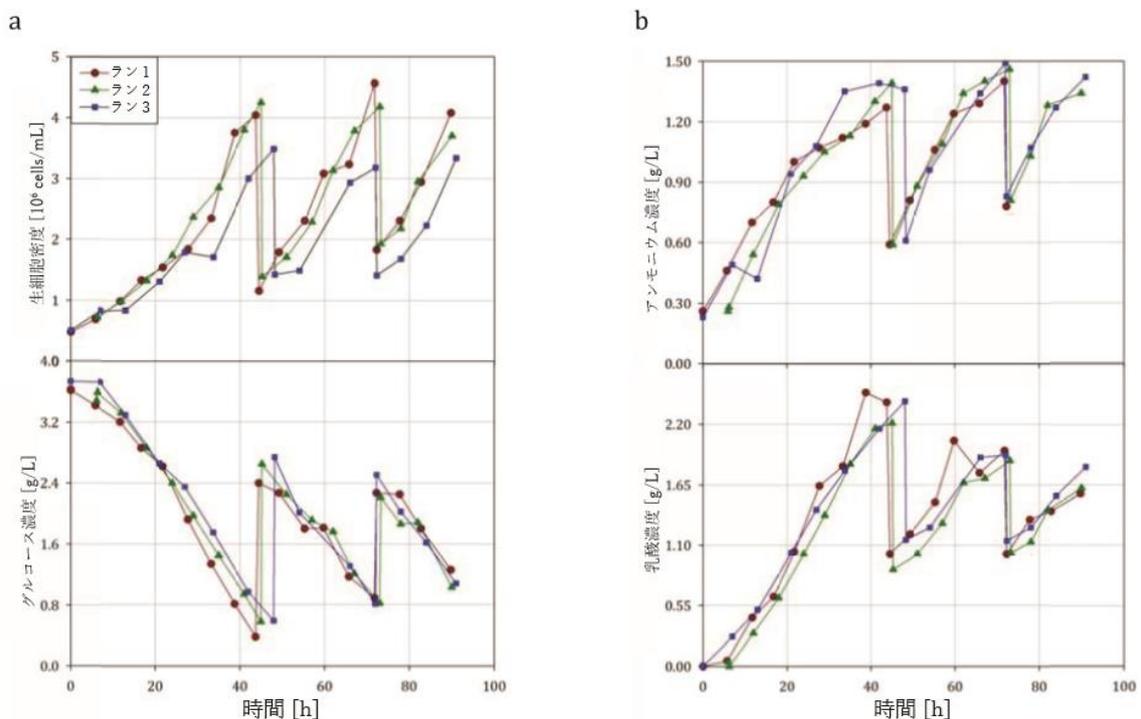


図 1: 流加培養モードでの懸濁 CHO 細胞を有する 3 つの培養液の、(a) 生細胞密度及びグルコースのプロファイル並びに (b) アンモニウム及び乳酸濃度のプロファイル。記号: 丸: ラン 1; 三角: ラン 2; 四角: ラン 3

プロセス中の制御を行うため、2 ml のサンプルを滅菌済シリンジで少なくとも 1 日に 3 回採取した。生細胞及び全細胞密度を、セルカウンター NucleoCounter® NC-100 (ChemoMetec, デンマーク) により自動測定した (セクション 2.2 参照)。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。図 1 に示すように、3 つの培養液の濃度プロファイルはかなり類似しており、生細胞及び主要な代謝産物の両方の最終濃度は、十分に同等であると言える。

2.2. 細胞密度及び生存率の定量

全細胞密度及び生細胞密度を、細胞計数装置、NucleoCounter® NC-100 (ChemoMetec, デンマーク) で自動測定した。測定は、DNA に結合した蛍光染料ヨウ化プロピジウム (PI) 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 [Shah et al. 2006]。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、VCD, 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)。

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

2.3. 継代培養

細胞は高せん断ストレスに暴露された後に更に増殖し得るか否かを調査するために、ポンプで循環させた細胞の継代培養を行った。細胞増殖及び基質消費量及び代謝産物生成量を評価した。細胞懸濁液の生存率が 50% よりも高い場合は、10 mL の循環させた細胞懸濁液を振とうフラスコへと移し、新鮮な媒質 (HP-1, 40 mL) を添加した。培養液を、37°C で約 4 日間、毎日サンプリングしつつ培養した。細胞増殖及び基質消費に応じて、新鮮な媒質を添加又は細胞培養液を継代した。

2.4. 反応速度論

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。）。

$$\frac{dVCD}{dt} = -k_D \cdot VCD \quad [2]$$

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

$$\ln(VCD(t)) = \ln(VCD_0) - k_D \cdot t \quad [3]$$

時間の関数として生細胞密度の対数をプロットすると（図 2 参照）、細胞死速度 k_D を傾きとして得ることができる。式 4 で定義される決定係数 R^2 により予想細胞死速度の質を評価した（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。）。

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_N (y_i - f_i)^2}{\sum_N (y_i - \bar{y})^2} \quad [4]$$

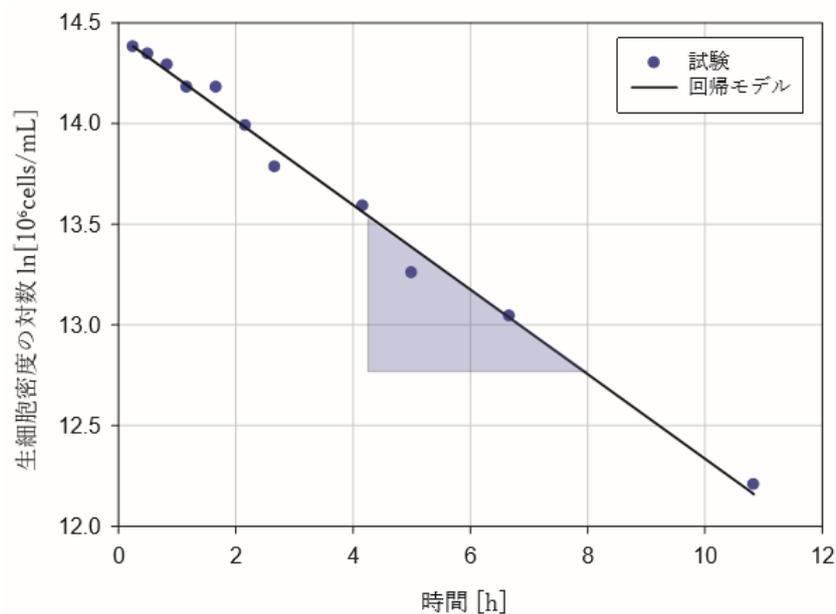


図 2： 細胞死動力学の回帰モデル。時間に対して生細胞密度の対数をプロットし、得られた関数の傾きを決定することで、細胞死係数 k_D は得られる。

2.5. 試験装置及び構成部品

ポンプ試験では、図3及び図4に示すように、3つの異なるポンプを使用した。2つのベアリングスポンプ Levitronix BPS-200 及び BPS-600 並びに比較対象として使用する4連式ダイヤフラムポンプ Quattroflow 1200-SU を調査した。加えて、標準的な培養条件下で、一方は振とうさせずもう一方は 120 rpm で振とうさせた、2つの振とうフラスコを比較対象として使用した。これらの機械的ストレスは我々の経験から無視してよい。

生物学的実験において、一定流速 3.4 L/min において、背圧を約 30~630 mbar の範囲で変更した。これらの条件を、Levitronix BPS-200 では 1500~5000 rpm、BPS-600 ポンプでは 1300~4100 rpm の範囲の回転速度で達成した (BPS-600 及び BPS-200 それぞれの最大ポンプ速度の、40%及び50%以下)。Quattroflow の速度を約 360 rpm に設定した。この速度は、最大値の、わずか約 12%である。背圧を、より小さい径 (1/4") のチューブ及びホースクリップを使用することにより変化させた。小径チューブの長さに応じて、約 150 mL の一定回路容積を確保するため、異なる長さのポンプチューブを使用した (図1参照)。ポンプ回路内の全液量は 3.4 L であったので、収容容器の平均滞留時間 1分が得られた。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シングルユース圧力センサー (Levitronix により提供された) を使用した。全構成要素を追加的データとともに表2にて示す。

細胞懸濁液を、全容積が 3.5 L である温度制御された容器 (Chemap AG) から、閉ループ内を循環させた。チューブ、コネクタ及びポンプヘッドの全てを含む完全なポンプ回路は、オートクレーブ (Systec V-150, Systec GmbH, ドイツ) で蒸気滅菌済 (121°C, 30 min) である。温度を $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に維持し、PC ベースのコントローラにより監視した。3つのテストケースに対するパラメータを、表1にまとめている。

