



Title	塑性流体を応用したヒト人工多能性幹細胞集塊の懸濁培養系設計に関する研究
Author(s)	山本, 陸
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88010
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

塑性流体を応用したヒト人工多能性幹細胞集塊の懸濁
培養系設計に関する研究

山本 陸

2022 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

序言.....	1
第1章 ヒト幹細胞の懸濁培養系と装置の設計	6
1.1 スケールアップに基づく装置設計の考え方	6
1.2 既存の装置・操作の設計	8
1.3 培養系の設計	15
1.3.1 細胞の設計.....	15
1.3.2 細胞挙動の設計.....	15
1.3.3 培養環境の設計.....	18
1.4 操作の設計	24
1.5 小括	25
第2章 塑性流体を利用したヒト iPS 細胞の懸濁培養系の構築.....	27
2.1 緒言	27
2.2 実験方法	29
2.2.1 ニュートン流体と塑性流体の調製.....	29
2.2.2 塑性流体の流動解析.....	29
2.2.3 気泡と粒子の挙動解析.....	29
2.2.4 ヒト iPS 細胞株と平面培養条件	30
2.2.5 翼攪拌型培養装置を用いた懸濁培養条件.....	31
2.2.6 カラム型培養装置を用いた懸濁培養条件.....	32

2.2.7 細胞集塊サイズの定量的解析.....	33
2.2.8 溶存酸素濃度の解析.....	34
2.2.9 フローサイトメトリーによる未分化状態の解析.....	34
2.2.10 分化能の解析.....	35
2.2.11 統計分析.....	35
2.3 結果.....	37
2.3.1 ニュートン流体と塑性流体の流動特性.....	37
2.3.2 翼攪拌型培養装置における気泡導入を伴うヒト iPS 細胞培養.....	38
2.3.3 ニュートン流体中と塑性流体中における細胞集塊と気泡の挙動.....	40
2.3.4 カラム型培養装置における塑性流体を用いた気泡導入を伴うヒト iPS 細胞培養.....	45
2.4 考察.....	49
2.5 小括.....	54
第3章 総括.....	55
略語一覧.....	58
参考文献.....	63
本報に関する論文.....	80
謝辞.....	81

序言

ヒト iPS 細胞を用いた細胞治療と再生医療の産業化

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は体細胞に対し遺伝子を導入することで作成される, 自己複製能かつ分化能を有する細胞であり (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007), 細胞治療や再生医療などへの活用が期待され研究が進められている. 例えば, 神経変性疾患であるパーキンソン病は薬物療法や手術療法などの対症療法が行われているが, これらの療法では根治はかなわない. これに対し中絶胎児由来のドパミン神経細胞そのものを移植する治療法が検討され, その効果がみられたが, 一方で多量の細胞の安定した確保が困難であった (Kim and Vellis, 2009). そこで幹細胞を用いた治療法の検討が進められ (Kikuchi *et al.*, 2011; Takahashi, 2017), 2018 年にはヒト iPS 細胞由来のドパミン神経細胞を用いた移植治療の医師主導治験が始められた (Takahashi, 2020). 同様に, 移植治療以外での根治が難しい症例として重症心不全が挙げられる. レシピエント数に対するドナー数が非常に少なく, 代替可能な治療法の検討が進められてきた. 幹細胞を用いた治療法もその一つであり, ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を直接患部へと注射する方法や (Lepperhof *et al.*, 2014), シート状の組織を形成し移植する方法により心機能の改善が報告されている (Kawamura *et al.*, 2013; Higuchi *et al.*, 2015). 2020 年にはヒト iPS 細胞由来の心筋細胞シートを用いた医師主導治験が行われており, このようにヒト iPS 細胞を用いた細胞治療・再生医療の産業化の実現に向けた検討がなされている.

ヒト iPS 細胞を用いた製造工程

ヒト iPS 細胞を用いた製造工程において, 他家移植を目的とする, 原料となる細胞はセルストックより提供される. セルストックの利用は細胞の樹立並びに評価にかかるコスト

と時間を省略でき、予め安全性と品質の保証された細胞を使用することが可能となる (Shi *et al.*, 2017). ストックされるヒト iPS 細胞は、他家移植において問題となる免疫拒絶を避け、かつ、少ない株数で広範囲のレシピエントをカバーするために、ヒト白血球抗原 (HLA) ホモ接合型の細胞を用いることが奨励されている (Rham and Villard, 2014). 日本では 50 種の HLA ホモ接合型 iPS 細胞株により日本人口の 73% への、140 種の細胞株により 90% への適用が可能とされている (Okita *et al.*, 2011).

セルストックから提供された細胞は同一株の安定供給のため、拡大培養を経てバンキングされる。このとき、まずマスターセルバンクを作成し、その後さらにワーキングセルバンクを作成することが一般的である。この規模は用途により様々であるが、少なくとも 300 ~ 400 本のバイアルにそれぞれ $5 \sim 10 \times 10^6$ 個の細胞を保管することが想定されている (Li and Ma, 2012). そのため特に多量のストックが必要となるワーキングセルバンクの作成においては、培養皿のような二次元平面培養容器だけでなく、大量培養を目的とした三次元懸濁培養装置の利用も想定される。

このように安定した原料として準備されたヒト iPS 細胞は、拡大培養、分化培養を経て目的の細胞へ分化される。その後、治療法に応じて直接的な投与、もしくは組織形成を経て患者へと移植される。一般に分化培養以降では細胞数の大幅な増加はみられず、未分化状態のヒト iPS 細胞の拡大培養によって必要な細胞数を確保することが要求される。パーキンソン病の治療においては、患者 1 人当たり約 5×10^6 個の細胞が移植治療に用いられ (Takahashi, 2020), また、心不全の治療には、患者 1 人当たり $10^8 \sim 10^{10}$ 個の細胞が必要とされている (Jing *et al.*, 2008; Kropp *et al.*, 2017). このような細胞治療・再生医療の産業化、製品化を考えた際、治療に用いられる再生医療等製品は低分子医薬品や高分子医薬品と比較し製造期間が長いため培養期間あたりの生産量が小さい。1 回の製造で製品を複数生産することがコスト削減のためには要求されており、ヒト iPS 細胞を用いた製造工程において、

未分化状態の細胞を 10^{10} 個以上準備が可能な大量培養工程の設計が必要である (図 1).

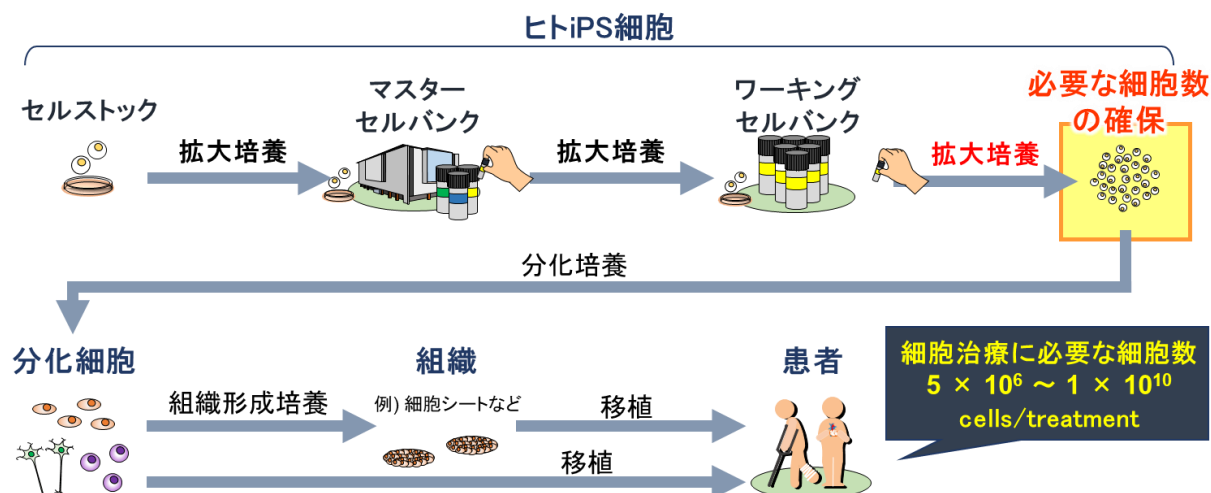


図 1 細胞治療と再生医療におけるヒト iPS 細胞を用いた製造工程

三次元培養装置を用いた細胞の大量培養

効率的に多量の細胞を確保するためには、大型の容器で、高い増殖速度を維持し、高い最終到達密度の達成が可能な、製造コストの小さい培養装置が要求される。大型化が容易であり、省スペースで高密度に培養が可能な三次元型の培養装置は、大腸菌などに代表される微生物などの製造工程に広く用いられてきた。これら微生物の実生産に用いられる培養装置の規模は $10^4 \sim 10^6$ L であり (Votruba and Sobotka, 1992), 比増殖速度は $> 0.1 \text{ h}^{-1}$ といわれている (O'Beirne and Hamer, 2000). 近年では、従来の微生物による生物反応では生産が難しい高機能医薬品の製造のために、細胞特性の大きく異なる動物細胞が用いられている。これらバイオ医薬品の製造に用いられる動物細胞の、みかけの比増殖速度と培養規模 (ワーキングボリューム), 獲得細胞数の関係を図 2 に示す。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞は高分子医薬品製造に用いられている代表的な動物細胞であり、既に 10^3 L 以上の規模での培養装置を用いた商業利用が行われている (Jayapal *et al.*, 2007; Kunert and

Reinhart, 2016). 微生物を用いた低分子医薬品や高分子医薬品など、これらの高生産を達成するためには、効率的な細胞数の確保に加え、細胞の目的生産物の代謝速度が重要な評価指標として用いられる。これに対し、ヒト iPS 細胞やヒト胚性幹細胞 (ヒト ES 細胞), ヒト間葉系幹細胞 (ヒト MSC) に代表される幹細胞は、生きた細胞や組織そのものが医薬品 (再生医療等製品) として扱われ、その培養規模は CHO 細胞と比較し非常に小さい。結果としてヒト iPS 細胞の獲得細胞数は 10^{10} 個を下回っており、大量培養装置の開発は十分でないと言える。

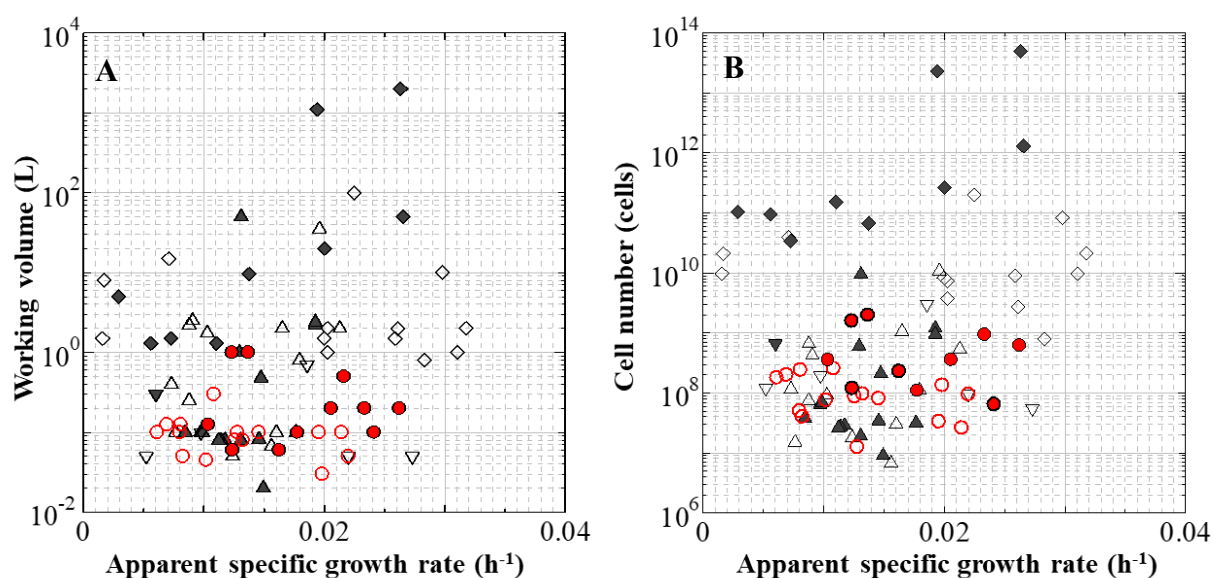


図 2 動物細胞のみかけの比増殖速度と培養容積 (A) と獲得細胞数 (B) の関係. 丸は iPS 細胞, ひし形は CHO 細胞, 上向きの三角形は MSC, 下向きの三角形は ES 細胞を示しており, それぞれ白抜き形状は回分培養, 色付き形状は流加培養もしくは連続培養での培養結果を示している. ワーキングボリュームは培養終了時の液体積を示している. これらの結果は Appendix の表 S1 から表 S4 までのデータに基づいている.

本研究の目的

本博士論文ではヒト iPS 細胞の大量培養を達成するために、細胞製造に適した装置設計に対するスケールアップの方法論を構築し、これに基づきヒト iPS 細胞の大量培養を鑑みた塑性流体を用いた培養系の設計を目的とした。

第 1 章では、既存の装置設計における考え方を整理し、新たに細胞製造におけるヒト幹細胞の培養装置設計に必要な考え方の構築を行った。

第 2 章では、1 章において構築した装置設計の考え方にに基づき、塑性流体を培養に利用することで、無攪拌かつ、下部からの気泡通気による酸素供給が可能な、ヒト iPS 細胞に適した培養系の設計を行った。

第 3 章の総括では、本研究結果に基づき、ヒト iPS 細胞の大量培養に適した培養系を提案するとともに、装置設計に対する今後の展望について言及した。

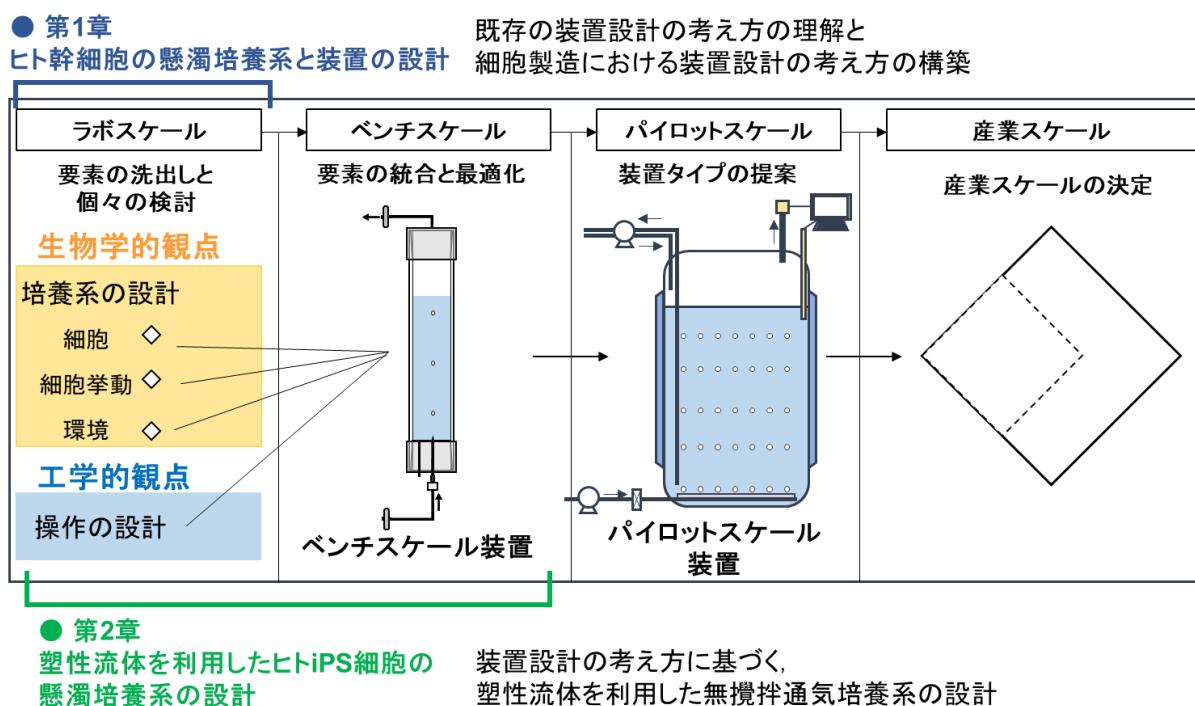


図 3 本博士論文の構成

第1章 ヒト幹細胞の懸濁培養系と装置の設計

1.1 スケールアップに基づく装置設計の考え方

培養装置や工程の設計は、検討規模に合わせて呼ばれる、ラボスケール、ベンチスケール、パイロットスケール、産業スケールというスケールアップ順序に基づき行われる。ラボスケールにおける検討は、培養に必要と考えられる種々の要素を網羅的に洗い出し、重要とされる変数を選択することを目的として行われる。多数の要素を確認するため、一般にコストを抑え副次的な要素を排除しやすいフラスコレベルの小規模な検討が行われる。ベンチスケールでは、洗い出しを行った種々の要素を統合し、目的に適した小規模のベンチスケール培養装置設計し、重要変数の最適化を行う。微生物培養の場合、ベンチスケールでの検討には、およそ 5 ~ 20 L 規模の培養装置を用いるとされている (Votruba and Sobotka, 1992)。パイロットスケールでの検討は、これら小規模の検討において最適化されたベンチスケール培養装置を基準にして、実生産を想定した培養規模にスケールアップした装置を用いて行う。周辺技術や前後工程など、製造を鑑みた際に必要な要素の最適化を行い、実生産に向けた最終確認を行うことを目的としている。このような種々の検討と最適化を経て、最終的な産業スケールの培養装置が設計され運転が行われる (図 1.1)。

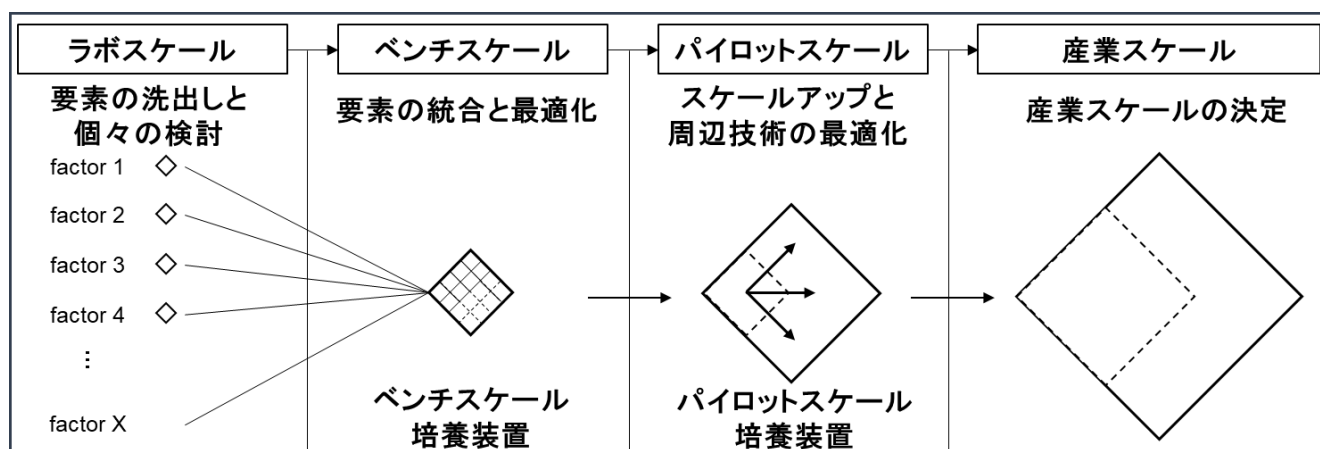


図 1.1 スケールアップに基づく装置設計の考え方

ヒト幹細胞の培養装置設計では、化合物医薬品の製造に用いられてきた、このような既存のコンセプトを設計基準とし、かつ、細胞製造固有の特性を考慮する必要がある (Kino-oka *et al.*, 2019). 細胞製造は、これまでの化合物の医薬品製造と比較し、生産物の最小単位が細胞であり、一分子の医薬品と比べて大きく、かつ、複雑である。また細胞-細胞間の接着による相互作用による影響が大きく無視できない。そのため、環境因子や周囲の細胞が、最終製品となる目的の細胞の状態に及ぼす影響を把握しておく必要がある。細胞製造性とは、生物学的見地と工学的見地を理解し橋渡しした工程による、細胞の製造に対する可能性であり、これに基づいて設計を行うためには、生物学的観点からみた要求事項と工学的な観点からみた要求事項の隔たりを理解することが求められる (Kino-oka and Sakai, 2019). そのため、本章では、既存の化合物の医薬品製造に用いられてきた装置と操作の役割を整理し、新たに細胞製造に用いる培養装置設計において必要とされる考え方の構築を行った。これは、それぞれの医薬品製造に用いる細胞の選択時における装置設計への要求の比較 (細胞の設計) と、細胞特性からくる「細胞挙動」と「環境」に対する細胞応答に基づく「培養系」と「操作」の設計により構成される考え方である。

