

明 細 書

発明の名称：

細胞培養装置、細胞培養方法、及び生産物の製造方法

技術分野

[0001] 本開示は、細胞培養装置、細胞培養方法、及び生産物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 細胞を培養する際には、種々の目的で培養液を培養容器内からポンプを用いて抜き出す場合がある。例えば、特開2010-29109号公報（特許文献1）では汚染微生物を捕集する目的で、培養容器内から培養液の抜き出しを行っている。

[0003] 米国特許第6544424号明細書（特許文献2）は、培養容器内から抜き出した培養液に対してタンジェンシャルフロー方式による濾過を、ダイアフラムポンプを用いて行うことを記載している。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明の実施形態が解決しようとする課題は、容量の小さいダイアフラムポンプにより細胞懸濁液の抜き出しをする場合に、良好な細胞増殖性とダイアフラムの破損抑制とを両立できる細胞培養装置及び細胞培養方法、並びに前記細胞培養方法を用いた生産物の製造方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 上記課題を解決するための手段には、以下の態様が含まれる。

[0006] <1> 細胞懸濁液を収容する培養容器と、

上記培養容器内から上記細胞懸濁液を抜き出すためのダイアフラムポンプとを備え、

上記ダイアフラムポンプのダイアフラムと、上記ダイアフラムの外縁部の上記ダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面Fとにより規定される空

間の体積が 1 cm^3 以上 20 cm^3 以下であり、

上記ダイアフラムにおける各点について、上記ダイアフラムの頂点から上記平面 F に下ろした垂線の足と上記各点とを結ぶ直線が上記垂線となす角度を上記各点の角度 A としたとき、角度 A が 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても上記ダイアフラムの厚さ H が 0.5 mm 以上 1.5 mm 以下の範囲内であり、

上記ダイアフラムの頂点における上記ダイアフラムの厚さを H_T としたとき、角度 A が 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても上記ダイアフラムの厚さ H が下記の式 1 を満たす、細胞培養装置。

$$1 \leq H_T / H \leq 1.75 \quad (\text{式 1})$$

<2> 上記ダイアフラムにおける角度 A が 75° から 88° までの領域における点のうち、最も厚さが厚い点における上記ダイアフラムの厚さを H_Y とし、角度 A が 90° の点における上記ダイアフラムの厚さを H_Z としたとき、 $H_Z < H_Y$ であり、かつ、角度 A が 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても上記ダイアフラムの厚さ H が $H \leq H_Z$ である、<1>に記載の細胞培養装置。

<3> 上記ダイアフラムにおける角度 A が 75° から 88° までの領域における点のうち、最も厚さが厚い点における上記ダイアフラムの厚さを H_Y としたとき、角度 A が 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても上記ダイアフラムの厚さ H が下記の式 2 を満たす、<1>又は<2>に記載の細胞培養装置。

$$1 < H_Y / H \leq 3 \quad (\text{式 2})$$

<4> 上記ダイアフラムの材質がシリコンゴムである、<1>から<3>のいずれか 1 つに記載の培養装置。

<5> 上記ダイアフラムの伸び率 50% における引張応力 σ が下記の式 3 を満たす、<1>から<4>のいずれか 1 つに記載の細胞培養装置。

$$0.4 \text{ MPa} \leq \sigma \leq 1.5 \text{ MPa} \quad (\text{式 3})$$

<6> 培養容器内に収容された細胞懸濁液中で細胞を培養することと、

上記培養容器内からダイアフラムポンプにより上記細胞懸濁液を抜き出すこととを含み、

上記ダイアフラムポンプのダイアフラムと、上記ダイアフラムの外縁部の上記ダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面Fとにより規定される空間の体積が 1 cm^3 以上 20 cm^3 以下であり、

上記ダイアフラムにおける各点について、上記ダイアフラムの頂点から上記平面Fに下ろした垂線の足と上記各点とを結ぶ直線が上記垂線となす角度を上記各点の角度Aとしたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても上記ダイアフラムの厚さHが 0.5 mm 以上 1.5 mm 以下の範囲内であり、

上記ダイアフラムの頂点における上記ダイアフラムの厚さを H_T としたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても上記ダイアフラムの厚さHが下記の式1を満たす、細胞培養方法。

$$1 \leq H_T / H \leq 1.75 \quad (\text{式1})$$

<7> 上記ダイアフラムにおける角度Aが 75° から 88° までの領域における点のうち、最も厚さが厚い点における上記ダイアフラムの厚さを H_Y とし、角度Aが 90° の点における上記ダイアフラムの厚さを H_Z としたとき、 $H_Z < H_Y$ であり、かつ、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても上記ダイアフラムの厚さHが $H \leq H_Z$ である、<6>に記載の細胞培養方法。

<8> 上記ダイアフラムにおける角度Aが 75° から 88° までの領域における点のうち、最も厚さが厚い点における上記ダイアフラムの厚さを H_Y としたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても上記ダイアフラムの厚さHが下記の式2を満たす、<6>又は<7>に記載の細胞培養方法。

$$1 < H_Y / H \leq 3 \quad (\text{式2})$$

<9> 上記ダイアフラムの材質がシリコンゴムである、<6>から<8>のいずれか1つに記載の細胞培養方法。

<10> 上記ダイアフラムの伸び率50%における引張応力 σ が下記の式3を満たす、<6>から<9>のいずれか1つに記載の細胞培養方法。

$$0.4 \text{ MPa} \leq \sigma \leq 1.5 \text{ MPa} \quad (\text{式3})$$

<11> 上記ダイアフラムポンプの運転時において、上記ダイアフラムを駆動させる上記ダイアフラムポンプの内部の圧力Pが下記の式4を満たす、<6>から<10>のいずれか1つに記載の細胞培養方法。

$$\text{大気圧} - 0.1 \text{ MPa} \leq P \leq \text{大気圧} + 0.1 \text{ MPa} \quad (\text{式4})$$

<12> 上記細胞がCHO細胞である、<6>から<11>のいずれか1つに記載の細胞培養方法。

<13> 上記培養容器内から抜き出された上記細胞懸濁液を、上記細胞懸濁液中の細胞濃度よりも高い細胞濃度を有する第一の溶液と、上記細胞懸濁液中の細胞濃度よりも低い細胞濃度を有する第二の溶液と、に分離膜を用いてタンジェンシャルフローフィルトレーション方式により分離する分離処理を行うことと、

上記第一の溶液を上記培養容器内に戻すことと、

上記培養容器内に新たに培地を添加することと、

をさらに含む、<6>から<12>のいずれか1つに記載の細胞培養方法

。

<14> 生産物を生産する細胞を<6>~<13>のうちいずれか1つに記載の細胞培養方法を用いて培養することと、

上記細胞懸濁液から生産物を回収することと、

を含む、生産物の製造方法。

<15> 上記生産物が抗体である、<14>に記載の生産物の製造方法。

発明の効果

[0007] 本発明の実施形態によれば、容量の小さいダイアフラムポンプにより細胞懸濁液の抜き出しをする場合に、良好な細胞増殖性とダイアフラムの破損抑制とを両立できる細胞培養装置及び細胞培養方法、並びに前記細胞培養方法を用いた生産物の製造方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]本開示に係る細胞培養装置の構成の一例を示す図である。

[図2]本開示に係る細胞培養装置におけるダイアフラムポンプの構成の一例を示す図である。

[図3A]ダイアフラム上の各点の角度Aを説明するための図である。

[図3B]ダイアフラムにより規定される体積を説明するための図である。

[図4] (A) ~ (D) は、実施例及び比較例におけるダイアフラムの状態の判定基準を示す図面である。

[図5]実施例及び比較例における増殖性及びバイアビリティの判定基準を示すグラフである。

[図6]実施例1における細胞濃度及びバイアビリティの推移を表すグラフである。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本開示に係る細胞培養装置、細胞培養方法、及び生産物の製造方法について説明する。但し、本開示に係る実施形態は以下の実施形態に何ら限定されるものではなく、適宜、変更を加えて実施することができる。

[0010] 本開示において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を意味する。

本開示に段階的に記載されている数値範囲において、ある数値範囲で記載された上限値又は下限値は、他の段階的な記載の数値範囲の上限値又は下限値に置き換えてもよい。また、本開示に記載されている数値範囲において、ある数値範囲で記載された上限値又は下限値は、実施例に示されている値に置き換えてもよい。

本開示において、2以上の好ましい態様の組み合わせは、より好ましい態様である。

本開示において、各成分の量は、各成分に該当する物質が複数種存在する場合には、特に断らない限り、複数種の物質の合計量を意味する。

本開示において、「工程」との語は、独立した工程だけではなく、工程の

所期の目的が達成される限りは、他の工程と明確に区別できない工程をも含む。

- [0011] 本開示に係る細胞培養装置は、
細胞懸濁液を収容する培養容器と、
培養容器内から細胞懸濁液を抜き出すためのダイヤフラムポンプとを備え、
ダイヤフラムポンプのダイヤフラムと、ダイヤフラムの外縁部のダイヤフラムの頂点から遠い側の面を含む平面Fとにより規定される空間の体積が 1 cm^3 以上 20 cm^3 以下であり、
ダイヤフラムにおける各点について、ダイヤフラムの頂点から平面Fに下ろした垂線の足と各点とを結ぶ直線が垂線となす角度を各点の角度Aとしたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においてもダイヤフラムの厚さHが 0.5 mm 以上 1.5 mm 以下の範囲内であり、
ダイヤフラムの頂点におけるダイヤフラムの厚さを H_T としたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においてもダイヤフラムの厚さHが下記の式1を満たす、細胞培養装置である。
- $$1 \leq H_T / H \leq 1.75 \quad (\text{式1})$$

- [0012] 細胞培養においては培養容器内から培養液の抜き出すためなどの目的でポンプを用いる場合がある。この目的でダイヤフラムポンプを用いることも考えられるが、従来の細胞培養用ダイヤフラムポンプは容量の比較的大きいダイヤフラムポンプであり、ダイヤフラムによって規定される空間の体積（後述）が例えば 20 cm^3 以下といった小型のダイヤフラムポンプを細胞培養に用いた例はこれまで無かった。一方、例えば実験用の培養においては大量の細胞あるいは生産物を得ることは目的とされていないため、培養スケールを小さくした方が培地の削減等、コストカットの観点からは好ましいと本発明者らは考えた。本発明者らは、また、培養スケールを小さくするのに応じてダイヤフラムポンプも小型化することを考えた。しかし、ダイヤフラムポンプを単純に小型化した場合にはダイヤフラムの厚さも小さくなり、この結果

、ダイアフラムの強度が低下し、培養中にダイアフラムが破損することを本発明者らは見出した。

[0013] 一方、小型ダイアフラムの強度を確保するために、ダイアフラムの厚さを増すと、ダイアフラムの反転時の衝撃が細胞にストレスを与え、細胞の増殖性に悪影響を及ぼす場合があることを本発明者らは見出した。

そして、本発明者らは、ダイアフラムにおける厚さ分布について特定の設計を行うことにより、細胞の増殖性を確保しつつ、ダイアフラムの破損抑制も達成することができることを見出し、本開示に係る細胞培養装置、細胞培養方法、及び生産物の製造方法を発明した。