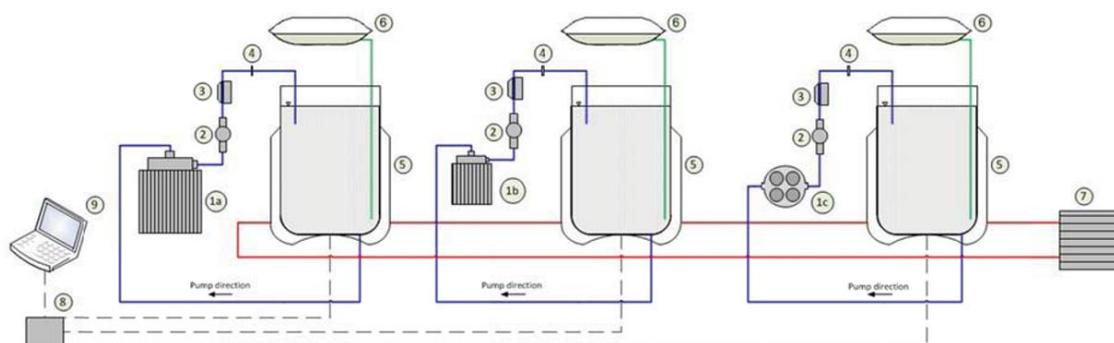
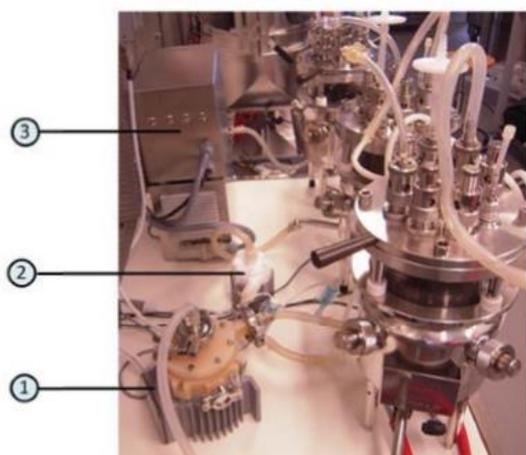


図3： 試験装置の概略図。細胞懸濁液を、3つのポンプ Levitronix BPS-600 (1a)、Levitronix BPS-200 (1b) 及び Quattroflow 1200-SU (1c) を用いて、ダブルジャケットステンレス鋼タンク (5) から閉ループ内を循環させた。圧力及び流速を、シングルユース圧力センサー (2) 及び超音波クランプオン式流量センサー (3) で監視した。配管抵抗を、径を小さくすること及びホースクリップ (4) により実現した。温度をサーモスタット (7) により調節し、PC ベースのコントローラ (8, 9) により制御した。

a



b



c

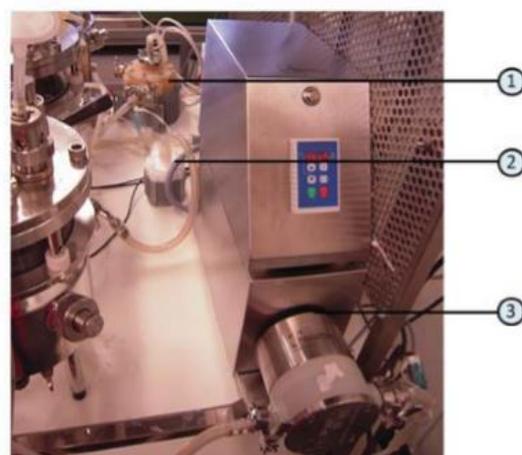


図4： 滅菌後の試験装置の写真。2つのベアリングレス Levitronix ポンプ BPS-600 (1) 及び BPS-200 (2) を、4連式ダイアフラムポンプ Quattroflow 1200-SU (3) と比較した。

表1： 調査したテストケースの説明及びパラメータ

特性	記号 / 単位	試験 1	試験 2	試験 3	注
流速	F / L min ⁻¹	3.4	3.4	3.4	・ 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。わずかな変化（± 2%未満）が生じた。
背圧	p / mmHg	23-24	220-228	457-475	・ 小径チューブ及びホースクリップによって調節した。
	p / mbar	31-32	293-304	609-633	
ポンプ速度	N / rpm				・ 値は一定に保った
BPS-200		1500	3500	5000	
BPS-600		1300	3000	4100	
Quattroflow 1200-SU		360	340	345	
小径チューブ (1/4")	L _R / mm	-	500	3000	・ 圧力及び流速を一定に保つために、配管抵抗を定期的にチューブの締付けにより再調節した。
ポンプチューブ (3/8")	L _P / mm	2250	1800	900	
全細胞培養液量	V / L	3.4			・ 培養液量及びチューブ回路内の容積
細胞培養温度	T / °C	37			・ 温度を 37 ± 0.5°Cに維持した。
測定した特性	--	生細胞密度及び全細胞密度、生存率、 基質&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）			・ 細胞密度及び生存率を、Cedex HiRes及びNucleoCounter® NC-100で見積もった。 ・ 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。

表 2: 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 C2.25 R00) ・手動操作パネル
1a	Levitronix BPS-600	<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-600.1 (ファームウェア D6.25 R04) ・手動操作パネル
1c	Quattroflow 1200-SU	<ul style="list-style-type: none"> ・4 連式ダイアフラムポンプ ・$\frac{3}{4}$"トリクランプ継手 ・5° 偏心軸
2	クランプオン流量センサー	トランソニックシステム株式会社、H9XL、超音波式
3	圧力センサー	Netech Digimano 1000、ピエゾ抵抗式センサー
4	ホースクリップ	-
5	細胞懸濁液収容容器	ステンレス鋼タンク (Chemap AG) ダブルジャケット温度制御 全容積3.5 L
6	細胞懸濁液移送バッグ	滅菌済 MPC カップリングにより、細胞収容容器と結合。
7	サーモスタット	THERMOMIX UB ウォーターバス液体再循環ヒーター (B. Braun, ドイツ)
8	Labjack データ取得デバイス	<ul style="list-style-type: none"> ・シングルエンド 8 ch、差動入力 4 ch、12 ビットアナログ入力、アナログ入力範囲$\pm 10V$ ・USB 2.0/1.1 低速インタフェース
9	PC	ソフトウェア BORIS (v 7.1) 使用によるデータ取得

2.6. 調製及び試験手順

細胞懸濁液を、MPC カップリングを使用して滅菌済容器へと移送した。移送チューブは溶接し、確実に無菌状態であるようにした。これらの作業工程はラミナーフローチャンバで行った。その後容器をサーモスタットへ再接続し、目標温度 37°C を達成した。ポンプ及びチューブを懸濁液で満たし、圧力センサーを較正し、配管抵抗を細かく調整した。その後、細胞の沈殿を避け、ポンプ試験の開始前に均質の懸濁液を得るため、細胞懸濁液を約 2 分間循環させた。

3 つの細胞懸濁液貯蔵容器から、5 mL の分量を滅菌済シリンジで定期的に採取した。最初の 1 mL は廃棄した。サンプルの全液量は約 90 mL で、液量の約 2.6% に相当する。振とうフラスコの培養液を滅菌済作業台で、ピペットを用いてサンプリングした。50 mL と培養液量が少ないため、振とうフラスコはより低頻度でサンプリングした。ポンプ試験の間、生細胞密度及び全細胞密度並びに細胞形態及び栄養素濃度を決定した。

2.7. 試験装置の評価

2.7.1. 流速

流速の信頼性を保証するため、流量センサーをポンプチューブ（Masterflex® PharmaPure 96410-36）を用いて較正した。そして、3リットルの規定液量を、収容容器から循環させるための所要時間を測定した。計算された流量をクランプオン式センサーに表示される値と比較した。図5に示すように、調査した全てのケースについて、2つの測定技術間では13%の平均差が得られた。この値は、先の実験時よりもわずかに大きく、蒸気滅菌によりチューブが変化したことに起因している可能性がある。クランプオン式センサーで測定した流速値は、従って、すべてのその後の実験において0.866倍して補正した。

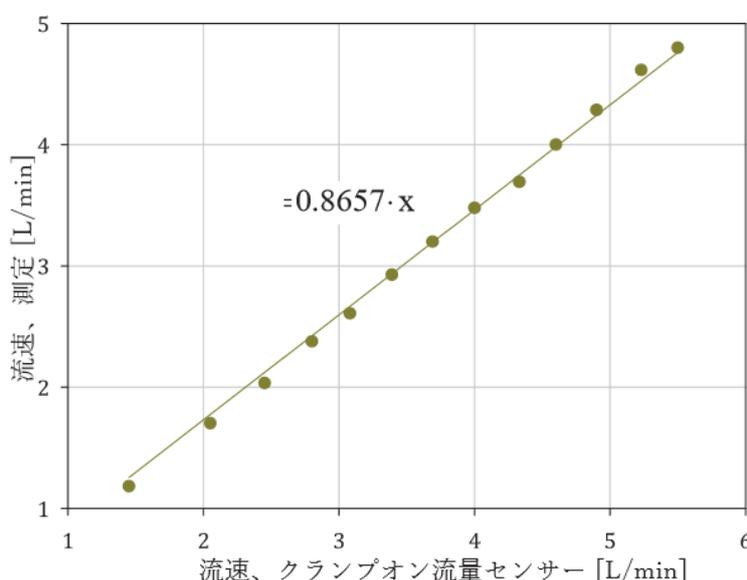


図5： ポンプ実験で使用したクランプオン式センサーが示す流速の較正。

2.7.2. BPS-600 ポンプの特性

BPS-600 ポンプの特性を決定するために、回転速度を1000～5000 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。背圧は、ポンプチューブをホースクリップで締め付けることで変化させた。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。Levitronixにより提供されたデータと対照的に、背圧の増加に伴う、明らかな流速の低下が得られた（図6参照）。このことは、流入口及び流出口間の圧力差を測定するのではなく、背圧を簡易測定したことに加えて、ポンプヘッド形状の改変による結果である可能性がある。全データポイントは、4次の多項式を使用する統計モデルにより、十分に表される（式及び付録の図19参照）：

$$F = 0.6567 - 0.0391 \cdot N - 102.0884 \cdot p + 0.0197 \cdot N^2 + 151.9624 \cdot p^2 - 2.4954 \cdot 10^{-4} \cdot N^3 - 157.4087 \cdot p^3 + 1.196 \cdot 10^{-6} \cdot N^4 + 61.6017 \cdot p^4 \quad [5]$$