1.2 既存の装置・操作の設計

これまで様々タイプの培養容器や装置が設計されている (図 1.2). 接着依存性細胞培養の場合, 挙動解析によるスクリーニングや毒性評価などの基礎研究には, 平面的増殖では一般的な単層の培養プレートが, 空間的増殖では, 集塊形成を可能とする v-bottom プレートが利用される場合が多い. これに対し, 大量生産を目的として, 多層型の平面培養プレート (Tohyama *et al.*, 2017) やローラーボトル型培養容器 (Kunitake *et al.*, 1997), 多穴構造を持つ集塊静置培養容器 (Takebe *et al.*, 2017) の設計が報告されている. これらの培養容器は, 並列生産によるスケールアウトの手法を用いた大量生産へのアプローチを行っている. これに対し, 一つの容器 (培養槽) 内で大量に培養するスケールアップ型のアプローチとして, 一般的な微生物培養に用いられる翼攪拌型培養装置や気泡塔型培養装置とエアリフト型培養装置, またせん断応力を抑えることを目的として設計された槽振とう型培養装置が用いられている. 接着依存性細胞培養では, 平面的増殖に対してはマイクロキャリアの利用が, 空間的増殖では細胞集塊形成を伴う培養が一般的に用いられる. 翼攪拌型培養槽は, 邪魔板と攪拌翼の形状に依存し混合状態が変化するため, 要求に合わせた攪拌翼の選択が可能である (Aunins *et al.*, 1989; Kamen *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 1992; Puthli *et al.*, 2005). 最も一般的に用いられ, 培養知見が蓄積した装置である. ただし, 攪拌機構が必要であるため, シール部分にコンタミネーションリスクが存在する. 小規模ではガラスやハードプラスチック, 大規模ではステンレス鋼を主とした金属で構成されることが一般的であり, 攪拌機構を有したシングルユース製品はコストが高い. 特に攪拌翼回りにおけるせん断応力が大きいため (Cherry and Papoutsakis, 1986), せん断応力耐性の低い細胞の培養では攪拌機構の検討が要求される. 例えば, せん断応力を抑えた並行流により細胞浮遊を可能とする攪拌翼として, 三角型の攪拌翼が提案されており, ヒト iPS 細胞培養での利用が報告されている (Matsuura *et al.*, 2012). 現在, 本形状の攪拌翼を持つ培養装置を利用し, 5 L 規模で

のヒト iPS 細胞の培養が行われている。ただし本形状においても攪拌翼まわりには乱流が生じ、せん断応力によるスケールアップの限界が想定されている。

気泡塔型培養槽やエアリフト型培養槽は、攪拌翼を用いないことで、構造が単純かつ駆動部がないためにコンタミネーションリスクが抑えられる。また攪拌動力が不要であるため、大型化が容易である。混合制御のため、多段塔型や循環型、ドラフトチューブ付塔型などいくつかの槽形状がある。ただし、多量の気泡導入そのもののリスクが大きいため、これらの培養槽は動物細胞培養に対して用いられる例が少ない。

攪拌翼を用いず、槽全体を振とうさせる槽振とう型培養槽は、通常の翼攪拌型培養槽と比較し流動により生じるせん断応力が小さいことが報告されている (Hang *et al.*, 2011; Marsh *et al.*, 2017)。また、攪拌翼を用いないために構造が単純であり、ソフトプラスチックを用いた低コストなシングルユース製品の製造が可能である。本培養槽は振とう形式により分類され、培養槽を旋回軌道に振とうする培養装置は Orbital shaking bioreactor と呼ばれている。培養槽は円柱形の形状が一般的であるが、Hang *et al.* は槽下部の形状を円錐型にすることで、平面の底面と比較し 21 %せん断速度を抑えることが可能であると報告している (Hang *et al.*, 2011)。また Wang *et al.* は槽中心部にバンプを設置した培養槽を用いることで、せん断応力を維持したまま、粒子を浮遊させることが可能であると報告している (Wang *et al.*, 2021)。鉛直方向への高さを抑え、底面積が大きい形状を持ち、上下方向にロッキングする槽振とう型の培養装置は Rocking-motion bioreactor や Wave bioreactor と呼ばれている。底面積が大きいために、比表面積が大きく、上面通気のみでの酸素供給が可能である。ただし 500 L 規模の培養に必要な装置の底面積は $> 5 \text{ m}^2$ であり、培養スペースの確保にコストがかかる。加えて、槽振とう型培養槽は、翼攪拌型培養槽と比較し低いせん断応力ではあるが、20 L 規模の Orbital shaking bioreactor で加わるせん断応力は 0.15 N m^{-2} (Wang *et al.*, 2021)、2 L 規模の Rocking-motion bioreactor で加わるせん断応力は $\sim 4 \text{ N m}^{-2}$ であり

(Marsh *et al.*, 2017), これらの値は規模の拡大に合わせて増加することが考えられる。

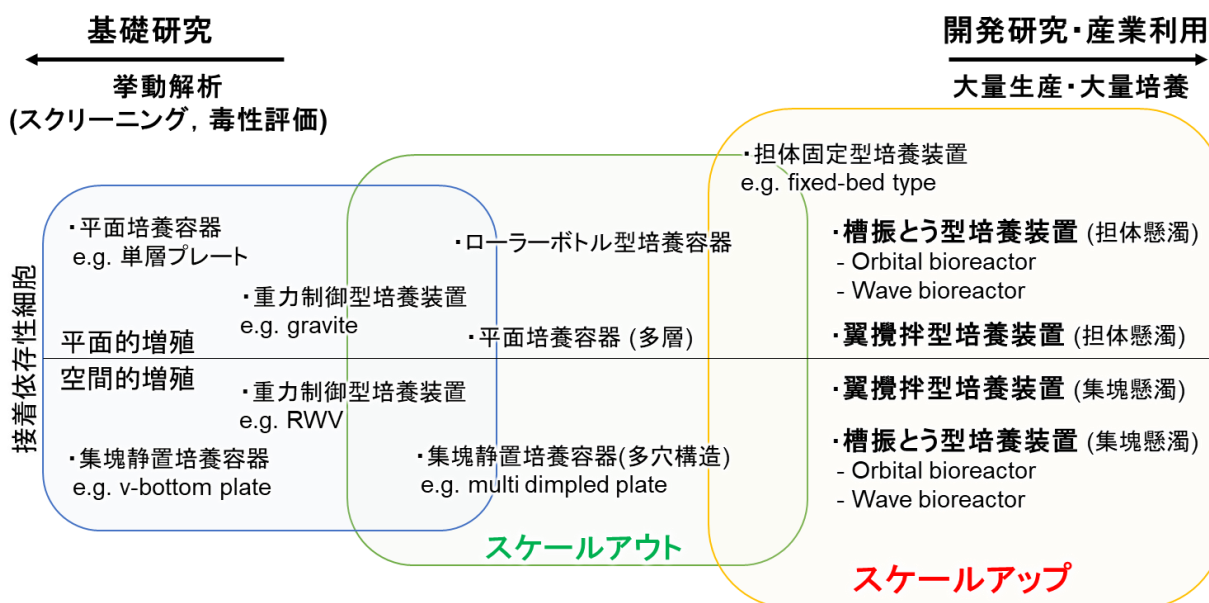


図 1.2 既存の培養装置や培養容器のタイプと利用目的

細胞環境変数に対する細胞反応の速度論的解析により，細胞毎の特性は評価される．これに対し，エネルギーを投入することで細胞に適した環境を制御することが，培養装置における操作の主な役割である．細胞環境変数に対応した以下のような種々の操作が行われる (図 1.3)．

培養系における温度は主に系外への送液により制御される．微生物培養の場合，代謝・増殖に伴う発熱が大きいために，培養槽外部のジャケットや，培養槽内にコイル状の冷却管を設置し，冷却水の送液により除熱を行うことが一般的である．一方，動物細胞培養の場合，細胞の代謝熱は微生物培養と比較し非常に小さい．加えて培養に要求される温度は 37℃前後と体温に近く，室温より高いため，加熱が要求される．培養ディッシュ程度の小規模な培養装置は炭酸ガスインキュベータ内に設置されることが多く，大型の培養装置ではジャケットへの温水の送液により温度制御を行うことが一般的である．

培養系における可溶性物質の濃度や pH は主に送液操作により制御される．細胞の増殖に必要とされるグルコースに代表される炭素源や，アミノ酸やペプトンなどの窒素源，増殖因子等の基質は細胞の代謝により消費される．また増殖因子は熱不安定性を示し，代表的な増殖因子の一つである Fibroblast growth factor (FGF) は，37 °C の培養環境において 24 h 後に活性を失うことが報告されている (Chen *et al.*, 2012)．回分培養は，培養開始の段階でこれら基質を含んだ培地を全量仕込み，培養系内外に送液操作を行わない培養手法であり，他の培養手法と比較し操作や装置が単純である．一方で，基質の枯渇や老廃物の蓄積により，増殖が阻害され，細胞の到達密度や目的生成物の生産量が小さいことが知られている．このような基質の枯渇を防ぐために，これらを含んだ溶液を送液操作によって培養系内に連続的あるいは間欠的に供給する培養手法は流加培養と呼ばれている．本手法は基質の枯渇による増殖阻害を抑制することで回分培養と比較し高密度培養が可能であるが，一方で老廃物の蓄積による増殖阻害は無視できない．これら課題を克服する培養手法として，培養系の定常状態を維持する連続培養が提案されている．ケモスタット培養やタービドスタット培養は，送液操作によって，培地を連続的に供給するとともに，培養系の細胞を含む培養液を連続的に系外に取り出すことで，培養系を定常状態に維持する手法である．基質の供給や，老廃物の除去により，増殖阻害を抑制した長期間の培養が可能となるが，一方で増殖した細胞や生産された目的物の一部が系外に取り出されるため，培養系内の細胞や生産物の密度向上が難しい．生産性を向上するためには，系外に取り出した培養液から目的物を獲得する仕組みが別途必要になる (Karst *et al.*, 2017; Steinebach *et al.*, 2017)．これに対し，灌流培養と呼ばれる培養手法は，送液操作によって，培地を連続的に供給するとともに，培養系の細胞を含まない培養液を連続的に系外に取り出すことで，培養系を定常状態に維持する手法である．基質の枯渇や老廃物の蓄積による増殖阻害を回避し，培養系内の密度向上が可能となるが，一方で細胞と培養液を分離する複雑な機構が必要となる．

これら培養手法に加え、乳酸やアンモニアなどの老廃物の蓄積による増殖阻害の影響が大きいとされる動物細胞培養では (Hassell *et al.*, 1991; Lao *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1996; Cruz *et al.*, 2000), 間欠的に一定量の細胞を含まない培養液を交換する, 培地交換操作が培養系の可溶性物質の濃度や pH の制御に用いられている. このような灌流培養や培地交換操作における細胞と培養液を分離する手法として, 主に, 遠心分離法, 沈降分離法, 膜分離法が用いられている. 遠沈管を用い, 遠心分離により細胞を沈降させ上清を除去する方法は, 小規模の培養装置を用いた培養において用いられている. 培養液の移し替え操作は煩雑であり, また遠心分離が必要とされるが, 処理時間は比較的短い. 培養液の移し替えが困難となる規模の培養においては, 遠心分離機構を無菌的に組み込んだ培養装置の設計が考えられている (Hamamoto *et al.*, 1989). またチューブ型, チャンバーボウル型, ディスク型などの連続遠心分離機は抗体医薬品等の連続生産の下流工程において目的生産物の分離回収工程に用いられており (Jungbauer, 2013), 培地交換操作への適用も検討されている. 沈降分離法は培養槽内もしくは沈降槽内で細胞を自然沈降させ, 上清を除く分離法である. 最も機構が単純である一方で, 培養規模が大きくなるほど沈降に時間が掛かり, 細胞同士の接着, 凝集が生じる可能性がある. 膜分離法は中空糸膜などを用いた分離法であり, タンジェンシャルフローフィルトレーション (TFF) や, オルタネーティングタンジェンシャルフローフィルトレーション (ATF) が例として挙げられる (Ponnudurai *et al.*, 1983; Bosco *et al.*, 2017; Radoniqi *et al.*, 2018). 分離膜を介した送液操作により細胞と培養液を分離する本手法は, 比較的, 機構が単純であり, 膜面積の拡大によるスケールアップが容易であるが, 分離膜の閉塞による系の破綻が生じることがある.

上面通気や下部通気といった通気操作は, 攪拌操作とともに, 主に難溶性基質である酸素を供給する酸素濃度制御を目的として行われる. 酸素消費の大きい好気性微生物の培養では, 酸素枯渇が増殖の律速となる場合が多いため, 酸素移動容量係数 (k_{La}) を基準とし

た装置，操作設計が行われることが多い．このような培養では，培養装置下部にスパージャーを設置し，培養液中に気泡を導入することで酸素供給を行うことが一般的である．またその他の通気操作の役割として pH や二酸化炭素濃度の制御，気泡塔型培養槽やエアリフト型培養槽において下部通気による混合制御が行われる．動物細胞培養では pH を安定させる役割として 5 %CO₂ 混合ガスを通気する場合が多い．一方で高い二酸化炭素濃度は細胞の増殖や抗体生産などを阻害する (DeZengotita *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2005)．特に大規模な培養装置を用いた動物細胞培養の場合，水圧により溶解度が大きくなる一方で，せん断応力を考慮した低い通気速度により二酸化炭素の物質移動が小さくなるため，二酸化炭素の除去を考慮した通気操作が必要とされる．

三次元懸濁培養装置に主に用いられている翼攪拌型培養槽において，攪拌操作は多くの役割を果たす重要な操作の一つである．攪拌操作の主な役割として，液流による対象物の混合，空間的均一化と酸素供給が挙げられる．攪拌翼はシャフトに取り付けられており，メカニカルシールを貫通して槽外のモーターにより回転する動力を得る．攪拌翼の形状は様々であり，流動や物質移動に影響を及ぼす (Aunins *et al.*, 1989; Shi *et al.*, 1992; Puthli *et al.*, 2005)．また攪拌により生じる流動方向の制御を目的として邪魔板の設置も行われる．これら液流の制御は基本的に完全混合を目的として行われ，操作や装置形状の選択が必要である．攪拌操作による酸素供給能の向上は複数の要素により構成される．攪拌により生じる流動は気液界面での物質移動を向上させる．加えて邪魔板の設置や攪拌により生じる上下混合流は気泡を長期間保持することでガスホールドアップを向上させる．回転する攪拌翼付近の気泡は分割され，また流動により気泡同士の合一が抑制されるため，気液界面の比表面積が大きくなり，物質移動が向上する．一方で攪拌操作は流動によりせん断応力を生じるために，目的の細胞に適した攪拌操作の設計が必要である．

このように，種々の操作によって細胞環境変数を制御することが可能となる．ただし，

攪拌操作と通気操作のように、細胞環境変数と操作が一对一对応しておらず、複数の操作が相乗的に環境に影響を及ぼし、かつ、複数の細胞環境変数に影響を与えることが装置設計における難点として挙げられる。

既存の装置タイプと操作はヒト幹細胞の大量培養に適しておらず、細胞特性を理解した新たな装置の設計が必要とされる。

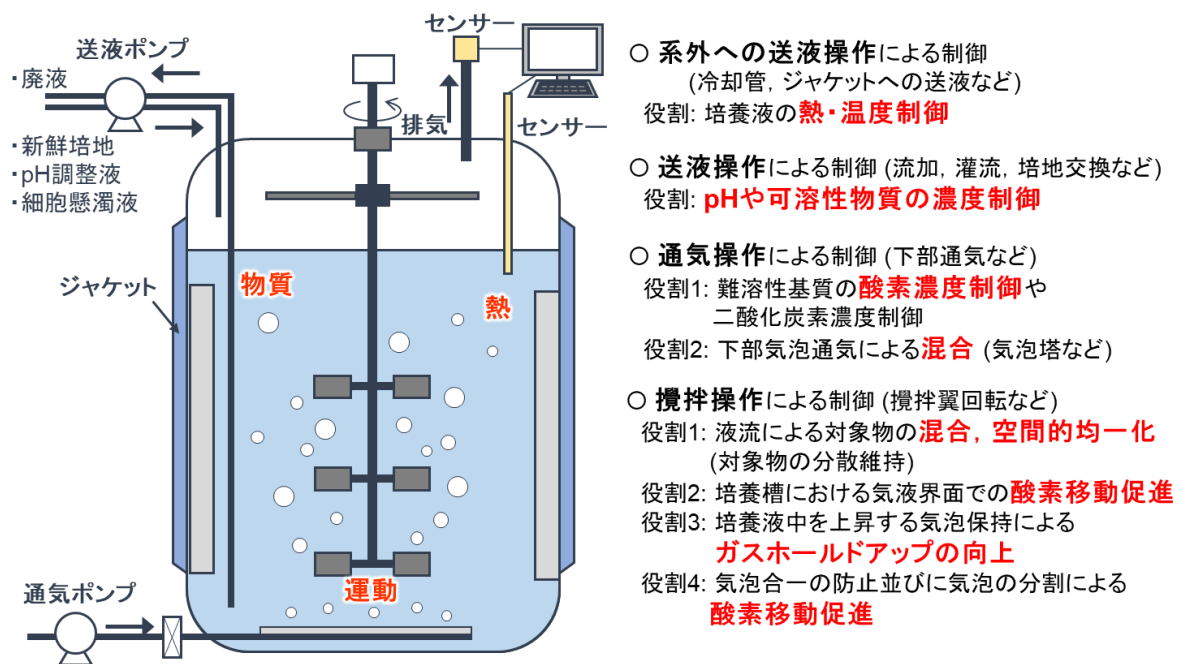


図 1.3 三次元懸濁培養装置における操作と役割

1.3 培養系の設計

1.3.1 細胞の設計

細胞を用いた製造工程において、目的生産物に適した細胞の選択が最初に行われる。低分子医薬品や高分子医薬品では細胞反応による代謝生産物が、再生医療等製品では細胞や組織そのものが目的生産物として扱われる。設計指針として、生産要求である、高生産、高品質、安定生産を達成可能な細胞の構築が目指される。代謝生産物の生産の場合、これら要求を満たすために、遺伝子組換えやゲノム編集技術により、高生産株や高耐性株、接着非依存性へと馴化した不死化細胞株を作成し (Cockett *et al.*, 1990; Mohan *et al.*, 2008; Area *et al.*, 2019), 安定生産のためにセルバンクの構築を行うことが一般的である。そのため、これらの製造工程では、細胞に合わせた装置設計のみならず、既存の装置を用いた製造的・工学的な要求に合わせた細胞の再設計も可能となる。これに対し、再生医療等製品は免疫拒絶の問題から、患者に合わせた細胞の使用が要求される。そのため細胞の選択肢は限られ、遺伝子組換え等による高生産株 (高増殖株) などの細胞設計は不可である。一般には、同種移植を目的とした際の、原料となる細胞の安定化を目的としたセルバンクの構築のみが行われる (Stacey, 2012)。細胞設計の自由度が小さいため、既存の装置が細胞要求に適さない場合、新たな装置設計が求められる。ヒト幹細胞培養もこの例に則る場合が多く、細胞特性に合わせた装置の設計が必要とされる。

1.3.2 細胞挙動の設計

動物細胞培養において、「接着」は増殖挙動に大きな影響を及ぼす要因の一つである。骨髄細胞や造血幹細胞、腫瘍細胞などの一部の接着非依存性細胞を除く大半の細胞は、増殖に接着を要する接着依存性細胞である (図 1.4)。この接着は、「細胞」と「足場」の接着である細胞基質間接着と「細胞」同士の接着である細胞間接着に分類される。細胞と足場と

なる細胞外基質 (Extracellular matrix; ECM) は主にインテグリンを介して接着しており、細胞同士は主にカドヘリンを介して接着している。これらの接着の喪失はアノイキスと呼ばれるアポトーシスを誘導する (Frisch and Francis, 1994; Bergin *et al.*, 2000; Grossmann, 2002; Chiarugi and Giannoni, 2008).