[0014] 本開示に係る細胞培養装置において、培養容器は、一般的な培養装置（バイオリアクターとも言う）の培養容器、又はそれ以外の好適な容器を培養容器とすることができる。培養装置の例としては、発酵槽型タンク培養装置、エアリフト型培養装置、カルチャーフラスコ型培養装置、スピナーフラスコ型培養装置、マイクロキャリア型培養装置、流動層型培養装置、ホロファイバー型培養装置、ローラーボトル型培養装置、充填槽型培養装置等が挙げられる。

[0015] ダイアフラムポンプとは、ダイアフラムと呼ばれる隔膜の往復運動により液体の吸引及び排出を行うポンプである。本開示に係る細胞培養装置において使用可能なダイアフラムポンプの典型的な一例を図2に示す。なお、図2に示したダイアフラムポンプは逆止弁を有しない往復流発生タイプのダイアフラムポンプであるが、本開示に係る細胞培養装置に使用可能なダイアフラムポンプはこれに限定されず、逆止弁を有して一方向の流れを形成可能なダイアフラムポンプであってもよい。

[0016] 図2はダイアフラムポンプ37の断面を示す断面図である。図2に示すダイアフラムポンプ37は、液体が流通する流路（配管）58及び気体が流通する流路（チューブ）59に連結している。ダイアフラムポンプ37は、部分304a及び部分304bからなるハウジング、並びにダイアフラム302を有しており、ダイアフラム302の両端部はハウジングの部分304b

の中に固定されている。このため、ダイヤフラム302の、ハウジング部分304bの中に格納された両端部はダイヤフラムポンプの運転時でも動かない。この両端部は、実際にはダイヤフラムの半径方向の外縁（外周）を形成しており、円環状の外縁部となっている。部分304a及び部分304bからなるハウジングは、鉄、ステンレス、プラスチックなど、ダイヤフラムポンプのために必要な強度を有する材料であれば任意の材料からなるものであってよい。

[0017] ダイヤフラム302は、ダイヤフラムポンプ37内部の空間をチャンバー301とチャンバー303の2つに区画している。チャンバー301は流路58からの液体により満たされており、チャンバー303は流路59からの気体によって満たされている。流路59の内部が真空ポンプ等により減圧されると、チャンバー303内の圧力も低下するため、チャンバー301とチャンバー303との間の圧力差によりダイヤフラム302はチャンバー303側に向かって弧を描く形状となる。一方、流路59の内部が加圧ガス源等により加圧されると、チャンバー303内の圧力も上昇するため、チャンバー301とチャンバー303との間の圧力差によりダイヤフラム302はチャンバー301側に向かって弧を描く形状となる。この2つの状態の間を往復することで、流路58内に往復流を発生させることができる。このような往復流は、タンジェンシャルフローフィルトレーション方式による濾過などに用いることができる。

[0018] 一方、上記のとおりダイヤフラムポンプにより一方向の流れを形成することも可能である。この場合には、チャンバー301内に流路58以外にもう一本の流路を取り付け、それぞれの流路に逆止弁を取り付けることで、ダイヤフラム302の往復動（反転）により一方向の流れを形成することができる。

[0019] なお、図2に示されるように、ダイヤフラムの中心は、ダイヤフラムの外縁部の円環の図2における下面が含まれる平面からの距離が最も遠い点となっており、ダイヤフラムの頂点と称することができる。図2に示すように断

面を見た場合にダイアフラムの中心はダイアフラムが形成する弧の頂点部に位置するためである。

[0020] ダイアフラムは上記のとおり往復動を繰り返すため、弾性体であることが好ましい。弾性体とは、力を受けるとそれに応じて変形し、力を除くと変形がもとに戻る部材のことを指し、特には、ゴム弾性を有する材料からなるものをいう。ゴム弾性とは、弾性率が金属と比較して小さく、力に対する変位量が多いものを指し、25℃における弾性率（ヤング率）が数MPa～数百MPa程度のものであり、具体的には、1MPaから60MPa程度のものをいう。ヤング率は、例えば、商品名「TGI 100kN」（ミネベア製）を使用し、JIS K7161（2014年）に準拠した方法（試験片寸法：縦5cm×横1.5cm×厚さ0.1cm、試験速度：0.5mm/min）で測定することができる。

[0021] 本開示に係る細胞培養装置においては、ダイアフラムと、ダイアフラムの外縁部のダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面Fとにより規定される空間の体積が1cm³以上20cm³以下であり、

ダイアフラムにおける各点について、ダイアフラムの頂点から平面Fに下ろした垂線の足と各点とを結ぶ直線が垂線となす角度を各点の角度Aとしたとき、角度Aが0°から75°までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さHが0.5mm以上1.5mm以下の範囲内であり、

ダイアフラムの頂点におけるダイアフラムの厚さをH_Tとしたとき、角度Aが0°から75°までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さHが下記の式1を満たす。

$$1 \leq H_T / H \leq 1.75 \quad (\text{式1})$$

本開示中においては、ダイアフラムの種々の領域、空間の体積又は点の厚さについて説明されるが、特段の断りが無い限り、本開示中におけるダイアフラムの領域、空間の体積又は点の厚さについての記載はいずれも、ダイアフラム（ダイアフラムを構成する弾性体）に外からの圧力がかかっていない状態で測定されたダイアフラムの領域、空間の体積又は点の厚さを意味する

。ダイヤフラムポンプの運転中には、ダイヤフラムの両面にかかる圧力には圧力差が生じ、それによってダイヤフラムは反転等の挙動を繰り返す。しかし、本開示中に記載されるダイヤフラムの領域、空間の体積又は点の厚さは、このような圧力差がある状態、つまりダイヤフラムのいずれかの面から圧力を受けている状態、で測定されるものではなく、例えばダイヤフラムをダイヤフラムポンプから取り出す等することでダイヤフラムに外からの圧力がかからない状態とすることで測定されるダイヤフラムの領域、空間の体積又は点の厚さである。なお、ダイヤフラムを支持台上に載置して厚さを測定するような場合、載置する向きによって異なる方向に自重を受けることになるが、ダイヤフラムの自重による変形は無視できる程度であるため、領域、空間体積、厚さの測定において特に影響しない。

[0022] 図3A及び図3Bを参照しながら上記の空間及び角度Aについて説明する。ダイヤフラムは、図3A及び図3Bに示されるように、ハウジングへの固定を強固にするための突起部を除き平坦な円環状の外縁部と、外縁部からドーム状に隆起した形状の可動部を有している。このため、ダイヤフラムの中心は、ドーム状の隆起形状の頂点Tとなっている。可動部は、図2において説明したとおり、ダイヤフラムにより仕切られたチャンバーとチャンバーとの間の圧力差により、反転可能である。図3A及び図3Bにおいて、ダイヤフラムの外縁部はダイヤフラムポンプのハウジングに固定されており、外縁部の図3A及び図3Bにおける下面（第1の面）は、ハウジングへの固定を強固にするための突起部を除き、同一平面上に属している。この下面は実際には円環状の形状を有している。外縁部の図3A及び図3Bにおける上面（第2の面）についても、下面と同様に、円環状であって、また、ハウジングへの固定を強固にするための突起部を除き同一平面上に属している。ダイヤフラムの外縁部の図3A及び図3Bにおける下面（上記突起部を除く）が含まれる平面を、本開示においては平面Fと称する。平面Fは、ダイヤフラムの外縁部の下面が属する平面を可動部の下の空間にまで延伸して形成される仮想的な平面である。なお、外縁部の図3A及び図3Bにおける下面とは、

外縁部の面のうち、ダイアフラムの頂点（つまり中心点）Tから遠い側の面である。言い換えれば、図3Aにおいて頂点Tは、外縁部から上方向に隆起しているため、外縁部の上面及び下面のうち頂点Tからより遠いのは下面である。

頂点Tからダイアフラムが反転すると、図3Aにおいて仮想線により示された形状をダイアフラムは有するようになるが、この場合でも弧を描く方向が逆になるだけで形状自体は同一となるため、図3Aにおける実線で示された形状の場合について説明をする。

[0023] 「ダイアフラムと、ダイアフラムの外縁部のダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面Fとにより規定される空間」とは、ダイアフラムの弧の形状の部分の図3Bにおける下面（平面Fに近い方の面）と、平面Fとにより規定される（囲まれる）閉空間を指す。この閉空間は、その断面が図3Bにおける点描部として示されている。この閉空間の体積は、ダイアフラムが反転することにより引き起こされる液体側チャンバー（図2におけるチャンバー301）の容積変化のおよそ1/2の値であり、ダイアフラムポンプに流入する、又はダイアフラムポンプから吐出される液体の量の指標となる。本開示におけるダイアフラムポンプにおいては、上記閉空間の体積が1 cm³以上20 cm³以下であり、従来培養に用いられてきたダイアフラムポンプの体積よりも小さくなっている。

[0024] ダイアフラムと、ダイアフラムの外縁部のダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面Fとにより規定される空間の体積を1 cm³以上とすることで、培養容器内から十分な量の細胞懸濁液を引き抜くことが可能となる。特に、灌流培養における培地中の老廃物等の除去にダイアフラムポンプを用いている場合は、細胞の老廃物等を濾過等により十分に系外に排出でき、細胞の増殖性を高めて、細胞生存率を維持することが容易になる。また、ダイアフラムと、ダイアフラムの外縁部のダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面Fとにより規定される空間の体積を20 cm³以下とすることで、細胞容器外における培養液の滞留時間が過剰に長くなることを容易に回避できる。

細胞容器外は細胞容器内と比べて酸素供給、温度維持等の条件が低下しやすい箇所であり、細胞容器外における培養液の滞留時間が過剰に長くなることを回避することで細胞の増殖性を高めて、細胞生存率を維持できる。これにより、例えば実験用の小スケールの培養に対応することが可能であり、培養コストを低減することができる。

[0025] 上記の観点から、ダイアフラムと、ダイアフラムの外縁部のダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面Fとにより規定される空間の体積は 2 cm^3 以上 15 cm^3 以下であることが好ましく、 2.5 cm^3 以上 10 cm^3 以下であることがより好ましく、 3 cm^3 以上 5 cm^3 以下であることがさらに好ましい。

[0026] ダイアフラムの弧の形状の部分に含まれる各点については、ダイアフラムにおける相対的位置を角度により表現することができる。図3Aに示されるように、ダイアフラムの頂点（中心）から平面Fに下ろした垂線Prを基準線とすると、頂点は垂線Prからの角度が 0° の位置にある。ダイアフラムの弧の形状の部分（外縁部以外の部分）に含まれる任意の点（例えば図3Aにおける点Pt）について、ダイアフラムの頂点（中心）から平面Fに下ろした垂線Prの足Ftから当該任意の点に向けて引いた直線と、上記垂線Prとのなす角度（角度Aとも称する）を規定することができる。この角度Aは、方向によらず負の値は取らないものとし、このため角度Aはダイアフラムの中心から離れるほど大きくなり、平面F上に属する点においては角度 90° となる。なお、ダイアフラムの弧の形状の部分に含まれる上記任意の点は、ダイアフラムの図3Aにおける下面（頂点から遠い側の面）において設定する。