式中、Fは流速（L/min）、Nはポンプ速度（rps）そして、pは背圧（bar）である。

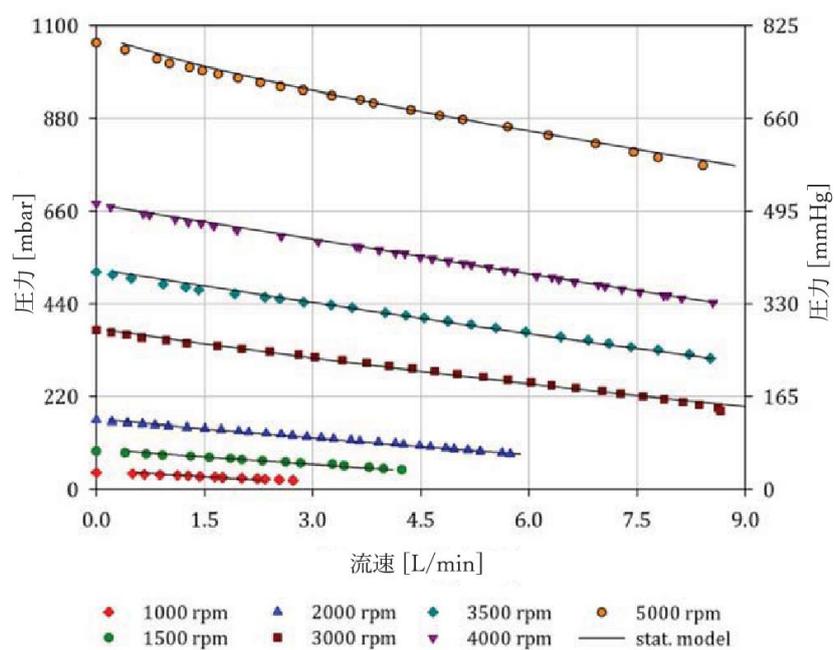


図 6： 1000～5000 rpm の異なる回転速度で見積もられた Levitronix BPS-600 遠心ポンプの特性。記号は測定データを示し、線は 4 次の多項式統計モデルにより得た。

3. 結果

3.1. 生細胞密度の決定

3.1.1. 第1のテストケース

第1のテストケースでは、Levitronix BPS-200 ポンプの回転速度を 1500 rpm に設定し、一定に保った。BPS-600 ポンプでは、所望の流速 3.4 L/min における同等の圧力条件は、1300 rpm で作動させることで得られた。4 連式ダイアフラムポンプの回転速度を、360 rpm に設定した（最大値の 12%）。ポンプチューブ内の圧力を約 31 ± 2 mbar に調節した（表 1 参照）。

循環開始時における平均の初期生細胞密度は、約 3.68×10^6 cells/mL で、生存率は 99% であった。グルコース、グルタミン及び乳酸濃度は、それぞれ 1.57 g/L、0 mmol/L 及び 1.46 g/L であった（表 3 参照）。2 L の新鮮な媒質を細胞培養の最後に添加したが、グルタミンは定量しなかった。媒質の添加によって、理論上のグルタミン濃度は約 0.15 mmol/L となるが、使用したバイオアナライザーの測定範囲の下限值未満であった（付録参照）。

表 3: 第1テストケースの循環開始時における細胞密度及び濃度の初期値。与えられたデータは、平均値並びに3つの細胞貯蔵容器培養液及び2つの振とうフラスコ培養液に対して見積もられた単純標準偏差を表す。

成分	単位	値
生細胞密度	10^6 cells/mL	3.68 ± 0.54
全細胞密度	10^6 cells/mL	3.65 ± 0.55
生存率	%	99 ± 0.15
グルタミン	mmol/L	0.00
グルタミン酸	mmol/L	0.13 ± 0.09
グルコース	g/L	1.57 ± 0.04
乳酸	g/L	1.46 ± 0.03
アンモニア	mmol/L	n.d

n.d. - 未測定

第1のテストケースで得られた全細胞密度及び生細胞密度を図7に示す。予想通り、循環させた培養液の生細胞密度は継続的に減少し、15時間後には、 $0.582 \times 10^6 \sim 2.68 \times 10^6$ cells/mLの値に到達した。4連式ダイヤフラムポンプは、全細胞密度及び生細胞密度の両方において、最も激しい減少を示し、最終的な値は、それぞれ 0.582×10^6 cells/mL 及び 1.3×10^6 cells/mL であった。顕著な差異は2つのベアリングレスポンプ間では検出されず、ポンプ接液の最後には、最終的な生細胞濃度 $2.43 \times 10^6 \sim 2.68 \times 10^6$ cells/mL を測定した。先の実験と対照的に、静止した振とうフラスコ内の細胞密度は、最初の2時間は減少したが、その後約 3.0×10^6 cells/mL から 3.6×10^6 cells/mL へと直線的に増加した。完了したプロジェクトにおいて、サンプリング間で細胞沈殿が繰り返されることに起因する酸素枯渇により、静置培養の細胞密度は、細胞死又は増殖がなく、一定のままであることが見出された。比較すると、振とうフラスコの培養液は、細胞密度が約 5×10^6 cells/mL に達するまで、約8時間にわたって典型的な細胞増殖を示した。その後細胞密度はほぼ一定であり、これは、乳酸含有量が 1.8 g/L 以上と高いことに加えて、グルコース (1.0 g/L 未満の濃度) 及びアミノ酸が制限されていることにより説明できる (図9参照)。

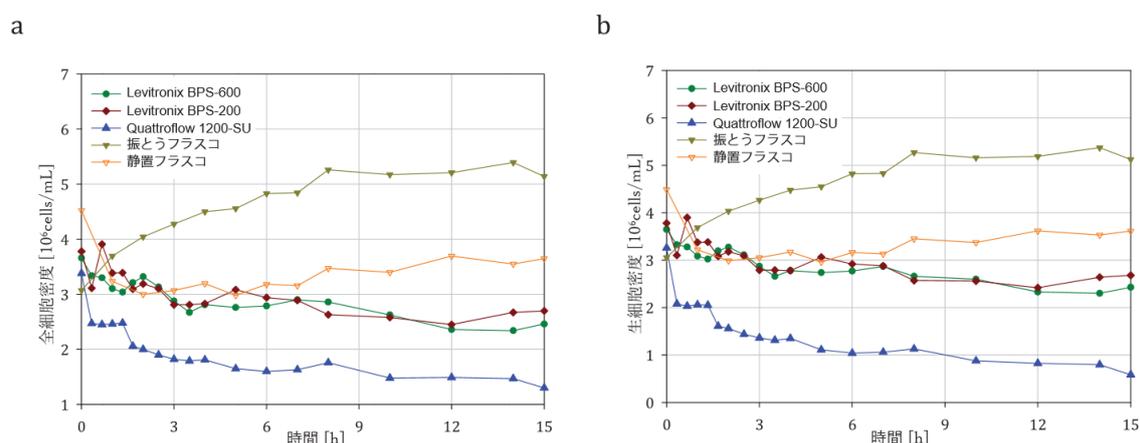


図7： 第1のテストケースで測定した全細胞密度 (a) 及び生細胞密度 (b) (31 ± 2 mbar の圧力)。

図8では、第1の試験中の細胞培養液の生存率を示す。Levitronix システムにより循環させた培養液の生存率は、プロセス全体に渡り 97%以上と高いままであった (8時間後における1つのデータポイントの例外を伴うものの、これはおそらく測定エラーの結果である)。対照的に、4連式ダイヤフラムポンプにより循環させた培養液の生存率は、実験終了時には50%未満の値まで減少した。興味深いことに、このポンプでの生存率は、実験開始時に、すでに約4%減少していた。これは、細胞沈殿を避けるために2分間の循環を実施した (セクション2.6参照) 結果である可能性がある。Quattroflow 1200-SUで循環させた培養液中のより低い生細胞密度は、図9に示すように、グルコース及び乳酸の両方が低濃度という結果をもたらした。グルコース濃度は、15時間後に約 1.2 g/L であったが、2つの Levitronix については約 0.8 g/L を測定した。2つの Levitronix については、代謝産物濃度については顕著な差異は得られな

ったが、これらの培養液中に存在する細胞密度は非常に類似しており、細胞死速度もほぼ同一であるので（セクション 3.2 参照）、必ずしも驚くべきことではない。

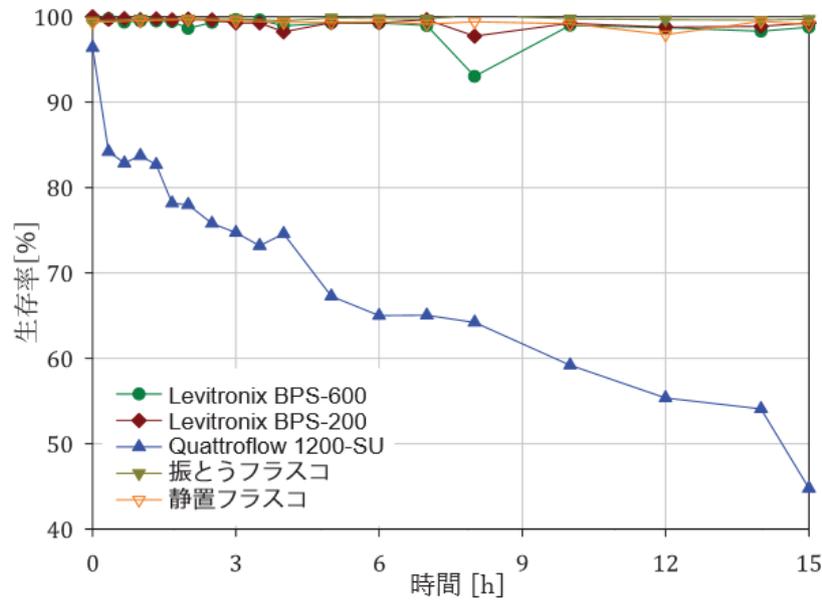


図 8： 第 1 のテストケースで得られた生存率（背圧 31 ± 2 mbar）。

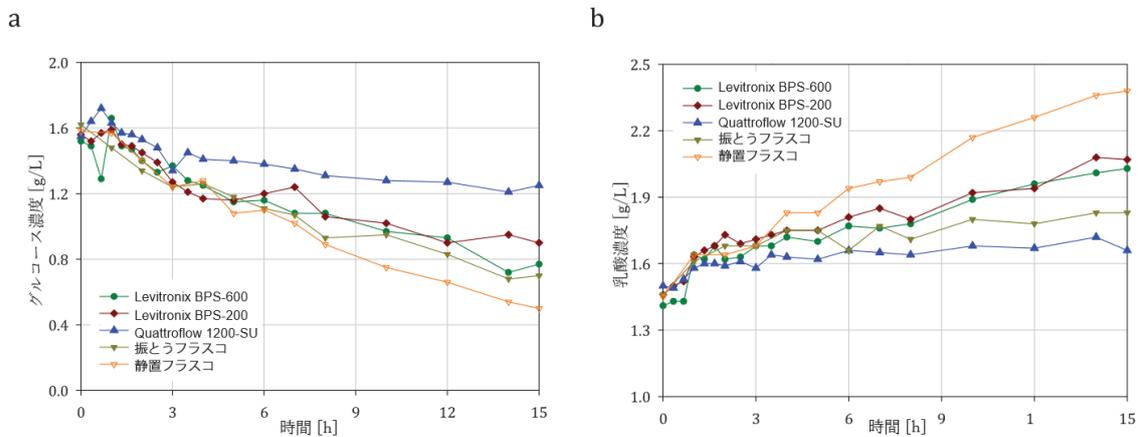


図 9： バイオアナライザー-Biopprofile 100 plus により、第 1 のテストケース（背圧 31 ± 2 mbar）において得られたグルコース (a) 及び乳酸 (b) プロファイル。

3.1.2. 第2のテストケース

第2のテストケースでは、Levitronix BPS-200 ポンプの回転速度を 3500 rpm に設定し、一定に保った。BPS-600 ポンプでは、所望の流速 3.4 L/m における同等の圧力条件は、3000 rpm で作動させることで得られた。Quattroflow 4 連式ダイヤフラムポンプの回転速度を、345 rpm に設定した（最大値の 11.5%）。ポンプチューブ内の圧力を約 300 ± 5 mbar に調節した（表 1 参照）。循環開始時における平均の初期生細胞密度は、約 2.71×10^6 cells/mL で、生存率は 97.8% であった。グルコース、グルタミン及び乳酸濃度は、それぞれ 1.57 g/L、0.14 mmol/L 及び 1.52 g/L であった（表 4 参照）。

表 4： 第2テストケースの循環開始時における細胞密度及び濃度の初期値。与えられたデータは、平均値並びに3つの細胞貯蔵容器培養液及び2つの振とうフラスコ培養液に対して見積もられた標準偏差を表す。

成分	単位	値
生細胞密度	10^6 cells/mL	2.77 ± 0.06
全細胞密度	10^6 cells/mL	2.71 ± 0.07
生存率	%	97.8 ± 2.3
グルタミン	mmol/L	0.14 ± 0.04
グルタミン酸	mmol/L	0.00
グルコース	g/L	1.57 ± 0.04
乳酸	g/L	1.52 ± 0.05
アンモニア	mmol/L	1.23 ± 0.04

第2のテストケースの間に得た全細胞密度及び生細胞密度を図 10 に与える。第1の実験と同様に、細胞濃度は、循環させた培養液でのみ減少し、細胞数の最も激しい減少は、Quattroflow で見られた。Levitronix ポンプでは、約 1.5×10^6 cells/mL の値が得られたが、Quattroflow では、生細胞密度は 0.57×10^6 cells/mL まで低下した。BPS-200 システム及び BPS-600 システム間では、わずかな違いのみを観察した。静置培養の細胞密度では、 $(3 \pm 0.5) \times 10^6$ cells/mL 近辺に留まり、明確な傾きは観察されなかった。懸濁液を振とうさせて均質な一定分量を得てはいるが、これは、サンプリング間における細胞沈殿の結果である可能性がある。振とうフラスコ内の生細胞数は 12 時間後、 4.76×10^6 cells/mL の値にまで増加した。

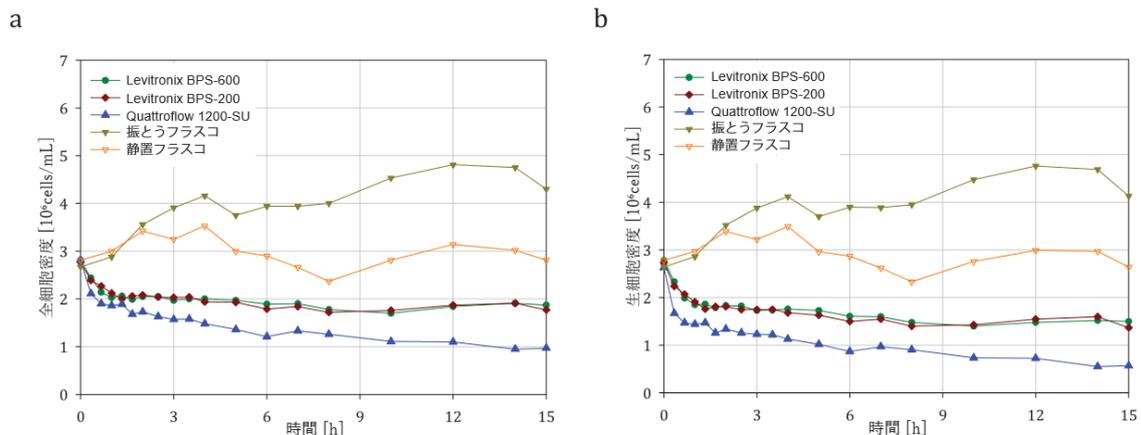


図 10： 第 2 のテストケースで、NucleoCounter NC-100 を用いて測定した全細胞密度 (a) 及び生細胞密度 (b) (背圧 300 ± 5 mbar)。

生細胞密度が示すように、2つの Levitronix ポンプ間では、生存率においてはわずかな差のみが観察された (図 11 参照)。最終的な生存率は約 80% であるが、これに対して、比較システム (Quattroflow) は、15 時間後に 58% の値を有した。第 1 のテストケースと同じように、4 連式ダイアフラムポンプでの生存率は、実質的に最初の 1 時間以内に減少している。ほぼ同一のポンプ速度 (360 rpm に代えて 345 rpm) を両テストケースで使用しているの、これは必ずしも驚くべきことではない。興味深いことに、Quattroflow ポンプの生存率は、1 時間後～3 時間後の間ではかなり一定であったが、実験の終了まで徐々に減少した。対照的に、フラスコ培養液の生存率は、プロセス全体にわたって高いまま ($> 95\%$) であった。

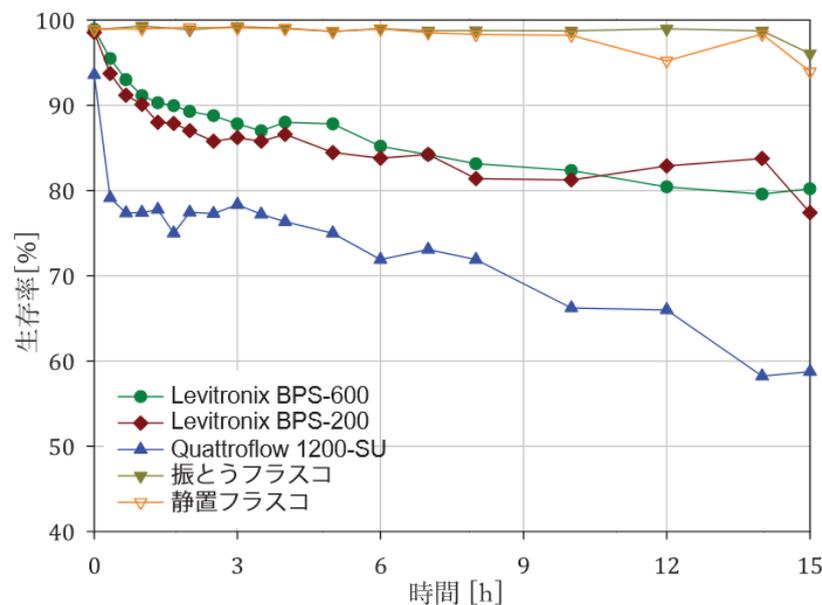


図 11： 第 2 のテストケースにおいて、NucleoCounter NC-100 を用いて得られた生存率 (背圧 300 ± 5 mbar)。

3.1.3. 第3のテストケース

第3のテストケースでは、Levitronix BPS-200の回転速度を5000 rpmに設定し、一定に保った。Levitronix BPS-600では4100 rpmで、Quattroflow 1200-SUでは345 rpmで、対応する背圧状態(420 ± 15 mbar)を得た(表1参照)。循環開始時における初期の生細胞密度は約 2.90×10^6 cells/mL、生存率は96.3%であった。グルコース、グルタミン、乳酸及びアンモニウム濃度は、それぞれ約1.44 g/L、0.22 mmol/L、1.75 g/L及び1.38 mmol/Lであった。これは、先のテストケースと同等である(表3及び表4も参照)。

表5: 第3テストケースの循環開始時における細胞密度及び濃度の初期値。与えられたデータは、平均値並びに3つの細胞貯蔵容器培養液及び2つの振とうフラスコ培養液に対して見積もられた標準偏差を表す。

成分	単位	値
生細胞密度	10^6 cells/mL	2.90 ± 0.51
全細胞密度	10^6 cells/mL	2.80 ± 0.57
生存率	%	96.3 ± 3.9
グルタミン	mmol/L	0.00
グルタミン酸	mmol/L	0.22 ± 0.04
グルコース	g/L	1.44 ± 0.08
乳酸	g/L	1.75 ± 0.06
アンモニア	mmol/L	1.38 ± 0.03

第3のテストケースで得られた全細胞密度及び生細胞密度を図12に与える。予想通り、定性的に第2のテストケースに類似した結果を得た。再び、Quattroflow 1200-SUは、全細胞密度及び細胞密度の両方において最も激しい減少を示した。最終的な値は、それぞれ 0.693×10^6 cells/mL及び 1.28×10^6 cells/mLであった。対照的に、Levitronix BPS-200及びBPS-600の生細胞密度は、それぞれ 1.46×10^6 cells/mL及び 1.40×10^6 cells/mLであった。これは、約2倍大きい値であることを意味する。興味深いことに、BPS-600の生細胞数は、初期値は最も高かった(3.26×10^6 cells/mL)が、4時間後は、BPS-200よりも約 0.2×10^6 cells/mLだけ小さかった。循環時間が長くなるに伴い、BPS-600の生存率はBPS-200と比較して2~12%の差で低下した(図13参照)。細胞死速度に関しても、その効果はまた注目に値する(セクション3.2及び図14を参照)が、このずれの理由は、解明できなかった。しかしながら、4連式ダイアフラムポンプについて得られた生存率は、またもや著しく低く(全試験時間にわたり少なくとも10%)、最終的な値は54%に達した(図13参照)。対照的に、両フラスコ培養液では細胞死は観察されず、生存率は実験の最後まで高いまま(>97%)であった。

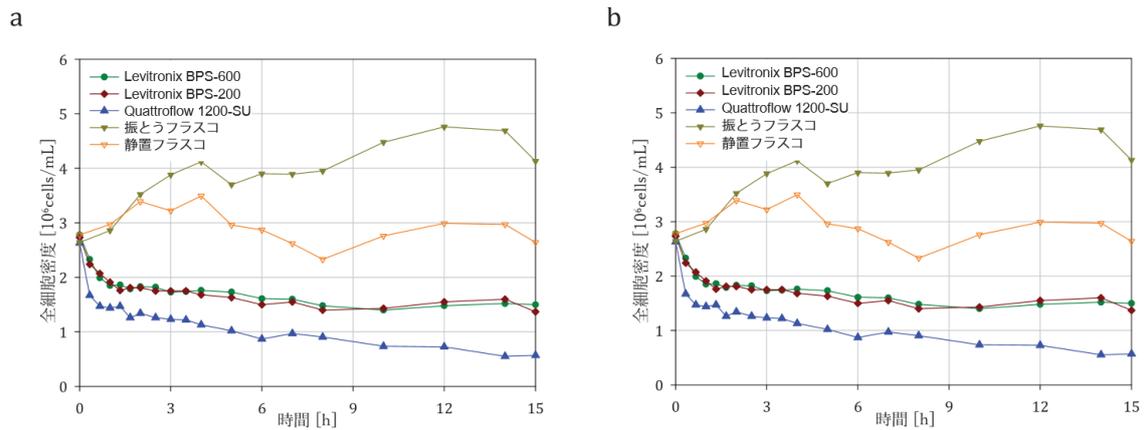


図 12： 第 3 のテストケースで、NucleoCounter NC-100 を用いて測定した全細胞密度 (a) 及び生細胞密度 (b) (背圧 620 ± 12 mbar) (翻訳者コメント: 図 a と図 b は同じ図)。

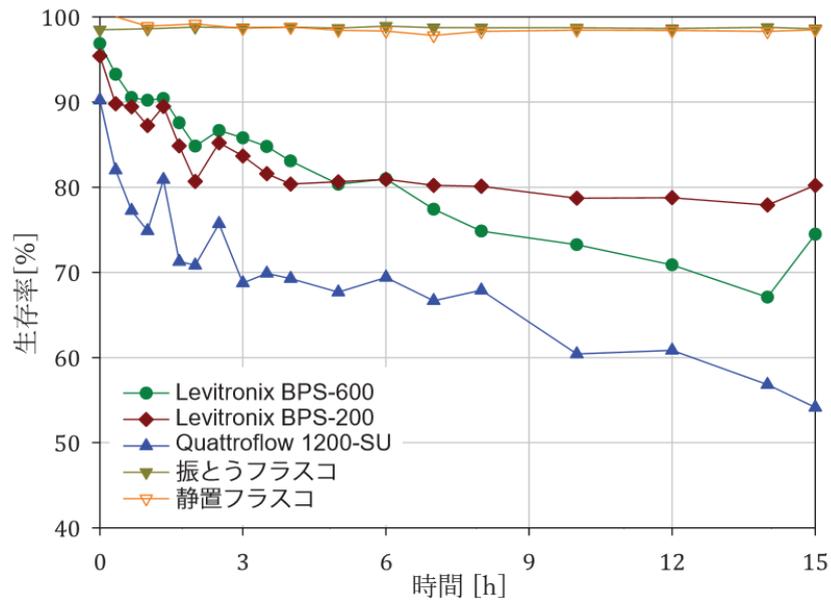


図 13： 第 3 のテストケースにおいて、NucleoCounter NC-100 を用いて得られた生存率 (背圧 620 ± 12 mbar)。

3.2. 細胞死速度による機械的ストレス評価

以下、懸濁トランスフェクション CHO 細胞株 (CHO-XM 111-10) を用いた 3 つの実験で得た細胞死速度をまとめた。セクション 1.1 に記載の通り、細胞死の一次速度式を仮定した。一般的に決定係数が 0.8 以上であれば、良好な近似を見出している。細胞死速度が、VCD の対数の勾配を表すため、細胞死速度が小さいと回帰モデルは不確実となる。しかしながら、第 3 のテストケースのみ、Levitronix BPS-200 について、 R^2 が 0.6 よりも小さかった (表 6 参照)。

調査した全回転速度について、遠心型ポンプがもたらす細胞死速度は、4 連式ダイヤフラムポンプがもたらす細胞死速度よりも低いことは明らかである (図 14 参照)。これは、同一の流体力学条件では、CHO 細胞にもたらされる流体力学的ストレスがより低いことを示す。予想通り、遠心型ポンプのポンプ速度が増加すると、BPS-200 を除いて、死速度が増加した。BPS-200 では、3500 rpm 及び 5000 rpm において、同一の死速度 0.032 h^{-1} が算出された。しかしながら、第 3 のテストケース (5000 rpm ; $620 \pm 12 \text{ mbar}$) についての回帰係数は、 $R^2 = 0.577$ と非常に小さく、これは線形モデルへの適合が非常に不確実であることを意味しているという点に留意すべきである。改良した曲線のあてはめにより、改善回帰モデルを達成できるだろうが、比較するという理由故に、適用しなかった。Levitronix BPS-600 では、ポンプ速度を増加させると、得られた細胞死速度が 0.023 h^{-1} から 0.046 h^{-1} へと増加する。これは、細胞死及びにポンプ速度がほぼ直線関係にあることに加え、2 倍に増加することを意味する。

先の研究で調査したペリスタポンプ、マスターフレックス® I/P イージーロード及びマスターフレックス® L/S コールパーマーに比較して、Quattroflow 1200-SU について計算した死速度は、背圧に依存せず、ほぼ一定のままであった。第 1 のテストケース (背圧 $31 \pm 2 \text{ mbar}$) において所望の流速 3.4 L/min を得るために、4 連式ダイヤフラムポンプではより高い回転速度を調節したが (第 2 のテストケースの 340 rpm と比較して 360 rpm)、細胞死において顕著な差は観察されなかった。

表 6: 細胞死動力学的回帰分析結果。

流速 [L/min]	圧力 [mbar]	細胞死速度			回帰係数		
		k_D [h^{-1}]			R^2 [-]		
		Levitronix BPS-600	Levitronix BPS-200	Quattroflow 1200-SU	Levitronix BPS-600	Levitronix BPS-200	Quattroflow 1200-SU
3.4	31 ± 2	0.023	0.022	0.068	0.745	0.616	0.907
3.4	300 ± 5	0.031	0.032	0.069	0.942	0.916	0.976
3.4	620 ± 12	0.046	0.032	0.065	0.820	0.577	0.816

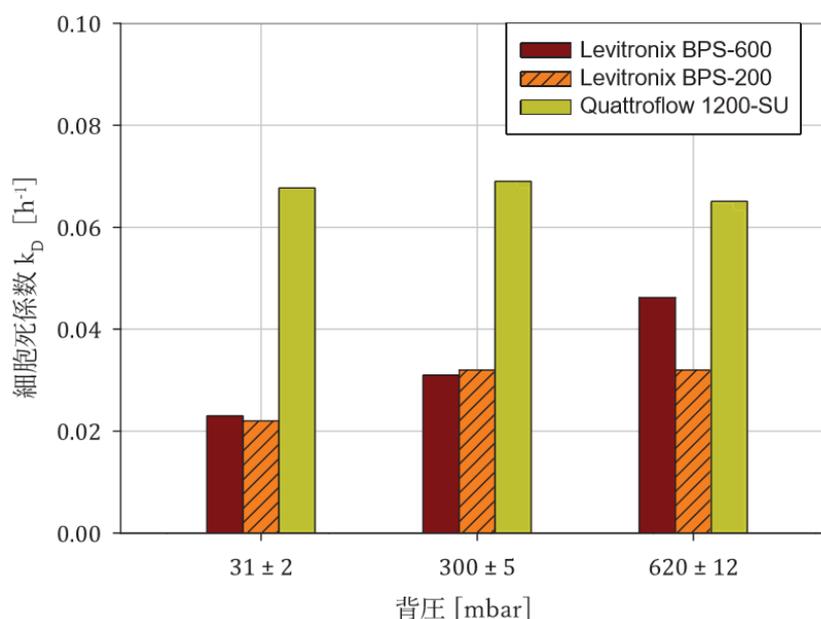


図 14：異なる背圧状態に対して得られた細胞死速度。

3.3. 継代培養実験の結果

セクション 2.3 に記載されているように、細胞生存率が 50%以上である場合は、循環させた細胞懸濁液の一定分量を、ポンプ収容容器から振とうフラスコへと移動させた。我々の実験から、更に低い生存率の細胞を再生させられる可能性は極めて低く、これは第 2 のトライアルにより確認している（以下を参照）。細胞を、細胞増殖に応じて細胞継代又は新鮮な媒質を添加して、37°C で約 4 日間培養した。

図 15a は、Levitronix BPS-200 及び BPS-600 により循環させ、第 1 のテストケースの後に継代培養した培養液の生細胞密度を与える。循環終了時点での生存率が低かったため（44.8%）、Quattroflow 1200-SU により循環させた細胞は継代培養しなかった。約 0.6×10^6 cells/mL の初期の細胞密度から開始し、細胞は、平均増殖速度が $\mu = 0.047 \text{ h}^{-1}$ （倍加時間 $t_D = 14.7 \text{ h}$ に相当する）で 3 継代サイクルにわたり増殖し、各サイクル中に細胞密度は 3×10^6 cells/mL 以上に達した。従って、増殖速度はウェーブミックスシステム中での細胞増殖値の間に得た値と同等である（セクション 2.1 参照）。生存率は全サンプルで 99% 以上であった。

対照的に、第 2 の循環実験（3.4 L/min ; 300 ± 5 mbar）後に継代培養した細胞は異なる増殖挙動を示した。全ポンプの細胞を、細胞密度 0.2×10^6 cells/mL ~ 0.47×10^6 cells/mL から開始して、継代培養した。一定分量の固定液量を使用したため、ポンプ実験の終了時の最終的な値に依存した初期の細胞密度は Quattroflow 1200-SU において、最も低い濃度となった。4 連式ダイアフラムポンプのフラスコ培養液中では、細胞増殖は検出されなかった。生細胞密度は 45 時間以内に 0.045×10^6 cells/mL へと低下し、ここで培養を中止した。その他の 2 つの培養液は、最大値約 1.43×10^6 cells/mL まで生細胞密度の増加を示した。これはほぼ、2 倍の増加を示す。平均増殖速度は、BPS-200 及び BPS-600 で、それぞれ 0.024 h^{-1} 及び 0.029 h^{-1} であっ

た。これらの値は、それぞれ倍加時間 28.6 時間及び 23.6 時間に相当する。これらはウェーブミックスシステム中での細胞増殖及び第 1 テストケースの継代培養の間に観察した倍加時間よりも著しく長い。このことは、循環プロセスについて得られたより高い細胞死速度と一致する（セクション 3.2 参照）。驚くべきことに、十分なグルコース含有量（1.1 g/L 以上）が利用可能であり、かつ乳酸濃度は高いものの許容可能な濃度（約 1.95 g/L）であったのだが、生細胞密度は 60 時間後には減少し始めた。最後のサンプルの生存率は、それぞれ 47%（BPS-600）及び 56%（BPS-200）であったので、同様に培養を中止した。急激な細胞死の理由は、完全には解明できなかった。考えられる説明として、60 時間後に 1.8 mmol/L の高アンモニア濃度に到達した（データは示さない）ということがあり得る。細胞株及び培養液の状態に応じて、2-3 mM 程度の低いアンモニア及びアンモニウム総濃度で、大幅に細胞増殖が減速すると報告されている [Schneider et al. (1996)]。

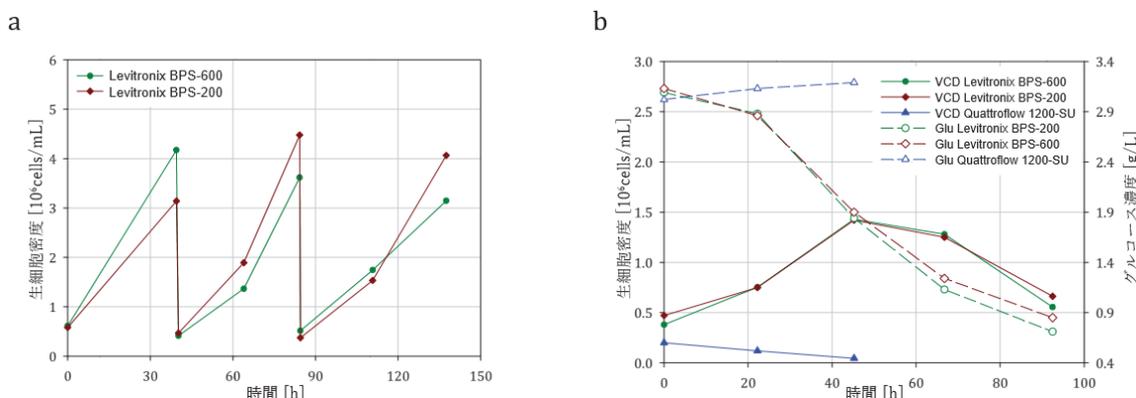


図 15： 継代培養実験の結果 (a) Levitronix BPS-200 及び BPS-600 により循環させた培養液の、振とうフラスコ内での継代培養の間における生細胞密度； (b) 第 2 のポンプ実験後の継代培養の間における生細胞密度 (VCD) 及びグルコース (glu) のプロファイル。

継代培養の間、アンモニア及び乳酸が細胞増殖に悪影響を及ぼすことを回避するため、第 3 の継代培養実験において、30 mL の新鮮な媒質 (HP-1) を培養 60 時間後に添加した (図 16 参照)。約 0.25×10^6 cells/mL の初期の生細胞密度から開始し、細胞は約 19 時間の平均倍加時間で増殖した。それによって、BPS-600 培養液は、BPS-200 フラスコに見られた典型的な指数型ではなく、ほぼ直線状の増殖を示した。媒質を添加する前の生細胞密度は、それぞれ 2.0×10^6 cells/mL (BPS-200) 及び 2.3×10^6 cells/mL (BPS-600) であった。その後、100 時間経過してグルコースが枯渇したとき、細胞密度は最大値 2.8×10^6 cells/mL (BPS-200)、 1.9×10^6 cells/mL (BPS-600) に達した。アンモニア濃度は、再び、1.64 mmol/L (BPS-200) 及び 1.75 mmol/L (BPS-600) とかなり高い濃度であった。しかしながら、実験終了時の細胞密度の減少は、ほぼ確実に基質の枯渇に関連している。

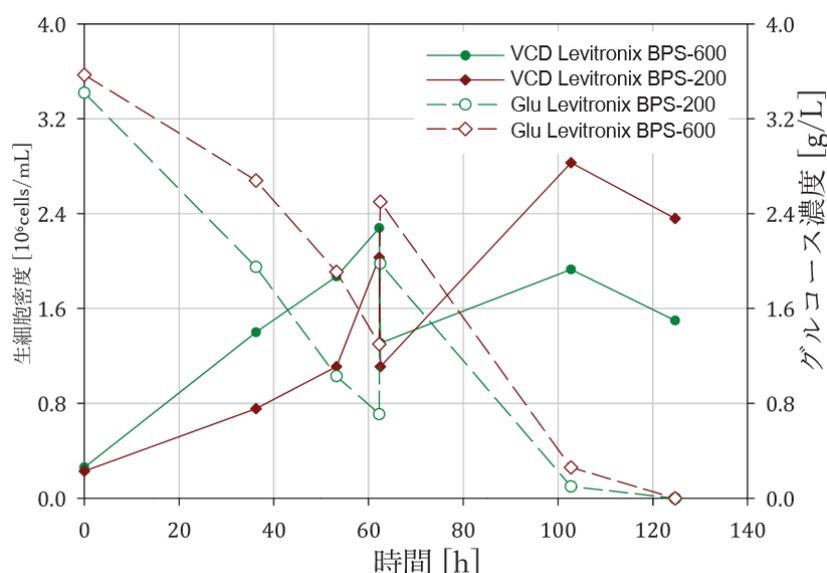


図 16： 第 3 の循環実験後に行った継代培養の間の、生細胞密度のグラフ (VCD) 及びグルコースグラフ (glu)。30 mL の新鮮な媒質 (HP-1) を、60 時間培養した後に添加した。

4. 議論

図 17 では、3 つの調査したポンプでの、生細胞密度及び生存率を、実現した 3 つのテストケースについて与える。磁力によって浮上させたポンプ Levitronix は、ポンプ速度に依存せず、プロセス全体にわたり高い生存率を有したと、要約することができる。このことは、懸濁 CHO 細胞にもたらされる機械的ストレスが、Quattroflow 1200-SU と比較してより低いことに起因し得る。機械的ストレスが低いことは、先の知見と一致する。その際は、Levitronix BPS-200 システムを 2 つのペリスタポンプ、マスターフレックス® I/P イージーロード及びマスターフレックス® L/S コールパーマーと比較した [ZHAW report 2011; ZHAW report 2011a]。予想通り、4 連式ダイアフラムポンプ及び遠心型ポンプの間で、最も低速のポンプ速度について細胞死プロファイルの最も大きな差を得た。その際、Levitronix システムでは、生存率は 95% 以上のままであったが、比較用ポンプでは、50% を下回った (図 8 参照)。更に、ポンプ速度と細胞死の間の直接的な関係が明白であり、この関係は、文献データ [Zhang et al. (2006); Kamaraju et al. (2010)] に加え、先の研究 [ZHAW report 2011a] での知見とも一致する。このことは、ポンプヘッド内で乱流が増大することにより説明できる。一方、Quattroflow 1200-SU を全 3 つの実験において、ほぼ一定の回転速度で作動させて得た細胞死速度は背圧に依存していないので、背圧差の細胞死への重要度はわずかであると結論づけることができる。これは、2.76 bar より高い背圧では、細胞破碎が著しくなることを見出した Kamaraju et al. (2010) の知見と一致し、2.76 bar という値は、本研究で調査した幅よりもずっと高い。しかしながら、ダイアフラムポンプはその最大速度のわずか 12% で作動させたことに、再び注目すべきである。Quattroflow ポンプの機械的ストレスは、ポンプ速度を増加させることでもまた、増大すると予想できる。

生細胞密度及び生存率の両方のプロファイルは、比較システムについての3つの試験で、10～20%の幅で異なっている（図17、上から3つ目参照）。しかしながら、コスト高と時間・手間故に、各背圧状態を我々は一度調査したのみであるということを強調したい。もし我々が、背圧が細胞死に影響を及ぼさないと仮定するなら、Quattroflow 1200-SUについて得られた細胞死速度を平均することができる。従って、平均値は、 $k_D = 0.067 \text{ h}^{-1}$ で、標準偏差は 0.002 h^{-1} （平均値の3%に相当する）を算出できる。1つの死速度を、0.816～0.976である回帰係数 R^2 を用いた線形回帰により得ることを考慮すると、許容可能な再現性を提示することができる。このことは、本研究で得られた細胞死速度を、図18に示す先の実験（2011年1月の研究）での細胞死速度と比較することでも確認される。第2の研究と比較して k_D が2倍大きい回転速度 3500 rpm を除いて、非常に良好な一致を達成した。しかしながら、3500 rpm で 0.016 h^{-1} という k_D の値（2011年1月の研究において得られる）は、1500 rpm での値よりも低いが、この結果の理由は完全には解明されていない [2011年1月の研究] という点に注目すべきである。

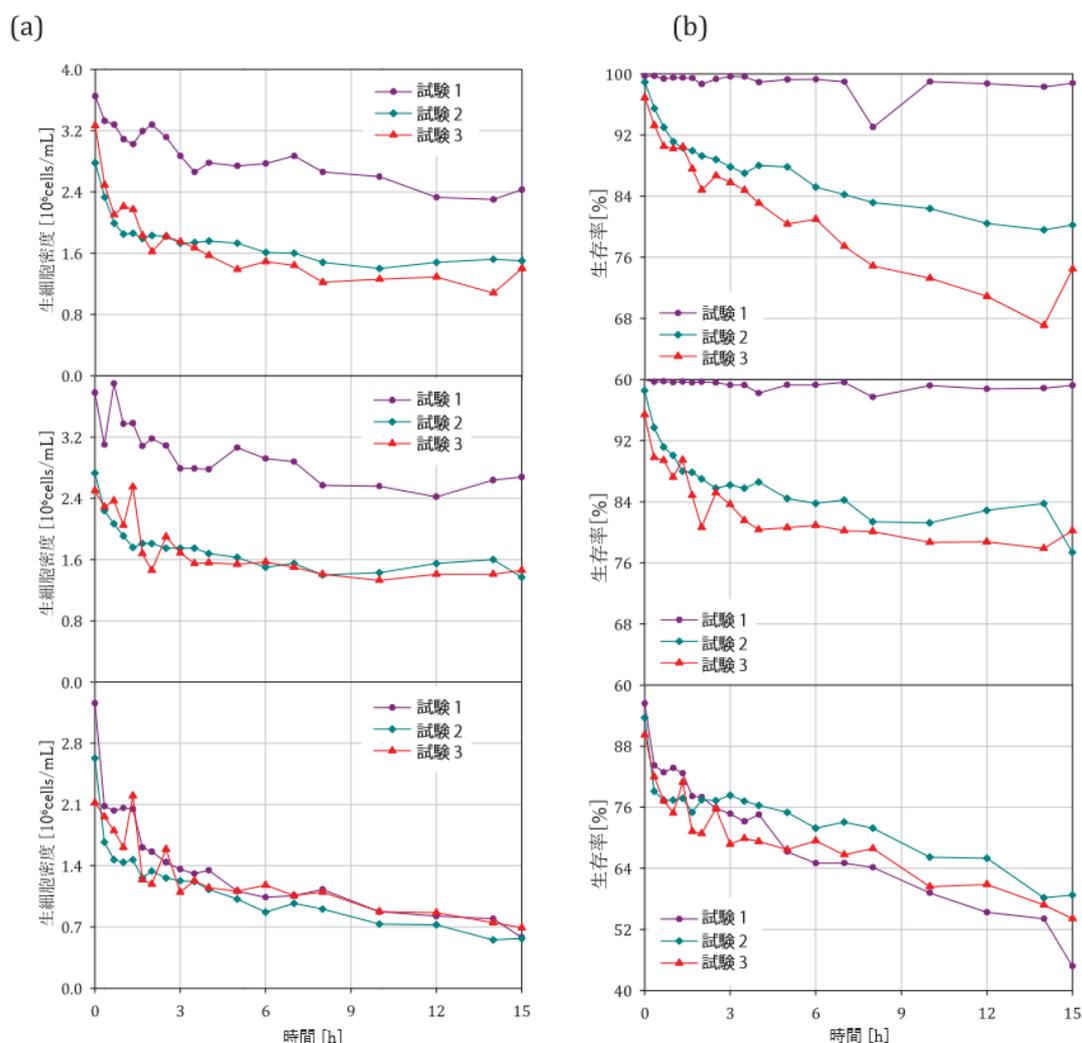


図17： Levitronix ポンプ BPS-600（グラフ1段目）及び BPS-200（2段目）並びに Quattroflow 1200-SU（3段目）についての、3つのテストケースで得た、生細胞密度 (a) 及び生存率 (b) の要約。

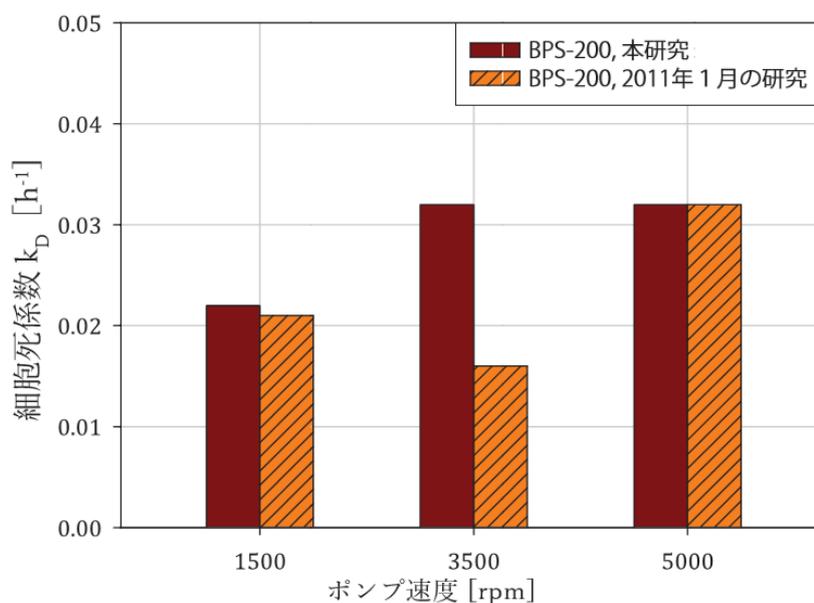


図 18：本研究及び先の研究で、Levitronix BPS-200 ポンプについて得られた細胞死速度の比較。

継代培養実験の結果、受けたストレスが小さい培養液と大きい培養液との間で、一般に異なる結果を示した。従って、機械的ストレスが、低く、均一であると仮定できる、ウェーブミックス培養液と同等の細胞増殖プロファイル及び代謝産物プロファイルを、第1の継代培養（30 ± 2 mbar の背圧での循環試験後）で得た。例えば、平均倍加時間は 14.7 時間であり、これは BIOSTAT® CultiBag RM 20L 内での細胞増殖の間に観察した倍加時間と同じである。一方、その他の2つの実験において、決定された倍加時間は 20 時間以上と、著しく長い（増殖速度が 0.035 h⁻¹ 未満であることに相当する）。生存率は、かなり迅速に増加したが（第2のサンプルの生存率は、全フラスコですでに 95%以上であった）、代謝産物において違いを検出した。ストレスを受けていない培養液と比較して、細胞はより多量の乳酸及びアンモニア（データは示さず）を生成した。乳酸及びアンモニアは、哺乳類の細胞培養液に対して有毒性及び阻害性があることでよく知られており [Schneider et al. (1996)]、このことが第2の継代培養での急激な細胞死の説明となり得る。しかしながら、機械的ストレスを受けた細胞を継代培養する間の、代謝産物消費及び細胞増殖の詳細を調査するため、より高頻度のサンプリングを実現する必要がある。加えて、より適切に比較を行うため、培養手順を更に標準化すべきである。

5. 要約

チューリッヒ応用科学大学（ZHAW）で実施した先の研究では、ベアリングレス Levitronix BPS-200 ポンプ及び2つのペリスタポンプを用いた第1の実験を実施し、懸濁トランスフェクション CHO 細胞（XM111-10）にもたらされる流体力学的ストレスを調査した。3.4 L/min の一定流速で、遠心型ポンプの速度を 1500 rpm~5000 rpm の範囲で変化させ、1分に1回と規定された、高流体力学的ストレスへの暴露頻度をもたらしした。生細胞密度の減少に基づくせん断ストレスの評価方法を確立した。従って、先の研究結果の1つは、磁力によって浮上させたベアリングレスポンプ Levitronix BPS-200 がもたらす細胞死は、比較対象よりも著しく少ないということの検証であった。更に、ポンプヘッド形状が改善された Levitronix MDP-200 を使用した実験を、実施した。結果により、再び、懸濁 CHO 細胞にもたらされる機械的ストレスが低いことが明らかになった。

本研究の目的は、別のベアリングレス遠心型ポンプ Levitronix BPS-600 が、懸濁 CHO 細胞にもたらす流体力学的ストレスを更に調査することであった。このベアリングレスポンプは、4,500 L/h に達するより高流速を実現するよう設計されている。先の研究で設置した実験装置を利用した。3つのポンプを、温度制御のためのダブルジャケットを有し、ステンレス鋼容器からなる細胞貯蔵容器に接続した。滅菌済条件を保証するため、ポンプヘッドを含む完全なポンプサイクルを、実験前に蒸気滅菌した。細胞懸濁液を 3.4 L/min の一定流速で循環させ、異なるポンプ速度に調整することによって、種々の圧力状況を実現した。

本研究は、Levitronix BPS-200 ポンプを使用して得た先の結果を確認し、4連式ダイアフラムポンプ Quattroflow 1200-SU と比較して、懸濁 CHO 細胞（CHO Xm111-10）にもたらされる流体力学的ストレスが著しく低いことを明らかにした。回転速度に依存して、BPS-600 ポンプ（pumped）は、その小型版である BPS-200 に類似の流体力学的ストレスをもたらしした。背圧 620 ± 12 mbar での最も高速なポンプ速度時にのみ（BPS-200 では 5000 rpm、BPS-600 では 4100 rpm）、BPS-600 について著しく高い細胞死速度が得られた。しかしながら、こうした高ポンプ速度下でさえ、細胞死速度は4連式ダイアフラムポンプよりも約 30%小さかった。

結果は、更なる調査の有望な基盤となる。更なる調査は流速の変化も含み得る。既存の全研究は、1分に1回の頻度での流体力学的ストレスへの曝露へと導く、3.4 L/min の一定流速で実施された。しかしながら、Levitronix ポンプで実現され得るより高流速を考慮すると、高流速の影響を調査すべきである。ポンプ速度を変化させることの他に、細胞懸濁液の液量を変化させることにより、更に曝露頻度を調整することも可能である。

6. 参考

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.

Schneider M, Marison IW & von Stockar U (1996). The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J Biotechnol* 46: 161-185.

Shah D, Naciri M, Clee P & Al-Rubeai M. (2006). NucleoCounter – an efficient technique for the determination of cell number and viability in animal cell culture processes. *Cytotechnol.* 51: 39-44.

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.

ZHAW report (2011). Mechanical stress analysis of transfected CHO suspension cells in pumps. Project report of the first working package.

ZHAW report (2011a). Mechanical stress analysis of transfected CHO suspension cells in pumps. Project report of the second working package.

7. 付録

表7： BioProfile NC-100 plus の測定のレンジ、

[http://www.novabiomedical.com/products/biotech_analyzers/biopprofile_analyzers.php] より

パラメータ	テスト方法	測定レンジ	分解能誤差
グルタミン	酵素/アンペロメトリック	0.2 – 6.0 mmol/L	5.0%
グルタミン酸	酵素/アンペロメトリック	0.2 – 6.0 mmol/L	5.0%
グルコース	酵素/アンペロメトリック	0.2 – 15 g/L	5.0%
乳酸塩	酵素/アンペロメトリック	0.2 – 5.0 g/L	5.0%
アンモニウム	イオン選択電極	0.2 – 25 mmol/L	5.0%
pH	イオン選択電極	5.00 – 8.00 pH units	0.01%
Na+	イオン選択電極	0.2 – 220 mmol/L	1.5%
K+	イオン選択電極	0.2 – 625 mmol/L	3.0%

*すべての測定実行時のデータ

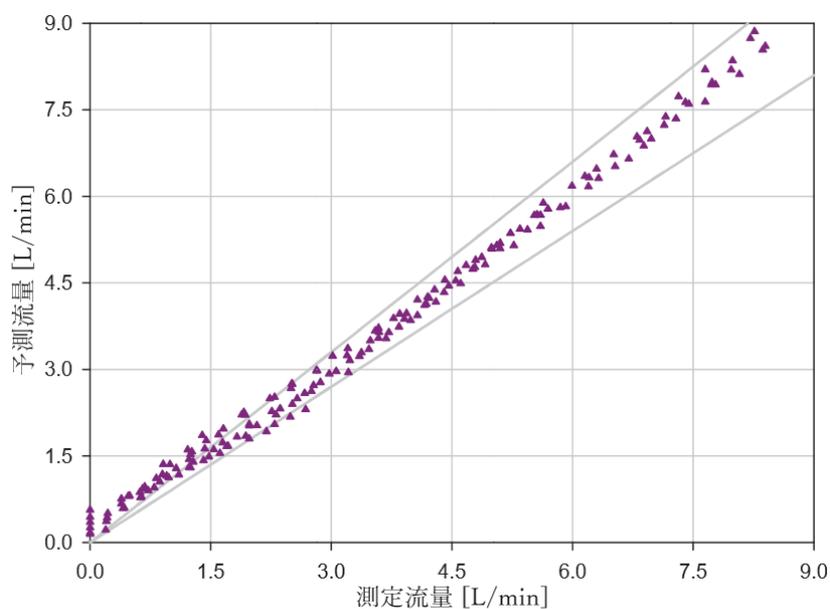


図 19： 統計モデルを用いた測定流量と予測流量の比較。実線は 10%の精度の下限と上限を示す。