

明 細 書

発明の名称：細胞培養システム及び細胞培養方法

技術分野

[0001] 本開示は、細胞培養を通じて有用な物質を効率的に入手するための細胞培養システム及び細胞培養方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、医薬品業界を初めとする幅広い分野において、動物細胞が産生する抗体物質や機能性物質等の有用な物質を利用することが注目されている。有用物質の市場供給を実現するために、細胞培養における条件の好適化及び効率化、産生される有用物質の単離精製手法などにおいて様々な工夫や改良が行われている。

[0003] 細胞の培養方法は、概して、バッチ式及び連続式の二つに分類される。バッチ式培養方法では、所定量の液体培地及び細胞を培養タンクに投入し、ある程度の濃度まで細胞が増殖すると、栄養素の不足又は代謝物による被毒によって増殖は停止するので、その時点で培養を終了する。連続式培養方法では、所定量の液体培地及び細胞を培養タンクに投入して細胞を増殖させると共に、液体培地の一部を抜き出して新たな液体培地と交換して投入し、補充した栄養素を利用して細胞培養を継続する。連続式の培養方法の利点として、培養を長期間継続でき、高濃度の培養細胞が得られるので、生産性の向上及び設備費が見込まれる。但し、抜き出した液体培地には細胞が含まれるので、抜き出した液体培地から細胞を分離して培養タンクに戻す必要がある。液体培地に含まれる細胞を分離又は濃縮する手段として、膜分離や遠心分離が利用される。しかし、膜分離は、目詰まりが生じ易く、細胞を損傷し易い。又、遠心分離は、分離に時間が必要であり、実験レベルの少量の分離は良好であっても、実用への適用性は決して高くない。

[0004] 特表2017-502666号公報（下記特許文献1）は、細胞培養のための装置に関し、バイオリアクターの出口に流通する音響定在波細胞分離器

が記載される。音響定在波による分離においては、異なる方向から高い周波数の波動を作用させて定在波を生成させると、定在波の節に粒子が集中する。この現象を利用して、定在波の節に細胞を集中させて液体培地から細胞が分離される。

- [0005] 一方、流体に含まれる粒子の分離に関する文献として、特表 2016-526479 号公報（下記特許文献 2）があり、湾曲チャネルを有する流体力学的分離デバイスが記載される。このデバイスでは、粒子を含む流体を湾曲チャネルに供給して、湾曲チャネルを流れる流体に作用する力を利用して粒子を分離することができる。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献 1：特表 2017-502666 号公報
特許文献 2：特表 2016-526479 号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 前述のように、細胞の連続培養を実用化するには、培養中の液体培地から細胞を分離する分離方法が重要である。この点に関し、上記特許文献 1 に記載される装置においては、高い周波数の波動が作用することによる細胞への物理的影響が大きい。このため、分離後の細胞における生存率の低下が懸念され、分離した細胞を用いて培養を繰り返しても、生存率の低下による培養効率の低下を生じる可能性がある。
- [0008] 特許文献 2 に記載される分離技術は、固体粒子の分離に関するものであるので、単に、培養終了後の細胞を分取する際に利用することは予想し得る。しかし、細胞培養に適用する場合には、細胞への影響を検討する必要がある、特に、培養途中の細胞を液体培地から分離する場合、分離技術に求められる要件はより厳しくなる。
- [0009] このように、培養終了後の培地から細胞を分離する場合の要件と、培養途

中の細胞を液体培地から分離する場合の要件とは異なるので、分離技術を細胞培養に適用するには、効率的な細胞培養が可能であるかについて十分に検討を重ねる必要がある。

- [0010] 本開示は、効率的に細胞を培地から分離すると共に、分離後の細胞が増殖能力を好適に維持して連続培養を実施可能な細胞培養システム及び細胞培養方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0011] 上記課題を解決するために、培地から細胞を分離する際に細胞に及ぶ影響について検討し、流体力分離技術を利用して、培地から効率的に細胞を濃縮分離して培養を継続することが可能であることを見出した。

- [0012] 本開示の一態様によれば、細胞培養システムは、細胞を培養する液体培地を収容する培養槽と、細胞分離装置とを有する細胞培養システムであって、前記細胞分離装置は、矩形断面を有する湾曲流路を有し、前記湾曲流路を流れることによって生じる渦流れを利用して液体培地に含まれる細胞から相対的に大きい細胞を分離する流体力分離装置と、前記流体力分離装置を流通する間の前記液体培地における圧力変動による細胞生存率の低下が抑制されるように制御された圧力環境で前記液体培地を前記流体力分離装置に流通させる送液部とを有することを要旨とする。

本開示の他の態様によれば、細胞培養システムは、細胞を培養する液体培地を収容する培養槽と、細胞分離装置とを有する細胞培養システムであって、前記細胞分離装置は、矩形断面を有する湾曲流路を有し、前記湾曲流路を流れることによって生じる渦流れを利用して液体培地に含まれる細胞から相対的に大きい細胞を分離する流体力分離装置と、前記流体力分離装置を流通する間の前記液体培地における細胞生存率の低下が抑制されるように前記液体培地を前記流体力分離装置に流通させる送液部とを有することを要旨とする。

- [0013] 前記流体力分離装置は、前記液体培地を取り入れる単一の導入口と、分離した液体培地を排出する少なくとも2つの導出口とを有し、前記導出口の1

つから相対的に大きい細胞が濃縮して含まれる液体培地が排出され、もう1つの導出口から相対的に小さい細胞が含まれる残部の液体培地が排出されるように構成するとよい。前記送液部は、前記流体力分離装置へ液体培地を供給するための流動圧を液体培地に付勢する付勢装置を有する。前記送液部は、前記流体力分離装置へ導入される液体培地と、前記流体力分離装置から導出される液体培地との圧力差が所定値以下になるように圧力環境を制御する圧力制御機構を有する。圧力制御によって、細胞の生存率が高く維持される。

[0014] 前記圧力制御機構は、前記流体力分離装置へ供給される液体培地の圧力を監視する圧力監視部と、前記圧力監視部によって監視される圧力に基づいて、前記流体力分離装置へ供給される液体培地の圧力を調整する圧力調整部材とを有するとよい。前記送液部は、更に、前記流体力分離装置へ供給される液体培地の流量を制御する流量制御機構を有するとよい。前記流量制御機構は、前記流体力分離装置へ供給される液体培地の流量を監視する流量計と、前記流量計によって監視される流量に基づいて、前記流体力分離装置へ供給される液体培地の流量を調整する流量調整部材とを有し、分離する細胞の大きさに対応して、前記流体力分離装置へ供給される液体培地の流量が好適に調整される。

[0015] 細胞培養システムは、更に、前記細胞分離装置の前記流体力分離装置によって分離される相対的に大きい細胞を含む液体培地を前記培養槽に還流して、前記培養槽と前記細胞分離装置との間で液体培地を循環させる循環システムを有する。更に、残部の液体培地の量に対応する新たな液体培地を前記培養槽に補充する培地補充部を有する。これにより、細胞培養が継続的に行うことができる。前記培地補充部は、前記培養槽へ補充される新たな液体培地の量を監視する監視装置と、前記監視装置によって監視される量に基づいて、前記培養槽へ補充される新たな液体培地の流量を調整する流量調整部材とを有し、流量計、液面計又は重量計などを用いて上記監視を行うことができる。

[0016] 前記細胞分離装置は、更に、前記流体力分離装置のもう一つの導出口から排出される残部の液体培地を収容する一時収容器と、追加の流体力分離装置と、追加の送液部とを有するように構成してもよい。追加の送液部は、前記追加の流体力分離装置を流通する間の前記液体培地における圧力変動による細胞生存率の低下が抑制されるように制御された圧力環境で、前記一時収容器に収容される液体培地を前記追加の流体力分離装置に流通させることができる。また、前記追加の送液部は、前記追加の流体力分離装置へ液体培地を供給するための流動圧を液体培地に付勢する付勢装置を有するとよく、前記付勢装置は、前記一時収容器と前記追加の流体力分離装置とを接続する接続路において液体培地に付勢するポンプ、又は、前記一時収容器内を加圧して、収容される液体培地に流動圧を供給する加圧装置を有するように構成できる。

[0017] また、前記細胞分離装置は、更に、前記流体力分離装置のもう一つの導出口から排出される残部の液体培地を収容する一時収容器と、前記一時収容器に収容される残部の液体培地を前記流体力分離装置へ再度供給するための戻し路と、前記培養槽から前記流体力分離装置への液体培地の供給と、前記戻し路から前記流体力分離装置への残部の液体培地の供給とを切り替える切り替え機構とを有してもよい。切り替え機構の切り替えによって、前記培養槽の液体培地及び前記一時収容器の残部の液体培地が交互に前記流体力分離装置に供給されるように構成できる。前記送液部は、前記培養槽と前記流体力分離装置とを接続する供給路、及び、前記流体力分離装置へ液体培地を供給するための流動圧を液体培地に付勢する付勢装置を有し、前記戻し路は、前記供給路に合流するように接続されてもよい。前記付勢装置は、前記供給路において液体培地に付勢するポンプ、又は、前記供給路において一時的に液体培地を収容し、収容される液体培地を加圧して流動圧を付与する加圧容器を有するとよい。

[0018] 或いは、前記送液部は、前記培養槽と前記流体力分離装置とを接続する供給路、及び、前記供給路において一時的に液体培地を収容し、収容される

液体培地を加圧して前記流体力分離装置へ液体培地を供給するための流動圧を付与する加圧容器を有するように構成可能である。その場合、前記細胞分離装置は、更に、前記流体力分離装置のもう一つの導出口から排出される残部の液体培地を収容する一時収容器と、前記供給路における前記加圧容器の下流側と前記一時収容器とを接続し、前記一時収容器に収容される残部の液体培地を前記流体力分離装置へ再度供給する戻し路と、切り替え機構とを有するとよい。切り替え機構は、前記培養槽から前記流体力分離装置への液体培地の供給と、前記戻し路から前記流体力分離装置への残部の液体培地の供給とを切り替え、前記切り替え機構の切り替えによって、前記培養槽の液体培地及び前記一時収容器の残部の液体培地が交互に前記流体力分離装置に供給することが可能である。

[0019] 前記切り替え機構は、前記供給路における前記加圧容器の上流側及び下流側、並びに、前記戻し路の各々に設けられる開閉弁又は逆止弁を有するとよい。前記細胞分離装置は、更に、前記流体力分離装置の前記導出口の1つから、相対的に大きい細胞が濃縮して含まれる液体培地を前記培養槽へ送る還流路を有するとよい。前記供給路の入口を前記還流路の出口と兼用可能なように、前記還流路の出口側末端は、前記供給路の入口近くに接続されるように構成可能である。

[0020] 又、本開示の一態様によれば、細胞培養方法は、液体培地で細胞を培養する細胞培養と、前記液体培地から相対的に大きい細胞を含む液体培地を分離する細胞分離とを有する細胞培養方法であって、前記細胞分離は、矩形断面を有する湾曲流路を流れることによって生じる渦流れを利用して、細胞を含む液体培地から相対的に大きい細胞が濃縮して含まれる培地を分離する分離処理と、前記湾曲流路を流通する間の液体培地における圧力変動による細胞生存率の低下が抑制されるように、前記分離処理を流通する前記液体培地の圧力環境を制御する圧力制御を有することを要旨とする。

[0021] 上記細胞培養方法は、更に、前記分離処理によって分離される相対的に大きい細胞を含む液体培地を前記細胞培養に還流して、前記細胞培養と前記分

離処理との間で液体培地を循環させる循環処理を有する。更に、前記分離処理において分離された相対的に小さい細胞を含む残部の液体培地の量に対応する新たな液体培地を前記細胞培養に補充する培地補充を有することによって、継続的な細胞培養が可能である。

発明の効果

[0022] 本開示によれば、培養細胞を含む液体培地から効率的に細胞を分離すると共に、分離後の細胞の増殖能力を好適に維持することができる。故に、効率的に連続培養を実施可能な細胞培養システム及び細胞培養方法を提供され、細胞が産生する有用物質を効率的に得ることが可能である。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]細胞培養システムの一実施形態を示す概略構成図。

[図2]細胞培養システムの他の実施形態を示す概略構成図。

[図3]流体力分離装置による細胞分離におけるDe数と分離効率との関係を示すグラフ。

[図4]細胞分離において使用するポンプと細胞の生存率の関係を示すグラフ。

[図5]細胞分離を伴う培養とバッチ培養とを比較するためのグラフであり、(a)は培養時間(時間)と生細胞密度($\times 10^6$ cells/mL)との関係、(b)は培養時間(時間)と平均細胞径(μm)との関係を示す。

[図6]図5に示す培養における培養時間(時間)と細胞の生存率(%)との関係を示すグラフ。

[図7]細胞培養システムの他の実施形態を示す概略構成図。

[図8]細胞培養システムの他の実施形態を示す概略構成図。

[図9]細胞培養システムの他の実施形態を示す概略構成図。

[図10]細胞培養システムの他の実施形態を示す概略構成図。

[図11]細胞培養システムの他の実施形態を示す概略構成図。

[図12]細胞培養システムの他の実施形態を示す概略構成図。

[図13]細胞培養システムの他の実施形態を示す概略構成図。

発明を実施するための形態

- [0024] 本開示の実施形態について、図面を参照して、以下に詳細に説明する。尚、実施形態において示す寸法、材料、その他の具体的な数値等は、内容の理解を容易とするための記載であって、特に断る場合を除き、本開示を限定するものではない。又、本願明細書及び図面において、実質的に同一の機能及び構成を有する要素については、同一の符号を付することにより重複説明を省略し、本開示に直接関係のない要素は、図示を省略する。
- [0025] 液体中に含まれる粒子を分離する分離技術の一つに、流体に発生するディーン渦の作用を利用するものがある（前記特許文献2参照。以下、この技術を流体力分離と称する）。これは、流れ方向に垂直な断面が矩形である一側に湾曲した湾曲流路を流れる液体にディーン渦が発生することによって、液体中の粒子の分布に偏りが生じることを利用した分離技術である。湾曲流路を流れる粒子は、その大きさによって流路における分布が異なる変化をする（前記特許文献2参照）。具体的には、流路の断面において輪を描くような粒子分布が形成されて、粒子は螺旋状に流路を流れ、この際、相対的に大きい粒子が輪の外側に、相対的に小さい粒子が内側に位置する。更に、所定の分離条件に設定することにより、粒子の分布形態は更に変化し、一定の大きさを超える粒子が流路の外周側へ収束する。
- [0026] 本開示においては、液体培地に含まれる培養細胞の分離に上述の流体力分離を適用し、所定の大きさ以上の細胞が湾曲流路の外周側へ収束する分離形態を利用する。本開示の培養システムにおいては、比較的高い流速で液体培地を湾曲流路に供給する。供給される液体培地が湾曲流路を流れる間に、相対的に小さい細胞は、前述したように、流路の断面において輪を描くように分布するが、相対的に大きい細胞は、湾曲流路の外側（外周側）に遍在するように収束する。従って、大きい細胞が集中する画分と残部の画分とに分離することによって、相対的に大きい細胞が濃縮した液体培地を分取することができる。大きい細胞が濃縮した画分は、相対的に小さい細胞を少量含むが、分離前に比べて小さい細胞の濃度は大幅に減少する。残部の画分には、小さい細胞の大部分が含まれ、更に、細胞培養によって生じる代謝物、老廃物

の微小凝縮物、死細胞片（デブリ）等の多くも含まれる。このようにして、液体培地を流通させる条件によって分離状態を調整して、相対的に大きな粒子と小さい粒子とを分別することが可能である。供給する液体培地の流速（流量）、及び、湾曲流路における断面の大きさの設定によって、濃縮する細胞の大きさを調整することができる。

[0027] 細胞は、活性が高い状態においては大きく生育するが、活性が低下すると、比較的小さい状態で死滅し分解する。相対的に小さい細胞の多くは、死細胞又は死細胞片であり、DNA合成途中の活性な細胞が含まれる割合は少ない。故に、相対的に大きい細胞が濃縮した画分を液体培地から分取することによって、代謝物などの不要物が除去されてその量が低下する。分取した相対的に大きい細胞の画分を培養槽に還流させると共に、取り除いた残部の画分に相当する量の新たな液体培地を培養槽に加えることによって、栄養素が補給されるので、細胞培養の継続が可能である。従って、上記のような細胞分離と、分離細胞の還流とを繰り返して、細胞培養が連続的に進行する。

[0028] 流体力分離は、細胞の分離において非常に有効であるが、効率的な細胞培養を継続するために、分離中の細胞へのダメージを抑制可能な分離条件が整えられる。この分離条件として、分離中に細胞に加わる圧力の変動（圧力低下）が一定レベルを超えないように、湾曲流路へ液体培地を供給する圧力環境が制御される。細胞は、比較的高圧下でも耐性を有し、例えば、1 MPa程度の加圧供給においても細胞の生存率は維持される。しかし、圧力変動が大きいと、0.6 MPa程度の供給圧力（入口圧力）でも、細胞のダメージが大きく、生存率が低下する。従って、分離中に細胞に加わる圧力の変動（入口圧力と出口圧力との差）が所定値以下となるように液体培地の供給が制御される。具体的には、圧力変動（圧力差）が0.6 MPa未満になるように制御され、好ましくは0.45 MPa以下、より好ましくは0.4 MPa以下となるように設定するとよい。上記のように圧力変動が抑制された分離条件においては、細胞の生存率は98%程度以上に維持することができるので、濃縮分離された大きい細胞を培養槽に還流させて、増殖効率を維持

することができる。

[0029] 以下に、細胞培養システムの構成について、図1に示す一実施形態を参照して説明する。図1の細胞培養システム1は、細胞を培養する液体培地を收容する培養槽2と、細胞分離装置3とを有する。細胞分離装置3は、流体力分離装置4と送液部5とを有し、培養槽2の液体培地Cは、送液部5を通じて流体力分離装置4へ供給される。流体力分離装置4は、流れ方向に垂直な一定の矩形断面を有する湾曲流路を内部に有し、湾曲流路の一端において液体培地Cを取り入れる単一の導入口41と、湾曲流路の他端において液体培地を分離して排出する少なくとも2つの導出口42、43とを有する。流体力分離装置4は、湾曲流路を流れることによって一方向に旋回する液体に生じる渦流れを利用して、液体培地Cに含まれる細胞から相対的に大きい細胞を流路の外側（外周側）に遍在させる。従って、湾曲流路から排出される液体培地を、外側の画分と内側の画分とに分割することによって、外側の画分として、相対的に大きい細胞が濃縮された液体培地を分離することができる。1つの導出口42から相対的に大きい細胞が濃縮して含まれる液体培地が排出され、もう1つの導出口43から相対的に小さい細胞が含まれる残部の液体培地が排出される。湾曲流路の湾曲形状は、略円周状、略円弧（部分円周）状、螺旋状等が挙げられ、これらの形状の何れであってもよい。流体力分離装置4は、1つの湾曲流路を有する流路ユニットを構成単位として設計することができる。具体的には、流路ユニットとして、内部に1つの湾曲流路が形成された平層状の成形体をプラスチック等で形成し、その際に、湾曲流路の両末端が成形体の端面に開口して1つの導入口と少なくとも2つの導出口を有するように構成する。このような成形体を流路ユニットとして用いて、1つの流路ユニット、又は、複数の流路ユニットの組み合わせによって流体力分離装置を構成することができる。複数の流路ユニットを積層して並列状の流路を構成することによって、液体培地の処理流量を高めることができる。

[0030] 送液部5は、培養槽2と流体力分離装置4とを接続する配管で構成される

供給路 6 を有し、培養槽 2 の細胞を含む液体培地 C は、供給路 6 を通じて流体力分離装置 4 へ送られる。図 1 の細胞培養システム 1 は、還流路 7 を構成する配管を有し、還流路 7 は、培養槽 2 と細胞分離装置 3 との間で液体培地を循環可能なように、細胞分離装置 3 の流体力分離装置 4 と培養槽 2 とを接続する。つまり、細胞培養システム 1 は、供給路 6 及び還流路 7 によって構成される循環システムを有する。

[0031] 細胞分離装置 3 の流体力分離装置 4 によって分離される相対的に大きい細胞を含む液体培地の画分は、還流路 7 を通じて培養槽 2 に還流されて、更に細胞培養が継続される。相対的に小さい細胞を含む残部の液体培地 C' の画分（内周側の画分）は、流体力分離装置 4 から回収路 8 を通じて排出される。更に、流体力分離装置 4 から排出される残部の液体培地 C' の量に対応する新たな液体培地 C 0 を培養槽 2 に補充するために、培地補充部 9 が備えられており、培養槽 2 内の液体培地 C は、新たな液体培地 C 0 の補充によって、一定量に維持される。

[0032] 流体力分離装置 4 における細胞の分離効率は、湾曲流路に供給される液体における D e 数及び圧力によって変化し、好適な分離が可能な D e 数及び圧力の適正な範囲が存在する。ディーン数は、式： $De = Re (D / 2 Rc)^{1/2}$ 、によって表される（Re：レイノルズ数(-)、D：代表長さ(m)、Rc：流路の旋回半径(m)）。De 数は、液体の流速に比例するので、流体力分離装置に供給される液体の流速及び圧力を適正に制御することによって、好適な細胞分離が実施される。概して、De 数が 30 以上且つ 100 以下であることが好ましく、50～80 程度であると更に好ましい。従って、このような範囲の De 数になるように液体培地の流速（流量）が設定される。

[0033] 細胞培養システム 1 の送液部 5 は、流体力分離装置 4 へ液体培地 C を供給するための流動圧を液体培地 C に付勢する付勢装置、具体的には、ポンプ 10 を有する。ポンプ 10 が付与する流動圧によって、液体培地 C が流体力分離装置 4 へ供給される流量及び流圧は変化する。分離された相対的に大きい細胞を培養槽 2 に還流して細胞培養を継続する上で、細胞の生存率は重要な

要素である。この点に関して、流体力分離装置4における分離の間に細胞の生存率は、圧力変動の大きさによって変化することが判明した。つまり、生存率の低下を防止するには、細胞分離における圧力変動を少なくすることが有効である。従って、この点に基づいて、送液部5が液体培地Cを流体力分離装置4に流通させる圧力環境は、流体力分離装置4を流通する間の液体培地における圧力変動による細胞生存率の低下が抑制されるように制御される。

[0034] つまり、送液部5は、圧力制御機構を有し、これにより、流体力分離装置4へ導入される液体培地と、流体力分離装置4から導出される液体培地との圧力差が所定値以下になるように圧力環境を制御する。圧力制御機構は、流体力分離装置4へ供給される液体培地の圧力を監視する圧力監視部と、圧力監視部によって監視される圧力に基づいて、流体力分離装置4へ供給される液体培地の圧力を調整する圧力調整部材とによって構成することができる。具体的には、図1の細胞培養システム1においては、圧力監視部として圧力計11が、圧力調整部材として圧力調整弁12が供給路6上に設けられる。この細胞培養システム1においては、流体力分離装置4の導出口42, 43における導出側圧力は、大気圧に開放されるので、導入される液体培地と導出される液体培地との圧力差は、圧力計11によって測定される圧力（ゲージ圧）に等しい。従って、この測定値に基づいて圧力制御を行える。分離中の細胞における生存率の低下を防止するために、圧力差が0.60MPa未満になるように圧力環境は制御され、好ましくは、0.45MPa以下、より好ましくは0.40MPa以下になるように制御される。

[0035] 前述したように、流体力分離装置4における分離効率は、湾曲流路を流通する液体培地の流速に依存する。従って、送液部5は、更に、流体力分離装置4へ供給される液体培地の流量を制御する流量制御機構を有し、流体力分離装置4の湾曲流路を流通する液体培地が適正な流速になるように、供給路6を流通する液体培地の流量が制御される。流量制御機構は、流量計13と、流量調整弁14とによって構成される。流量計13は、流体力分離装置4

へ供給される液体培地Cの流量を監視し、流量調整弁14は、流量計13によって監視される流量に基づいて、流体力分離装置4へ供給される液体培地Cの流量を調整する流量調整部材として機能する。分離する細胞の大きさに対応して、流体力分離装置4へ供給される液体培地の流量が調整される。

[0036] 細胞培養システム1において、流体力分離装置4へ供給する液体培地の流量を、ポンプ10の駆動制御によって適正に調整可能である場合、流量調整弁14を省略することが可能である。又、流体力分離装置4へ供給する液体培地の供給圧を、ポンプ10の駆動制御によって適正に調整可能である場合、圧力調整弁12を省略可能である。従って、流体力分離装置4における処理能力（流路断面の大きさ及び流路数）に基づいて、供給路6及び還流路7の寸法を適正に設計することによって、細胞培養システムの構成を簡略化することができる。

[0037] 細胞は、流体力分離装置4における圧力変動が上記のような範囲であれば、ある程度高い静圧にも耐性を有する。つまり、流体力分離装置4から排出される液体培地における圧力が高ければ、流体力分離装置4へ導入される液体培地に適用可能な圧力範囲の上限は高くなる。従って、流体力分離装置4へ導入される液体培地に加わる圧力が0.6MPa以上になる条件設定に対しても、液体培地の導入時と排出時の圧力差を減少させて対応することが可能である。つまり、還流路7及び回収路8に圧力調整弁を設けて、流体力分離装置4の導出口42、43から排出される液体培地における出口圧力を増加させて、圧力差を減少させればよい。この場合、還流路7及び回収路8に圧力計を設置して、適切な圧力差になるように排出圧力を監視すると好適である。この際、還流路7を流れる液体培地についても急激な圧力変動が生じないように圧力環境を確認することが望ましい。

[0038] 細胞培養システム1の培地補充部9は、新たな液体培地C0を収容する培地タンク15、及び、培地タンク15と培養槽2とを接続する補給路16を有し、培地タンク15の新たな液体培地C0を培養槽2に補充して、培養槽2内の液体培地を一定量に維持する。つまり、分割された残部の液体培地C

’（内周側の画分）の量に対応する量の新たな液体培地C 0が、培地タンク15から補給路16を通じて補充される。このために、培地補充部9は、培養槽2へ補充される新たな液体培地C 0の量を監視する監視装置と、監視装置によって監視される量に基づいて、培養槽2へ補充される新たな液体培地の流量を調整する流量調整部材とを有する。図1の細胞培養システム1においては、監視装置として、培養槽2に設置される液面計17が設置され、流量調整部材として、流量調整弁18が補給路16に設置される。液面計17が検出する液面レベルに応じて、流量調整弁18が制御され、培養槽2の液体培地の液面が一定に維持されるように、培地タンク15に付設されるローラポンプ19によって供給される液体培地C 0の量が調整される。流体力分離装置4から培養槽2へ還流される液体培地の量は、流体力分離装置4において分割される相対的に小さい細胞を含む残部の液体培地の画分だけ減少している。従って、培養槽2内の液面を維持することで、相対的に小さい細胞を含む残部の液体培地の画分に対応した補充がなされる。液面計の代わりに、培養槽2の重量を測定する重量計を用いても、このような補充を行うことができ、重量が一定に維持されるように新たな液体培地を補充すればよい。或いは、培養槽2に還流される相対的に大きい細胞を含む液体培地の量、又は、相対的に小さい細胞を含む残部の液体培地の量を測定する測定装置（流量計）を用いてこのような補充を行ってもよい。具体的には、還流路7又は回収路8に流量計を設置して、その測定値に基づいて、新たな液体培地を供給することができる。

[0039] 回収路8には、回収タンク20が接続され、相対的に小さい細胞やデブリ等を含んだ液体培地が収容される。この液体培地は、フィルター21によってデブリや凝集物が除去され、この後、精製処理によって液体培地から有用な成分を回収可能である。フィルター21は、除去対象に応じて、適切な孔径のものを選択すればよく、例えば、精密濾過膜、限外濾過膜等が挙げられる。

[0040] 培養槽2、培地タンク15及び回収タンク20は、微生物汚染を防止可能

な容器であり、各々、ヒーター又は冷却器、及び、温度調節機能が装備されたものが使用され、内部の液体培地は、細胞培養又は保管に適した温度に維持される。培養槽 2 は、細胞を損傷しない適切な速度で攪拌可能な攪拌装置を備え、液体培地を均一化する。又、必要に応じて、培養する細胞に適した培養環境に調整可能なように、酸素／二酸化炭素／空気の量、pH、導電率、光量等の調整機能を備えたものを適宜利用すればよい。

[0041] 上述のように、細胞培養システムにおいては、細胞の生存率を好適に維持するために、流体力分離装置 4 へ供給される液体培地の圧力環境が制御される。細胞の生存率は、細胞を含んだ液体培地に流動圧を供給するポンプ 10 による影響も受けるので、細胞の生存率を維持する上で好適な送液手段をポンプ 10 として選択することが好ましい。細胞の生存率への影響を抑制するには、細胞に剪断力を加えない方式のポンプであることが好ましく、具体的には、往復動又は回転動による容積変化を利用して一定容積の液を押し出す容積式ポンプを使用すると好適である。容積式ポンプとしては、例えば、ピストンポンプ、プランジャポンプ、ダイヤフラムポンプ、ウィングポンプ等の往復ポンプ、歯車ポンプ、ベーンポンプ、ねじポンプ等の回転ポンプが挙げられる。一実施形態として、コンプレッサを付設した加圧タンクを利用するものが挙げられ、加圧タンクに収容した液体培地にコンプレッサで加圧することによって、加圧タンクから流体力分離装置へ液体培地を圧送することができる。

[0042] 上述のような細胞培養システム 1 において実施可能な細胞培養方法について、以下に記載する。細胞培養方法は、液体培地で細胞を培養する細胞培養工程と、液体培地から相対的に大きい細胞を含む液体培地を分離する細胞分離工程とを有する。細胞培養工程は、上記培養槽 2 において行われ、細胞分離工程は、上記細胞分離装置 3 において実施される。細胞分離工程は、上記流体力分離装置 4 において実施される分離処理と、分離処理を流通する前記液体培地の圧力環境を制御する圧力制御とを含む。前記分離処理においては、矩形断面を有する湾曲流路を流れることによって生じる渦流れを利用して

、細胞を含む液体培地から相対的に大きい細胞が濃縮して含まれる培地を分離する。圧力制御は、湾曲流路を流通する間の液体培地における圧力変動による細胞生存率の低下が抑制されるように実施される。

[0043] 分離処理において、細胞を含む液体培地は、矩形断面を有する湾曲流路へ単一の導入口から導入され、均一な状態で湾曲流路に供給される。流体力分離装置の湾曲流路は、流れ方向に垂直な断面（径方向断面）が矩形の流路である。均一な液体培地が湾曲流路を流れる間に、相対的に小さい細胞及び微細粒子は、ディーン渦に載って、矩形断面において輪を描くように分布が変化する一方、相対的に大きい細胞は、流路の外周側に滞留する揚力が比較的強く作用するため、分布が外周側に集中する。湾曲流路の末端出口は、外周側に位置する導出口42と内周側の導出口43に二分割される。外周側の導出口42から相対的に大きい細胞が濃縮して含まれる液体培地が排出され、内周側の導出口43から相対的に小さい細胞及び微細粒子が含まれる残部の液体培地が排出される。

[0044] 前述の式で示したように、 De 数は、湾曲流路の巡回半径 R_c 及び流路の断面寸法によって変化する（前述の式における代表長さ D は、湾曲流路の幅と見なすことができる）。従って、湾曲流路の設計に基づいて De 数が好適な値になるように調整することができ、それによって、流体力分離装置は、細胞の濃縮分離を良好な分離効率で実施することができる。又、流体の流量は、湾曲流路の断面の幅（径方向）及び高さの何れかの設定によって調節可能であるので、湾曲流路の設計に基づいて、適正な圧力及び所望の流量で細胞の分離処理を実施可能なように流体力分離装置を構成することができる。従って、湾曲流路の設計は、分離対象の条件（細胞の寸法分布、培地の粘度等）に応じて、好適な分離が可能のように適宜変更可能である。細胞の分離効率の観点から、湾曲流路が、アスペクト比（幅／高さ）が10以上の長方形の断面を有する流路であると好適である。このような湾曲流路に、液体培地を100～500 mL／分程度の流量で供給することによって、分離が良好に進行し、50億～250億細胞／分程度の効率で細胞の分離処理を行うこ

とができる。相対的に大きい細胞として、粒径が $70\mu\text{m}$ 程度以上の細胞を、外周側の画分として濃縮分取することができ、輪状に分布する $20\mu\text{m}$ 程度以下の相対的に小さい細胞の大部分は、内周側の画分として分取できる。湾曲流路の末端出口の設計（導出口の分割位置）によって、外周側の画分に含まれる細胞の大きさ及び分離精度を調整することができ、外周側の画分に含まれる細胞の大きさの下限を $70\mu\text{m}$ より小さくすることも可能である。大きい細胞は、小さい細胞に比べて生存率及び活性が高く、外周側の画分を分取することによって、死細胞や細胞片を減量することができる。従って、分離処理によって分離される相対的に大きい細胞を含む液体培地を培養槽における細胞培養に還流して、細胞培養と分離処理との間で液体培地を循環させる循環処理を行うと、細胞の培養効率を高めることができる。この際、分離処理において分離された相対的に小さい細胞を含む残部の液体培地（内周側の画分）の分だけ、還流する液体培地の量が減少するので、この量に対応する新たな液体培地を培養槽に添加して、細胞培養における液体培地を補充する培地補充を行う。これにより、細胞が使用する栄養素が継続的に補充され、代謝物の濃度が希釈されるので、連続的に培養を行うことができる。

[0045] 流体力分離装置における細胞の分離状態（分取する細胞の大きさ、分取比率）は、出口における導出口の分割位置によって異なる。概して、外周側画分／内周側画分の分割比率（容積比）が、 $90/10\sim 50/50$ 程度になるように流路出口における断面積比を設計すると、上述のような細胞の濃縮分離に好適である。図1の細胞培養システムにおいて、流体力分離装置は、湾曲流路の出口として、2つの導出口を有するが、3つ以上の導出口に分割してもよい。末端出口を3つ以上の導出口に分割した場合、培養槽に還流させる画分の量を状況に応じて変更可能なように構成してもよい。

[0046] 細胞培養システムは、図2に示す実施形態のように、流体力分離装置を複数使用するように応用することができる。図2の細胞培養システム1aは、2つの流体力分離装置4、4aを用いて2段階の分離処理を実施するように構成される。具体的には、液体培地Cの分離によって流体力分離装置4から

排出される残部の液体培地C'、つまり、内周側の画分に含まれる相対的に小さい細胞を更に分離するための2段目の流体力分離装置4aを有するように構成される。1段目の流体力分離装置4から回収路8'を通じて排出される残部の液体培地C'を収容する回収タンク20aは、供給路6aによって2段目の流体力分離装置4aと接続される。供給路6aには、ポンプ10a、圧力計11a、圧力調整弁12a、流量計13a及び流量調整弁14aが設置される。回収タンク20aの液体培地C'がポンプ10aによって流体力分離装置4aの導入口41aに供給され、液体培地C'は、更に2つの画分に分割される。液体培地C'に含まれる細胞のうち相対的に大きいものを含む画分（外周側）は、導出口42aから還流路7aを通じて培養槽2へ還流される。相対的に小さいものを含む残部の液体培地C''（内周側の画分）は、導出口43aから回収路8aを通じて回収タンク20bに供給される。回収タンク20bに収容される液体培地C''は、フィルター21を通して、精製処理へ供給される。

[0047] 図2の細胞培養システム1aでは、2段階の細胞分離を行うことによって、液体培地に含まれる成分が3つに分割される。2段目の流体力分離装置4aにおける分離条件は、供給路6aを通じて供給される液体培地C'の流量及び供給圧の制御によって調整可能である。2つの流体力分離装置4, 4aにおける分離条件を適切に設定することによって、細胞の分離精度及び濃縮度の改善が可能である。一例として、容量が200Lの培養槽2を用いて構成した図2の細胞培養システム1aにおいて、例えば、以下のような培養方法を実施することができる。

[0048] 定格の処理流量が300mL/分である流路ユニットを6基用いて流体力分離装置4を構成し、同じ流路ユニットを2基用いて流体力分離装置4aを構成した場合、1段目の流体力分離装置4においては1800mL/分の流量で分離処理を進行可能である。この分離によって相対的に大きい細胞を含む液体培地を1200mL/分の流量で培養槽2に還流し、残部の液体培地C'を、回収タンク20aから2段目の流体力分離装置4aに供給すると、

2 段目の流体力分離装置 4 a において 6 0 0 m L / 分の流量で分離処理が適正に進行可能である。2 段目の流体力分離装置 4 a から 4 0 0 m L / 分の流量で外周側の液体培地を培養槽 2 に還流すると、2 0 0 m L / 分の流量で液体培地 C” が回収タンク 2 0 b から精製工程へ供給される。培養槽 2 においては、液体培地の量を維持するために、2 0 0 m L / 分の流量で新たな液体培地が補充され、一日の培地交換量は、2 8 8 L（培地交換率：約 1. 4 倍）となる。このように、濃縮された相対的に大きい細胞を継続的に細胞培養に導入すると共に、新たな液体培地の添加により栄養素が補充され、培養を継続的に進行させることができる。培養槽 2 の液体培地から死細胞等が徐々に取り除かれ、相対的に大きい培養細胞が増加する。

[0049] 細胞培養システム 1, 1 a のシステム設計においては、流体力分離装置における適正な処理流量（定格流量）が基本となるので、培養槽 2 の容量と流体力分離装置の処理流量とのバランスが適正になるように細胞培養システムを構成するとよい。培養槽 2 の液体培地容量が、流体力分離装置における処理を連続して行くと適正な培地交換率を超えるような比較的少ない量である場合には、培地交換率が適正な値になるように流体力分離装置における処理量を設定する。そして、定格流量に基づいて処理時間を計算し、分離処理を複数回に分けて一定時間おきに断続的に実施するとよい。

[0050] 上述のような細胞培養システムを用いて、様々な細胞について細胞培養方法を実施することができ、培養細胞が産生するタンパク質や酵素等の各種有用物質を回収して医薬品等の製造に利用できる。具体的には、動物細胞（ほ乳類、鳥類又は昆虫の細胞）のような真核細胞、及び、真菌細胞（大腸菌等の菌類又は酵母の細胞）の培養に適用可能であり、例えば、チャイニーズハムスターの卵巣細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、PER. C. 6 細胞、骨髓腫細胞、HER細胞などが挙げられる。このような細胞培養によって得られる有用物質として、例えば、免疫グロブリン（単クローン抗体又は抗体フラグメント）、融合タンパク質、インスリン類、成長ホルモン類、サイトカイン類、インターフェロン類、グルカゴン、アルブミン、リソソ

ーム酵素、ヒト血清アルブミン、HPVワクチン、血液凝固因子、エリスロポエチン類、NSOやSP2/O等の抗体などが挙げられる。細胞培養は、各細胞について判明している培養条件に基づいて、常法に従って培養を行えばよい。細胞培養に使用する液体培地についても、合成培地、半合成培地、天然培地の何れの液体培地であってもよく、培養する細胞に適したものを適宜選択して使用すればよい。概して、特定の菌種を増殖させるように処方された選択増菌培地や選択分離培地が好適に使用される。市販の液体培地から適宜選択して使用しても、或いは、既知の処方に従って栄養素及び精製水等を用いて調製してもよく、検査を目的とする鑑別剤（pH指示薬、酵素基質、糖類等）や、目的外微生物の発育を抑制する選択剤などを必要に応じて添加してよい。流体力分離を効率的に進行させるために、粘性があまり高くない液体培地を使用すると好ましい。

[0051] 培養細胞が産生する有用物質が液体培地に含まれる場合、流体力分離装置から回収される内周側の画分の精製によって、有用物質を回収することができる。産生する有用物質が培養細胞内にある場合も、流体力分離装置から回収される内周側の画分には、死細胞から放出された有用物質が含まれ得るので、同様に、回収画分から有用物質を回収可能である。しかし、細胞培養と並行して、培養槽2の液体培地を一定割合で抜き出して細胞を分取すると、細胞から有用物質を効率的に回収することができる。この際、細胞培養システム1、1aの流体力分離装置4を利用して、細胞を濃縮して回収することができる。このためには、流体力分離装置4の還流路7を分岐させて、導出口42から排出される相対的に大きい細胞を含む液体培地の供給先を培養槽2から切り替え可能であるように変更するとよい。この回収形態においては、相対的に大きい細胞を含む液体培地の抜き出しと、培養槽2への還流とを交互に行う方法、及び、培養槽2における細胞の増殖速度に応じた所定割合で抜き出しを連続的に行う方法の何れも可能である。

[0052] 図3は、流体力分離装置における分離効率とDe数との関係を調べた結果を示すグラフである。図3は、流路の寸法が異なる5種類の流体力分離装置

(装置A 1～A 5)の何れかと、ポリマー粒子(スチレンージビニルベンゼン共重合体)又はCHO細胞(チャイニーズハムスターの卵巣細胞)の何れかの分離対象を用いて、流体力分離装置による分離を行った結果である。何れの分離対象も平均粒子径が $1.4 \sim 1.8 \mu\text{m}$ の範囲にある。分離効率は、 $[1 - (x/X)] \times 100 (\%)$ として計算した値であり、計算式中のXは、分離前の液体に含まれる分離対象の濃度、xは、分離後の内周側の画分に含まれる分離対象の濃度を示す。何れの分離対象も粒径分布が狭いので、粒子又は細胞の全量が外周側の画分に濃縮される状態の分離効率を100%と見なした評価である。グラフから理解されるように、ポリマー粒子及び動物細胞の何れにおいても、De数が70前後において最も分離効率が高くなり、概して、De数が50～80の範囲になる条件において高い分離効率を達成することができる。

[0053] 図4は、流体力分離装置へ液体培地を送るポンプの種類による細胞の生存率への影響を調べた結果を示す。細胞を培養した液体培地を、ポンプを用いて0.3MPaの吐出圧で流体力分離装置へ供給し、分離装置から排出される液体培地の2つの画分を纏めて収集し、少量をサンプリングした。細胞計測装置(ベックマンコールター社製、製品名:Vi-Cell)によりサンプルの細胞の生存率(%、全細胞中の生細胞の割合)を計測した結果である。グラフ中の「ガス圧送」は、コンプレッサが接続された加圧タンクから液体培地を圧縮空気で圧送する形態であり、容積式ポンプとして分類することができる。図4から、遠心ポンプにおいては細胞における損傷が大きく、容積式ポンプに分類される他のポンプでは、生存率の低下が防止されることが判る。

[0054] 図2のように追加の流体力分離装置を用いて2段目の分離を行うことで、増殖が進んだ高密度の細胞培養液に対しても好適な分離を実施することができる。図1, 2の細胞培養システムに関する説明では、流路の流通を規制する弁制御について省略しているが、細胞培養システムにおいては、通常、流路に開閉弁が設けられ、操作の開始時及び終了時に開閉作業が行われる。以下に、流路の断続を切り替える開閉弁について、図7を参照して説明する。

尚、図 7 について、新たな培地を培養槽へ補給する培地補充部については、図 1, 2 と同様であるので、その図示及び説明は省略し、前述を参照するものとする。

[0055] 図 7 は、図 2 の細胞培養システム 1 a における開閉弁の設置を記載している。つまり、追加の流体力分離装置 4 a を用いて 2 段階の流体力分離を行うシステムである。培養槽 2 から 1 段目の流体力分離装置 4 へ液体培地を供給する供給路 6 には開閉弁 V 1 が設置され、流体力分離装置 4 の導出口 4 2 から外周側の画分を培養槽 2 へ還流させる還流路 7 には開閉弁 V 2 が設置される。流体力分離装置のもう一つの導出口 4 3 から排出される残部の液体培地（内周側の画分）は、回収タンク 20 a に一時収容され、供給路 6 a を通じて流体力分離装置 4 a に供給される。供給路 6 a は、一時収容器と流体力分離装置 4 a とを接続区する接続路であり、開閉弁 V 3 が設置される。供給路 6 a を流れる液体培地は、追加の送液部 5 a によって圧力及び流量が適切に制御される。そのように制御された圧力環境で、流体力分離装置 4 a を流通する間の液体培地における圧力変動による細胞生存率の低下は抑制される。流体力分離装置 4 によって分離された液体培地の外周側の画分は、還流路 7 a を通じて培養槽 2 に還流する。還流路 7 a には開閉弁 V 4 が設置される。また、新たな液体培地を補給する補給路 1 6 に開閉弁 V 5 が設置される。

[0056] 細胞培養の操作を開始するに当たって、開閉弁 V 1 ～ V 5 が開放され、操作停止後は、流路から液体培地が培養槽 2 又は回収タンク 20 a, 20 b へ排出されたのを確認して開閉弁 V 1 ～ V 5 が閉鎖される。

[0057] 前述したように、流動圧を与える付勢装置として使用するポンプの種類は、細胞の生存率に影響を与え、耐圧容器を用いたガス圧送を利用すると、好適に細胞培養を継続する上で有利である。ガス圧送によって流体力分離装置へ液体培地を供給する実施形態について、図 8 ～ 10 を参照して説明する。尚、図 8 ～ 10 についても、新たな培地を培養槽へ補給する培地補充部については、図 1, 2 と同様であるので、その図示及び詳細説明は省略し、前述を参照するものとする。

[0058] 図8の細胞培養システム1bは、図7の細胞培養システム1aにおいてポンプ10aの代わりにガス圧送を付勢手段として利用するように回収タンク20aを利用して設計変更した構成を有する。従って、ポンプ10aは使用しない。それ以外の構成は、図7の細胞培養システム1aと同じであるので、その説明は省略する。

[0059] 図8において、流体力分離装置4導出口43から回収路8'を通じて排出される残部の液体培地C'（内周側の画分）は、耐圧性の密閉された一時収容器50に收容される。液体培地C'を流体力分離装置4aへ供給する供給路6aは、その末端が一時収容器50に貯留される液体培地C'の液面より低くなるように一時収容器50に接続される。供給路6aには開閉弁V6が設置される。一時収容器50には、加圧空気を供給するガスライン51が接続され、供給される加圧空気によって、貯留される液体培地が加圧される。従って、開閉弁V6が開放されると、一時収容器50の液体培地C'は、供給路6aを流通して流体力分離装置4aに供給される。その際の流量及び圧力は、送液部5aによって適切に制御される。このようにして、ガスライン51は、一時収容器50内を加圧して液体培地C'に流動圧を供給する加圧装置として作用する。従って、一時収容器50と流体力分離装置4aとを接続する回収路8'及び供給路6aにおいて、ポンプの代わりに、液体培地に流動圧を付勢する。尚、ガスライン51には、空気を逃がして脱圧するための残圧排除弁V7が設置され、加圧及び脱圧を繰り返して、ポンプと同様に液体培地を繰り返し送出することができる。

[0060] 細胞培養の操作を開始するに当たって、開閉弁V1、V2、V4～V6が開放される。操作停止後は、流路から液体培地が培養槽2又は回収タンク20a、20bへ排出されたのを確認して開閉弁V1、V2、V4～V6が閉鎖され、残圧排除弁V7からガスライン51の空気を逃がすことによって脱圧する。

[0061] 図9の細胞培養システム1cは、図1の細胞培養システム1において回収タンク20を利用してガス圧送を行うように変更した構成を有する。ガス圧

送は、流体力分離装置 4 から排出される残部の液体培地 C'（内周側の画分）を流体力分離装置 4 へ再度供給可能なように構成される。

[0062] 細胞培養システム 1 c において、供給路 6 及び還流路には開閉弁 V 1 及び開閉弁 V 2 が各々設置され、新たな液体培地を補給する補給路 1 6 に開閉弁 V 5 が設置される。開閉弁 V 1, V 2, V 5 を開放して操作を開始すると、培養槽 2 の液体培地 C は、流体力分離装置 4 に供給される。流体力分離装置 4 の導出口 4 2 から排出される液体培地（外周側の画分）は、培養槽 2 へ還流する。

[0063] 細胞培養システム 1 c は、回収タンク 2 0 の代わりに、耐圧性の密閉された一時収容器 5 0 を有し、流体力分離装置 4 のもう一つの導出口 4 3 は、回収路 8 によって一時収容器 5 0 と接続される。導出口 4 3 から排出される残部の液体培地 C'（内周側の画分）は、回収路 8 から一時収容器 5 0 へ供給され、一時収容器 5 0 に收容される。一時収容器 5 0 には、図 8 と同様に、加圧空気を供給するガスライン 5 1 が接続され、供給される加圧空気によって、貯留される液体培地 C' の表面が押圧される。更に、一時収容器 5 0 には戻し路 5 2 が接続され、戻し路 5 2 は、供給路 6 の開閉弁 V 1 の下流側に合流する。戻し路 5 2 には開閉弁 V 8 が設置される。

[0064] 従って、開閉弁 V 8 を開放すると、一時収容器 5 0 の液体培地 C' は、戻し路 5 2 から供給路 6 へ還流されて、流体力分離装置 4 へ再度供給される。開閉弁 V 1, V 8 を切り替えることによって、培養槽 2 の液体培地 C 及び一時収容器 5 0 の液体培地 C' のいずれか一方を流体力分離装置 4 へ供給することができる。つまり、開閉弁 V 1, V 8 は、培養槽 2 から流体力分離装置 4 への液体培地の供給と、戻し路 5 2 から流体力分離装置 4 への残部の液体培地 C' の供給とを切り替える切り替え機構として機能する。従って、開閉弁 V 1, V 8 の切り替えによって、培養槽 2 の液体培地及び一時収容器の残部の液体培地 C' を交互に流体力分離装置 4 に供給することができる。

[0065] 図 9 の実施形態は、図 2 の実施形態と同様に、流体力分離を繰り返すことによって細胞密度（容積当たりの細胞数）が低い内周側の画分を得ることが

できる。従って、培養槽 2 の液体培地の細胞密度が高く、一度の流体力分離によって残部の液体培地の細胞密度が十分に低下しない場合に有用である。このようにして細胞密度が低下した画分を回収するために、回収路 8 から分岐する排出路 5 3 が設けられ、排出路 5 3 に開閉弁 V 9 が設置される。従って、開閉弁 V 1, V 8 の切り替えと同時に、開閉弁 V 9 の切り替えも行われ、二度の流体力分離によって細胞密度が低下した画分が排出路 5 3 から断続的に回収される。尚、開閉弁 V 1, V 8 の代わりに、戻し路 5 2 が供給路に合流する合流点に切り替え弁を設置して流路の接続を切り替えるようにしてもよい。

[0066] 図 10 の細胞培養システム 1 d は、図 9 の細胞培養システム 1 c において、ポンプ 10 の代わりの付勢装置として、ガス圧送するガスラインを用いるように変更した構成を有する。このために、液体培地 C を一時的に收容して流動圧を付与するための加圧容器 5 4 が設置される。

[0067] 詳細には、培養槽 2 の液体培地 C を流体力分離装置 4 へ供給する供給路は、加圧容器 5 4 が介在する供給路 6 b 及び供給路 6 c によって構成される。加圧容器 5 4 の上流側の供給路 6 b には開閉弁 V 1 が設置され、下流側の供給路 6 c には開閉弁 V 11 が設置される。開閉弁 V 1 を開放すると、培養槽 2 の液体培地 C は、加圧容器 5 4 に供給されて收容される。加圧容器 5 4 には、加圧空気を供給するガスライン 5 1' が接続され、供給される加圧空気によって、貯留される液体培地 C が加圧される。従って、流動圧が付与され、開閉弁 V 11 の開放によって、液体培地 C は供給路 6 c から流体力分離装置 4 へ供給される。液体培地 C を供給する圧力及び流量は、送液部 5 において適正に制御される。ガスライン 5 1' には、空気を逃がして脱圧するための残圧排除弁 V 10 が設置される。

[0068] 細胞培養システム 1 d は、図 9 の細胞培養システム 1 c と同様に、一時収容器 5 0 を有する。流体力分離装置 4 の導出口 4 2 は還流路 7 によって培養槽 2 と接続され、もう一つの導出口 4 3 は、回収路 8 によって一時収容器 5 0 と接続される。流体力分離装置 4 の導出口 4 3 から排出される残部の液体

培地C'（内周側の画分）は、回収路8から一時収容器50へ供給され、一時収容器50に収容される。一時収容器50には、図8と同様に、加圧空気を供給するガスライン51が接続され、供給される加圧空気によって、貯留される液体培地C'を加圧する。一時収容器50には戻し路52が接続され、戻し路52は、供給路6cにおける開閉弁V11の下流側且つ送液部5の上流側に合流する。戻し路52には開閉弁V8が設置される。

[0069] 従って、開閉弁V8を開放すると、一時収容器50の液体培地C'は、戻し路52から供給路6cへ還流されて、流体力分離装置4へ再度供給される。開閉弁V1、V8を切り替えることによって、培養槽2の液体培地C及び一時収容器50の液体培地C'のいずれか一方を流体力分離装置4へ供給することができる。従って、図9の細胞培養システム1cと同様に、開閉弁V11、V8の切り替えによって、培養槽2の液体培地及び一時収容器の残部の液体培地C'を交互に流体力分離装置4に供給することができる。これにより、流体力分離を繰り返して細胞密度が低い内周側の画分を得ることができる。故に、培養槽2の液体培地の細胞密度が高く、一度の流体力分離によって残部の液体培地の細胞密度が十分に低下しない場合に有用である。

[0070] 図10において、加圧空気を供給するガスライン51、51'は、ガス源を共通とする分岐したラインであるが、個別に制御されるので、個別の2つのラインでもよい。

[0071] 細胞培養システム1dにおける多段の分離処理は、培養槽2の液体培地Cを加圧容器54に収容した状態で、開閉弁V1、V8、V9を閉止し、開閉弁V2、V11を開放して開始し、一回目の流体力分離が行われる。外周側の画分は培養槽2へ還流し、内周側の画分は一時収容器50に収容される。二回目の流体力分離は、開閉弁V11を閉止し、開閉弁V8、V9を開放して開始する。外周側の画分は培養槽2へ還流し、内周側の画分は排出路53から排出される。流体力分離装置4での処理を行わない待機中には、開閉弁V1、V2、V9を閉止する。

[0072] 図11の細胞培養システム1d'は、流体力分離装置4の導出口43から

排出される残部の液体培地C'（内周側の画分）を一時収容器50へ供給する回収路8に開閉弁V12が設けられている。それ以外の構成は、図10の細胞培養システム1dと同じであるので、その説明は省略する。また、新たな培地を培養槽へ補給する培地補充部については、図1、2と同様であるので、その図示及び説明は省略し、前述を参照するものとする。

[0073] 図11の細胞培養システム1d'では、図10の細胞培養システム1dと同様に、図2の細胞培養システム1aの2つの流体力分離装置4、4aにおける分離処理を交互に行うことができる。それにより、図11における流体力分離装置4の導出口43から、図2における液体培地C'と液体培地C"とが交互に排出される。回収路8から分岐する排出路53に開閉弁V9が、回収路8に開閉弁V12が各々設置される。従って、開閉弁V1、V11、V12の切り替えと同時に、開閉弁V9の切り替えが行われ、二度の流体力分離によって細胞密度が低下した画分が排出路53から断続的に回収される。開閉弁V12は、流体力分離装置4における二度目の分離によって排出される残部の液体培地C"が、一次容器50へ供給されるのを防止し、排出路53からの回収を確実にする。尚、開閉弁V8、V11の代わりに、戻し路52が供給路6cに合流する合流点に切り替え弁を設置して流路の接続を切り替えるようにしてもよい。

[0074] 細胞培養システム1d'でも、単一の流体力分離装置4を用いて流体力分離を繰り返すことにより、細胞密度が低い内周側の画分を得ることができる。故に、図2の細胞培養システム1aと同様に、培養槽2の液体培地の細胞密度が高いために一度の流体力分離で残部の液体培地の細胞密度が十分に低下しない場合に有用である。

[0075] 細胞培養システム1d'における多段の分離処理は、培養槽2の液体培地Cを加圧容器54に収容した状態で、開閉弁V1、V8、V9を閉止し、開閉弁V2、V11、V12を開放して開始し、一回目の流体力分離が行われる。外周側の画分は培養槽2へ還流し、内周側の画分は一時収容器50に収容される。二回目の流体力分離は、開閉弁V11、V12を閉止し、開閉弁

V 8, V 9 を開放して開始する。外周側の画分は培養槽 2 へ還流し、内周側の画分は排出路 5 3 から排出される。流体力分離装置 4 での処理を行わない待機中には、開閉弁 V 1, V 2, V 9 を閉止する。

[0076] 図 1 2 の細胞培養システム 1 e は、図 1 1 の細胞培養システム 1 d' における開閉弁 V 1, V 2, V 8, V 1 1, V 1 2 を逆止弁 V a ~ V e に変更した実施形態を示す。これにより、弁制御の操作における煩雑さを軽減することができる。

[0077] 詳細には、供給路 6 b には逆止弁 V a が設置され、加圧容器 5 4 から培養槽 2 への逆流が防止される。供給路 6 c には逆止弁 V b が設置され、流体力分離装置 4 及び戻し路 5 2 から加圧容器 5 4 への流入が防止される。還流路 7 には逆止弁 V c が設置され、培養槽 2 側から流体力分離装置 4 側への流れが防止される。従って、培養槽 2 と流体力分離装置 4 との間での液体培地の循環は一方向に規定される。回収路 8 には逆止弁 V d が設置され、流体力分離装置 4 の導出口 4 3 から排出される液体培地の供給先は、開閉弁 V 9 の開閉のみによって切り替えることができる。戻し路 5 2 には逆止弁 V e が設置され、加圧容器 5 4 及び流体力分離装置 4 から戻し路 5 2 への流入が防止される。

[0078] 従って、細胞培養システム 1 c においては、開閉弁 V 9 を閉止して、ガスライン 5 1' からのガス圧送によって分離処理を開始する。培養槽 2 の液体培地は、加圧容器 5 4 を介して流体力分離装置 4 へ供給されて分離され、外周側の画分は、培養槽 2 へ還流し、内周側の画分は一時収容器 5 0 に收容される。次に、開閉弁 V 9 を開放して、ガス圧送をガスライン 5 1 から行くと、一時収容器 5 0 の液体培地 C' は、戻し路 5 2 から流体力分離装置 4 へ供給されて分離される。外周側の画分は、培養槽 2 へ還流し、内周側の画分は、排出路 5 3 から排出され、加圧される一時収容器 5 0 には戻らない。

[0079] 図 1 2 の細胞培養システム 1 e においては、培養槽 2 の液体培地は、加圧容器 5 4 に一旦收容された後に流体力分離装置 4 において分離される。つまり、供給路 6 b における液体培地の流通と、還流路 7 における液体培地の流

通は、交互に行われる。従って、供給路 6 b 及び還流路 7 は、培養槽側の末端を一つに統合して兼用することが可能である。図 1 3 は、図 1 2 の細胞培養システムにおいて還流路 7 の培養槽側の末端を供給路 6 b の末端に一体化した実施形態を示す。

[0080] 図 1 3 の細胞培養システム 1 f において、培養槽 2 から加圧容器 5 0 へ液体培地 C を供給する供給路 6 b' には、逆止弁ではなく開閉弁 V 1 が設置される。加圧容器 5 4 の液体培地 C は、前述と同様に流体力分離装置 4 において分離され、相対的に大きい細胞が濃縮して含まれる液体培地は導出口 4 2 から排出される。導出口 4 2 には、液体培地を培養槽 2 へ送るための還流路 7' の一端が接続され、逆止弁 V c が設置される。還流路 7' の他端、つまり、出口側末端は、供給路 6 b' の入口近くに接続されるので、供給路 6 b' の入口を還流路 7' の出口と兼用可能である。

[0081] 細胞培養システムにおいて分離処理を停止すると、培養槽から液体培地を吸い上げる供給路、及び、流体力分離装置 4 から液体培地を返送する還流路を構成する配管内には、液体培地が滞留し易い。配管に閉じ込められた細胞は呼吸ができず、分離処理の再開によって流路から培養槽に細胞が戻されると、増殖に悪影響を及ぼす可能性がある。この点に関して、図 1 3 の細胞培養システム 1 f では、還流路 7' から培養槽 2 への還流によって操作を停止し、供給路 6' 及び還流路 7' の開閉弁 V 1 及び逆止弁 V c は、培養槽 2 からの液体培地の逆流を防止する。従って、処理停止後の配管内に液体培地が滞留し難い。供給路及び還流路を一体化する構成以外は、図 1 2 の細胞培養システムと同じであるので、その説明は省略し、前述を参照するものとする。

[0082] このように、流体力分離技術を利用して、培養中の液体培地から相対的に大きい細胞を選択的に濃縮分離することができるので、これと共に新たな液体培地を培養槽に還流することによって、増殖力を高く維持したまま細胞培養を継続することができる。流体力分離は、遠心分離より極めて効率的に細胞の濃縮分離を進めることができ、フィルター分離等に比べて、細胞を損傷

せずに高い生存率で濃縮分離することができる。分離除去された相対的に小さい細胞を含む画分は、フィルター等を用いて細胞片等の不要物を除去した後、精製することによって、有用成分を回収することができる。流体力分離において、液体培地を比較的高い速度で湾曲流路へ供給するので、本開示の細胞培養システムは、細胞の濃縮分離を行う処理能力が高く、製品製造規模の細胞培養に十分適用可能である。

実施例 1

[0083] <バッチ培養>

1. 5 Lの液体培地（GEヘルスケア社製、製品名：SH30934, 01 HyCell CHO Medium）にアミノ酸（L-アラニル-L-グルタミン）及び抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン、アムホテリシンB）を適量添加した。温度を36.5～37.0℃に維持した液体培地中で、CHO細胞（チャイニーズハムスターの卵巣細胞）を培養した。培養中、pHが6.70未満にならないように液体培地のpHを管理した。

培養中にサンプリングを行って、細胞計測装置（ベックマンコールター社製、製品名：Vi-Cell）を用いて、生細胞密度（ $\times 10^6$ cells/mL）及び平均細胞径（ μm ）を測定した。結果を図5（a）及び（b）のグラフに示す。又、この間の細胞の生存率を図6のグラフに示す。

[0084] <培養E1>

前記特許文献2に記載される粒子分離器を模倣して、円弧状の湾曲流路が内部に形成された平板状の樹脂製成形体を作製した。この成形体を流路ユニットとして用いて流体力分離装置を構成した。液体培地を圧送するためのポンプ10としてガス圧送を使用し、流体力分離装置を用いて、図1の細胞培養システム1を構成し、培養槽2において、上述のバッチ培養を100時間行った。

[0085] この後、1回の分離処理において所定量の液体培地を培養槽から抜き出して、0.28～0.36 MPaの圧力で液体培地を流体力分離装置へ圧送した（De数：47～70程度）。流体力分離装置から排出される外周側の画

分を培養槽に戻し、内周側の画分と同量の新たな液体培地を追加した。この分離処理を、1日の培地交換率が0.5～1.4の範囲になるように、一定時間毎に繰り返して行いながら、培養を継続した。この間にサンプリングを行って、生細胞密度($\times 10^6$ cells/mL)及び平均細胞径(μm)を測定した。結果を図5(a)及び(b)のグラフに示す。又、この間の細胞の生存率を図6のグラフに示す。

- [0086] 図5及び図6から、バッチ培養における培養時間が110時間を超えると、栄養素の不足又は代謝物の被毒によって細胞の増殖が困難になり、生存率が大幅に低下することが判る。これに対し、上述の培養E1のように、液体培地を抜き出して相対的に大きい細胞を濃縮分離して、新たな液体培地と共に培養槽に供給すると、培養時間が110時間を超えても細胞の増殖は進行し、300時間以上培養を継続できることが判る。又、培養される細胞は、 $16\mu\text{m}$ 以上の細胞径を維持しており、流体力分離装置において相対的に大きい細胞が好適に分離濃縮されていることが理解される。

実施例 2

- [0087] <細胞分離試験>

実施例1と同様の液体培地及びCHO細胞を用いて細胞培養を100時間行った。この液体培地を原液として、細胞計測装置(ベックマンコールター社製、製品名: Vi-Cell)を用いて細胞の生存率(全細胞中の生細胞の割合)を計測したところ、92.9%であった。又、細胞濃度を測定したところ、全細胞濃度は $2.86 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 、生細胞濃度は $2.66 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ であり、平均細胞径は、 $14.87\mu\text{m}$ であった。

プランジャポンプを用いて、上記原液を実施例1の流体力分離装置の湾曲流路へ0.25MPaの圧力で圧送して(D_e数: 78)、外周側の画分と内周側の画分とに分割した。

- [0088] 内周側の画分について、同様に、細胞濃度、平均細胞径及び細胞の生存率を測定したところ、全細胞濃度は $0.25 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 、生細胞濃度は $0.18 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ で、平均細胞径は、 $11.46\mu\text{m}$ であった。

細胞の生存率は、70.0%であった。

[0089] 外周側の画分についても同様に測定を行ったところ、全細胞濃度は $5.72 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 、生細胞濃度は、 $5.37 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ で、平均細胞径は、 $14.96 \mu\text{m}$ であった。細胞の生存率は、93.8%であった。

[0090] 上記結果から、第1に、細胞濃度を比較すると、液体培地が湾曲流路を流れることによって、細胞の分布が外周側に移行することが明らかである。更に、平均細胞径の比較から、内周側の画分には相対的に小さい細胞（細胞径： $11.46 \mu\text{m}$ ）が含まれ、外周側の画分に相対的に大きい細胞（細胞径： $14.96 \mu\text{m}$ ）が濃縮されることが明らかである。従って、液体培地を外周側と内周側の2つの画分に分割することによって、相対的に大きい細胞を選択的に高濃度で分取することができることが理解される。更に、内周側の画分における生存率が低いことから、相対的に小さい細胞を除去することによって、死細胞が除去され、原液より生存率が高い細胞群を含む液体培地が得られることが解る。

実施例 3

[0091] <圧力環境による細胞への影響>

流体力分離装置における圧力環境による細胞への影響を調べるために、以下のような試験システムを構成した。耐圧タンクと流体力分離装置の導入口とを、一方向弁及びシリンジポンプを介して配管で接続し、流体力分離装置から排出される2つの画分が共に耐圧タンクに還流するように、流体力分離装置の2つの導出口と耐圧タンクとをY字配管で接続した。流体力分離装置における液体培地の供給圧及び出口圧を計測する圧力計を配管に敷設した。

[0092] 実施例1と同様の液体培地及びCHO細胞を用いて細胞培養を100時間行い、培養後の液体培地を、約0.3MPaの加圧空気と共に耐圧タンクに充填して、以下の試験T1～T10を行った。試験を行う前後に、液体培地に含まれる細胞の生存率を細胞計測装置（ベックマンコールター社製、製品名：Vi-Cell）を用いて計測した。結果を表1に示す。尚、以下の試験におい

ては、実施例 1 の湾曲流路を含む 3 種類の湾曲流路（L 1 ～ L 3、同一幅で高さ又は長さが異なる）を作製して、何れかを有する流体力分離装置を使用した。

[0093] （試験 T 1 ～ T 8）

シリンジポンプを用いて表 1 のような供給圧に調節しながら、耐圧タンクに収容される液体培地を流体力分離装置へ圧送して分離処理を行った。流体力分離装置から排出される 2 つの画分は、併せて耐圧タンクに還流された。この分離処理を繰り返して、液体培地に 10 回の分離処理を施した。尚、流体力分離装置から排出される画分の圧力は大気圧に開放されるので、流体力分離装置における圧力変動は、流体力分離装置へ圧送される供給圧（入口圧）に等しい。

[0094] （試験 T 9, T 10）

上記の試験システムにおいて、更に、流体力分離装置の 2 つの導出口に接続される配管に圧力調整弁を取り付けて、流体力分離装置から排出される画分の出口圧の調節を可能にした。この試験システムにおいて、供給圧及び出口圧を表 1 のように調節して、試験 T 1 ～ T 8 と同様に分離処理を繰り返す行い、液体培地に 10 回の分離処理を施した。流体力分離装置における圧力変動は、流体力分離装置へ圧送される供給圧（入口圧）と、導出口の圧力調整弁によって調節される圧力（出口圧）との差である。

[0095] [表1]

	供給圧 [MPa]	出口圧 [MPa]	圧力変動 [MPa]	使用流路	細胞生存率[%]		
					試験前	試験後	差
試験T1	0.22	0	0.22	L1	96.7	96.4	-0.3
試験T2	0.26	0	0.26	L2	98.6	98.3	-0.3
試験T3	0.33	0	0.33	L1	97.3	97.4	0.1
試験T4	0.33	0	0.33	L1	97.9	97.7	-0.2
試験T5	0.40	0	0.40	L1	99.0	98.8	-0.2
試験T6	0.50	0	0.50	L1	98.0	97.1	-0.9
試験T7	0.51	0	0.51	L3	98.9	97.8	-1.1
試験T8	0.60	0	0.60	L1	98.4	95.2	-3.2
試験T9	0.60	0.29	0.31	L1	97.9	97.9	0.4
試験T10	0.31	0	0.31	L1	97.9	97.9	0.3

[0096] 細胞の生存率の測定においては、±0.5%の範囲は、誤差と見なすこと

ができるので、試験 T 6 の供給圧が 0.6 MPa における生存率の低下は、明らかに有意な結果である。表 1 の試験 T 1 ~ T 8 の結果から、生存率の低下が抑制可能な閾値は、0.45 MPa 付近であると考えられる。但し、試験 T 9 においては、供給圧が 0.6 MPa であっても、細胞の生存率は高く維持されており、この結果から細胞の生存率を低下させる原因は、静圧ではなく、圧力変動の大きさであることが解る。

産業上の利用可能性

[0097] 培養細胞のうちの相対的に大きい細胞を選択的に濃縮分離して培養を継続することができる。従って、バイオ技術を利用した医薬品の製造に利用して、ホルモン、サイトカイン、酵素、抗体、ワクチン等の製品の提供において、経済性、品質の向上に寄与し、現状において稀少又は高価な医薬品の普及、汎用化を進めることが可能になる。

符号の説明

- [0098] 1, 1 a, 1 b, 1 c, 1 d, 1 d', 1 e, 1 f 細胞培養システム
- 2 培養槽
- 3 細胞分離装置
- 4, 4 a 流体力分離装置
- 5, 5 a 送液部
- 6, 6 a, 6 b, 6 c, 6' 供給路
- 7, 7 a, 7' 還流路
- 8, 8', 8 a 回収路
- 9 培地補充部
- 10, 10 a ポンプ
- 11, 11 a 圧力計
- 12, 12 a 圧力調整弁
- 13, 13 a 流量計
- 14, 14 a, 18 流量調整弁
- 15 培地タンク

- 16 補給路
- 17 液面計
- 19 ローラーポンプ
- 20, 20a, 20b 回収タンク
- 21 フィルター
- 41 導入口
- 42, 42a, 43, 43a 導出口
- 50 一時収容器
- 51, 51' ガスライン
- 52 戻し路
- 53 排出路
- 54 加圧容器
- V1, V2, V3, V4, V5、V6, V8, V9, V11 開閉弁
- V7, V10 残圧排除弁
- Va, Vb, Vc, Vd, Ve 逆止弁
- C, C0, C', C'' 液体培地