なお、ダイアフラムの可動部が有するドーム状の隆起形状は、垂線Prを軸として円対称な形状であることが好ましい。隆起形状の断面（図3Aに示されるような垂線Prを含む断面）の形状（外縁部との接続箇所を除く）、は、半球や楕円であってもよいが、半球や楕円のような規則的な形状である必要は必ずしも無い。例えば、図3Aにおいて、ダイアフラムの可動部の下

面の縦方向（垂線 P_r の方向）の座標（図 3 A における上方を正とする）を横方向（垂線 P_r に直交する方向）の座標（図 3 A における右側を正とする）で 2 階微分した値が、外縁部との接続箇所を除いて、0 以下である任意の形状であってもよい。

[0027] 本開示におけるダイアフラムポンプにおけるダイアフラムでは、角度 A が 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さ H は 0.5 mm 以上 1.5 mm 以下の範囲内である。言い換えると、ダイアフラムの厚さ H は各点において決まる変数であるが、ダイアフラムにおける角度 A が 0° から 75° までの領域（図 3 A における領域 X ）におけるこの変数の最小値及び最大値はいずれも 0.5 mm 以上 1.5 mm 以下の範囲内である。ここで、ダイアフラムポンプは弧の形状を形成しているが、各点における厚さ H は、各点におけるダイアフラムの下面への接線に垂直な方向におけるダイアフラムの寸法を意味する。また、 H は、特に断りが無ければ、角度 A が 0° から 75° までの領域における各点におけるダイアフラムの厚さを指す。

[0028] 角度 A が 0° から 75° までの領域における各点におけるダイアフラムの厚さが 0.5 mm 以上であることにより、培養途中でのダイアフラムの破損を効果的に抑制でき、培養の継続が容易になる。また、角度 A が 0° から 75° までの領域における各点におけるダイアフラムの厚さが 1.5 mm 以下であることにより、ダイアフラムの反転が困難となることを回避でき、ダイアフラムの反転によりダイアフラムポンプの機能を十分に発揮することができる。

[0029] 上記の観点から、ダイアフラムにおける角度 A が 0° から 75° までの領域における各点における厚さは、 0.6 mm 以上 1.4 mm 以下であることが好ましく、 0.7 mm 以上 1.3 mm 以下であることがより好ましく、 0.8 mm 以上 1.2 mm 以下であることがさらに好ましい。

[0030] ダイアフラムにおける角度 A が 0° から 75° までの領域は、ダイアフラムの頂点及びその周辺の領域である。角度 A が 0° から 75° までの領域に

おける厚さが均一であるか、又はダイアフラムの頂点における厚さが周辺領域よりも若干厚いことによりダイアフラムの耐久性が向上し破れにくくなる。一方、ダイアフラムの頂点における厚さが周辺領域の厚さに比べ大きすぎると、相対的に薄い部分に応力が集中しやすくなり、ダイアフラムが破れやすくなる。

[0031] これらの観点から、本開示におけるダイアフラムにおいては、ダイアフラムの頂点におけるダイアフラムの厚さを H_T としたとき、角度 A が 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さ H は下記の式1を満たす。

$$1 \leq H_T / H \leq 1.75 \quad (\text{式1})$$

式1を満たすことで、ダイアフラムの破損抑制における効果以外にも、ダイアフラムの反転挙動がよりしなやかになるという効果も得られる。なお、ダイアフラムの反転挙動は、頂点における厚さとその周辺の厚さとが均一に近くなるほどよりしなやかになる傾向がある。ダイアフラムの反転挙動がしなやかであると、チャンバー301内の細胞懸濁液における急激な流速上昇によるせん断増加を回避でき、細胞へのダメージが小さくなる。

[0032] 上記のとおり H は各点の厚さを表す変数であるが、上記の観点から、ダイアフラムにおける角度 A が 0° から 75° までの領域におけるいかなる点についても、 H_T / H の値は1以上1.5以下であることが好ましく、1以上1.3以下であることがより好ましく、1以上1.2以下であることがさらに好ましい。

[0033] ダイアフラムにおける角度 A が 75° から 88° までの領域（図3Aにおける領域Y）における点のうち、最も厚さが厚い点におけるダイアフラムの厚さを H_Y とし、角度 A が 90° の点（図3Aにおける点Z）におけるダイアフラムの厚さを H_Z としたとき、 $H_Z < H_Y$ であることが好ましく、かつ、角度 A が 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さ H は $H \leq H_Z$ であることが好ましい。ダイアフラムの破れに関する領域としては、主に、角度 A が 0° から 75° までの領域、角度 A が 75° か

ら 88° までの領域、及び角度 A が 90° の点の3つがある。基本的に、ダイアフラム中で最も厚さの薄い部分に応力が集中しその点が破れやすいが、かといって全ての領域の厚さを増すだけではダイアフラム反転時の衝撃が大きくなり、細胞増殖性を低下させてしまうおそれがある。このため、ダイアフラムが反転する際最も応力が集中しやすい領域である角度 A が 75° から 88° の領域の最大の厚さを他の領域の厚さよりも厚くすることが好ましく、この意味で $H_z < H_y$ であることが好ましい。また、角度 A が 75° から 88° までの領域におけるダイアフラムの厚さの最小値を H_s とすると、角度 A が 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さ H は $H \leq H_s$ であることが好ましい。

[0034] H_y/H_z は1を超え3以下であることが好ましく、1を超え2以下であることがより好ましく、1を超え1.5以下であることがさらに好ましく、1を超え1.3以下であることがいっそう好ましい。角度 A が 90° である点における厚さ H_z が大きいほど、角度 A が 75° から 88° までの領域にかかる応力が大きくなるため、 H_y をより大きく(H_z より大きく)することが好ましい。また、 H_z に対する H_y の比の上限値を上記のとおり制限した方が、ダイアフラムの反転挙動をよりしなやかにすることができ、ダイアフラムの反転挙動に起因する細胞へのダメージをより低減することができ、細胞の増殖性をより高めて、細胞生存率の低下をより抑制することができる傾向にある。なお、角度 A が 90° の点は実際には円状の線上に位置しているが、この線上においてもダイアフラムの厚さにばらつきがある場合は、 H_y との比較に用いる厚さとしては、上記線上における最大の厚さを用いる。

[0035] ダイアフラムにおける角度 A が 0° から 75° までの領域におけるいずれの点の厚さ H についても $H \leq H_z$ であることが好ましく、 $H_z < H_y$ も同時に満たすことがより好ましい。角度 A が 0° から 75° までの領域におけるダイアフラムの厚さが厚いほど、角度 A が 90° である点にかかる応力が大きくなる傾向があるため、角度 A が 90° である点におけるダイアフラムの厚さ H_z をより大きく(角度 A が 0° から 75° までの領域における任意の点の厚

さよりも大きく)することが好ましい。なお、角度Aが 90° の点は実際には円状の線上に位置しているが、この線上においてもダイアフラムの厚さにばらつきがある場合は、角度Aが 0° から 75° までの領域における任意の点の厚さHとの比較に用いる厚さとしては、上記線上における最小の厚さを用いる。

[0036] また、ダイアフラムにおける角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点の厚さHについても $H \leq H_z$ であり、かつ $H_z < H_y$ も同時に満たす場合、ダイアフラムにおける角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点の厚さHについても $H < H_y$ となるため、角度Aが 75° から 88° までの領域におけるダイアフラムの破れを抑制する上で好ましい。

[0037] H_z の値は特に規定されないが、 0.5 mm 以上 2 mm 以下であることが好ましく、 0.7 mm 以上 1.9 mm 以下であることがより好ましく、 0.9 mm 以上 1.8 mm 以下であることがさらに好ましく、 1 mm 以上 1.7 mm 以下であることが最も好ましい。

また、ダイアフラムにおける角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点の厚さHについても、 H_z/H の値が1以上3以下であることが好ましく、 1.1 以上 2.5 以下であることがより好ましく、 1.2 以上 2.0 以下であることがさらに好ましく、 1.3 以上 1.8 以下であることが最も好ましい。ダイアフラムにおける角度Aが 0° から 75° までの領域における各点での厚さHに対する H_z の比の上限値を上記のとおり制限した方が、角度Aが 75° から 88° までの領域におけるダイアフラムの厚さが過度に大きくなることを回避しやすいため、ダイアフラムの反転挙動をよりしなやかにできる傾向があり、ダイアフラムの反転挙動による細胞へのダメージをより減少し、細胞の増殖性をより高めて、細胞生存率をより向上できる傾向にある。

[0038] また、ダイアフラムにおける角度Aが 88° を超え 90° 未満の領域については、図3Aから分かるようにダイアフラム反転の際に僅かしか動かない領域である。角度Aが 88° を超え 90° 未満の領域については、角度Aが

90°の点と同様に考えることができるため、 H_z について記載した事項を同様に適用してもよい。

- [0039] ダイアフラムにおける角度Aが75°から88°までの領域における点のうち、最も厚さが厚い点におけるダイアフラムの厚さ H_Y に対して、角度Aが0°から75°までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さHは下記の式2を満たすことが好ましい。

$$1 < H_Y / H \leq 3 \quad (\text{式2})$$

- [0040] 角度Aが0°から75°までの領域におけるダイアフラムの厚さが厚いほど、Yにかかる応力が大きくなる傾向がある。ダイアフラムにおける角度Aが0°から75°までの領域におけるいずれの点の厚さHについても、 H_Y / H が1を超えるようにすることにより、角度Aが75°から88°までの領域はダイアフラムの反転時の応力に耐えるだけの厚さを有し、角度Aが75°から88°までの領域においてダイアフラムの破れがより生じにくくなる。 H_Y / H が3以下となるようにすることで、ダイアフラムの反転挙動をよりしなやかに維持し、ダイアフラムの反転挙動による細胞へのダメージをより低減し、細胞増殖性をより向上し、細胞生存率をより低下させることができる傾向にある。

- [0041] 上記の観点から、ダイアフラムにおける角度Aが0°から75°までの領域におけるいずれの点の厚さHについても、 H_Y / H は1を超え3以下であることが好ましく、1.2以上2.8以下であることがより好ましく、1.4以上2.6以下であることがさらに好ましく、1.6以上2.4以下であることがいっそう好ましい。

また、 H_Y の値は特に限定されないが、1mm以上3mm以下であることが好ましく、1.2mm以上2.8mm以下であることがより好ましく、1.4mm以上2.6mm以下であることがさらに好ましく、1.6mm以上2.4mm以下であることが最も好ましい。

- [0042] ダイアフラムの材質としては、ゴム材料（例えばクロロプレンゴム、ニトリルゴム、エチレンプロピレンジエンゴム、シリコンゴム）、エラストマ

ー（例えば、熱可塑性ポリエステルエラストマー、塩化ビニル樹脂系熱可塑性エラストマー）、フッ素樹脂（例えば、ポリテトラフルオロエチレン）などが挙げられる。

[0043] ダイアフラムの材質はダイアフラムとしての働きが可能であれば特に限定されず、任意の弾性体であってよい。ダイアフラムの材質はシリコーンゴムであることが好ましく、硬度45以上54以下のシリコーンゴムであることがより好ましく、硬度45以上54以下であり、かつ引張強さが5 MPa以上8 MPa以下であるシリコーンゴムであることがさらに望ましい。シリコーンゴムの例としては、モメンティブ・パフォーマンス・マテリアルズ・ジャパン合同会社製TSE3457Tなどが挙げられる。ゴムの硬度は、JIS K6253：2012に準拠して、デュロメータタイプAにより測定できる。また、ゴムの引張強さはJIS K6249：2003に準拠して、当該JISに規定のダンベルを用いて測定することができる。

[0044] シリコーンゴムの硬度が45以上54以下であると、ダイアフラムの破れにくさと反転挙動のしなやかさのバランスがより良好になる。シリコーンゴムの引張強さが5 MPa以上8 MPa以下であると、ダイアフラムの破れにくさと反転挙動のしなやかさのバランスがより良好になる。シリコーンゴムの硬度が45以上54以下であり、加えて、シリコーンゴムの引張強さが5 MPa以上8 MPa以下であると、ダイアフラムの破れにくさと反転挙動のしなやかさのバランスがさらに良好になる。反転挙動がしなやかであることは、細胞へのダメージ低減、細胞増殖性の向上、細胞生存率の向上につながる。

[0045] ダイアフラムの伸び率50%における引張応力 σ は下記の式3を満たすことが好ましい。

$$0.4 \text{ MPa} \leq \sigma \leq 1.5 \text{ MPa} \quad (\text{式3})$$

ダイアフラムの伸び率50%における引張応力 σ は、以下のやり方で求めることができる。

[0046] <ダイアフラムの伸び率50%における引張応力の測定方法>

ダイアフラムから幅 10 mm、長さ 40 mm の大きさの試験片を切り出し、試験片に対し、株式会社東洋精機製作所製の引張試験機ストログラフ R 2（商品名）を用いて引張試験を行う。引張試験の前に、試験片の厚さを、株式会社ミットヨ製の高精度デジマチックマイクロメータ MDH-25M（商品名）を用いて測定する。引張試験は、チャック間距離を 10 mm とし、引張速度を 10 mm/分として、試験片の長さ方向に引張試験を行う。伸び率 50% すなわちチャック間が 15 mm になったときの荷重を、試験片の厚さで割ることで、伸び率 50% のときの引張応力を算出する。試験片は 1 つのダイアフラムから 3 枚切り出し、3 枚の試験片を用いて引張試験を 3 回繰り返し、得られた 3 つの引張応力の平均値をダイアフラムの伸び率 50% における引張応力として使用する。

[0047] ダイアフラムの伸び率 50% のときの引張応力 σ が 0.4 MPa 以上であることで、ダイアフラムが低い圧力で勢いよく反転することをより回避でき、細胞へのダメージをより減少できる傾向がある。ダイアフラムの伸び率 50% のときの引張応力 σ が 1.5 MPa 以下であることで、ダイアフラムを反転させるために必要な圧力をより適切な範囲に制御することができ、また、ダイアフラムの反転挙動の勢いによる細胞へのダメージをより減少できる傾向にある。したがって、ダイアフラムの伸び率 50% のときの引張応力 σ が 0.4 MPa 以上 1.5 MPa 以下であることで、ダイアフラムの反転挙動をよりしなやかにすることができ、細胞へのダメージを軽減して細胞生存率を高く維持することがより容易になる傾向にある。

[0048] 上記の観点から、ダイアフラムの伸び率 50% のときの引張応力 σ は、0.4 MPa 以上 1.5 MPa 以下であることが好ましく、0.5 MPa 以上 1.3 MPa 以下であることがより好ましく、0.6 MPa 以上 1.1 MPa 以下であることがさらに好ましい。

[0049] 本開示に係る細胞培養方法は、
培養容器内に収容された細胞懸濁液中で細胞を培養することと、
培養容器内からダイアフラムポンプにより細胞懸濁液を抜き出すことを

含み、

ダイアフラムポンプのダイアフラムと、ダイアフラムの外縁部のダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面Fとにより規定される空間の体積が 1 cm^3 以上 20 cm^3 以下であり、

ダイアフラムにおける各点について、ダイアフラムの頂点から平面Fに下ろした垂線の足と各点とを結ぶ直線が垂線となす角度を各点の角度Aとしたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さHが 0.5 mm 以上 1.5 mm 以下の範囲内であり、

ダイアフラムの頂点におけるダイアフラムの厚さを H_T としたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さHが下記の式1を満たす、細胞培養方法である。

$$1 \leq H_T/H \leq 1.75 \quad (\text{式1})$$

培養容器及びダイアフラムポンプについては、本開示に係る細胞培養装置の説明において記載した事項がそのまま当てはまる。

[0050] 本開示に係る細胞培養方法において培養する細胞は、特に限定されず、例えば、動物細胞、植物細胞、酵母などの真核細胞、及び枯草菌、大腸菌などの原核細胞が挙げられる。細胞は、ES細胞、IPS細胞、各種幹細胞などであってもよい。

本開示に係る細胞培養方法において培養する細胞は、生産物を生産する細胞であってもよい。生産物を生産する細胞を培養すると、細胞により生産物が生産され、これを回収すれば細胞を用いた物質生産を行うことができる。生産物を生産する細胞として用いられる細胞は、特に限定されず、動物細胞、植物細胞、酵母などの真核細胞、及び枯草菌、大腸菌などの原核細胞のいずれであってもよい。CHO細胞、BHK-21細胞、C127細胞、ハイブリドーマ細胞、NSO細胞及びSP2/O-Ag14細胞などの動物細胞が好ましく、解析が多数行われ、遺伝子工学的な手法が確立している点でCHO細胞がより好ましい。所望の生産物を細胞が元々生産しない又は生産量が少ない場合であっても、例えば、生産物を生産するのに必要な蛋白質をコ

ードするプラスミドなどの発現ベクターを細胞に導入することで、所望の生産物を効率よく生産させることができる。本開示における細胞によって生産される生産物は、上記の細胞が培養液中に生産する物質であれば、特に限定されず、例えば、アルコール、酵素、抗生物質、核酸、組換えタンパク質、抗体などの物質が挙げられる。中でも生産物として、好ましくは、組み換えタンパク質又は抗体であり、より好ましくは抗体である。

[0051] 培養容器内に収容された細胞懸濁液中における細胞の濃度は特に限定されない。ただし、培養容器内に収容された細胞懸濁液中における細胞の濃度が高い方が、細胞量が大きくなること、及び細胞が生産物を生産する場合には生産物の生産量が大きくなることから、細胞の濃度が高いことは好ましい。培養容器内に収容された細胞懸濁液中における細胞の濃度は、細胞を播種後に増大するが、例えば、 $20 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上 $150 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下の範囲内の細胞濃度まで増大してもよい。あるいは、培養容器内に収容された細胞懸濁液中における細胞の濃度は、 $30 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上 $120 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下の範囲内の細胞濃度まで増大してもよく、 $40 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上 $100 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下の範囲内の細胞濃度まで増大してもよく、又は $50 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上 $100 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下の範囲内の細胞濃度まで増大してもよい。なお、本開示中において、細胞について「濃度」とは、個数密度、つまり単位容量当たりの細胞数を指す。

[0052] 細胞の培養に用いる培地としては、細胞の培養に通常使用されている液体培地を用いることができる。例えば、OptiCHO (Life technologies社、12681011) 培地、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、イーグル最小必須培地 (MEM)、RPMI-1640培地、RPMI-1641培地、F-12K培地、ハムF12培地、イスコプ変法ダルベッコ培地 (IMDM)、マッコイ5A培地、ライボビッツL-15培地、及びEX-CELL (商標) 300シリーズ (JRHBiosciences社)、CHO-S-SFM11 (Invitrogen社)、CH

O-SF (Sigma-Aldrich社)、CD-CHO (Invitrogen社)、IS CHO-V (Irvine Scientific社)、PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich社)などを使用することができる。

[0053] 培地にはウシ胎児血清 (FCS) 等の血清を添加してもよい。あるいは、培地は無血清培地、例えば完全合成培地であってもよい。

培地には、アミノ酸、塩、糖類、ビタミン、ホルモン、増殖因子、緩衝液、抗生物質、脂質、微量元素、植物タンパク質の加水分解物などの追加成分を補充してもよい。

[0054] 培地のpHは培養する細胞により異なるが、一般的にはpH 6.0～8.0であり、好ましくはpH 6.8～7.6であり、より好ましくはpH 7.0～7.4である。

培養温度は、一般的には30℃～40℃であり、好ましくは32℃～37℃であり、より好ましくは36℃～37℃であり、培養中に培養温度を変更してもよい。

[0055] 培養は、CO₂濃度が0～40%の雰囲気下で行ってもよく、CO₂濃度が2～10%の雰囲気下で行うことが好ましい。

培養においては、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加えることができる。

[0056] 培養されている細胞懸濁液の総量 (培養容器内の細胞懸濁液量、並びにダイアフラムポンプ及び流路等の培養容器に液体連絡している要素内の細胞培養液量を含む) は、本開示におけるダイアフラムポンプが使用可能な量であれば特に限定されないが、50 mL以上500 mL以下であることが好ましく、60 mL以上400 mL以下であることがより好ましく、70 mL以上300 mL以下であることがさらに好ましく、80 mL以上250 mL以下であることが最も好ましい。上述のとおり、本開示においては、ダイアフラムと、ダイアフラムの外縁部のダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面Fとにより規定される空間の体積が1 cm³以上20 cm³以下であるダイ

アフラムを有するダイアフラムポンプを用いて培養を行う。このように、本開示に係るダイアフラムポンプの能力は限定されるため、細胞懸濁液の量が上述の範囲のように小さい小規模培養であることが好ましい。培養液体積を上述の下限值以上とすることで、サンプリングによる液量減少、揮発等の外乱の影響を受けにくくなり、培養継続がより容易になり、培養液体積を上述の上限値以下とすることで、培養液体積が小規模に抑えられ、実験コストも抑えられる傾向にある。

[0057] 本開示に係る細胞培養方法は、培養容器内の細胞懸濁液を攪拌翼により攪拌することを含んでいてもよく、細胞懸濁液にスパージャーによりガス通気することを含んでいてもよい。

[0058] 細胞の培養は灌流培養であることが好ましい。灌流培養は、新鮮な培地を添加し、同時に使用済み培地を除去する培養法である。灌流培養によれば、 $1 \times 10^8 \text{ cells/mL}$ を超える高い細胞濃度を達成することも可能である。典型的な灌流培養は、1日間又は2日間続くバッチ培養スタートアップで始まり、その後、培養物に新鮮な供給培地を連続的、段階的、及び／又は断続的に添加し、使用済み培地を同時に除去する。灌流培養においては、沈降、遠心分離又は濾過などの方法を用いて、細胞濃度を維持しながら使用済み培地を除去することができる。灌流は、連続的、段階的、断続的又はこれらの組み合わせの何れの形態でもよい。

[0059] ダイアフラムポンプを用いて、培養容器内からの細胞懸濁液の抜き出しを行う。培養容器内からの細胞懸濁液の抜き出しは、間欠的に行っても連続的に行ってもよいが、系の状態を安定に保つ観点からは連続的に行うことが好ましい。逆止弁を用いない往復流タイプのダイアフラムポンプを用いる場合、ダイアフラムポンプを運転すると、培養容器内からの細胞懸濁液の抜き出し、及び抜き出された細胞懸濁液の培養容器への戻しの両方が交互に行われることになる。このような場合も、上記の「培養容器内からの細胞懸濁液の抜き出し」の表現が指す範囲に含まれる。細胞懸濁液の抜き出し位置は、液面よりも下の位置であれば特に限定されず、例えば培養容器の底部近辺とす

ることができる。

[0060] ダイアフラムポンプを用いる場合、培養容器とダイアフラムポンプとの間にクロスフロー方式のフィルタを設け、クロスフロー方式による濾過を行ってもよい。このような濾過により、細胞懸濁液からの細胞による生産物の回収、老廃物の除去等を行うことが可能である。

[0061] ただし、本開示に係る細胞培養方法において細胞懸濁液の培養容器内からの抜き出しを行う目的は特に限定されず、抜き出された細胞懸濁液は単に廃棄されて細胞濃度の調節、老廃物の除去を行ってもよく、あるいは遠心分離等により細胞を回収する処理に供されてもよく、あるいはクロスフロー方式以外のフィルタにより細胞による生産物の回収、老廃物の除去等を行ってもよい。これらの場合、ダイアフラムポンプは往復流を発生するタイプであっても、一方向の流れを発生するタイプであってもよい。

[0062] 本開示に係る細胞培養方法においては、本開示に係る細胞培養装置の説明において記載した任意の事項を適用することができ、本開示に係る細胞培養方法は、例えば、以下の実施形態を含む。

[0063] 本開示に係る細胞培養方法においては、ダイアフラムにおける角度Aが75°から88°までの領域における点のうち、最も厚さが厚い点におけるダイアフラムの厚さを H_Y とし、角度Aが90°の点におけるダイアフラムの厚さを H_Z としたとき、 $H_Z < H_Y$ であり、かつ、角度Aが0°から75°までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さHは $H \leq H_Z$ であることが好ましい。

[0064] 本開示に係る細胞培養方法においては、ダイアフラムにおける角度Aが75°から88°までの領域における点のうち、最も厚さが厚い点におけるダイアフラムの厚さを H_Y としたとき、角度Aが0°から75°までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さHは下記の式2を満たすことが好ましい。

$$1 < H_Y / H \leq 3 \quad (\text{式2})$$

[0065] 本開示に係る細胞培養方法においては、ダイアフラムの材質がシリコン

ゴムであることが好ましい。

- [0066] 本開示に係る細胞培養方法においては、ダイアフラムの伸び率50%における引張応力 σ が下記の式3を満たすことが好ましい。

$$0.4 \text{ MPa} \leq \sigma \leq 1.5 \text{ MPa} \quad (\text{式3})$$

- [0067] 本開示に係る細胞培養方法においては、ダイアフラムポンプの運転時において、ダイアフラムを駆動させるダイアフラムポンプの内部の圧力Pが下記の式4を満たすことが好ましい。

$$\text{大気圧} - 0.1 \text{ MPa} \leq P \leq \text{大気圧} + 0.1 \text{ MPa} \quad (\text{式4})$$

- [0068] ダイアフラムポンプの内部の圧力Pとは、ダイアフラムポンプ内の、ダイアフラムを境として細胞懸濁液とは逆側の空間における圧力を指し、言い換えればダイアフラムポンプを駆動するための媒体の圧力を指す。ダイアフラムポンプの内部の圧力Pは、図2においては、気体で満たされたチャンバー303内の圧力を指す。上記の式は、言い換えれば、大気圧と圧力Pとの差の絶対値が、ダイアフラムポンプの運転中0.1 MPa以下に維持されること、つまり大気圧と圧力Pとの差の絶対値の最大値が0.1 MPa以下であることを意味している。ダイアフラムポンプの内部の圧力Pは、上記空間に連絡した流路等において測定することも可能であり、例えば図2における流路59において測定することも可能である。

- [0069] 圧力Pと大気圧との間の圧力差は、ダイアフラムを反転させるための原動力となる。上記圧力差の絶対値を0.1 MPa以下とすることで、ダイアフラムの反転挙動を適切な速度で行うことができ、細胞へのダメージをより軽減し、ダイアフラムの破れをより抑制できる傾向がある。

- [0070] Pは[大気圧-0.1 MPa]以上[大気圧+0.1 MPa]以下であることが好ましく、[大気圧-0.08 MPa]以上[大気圧+0.08 MPa]以下であることがより好ましく、[大気圧-0.06 MPa]以上[大気圧+0.06 MPa]以下であることがさらに好ましく、[大気圧-0.05 MPa]以上[大気圧+0.05 MPa]以下であることがいっそう好ましい。ただし、圧力Pと大気圧との間の圧力差をある程度以上に維持した

方が、ダイアフラムの完全な反転を促し、細胞懸濁液の滞留を回避する上で有効である。このため、圧力Pと大気圧との間の圧力差の絶対値の最大値（ダイアフラム反転サイクルにおける最大値）は1 kPa以上であることが好ましく、5 kPa以上であることがより好ましく、8 kPa以上であることがさらに好ましく、10 kPa（0.01 MPa）以上であることがいっそう好ましい。

[0071] 本開示に係る細胞培養方法において、細胞懸濁液に含まれる細胞はCHO細胞であってもよい。

[0072] 本開示に係る細胞培養方法は、

培養容器内から抜き出された細胞懸濁液を、細胞懸濁液中の細胞濃度よりも高い細胞濃度を有する第一の溶液と、細胞懸濁液中の細胞濃度よりも低い細胞濃度を有する第二の溶液と、に分離膜を用いてタンジェンシャルフローフィルトレーション方式により分離する分離処理を行うことと、

第一の溶液を培養容器内に戻すことと、

培養容器内に新たに培地を添加することと、

をさらに含んでいてもよい。

[0073] タンジェンシャルフローフィルトレーション方式とは、膜分離処理の対象となる液体を分離膜の膜面に沿って流すことにより、サイズの小さい成分を液体成分と共に分離膜の透過側へと移動させ、サイズの大きい成分及び残りの液体成分を分離膜の未透過側に保持する方式である。本開示においては、分離膜の未透過側、つまり供給側を1次側とも称し、分離膜の透過側を2次側とも称する。

本開示においては、タンジェンシャルフローフィルトレーション方式による膜分離処理は、培養容器内から抜き出された細胞懸濁液が分離膜の膜面に沿って平行な一方向の流れを形成してもよいし、培養容器内から抜き出された細胞懸濁液の流れの方向を所定の時間毎に逆転させて、往復する流れを形成してもよい。

[0074] 培養容器内からの細胞懸濁液の抜き出しは、ダイアフラムポンプを用いて

行うことができる。培養容器内から抜き出された細胞懸濁液は、タンジェンシャルフローフィルトレーションを行うためのフィルタ部へと送液される。培養容器内からフィルタ部への細胞懸濁液の抜き出しは、間欠的に行っても連続的に行ってもよいが、系の状態を安定に保つ観点からは連続的に行うことが好ましい。

[0075] フィルタ部は、例えば、容器と、容器内の空間を供給側と透過側とに隔て、培養容器内から抜き出された細胞懸濁液に対して膜分離処理を施す分離膜とを備える。分離膜の供給側においては、フィルタ部は流路にそれぞれ接続された流入口及び流出口とを有する。タンジェンシャルフローフィルトレーション方式による膜分離処理において、培養容器内から抜き出された細胞懸濁液の流れの方向を所定の時間毎に逆転させる場合は、流入口と流出口とは流れの方向の逆転により入れ替わることになる。

[0076] 分離膜は、繊維状部材を網目状に織ることにより構成されるメッシュフィルタであっても、中空糸膜であってもよい。中空糸膜としては、精密濾過膜（MF膜）あるいは限外濾過膜（UF膜）を用いることができる。

[0077] 分離膜は、細胞懸濁液中の生細胞は透過させないが、例えば、細胞懸濁液中の目的とする生産物などの小分子は透過させる。例えば、抗体を動物細胞に生産させる場合、抗体のサイズが1 nm～5 nm程度であるのに対して、動物細胞の大きさは10 μ mオーダー程度であるため、例えば分離膜としての精密濾過膜や限外濾過膜を用いることで、生細胞を1次側に留めつつ、抗体を分離膜を通して2次側に移行させることができる。また、液体成分、例えば水分子の大きさは微小であるため、液体成分も一部の量が抗体と共に2次側に移行する。この結果、分離膜の非透過側に残った液体中における細胞濃度は上昇する。このように、タンジェンシャルフローフィルトレーション方式による分離を行うことにより、フィルタ部に送液された細胞懸濁液は、分離膜を透過せずに1次側に留まり、細胞懸濁液よりも高い細胞濃度を有する戻り液と、分離膜を透過して2次側に移行した、細胞懸濁液よりも低い細胞濃度を有する透過液とに分離される。透過液には例えば細胞による生産物

などの小分子が含まれる。なお、ここでいう細胞懸濁液中の細胞濃度とは、培養容器内の細胞懸濁液中の生細胞の濃度を意味する。また、本開示において「細胞濃度」とは特段の断りが無い限り「生細胞濃度」を指す。

- [0078] 1次側に留まった戻り液は、フィルタ部から流出して培養容器内に戻る。例えば、タンジェンシャルフローフィルトレーションにおけるフィルタ部供給側空間中の流れの向きを一方向に固定する場合には、細胞懸濁液を、逆止弁を有するダイヤフラムポンプによる送液圧力により流出口から流出させ、流出口と培養容器とを連絡する流路を通して培養容器内に戻してもよい。この場合は、戻り液は、培養容器内の細胞懸濁液がフィルタ部の流入口に移動する際に通った流路とは異なる流路を通して、培養容器内に戻ることとなり、循環する流れが形成される。一方、逆止弁を有しないダイヤフラムポンプによりタンジェンシャルフローフィルトレーションにおけるフィルタ部供給側空間中の流れの向きを、時間の経過と共に逆転させる、つまり流れを往復させる場合には、戻り液は、培養容器内の細胞懸濁液がフィルタ部の流入口に移動する際に通った流路と同じ流路を通して、培養容器内に戻ることとなり、また、流れの向きの逆転と共に、流入口と流出口は逆転する。

- [0079] 分離膜を透過した透過液中には、細胞による生産物などの小分子が含まれている。透過液中の生産物を回収して医薬品の製造及び食品の製造など様々な用途に用いることができる。生産物の回収は、単に透過液の回収、例えば透過液をタンク中に回収することであってもかまわない。生産物の純度を向上したり、溶媒を変更したり、例えば粉末状にするなど形態を変更したい場合には、透過液をさらなる処理に供することができる。

- [0080] 培養容器内からフィルタ部に送液された細胞懸濁液は透過液と戻り液とに分離されるため、戻り液の量は、フィルタ部に送液された細胞懸濁液の量よりも少なくなる。フィルタ部に送液された細胞懸濁液量と戻り液量との差を少なくとも補うために、新鮮培地を培養容器内に供給する。新鮮培地を培養容器内に供給することで、培養容器内の細胞濃度が過剰に上昇することを抑えることができ、また、培養容器内の細胞の状態を健康な状態に保つことが

できる。つまり、灌流培養による利益が得られる。

なお、新鮮培地の培養容器内への供給は、間欠的に行っても連続的に行ってもよい。また、培養容器内の細胞懸濁液量は常時完全に一定である必要はなく、略一定、例えば $\pm 10\%$ 、又は $\pm 5\%$ 、又は $\pm 1\%$ 程度の変動が生じるものであってもよい。培養容器内の細胞懸濁液量の測定も、常時行う必要は必ずしもなく、間欠的に行うものであってもよい。細胞懸濁液量に若干の変動があっても、灌流培養による利益を得ることができる。

[0081] 本開示に係る生産物の製造方法は、
生産物を生産する細胞を本開示に係る細胞培養方法を用いて培養することと、

上記細胞懸濁液から生産物を回収することと、
を含む、生産物の製造方法である。

本開示に係る生産物の製造方法においては、本開示に係る細胞培養方法を用いて培養を行うため、生産物を生産する細胞の細胞増殖性が良好であるため生産物の生産性を高くでき、また、ダイアフラムの破損も抑制できる。

[0082] 生産物を生産する細胞としては、先に例示した生産物を生産する細胞を用いることができ、また生産物としては先に例示した生産物とすることができる。生産物は抗体であることが好ましい。

[0083] 生産物は、培養の終了時に細胞懸濁液からまとめて回収してもよいが、生産物を培養中に所定の頻度で又は連続的に細胞懸濁液から回収することが好ましい。特に、生産物の製造方法において用いられる細胞培養方法が、

培養容器内から抜き出された細胞懸濁液を、細胞懸濁液中の細胞濃度よりも高い細胞濃度を有する第一の溶液と、細胞懸濁液中の細胞濃度よりも低い細胞濃度を有する第二の溶液と、に分離膜を用いてタンジェンシャルフローフィルトレーション方式により分離する分離処理を行うことと、

第一の溶液を培養容器内に戻すことと、

培養容器内に新たに培地を添加することと、

をさらに含み、生産物の製造方法において上記第二の溶液から生産物を回

収する実施形態が好ましい。

生産物は、一般に、細胞に比してサイズが大幅に小さい。培養容器から細胞懸濁液を抜き出す際には、細胞懸濁液に含まれる生産物も共に抜き出されるが、タンジェンシャルフィルトレーション方式による分離処理においては、生産物は細胞に比して小さいサイズを有しているため、大きく濃度減少することなくそのまま第二の溶液に含まれ、一方、細胞は主に第一の溶液の側に留まる。このため、第二の液体中から生産物を回収することができる。

[0084] 上記のように、「細胞懸濁液から生産物を回収する」ことは、細胞懸濁液を処理して得られた処理物（例えば、濾過により得られた第二の溶液）から生産物を回収する場合をも包含する。

[0085] 生産物の回収は、単に細胞懸濁液を回収すること、単に上記第二の溶液を回収すること等であっても構わず、この場合、細胞懸濁液、第二の溶液等は、例えばタンク中に回収することができる。細胞懸濁液を回収した場合、回収した細胞懸濁液に対しては生産物を細胞から分離するための処理を行うことが好ましく、例えばフィルタ又は遠心分離等により細胞を溶液から除去することができる。また、第二の溶液を回収した場合であっても、細胞をさらに除去するために、フィルタ又は遠心分離等によるさらなる処理に供しても構わない。その他、生産物の純度を向上したり、溶媒を変更したり、例えば粉末状にするなど形態を変更する目的で、溶液をさらなる処理に供することもできる。

[0086] 例えば、溶液に含まれる生産物は、精製処理により精製することができる。得られた生産物は、高い純度にまで精製することができる。生産物が抗体又はその断片などのポリペプチドである場合、生産物の分離及び精製は通常のポリペプチドで使用されている分離及び精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルタ、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動及び等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、ポリペプチドを分離及び精製することができるが、これらに限定されるものではない。得られたポリペプ

チドの濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 等により行うことができる。

[0087] 本開示に係る細胞培養装置、細胞培養方法、及び生産物の製造方法の一例について、図1においてまとめて説明する。図1は、本開示に係る細胞培養方法及び生産物の製造方法に適用可能な細胞培養装置の構成の一例を示す図である。

[0088] 細胞培養装置100は、細胞を培地とともに収容し培養する培養容器10と、培養容器10に収容されている細胞懸濁液を流路57を通して抜き出すためのダイヤフラムポンプ37と、培地供給容器20に収容された新鮮培地L2を流路56を通して培養容器10内に供給するためのポンプP1と、CO₂ガスを培養容器10内に供給するためのCO₂供給容器31と、空気を培養容器10内に供給するための空気供給容器32と、O₂ガスを培養容器10内に供給するためのO₂供給容器33と、を備える。培養容器10内には、細胞懸濁液L1が収容され、細胞懸濁液L1を攪拌するための攪拌翼11が備えられている。攪拌翼11を回転させることで、培養容器10の内部に収容された細胞懸濁液L1が攪拌され、細胞懸濁液L1の均質性が保たれる。また、培養容器にはサンプリング口35が備えられている。

[0089] CO₂供給容器31内のCO₂ガスは、流路51を通してフローメーター34に送られ、さらに流路54を通して培養容器10内に供給される。流路51にはレギュレータR1及び圧力計M1が設けられ、流量の制御及び圧力のモニターを行っている。流路54にはフィルタF1が設けられ、供給される気体の清浄化を行っている。空気供給容器32内の空気は、流路52を通してフローメーター34に送られ、さらに流路54を通して培養容器10内に供給される。流路52にはレギュレータR2及び圧力計M2が設けられ、流量の制御及び圧力のモニターを行っている。O₂供給容器33内のO₂ガスは、流路53を通してフローメーター34に送られ、さらに流路55を通して培養容器10内に供給される。流路53にはレギュレータR3及び圧力計M3が設けられ、流量の制御及び圧力のモニターを行っている。流路55には

フィルタ F 2 が設けられ、供給される気体の清浄化を行っている。

[0090] 流路 5 7 を通して抜き出された細胞懸濁液は、タンジェンシャルフローフィルトレーション方式の中空糸膜フィルタ 3 6 に送られる。中空糸膜フィルタ 3 6 を透過した液体は、流路 6 0 を通して、ポンプ P 2 により中空糸膜フィルタ 3 6 から排出される。培養される細胞が生産物を生産する細胞の場合は、中空糸膜フィルタ 3 6 から流路 6 0 へと排出された液体を精製処理に供することで、生産物を回収することができる。ダイヤフラムポンプ 3 7 は、流路 5 7、中空糸膜フィルタ 3 6 の非透過側、及び流路 5 8 に往復する流れを生成する。ダイヤフラムポンプ 3 7 の流路 5 8 側のチャンバー（液体側チャンバー）とは反対側のチャンバー（気体側チャンバー）は気体で満たされ、流路 5 9 に連結している。空気供給容器 3 8 内の空気は、電磁弁 V 2 を閉め、電磁弁 V 1 を開くことにより流路 5 9 を介してダイヤフラムポンプ 3 7 の気体側チャンバーに流入する。これにより、気体側チャンバー内の圧力は大気圧を超える圧力となり、ダイヤフラムポンプ 3 7 のダイヤフラムは液体側チャンバーに頂点を置く略半球形状を取る。逆に、電磁弁 V 2 を開き、電磁弁 V 1 を閉めた場合には、真空ポンプ P 3 によりダイヤフラムポンプ 3 7 の気体側チャンバー内の空気の一部は気体側チャンバーから排出され、気体側チャンバー内は大気圧よりも低い圧力となり、ダイヤフラムポンプ 3 7 のダイヤフラムは気体側チャンバーに頂点を置く略半球形状へと反転する。電磁弁 V 1 とダイヤフラムポンプ 3 7 との間にはレギュレータ R 4 及びフィルタ F 3 が設けられ、気体流量の制御及び気体の清浄化を行っている。同様に電磁弁 V 2 とフィルタ F 3 との間にはレギュレータ R 5 が設けられ、気体流量の制御を行っている。流路 5 9 には圧力計 M 4 が設けられており、フィルタ F 3 の圧力損失はほとんど無いため、圧力計 M 4 によりダイヤフラムポンプ 3 7 の気体側チャンバー内の圧力をモニターすることができる。なお、図 1 中の矢印は、液体若しくは気体の移動方向、又はダイヤフラムポンプ 3 7 のダイヤフラムの移動を示している。なお、気体を通る流路 5 9 以外の流路は金属、プラスチック等で形成された配管とすることができ、気体を通

る流路59については金属、プラスチック等で形成された配管としてもよく、ゴム等で形成されたチューブであってもよい。

実施例

[0091] 図1に示した細胞培養装置を用いて、CHO細胞の培養を行った。

まず、全容250mLのエイブル株式会社製培養容器に培地（商品名CD OptiCHO、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）90mLを入れ37℃で保持し、培養容器上面から空気を3.8mL/分、CO₂を0.2mL/分で通気し1日間放置した。次に、CHO細胞を培養容器内の細胞濃度が $2.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 、培養容器内の液量が100mLになるように播種した。播種から3日後に試験対象のダイアフラムポンプによる細胞懸濁液の往復流を、ダイアフラム気体側チャンバーの最大圧力（大気圧からの差異の絶対値の最大値）が表2に示された所定圧力となるようにして生じさせ、この往復流によりタンジェンシャルフローフィルトレーション方式による濾過を行った。濾過には、Repligen社製の中空糸膜フィルター（TO4-P20U-10-N）を用いた。濾過により培養系から失われる液量を補充するため、新鮮培地（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製の商品名CD OptiCHOで表される培地と、GEヘルスケア製の商品名Cell Boost 7a及び7bで表される培地との混合物）の供給（培養容器内に新鮮培地を供給すること）も並行して行った。上記の濾過及び新鮮培地の供給は、1.2L/日の割合で行った。タンジェンシャルフローフィルトレーション方式による濾過においては、細胞懸濁液を、細胞懸濁液よりも高い細胞濃度を有する戻り液と、細胞懸濁液よりも低い細胞濃度を有する透過液とに分離し、戻り液は培養容器内に戻した（戻り液を培養容器内に戻すこと）。また同日（播種から3日後）から、培養容器内に一端が挿入された内径2mmの単管を用いて、培養容器下面側から酸素を1mL/分の流量で培養容器内に供給した。

[0092] 上記の培養において、細胞濃度が $8.0 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ に達した日からは、平均細胞濃度（以下に記載の1日2回の細胞濃度測定による2時点

での細胞濃度の平均値)が約 $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ になるように1日に1回、培養容器内から所定量の細胞懸濁液を抜き出す操作(セルブリーディング操作)を行い、播種から28日目まで培養を継続した。なお、培養途中でダイアフラムポンプによる細胞懸濁液の往復流が停止した場合、ダイアフラム気体側チャンバーの圧力の絶対値の最大値を0.1MPaまで増加させ、それでも往復流が再開しないときは培養を停止させた。培養停止後に、ダイアフラムの破れの有無を目視で確認した。

[0093] 播種した日からセルブリーディング操作を開始した日の前までは1日1回、セルブリーディング操作を開始した日の後からはセルブリーディング操作前後の1日2回、培養容器内の細胞懸濁液をサンプリングして、BECKMAN COULTER社の商品名Vicerio XRを用いて細胞濃度及びバイアビリティを測定した。バイアビリティは死細胞と生細胞との合計数に対する生細胞の数割合を意味する。

[0094] 試験対象のダイアフラムポンプとして、比較例1ではRepligen製XCel ATF2を用いた。それ以外の実施例及び比較例では、SUS316製の金属容器内に以下の素材で形成されたダイアフラムを有するダイアフラムポンプを用いた。実施例1～11、16、17では、モメンティブ・パフォーマンス・マテリアルズ・ジャパン合同会社製シリコーンゴム(TSE3457T)、実施例12ではモメンティブ・パフォーマンス・マテリアルズ・ジャパン合同会社製シリコーンゴム(TSE3478T)、実施例13ではモメンティブ・パフォーマンス・マテリアルズ・ジャパン合同会社製シリコーンゴム(TSE221-5U)、実施例14ではモメンティブ・パフォーマンス・マテリアルズ・ジャパン合同会社製シリコーンゴム(TSE3466)、実施例15では信越化学工業株式会社製シリコーンゴム(KE-951-U)、を成形して得た、表1及び表2に記載のサイズ及び特性を有するダイアフラムを上記金属容器内に収容し、空気及び真空ポンプと電磁弁にてポンプ内の圧力(気体側チャンバー内の圧力)を一定時間毎に正圧又は負圧に切り替え制御できる装置を用いた。

[0095] ダイアフラムの各位置の厚さは、ダイアフラムポンプを上記培養に使用する前に、厚み計（ミットヨ株式会社製、商品名シックネスゲージ547-31）を用いて測定した。ダイアフラムの伸び率50%のときの引張り応力は、以下の手順に沿って測定した。ダイアフラムから幅10mm、長さ40mmの大きさの試験片E1を切り出し、試験片E1に対し、株式会社東洋精機製作所製の引張試験機ストログラフR2（商品名）を用いて引張試験を行った。引張試験の前に、試験片E1の厚さを株式会社ミットヨ製の高精度デジマチックマイクロメータMDH-25M（商品名）を用いて測定した。引張試験は、チャック間距離を10mmとし、引張速度を10mm/分として、試験片E1の長さ方向に引張試験を行った。伸び率50%すなわちチャック間が15mmになったときの荷重を、試験片E1の厚さで割ることで、伸び率50%のときの引っ張り応力を導出した。試験片E1は1つのダイアフラムから3枚切り出し、3枚の試験片を用いて引張試験を3回繰り返し、得られた3つの引張応力の平均値をダイアフラムの伸び率50%における引張応力として使用した。

[0096] 上記で観察したダイアフラムの破れの有無、細胞濃度、及びバイアビリティを基に以下の評価基準でように評価を行った。

<ダイアフラムの状態>

- A 使用後に破れ、亀裂、及び変色が無かった。
- B 使用後にダイアフラムの一部が白く変色していた。
- C 使用後にダイアフラムの一部に亀裂が生じていた。
- D 培養の途中でダイアフラムが破れた。

<細胞増殖性>

- A 播種後10日以内に細胞濃度が $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上に増加した。
- B 播種後10日以内には、細胞濃度は $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ に達しなかった。

<平均バイアビリティ>

A 28日間の培養期間中におけるバイアビリティの平均値が95%以上であった。

B 28日間の培養期間中におけるバイアビリティの平均値が90%以上95%未満であった。

C 28日間の培養期間中におけるバイアビリティの平均値が85%以上90%未満であった。

[0097] ダイアフラムの状態の評価について、具体的な状態の具体例を図4に示す。図4（A）は、上記の判定基準における状態Aにおけるダイアフラムの状態を表しており、図4（B）は、上記の判定基準における状態Bにおけるダイアフラムの状態を表しており、図4（C）は、上記の判定基準における状態Cにおけるダイアフラムの状態を表しており、図4（D）は、上記の判定基準における状態Dにおけるダイアフラムの状態を表している。図4（A）～（D）において、状態B、状態C及び状態Dでは明らかな異常が見られるが、状態B及び状態Cにおいてはダイアフラムの運転自体は可能である。このため、状態A～状態Cは許容範囲内であるといえる。しかし、状態Dのように培養の途中でダイアフラムが破れてしまうと、ダイアフラムポンプとしての機能（往復流の発生）を果たせなくなるため、培養を継続できない。また、細胞増殖性及び平均バイアビリティの評価についての具体的な例を図5に示す。図5において増殖性として示される変化曲線は、播種後の培養日数と細胞濃度（生細胞濃度）との関係を表している。図5における増殖性Aの場合のように、細胞増殖が順調に進む場合には、高い細胞濃度に達することが可能で、また、当該高い細胞濃度を維持することができる。一方、細胞増殖性の評価がBの場合は、典型的には図5に示すように、細胞濃度は比較的低い細胞濃度で極大に達し、その後減少してしまう。図5におけるバイアビリティとして示される変化曲線は、播種後の培養日数とバイアビリティ（細胞生存率＝生細胞数／（生細胞数＋死細胞数））との関係を示している。播種後のバイアビリティは徐々に減少する傾向は見られるものの、減少傾向は平均バイアビリティ評価のランクが下に行くにつれてより顕著になる。とは

いえ、平均バイアビリティについてはCであっても許容範囲内である。細胞についての評価における許容範囲は、細胞増殖性が許容範囲内（増殖性A）であることが前提となり、バイアビリティが高いことは、より好ましい範囲を示している。

[0098] 各例の構成を評価結果とともに以下の表1及び表2に示す。

[0099] [表1]

実施例	ダイアフラムの体積 (cm^3)	角度Aが0～75度までの領域の最大厚さ X_{max} (mm)	角度Aが0～75度までの領域の最小厚さ X_{min} (mm)	頂点の厚さと、角度Aが0～75度までの領域の厚さとの比の最大値 (H_T/H) $_{\text{max}}$	頂点の厚さと、角度Aが0～75度までの領域の厚さとの比の最小値 (H_T/H) $_{\text{min}}$	角度Aが90度の点の厚さ H_Z (mm)	角度Aが75～88度までの領域の最大厚さ H_Y (mm)
実施例 1	3.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6	1.7
実施例 2	6.4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6	1.7
実施例 3	3.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6	1.7
実施例 4	3.9	1.3	1.3	1.0	1.0	1.6	1.7
実施例 5	3.9	0.7	0.7	1.0	1.0	1.6	1.7
実施例 6	3.9	1.2	0.8	1.5	1.0	1.6	1.7
実施例 7	3.9	1.3	1.3	1.0	1.0	1.6	1.4
実施例 8	3.9	1.3	1.3	1.0	1.0	1.2	1.7
実施例 9	3.9	1.3	1.3	1.0	1.0	1.2	1.2
実施例 10	3.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6	2.5
実施例 11	3.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6	3.3
実施例 12	3.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6	1.7
実施例 13	3.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6	1.7
実施例 14	3.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6	1.7
実施例 15	3.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6	1.7
実施例 16	3.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6	1.7
実施例 17	3.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.6	1.7
比較例 1	35	2.2	1.2	1.8	1.0	1.6	1.7
比較例 2	3.9	0.4	0.4	1.0	1.0	1.6	1.7
比較例 3	3.9	1.7	1.7	1.0	1.0	1.6	1.7
比較例 4	3.9	2.2	1.2	1.8	1.0	1.6	1.7
比較例 5	3.9	1.1	0.6	1.8	1.0	1.6	1.7
比較例 6	3.9	1.2	0.8	1.0	0.7	1.6	1.7

[0100] [表2]

実施例	$H_Z < H_Y$	常に $H_Z \geq H$	H_Y/H の比の 最大値 (H_Y/H)max	H_Y/H の比の 最小値 (H_Y/H)min	伸び率 50%の ときの引張応力 σ (MPa)	ダイアフラムへの 圧力の絶対値 の最大値 (MPa)	ダイアフラム の状態	細胞増 殖性	平均バイア リティ
実施例 1	満たす	満たす	1.7	1.7	0.8	0.05	A	A	A
実施例 2	満たす	満たす	1.7	1.7	0.8	0.05	A	A	B
実施例 3	満たす	満たす	1.7	1.7	0.8	0.05	A	A	B
実施例 4	満たす	満たす	1.3	1.3	0.8	0.05	A	A	C
実施例 5	満たす	満たす	2.4	2.4	0.8	0.05	B	A	B
実施例 6	満たす	満たす	2.1	1.4	0.8	0.05	A	A	C
実施例 7	満たさない	満たす	1.1	1.1	0.8	0.05	B	A	C
実施例 8	満たす	満たさない	1.3	1.3	0.8	0.05	B	A	C
実施例 9	満たさない	満たさない	0.9	0.9	0.8	0.05	C	A	C
実施例 10	満たす	満たす	2.5	2.5	0.8	0.05	A	A	B
実施例 11	満たす	満たす	3.3	3.3	0.8	0.05	A	A	C
実施例 12	満たす	満たす	1.7	1.7	0.6	0.05	A	A	B
実施例 13	満たす	満たす	1.7	1.7	0.3	0.05	A	A	C
実施例 14	満たす	満たす	1.7	1.7	1.2	0.05	A	A	B
実施例 15	満たす	満たす	1.7	1.7	1.6	0.05	A	A	C
実施例 16	満たす	満たす	1.7	1.7	0.8	0.07	A	A	B
実施例 17	満たす	満たす	1.7	1.7	0.8	0.12	A	A	C
比較例 1	満たす	満たさない	1.4	0.8	0.8	0.05	-	B	-
比較例 2	満たす	満たす	4.3	4.3	0.8	0.05	D	-	-
比較例 3	満たす	満たさない	1.0	1.0	0.8	0.05	-	B	-
比較例 4	満たす	満たさない	1.4	0.8	0.8	0.05	D	A	-
比較例 5	満たす	満たす	2.8	1.5	0.8	0.05	D	A	-
比較例 6	満たす	満たす	2.1	1.4	0.8	0.05	D	A	-

[0101] ダイアフラムと、ダイアフラムの外縁部のダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面とにより規定される空間の体積が 1 cm^3 以上 20 cm^3 以下であり、角度 A が 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さ H が 0.5 mm 以上 1.5 mm 以下の範囲内であり、かつ、角度 A が 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さ H が式 1

$$1 \leq H_T / H \leq 1.75 \quad (\text{式 1})$$

を満たす、本願実施例 1 ～ 実施例 17 においては、ダイアフラムの破損が抑制され、良好な細胞増殖性が得られ、かつ、良好な細胞生存率が得られた

。例えば、実施例 1 においては培養後のダイアフラムに異常が見られなかったことに加え、図 6 に示す良好な細胞増殖性及びバイアビリティを示した。図 6 において白抜き菱形はバイアビリティの変化を表し、黒塗り菱形は細胞濃度（生細胞濃度）の変化を表す。図 6 において 10 日目以降、細胞濃度に振動的変動が見られるのは、セルブリーディング操作のために細胞濃度が下がり、その後の増殖によって細胞濃度が再び上昇したためである。

[0102] これに対して、上記空間の体積が 20 cm^3 を超え、角度 A が 0° から 75° までの領域におけるダイアフラムの厚さ H の最大値が 1.5 mm を超え、 H_T/H の最大値が 1.75 を超える比較例 1 においては、細胞濃度の上昇が低い細胞濃度で止まってしまい、十分な細胞増殖性が得られなかった。細胞濃度が減少を始めてしまったため、培養を停止させた。このため、28 日培養後のダイアフラム状態及び 28 日間の平均バイアビリティは測定できなかった。この結果は、従来の培養用ダイアフラムポンプを用いても、小規模での培養においては細胞増殖性を維持できないことを示している。

[0103] また、角度 A が 0° から 75° までの領域におけるダイアフラムの厚さ H の最小値が 0.5 mm 未満である比較例 2 においては、播種から 10 日目より前、かつ細胞濃度が $80 \times 10^6\text{ cells/mL}$ に達する前に、ダイアフラムが培養途中に破れてしまった。このため、細胞増殖性及び 28 日間の平均バイアビリティは測定できなかった。

角度 A が 0° から 75° までの領域におけるダイアフラムの厚さ H の最大値が 1.5 mm を超える比較例 3 においては、細胞濃度の上昇が低い細胞濃度で止まってしまい、十分な細胞増殖性が得られなかった。細胞濃度が減少を始めてしまったため、培養を停止させた。このため、28 日培養後のダイアフラム状態及び 28 日間の平均バイアビリティは測定できなかった。

角度 A が 0° から 75° までの領域におけるダイアフラムの厚さ H の最大値が 1.5 mm を超え、 H_T/H の最大値が 1.75 を超える比較例 4 においては、ダイアフラムが培養途中に破れてしまった。このため、28 日間の平均バイアビリティは測定できなかった。

H_T/H の最大値が1.75を超える比較例5においては、ダイアフラムが培養途中に破れてしまった。このため、28日間の平均バイアビリティは測定できなかった。なお、比較例5は、Replicon製XCell ATF 2に対する比較例1のダイアフラムを相似形で小さくしたものに对应する。このように、従来の培養用ダイアフラムポンプをそのまま小さくしても、ダイアフラム破損の抑制と高い細胞増殖性との両立はできないことが示された。

H_T/H の最小値が1未満の比較例6においては、ダイアフラムが培養途中に破れてしまった。このため、28日間の平均バイアビリティは測定できなかった。

[0104] 以上の結果から、ダイアフラムの外縁部のダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面とにより規定される空間の体積が 1 cm^3 以上 20 cm^3 以下であり、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さHが 0.5 mm 以上 1.5 mm 以下の範囲内であり、かつ、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においてもダイアフラムの厚さHが式1を満たすダイアフラムポンプを用いることによって、小規模の培養において高い細胞増殖性と、ダイアフラム破れの抑制とを両立させることができることが分かる。

[0105] さらに、実施例4の結果と、実施例7から実施例9の結果とを比較することにより、 $H_Z < H_Y$ 及び $H_Z \geq H$ を満たすことにより、ダイアフラムの破損がより抑制される傾向であることが分かる。また、実施例10の結果と実施例11の結果との比較により、 H_Y/H の値を1を超え3以下の範囲内の値とすることで、より高い細胞生存率が得られる傾向であることが分かる。実施例12及び実施例14の結果と、実施例13及び実施例15の結果とを比較することで、ダイアフラムの伸び率50%における引張応力 σ を 0.4 MPa 以上 1.5 MPa 以下の範囲内の値とすることで、より高い細胞生存率が得られる傾向であることが分かる。実施例1及び実施例16の結果と、実施例17の結果とを比較することにより、ダイアフラムポンプの内部の圧力Pと

大気圧との間の圧力差の絶対値を0.1 MPa以下に制御することでより高い細胞生存率が得られる傾向であることが分かる。

[0106] 以上説明したように、本開示によれば、容量の小さいダイヤフラムポンプにより細胞懸濁液の抜き出しをする場合に、良好な細胞増殖性とダイヤフラムの破損抑制とを両立できる細胞培養装置、細胞培養方法、及び生産物の製造方法を提供することができる。

[0107] 日本出願特願2019-018245号の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

[0108] 本明細書に記載された全ての文献、特許出願、および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

符号の説明

- [0109] 10 培養容器
- 11 攪拌翼
 - 20 培地供給容器
 - 31 CO₂供給容器
 - 32 空気供給容器
 - 33 O₂供給容器
 - 34 フローメーター
 - 35 サンプリング口
 - 36 中空糸膜フィルタ
 - 37 ダイヤフラムポンプ
 - 38 空気供給容器
 - 51～60 流路
 - 100 細胞培養装置
 - 301 チャンバー
 - 302 ダイヤフラム
 - 303 チャンバー

3 0 4 a ハウジングの部分

3 0 4 b ハウジングの部分

A 角度

F 平面

F t 垂線の足

F 1 ～ F 3 フィルタ

L 1 細胞懸濁液

L 2 新鮮培地

M 1 ～ M 4 圧力計

P 1 ポンプ

P 2 ポンプ

P 3 真空ポンプ

P r 垂線

P t 任意の点

R 1 ～ R 5 レギュレータ

T 頂点

V 1、V 2 電磁弁

X 領域

Y 領域

Z 角度Aが90°の点

請求の範囲

- [請求項1] 細胞懸濁液を収容する培養容器と、
前記培養容器内から前記細胞懸濁液を抜き出すためのダイアフラムポンプとを備え、
前記ダイアフラムポンプのダイアフラムと、前記ダイアフラムの外縁部の前記ダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面Fとにより規定される空間の体積が 1 cm^3 以上 20 cm^3 以下であり、
前記ダイアフラムにおける各点について、前記ダイアフラムの頂点から前記平面Fに下ろした垂線の足と前記各点とを結ぶ直線が前記垂線となす角度を前記各点の角度Aとしたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても前記ダイアフラムの厚さHが 0.5 mm 以上 1.5 mm 以下の範囲内であり、
前記ダイアフラムの頂点における前記ダイアフラムの厚さを H_T としたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても前記ダイアフラムの厚さHが下記の式1を満たす、細胞培養装置。
- $$1 \leq H_T / H \leq 1.75 \quad (\text{式1})$$
- [請求項2] 前記ダイアフラムにおける角度Aが 75° から 88° までの領域における点のうち、最も厚さが厚い点における前記ダイアフラムの厚さを H_Y とし、角度Aが 90° の点における前記ダイアフラムの厚さを H_Z としたとき、 $H_Z < H_Y$ であり、かつ、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても前記ダイアフラムの厚さHが $H \leq H_Z$ である、請求項1に記載の細胞培養装置。
- [請求項3] 前記ダイアフラムにおける角度Aが 75° から 88° までの領域における点のうち、最も厚さが厚い点における前記ダイアフラムの厚さを H_Y としたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても前記ダイアフラムの厚さHが下記の式2を満たす、請求項1又は請求項2に記載の細胞培養装置。

$$1 < H_Y / H \leq 3 \quad (\text{式 } 2)$$

[請求項4] 前記ダイアフラムの材質がシリコーンゴムである、請求項1から請求項3のいずれか一項に記載の細胞培養装置。

[請求項5] 前記ダイアフラムの伸び率50%における引張応力 σ が下記の式3を満たす、請求項1から請求項4のいずれか一項に記載の細胞培養装置。

$$0.4 \text{ MPa} \leq \sigma \leq 1.5 \text{ MPa} \quad (\text{式 } 3)$$

[請求項6] 培養容器内に收容された細胞懸濁液中で細胞を培養することと、
前記培養容器内からダイアフラムポンプにより前記細胞懸濁液を抜き出すこととを含み、

前記ダイアフラムポンプのダイアフラムと、前記ダイアフラムの外縁部の前記ダイアフラムの頂点から遠い側の面を含む平面Fとにより規定される空間の体積が 1 cm^3 以上 20 cm^3 以下であり、

前記ダイアフラムにおける各点について、前記ダイアフラムの頂点から前記平面Fに下ろした垂線の足と前記各点とを結ぶ直線が前記垂線となす角度を前記各点の角度Aとしたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても前記ダイアフラムの厚さHが 0.5 mm 以上 1.5 mm 以下の範囲内であり、

前記ダイアフラムの頂点における前記ダイアフラムの厚さを H_T としたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても前記ダイアフラムの厚さHが下記の式1を満たす、細胞培養方法。

$$1 \leq H_T / H \leq 1.75 \quad (\text{式 } 1)$$

[請求項7] 前記ダイアフラムにおける角度Aが 75° から 88° までの領域における点のうち、最も厚さが厚い点における前記ダイアフラムの厚さを H_Y とし、角度Aが 90° の点における前記ダイアフラムの厚さを H_Z としたとき、 $H_Z < H_Y$ であり、かつ、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても前記ダイアフラムの厚さHが

$H \leq H_z$ である、請求項6に記載の細胞培養方法。

- [請求項8] 前記ダイアフラムにおける角度Aが 75° から 88° までの領域における点のうち、最も厚さが厚い点における前記ダイアフラムの厚さを H_y としたとき、角度Aが 0° から 75° までの領域におけるいずれの点においても前記ダイアフラムの厚さHが下記の式2を満たす、請求項6又は請求項7に記載の細胞培養方法。

$$1 < H_y / H \leq 3 \quad (\text{式2})$$

- [請求項9] 前記ダイアフラムの材質がシリコンゴムである、請求項6から請求項8のいずれか一項に記載の細胞培養方法。

- [請求項10] 前記ダイアフラムの伸び率50%における引張応力 σ が下記の式3を満たす、請求項6から請求項9のいずれか一項に記載の細胞培養方法。

$$0.4 \text{ MPa} \leq \sigma \leq 1.5 \text{ MPa} \quad (\text{式3})$$

- [請求項11] 前記ダイアフラムポンプの運転時において、前記ダイアフラムを駆動させる前記ダイアフラムポンプの内部の圧力Pが下記の式4を満たす、請求項6から請求項10のいずれか一項に記載の細胞培養方法。

$$\text{大気圧} - 0.1 \text{ MPa} \leq P \leq \text{大気圧} + 0.1 \text{ MPa} \quad (\text{式4})$$

- [請求項12] 前記細胞がCHO細胞である、請求項6から請求項11のいずれか一項に記載の細胞培養方法。

- [請求項13] 前記培養容器内から抜き出された前記細胞懸濁液を、前記細胞懸濁液中の細胞濃度よりも高い細胞濃度を有する第一の溶液と、前記細胞懸濁液中の細胞濃度よりも低い細胞濃度を有する第二の溶液と、に分離膜を用いてタンジェンシャルフローフィルトレーション方式により分離する分離処理を行うことと、

前記第一の溶液を前記培養容器内に戻すことと、

前記培養容器内に新たに培地を添加することと、

をさらに含む、請求項6から請求項12のいずれか一項に記載の細胞培養方法。

- [請求項14] 生産物を生産する細胞を請求項6～請求項13のうちいずれか一項に記載の細胞培養方法を用いて培養することと、
前記細胞懸濁液から生産物を回収することと、
を含む、生産物の製造方法。
- [請求項15] 前記生産物が抗体である、請求項14に記載の生産物の製造方法。