

培養技術研究部会第4回技術セミナー

動物細胞培養のスケールアップ

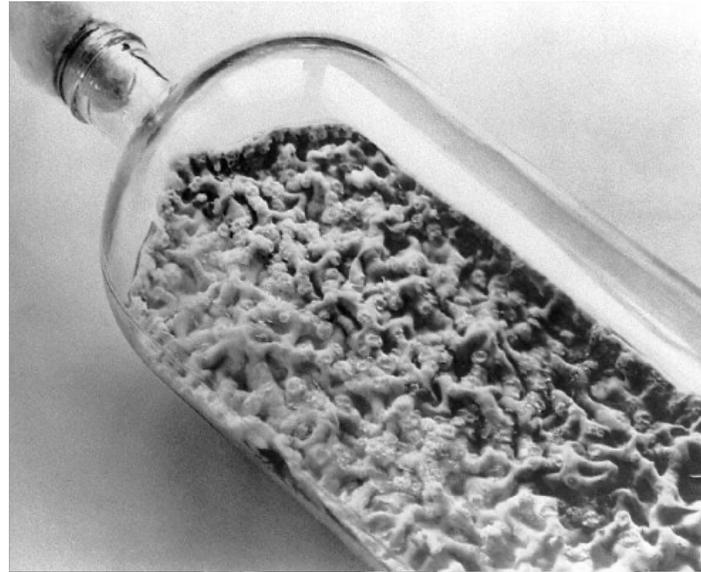
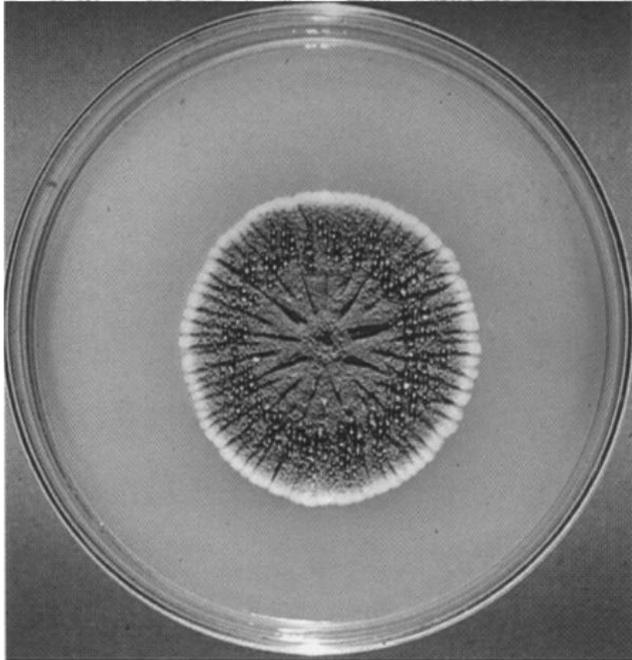
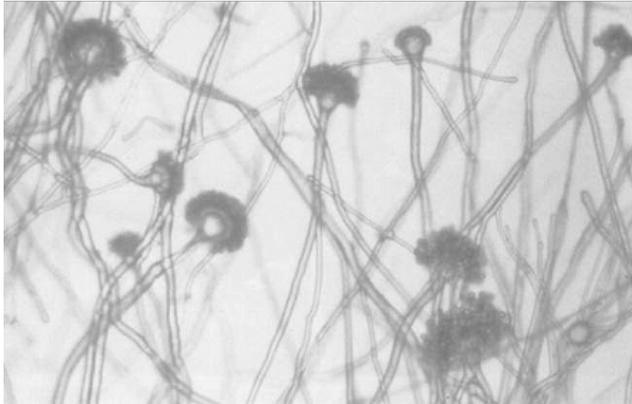
2023年3月28日

村上 聖

次世代バイオ医薬品製造技術研究組合専務理事



液中培養技術の発展

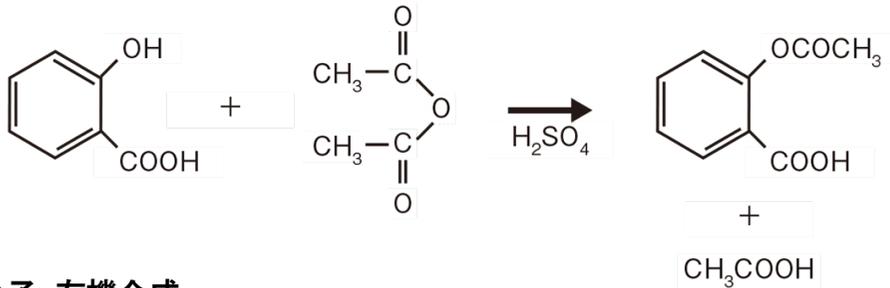
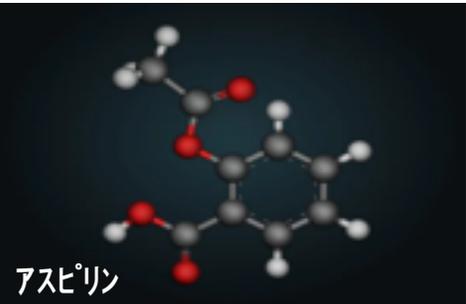
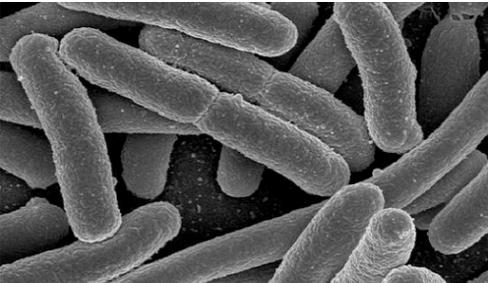
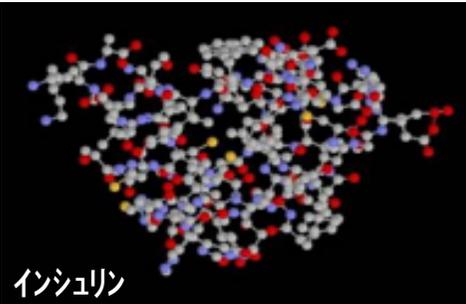
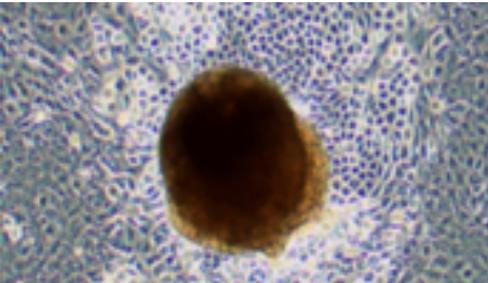
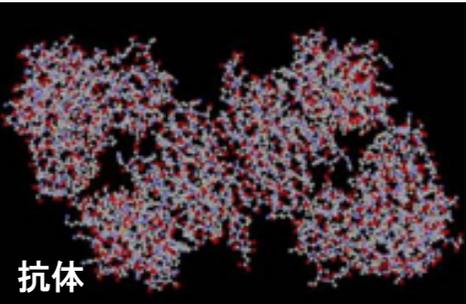


固体培養

液面培養

液中培養

培養細胞と生産物

	種類	生産工程	反応時間	生産物例
化学反応	有機合成	 <p>低分子: 有機合成 核酸: 有機合成、PCR</p>	数分～数時間	 <p>アスピリン MW: 180</p>
微生物	細菌 放線菌 糸状菌 真菌 酵母	 <p>タンパク質: 遺伝子→アミノ酸配列→糖鎖付加(限定的) 核酸: プラスミド導入、複製</p>	1～2日	 <p>インシュリン MW: 5,808</p>
動物細胞	ヒト細胞 CHO※ ほか	 <p>抗体医薬: 遺伝子→アミノ酸配列→3次元構造→糖鎖付加 ウイルス生産: ウイルス感染→ウイルス複製→ウイルス放出</p>	7～10日	 <p>抗体 MW: 150,000</p>

※CHO:チャイニーズハムスタ卵巣細胞

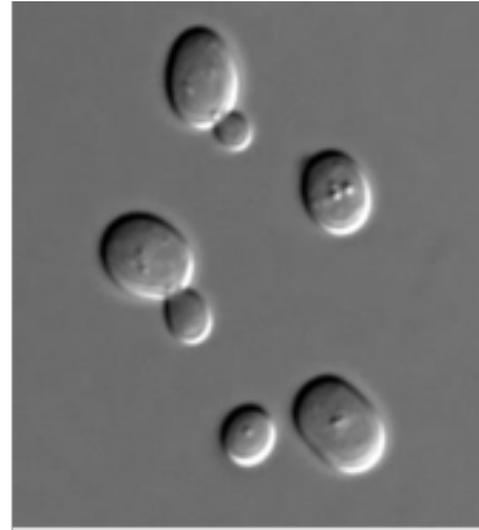
大容量細胞培養槽



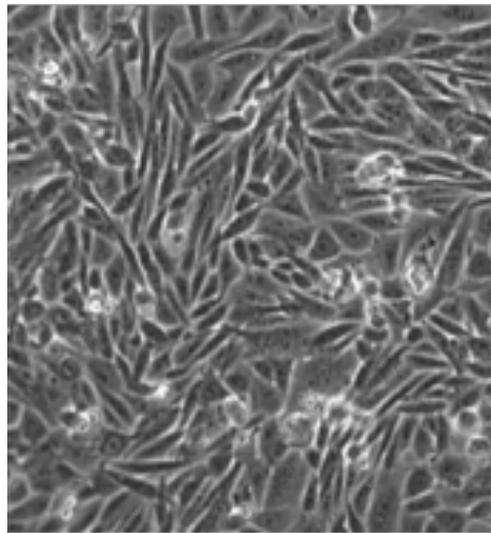
動物細胞培養技術の発展



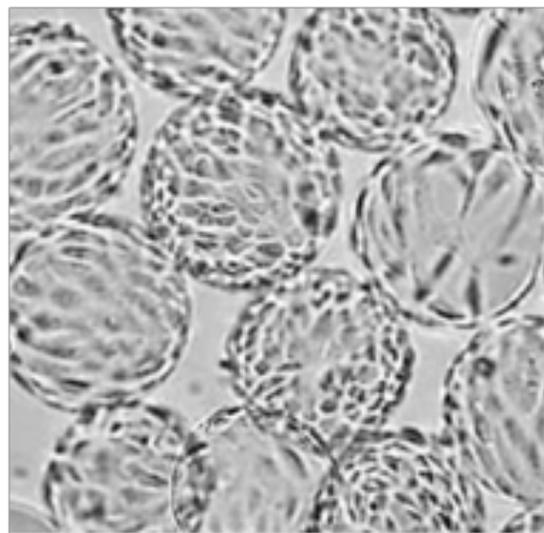
大腸菌



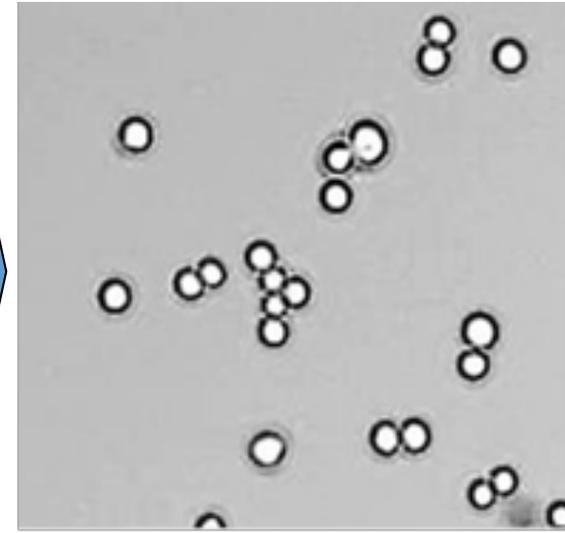
酵母



付着依存性動物細胞
(固定表面培養)

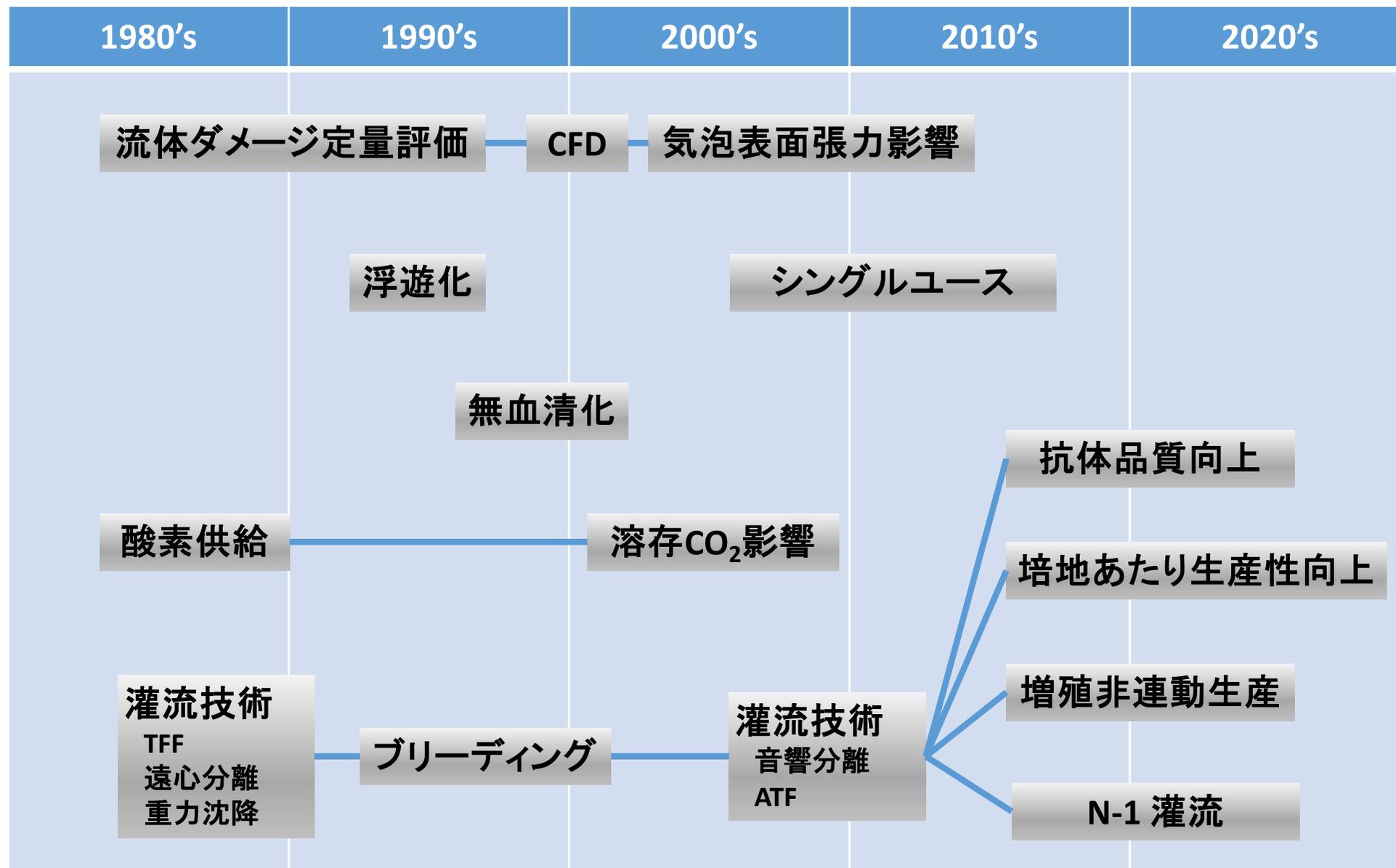


付着依存性動物細胞
(担体表面培養)

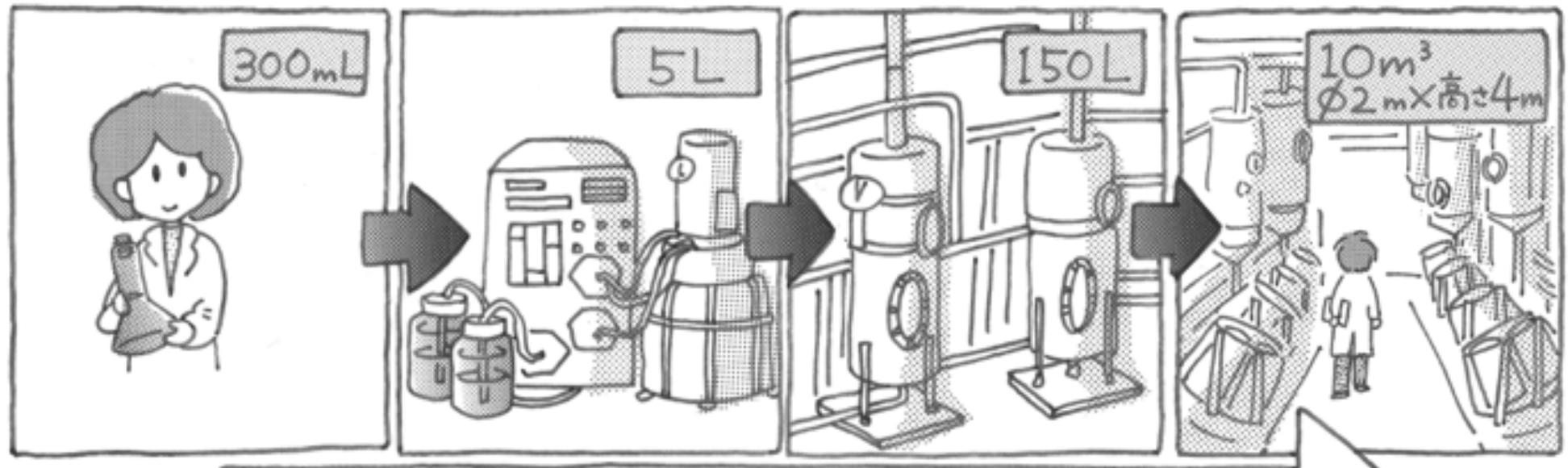


浮遊性動物細胞
(浮遊培養)

動物細胞培養技術の発展



スケールアップ



正しいスケールアップ (生産性に影響する培養環境, 大型設備に必要な構造を十分考慮)

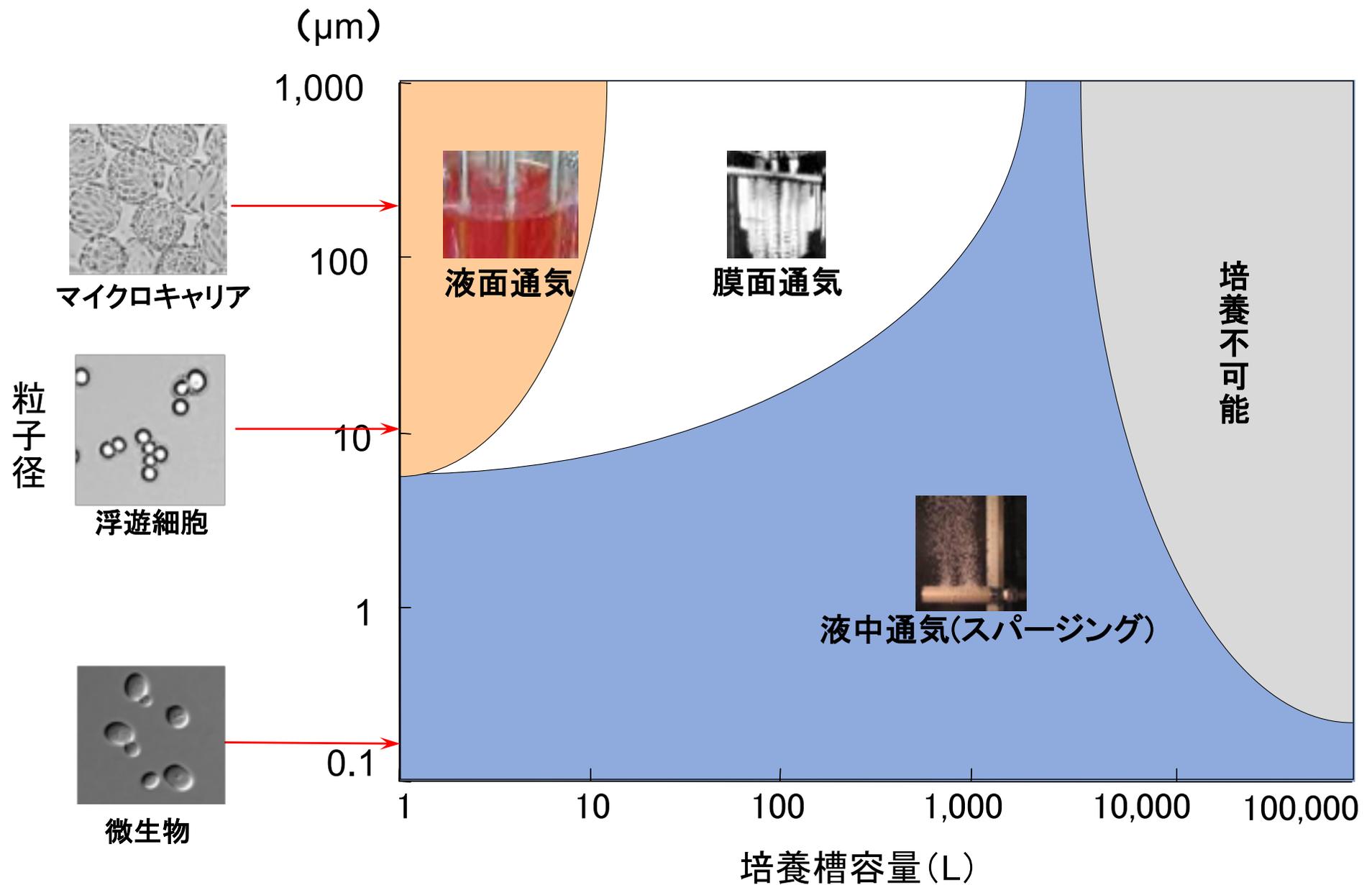
間違ったスケールアップ (実験器具のまま...)

スケールアップ

*実際にはありません

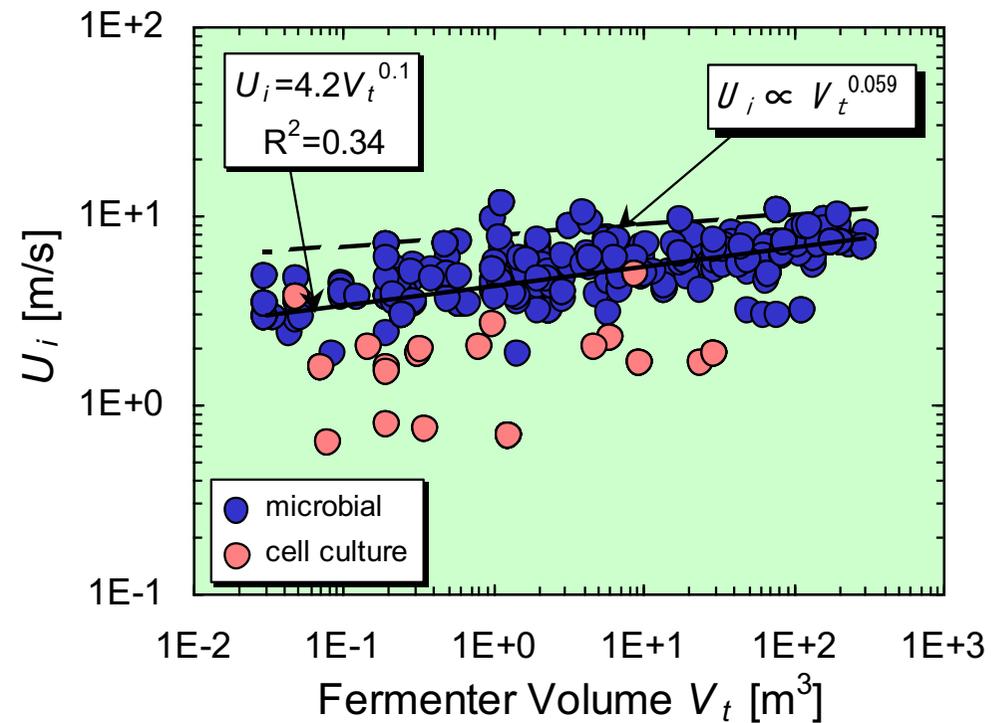
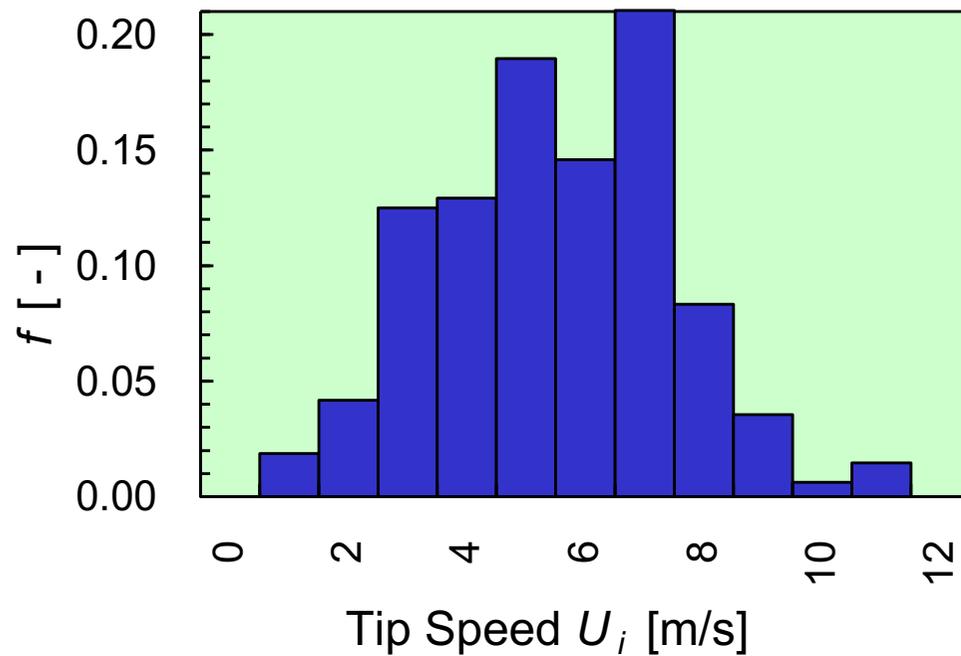
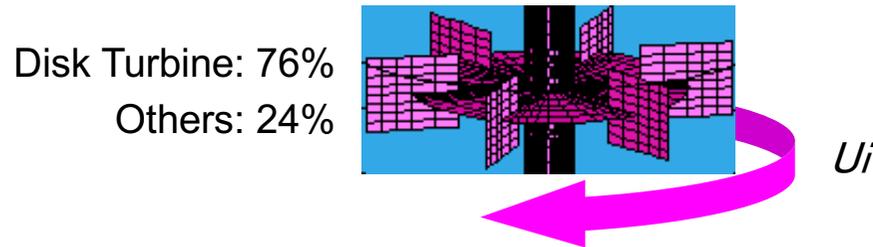
イラスト：田口あけ美

培養対象別のスケールアップ限界



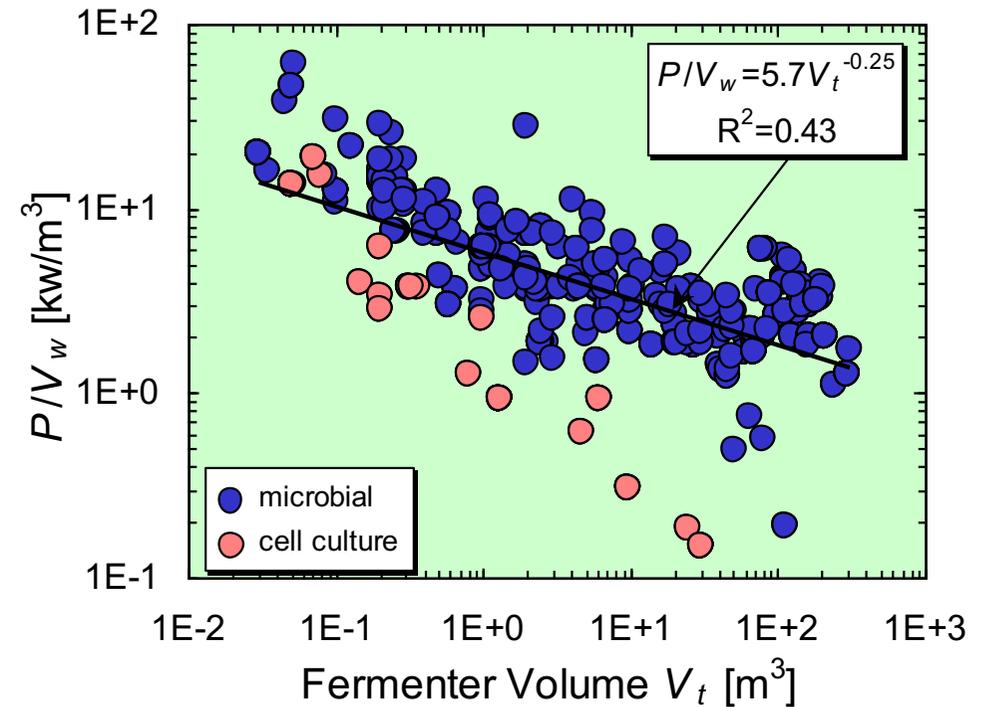
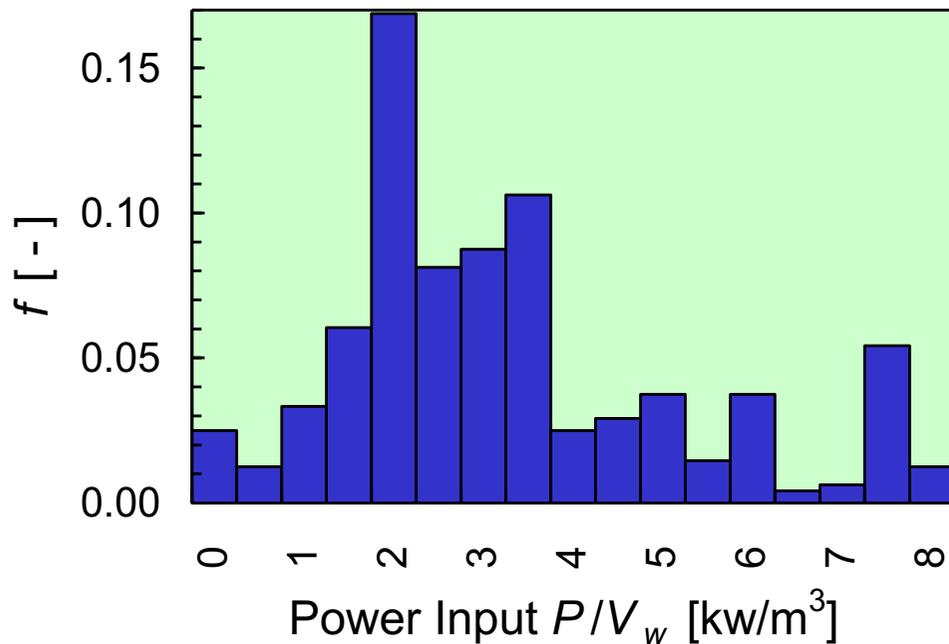
攪拌翼先端速度

剪断ダメージ防止のため、攪拌翼先端速度を増加困難



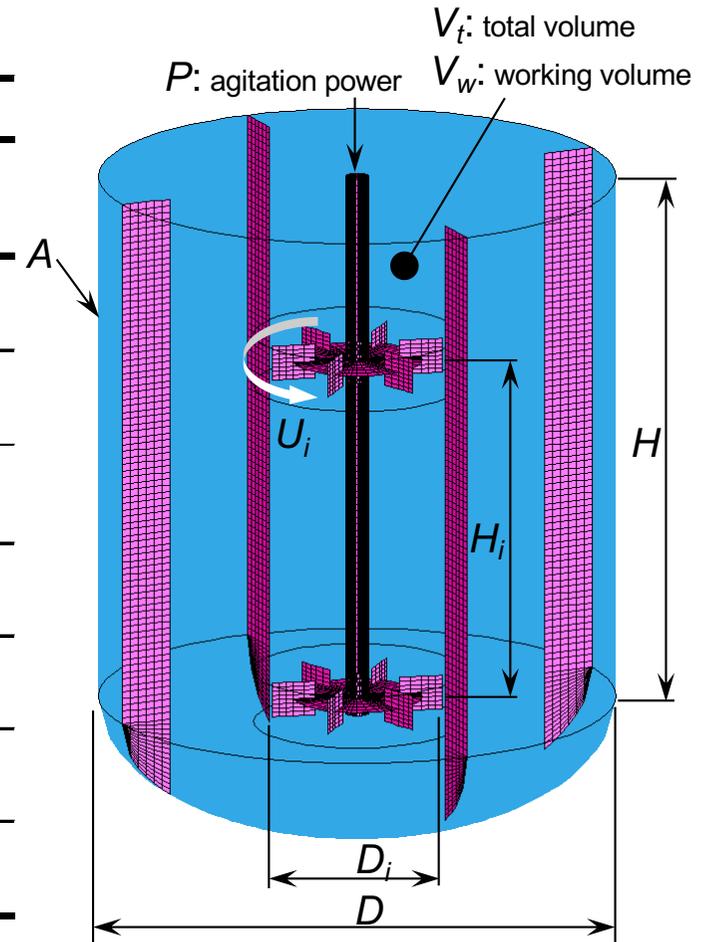
攪拌動力

攪拌翼先端速度制限(ND_i)から、スケールアップに伴い
動力($P/V \propto N^3 D_i^5 / V$)が急速に減少



培養槽製作実績値

name	symbol	cell culture	microbial culture	
		average [large scale]	average [large scale]	tank scale correlation
aspect ratio	H/D [-]	1	1.8	$\propto V_t^{0.038}$
working volume	V_w/V_t [-]	0.7		-
heat transfer area	A/V_w [m^{-1}]	5 [1 ~ 2]		$\propto V_t^{-0.32}$
agitation power	P/V_w [kw/m^3]	4 [1]	6 [2]	$\propto V_t^{-0.25}$
impeller spacing	H_i/D_i [-]	1.4		-
impeller diameter	D_i/D [-]	0.5	0.4 [0.3]	$\propto V_t^{-0.034}$
impeller tip speed	U_i [m/s]	2	5.5	$\propto V_t^{0.10}$



代表的なスケールファクター

体積あたり攪拌動力	P_g/V	$\propto N^3 D_i^5 / V$
総括物質移動容量係数	kLa	$\propto (P_g/V)^{0.4} U_s^{0.5}$
攪拌翼先端速度	U_i	$= N D_i$
液循環速度	Q_i/V	$\propto N D_i^3 / V$
混合時間	t_m	$\propto N^{-3/2} D_i^{1/6}$
レイノルズ数	N_{Re}	$\propto N D_i^2$
気泡発生、消滅ダメージ	k_{db0}	$\propto VVD$
気泡上昇ダメージ	k_{dbr}	$\propto U_s$

体積あたり攪拌動力 P_g/V

$$P_0 = \frac{N_p \rho N^3 D_i^5}{g_c} \propto N^3 D_i^5 \quad \text{at } N_{Re} > 10^4$$

P_0 : nongassed power

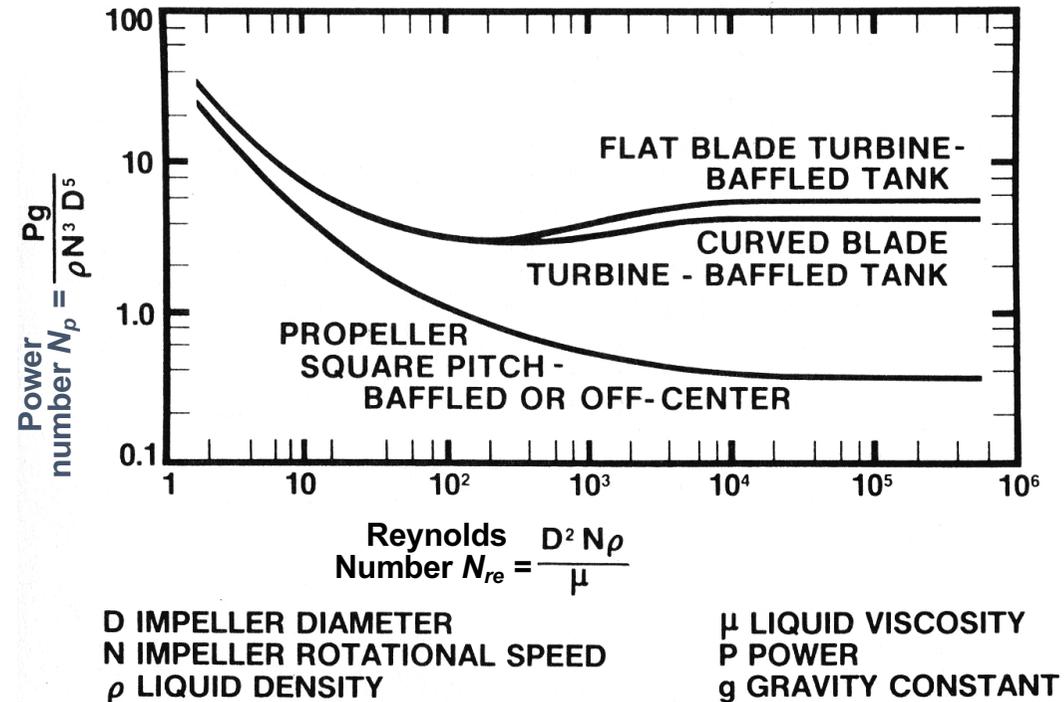
N_p : power number

ρ : fluid density

N : impeller rotation speed

D_i : impeller diameter

g_c : gravitational conversion constant



総括物質移動容量係数 kLa

$$OTR = k_L a (C^* - C_L)$$

$$k_L a = \alpha \left(\frac{P_g}{V} \right)^\beta (U_s)^\gamma$$

微生物培養槽

$$k_L a = 0.026 \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.4} (U_s)^{0.5}$$

Van't Riet, 1983

OTR : volumetric oxygen transfer rate

k_L : liquid phase mass transfer coefficient

a : interfacial area per reactor volume

C^* : equilibrium dissolved oxygen conc.

C_L : dissolved oxygen concentration

P_g : gassed power

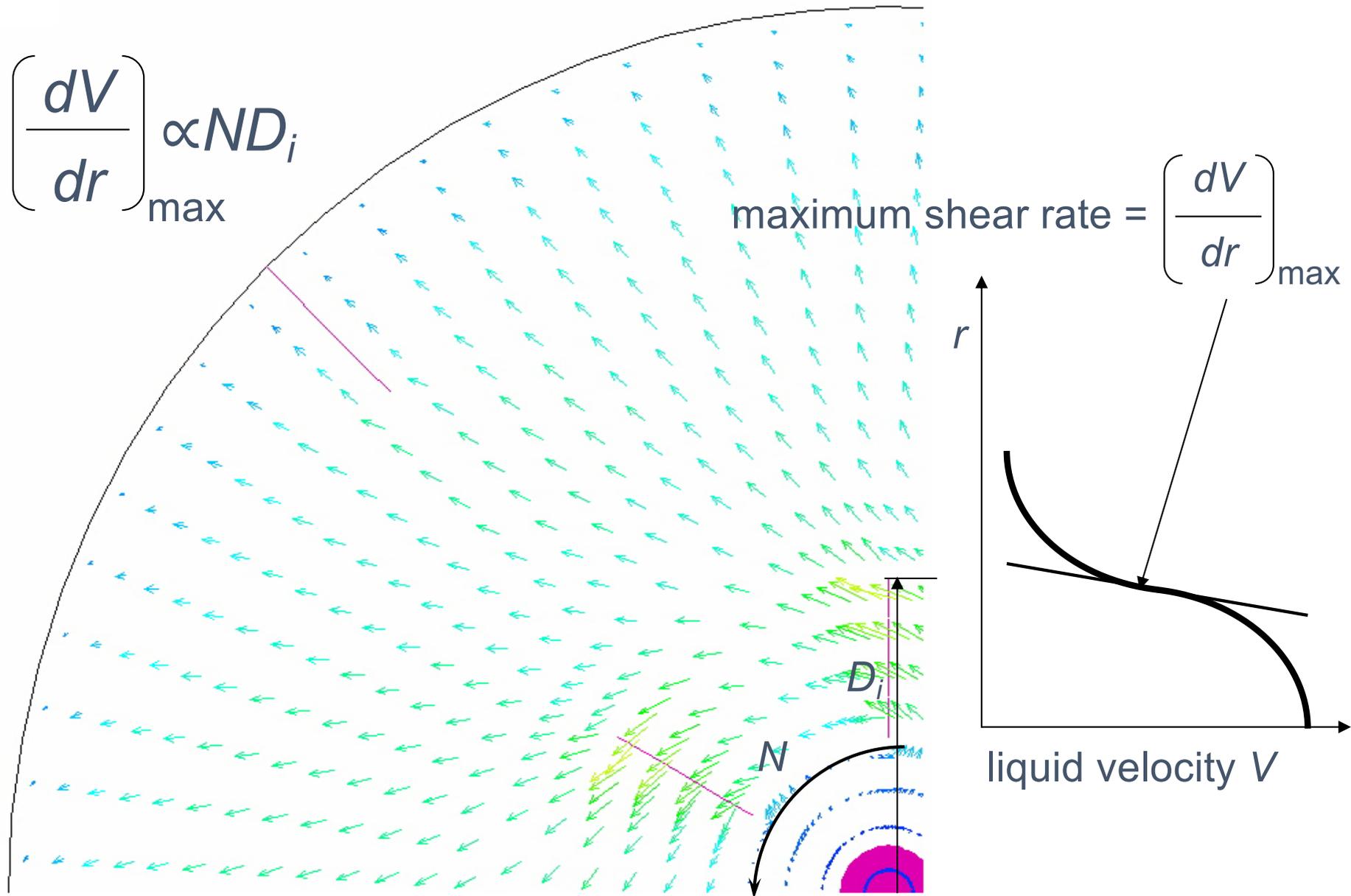
V : reactor volume

U_s : gas superficial velocity

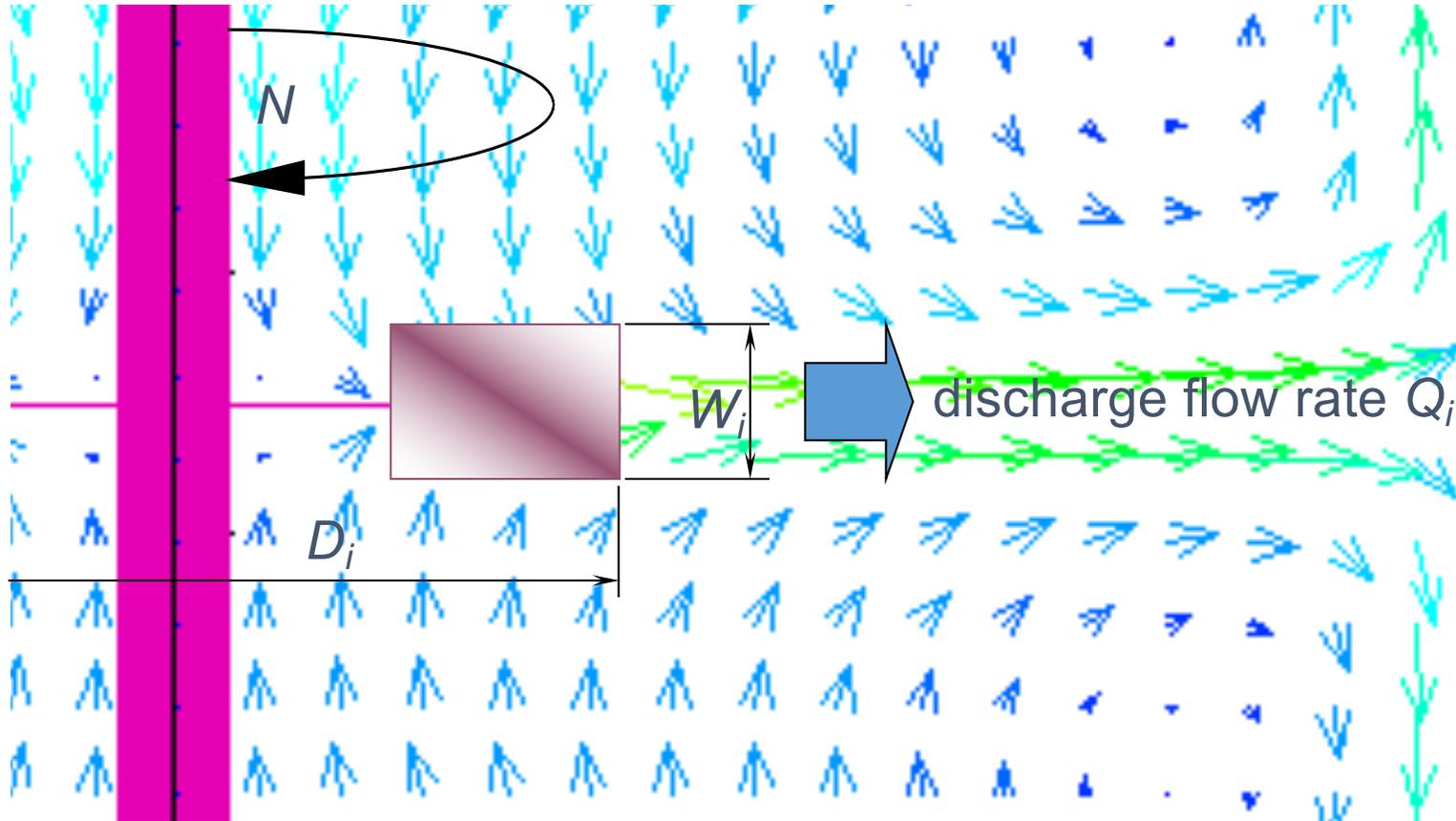
α : proportionality constant

β, γ : exponent constants

攪拌翼先端速度 U_i



液循環速度 Q_i/V



$$Q_i = W_i(\pi D_i)^2 N \propto N D_i^3$$

$$Q_i/V \propto N D_i^3/V$$

培養スケールアップの課題

- 全ての指標を同一としたスケールアップは不可能
- 小スケールでどれだけ裕度を持たせるかが重要

指標		200L	10,000L									
攪拌	体積あたり 攪拌動力	Pg/V	$\propto N^3 Di^5/V$	1.00	1.00	0.20	0.27	13.6	36.1	0.01		
	総括物質移動 容量係数	kLa	$\propto (Pg/V)^{0.4} Us^{0.5}$	1.00	1.92	1.00	1.14	5.45	8.06	0.24		
	攪拌翼先端速度	Ui	$=NDi$	1.00	1.54	0.90	1.00	3.68	5.10	0.27		
	液循環速度	Qi/V	$\propto NDi^3/V$	1.00	0.42	0.24	0.27	1.00	1.39	0.07		
	混合時間	tm	$\propto N^{-3/2} Di^{1/6}$	1.00	2.22	3.19	2.96	1.24	1.00	7.07		
	レイノルズ数	N_{Re}	$\propto NDi^2$	1.00	5.69	3.30	3.68	13.6	18.8	1.00		
通気	気泡発生、消滅 ダメージ	k_{db0}	$\propto VVD$	1.00							1.00	0.27
	気泡上昇ダメージ	k_{dbr}	$\propto Us$	1.00							3.68	1.00

Pg : 通気攪拌動力
 V : 培養容積
 N : 攪拌回転数

Di : 攪拌翼径
 kLa : 総括物質移動容量係数
 Us : 通気空塔速度

Ui : 攪拌翼先端速度
 Qi : 攪拌翼吐出量
 tm : 混合時間

N_{re} : レイノルズ数
 K_{db0} : 気泡発生、消滅ダメージ
 K_{dbr} : 気泡上昇ダメージ

スケールアップウィンドー(デザインスペース)

- スケールアップウィンドーによる異なるスケール間の同一性評価

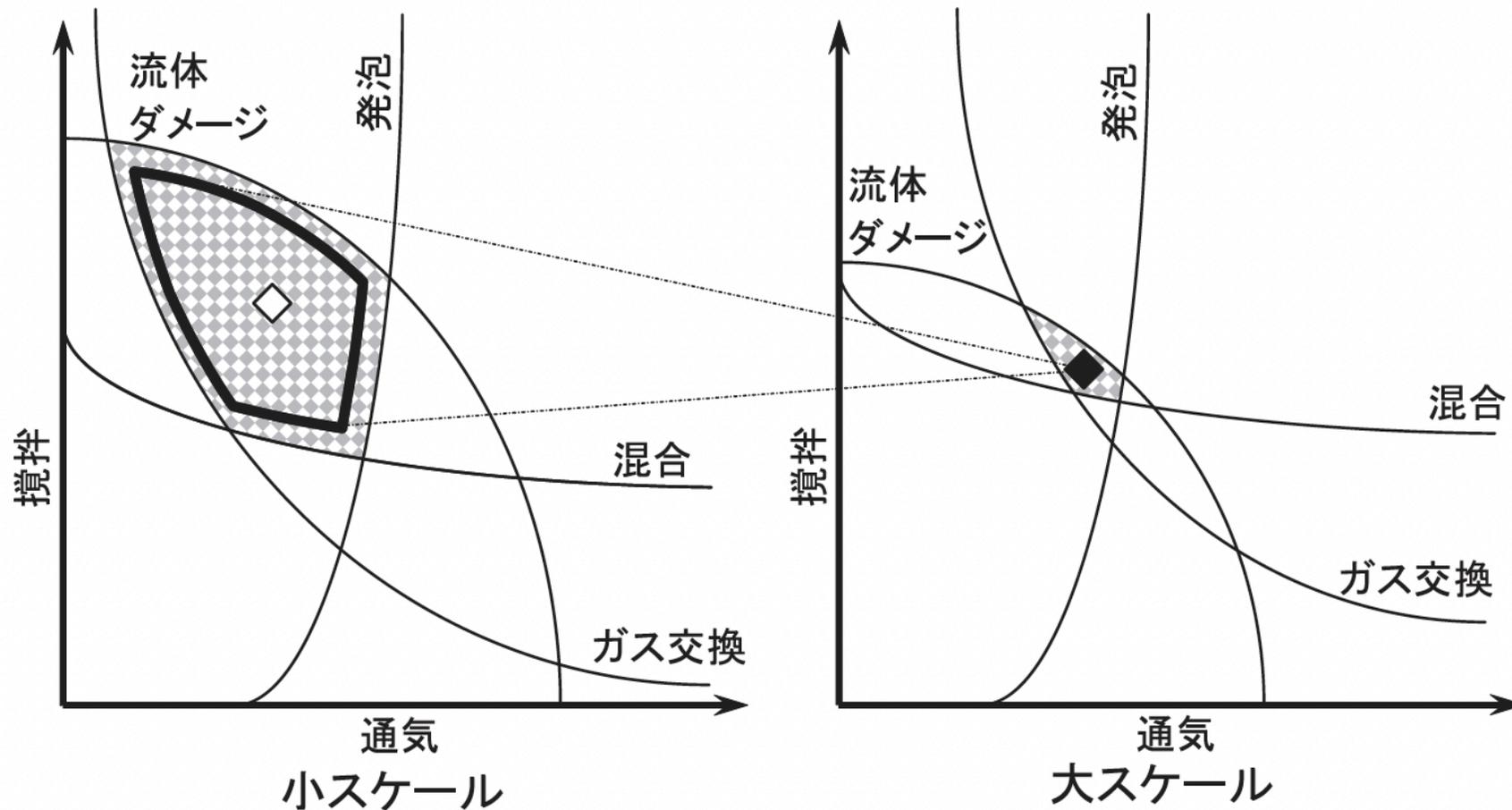


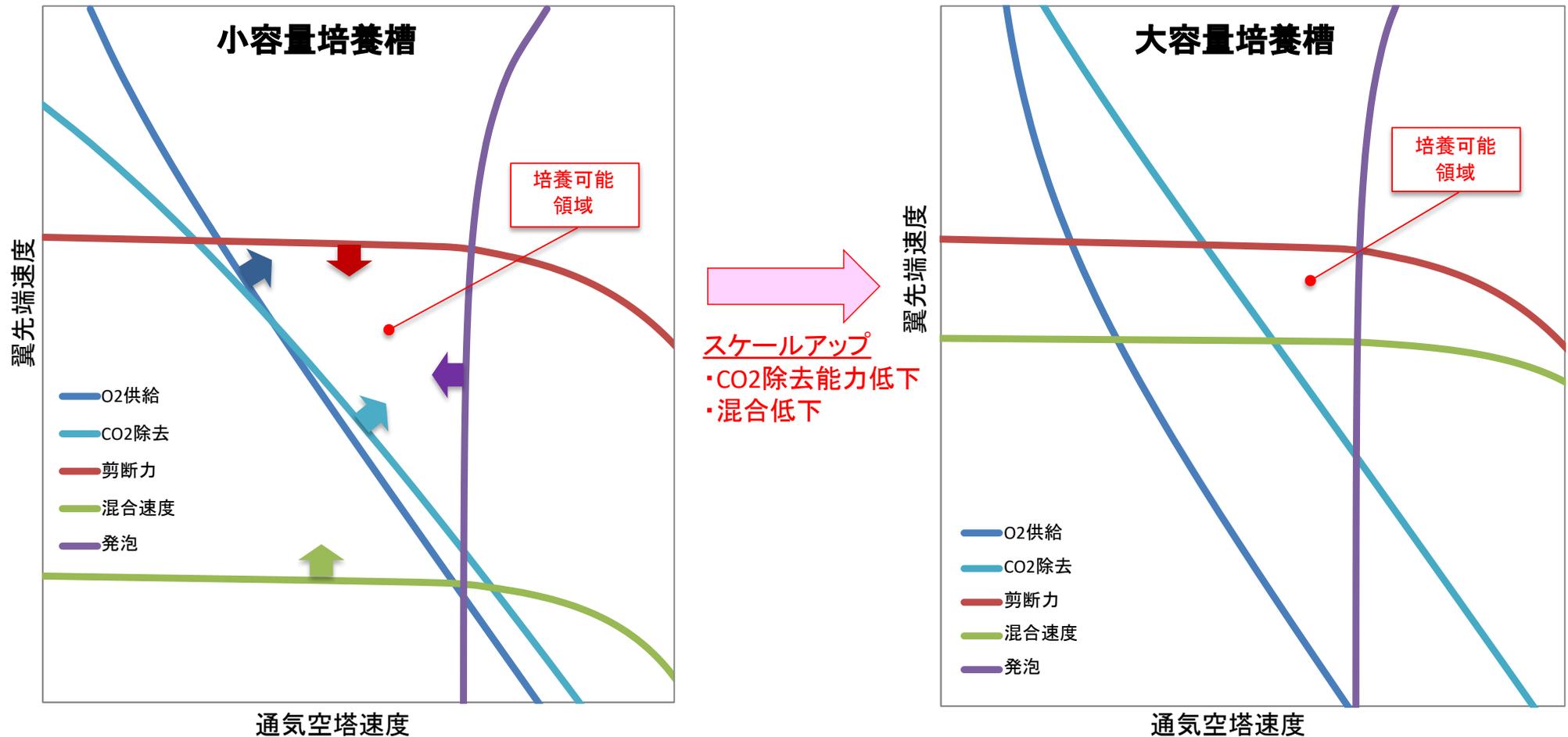
図6. スケールアップウィンドー. , 培養可能領域; , 小スケールでの最適運転条件; , 大スケールでの最適運転条件.

動物細胞培養のスケールアップはもう必要無いのか？

- ✓ 既に大容量までスケールアップ済み
- ✓ 生産効率向上により小スケールで十分
- ✓ 連続培養により小型培養槽で生産可能

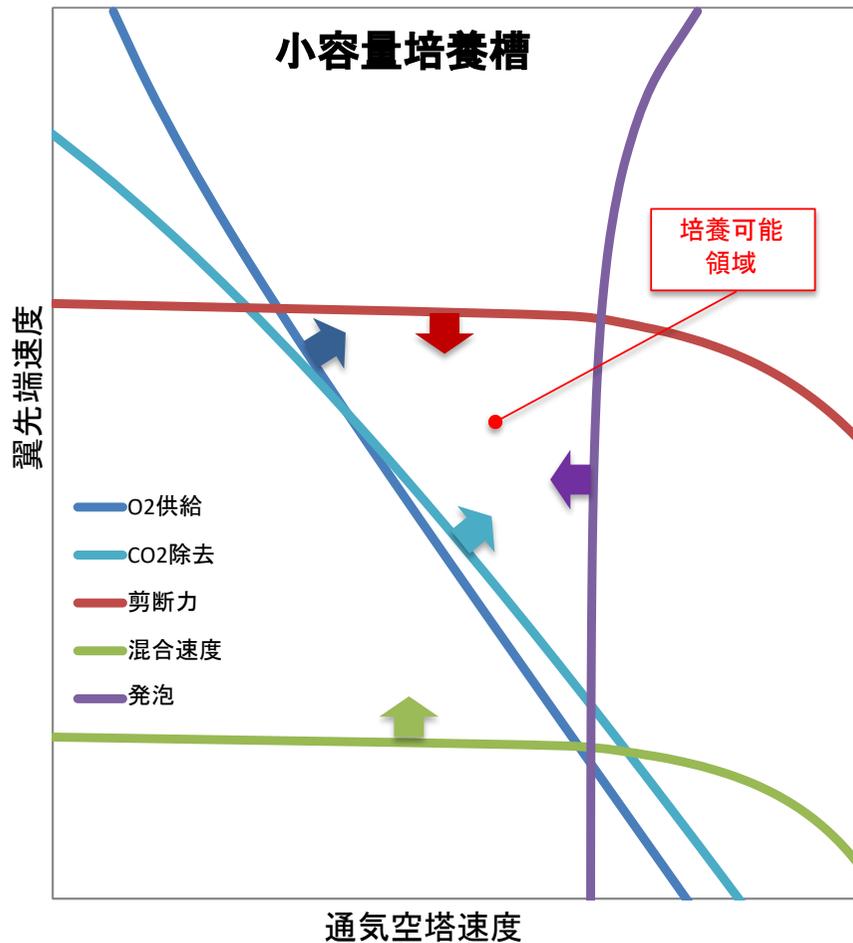
スケールアップにおけるデザインスペースの変化

- スケールアップによりCO2除去悪化、槽内混合低下、デザインスペース縮小

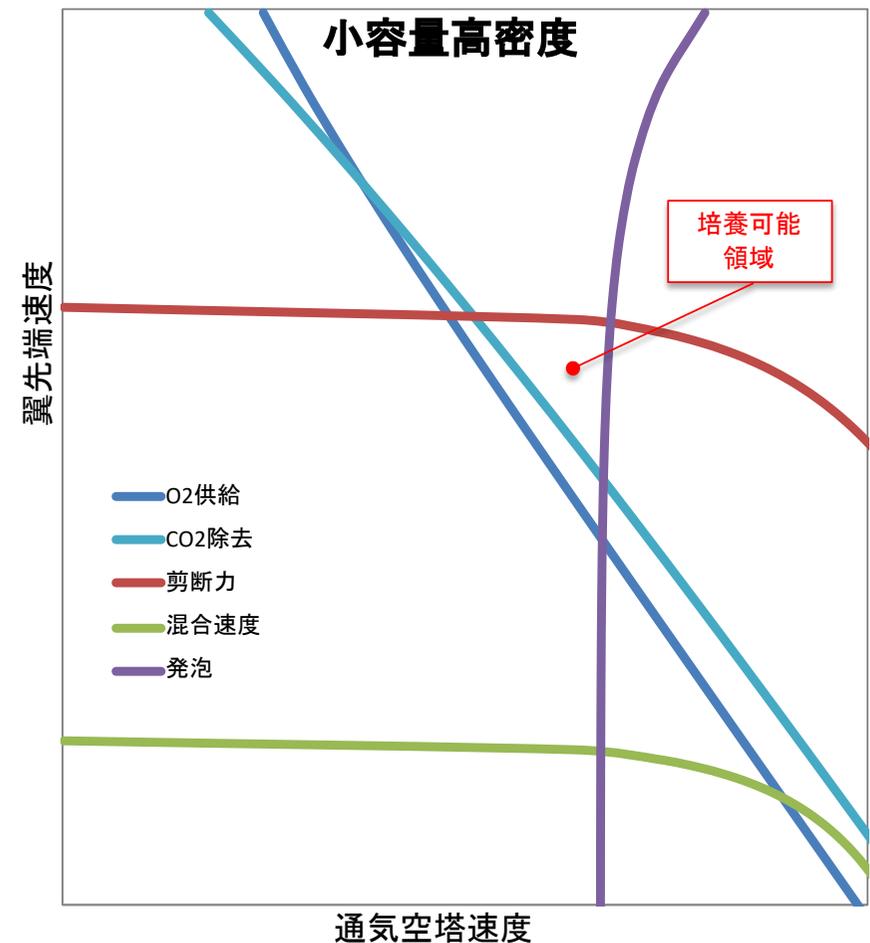


細胞高密度化におけるデザインスペースの変化

- 細胞高密度化によりO₂供給、CO₂除去低下、デザインスペース縮小

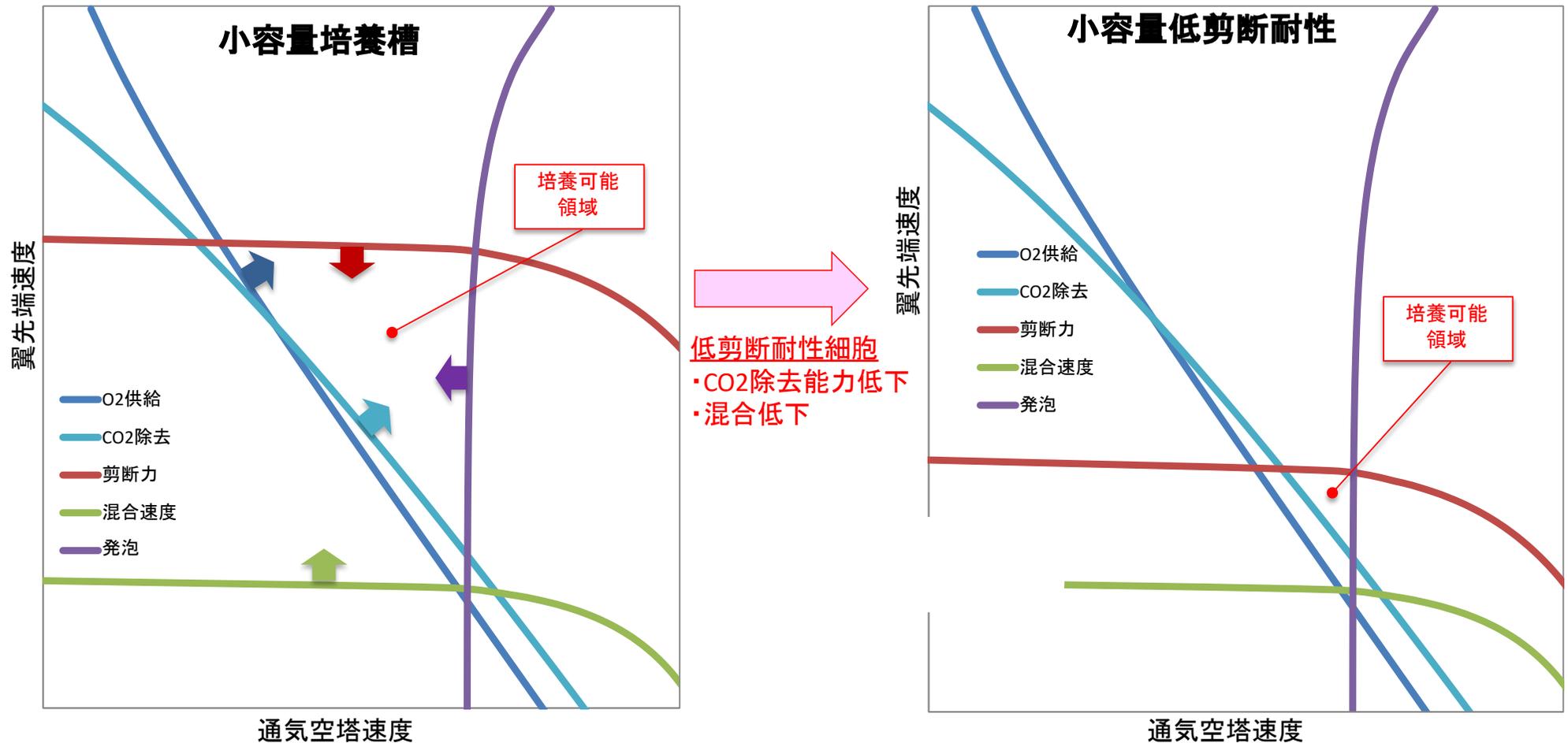


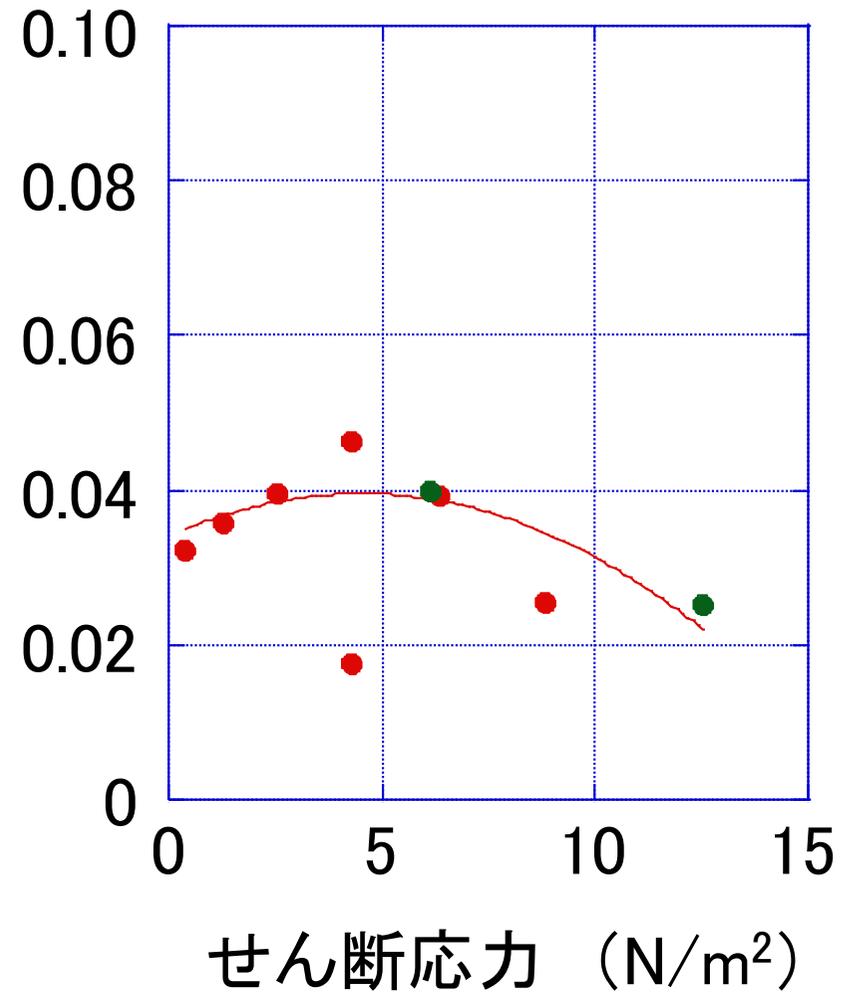
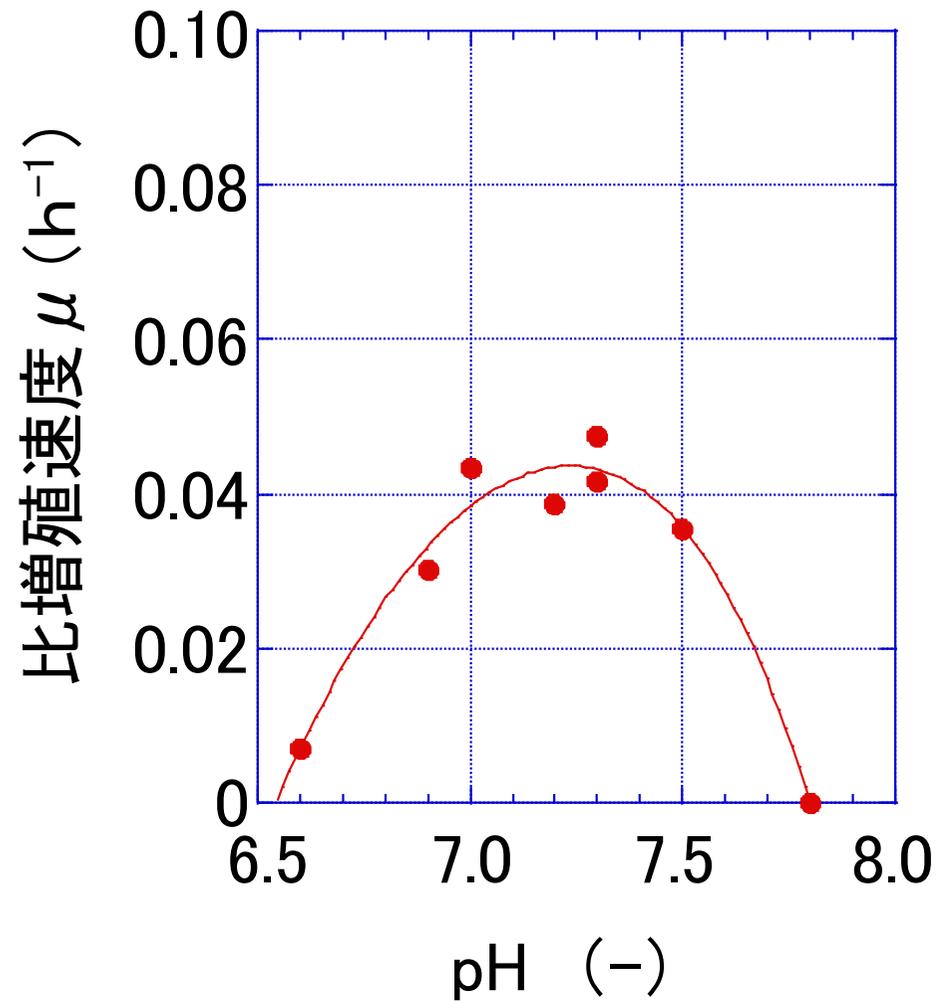
細胞高密度化
・O₂供給、
CO₂除去低下



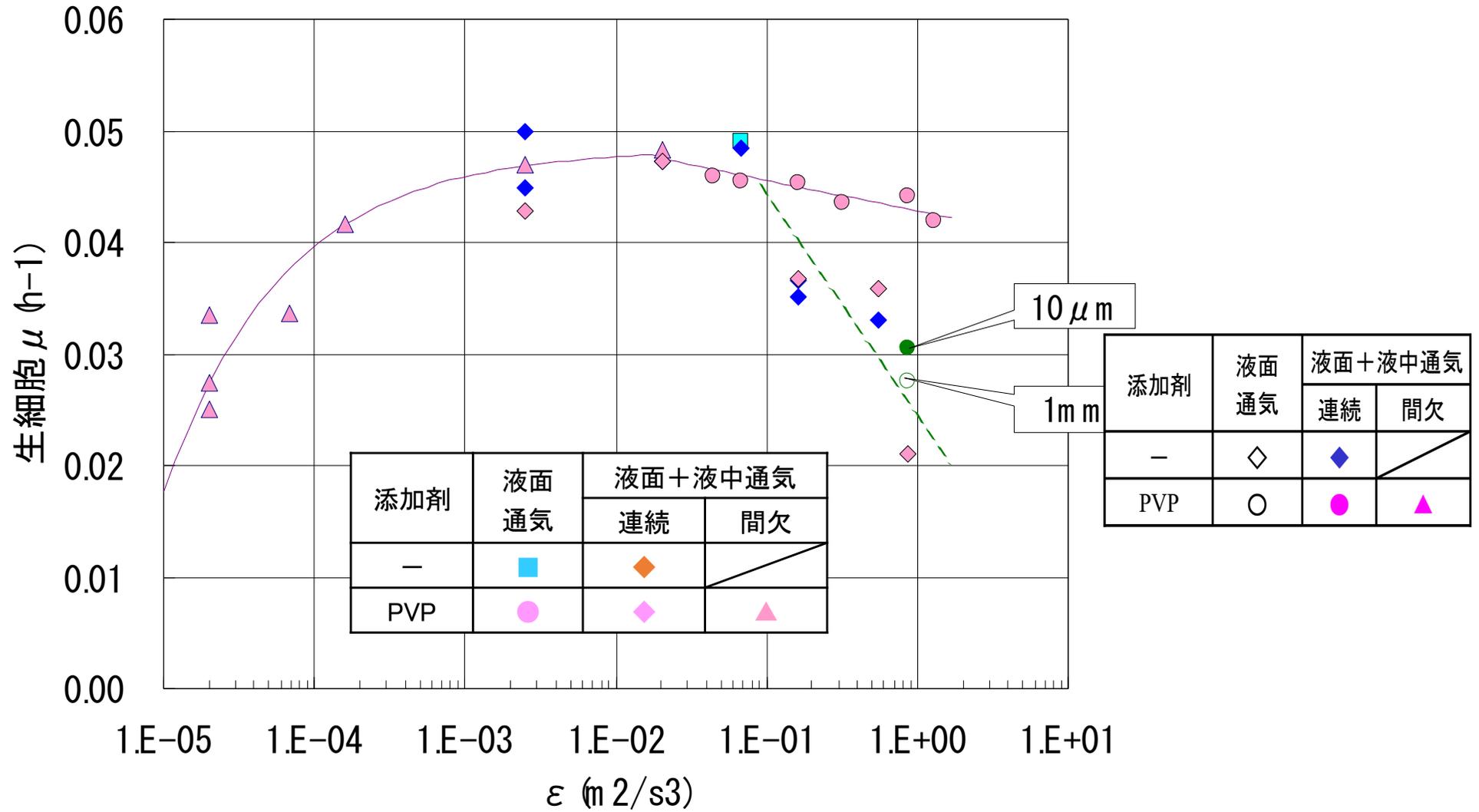
低剪断耐性細胞におけるデザインスペースの変化

- 低剪断耐性細胞によりCO₂除去悪化、槽内混合低下、デザインスペース縮小

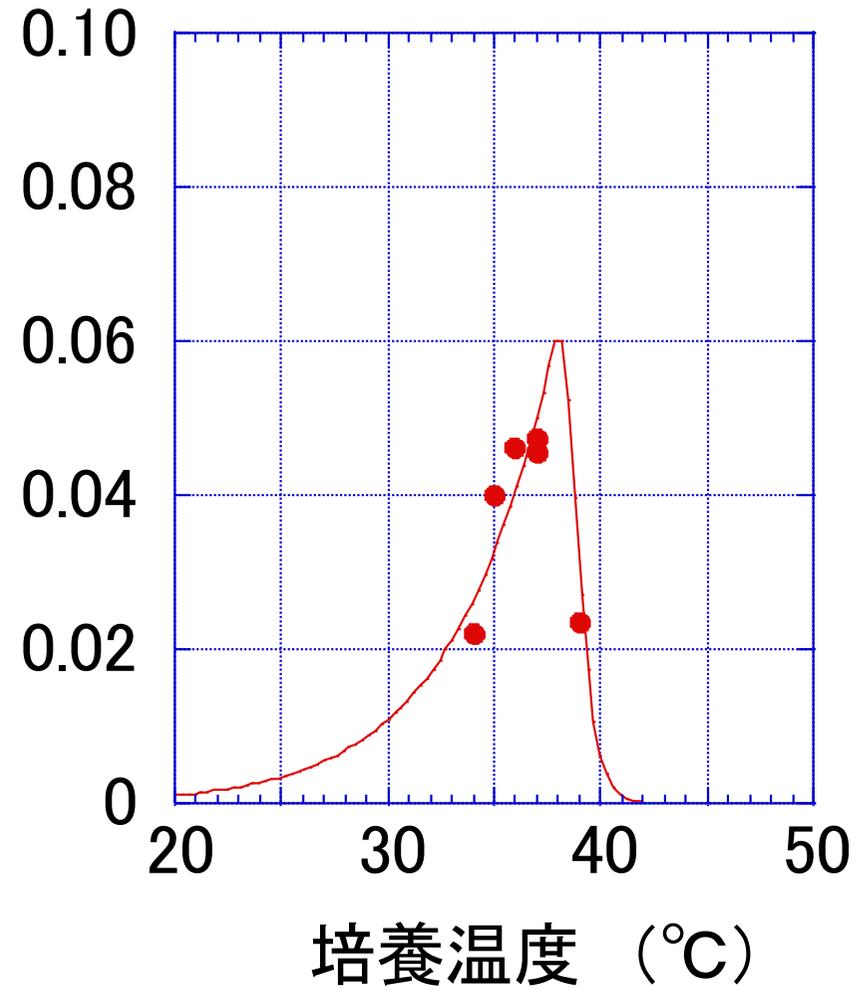
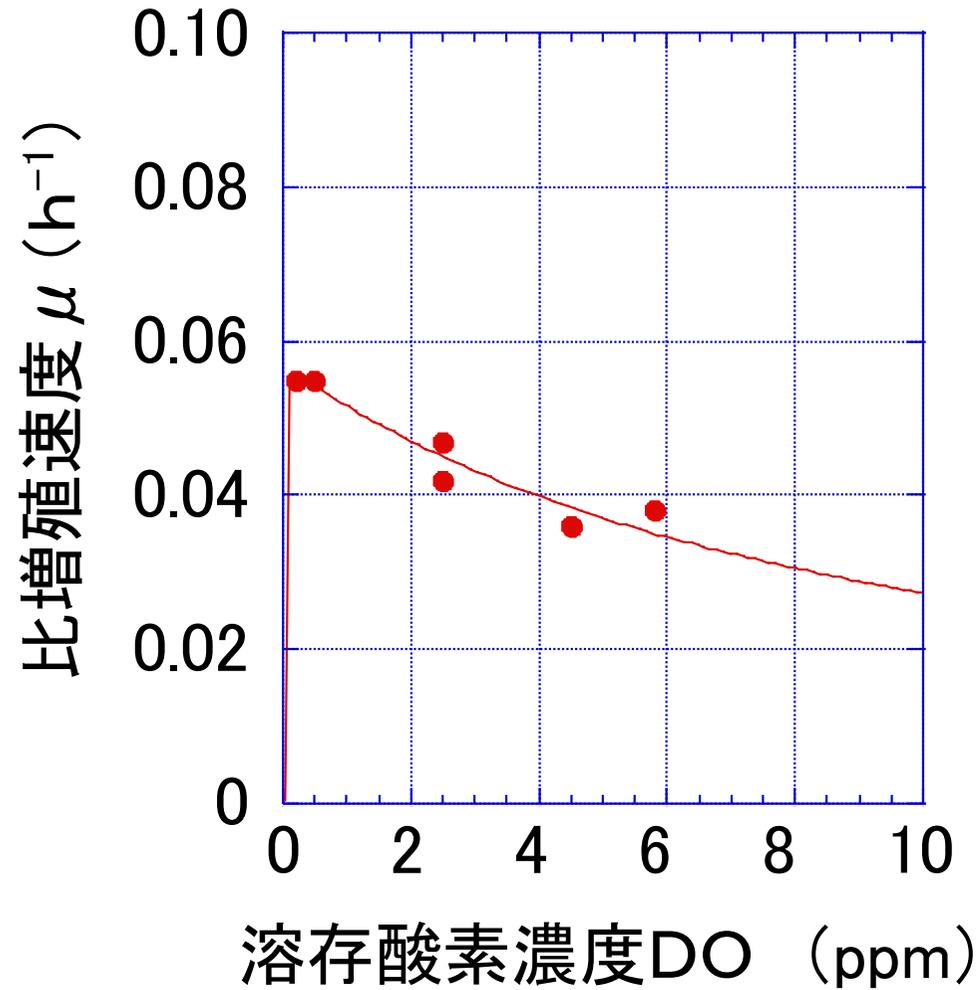




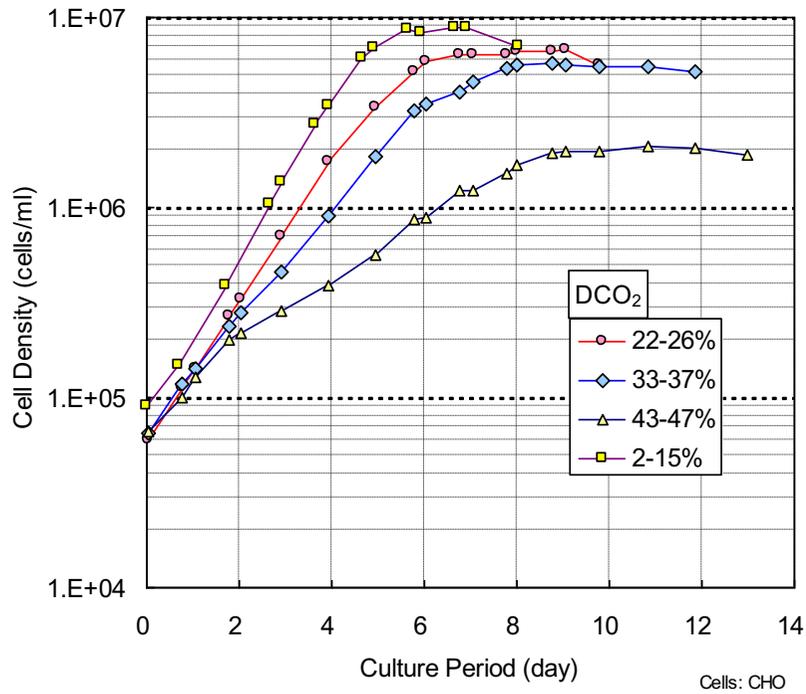
デザインスペース作成に必要なパラメータ
攪拌動力と細胞増殖率



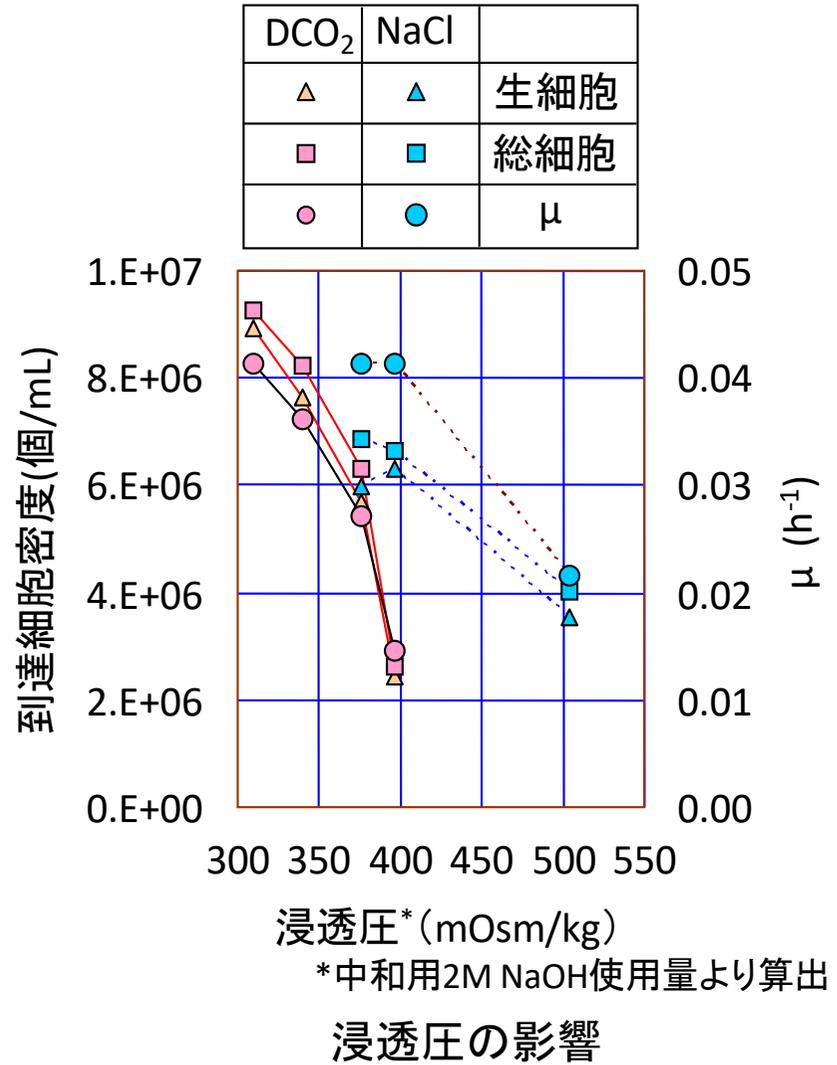
溶存酸素、培養温度の培養影響



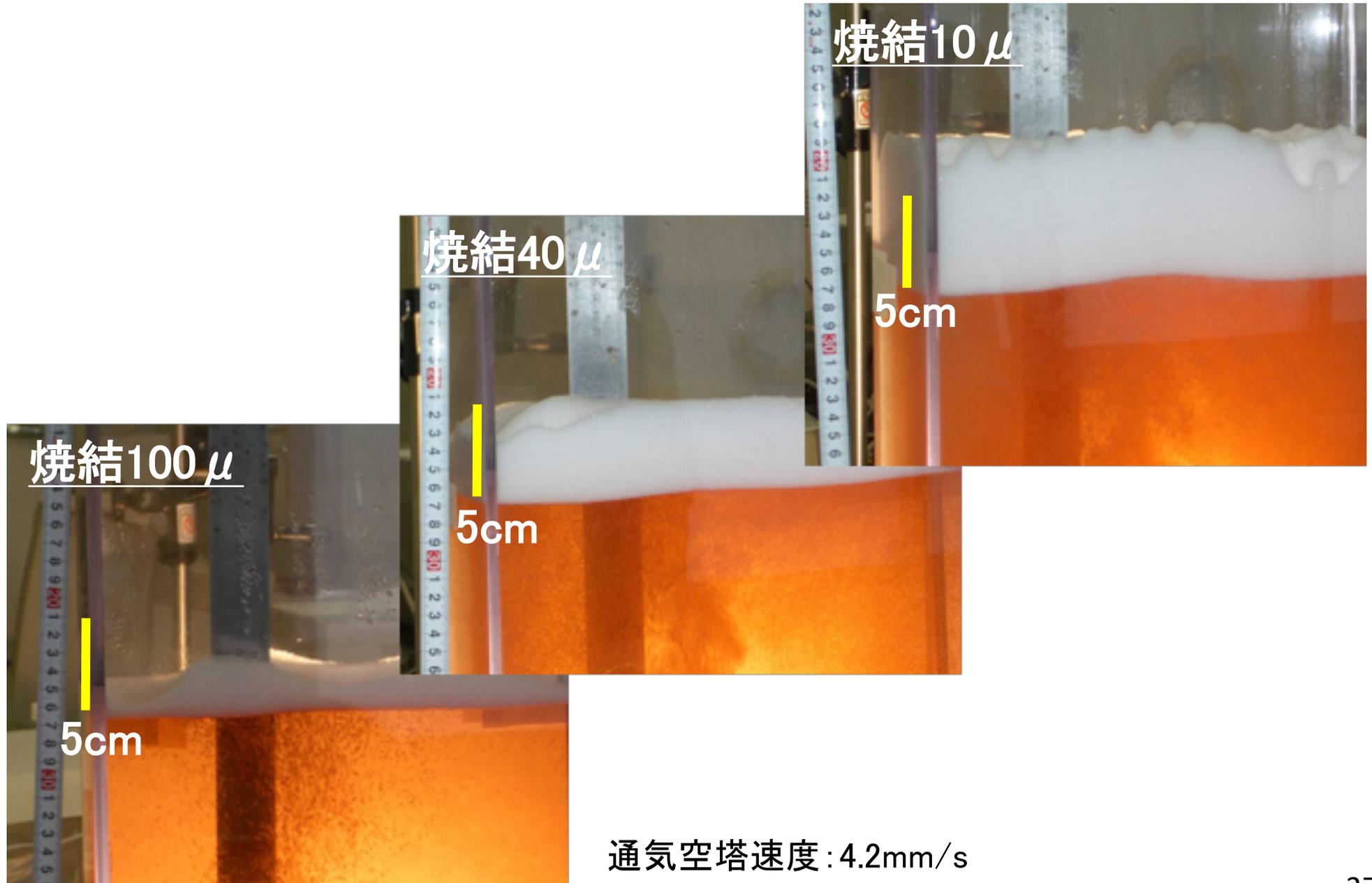
DCO₂ の細胞増殖への影響



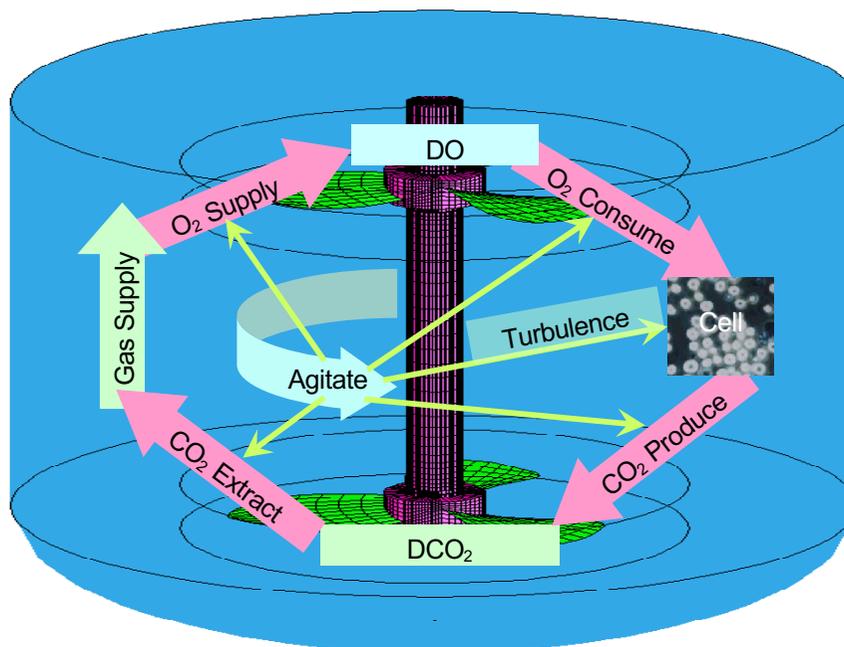
各DCO₂における細胞増殖



液中通気による液面泡沫層の発生



化学工学的計算式と数値解析(CFD)

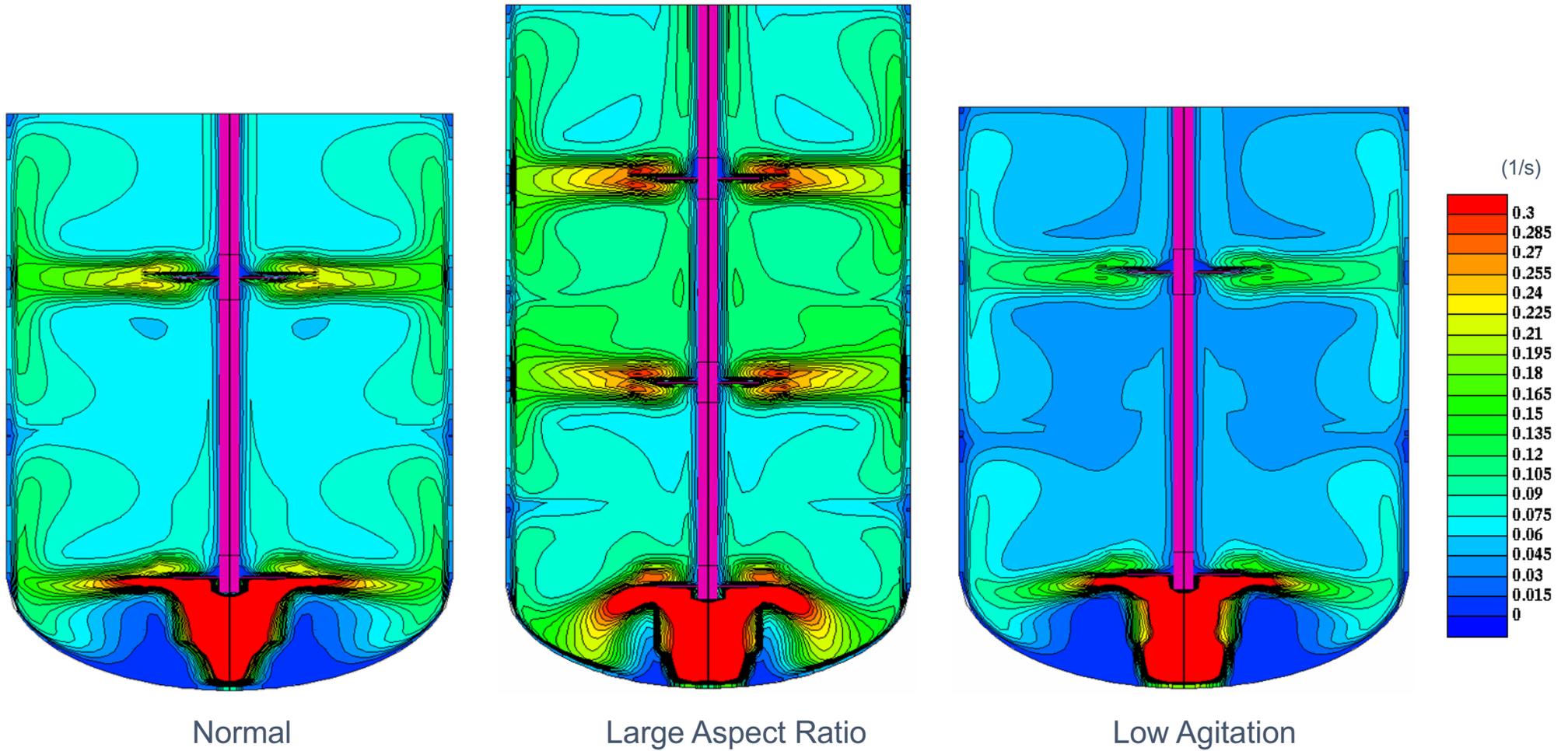


デザインスペース描画

培養槽構造詳細評価

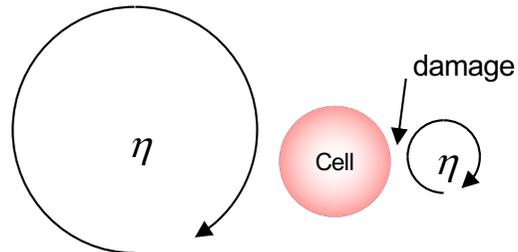
Characteristics	Empirical Equations		Elemental Parameters		Overall Evaluation	
Agitation Power	Pg/V	$\propto \frac{n^3 Di^5}{V}$	Turbulent Energy Dissipation Rate	$\rho\varepsilon$	Total Turbulent Energy Dissipation Rate	$\frac{1}{V} \iiint (\rho\varepsilon) dx dy dz$
Mass Transfer	$k_L a$	$\propto \left(\frac{Pg}{V}\right)^{0.4} Us^{0.5}$	Local $k_L a$	$(\alpha/Db)f(Sc, \nu, k, \varepsilon)$	Total $k_L a$	$\frac{1}{V} \iiint (k_L a) dx dy dz$
Hydrodynamic Intensity	$(dU/dz)_{max}$	$\propto nDi$	Kolmogoroff Eddy Length Scale	$(\nu^3/\varepsilon)^{1/4}$	Minimum Eddy Length Scale	$\left(\left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{1/4}\right)_{min}$
Homogeneity	Qi/V	$\propto \frac{n Di^3}{V}$	Local Concentration	C	Standard Deviation of Concentration	$\sqrt{\frac{1}{V} \iiint (C - \bar{C})^2 dx dy dz}$

CFDによる総括物質移動容量係数(kLa)の計算

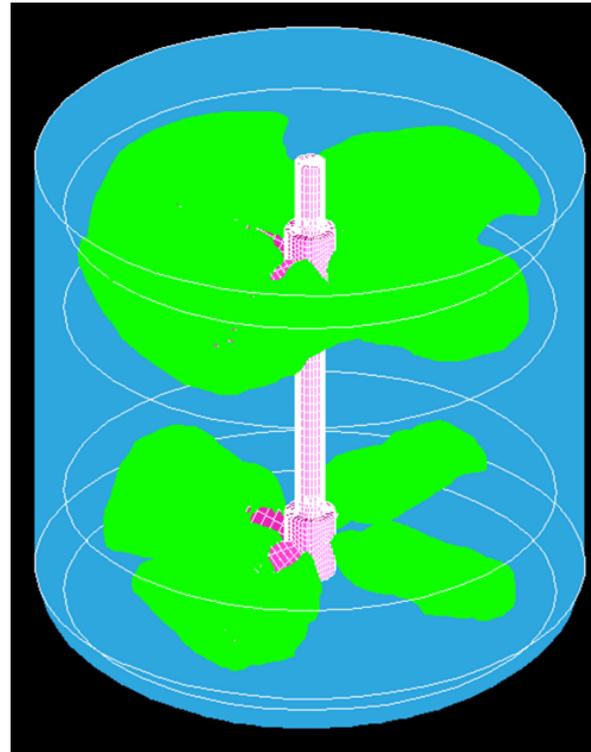
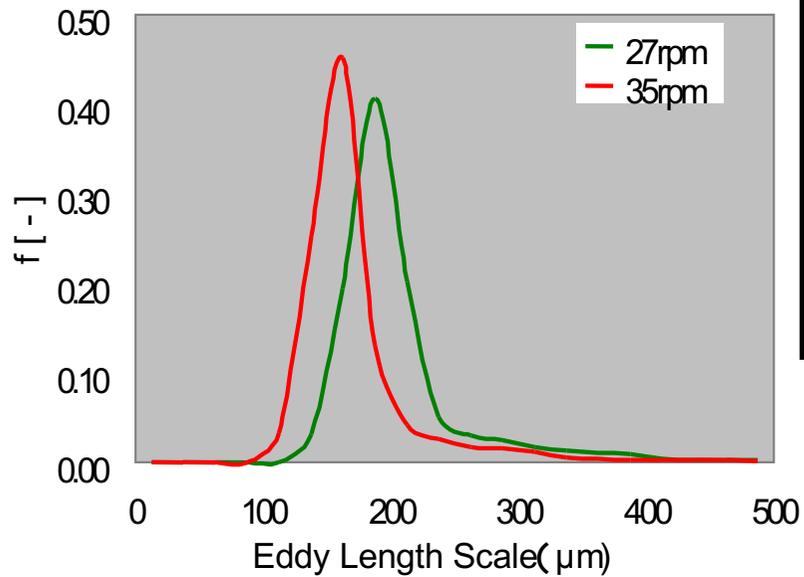


CFDによる流体力学的損傷の評価

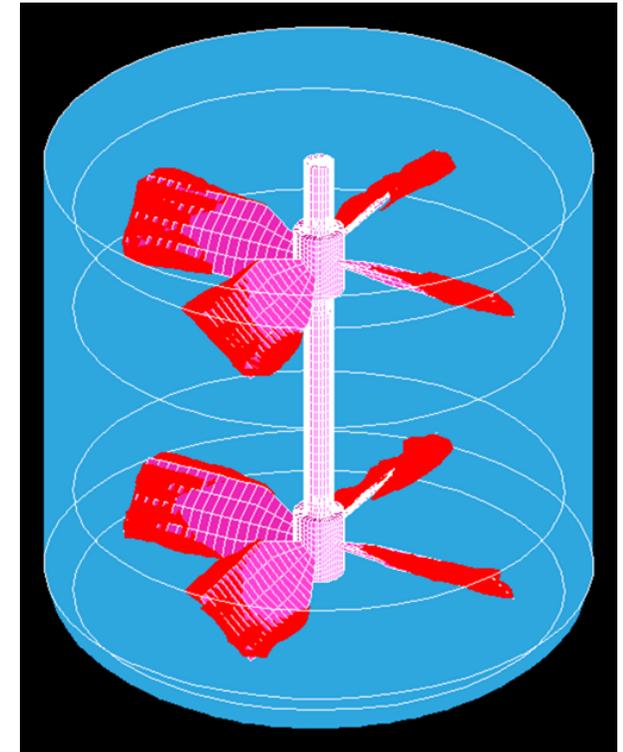
乱流エネルギー、渦長さから細胞ダメージを評価



ε : 乱流運動エネルギー散逸率
 ρ : 密度
 η : コルモゴロフスケール ($= \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{\frac{1}{4}}$)



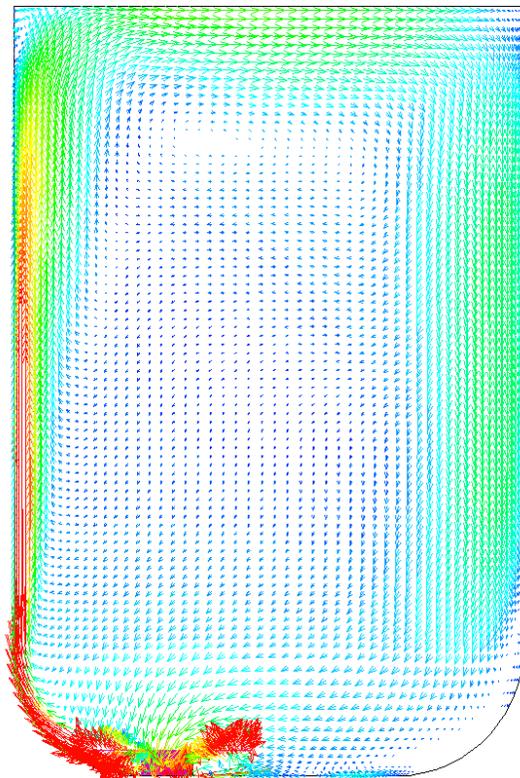
$\varepsilon > 0.01 \text{ m}^2/\text{s}^3$
 $\rho\varepsilon > 10 \text{ W}/\text{m}^3$
 $\eta = 100 \mu\text{m}$



$\varepsilon > 0.1 \text{ m}^2/\text{s}^3$
 $\rho\varepsilon > 100 \text{ W}/\text{m}^3$
 $\eta = 56 \mu\text{m}$

培養槽形式の同等性検討

シングルユース培養槽

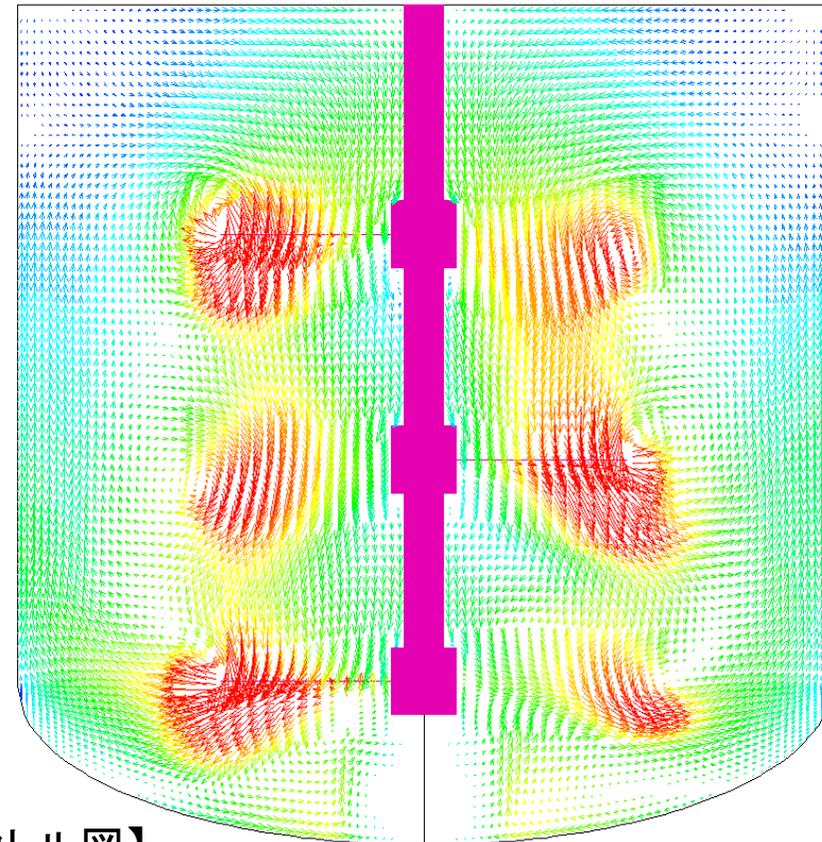


Y = 0.000000
Max = 4.83998
Min = 0

1
0.952381
0.904762
0.857143
0.809524
0.761905
0.714286
0.666667
0.619048
0.571429
0.52381
0.47619
0.428571
0.380952
0.333333
0.285714
0.238095
0.190476
0.142857
0.0952381
0.047619
0



ステンレス製培養槽



Y = 0.000000
Max = 1.0388
Min = 0

0.5
0.47619
0.452381
0.428571
0.404762
0.380952
0.357143
0.333333
0.309524
0.285714
0.261905
0.238095
0.214286
0.190476
0.166667
0.142857
0.119048
0.0952381
0.0714286
0.047619
0.0238095
0

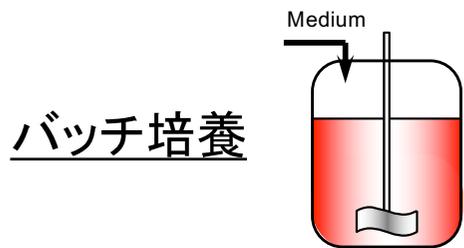


【速度ベクトル図】

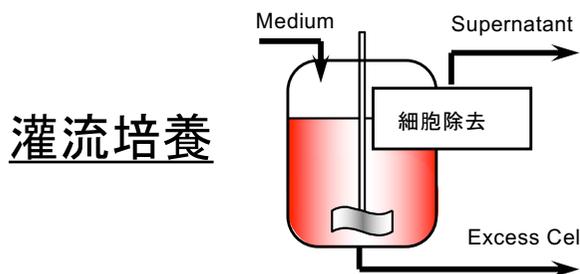
スケールアップとPMI (プロセス質量強度) 低減

① 培養スケールあたり生産性 = 細胞密度 × 細胞あたりタンパク生産量 ∙ ∙ 【設備投資】

② PMI = $\frac{\text{使用した材料の全質量}}{\text{製品の質量}} = \frac{\text{培地消費量} + \text{培地損失}}{\text{タンパク生産量}} \dots \dots$ 【環境負荷、運転コスト】



$$PMI = \frac{C_s \int_0^{t_c} X dt / t_c + Bc S_e / t_c}{Y_p \int_0^{t_c} X dt / t_c} = \frac{C_s / \bar{X} + \frac{Bc S_e}{\int_0^{t_c} X dt}}{Y_p / \bar{X}} \cong \frac{Y_p C_s / \bar{X} + \frac{\mu S_e}{X_e}}{Y_p / \bar{X}}$$

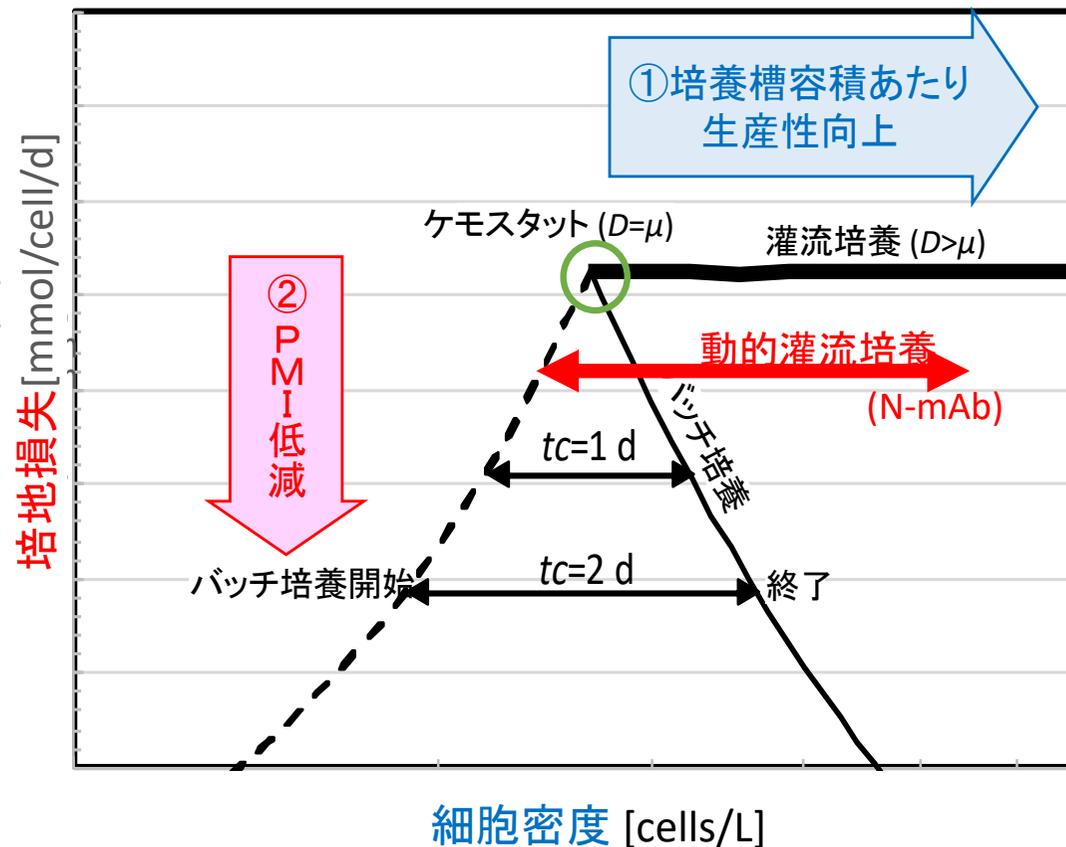


$$PMI = \frac{C_s X_p + D S_p}{Y_p X_p C_s / \bar{X}} = \frac{C_s}{Y_p / \bar{X}} + \frac{D S_p}{X_p}$$

Bc : 培養液交換率 [-]
 $C_{s/X}$: 培地比消費速度 [mmol/cells/d]
 D : 灌流率 (Bleeding含む) [d⁻¹]
 S_e : 各回培養終了時の培地成分濃度 [mmol/L]

S_p : 培養槽内培地成分濃度 [mmol/L]
 t_c : 繰返し周期 [d]
 X_0 : 開始時生細胞密度 [cells/L]
 X_e : 終了時生細胞密度 [cells/L]

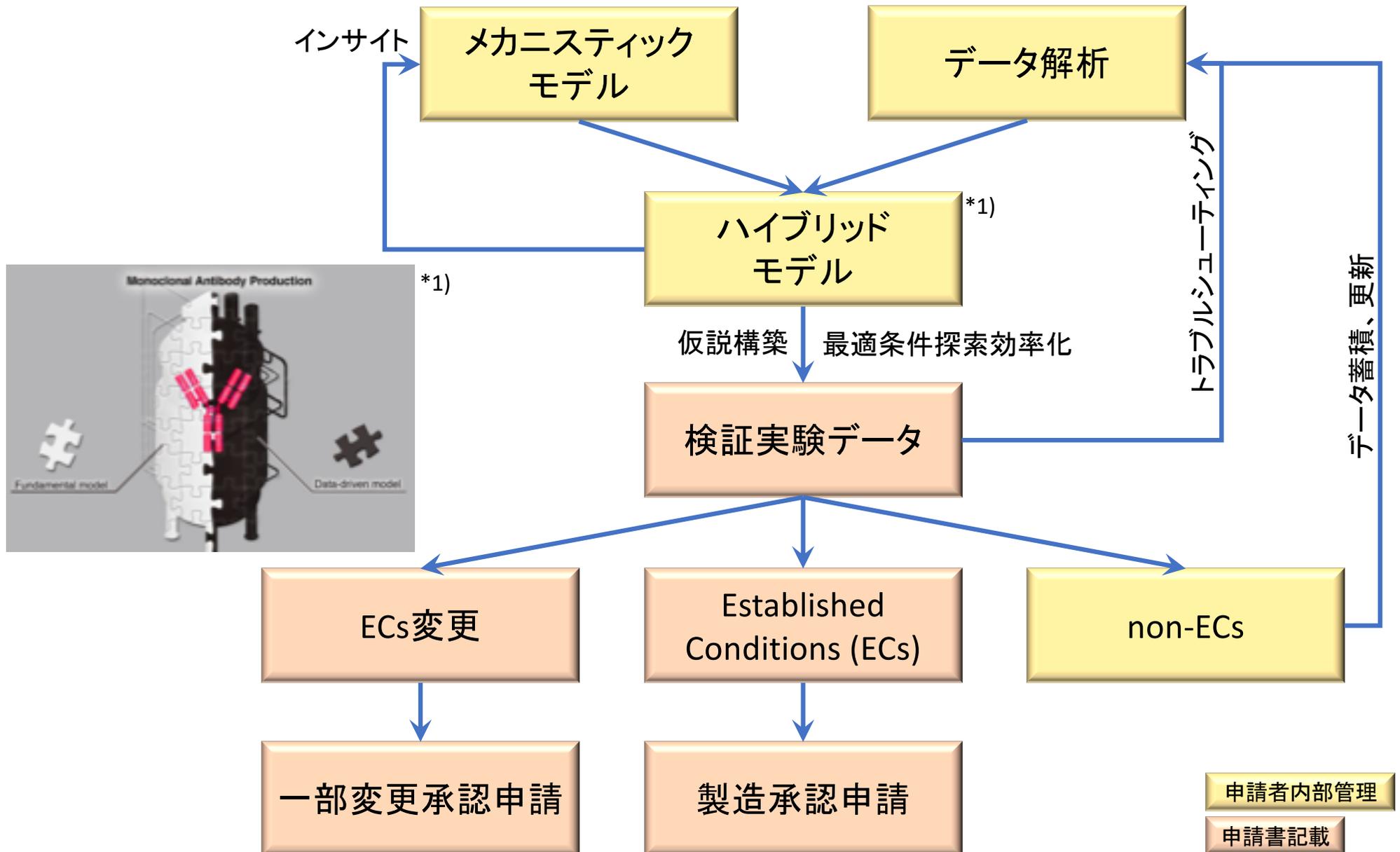
X_p : 灌流培養における生細胞密度 [cells/L]
 $Y_{P/S}$: 培地からのタンパク質の生産性 [-]
 $Y_{P/X}$: 比生産速度 [mmol/cells/d]
 μ : 比増殖速度 [d⁻¹]



プロセス質量強度 (Process Mass Intensity, PMI): 指定された質量の製品を製造するために使用される材料の総質量*1)

プロセスモデルによるスケールアップの生物学的影響評価

✓ プロセスモデルを検証実験データへの仮説提供、実験効率化に使用



*1) K. Okamura, et al., Hybrid modeling of CHO cell cultivation in monoclonal antibody production with an impurity generation module, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **61**(40), 14898-14909 (2022)

動物細胞培養のスケールアップはもう必要無いのか？

- 培養スケールの大小ではなく細胞の呼吸、流体力、混合、発泡等の各デザインスペースの最適化が重要
- 小型培養槽でも生産性向上のためにはスケールアップと同様の検討が必要
- 連続培養の小型培養槽でもPMIを考慮した最適な培養運転が必要
- スケールアップにおける培養環境の最適化だけでなく、細胞の生物応答の理解促進が必要

培養技術研究部会第4回技術セミナー

動物細胞培養のスケールアップ

2023年3月28日

村上 聖

次世代バイオ医薬品製造技術研究組合専務理事