接着非依存性細胞培養の場合、懸濁培養下において、分裂した細胞は独立し、コロニー形成を伴わない増殖挙動を示す。この単一細胞群を扱う培養系は、細胞-細胞間の接着による増殖挙動への影響を考える必要がなく、また一般的な微生物細胞培養と同一であるため、従来の培養技術の転用が可能となり、培養系の構築が比較的容易である。CHO 細胞が抗体等の生産に用いられている主な要因の一つとして、無血清培地での接着非依存性細胞への馴化が容易であることが挙げられる。

これに対し、ヒト iPS 細胞のような、接着依存性細胞はコロニー形成を伴う増殖挙動を示す。接着面となる足場を用いた培養系では、細胞はインテグリンを介して足場と接着し、面上を広がっていくように増殖する。最大細胞密度は接着面積に依存するため、接着面の十分な提供が高密度培養の達成に要求される。三次元培養装置を用いた培養では、接着面を持つ担体を利用した培養系が主流である。担体を充填、固定し、液のみを流動させる培養系は fixed-bed (packed-bed) culture system と呼ばれている。Tsai *et al.* は、繊維層の利用により、1.75 L のワーキングボリューム中に 30000 cm² の表面積を設置し、 9.2×10^7 個のヒト MSC の培養を行ったことを報告している (Tsai *et al.*, 2016)。このような充填層を利用した培養系は、増殖のための接着面積が大きく、灌流培養による基質の供給と老廃物除去が容易である。一方で充填層内の分布にバラつきが生じやすく、また充填層を設置するためのコストがかかることが知られている。これに対し細胞の接着した担体そのものを懸濁する、マイクロキャリアを用いた三次元懸濁培養系が、ヒト多能性幹細胞 (Serra *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2016) やヒト MSC (Schirmaier *et al.*, 2014; Lawson *et al.*, 2017) な

どの培養に広く利用されている。マイクロキャリアは構造 (球体や多孔質体), 直径及び表面積, 比重, 基材材質, 表面コーティング, 表面電荷の有無などを考慮して設計されている。多様な製品が提供されており, これらマイクロキャリアの種類によって増殖や代謝が異なることが報告されている (Goh *et al.*, 2013; Rafiq *et al.*, 2016)。攪拌型培養槽を用いた三次元懸濁培養では攪拌速度に依存してマイクロキャリアの破砕が生じることが確認されている (Gupta *et al.*, 2016)。再生医療や細胞治療などの細胞を製品として用いる製造工程では, このようなマイクロキャリア片などの小粒子の混入が問題視されるが, 細胞のみを回収する分離精製は難しい。これらの理由から, 目的の細胞や製造工程に適したマイクロキャリアの選択が培養系の設計において必要となる。

接着依存性細胞のもう一つの代表的な増殖挙動として, 足場基材を用いない場合の培養が挙げられる。懸濁液中の細胞は, 他の細胞と接触した際に細胞間接着を介して凝集・分裂し, 球状の細胞集塊を形成する, 空間的 (三次元的) な増殖を示す。このとき, 細胞は ECM を分泌して集塊内部に構造を形成し, インテグリンを介した細胞基質間接着を示す。Kim *et al.* の報告では, ヒト iPS 細胞の ECM 生成能は細胞株や Rock (Rho-associated protein kinase) 阻害剤の添加により異なり, ECM による構造の形成が細胞集塊の安定した増殖に必要とされる (Kim *et al.*, 2019)。ただし, ECM の蓄積により細胞集塊外縁部に生じるコラーゲン I のシェル様構造は, 集塊外側への細胞分裂を制限し, 圧迫により細胞増殖が制限されることが示唆されている (Nath *et al.*, 2017)。また集塊径の増大は集塊内外の物質拡散を阻害し, 増殖を制限する (Wu *et al.*, 2014)。このような集塊形成を伴う増殖挙動の課題に対し, Mohamet *et al.* はマウス ES 細胞の E-cadherin をノックアウトする, もしくは E-カドヘリン中和抗体の DECMA-1 を用いることで, 細胞同士の凝集を阻害し, 単細胞培養に近い状態での三次元懸濁培養を報告している (Mohamet *et al.*, 2010)。Nath *et al.* はボツリヌス菌由来ヘマグルチニンの添加により, ヒト iPS 細胞集塊の E-カドヘリン接着を抑制し, 細

細胞集塊に物理的な力を加えて細胞集塊を小集塊に分割することで、30 mL 規模の攪拌型培養槽を用いた培養系で、最大細胞密度が向上することを報告している (Nath *et al.*, 2017).

また細胞集塊群を扱う懸濁培養下において、形成された細胞集塊同士は E-カドヘリンを介して容易に凝集することが報告されており (Dang *et al.*, 2004), 他の集塊との合一は、培養系における集塊径増大の一因となる。三次元懸濁培養では、沈降による培養槽下部の集塊密度の増加が合一の主な原因であり、浮遊懸濁状態の維持が求められる。Otsuji *et al.*, は低アシル化ジェランガムを含有した培地を用いることで、200 mL 規模のヒト iPS 細胞集塊の無攪拌での浮遊懸濁培養系を提案している (Otsuji *et al.*, 2014).

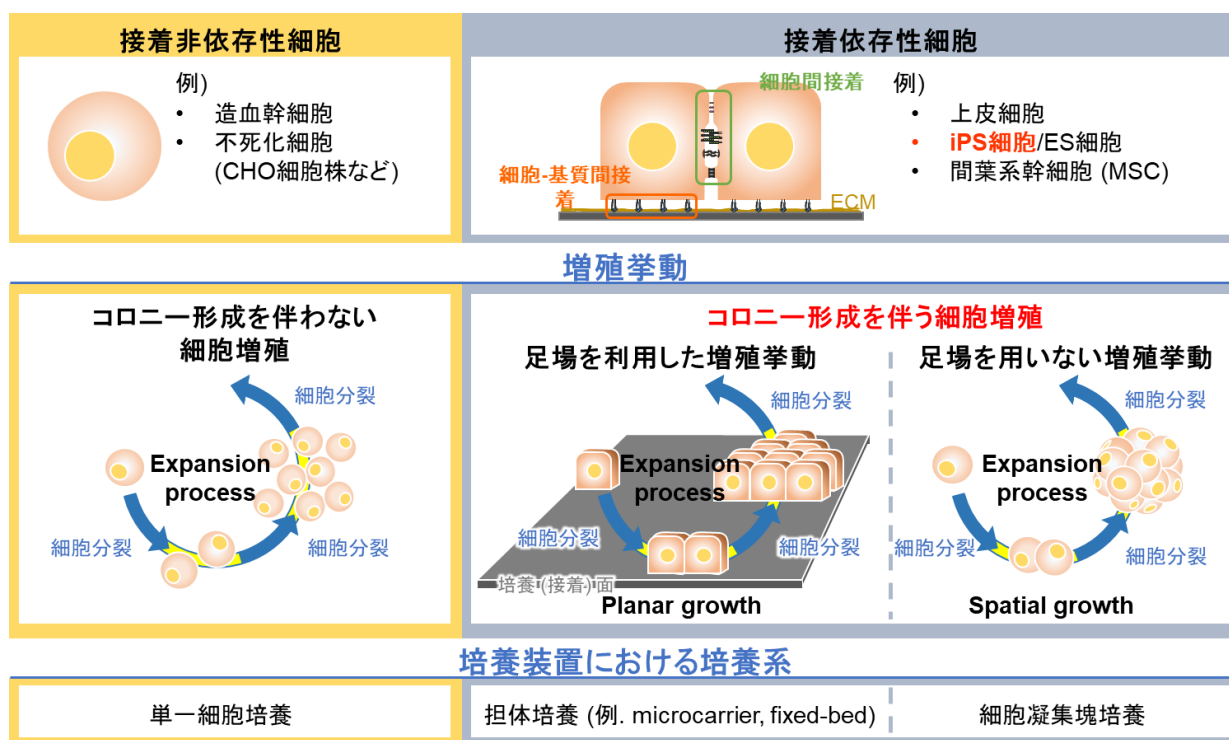


図 1.4 細胞接着に依存した増殖挙動と培養系の分類

1.3.3 培養環境の設計

細胞応答は環境因子である物質 (基質, 増殖因子, 代謝産物, pH など), 熱, 運動に依存

し変化する．これらエネルギーに対する応答は大きく，増殖反応（細胞分裂や細胞死），代謝反応，分化反応と，それぞれに関連するシグナル伝達や骨格形成，遺伝子発現などの出力によって評価される．細胞毎に異なるこれら反応を，速度論的に解析し理解することが，培養環境の設計に求められる．速度論的に細胞特性を論じるため，これらの環境因子は単位を持つ，濃度や温度などの細胞環境変数として示される．系における反応速度は，細胞当たりの反応を示す比速度を用いた生理活性変数により評価される．

基質や増殖因子，pH，細胞の代謝により生成される老廃物などの可溶性物質の濃度は主に初期に培養系に投入する培地並びに，送液操作により制御される．動物細胞培養に用いられる培地は糖，アミノ酸，ビタミンなどの基質と，pH や浸透圧を *in vivo* の環境に合わせて調整する無機塩を含有している (Price, 2017)．これら基礎成分に加え，増殖因子やホルモンなどを含むウシ胎児血清などの血清が，培地に混合され培養に用いられてきた．ただしこのような血清は，コストが高くロット間差が大きい．また動物由来のためにウイルス等の混入リスクがあり，安全性の観点から製造への利用が避けられ，無血清培地や化学合成培地の開発が進められている (Lee *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2006; Nakagawa *et al.*, 2014)．これら可溶性物質の成分並びに濃度は細胞の増殖や代謝に大きく影響を及ぼす．Kurokawa *et al.* は，ハイブリドーマの細胞収率や比抗体生産速度は低グルコース濃度の環境下において増加することを報告している (Kurokawa *et al.*, 1994)．

このような動物細胞の増殖や代謝を促進する物質に対し，細胞の代謝により生成される乳酸やアンモニアなどの老廃物は動物細胞の増殖や代謝を阻害することが報告されている (Hassell *et al.*, 1991; Ozturk *et al.*, 1992)．表 1 に動物細胞ごとの増殖阻害を示す乳酸濃度並びに，乳酸の比生成速度を示した．抗体生産に主として用いられている CHO 細胞は，ヒト MSC やヒト iPS 細胞と比較し，乳酸に対して耐性を示し，また比生成速度が小さい．そのため，CHO 細胞培養では，老廃物除去操作を伴わない，回分培養や流加培養を用いること

が一般的である．一方，ヒト iPS 細胞の場合，三次元懸濁培養における最大細胞密度は 2×10^9 cells/L 程度であるが，このとき，6 ～ 8 h 程度で細胞の増殖を妨げる量の乳酸を生成する．そのため，ヒト iPS 細胞培養では，培地中の乳酸を除去する操作の設計が必要とされている．

表 1 細胞の増殖を阻害する乳酸濃度と乳酸の比生成速度

Cell type	Critical lactate concentration (g L ⁻¹)	Reference	Specific lactate production rate (10 ⁻¹¹ g h ⁻¹ cell ⁻¹)	Reference
CHO 細胞	5.4	Lao <i>et al.</i> (1997)	3.7	Lao <i>et al.</i> (1997)
	8.1 - 9.9	Hayter <i>et al.</i> (1991)	0.1 - 0.2	Monteil <i>et al.</i> (2016)
			0.4 - 2.0	Reinhart <i>et al.</i> (2015)
BHK 細胞	5.2 - 10.5	Cruz <i>et al.</i> (2000)	2.8 - 5.7	Cruz <i>et al.</i> (2000)
ハイブリドーマ	5.0	Ozturk <i>et al.</i> (1992)	4.1	Ozturk <i>et al.</i> (1992)
ヒト MSC	3.2	Schop <i>et al.</i> (2009)	3.8	Goh <i>et al.</i> (2013)
ヒト ES 細胞	1.0	Chen <i>et al.</i> (2010)	6.1 - 11.0	Chen <i>et al.</i> (2010)
	1.0		7.2 - 9.0	
ヒト iPS 細胞	1.0	Nath <i>et al.</i> (2017)	8.0	Nath <i>et al.</i> (2017)
	0.5	Horiguchi <i>et al.</i> (2017)		

難溶性を示す酸素は TCA サイクルや電子伝達系の酸化反応などに利用されアデノシン三リン酸 (Adenosine triphosphate, ATP) を合成するなど、代謝反応に関わる基質の一つである。細胞の増殖や分化は溶存酸素濃度に依存することが知られている。ヒト iPS 細胞の場合、大気中の酸素濃度が 4 %の低酸素濃度条件において、細胞の比増殖速度と最大細胞密度が向上し (Abecasis *et al.*, 2017), また心筋細胞への分化が促進されることが報告されている (Correia *et al.*, 2014)。こうした培養系における溶存酸素濃度の制御には細胞の酸素消費速度の理解と、操作による供給速度の評価が必要である。表 2 は細胞種ごとの比酸素消費速度を示す。CHO 細胞と比較し、ES 細胞やヒト iPS 細胞の比酸素消費速度は小さいが、一方でこれら接着依存性細胞は集塊形成培養を行う際に集塊内部への拡散を考慮する必要がある。Wu *et al.* は、バルク中の酸素分圧が 148 mmHg の際、直径 400 μm のヒト ES 細胞集塊の 23 %が、低酸素から無酸素条件 (0 - 30 mmHg) に陥ることを報告している (Wu *et al.*, 2014)。三次元懸濁培養系の溶存酸素濃度は溶存酸素センサーによりモニタリングされ、酸素供給を行う通気操作と攪拌操作により制御される。酸素供給能を表す評価指数として、気液界面の限られた領域での濃度勾配を仮定する二重境膜説に基づく、酸素移動容量係数 $k_{La} (\text{h}^{-1})$ が一般的に用いられる。培養装置のスケールアップでは、 k_{La} が一定になるように装置概形や、通気速度や攪拌速度などの操作変数を設計・制御する手法が広く用いられている。

表 2 細胞の比酸素消費速度

Cell type	Specific oxygen consumption rate (10^{-9} mg h ⁻¹ cells ⁻¹)	Reference
CHO 細胞	8.51	James <i>et al.</i> (1995)
	10.2	Deshpande <i>et al.</i> (2004)
	9.92	Jorjani <i>et al.</i> (1999)
BHK 細胞	7.04	Jorjani <i>et al.</i> (1999)
ハイブリドーマ	9.60	Jorjani <i>et al.</i> (1999)
ヒト MSC	3.17	Curcio <i>et al.</i> (2014)
マウス ES 細胞	4.61	Zur Nieden <i>et al.</i> (2007)
ヒト iPS 細胞	4.52	Our data

流動力 (hydrodynamic force) は下部通気による通気操作や攪拌操作により培養系に導入されるエネルギーであり、浮遊・混合状態の維持や酸素供給に影響を及ぼす。Navier-Stokes の運動方程式によると、流体中の細胞に加わる慣性力は、重力などの密度や体積に依存した体積力と、この流動力によって細胞表面に加わる面積力の総和として考えることができる。面積力は圧力による力 (pressure force) と粘性力 (viscous force) により構成されている。単位面積当たりの面積力は応力と呼ばれ、面に対して垂直向きの応力が垂直応力、面に並行方向の応力がせん断応力である。細胞の浮遊状態を維持するためには、攪拌の流動力によって細胞に加わる面積力を考える必要がある。Zamzam *et al.* は粒子に加わる鉛直上向きの力 (揚力) が重力と浮力の差よりも大きいとき粒子が浮遊すると仮定し、攪拌槽における粒子の浮遊状態の計算を報告している (Zamzam *et al.*, 2016)。体積力である重力や浮力によって加わる力は粒子体積や密度の増加とともに大きくなるため、マイクロキャリアの

利用や細胞集塊形成を必要とする接着依存性細胞の浮遊維持は単細胞と比較し難しい。

また動物細胞はせん断応力に対してセンシティブであることが知られている。表 3 に細胞ごとの増殖を妨げるせん断応力の値を示す。大腸菌と比較し動物細胞の増殖に影響を及ぼすせん断応力は非常に小さい。加えて、iPS 細胞や ES 細胞などの幹細胞は、抗体生産などに用いられている CHO 細胞などと比較し、さらに 1/10 程度耐性が小さく、よりせん断応力を抑えた環境の維持が必要である。

表 3 細胞の増殖に影響を及ぼすせん断応力

Cell type	critical shear stress (N m^{-2})	Reference
<i>Escherichia coli</i>	1.3×10^3	Lange <i>et al.</i> (2001)
CHO 細胞	1.2×10^0	Tanzeglock <i>et al.</i> (2009)
HEK 細胞	1.7×10^0	Tanzeglock <i>et al.</i> (2009)
	2.6×10^0	Stathopoulos <i>et al.</i> (1985)
BHK 細胞	1.0×10^0	Ludwig <i>et al.</i> (1992)
マウス ES 細胞	7.8×10^{-1}	Cormier <i>et al.</i> (2014)
	1.0×10^{-1}	Toh <i>et al.</i> (2011)
マウス iPS 細胞	1.1×10^{-1}	Ismadi <i>et al.</i> (2014)
ヒト iPS 細胞	1.5×10^{-1}	Wang <i>et al.</i> (2013)

1.4 操作の設計

ヒト iPS 細胞など、ヒト幹細胞の培養では、前節までに述べたように、凝集を防止し、低せん断応力で老廃物の除去操作が可能な培養系が要求される。従来、凝集の防止に対し攪拌操作による分散状態の維持が行われてきたが、この方法はせん断応力耐性の低い細胞に不適である。またこれらの細胞は、酸素要求性の低いため、小規模においては上面通気による酸素供給が行われてきたが、大規模の培養装置では、これらの細胞培養においても、下部からの気泡導入に代表される酸素供給操作が要求される。しかしながら、気泡の導入は細胞にダメージを加えるせん断応力を生じる。これは気泡導入時に生じるせん断応力、バルク中での気泡との接触によるせん断応力、液上面に達した気泡が破裂する際に生じるせん断応力など複数に及び、せん断応力に弱いとされる細胞の培養では通気操作の検討が要求される (Garcia-Briones *et al.*, 1992)。加えて、槽内のヘッドスペースに生じる発泡層はガス通気の圧力損失や排気系への溢流などの問題を生じる。特に動物細胞培養ではタンパク質を含有した培地を用いるために発泡層が生じやすい (Prins *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1992)。そのため消泡翼などの機械的な消泡操作や、消泡槽の設置、また消泡剤などが CHO 細胞培養に用いられている (Prins *et al.*, 1987; Murhammer *et al.*, 1988)。ただし、機械的な消泡はせん断応力を生じるために、ヒト iPS 細胞などのせん断応力にセンシティブな細胞培養への適応は難しい。また製造の観点では、消泡剤として用いられている既存の非イオン界面活性剤の添加は、原材料の安全性評価が必要であり、今後、製造に適した起泡性の低い培地の開発が必要である。そのため、少ない気泡導入で効率的な酸素供給が可能な培養系の構築が求められる。

また動物細胞の比増殖速度や比代謝速度が微生物と比較し小さいことは、完全混合状態を維持した継続的なモニタリングによる制御ではなく、攪拌を抑制した間欠的な制御が可能となることを示唆している。

1.5 小括

本章では、ヒト幹細胞の培養装置設計を達成するための考え方の構築を行った。細胞製造に用いられるヒト幹細胞の装置設計では、生物学的観点からみた細胞培養系に対する要求と、工学的観点からみた装置・操作による細胞培養系への供給の間に、従来の細胞培養では考慮の必要がなかった隔たりが存在する。そのため既存の装置が適用できず、大型の培養装置での培養に至っていない。培養装置の設計では、まず使用する細胞の選択を行わなければならない (細胞の設計)。特に細胞製造に用いられるヒト幹細胞は、細胞そのものを製品とするために、製造要求に合わせた細胞の設計が難しい。そのため使用する細胞の培養系への要求に基づく設計が必要とされる。また多くのヒト幹細胞は接着依存性を有する。足場を用いないヒト幹細胞培養の場合、集塊形成が増殖に要求されるが、一方で、過度な凝集は細胞増殖を阻害する。これは細胞-細胞間の相互作用による影響を無視できず、培養系の設計において、凝集を防止することが必要とされている。培養環境が細胞挙動に与える影響は、これまで様々な細胞培養において速度論的に解析され、その特性が評価されてきた。ヒト幹細胞は、基質要求性が低い一方で、老廃物への耐性が低い。またせん断応力に非常にセンシティブである。酸素の要求性は低い、装置の大型化においては依然として酸素供給による律速が想定される。一方で高分子タンパク質を多量に含むヒト幹細胞培地は発泡性が高く、気泡導入によって、せん断応力が生じ、また圧力損失や排気系への溢流などの問題を生じる。このように、細胞製造に用いる細胞の培養装置設計では、細胞挙動や環境因子、操作に適した培養系を考慮した設計が必要であることを提案した。

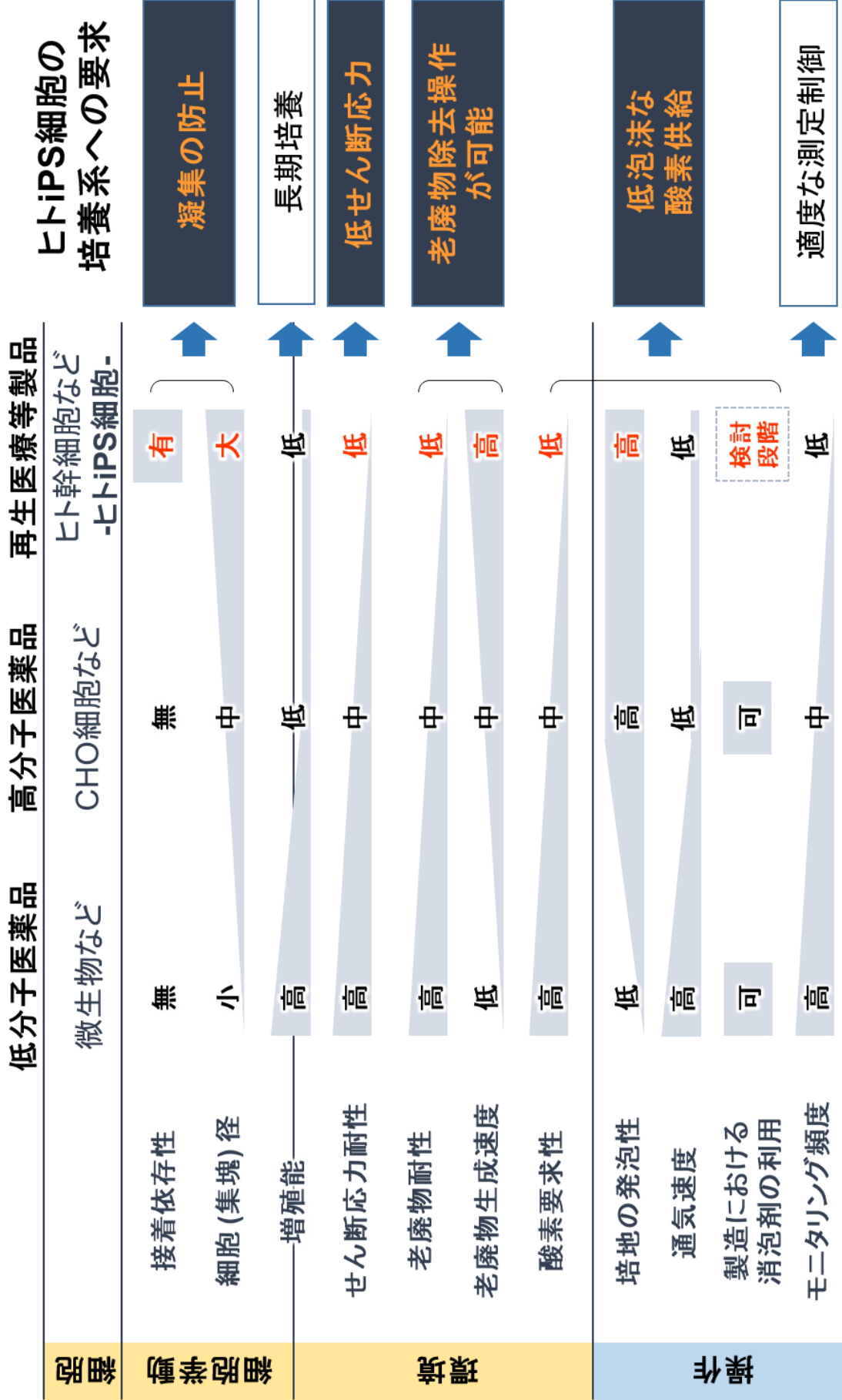


図 1.5 ヒト iPS 細胞の細胞特性に基づく培養系設計の概要

第2章 塑性流体を利用したヒト iPS 細胞の懸濁培養系の構築

2.1 緒言

接着依存性細胞であるヒト iPS 細胞の三次元懸濁型の大量培養装置を設計するためには、細胞集塊の過度な凝集を防ぐ分散状態の維持と、低せん断応力の環境の提供、また老廃物除去操作が可能で、低泡沫な酸素供給手法を擁する培養系の設計が求められる。従来の三次元懸濁培養系は、動的培養系 (dynamic culture system) であり、攪拌操作によって生じる流動力によって分散・混合状態の維持を行っているが、これは細胞にダメージを与えるせん断応力を生じる。攪拌翼や装置形状の検討により、せん断応力を抑制し細胞集塊の分散状態を維持する方法が提案されているが (Matsuura *et al.*, 2012; Hang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2021), 一般にせん断応力は培養槽のスケールアップに伴い増加するため、せん断応力にセンシティブなヒト iPS 細胞の大量培養系への適用は難しい。流動力を用いない静的培養系 (static culture system) において三次元の分散状態の維持を行うためには、細胞集塊に加わる重力に釣り合う垂直抗力を持つ構造体を用いる必要がある。ゲルを用いた包埋培養はその一例であるが、固相中での培養は、老廃物の除去が難しく、また物質拡散律速が生じやすいため大量培養には不適である。これに対し、液体培地に高分子化合物を溶解することで、液中に微小構造を形成し、浮遊培養を行う手法が提案されている (Otsuji *et al.*, 2014)。本手法ではガス透過性バッグ内で細胞集塊の分散状態を維持することで、無攪拌での培養を達成している。ただし、体積当たりの比表面積は培養規模の拡大に伴い減少するため、 10^1 L 以上の培養には不適であることが想定される。

従来の三次元懸濁培養装置では、下部通気操作による気泡導入が大規模な培養装置での酸素供給に用いられてきた。この操作をヒト iPS 細胞培養に適用するためには、せん断応力の抑制と発泡層の形成抑制が求められる。下部通気操作により生じるせん断応力は、気泡生成時に生じるせん断応力、バルク中での気泡と細胞の接触によるせん断応力、上昇す

る気泡に伴う流動によるせん断応力、液上面に達した発泡層を形成する気泡が破裂した際に生じるせん断応力などが挙げられている (Garcia-Briones and Chalmers, 1992; Meier *et al.*, 1999; Chisti, 2000). そのため、下部通気操作によるせん断応力を抑制するためには、導入する気泡数を抑え、かつ、気泡の上昇に伴う流動力を最低限に抑えることが要求される。また発泡層の形成抑制に対しても、導入する気泡数の抑制や、もしくは、消泡剤の利用が要求される (Prins *et al.*, 1987; Murhammer *et al.*, 1988).

塑性流体は、液中に微小構造を持つことで、降伏応力未満の力では流動せず固相のような様相を示す流体であり、比重の小さい細胞集塊に加わる重力は小さいために、構造による垂直抗力によって沈降抑制が可能となる。Otsuji *et al.* の用いた細胞集塊の分散状態の維持が可能な培地も本流体に分類される (Otsuji *et al.*, 2014). また塑性流体において降伏応力を越えた力が加わる領域は微小構造が破壊され流動が生じるが、加力を止めると時間経過とともに微小構造が回復することが知られている。このような現象をチキソトロピーと呼び、この構造回復に係る時間はチキソトロピー回復時間と呼ばれている。これらの特性は、流動を局所かつ一時的に抑制することが可能となると考えられる。

本章では、塑性流体を用いた際の挙動解析を行うことで、分散状態の維持と気泡上昇の抑制を可能とする流動特性を理解し、ベンチスケールにおいてカラム型培養装置を設計することで、下部通気による効率的な酸素供給を可能とするヒト iPS 細胞の静置培養系の設計を行った。

2.2 実験方法

2.2.1 ニュートン流体と塑性流体の調製

ニュートン流体として、市販の iPS/ES 細胞用未分化維持培地である mTeSR1™ medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) 並びに StemFit® AK02N (Ajinomoto Co. Inc., Tokyo, Japan) を用いた。塑性流体として、それぞれの培地に、ポリマー溶液 (FCeM™-series FP001 Solution; Nissan Chemical Industries Ltd., Tokyo, Japan) を室温で混合し、終濃度を 0.02 %に調整した培地を用いた。

2.2.2 塑性流体の流動解析

塑性流体 (ポリマー溶液を混合した StemFit® AK02N) の流動時の粘度, $\eta(\text{Pa s}^{-1})$ と降伏応力, $\tau_0(\text{Pa})$ はレオメーター (MCR301; Anton-Paar, Graz, Austria) を用いて解析を行った。降伏応力は 37°C に保温した塑性流体のせん断速度, $\tau(\text{Pa})$ とせん断応力, $\gamma(\text{s}^{-1})$ をレオメーターにより測定し, Herschel-Bulkley モデル (式 (1)) に従い算出した。

$$\tau = \tau_0 + K\gamma^n \quad (1)$$

ここで, K は一貫性インデックス, n はべき乗指数である。

2.2.3 気泡と粒子の挙動解析

ノズルとなる単一の針を下部中心部に設置したカラム型培養装置 (Fujimori Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan) に (図 2.1 A), 100 mL のニュートン流体 (StemFit® AK02N) 並びに塑性流体 (ポリマー溶液を混合した StemFit® AK02N) を充填し, それぞれに対して, 1.0×10^{-2} vvm から 5.0×10^{-2} vvm までの通気速度, $F(\text{vvm})$ で通気を行った。通気によりカラム中に導入された気泡が上昇する様子を, 高速度カメラ (K4; Katokoken Co. Ltd., Isehara, Japan)

を用いて 400 images s⁻¹ のフレームレートで撮影した。取得した画像から、画像処理ソフトウェア (ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて気泡上昇速度, v_b (mm/s) 液中の平均気泡滞在数, n_b (-) を測定し, また気泡を楕円体とみなした際の気泡体積, V_b (mm³) を測定した投影面積から算出した。またガスホールドアップ, ϕ (-) は, 気液二相の中で気相の占める体積比率として定義されるが, 気相体積 $n_b V_b$ (mm³) は, 液相体積, V_L (mm³) と比較し, $n_b V_b \ll V_L$ であるため, 式 (2) として定義し算出した。

$$\phi = \frac{n_b V_b}{V_L} \quad (2)$$

塑性流体中の細胞集塊を模した粒子 (red polyethylene microspheres; Cospheric LLC., Santa Barbara, CA, USA) の通気前後の分散状態を示すため, 通気前並びに通気開始から 20 min 後の画像を, カメラ (HDR-CX420; Sony Co. Tokyo, Japan) を用いて取得した。

2.2.4 ヒト iPS 細胞株と平面培養条件

実験で用いたヒト iPS 細胞, 1383D2 株は京都大学 iPS 細胞研究所 (Center for iPS Research and Application, Kyoto University, Kyoto, Japan) (Nakagawa *et al.*, 2014) から, Tic 株は JCRB 細胞バンク (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank) から得た。細胞は, ラミニン 511-E8 フラグメント (iMatrix-511; Nippi Inc., Tokyo, Japan) でコートされた培養面上で, 市販の iPS/ES 細胞用未分化維持培地 (1383D2 株は StemFit® AK02N, Tic 株は mTeSR1™ medium) を用い, 37°C, 5 %CO₂ 混合ガスの加湿環境下で培養した。継代操作として, まず培養面上で 4 日間培養した細胞に対し, 5 mM のエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (0.5 mmol/L EDTA/PBS solution; Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) と, 10 μ M の Rock 阻害剤 (CultureSure Y-27632; FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を溶解したリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered salts, PBS) を室温で 10 分間処理した。その後, 10 μ M の Rock 阻害剤を溶解した細胞剥離液 (TrypLE

Select™; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を加えて室温で 7 分間処理し、細胞を培養面から剥離した。回収した細胞懸濁液は、ピペッティング操作により細胞の単分散を行い、180 g, 3 分間の遠心分離を行った。その後、上清の除去、並びに 10 μ M の Rock 阻害剤を含む iPS/ES 細胞用未分化維持培地 (1383D2 株は StemFit® AK02N, Tic 株は mTeSR1™ medium) に細胞の再懸濁を行い、 2.5×10^3 cells/cm² の播種密度で、ラミニン 511-E8 フラグメント (iMatrix-511; Nippi Inc., Tokyo, Japan) でコートされた培養面に播種を行った。継代操作から 1 日後に、iPS/ES 細胞用未分化維持培地を用いて培地交換操作を行った。それ以後、一日おきに培地交換操作を行い、培養 4 日目に平面培養もしくは懸濁培養へと継代操作を行った。

2.2.5 翼攪拌型培養装置を用いた懸濁培養条件

懸濁培養は翼攪拌型培養装置 (BWV-S03A; Able Co., Tokyo, Japan) を用いた。培養面から剥離した単分散状態のヒト iPS 細胞 (Tic 株) を 10 μ M の Rock 阻害剤を含む iPS/ES 細胞用未分化維持培地 (mTeSR1™ medium) に懸濁し、 1.0×10^5 cells/mL の播種密度で、培養容量 30 mL として翼攪拌型培養装置に播種し、24 時間培養を行った。このとき、攪拌速度を 55 rpm とし、37°C, 5 %CO₂ 混合ガスの加湿環境下で培養した。24 時間培養を行った細胞集塊を回収し、通気条件並びに、攪拌条件と培地条件の異なる以下の 4 種類の懸濁培養条件下で、それぞれ 96 時間培養を行った。

コントロールとして、iPS/ES 細胞用未分化維持培地 (mTeSR1™ medium) に懸濁した細胞集塊を、翼攪拌型培養装置 (BWV-S03A) にて攪拌速度を 55 rpm の条件下で培養を行った。これに対し、同一培地、攪拌速度で、装置下部に設置した焼結ガラスに、炭酸ガス混合器 (Tokken Inc., Kashiwa, Japan) により調整した 5 % CO₂ ガスを、 1.7×10^{-2} vvm の通気速度で下部から通気を行う条件で培養を行った。塑性流体として、iPS/ES 細胞用未分化維

持培地 (mTeSR1™ medium) にポリマー溶液 (FCeM™-series FP001 Solution; Nissan Chemical Industries Ltd., Tokyo, Japan) を室温で混合し、終濃度を 0.02 %に調整した培地を作成した。本培地に細胞集塊を再懸濁し、翼攪拌型培養装置 (BWV-S03A) にて下部から 5 % CO₂ ガスを、 1.7×10^{-2} vvm の通気速度で通気を行い、無攪拌で培養する条件、並びに 165 分おきに 15 分間 55 rpm で攪拌する条件で培養を行った。このとき低頻度の攪拌を行う条件では、窒素ガスの上面通気を行い、培養液上部の窒素ガス置換を行った。全ての条件において、24 時間ごとに iPS/ES 細胞用未分化維持培地 (mTeSR1™ medium) の培地交換操作を行った。また 24 時間ごとにサンプリングした細胞集塊を位相差顕微鏡 (CKX53; Olympus Co., Tokyo, Japan) により画像取得を行い、10 分間の酵素処理 (Accumax; Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, CA, USA) により単分散処理し、トリパンブルー染色法によりカウントを行った。

2.2.6 カラム型培養装置を用いた懸濁培養条件

懸濁培養はカラム型培養装置並びに、翼攪拌型培養装置 (BWV-S10A; Able Co., Tokyo, Japan) を用いた (図 2.1 B)。前培養として、培養面から剥離した単分散状態のヒト iPS 細胞 (1383D2 株) を 10 μ M の Rock 阻害剤を含む iPS/ES 細胞用未分化維持培地 (StemFit® AK02N) に懸濁し、 1.0×10^5 cells/mL の播種密度で、培養容量 100 mL として翼攪拌型培養装置に播種し、48 時間培養を行った。このとき、攪拌速度を 40 rpm、温度を 37°C、溶存酸素濃度を 2.7 ppm になるように制御を行った。48 時間の前培養を行った細胞集塊を回収し、100 mL の塑性流体に再懸濁を行い、カラム型培養装置に播種を行った。炭酸ガス混合器 (Tokken Inc., Kashiwa, Japan) により調整した 5 % CO₂ ガスを、それぞれ $F=0$, 1.0×10^{-2} , 2.0×10^{-2} , 4.0×10^{-2} vvm の通気速度で通気を行い、37°C, 5 %CO₂ 混合ガスの加湿環境下で 48 時間培養を行った。比較対象として用いた翼攪拌型培養装置での培養は、培養 0

時間に iPS/ES 細胞用未分化維持培地 (StemFit® AK02N) への培地交換を行い，前培養と同条件で培養を継続して行った．培養期間における細胞増殖は，みかけの比増殖速度， μ^{app} (h) により評価した．培養 0 時間と培養 48 時間に細胞集塊を回収し，10 分間の酵素処理 (Accumax; Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, CA, USA) により単分散処理を行った．これらの懸濁液をトリパンブルー染色法によりカウントし，培養 0 時間の細胞密度 X_0 (cells/mL) と培養 48 時間の細胞密度 X_{48} (cells/mL) を算出した．48 時間の培養における μ^{app} は式 (3) を用いて算出した．

$$\mu^{\text{app}} = \frac{\ln(X_{48}/X_0)}{48} \quad (3)$$

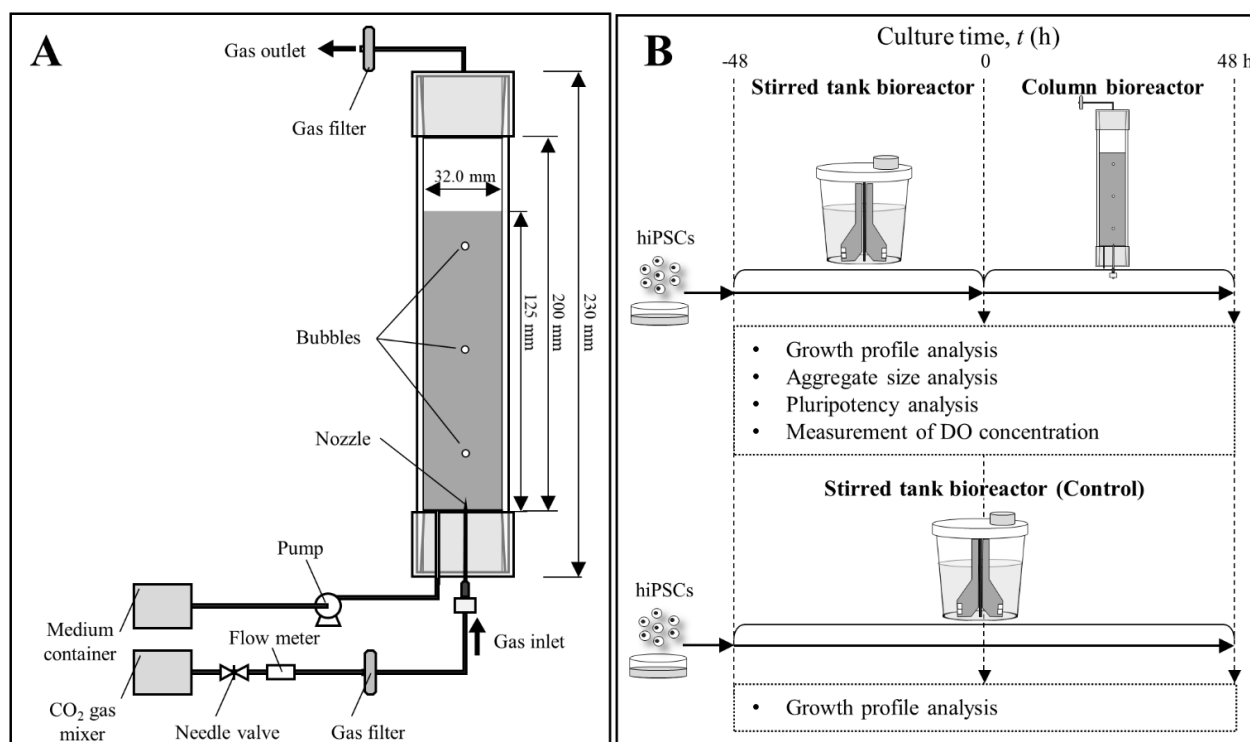


図 2.1 気泡塔型培養装置の概形 (A) と懸濁培養実験の概要 (B)

2.2.7 細胞集塊サイズの定量的解析

培養 0 時間と 48 時間の細胞集塊の明視野画像は，回収した細胞集塊懸濁液を 6 ウェルプレート (Corning Inc., Corning, NY, USA) に移し，10 倍対物レンズ付きの画像解析装置 (IN

Cell Analyzer 2000; GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を用いて取得した。取得した画像から、画像処理ソフトウェア (Image-Pro Plus 7.0; Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA) を用い、それぞれの条件において 800 個から 1000 個の細胞集塊の投影面積、 $S (\mu\text{m}^2)$ を解析した。また、細胞集塊の位相差画像は、位相差顕微鏡 (CKX53; Olympus Co., Tokyo, Japan) を用いて取得した。

2.2.8 溶存酸素濃度の解析

培養 48 時間における培養装置内の溶存酸素濃度は、光学式の酸素センサー (Presens Co., Regensburg, Germany) を用いて取得した。酸素センサーは酸素メーター (Microx TX3; Presens Co., Regensburg, Germany) に接続し、カラム型培養装置の上部から底部に挿入した。上部 (ノズル先端から 114 mm 付近)、中部 (ノズル先端から 62 mm 付近)、底部 (ノズル先端部) の点において、溶存酸素濃度が安定した値を示したことを確認し、それぞれの点での溶存酸素濃度を測定した。

2.2.9 フローサイトメトリーによる未分化状態の解析

培養 48 時間におけるヒト iPS 細胞の未分化状態を、多能性マーカーである Oct 3/4, SSEA-4, TRA-1-60 の発現をフローサイトメトリーにより評価した。培養 48 時間における細胞集塊は酵素処理 (Accumax) により単分散処理を行った。細胞は、固定化並びに透過処理試薬 (Cytotfix/Cytoperm™ permeabilization kit; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いた処理を行った後、それぞれ、Oct 3/4 マーカー (PE-conjugated human/mouse Oct 3/4 fluorescein ; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), SSEA-4 マーカー (FITC-conjugated human/mouse SSEA-4 fluorescein; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), TRA-1-60 マーカー (FITC-conjugated human/mouse TRA-1-60 fluorescein; Merck, Darmstadt, Germany) によって染色を行った。染色した細胞は、フローサイトメーター (Sysmex Co., Kobe, Japan) を用いて蛍光を検出し、解

析ソフトウェア (FlowLogic software; Inivai Technologies, Melbourne, VIC, Australia) を用いて解析を行った。

2.2.10 分化能の解析

培養 48 時間におけるヒト iPS 細胞を回収し、10 分間の酵素処理 (Accumax) により単分散処理を行った後に再度播種を行い、市販の三胚葉系への分化誘導培地 (Stemdiff™ trilineage differentiation kit; Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) を用いて培養を行うことにより分化能の有無を評価した。提供されるプロトコルに従い培養を行った細胞を、PBS で洗浄し、4 %パラホルムアルデヒド (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いて室温で 10 分間、固定化処理を行った。PBS で洗浄後、0.5 % Triton X-100 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を溶解した PBS で 5 分間、膜透過処理を行った。洗浄後、ブロックエースを用いて、室温で 90 分間処理することで、非特異的なタンパク質を遮蔽した。その後、10 %のブロックエースを含む PBS で希釈した一次抗体を、温度を 4°C で一晩処理を行った。一次抗体はそれぞれ、Anti-PAX6 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Anti-Brachyury (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Anti-SOX17 (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA) を用いた。トリス緩衝生理食塩水 (TBS) で洗浄後、Alexa Fluor488 標識二次抗体 (AF488 goat anti-rabbit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を室温で 60 分間処理した。細胞核は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて染色を行った。PBS で洗浄後、10 倍対物レンズ付きの画像解析装置 (IN Cell Analyzer 2000) を用いて免疫蛍光染色画像を取得した。

2.2.11 統計分析

塑性流体の流動は、それぞれの条件につき 3 つの異なる塑性流体を準備し、せん断応力

並びに降伏応力の測定を行った．気泡の挙動は，それぞれの条件につき 10 個の気泡挙動の測定を行った．懸濁培養はそれぞれの実験条件につき 3 回の実験を行った．統計解析は Student's *t*-test を使用し，有意水準は $p < 0.01$ および $p < 0.05$ とした．

2.3 結果

2.3.1 ニュートン流体と塑性流体の流動特性

高分子化合物の溶解による培地の流動特性を比較した．ポリマー溶液を溶解した培地の流動時の粘度は $(1.84 \pm 0.03) \times 10^{-3} \text{ Pa s}$ であり，通常の未分化維持培地の粘度 $(1.11 \pm 0.06) \times 10^{-3} \text{ Pa s}$ と比較し，僅かに増加した．また本流体のせん断速度とせん断応力の関係は，塑性流体の代表的な挙動を示しており，降伏応力は $\tau_0 = 0.23 \pm 0.02 \text{ Pa}$ であった (図 2.2)．そこで通常の培地をニュートン流体，高分子化合物を溶解した培地を塑性流体として以後の検討に用いた．

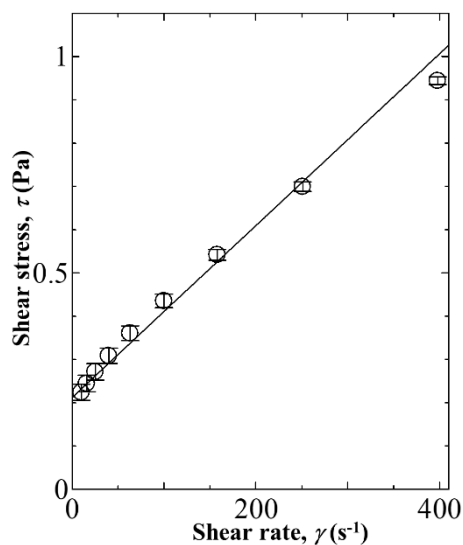


図 2.2 ポリマー溶液を混合した培地 (StemFit® AK02N) におけるせん断速度, $\gamma(\text{s}^{-1})$ とせん断応力, τ (Pa) の関係．エラーバーはそれぞれ 3 つの調製した流体におけるせん断応力の標準偏差を示し ($n = 3$)，実線は Herschel-Bulkley モデルに基づく以下の式を示す；

$$\tau = 0.23 + 0.0018\gamma$$

2.3.2 翼攪拌型培養装置における気泡導入を伴うヒト iPS 細胞培養

ニュートン流体を用いた小規模の翼攪拌型培養装置では、上面通気のみするときヒト iPS 細胞は増殖した (図 2.3). これに対し、下部通気を伴う場合、細胞集塊は崩壊し (図 2.4), 細胞密度は減少する様子がみられた. 一方で、塑性流体を用い下部通気を伴い培養を行った条件では、無攪拌の場合、培養 48 時間まで細胞密度が増加し、その後、増殖が停止する様子が確認された. また低頻度の攪拌を伴う条件では、コントロールと同等の増殖が確認された.

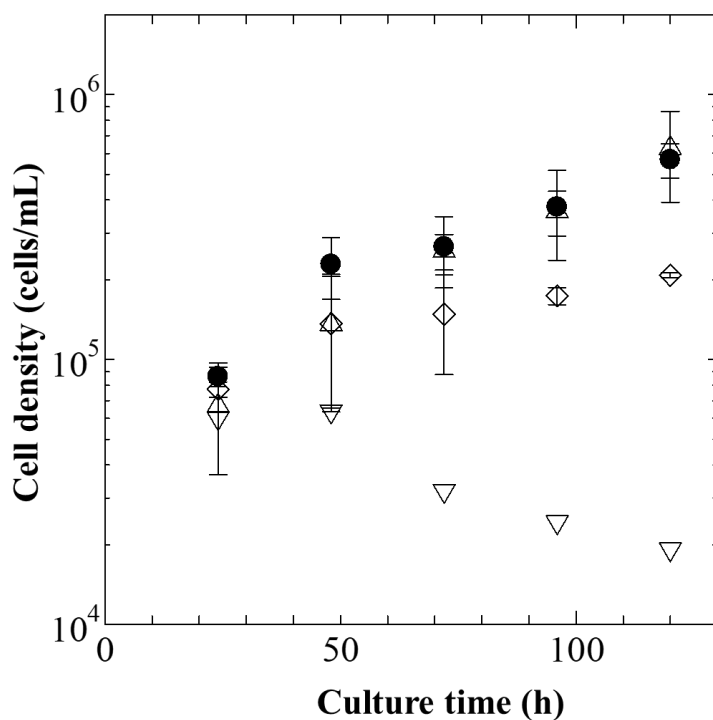


図 2.3 時間経過に伴う細胞密度の推移. 上向きの三角形はニュートン流体中で連続的に攪拌を行い、下部通気を行わなかった条件、下向きの三角形はニュートン流体中で連続的に攪拌を行い、下部通気を行った条件、ひし形は塑性流体中で攪拌を行わず、下部通気を行った条件、黒丸は塑性流体中で攪拌を 165 分おきに 15 分を行い、下部通気を行った条件をそれぞれ示している.

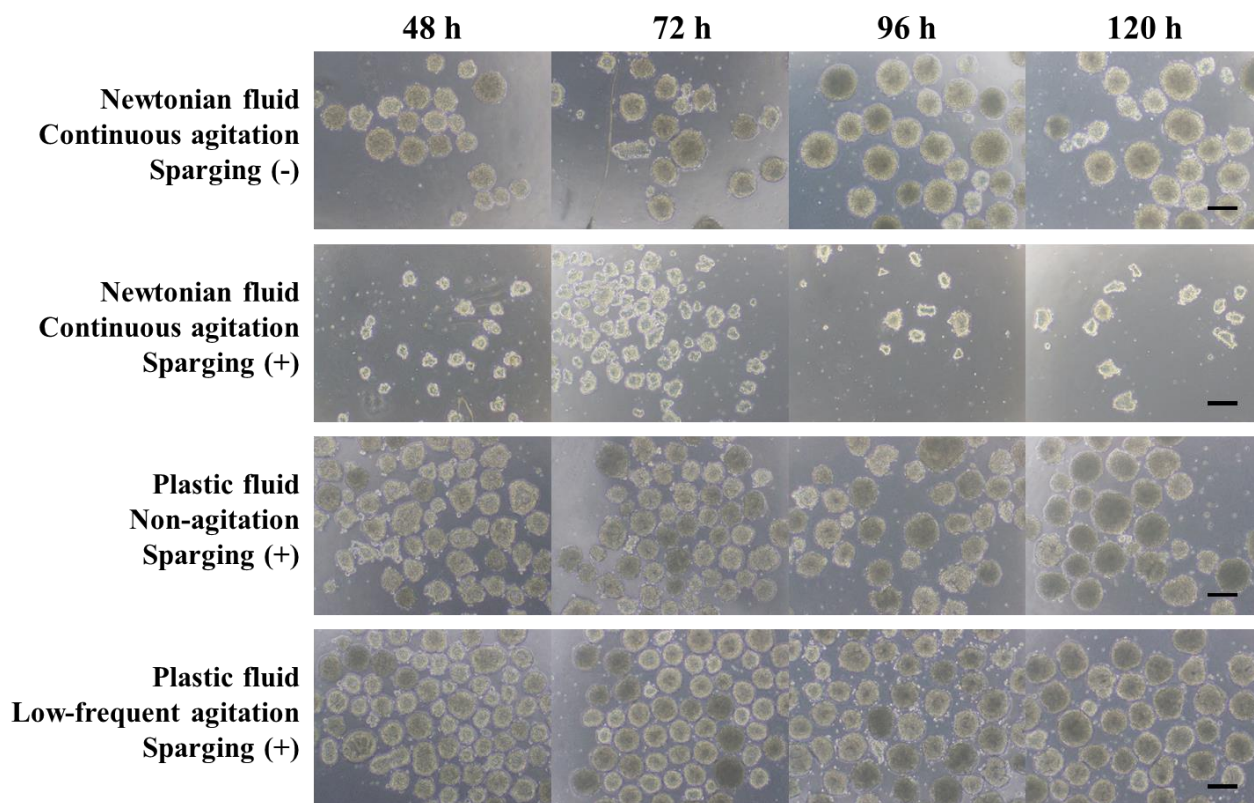


図 2.4 各培養条件における培養 24 時間ごとの細胞集塊の位相差画像. ニュートン流体を用いた条件では, 55 rpm で連続的に攪拌を行い, 下部から気泡導入の有無による増殖を比較した. 塑性流体を用いた条件では, 下部からの気泡導入を行い, 無攪拌並びに, 165 分おきに 15 分攪拌する低頻度の攪拌条件での増殖を比較した. スケールバー: 200 μm

2.3.3 ニュートン流体中と塑性流体中における細胞集塊と気泡の挙動

各流体における通気による影響を比較するために、細胞集塊を模した粒子の分散と気泡の体積、上昇速度並びにガスホールドアップを評価した。通常の培地では細胞集塊は重力により沈降するが、実験に用いた高分子化合物は、培地に溶解することで、細胞集塊の沈降を防ぐことが報告されている (Otsuji *et al.*, 2014)。本研究においても、細胞集塊を模した粒子の分散状態が、通気前の塑性流体中で維持されている様子が観察された (図 2.5)。20 分間の通気を行った後の粒子の分散状態は $F = 1.0 \times 10^{-2}$, 2.0×10^{-2} vvm の低流速の通気条件において維持された。一方で、 $F = 3.0 \times 10^{-2}$ vvm 以上の条件では、粒子が沈降の様子が確認された。

流体中に導入された気泡の体積は、流体の種類や通気速度に関わらず同程度の値を示した (図 2.6A)。ニュートン流体中では、気泡の上昇速度も通気速度に関わらず同程度の値を示したのに対し、塑性流体中の気泡上昇速度は、 $F = 1.0 \times 10^{-2}$, 2.0×10^{-2} , 3.0×10^{-2} vvm の通気速度条件において、ニュートン流体中と比較し小さい値を示した (図 2.6B)。一方で、 $F = 4.0 \times 10^{-2}$ vvm の通気条件では、ニュートン流体中と塑性流体中ともに、 $v_b = (1.90 \pm 0.04) \times 10^2$ mm/s であり上昇速度は同じであった。気泡上昇速度の低下に伴い、低流速条件 ($F = 1.0 \times 10^{-2}$, 2.0×10^{-2} , 3.0×10^{-2} vvm) では、塑性流体におけるガスホールドアップはニュートン流体と比較し高い値を示した (図 2.6C)。液中に順番に導入された気泡が同じ点を通過する時間間隔、 Δt (s) は、気泡の導入頻度の逆数である。通気速度に関わらず気泡体積が一定であるため、通気速度と Δt は反比例の関係を示した (図 2.7A)。 $\Delta t < 0.9$ s のとき、塑性流体中の気泡上昇速度はニュートン流体中と同程度の値を示した (図 2.7B)。一方、 $\Delta t = 0.9$ s ~ 1.4 s の区間で塑性流体中の気泡上昇速度は急激に減少し、 $\Delta t > 1.4$ s において、ニュートン流体中と比較し小さい値を示した。気泡による酸素供給効率を示す、通気速度あたりのガスホールドアップは、塑性流体中において、通気速度が小さい条件 ($F = 1.0 \times 10^{-2} \sim$

2.0×10^{-2} vvm) では, 大きい条件 ($F > 4.0 \times 10^{-2}$ vvm) と比較して高い値を示した (図 2.8).

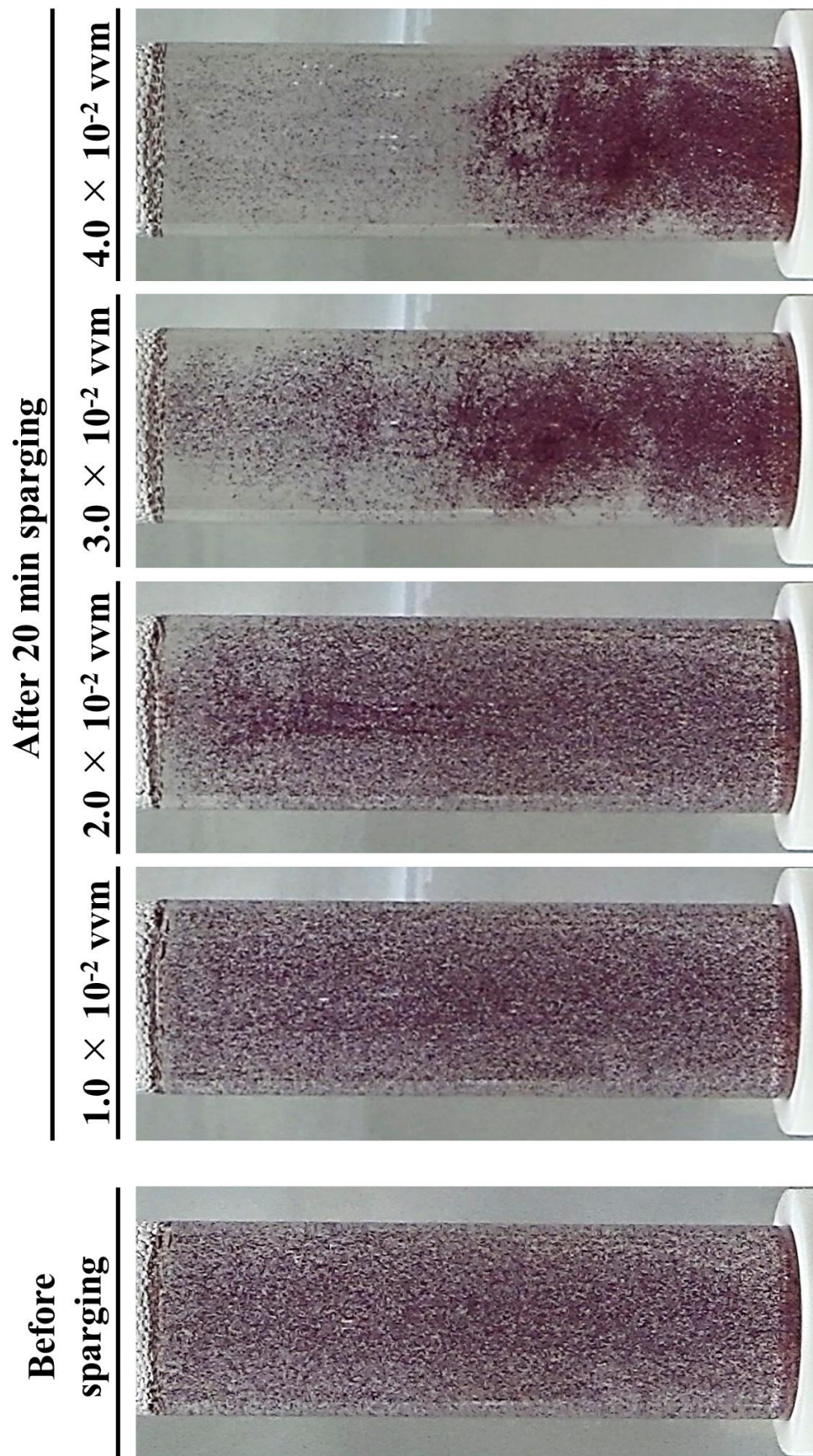


図 2.5 塑性流体中の細胞集塊を模した粒子の分散画像．通気前並びにそれぞれ $F = 1.0 \times 10^{-2}$, 2.0×10^{-2} , 3.0×10^{-2} , 4.0×10^{-2} vvm の通気速度で 20 分間通気を行った後の様子を示す．

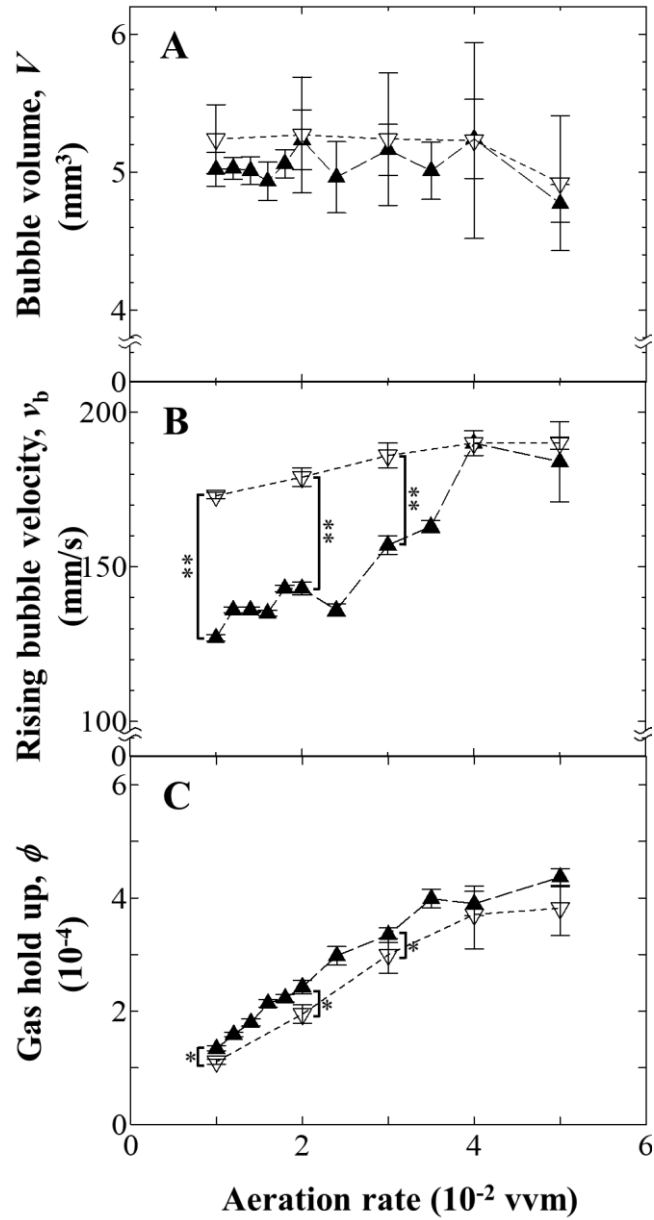


図 2.6 流体中にそれぞれの通気速度で気泡を導入した際の気泡の体積, V (mm^3) (A), 気泡上昇速度, v_b (mm/s) (B) とガスホールドアップ, ϕ (-) (C). 下向きの白三角形はニュートン流体中での挙動を, 上向きの黒三角形は塑性流体中での挙動を示す. エラーバーは標準偏差を示し, 有意差は Student's t -test により分析した $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (bubble number $n = 10$ in each condition).

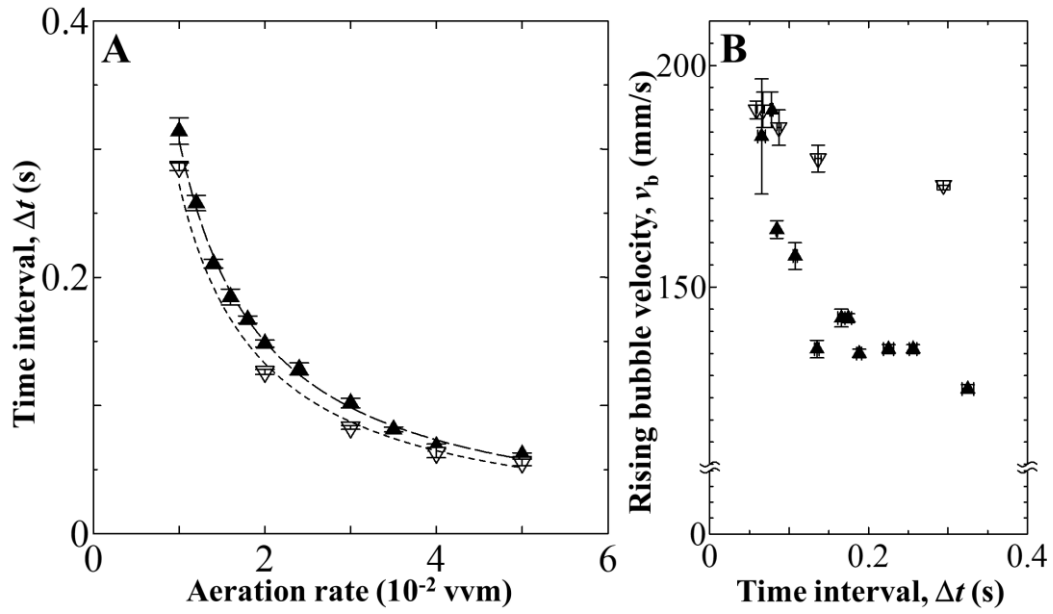


図 2.7 通気速度と気泡が同一点を順番に通過する際の時間間隔, Δt (s) の反比例関係 (A) と, 各時間間隔における気泡上昇速度, v_b (mm/s) (B). 下向きの白三角形はニュートン流体中での挙動を, 上向きの黒三角形は塑性流体中での挙動を示す. エラーバーは標準偏差を示す (bubble number $n = 10$ in each condition).

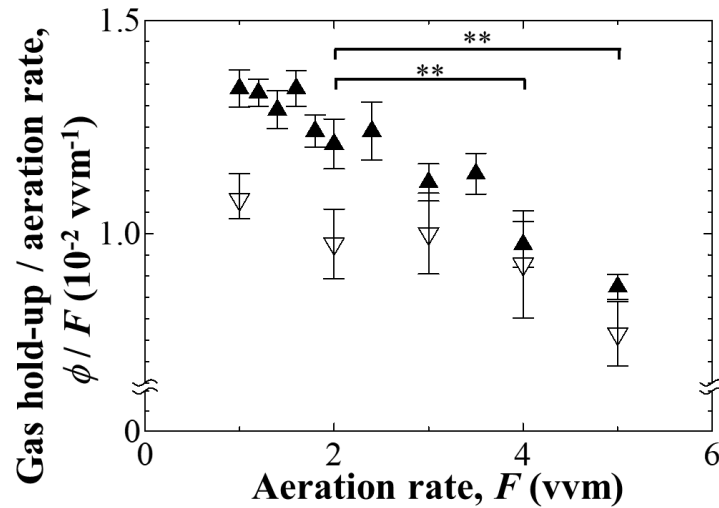


図 2.8 各通気速度における液中に滞在する気泡による酸素供給効率 (通気速度あたりのガスホールドアップ). 下向きの白三角形はニュートン流体中での挙動を, 上向きの黒三角形は塑性流体中での挙動を示す. エラーバーは標準偏差を示し, 有意差は Student's t -test により分析した $**p < 0.01$ (bubble number $n = 10$ in each condition).

2.3.4 カラム型培養装置における塑性流体を用いた気泡導入を伴うヒト iPS 細胞培養

塑性流体を用いた気泡通気を伴う三次元懸濁培養系でのヒト iPS 細胞増殖を評価するため、シングルノズルのカラム型培養装置を用いて培養を行った。無通気条件では、みかけの比増殖速度は $\mu^{app} = (-0.53 \pm 0.04) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ であり、増殖がみられなかった (図 2.9 下部破線)。 $F = 1.0 \times 10^{-2}$, $2.0 \times 10^{-2} \text{ vvm}$ におけるみかけの比増殖速度は、それぞれ $\mu^{app} = (1.24 \pm 0.32) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, $\mu^{app} = (1.94 \pm 0.59) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ であり、通気速度の増加とともに増殖が向上する様子が確認された。また $F = 2.0 \times 10^{-2} \text{ vvm}$ の条件における細胞集塊の投影面積分布は増加する傾向がみられた (図 2.10)。一方で、 $F = 4.0 \times 10^{-2} \text{ vvm}$ の高い通気速度におけるみかけの比増殖速度は $\mu^{app} = (0.19 \pm 0.43) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ であった。このとき、 $S < 10 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ の範囲の投影面積の分布は培養前後で大きな変化がみられなかったが、 $S > 10 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ の細胞集塊の頻度は培養後に大きく増加することが確認され、複数の細胞集塊が凝集したような大きなサイズの集塊が観察された。 $F = 1.0 \times 10^{-2}$, $2.0 \times 10^{-2} \text{ vvm}$ の条件では、培養 48 時間において、細胞集塊の沈降がほとんどみられなかったが、 $F = 4.0 \times 10^{-2} \text{ vvm}$ の高い通気速度では細胞集塊が装置中心部から下部まで沈降している様子が確認された (図 2.11)。培養終了時における溶存酸素濃度は、最も高いみかけの比増殖速度がみられた $F = 2.0 \times 10^{-2} \text{ vvm}$ において、翼攪拌型培養装置と同程度から少し低い値を示した (図 2.12)。一方で、最も高い通気速度である $F = 4.0 \times 10^{-2} \text{ vvm}$ では、細胞集塊の分布が少ない装置上中部では溶存酸素濃度は他の条件と比較し高い値を示したが、沈降した細胞集塊が多数分布する下部では $1.10 \pm 0.06 \text{ ppm}$ であり、他の条件と同程度の値を示した。培養終了時のヒト iPS 細胞は、いずれの条件においても 0.9 以上の高い多能性マーカー (TRA-1-60, SSEA-4, Oct 3/4) 発現を示した (図 2.13)。また $F = 2.0 \times 10^{-2} \text{ vvm}$ で培養を行ったヒト iPS 細胞は、その後三胚葉系への分化誘導培養により、全ての系の分化マーカーの発現が確認された (図 2.14)。

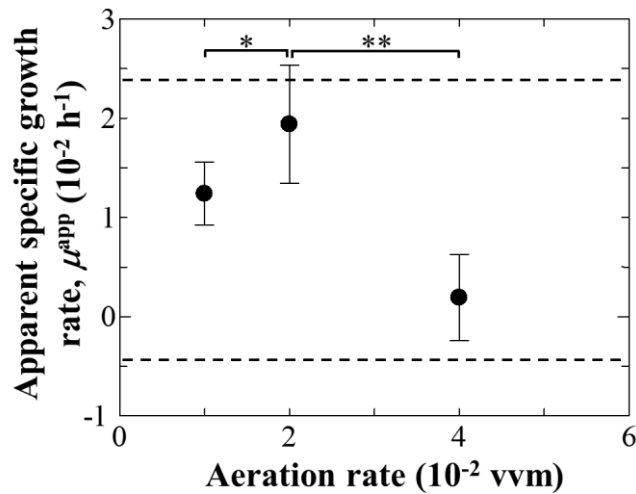


図 2.9 塑性流体を用いた培養系における，各通気速度条件でのみかけの比増殖速度．上部破線は翼攪拌型培養装置における，みかけの比増殖速度の平均値 ($\mu^{\text{app}} = (2.30 \pm 0.06) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$) を示し，下部破線は無通気条件でのカラム型培養装置でのみかけの比増殖速度の平均値 ($\mu^{\text{app}} = (0.19 \pm 0.43) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$) を示す．エラーバーは標準偏差を示し，有意差は Student's *t*-test により分析した $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ ($n = 3$ in each culture condition).

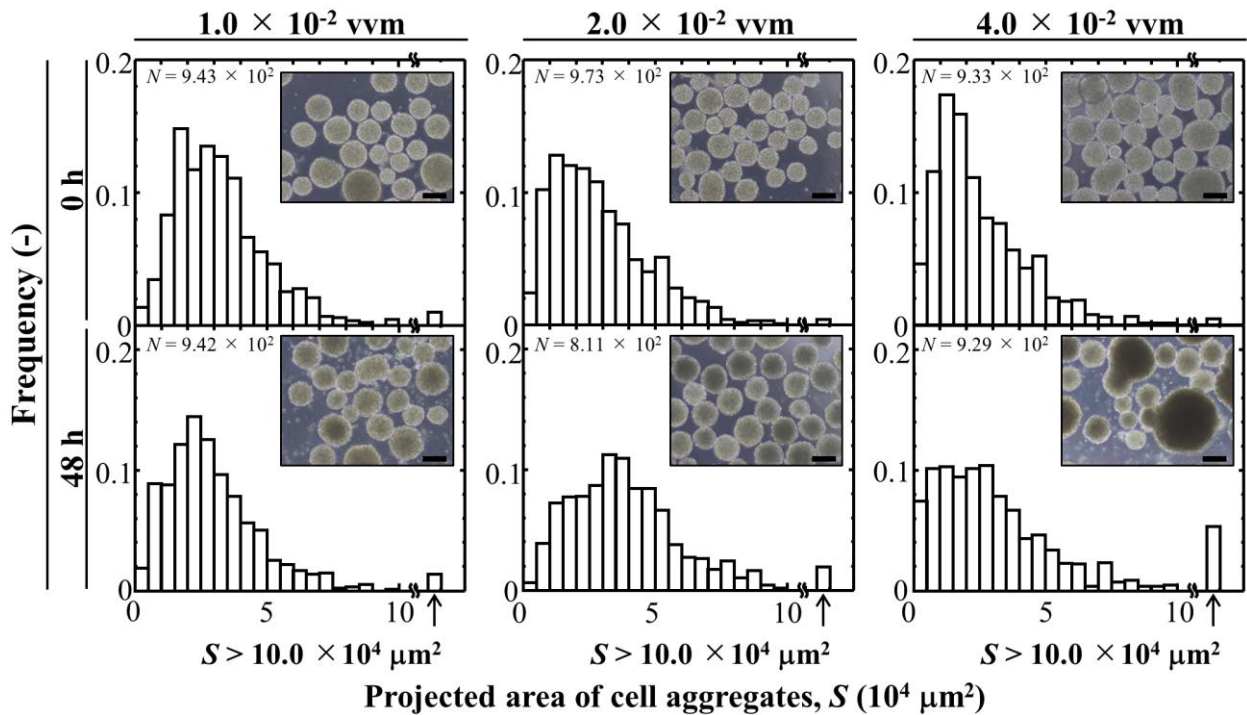


図 2.10 各通気速度における培養 0 時間と 48 時間の細胞集塊の投影面積分布と位相差画像．

N は各条件における測定を行った細胞集塊数を示す．スケールバー: 200 μm

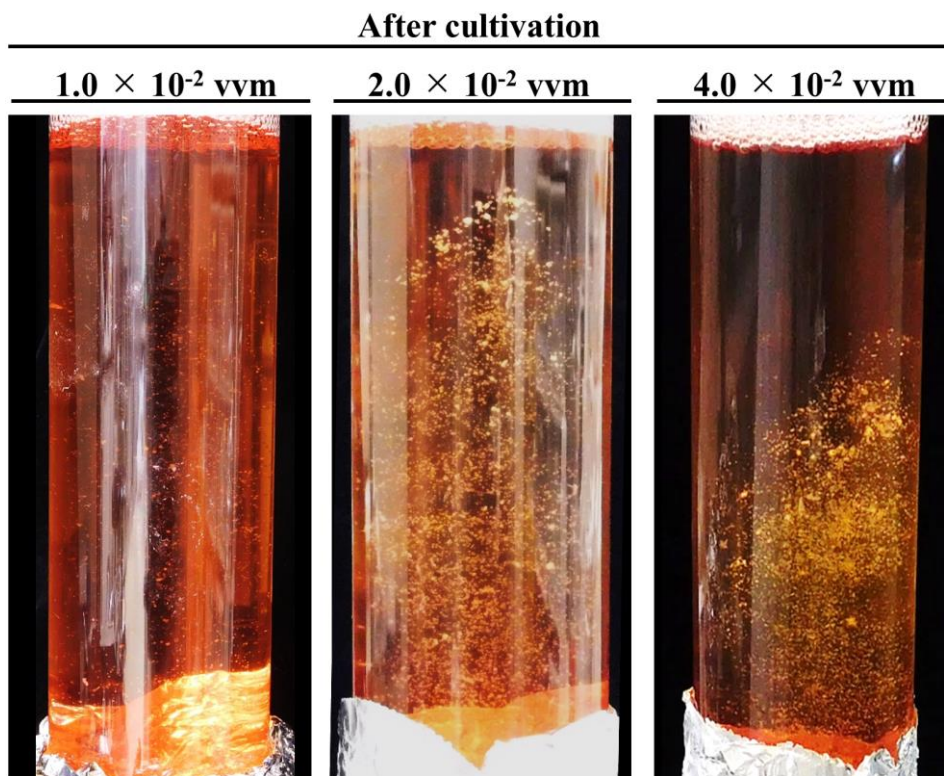


図 2.11 各通気速度で 48 時間培養を行った後の，装置内の細胞集塊の分布画像

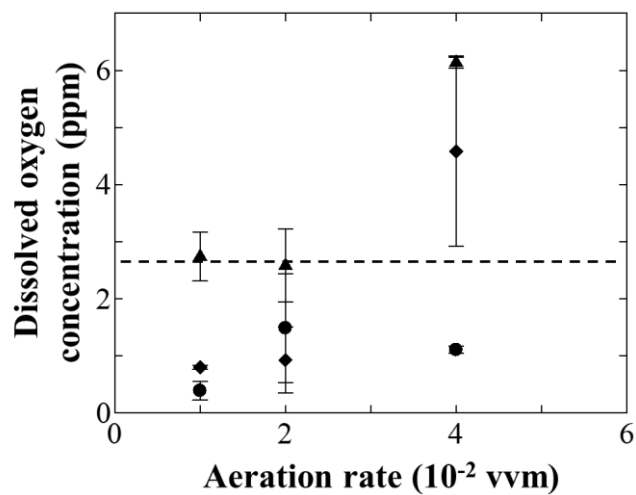


図 2.12 各通気速度で 48 時間培養を行った後の装置内の溶存酸素濃度．三角形は装置上部の，ひし形は装置中部の，丸は装置下部の溶存酸素濃度を示す．破線は翼攪拌型培養装置における培養で設定している溶存酸素濃度を示し，エラーバーは標準偏差を示す ($n = 3$ in each culture condition).

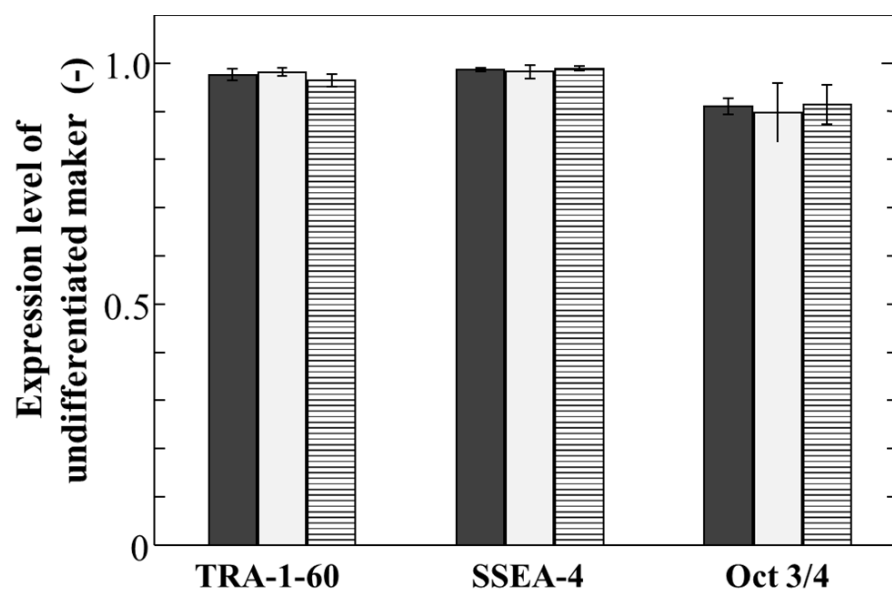


図2.13 フローサイトメトリーによる各培養条件での多能性マーカー (TRA-1-60, SSEA-4, Oct 3/4) 発現. 黒いバー, 白いバー, 斜線のバーはそれぞれ $F = 1.0 \times 10^{-2}$, 2.0×10^{-2} , 4.0×10^{-2} vvm の通気速度を示し, エラーバーは標準偏差を示す ($n = 3$ in each culture condition).

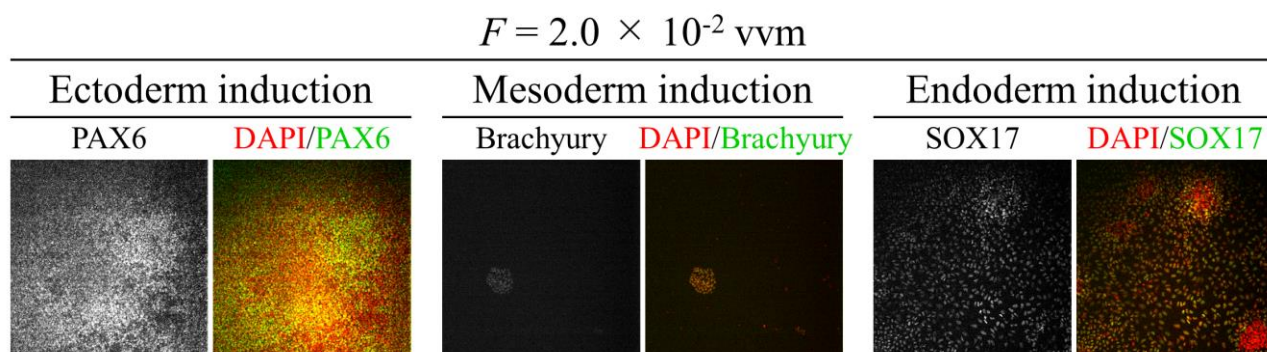


図 2.14 $F = 2.0 \times 10^{-2}$ vvm で培養を行ったヒト iPS 細胞の三胚葉系への分化培養後の免疫蛍光染色画像. 重ね合わせた画像は, それぞれ赤色が DAPI, 緑色が Ectoderm の分化マーカーとして PAX6, Mesoderm の分化マーカーとして Brachyury, Endoderm の分化マーカーとして SOX17 を示す.

2.4 考察

小規模な翼攪拌型培養装置においても気泡の導入と攪拌を行った条件では、ヒト iPS 細胞集塊は崩壊し、細胞密度の減少がみられた。下部通気操作と攪拌操作を同時に行うことで細胞へのダメージが大きくなることが知られており (Oh *et al.*, 1992), せん断応力耐性の低いヒト iPS 細胞は通気攪拌培養では増殖できないことが示唆された。これに対し、無攪拌での浮遊維持が可能な塑性流体を用いた培養系では (Otsuji *et al.*, 2014), 通気を伴う条件下において細胞の増殖がみられた。低頻度の攪拌の有無により細胞の到達密度に差がみられ、無攪拌の条件では培養後期での増殖停止が、低頻度の攪拌を行った条件では、ニュートン流体中における上面通気のための連続攪拌条件と同等の増殖を示した。これは、無攪拌条件において生じる局所的な物質濃度の偏りによることが示唆される。これらの結果は、塑性流体を用い、拡散を考慮した培養系を設計することで、気泡通気による酸素供給が可能な、無攪拌もしくは最低限の攪拌を伴う気泡塔型の培養装置が、ヒト iPS 細胞の大量培養に適する可能性を示唆しており、ラボスケールにおける塑性流体中での挙動解析による重要変数の検討を行った後に、ベンチスケールのカラム型培養装置を用いた培養を行った。

塑性流体中の気泡体積に有意な差が無いのに対し、気泡の上昇速度は $F = 3.0 \times 10^{-2}$ vvm 以上の通気速度の条件で増加した (図 2.6A, B)。塑性流体の流動特性は、液中に存在する高分子化合物などの微小構造に依存する (Gaecia *et al.*, 2011)。この微小構造は降伏応力より大きいせん断応力により破壊されるが、応力を加えることを止めると、時間経過とともに再び回復することが知られている (Cheng, 1986; Møller *et al.*, 2006)。この構造の回復に掛かる時間は「チキソトロピー回復時間」と呼ばれ、流体の種類に依存する。気泡が通過する時間間隔、 Δt が 0.14 s 未満のとき、塑性流体中の気泡上昇速度はニュートン流体中の値に近づき (図 2.7B), また細胞集塊を模した粒子の沈降が確認された (図 2.15A)。塑性流体中の微小構造の抵抗力や垂直抗力により、気泡の上昇抑制や粒子の分散維持が可能であると

考えられる．上昇する気泡は周囲にせん断応力を加えるため (Bhavaraju *et al.*, 1978; Putz *et al.*, 2008), 微小構造は破壊される． Δt が 0.14 s 未満では, 気泡間のこの構造の回復が十分でないために気泡上昇速度の増加や粒子の沈降が生じたことが考えられる (図 2.15B). 一方で, Δt が 0.14 s 以上のとき, 気泡間に回復した微小構造が存在し, 抵抗力が大きくなるために気泡上昇速度が抑制されたと考えられる (図 2.15C). このことから本流体のチキソトロピー回復時間は 0.14 s であることが示唆される．

粒子や細胞集塊の分散状態も同様に, Δt が 0.14 s 以上の条件で維持された (図 2.15D). Mougín *et al.* の報告では, 塑性流体中を上昇する気泡の軌跡上に存在する粒子は, 気泡の上昇に伴い移動するものの, 軌跡外の気泡周囲の粒子は α 型の軌跡を描くように同一箇所に維持される (Mougín *et al.*, 2012). また気泡の中心部から気泡半径の 3.5 倍以上離れた領域では, 粒子は移動せず, 塑性流体は構造を維持することが報告されている．そのため本培養系では, 気泡が上昇する周囲では細胞集塊にせん断応力が加わり, 移動が生じるものの, それ以外の大半の領域ではせん断応力が加わらず分散状態の維持が可能であることが示唆される．

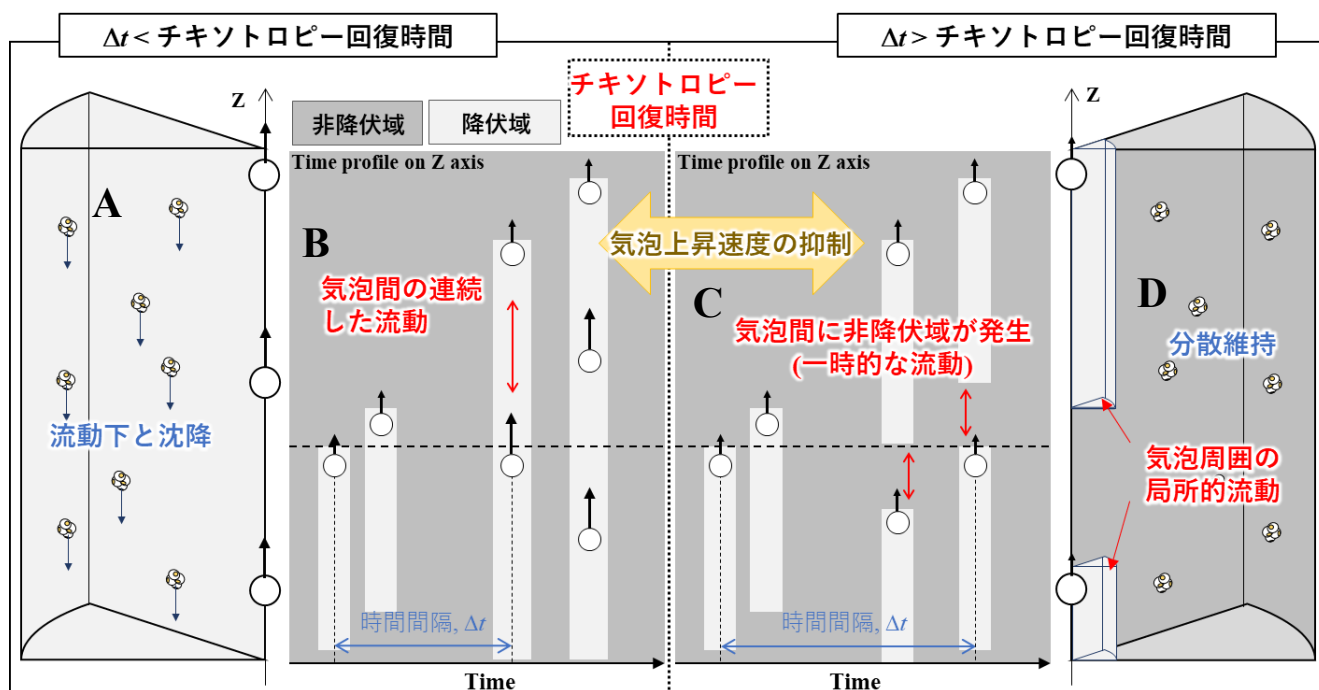


図 2.15 塑性流体に気泡導入を行った際の流動に関する概念図．気泡通過の時間間隔 Δt がチキソトロピー回復時間より小さい場合における細胞集塊の沈降 (A) と気泡上昇速度の増加 (B), 並びに, Δt がチキソトロピー回復時間より大きい場合の気泡上昇速度の抑制 (C) と流動域の限定による浮遊維持 (D).

培養終了時の細胞集塊の装置内での分散は, 粒子を用いた検討と同様に $F = 1.0 \times 10^{-2}$, 2.0×10^{-2} vvm の通気条件で維持された. 無通気条件から, 通気速度の増加に伴い, みかけの比増殖速度は増加しており, 細胞増殖は酸素供給速度に依存していることが示唆される. $F = 2.0 \times 10^{-2}$ vvm におけるみかけの比増殖速度は $\mu^{\text{app}} = (1.94 \pm 0.59) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ であり, 従来の翼攪拌型培養装置を用いた三次元懸濁培養でのみかけの比増殖速度 ($\mu^{\text{app}} = (2.30 \pm 0.06) \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, 図 2.7, 上部破線) に近い値を示した. また培養後のヒト iPS 細胞は多能性マーカー発現並びに (図 2.13), 三胚葉系への分化能を示した (図 2.14). これらの結果は, 塑性流体を用いた通気を伴う本培養系は, ヒト iPS 細胞の多能性を維持したまま増殖が可能な三次元懸濁培養系であることを示唆している. ただし, $F = 4.0 \times 10^{-2}$ vvm の通気条件にお

いてみかけの比増殖速度は低下した。本条件下では培養終了時において細胞集塊の沈降がみられており、その結果装置中下部の細胞集塊密度が増加する様子が観察された (図 2.11)。このとき、 $S > 10 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ の細胞集塊頻度は他の条件と比較して大きく増加した (図 2.10)。位相差画像から複数の集塊が凝集したような形状の細胞集塊が多くみられており、本通気条件では沈降による集塊同士の合一が生じたことが示唆される。径の大きな細胞集塊の増殖は、圧迫に伴う接触阻害や基質などの拡散律速などにより阻害されることが知られている (Nath *et al.*, 2017)。また沈降により細胞集塊の密度が増加した装置の下部における溶存酸素濃度は $1.10 \pm 0.06 \text{ ppm}$ と低い値を示しており、これらによって細胞増殖が抑制されたことが示唆される。

ヒト iPS 細胞の比酸素消費速度は抗体生産等に用いられている CHO 細胞等と比較し、2 分の 1 程度と少し小さく、また 4 % の低酸素濃度条件において、細胞の比増殖速度と最大細胞密度が向上することが知られている (Abecasis *et al.*, 2017)。過度な気泡の導入は、発泡層を形成し、せん断応力に伴う細胞へのダメージや (Garcia-Briones and Chalmers, 1992)、ガス通気の圧力損失、排気系への溢流などの問題を生じるために、このように酸素要求の比較的小さいヒト iPS 細胞培養においては、最低限の通気による酸素供給が求められる。従来のヒト iPS 細胞培養装置では、気泡導入を伴わない上面通気のみでの酸素供給を行っているが、培養体積の増加とともに比表面積は減少するために (Marks, 2003)、 10^2 L 以上の規模への適用は難しい。一方で本培養系では気泡導入による酸素供給でのヒト iPS 細胞増殖が可能であり、そのガスホールドアップは酸素消費速度の大きい微生物や植物細胞培養と比較して非常に小さい (表 4)。加えて、通気速度あたりのガスホールドアップの値、 ϕ/F (vvm^{-1}) は、上下混合流や気泡分割機構の存在する翼攪拌型培養装置や気泡塔型培養装置に近い値を示しており、これらは本培養系による気泡上昇の抑制が、酸素供給の効率化につながることを示唆している。このように、本研究により提案した無攪拌での気泡通気を伴

う新規培養系の適用により，ヒト iPS 細胞の 10^2 L 以上の規模の培養装置の開発が期待される．

表 4 細胞と培養装置，通気速度あたりのガスホールドアップの比較

bioreactor system		cell type	ϕ (10^{-3})	ϕ/F (10^{-2} vvm $^{-1}$)	Reference
Column bioreactor	hiPSC	(mammalian cell)	0.14	1.2	Our data
Balloon-type bubble bioreactor	<i>Ginseng</i> cell	(plant cell)	7.0	1.8	Dong <i>et al.</i> (2013)
Bubble column bioreactor	<i>Escherichia coli</i>	(microbe)	120	2.4	Khanchezar <i>et al.</i> (2019)
Stirred tank bioreactor	<i>Escherichia coli</i>	(microbe)	3.0	1.0	Campani <i>et al.</i> (2015)

2.5 小括

塑性流体中において，流動は上昇する気泡周囲の一時的かつ，局所的な範囲に抑制されることが示された．またチキソトロピー回復時間より大きい時間間隔での気泡導入により，気泡上昇速度が抑制され，通気速度あたりのガスホールドアップは向上し，酸素供給の向上が期待された．培養系では細胞集塊の分散状態を無攪拌で維持したまま，既存の懸濁培養装置と同等の増殖が示され，気泡導入による酸素供給が可能な無攪拌のヒト iPS 細胞の新規培養系が構築された．

第3章 総括

本学位論文では、ヒト iPS 細胞の大量培養を目的とした培養装置の設計指針を示すために、塑性流体を応用したヒト iPS 細胞集塊の懸濁培養系設計に関する研究を行った。

第 1 章では、ヒト幹細胞の培養装置設計を達成するための考え方の構築を行った。細胞製造に用いられるヒト幹細胞の装置設計では、生物学的観点からみた細胞培養系に対する要求と、工学的観点からみた装置・操作による細胞培養系への要求の間に、従来の細胞培養では考慮の必要がなかった隔たりが存在する。これは既存の装置・操作などの仕組みでは、ヒト幹細胞培養への適用に限界が生じることを意味している。そこで、細胞特性に基づく培養系設計の考え方を提案した。細胞特性は選択した細胞により異なるが、特に細胞製造に用いられるヒト幹細胞は、細胞そのものを製品とするために、製造要求に合わせた細胞の設計が難しい。ヒト幹細胞は、その多くが接着依存性であるために、接着による細胞挙動の理解と、挙動に適した培養系の構築が必要である。加えて、代表的なヒト幹細胞は、せん断応力耐性と老廃物耐性が低く、また一方で老廃物の比生成速度が高いため、低せん断応力かつ老廃物の除去が可能な培養系が必要とされる。加えて、酸素要求性は低いが大規模な装置では依然として酸素供給が律速となる。起泡性の高い培地が使用されるため、気泡導入といった操作設計も必要となる。このように、細胞製造に用いる大量培養装置設計では、培養系の構築に新たな考え方が必要とされており、本章ではその考え方に基づきヒト iPS 細胞の培養に要求される培養系を提案した。

第 2 章では、1 章で示した装置設計の考え方に基づき、塑性流体を応用することで、下部通気による酸素供給が可能となる無攪拌懸濁培養系の構築を行った。塑性流体中への気泡導入は、流動が上昇する気泡周囲のみの局所かつ、気泡が通過する一時的な範囲に限定されることが示された。またチキソトロピー回復時間を考慮した通気操作を行うことで、細胞集塊の分散状態を維持し、気泡上昇速度の抑制とガスホールドアップ効率の向上が確

認された．本通気培養系において，ヒト iPS 細胞は従来の懸濁培養装置と同等のみかけの比増殖速度を示し，多能性を維持したまま増殖することが確認された．

総括として，本研究では，ヒト iPS 細胞の大量培養装置設計に必要なスケールアップの方法論を提案し，これに基づき，塑性流体を利用することで，ベンチスケールまでの培養系の構築した．このモデルにより，チキソトロピー回復時間を考慮した通気頻度で小気泡を導入可能なノズルを多数持つ大型の培養装置を設計することで (図 3.1)，未だ達成されていない 10^2 L 規模の培養装置への展開が期待される．

実際に大量培養を行うためには，今回提案した培養系を維持可能な操作設計に加え，培養に必要な操作設計，そして前後工程を含む工程設計が求められる．例えば第 1 章で述べたように，老廃物耐性の低いヒト iPS 細胞の培養を行うためには，除去を行うための送液操作設計が求められる．これに対し，分離膜を用いた透析操作などの検討が行われている (Nath *et al.*, 2017; Torizal *et al.*, 2021)．塑性流体は送液が可能であるため，このような膜を用いた培地交換操作の適用が期待される．また細胞集塊培養の高密度化に対し，ボツリヌス菌由来ヘマグルチニンを用いた細胞集塊の分割操作が提案されており (Nath *et al.*, 2018)，これら操作の培養規模に合わせたスケールアップ検討が必要とされる．また実生産を行う際には，大量培養した細胞を分注，凍結する下流工程設計も必要とされる．Kagihiro *et al.* の検討では，凍結保存液の温度を制御することで， 1.5×10^{10} 個のヒト iPS 細胞を分注凍結できる充填システムが示唆されているが (Kagihiro *et al.*, 2018)，実生産ではこのような全体の工程設計が必要となる．

このように，実生産を目的とした際には，ラボ・ベンチスケールでの要素技術の開発と集合，パイロットスケールでの検証，と段階を追ったスケールアップが必要不可欠である．本研究成果に基づく細胞製造に用いる培養装置設計の方法論は，将来的な幹細胞を用いた製造工程の構築に資するものであり，特にヒト iPS 細胞の産業化利用の推進に寄与するこ

とができると考えている.

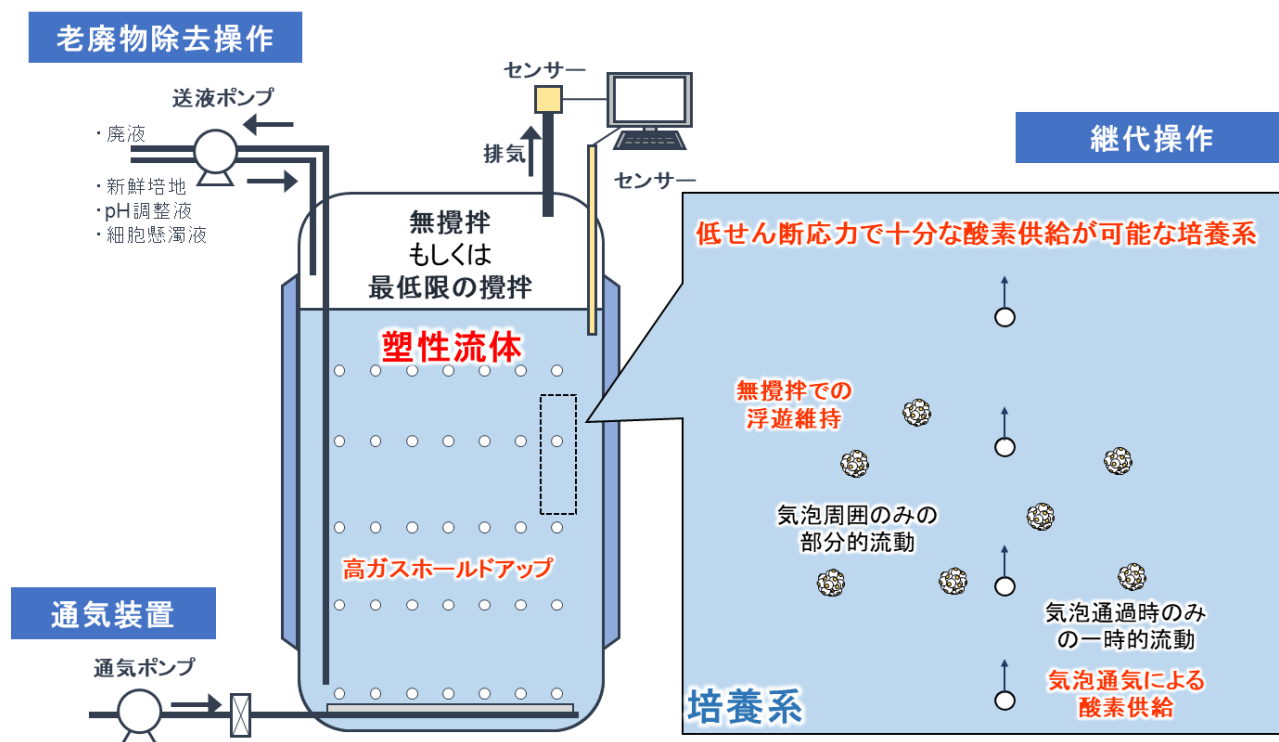


図 3.1 本研究で提案した培養系と，それを利用した大量培養装置の外観

略語一覧

BHK 細胞: Baby hamster kidney cell, ベビーハムスター腎臓細胞

CHO 細胞: Chinese hamster ovary cell, チャイニーズハムスター卵巣細胞

ES 細胞: Embryonic stem cell, ヒト胚性幹細胞

HEK 細胞: Human Embryonic Kidney cell, ヒト胎児腎細胞

iPS 細胞: Induced pluripotent stem cell, 人工多能性幹細胞

MSC: Mesenchymal stem cell, 間葉系幹細胞

ATF: Alternating tangential flow filtration

ATP: Adenosine triphosphate, アデノシン三リン酸

ECM: Extracellular matrix, 細胞外基質

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸

FGF: Fibroblast growth factor, 線維芽細胞増殖因子

HLA: Human leukocyte antigen, ヒト白血球抗原

JCRB 細胞バンク: Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank

PBS: Phosphate buffered salts, リン酸緩衝生理食塩水

Rock 阻害剤: Rho-associated protein kinase inhibitor, Rho 関連タンパク質阻害剤

TFF: Tangential flow filtration

k_{La} : 酸素移動容量係数

Appendix

表 S1 CHO 細胞の三次元培養

	Cell type	Bioreactor type	Operation mode	Final working volume (L)	cell number (cells)	μ^{app} (h ⁻¹)	Reference
1	CHO cell	Stirred tank bioreactor	batch	8	2.1×10^{10}	1.7×10^{-3}	Kong <i>et al.</i> (1999)
2	CHO cell	Fuidized bed bioreactor	batch	1.5	9.8×10^9	1.6×10^{-3}	Kong <i>et al.</i> (1999)
3	CHO cell	Stirred tank bioreactor	batch	2	2.7×10^9	2.6×10^{-2}	Hayter <i>et al.</i> (1991)
4	CHO cell	Stirred tank bioreactor	batch	1	3.7×10^9	2.0×10^{-2}	Kim <i>et al.</i> (2013)
5	CHO cell	Stirred tank bioreactor	batch	1	9.7×10^9	3.1×10^{-2}	Kim <i>et al.</i> (2013)
6	CHO cell	Pneumatic bioreactor	batch	2	7.4×10^9	2.0×10^{-2}	Kim <i>et al.</i> (2013)
7	CHO cell	Pneumatic bioreactor	batch	2	2.1×10^{10}	3.2×10^{-2}	Kim <i>et al.</i> (2013)
8	CHO cell	Pneumatic bioreactor	batch	10	8.3×10^{10}	3.0×10^{-2}	Kim <i>et al.</i> (2013)
9	CHO cell	Stirred tank bioreactor	batch	15	3.9×10^{10}	7.1×10^{-3}	Sandadi <i>et al.</i> (2011)
10	CHO cell	Stirred tank bioreactor	batch	15	3.9×10^{10}	7.1×10^{-3}	Sandadi <i>et al.</i> (2011)
11	CHO cell	Stirred tank bioreactor	batch	1.5	8.3×10^9	2.0×10^{-2}	Monteil <i>et al.</i> (2016)
12	CHO cell	Stirred tank bioreactor	batch	100	2.0×10^{11}	2.2×10^{-2}	Lütkemeyer <i>et al.</i> (2008)
13	CHO cell	Taylor vortex flow bioreactor	batch	0.8	8.0×10^8	2.8×10^{-2}	Sandadi <i>et al.</i> (2011)
14	CHO cell	Orbital shaking bioreactor	batch	1.5	9.0×10^9	2.6×10^{-2}	Monteil <i>et al.</i> (2016)
15	CHO cell	Stirred tank bioreactor	fed-batch	1.5	3.5×10^{10}	7.3×10^{-3}	Xu <i>et al.</i> (2017)
16	CHO cell	Stirred tank bioreactor	fed-batch	1.3	1.5×10^{11}	1.1×10^{-2}	Xu <i>et al.</i> (2017)
17	CHO cell	Stirred tank bioreactor	fed-batch	50	1.3×10^{12}	2.7×10^{-2}	Metze <i>et al.</i> (2020)
18	CHO cell	Stirred tank bioreactor	fed-batch	2000	5.0×10^{13}	2.6×10^{-2}	Metze <i>et al.</i> (2020)
19	CHO cell	Stirred tank bioreactor	fed-batch	1100	2.3×10^{13}	1.9×10^{-2}	Smelko <i>et al.</i> (2011)
20	CHO cell	Wave bioreactor	fed-batch	9.6	6.7×10^{10}	1.4×10^{-2}	Ye <i>et al.</i> (2009)
21	CHO cell	Stirred tank bioreactor	perfusion	1.3	9.6×10^{10}	5.6×10^{-3}	Xu <i>et al.</i> (2017)
22	CHO cell	Stirred tank bioreactor	perfusion	5	1.0×10^{11}	2.9×10^{-3}	Xiao <i>et al.</i> (1999)
23	CHO cell	Stirred tank bioreactor	perfusion	20	2.7×10^{11}	2.0×10^{-2}	Xiao <i>et al.</i> (1999)

表 S2 MSC の三次元培養

	Cell type	Bioreactor type	Operation mode	Final working volume (L)	cell number (cells)	μ^{app} (h ⁻¹)	Reference
24	MSC	Stirred tank bioreactor	batch	2	5.4×10^8	2.1×10^{-2}	Schirmainer <i>et al.</i> (2014)
25	MSC	Stirred tank bioreactor	batch	35	1.1×10^{10}	2.0×10^{-2}	Schirmainer <i>et al.</i> (2014)
26	MSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.4	1.2×10^8	7.3×10^{-3}	Cunha <i>et al.</i> (2015)
27	MSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.1	3.0×10^7	1.6×10^{-2}	Heathman <i>et al.</i> (2015)
28	MSC	Stirred tank bioreactor	batch	2	1.1×10^9	1.7×10^{-2}	Jossen <i>et al.</i> (2014)
29	MSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.05	1.8×10^7	1.2×10^{-2}	Lam <i>et al.</i> (2017)
30	MSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.067	6.7×10^6	1.6×10^{-2}	Krutty <i>et al.</i> (2021)
31	MSC	Stirred tank bioreactor	batch	2.5	4.3×10^8	9.1×10^{-3}	Rafiq <i>et al.</i> (2013)
32	MSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.1	1.5×10^7	7.6×10^{-3}	Rafiq <i>et al.</i> (2013)
33	MSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.25	7.4×10^7	8.8×10^{-3}	Sousa <i>et al.</i> (2015)
34	MSC	Vertical-wheel bioreactor	batch	2.2	6.6×10^8	8.8×10^{-3}	Sousa <i>et al.</i> (2015)
35	MSC	Packed bed bioreactor	batch	1.75	9.2×10^7	1.0×10^{-2}	Tsai <i>et al.</i> (2016)
36	MSC	Packed bed bioreactor	batch	0.8	1.1×10^8	1.8×10^{-2}	Mizukami <i>et al.</i> (2016)
37	MSC	Shaking bioreactor	fed-batch	0.02	9.0×10^6	1.5×10^{-2}	Alimperti <i>et al.</i> (2014)
38	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	2.2	1.2×10^9	1.9×10^{-2}	Chen <i>et al.</i> (2015)
39	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	2.4	9.6×10^8	1.9×10^{-2}	Lawson <i>et al.</i> (2017)
40	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	50	9.5×10^9	1.3×10^{-2}	Lawson <i>et al.</i> (2017)
41	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	0.08	3.4×10^7	1.5×10^{-2}	Lam <i>et al.</i> (2017)
42	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	0.48	2.1×10^8	1.5×10^{-2}	Lam <i>et al.</i> (2017)
43	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	0.1	3.2×10^7	1.8×10^{-2}	Lam <i>et al.</i> (2021)
44	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	0.1	6.5×10^7	9.7×10^{-3}	Goh <i>et al.</i> (2013)
45	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	0.1	6.8×10^7	9.9×10^{-3}	Goh <i>et al.</i> (2013)
46	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	0.1	3.8×10^7	8.5×10^{-3}	Goh <i>et al.</i> (2013)
47	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	0.1	6.8×10^7	9.9×10^{-3}	Goh <i>et al.</i> (2013)
48	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	1	6.0×10^8	1.3×10^{-2}	Goh <i>et al.</i> (2013)
49	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	0.08	2.9×10^7	1.2×10^{-2}	Carmelo <i>et al.</i> (2015)
50	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	0.08	2.7×10^7	1.1×10^{-2}	Carmelo <i>et al.</i> (2015)
51	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	0.08	2.6×10^7	1.1×10^{-2}	Carmelo <i>et al.</i> (2015)
52	MSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	0.08	1.9×10^7	1.3×10^{-2}	Mizukami <i>et al.</i> (2016)

表 S3 ES 細胞の三次元培養

	Cell type	Bioreactor type	Operation mode	Final working volume (L)	cell number (cells)	μ^{app} (h ⁻¹)	Reference
53	ESC	Stirred tank bioreactor	batch	0.7	3.0×10^9	1.9×10^{-2}	Fernandes-Platzgummer <i>et al.</i> (2011)
54	ESC	Stirred tank bioreactor	batch	0.1	2.0×10^8	9.7×10^{-3}	Abbasalizadeh <i>et al.</i> (2012)
55	ESC	Stirred tank bioreactor	batch	0.05	9.5×10^7	2.2×10^{-2}	Fan <i>et al.</i> (2013)
56	ESC	Stirred tank bioreactor	batch	0.05	5.5×10^7	2.7×10^{-2}	Liu <i>et al.</i> (2014)
57	ESC	Stirred tank bioreactor	batch	0.05	1.2×10^8	5.2×10^{-3}	Singh <i>et al.</i> (2010)
58	ESC	Stirred tank bioreactor	perfusion	0.3	6.6×10^8	6.0×10^{-3}	Serra <i>et al.</i> (2010)

表 S4 iPSC 細胞の三次元培養

	Cell type	Bioreactor type	Operation mode	Final working volume (L)	cell number (cells)	μ^{app} (h ⁻¹)	Reference
59	iPSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.1	1.8×10^8	6.1×10^{-3}	Abbasalizadeh <i>et al.</i> (2012)
60	iPSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.05	9.5×10^7	2.2×10^{-2}	Fan <i>et al.</i> (2013)
61	iPSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.125	2.4×10^8	8.1×10^{-3}	Kropp <i>et al.</i> (2016)
62	iPSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.045	7.7×10^7	1.0×10^{-2}	Wang <i>et al.</i> (2013)
63	iPSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.1	8.1×10^7	1.5×10^{-2}	Nath <i>et al.</i> (2017)
64	iPSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.03	1.4×10^8	2.0×10^{-2}	Nath <i>et al.</i> (2018)
65	iPSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.05	4.0×10^7	8.3×10^{-3}	Gupta <i>et al.</i> (2016)
66	iPSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.1	5.0×10^7	8.0×10^{-3}	Shafa <i>et al.</i> (2012)
67	iPSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.1	2.6×10^7	2.1×10^{-2}	Meng <i>et al.</i> (2017)
68	iPSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.125	2.0×10^8	6.9×10^{-3}	Olmer <i>et al.</i> (2012)
69	iPSC	Stirred tank bioreactor	batch	0.1	1.3×10^7	1.3×10^{-2}	Borys <i>et al.</i> (2021)
70	iPSC	Vertical-wheel bioreactor	batch	0.1	3.3×10^7	2.0×10^{-2}	Borys <i>et al.</i> (2021)
71	iPSC	Vertical-wheel bioreactor	batch	0.08	9.7×10^7	1.3×10^{-2}	Rodrigues <i>et al.</i> (2018)
72	iPSC	Vertical-wheel bioreactor	batch	0.08	8.8×10^7	1.3×10^{-2}	Rodrigues <i>et al.</i> (2018)
73	iPSC	Vertical-wheel bioreactor	batch	0.3	2.6×10^8	1.1×10^{-2}	Rodrigues <i>et al.</i> (2018)
74	iPSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	1	2.0×10^9	1.4×10^{-2}	Kwok <i>et al.</i> (2018)
75	iPSC	Stirred tank bioreactor	fed-batch	1	1.6×10^9	1.2×10^{-2}	Kwok <i>et al.</i> (2018)
76	iPSC	Vertical-wheel bioreactor	fed-batch	0.1	6.5×10^7	2.4×10^{-2}	Borys <i>et al.</i> (2021)
77	iPSC	Vertical-wheel bioreactor	fed-batch	0.5	2.3×10^8	2.2×10^{-2}	Borys <i>et al.</i> (2021)
78	iPSC	Vertical-wheel bioreactor	fed-batch	0.1	1.2×10^8	1.2×10^{-2}	Nogueira <i>et al.</i> (2019)
79	iPSC	Vertical-wheel bioreactor	fed-batch	0.1	2.3×10^8	1.6×10^{-2}	Nogueira <i>et al.</i> (2019)
80	iPSC	Stirred tank bioreactor	perfusion	0.125	3.6×10^8	1.0×10^{-2}	Kropp <i>et al.</i> (2016)
81	iPSC	Stirred tank bioreactor	perfusion	0.1	1.1×10^8	1.8×10^{-2}	Nath <i>et al.</i> (2017)
82	iPSC	Stirred tank bioreactor	perfusion	0.2	3.6×10^8	2.1×10^{-2}	Abecasis <i>et al.</i> (2017)
83	iPSC	Stirred tank bioreactor	perfusion	0.2	6.2×10^8	2.6×10^{-2}	Abecasis <i>et al.</i> (2017)
84	iPSC	Stirred tank bioreactor	perfusion	0.2	9.4×10^8	2.3×10^{-2}	Abecasis <i>et al.</i> (2017)

参考文献

- Abbasalizadeh, S., Larijani, M. R., Samadian, A., and Baharvand, H.: Bioprocess development for mass production of size-controlled human pluripotent stem cell aggregates in stirred suspension bioreactor, *Tissue Eng. Part C Methods*, **18**, 831-851 (2012)
- Abecasis, B., Aguiar, T., Arnault, É., Costa, R., Gomes-Alves, P., Aspegren, A., Serra, M., and Alves, P. M.: Expansion of 3D human induced pluripotent stem cell aggregates in bioreactors: Bioprocess intensification and scaling-up approaches, *J. Biotechnol.*, **246**, 81-93 (2017)
- Alimperti, S., Lei, P., Wen, Y., Tian, J., Campbell, A. M., and Andreadis, S. T.: Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential, *Biotechnol. Prog.*, **30**, 974-983 (2014)
- Arena, T., Chou, B., Harms, P., and Wong, A. W.: An anti-apoptotic HEK293 cell line provides a robust and high titer platform for transient protein expression in bioreactors, *mAbs*, **11**, 977-986 (2019)
- Aunins, J. G., Woodson, B. A., Hale, T. K., and Wang, D. I. C.: Effects of paddle impeller geometry on power input and mass transfer in small-scale animal cell culture vessels, *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1127-1132 (1989)
- Bergin, E., Levine, J., Koh, J. S., and Lieberthal, W.: Mouse proximal tubular cell-cell adhesion inhibits apoptosis by a cadherin-dependent mechanism, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **278**, 758-768 (2000)
- Bhavaraju, S. M., Mashelkar, R. A., and Blanch, H. W.: Bubble motion and mass transfer non-Newtonian fluids, *AIChE J.*, **24**, 1063-1070 (1978)
- Borys, B. S., Dang, T., So, T., Rohani, L., Revay, T., Walsh, T., Thompson, M., Argiropoulos, B., Rancourt, D. E., Jung, S., Hashimura, Y., Lee, B., and Kallos, M. S.: Overcoming bioprocess bottlenecks in the large-scale expansion of high-quality hiPSC aggregates in vertical-wheel stirred suspension bioreactors, *Stem Cell Res. Ther.*, **12**, 1-19 (2021)

- Bosco, B., Paillet, C., Amadeo, I., Mauro, L., Orti, E., and Forno, G.: Alternating flow filtration as an alternative to internal spin filter based perfusion process: Impact on productivity and product quality, *Biotechnol. Prog.*, **33**, 1010-1014 (2017)
- Campani, G., Ribeiro, M. P. A., Horta, A. C. L., Giordano, R. C., Badino, A. C., and Zangirolami, T. C.: Oxygen transfer in a pressurized airlift bioreactor, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **38**, 1559-1567 (2015)
- Carmelo, J. G., Fernandes-Platzgummer, A., Diogo, M. M., da Silva, C. L., and Cabral, J. M. S.: A xeno-free microcarrier-based stirred culture system for the scalable expansion of human mesenchymal stem/stromal cells isolated from bone marrow and adipose tissue, *Biotechnol. J.*, **10**, 1235-1247 (2015)
- Chen, A. K. L., Chew, Y. K., Tan, H. Y., Reuveny, S., and Oh, S. K. W.: Increasing efficiency of human mesenchymal stromal cell culture by optimization of microcarrier concentration and design of medium feed, *Cytotherapy*, **17**, 163-173 (2015)
- Chen, G., Gulbranson, D. R., Yu, P., Hou, Z., and Thomson, J. A.: Thermal stability of fibroblast growth factor protein is a determinant factor in regulating self-renewal, differentiation, and reprogramming in human pluripotent stem cells, *Stem Cells*, **30**, 623-630 (2012)
- Chen, X., Chen, A., Woo, T. L., Choo, A. B. H., Reuveny, S., and Oh, S. K. W.: Investigations into the metabolism of two-dimensional colony and suspended microcarrier cultures of human embryonic stem cells in serum-free media, *Stem Cells Dev.*, **19**, 1781-1792 (2010)
- Chen, Z., Iding, K., Lütkemeyer, D., and Lehmann, J.: A low-cost chemically defined protein free medium for a recombinant CHO cell line producing prothrombin, *Biotechnol. Lett.*, **22**, 837-841 (2000)
- Chiarugi, P., and Giannoni, E.: Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells, *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 1352-1364 (2008)
- Cheng, D. C. H.: Yield stress: A time-dependent property and how to measure it, *Rheol. Acta*, **25**, 542-554 (1986)

- Cherry, R. S., and Papoutsakis, E. T.: Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors, *Bioprocess Eng.*, **1**, 29-41 (1986)
- Chisti, Y.: Animal-cell damage in sparged bioreactors, *Trends Biotechnol.*, **18**, 420-432 (2000)
- Cockett, M., Bebbington, C., and Yarranton, G. T.: High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification, *Nat. Biotechnol.*, **8**, 662-667 (1990)
- Cormier, J. T., Nieden, N. I. Z., Rancourt, D. E., and Kallos, M. S.: Expansion of undifferentiated murine embryonic stem cells as aggregates in suspension culture bioreactors, *Tissue Eng.*, **12**, 3233-3245 (2006)
- Correia, C., Serra, M., Espinha, N., Sousa, M., Brito, C., Burkert, K., Zheng, Y., Hescheler, J., Carrondo, M. J. T., Šarić, T., and Alves, P. M.: Combining hypoxia and bioreactor hydrodynamics boosts induced pluripotent stem cell differentiation towards cardiomyocytes, *Stem Cell Rev. Rep.*, **10**, 786-801 (2014)
- Cruz, H. J., Freitas, C. M., Alves, P. M., Moreira, J. L., and Carrondo, M. J.T.: Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells, *Enzyme Microb. Technol.*, **27**, 43-52 (2000)
- Cunha, B., Aguiar, T., Silva, M. M., