明　細　書

発明の名称 ： 培養情報生成装置及び培養装置並びに培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、培養情報生成装置及び培養装置並びに培養方法に関する。

本発明は、２０１０年１月２７日に、日本に出願された特願２０１０－１５８４４号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] ウイルスを用いて目的とする蛋白質等を生産する場合、特定の蛋白質を生成するための遺伝子を組み込んだウイルスを動物細胞等に播種して培養し、培養後のウイルスから上記蛋白質を分離することが行われている。また、ウイルスを用いてワクチンを生産する場合には、ウイルス自体が生産対象であることもあり、適度に培養した動物細胞等にウイルスを播種して増殖させることが行われている。そして、このようなウイルスの培養では、培養状態を評価するための手法として、ウイルス含有培養液をサンプリングしてウイルス数を計数する方法（タイター測定）や顕微鏡観察によってサンプル中の細胞の状態を確認することが一般的に行われている。下記特許文献１及び非特許文献１～３には、このようなウイルスの培養技術の一例が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開２００２－１４８２５８号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1：「バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いた蛋白質の大量生産」蛋白質科学会愛カーブ#022

非特許文献2：「細胞培養におけるカイコ核多角体病ウイルスの増殖」養蚕昆虫研報　７号；9-29（1993）

非特許文献3：「Expression and purification of an influenza hemaggluti

nin- one step closer to a recombinant protein-based influenza vaccine」 Vaccine 24P2176(2006)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] ところで、上記従来の培養状態の評価技術では、培養対象がウイルスであるために無菌及び閉鎖系での操作によるサンプリング操作が必須であり、よってこのサンプリング操作が煩雑である。このサンプリング操作と共に、培養槽等が雑菌によって汚染される虞もある。また、タイター測定には数日を要し、測定操作が難しいために測定者によっては誤差が大きくなるので、タイムリーな測定かつ測定精度の確保が困難である。さらに、顕微鏡を用いる評価では観察者の個人差が生じ易く、よって客観性を担保した評価ができない。

[0006] 本発明は、上述した事情に鑑みてなされたものであり、以下の点を目的とする。

（Ｉ）ウイルスの培養状態をタイムリーに評価する。

（ＩＩ）従来よりも客観性を担保し得るウイルスの培養状態の評価手法を提供する。

（ＩＩＩ）培養槽が雑菌で汚染されることを防止する。

課題を解決するための手段

[0007] 上記目的を達成するために、本発明では、以下の手法を採用する。即ち、

（１）本発明は、ウイルス含有培養液を保有する培養槽から排気されるガス中の対象成分の濃度変化を示す測定信号を入力とし、その測定信号に所定の情報処理を施すことによりウイルスの培養状態を示す培養情報を生成する培養情報生成装置である。

[0008] （２）上記（１）に記載の培養情報生成装置では、培養槽内でウイルスの栄養となる所定の細胞にウイルスを播種して培養する場合には、ガスの発生濃度の予め決定された回数の極大値の発生を示す培養情報を生成しても良い。

[0009] （３）上記（１）または（２）に記載の培養情報生成装置でのガスは、二酸化炭素（CO_2）でも良い。

[0010] （４）また、本発明は、ウイルスを培養する培養槽と、その培養槽から排出される排気ガスを分析・測定し、測定結果を示す測定信号を出力する排気ガス分析装置と、上記（１）～（３）のいずれかの培養情報生成装置とを具備する培養装置である。

[0011] （５）上記（４）に記載の培養装置の培養槽は、培養情報に基づいてウイルスの培養を終了しても良い。

[0012] （６）また、本発明は、ウイルスの培養で発生したガス中の対象成分の濃度変化に基づいてウイルスの培養を終了する培養方法である。

[0013] （７）上記（６）に記載の培養方法は、ウイルスの栄養となる所定の細胞にウイルスを播種して培養する場合には、ガスの発生濃度の予め決定された回数の極大値の発生をもってウイルスの培養を終了しても良い。

[0014] （８）上記（６）または（７）に記載の培養方法におけるガスは、二酸化炭素（CO_2）でも良い。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、培養槽から排出される排気ガスに基づいて培養槽の培養状態をオンライン状態で自動的に検知することができる。その為、ウイルスの培養状態をタイムリーに評価することが可能であると共に、従来よりも客観性が向上したウイルスの培養状態の評価手法を提供することができ、また培養槽が雑菌で汚染されることを防止することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]本発明の一実施形態に係るウイルス培養装置の構成を示すブロック図である。

[図2]本発明の一実施形態に係るウイルス培養装置の要部動作を示すフローチャートである。

[図3]本発明の一実施形態において、培養槽から排出される二酸化炭素（CO_2）及び酸素（O_2）の濃度変化を示す測定結果である。

[図4]本発明の一実施形態において、培養時間による生産物濃度比の変化を示す特性図である。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、図面を参照して、本発明の一実施形態について説明する。

図１に示すように、本実施形態に係るウイルス培養装置Ａは、培養槽１、ウイルス供給装置２、排気ガス分析装置３及び培養情報生成装置（培養状態情報生成装置）４を備える。このようなウイルス培養装置Ａは、所定の目的蛋白質を生成するための遺伝子を組み込んだウイルスを昆虫細胞に播種して培養することにより、上記目的蛋白質を生産する、またはウイルスそのものを増殖させる。

[0018] 培養槽１は、培養対象である上記昆虫細胞及びウイルスを培養するための設備であり、槽本体内の環境（培養環境）を培養に最適な環境を維持しつつ培養対象を培養する装置である。すなわち、この培養槽１は、槽本体、槽本体内の培養液を攪拌する攪拌装置、槽本体に対して培養に必要な酸素を供給する酸素供給装置、槽本体を培養に最適な温度に維持するための温度管理装置を含む。培養槽の形態としては、攪拌機がなく、通気で攪拌を行うもの等、一般にいくつかの形態の培養槽が知られているが、本実施形態における培養槽１は何れの形態でも良い。

[0019] ウイルス供給装置２は、培養開始後の所定のタイミングで上記培養槽１にウイルスを供給する。このウイルスには、特定の蛋白質を生成するための遺伝子が組み込まれている。上記タンパク質は、本ウイルス培養装置Ａの最終的な生産物である。培養槽１は初期的には昆虫細胞を培養するが、培養開始後の所定のタイミングでウイルス供給装置２からウイルスが供給されると、これ以降は昆虫細胞に播種したウイルスが槽本体内で培養される。

[0020] 排気ガス分析装置３は、このような培養槽１における培養過程において培養槽１から排出される排気ガスの成分及び濃度をオンラインで分析・測定する装置である。

この排気ガス分析装置３は、排気ガスに含まれるいくつかの成分のうち、例

えば二酸化炭素（CO_2）の濃度を分析・測定し、測定信号として培養情報生成装置４に出力する。このような排気ガス分析装置３としては、例えばガス成分の違いによる光吸収波長の違い等を利用した光学的なオンラインガス測定器が用いられる。

[0021] 培養情報生成装置４は、本ウイルス培養装置Ａにおける最も特徴的な構成要素である。

この培養情報生成装置４は、図１に図示するように情報処理部４ａと記憶部４ｂとを主な構成要素とする一種のコンピュータである。情報処理部４ａは、所定の培養情報生成プログラムに基づいて上記測定信号を信号処理することにより、上記培養槽１における培養対象の培養状態を示す培養情報を生成して外部、自らに備えられた表示装置（図示略）あるいは／及び培養槽１に出力する。記憶部４ｂは、上記培養情報生成プログラムを記憶する不揮発性記憶領域と、演算結果を一時的に記憶する揮発性記憶領域と、からなる半導体メモリである。

[0022] 次に、このように構成された本ウイルス培養装置Ａの動作について、図２～図４を参照して詳しく説明する。

[0023] 本ウイルス培養装置Ａでは、培養槽１に昆虫細胞のみを収容して培養を開始する。そして、培養開始から所定時間が経過した時点で、ウイルス供給装置２が作動して培養槽１にウイルスが供給される。培養槽１では、攪拌装置によって昆虫細胞とウイルスとが攪拌混合されつつ昆虫細胞の培養が進行し、培養開始から一定の時間が経過した時点で昆虫細胞の培養を終了する。

[0024] 図３は、このような昆虫細胞の培養開始から培養終了までの間に培養槽１から排出される二酸化炭素（CO_2）及び酸素（O_2）の濃度変化、つまり培養開始から培養終了までの間における排気ガス分析装置３の測定結果は、図３に示す通りである。二酸化炭素（CO_2）の濃度変化に着目すると、培養開始から４５時間が経過した時点でウイルス供給装置２が作動することによりウイルスが培養槽１に供給され、ウイルスの昆虫細胞への播種が発生する。培養開始から昆虫細胞が順調に培養されることにより二酸化炭素（CO_2）の

濃度は徐々に上昇するが、上記播種のタイミングで二酸化炭素（CO_2）の濃度の上昇カーブに若干の乱れが発生している。

[0025] 二酸化炭素（CO_2）の濃度は、播種後も昆虫細胞が継続して増殖するので上昇カーブを描くが、その後、二酸化炭素（CO_2）の濃度の上昇率は徐々に小さくなり、培養開始から７５時間が経過した時点で下降カーブを描くようになる。すなわち、二酸化炭素（CO_2）の濃度は、丸印で示すように播種後に１回目の極大値を示す。このような二酸化炭素（CO_2）の濃度の変化は、播種後にウイルスが徐々に昆虫細胞に感染（一次感染）して昆虫細胞の増殖が妨げられ、また昆虫細胞内でのウイルスの増殖に伴って死滅する昆虫細胞が徐々に増加するためである。

[0026] そして、昆虫細胞内で所定数まで増殖したウイルスは、培養開始から１００時間程度が経過した時点で、昆虫細胞から離脱して他の昆虫細胞に感染（二次感染）する。この二次感染の際には、昆虫細胞内で増殖していたウイルスが昆虫細胞の外に一旦出てくるので、図３中の丸印で示すように二酸化炭素（CO_2）の濃度が急激に増加して減少する。すなわち、二酸化炭素（CO_2）の濃度は、ウイルスの二次感染によって２回目の極大値を示す。

[0027] ウイルス内で生成される蛋白質（生産物）は、ある蛋白質の場合には、図４に示すように、培養開始から４５時間が経過後の播種によってウイルスが培養槽１内で増殖すると共に徐々に増大する。その後、蛋白質（生産物）は、時間の経過とともに徐々に増加するが、一次感染時及び二次感染時に飛躍的に増大する。そして、蛋白質（生産物）は、二次感染が終了すると極端に減少する。このような二次感染後における蛋白質（生産物）の減少は、死滅した昆虫細胞から分泌されたプロテアーゼ（蛋白質やペプチドを加水分解する酵素）によって、ウイルス内の蛋白質（生産物）が急激に分解されるためと考えられる。したがって、蛋白質（生産物）を効率（収率）良く生産するためには二次感染の発生を的確かつ正確に検知することが極めて重要である。

[0028] さて、以上説明した二酸化炭素（CO_2）の濃度変化は、排気ガス分析装置

３によって分析・測定された結果であり、排気ガス分析装置３から培養情報生成装置４に測定信号として供給される。培養情報生成装置４の情報処理部４ａは、培養情報生成プログラムに基づいて作動することにより、各時刻で排気ガス分析装置３から入力される上記測定信号が示す二酸化炭素（CO_2）の濃度を時系列データとして記憶部４ｂに順次記憶させつつ、その時系列データ、つまり現在及び過去の時刻における二酸化炭素（CO_2）の濃度に基づいて上記二次感染の発生を図２のフローチャートに示す手順で検知する。

[0029] 情報処理部４ａは、培養開始後に播種が発生したか否かを判断し（ステップＳ１）、この判断が「Ｙｅｓ」となると、一次感染が発生したか否かを判断する（ステップＳ２）。

ここで、情報処理部４ａは、例えば内部タイマー等をセットすることにより培養開始後の経過時間（タイマーの計時時間）が予め設定されたウイルス供給時間に一致したか否かを判断することによって、上記播種の発生を判断する。そして、情報処理部４ａは、二酸化炭素（CO_2）の濃度変化が播種後において上昇カーブから下降カーブに変化したことを上記時系列データに基づいて確認することによって、上記一次感染の発生を判断する。

[0030] そして、情報処理部４ａは、ステップＳ２の判断が「Ｙｅｓ」となると、二次感染が発生したか否かを判断する（ステップＳ３）。すなわち、情報処理部４ａは、一次感染後において二酸化炭素（CO_2）の濃度変化が再び上昇して下降したことを時系列データに基づいて確認することによって、上記二次感染の発生を判断する。情報処理部４ａは、このようにして二次感染の発生を検知すると、その二次感染の発生を示す培養情報を生成して外部及び培養槽１に出力する（ステップＳ４）。そして、培養槽１は、培養情報生成装置４から培養情報が入力されると、速やかに培養を終了して蛋白質（生産物）の分解を防止する。

[0031] このように、培養情報生成装置４の情報処理部４ａは、培養情報生成プログラムに基づいて作動することにより、培養槽１から排出される排気ガスの一成分である二酸化炭素（CO_2）の濃度に関する時系列データに基づいて二

次感染の発生をオンライン状態で自動的に検知する。したがって、本ウイルス培養装置Ａによれば、従来技術の問題を完全に解決することが可能であり、ウイルスの培養状態をタイムリーに評価することが可能である。更に、従来よりも客観性が向上したウイルスの培養状態の評価手法を提供することができる。

[0032] なお、本発明は、上記実施形態に限定されるものではなく、例えば以下のような変形例が考えられる。

（１）上記実施形態では、培養情報生成装置４は、二次感染の発生を示す情報を培養情報として生成したが、本発明における培養情報はこれに限定されない。例えば、培養情報生成装置４で図３に示すような二酸化炭素（CO_2）の濃度変化を示すトレンドグラフを生成し、そのトレンドグラフを培養情報として外部、自らに備えられた表示装置あるいは／及び培養槽１に出力するようにしても良い。このようなトレンドグラフを培養情報として生成する場合、作業者が、このトレンドグラフに基づいて二次感染の発生を判断して所定の措置をとることによって培養槽１における培養が終了する。

[0033] （２）図２に示したように播種の発生を判断した後に一次感染（１回目の極大値の発生）及び二次感染（２回目の極大値の発生）の発生を判断したが、播種の発生に関する判断を省略しても良い。すなわち、培養の終了を決定するガスの発生濃度の極大値の発生回数は、予め決定された回数であればよく、上記実施形態の２回に限定されない。

[0034] （３）図２に示した二酸化炭素（CO_2）の濃度変化は、特定の昆虫細胞とウイルスについて測定されたが、一次感染及び二次感染は、各種のウイルス及び各種の動物細胞あるいは昆虫細胞以外の動物細胞等についても同様に発生するので、１回目の極大値及び２回目の極大値は、昆虫細胞等のウイルスの栄養となる細胞とウイルスとの関係に依らず発生すると考えられる。したがって、本願発明は、ウイルスの栄養となる細胞とウイルスとの関係を特に限定しない。

[0035] （４）上記実施形態では、培養槽１は二次感染の発生を示す培養情報が培養

情報生成装置４から入力されると培養を終了させたが、培養槽１における培養情報に基づくウイルスの培養状態の制御は、このような培養の終了制御に限定されない。培養情報生成装置４が検知した各種の培養状態を培養槽１に逐次供給することによって、培養の終了制御以外の制御を行うようにしても良い。例えば、培養情報生成装置４は、一次感染（１回目の極大値の発生）を示す培養情報を生成して培養槽１に提供し、培養槽１は、これを受けて培養条件に変更を加えるようにしても良い。

[0036] （５）上記実施形態では、培養槽１から排出される排気ガス中の二酸化炭素（CO_2）の濃度に基づいて培養情報を生成したが、本発明はこれに限定されない。一次感染または／及び二次感染時に特異な濃度変化を示すガス成分であれば、二酸化炭素（CO_2）以外の成分の濃度を測定しても良い。

産業上の利用可能性

[0037] 本発明の培養情報生成装置及び培養装置並びに培養方法によれば、ウイルスの培養状態をタイムリーに評価することが可能であると共に、従来よりも客観性が向上したウイルスの培養状態の評価手法を提供することができ、また培養槽が雑菌で汚染されることを防止することができる。

符号の説明

[0038] Ａ…ウイルス培養装置、１…培養槽、２…ウイルス供給装置、３…排気ガス分析装置、４…培養情報生成装置、４ａ…情報処理部、４ｂ…記憶部

請求の範囲

[請求項1] ウイルス含有培養液を保有する培養槽から排気されるガス中の対象成分の濃度変化を示す測定信号を入力し、その測定信号に所定の情報処理を施すことによりウイルスの培養状態を示す培養情報を生成する培養情報生成装置。

[請求項2] 前記培養槽内でウイルスの栄養となる所定の細胞に、ウイルスを播種して培養する場合には、ガスの発生濃度の予め決定された回数の極大値の発生を示す培養情報を生成する請求項１に記載の培養情報生成装置。

[請求項3] 前記ガスは、二酸化炭素（CO_2）である請求項１または２に記載の培養情報生成装置。

[請求項4] ウイルスを培養する培養槽と、

その培養槽から排出される排気ガスを分析・測定し、測定結果を示す測定信号を出力する排気ガス分析装置と、

請求項１に記載の培養情報生成装置と

を具備する培養装置。

[請求項5] ウイルスを培養する培養槽と、

その培養槽から排出される排気ガスを分析・測定し、測定結果を示す測定信号を出力する排気ガス分析装置と、

請求項２に記載の培養情報生成装置と

を具備する培養装置。

[請求項6] ウイルスを培養する培養槽と、

その培養槽から排出される排気ガスを分析・測定し、測定結果を示す測定信号を出力する排気ガス分析装置と、

請求項３に記載の培養情報生成装置と

を具備する培養装置。

[請求項7] 前記培養槽は、培養情報に基づいてウイルスの培養を終了する請求項４に記載の培養装置。

[請求項8] 前記培養槽は、培養情報に基づいてウイルスの培養を終了する請求項５に記載の培養装置。

[請求項9] 前記培養槽は、培養情報に基づいてウイルスの培養を終了する請求項６に記載の培養装置。

[請求項10] ウイルスの培養で発生したガス中の対象成分の濃度変化に基づいてウイルスの培養を終了する培養方法。

[請求項11] ウイルスの栄養となる所定の細胞に、ウイルスを播種して培養する場合には、ガスの発生濃度の予め決定された回数の極大値の発生をもってウイルスの培養を終了する請求項１０に記載の培養方法。

[請求項12] 前記ガスは、二酸化炭素（CO_2）である請求項１０または１１に記載の培養方法。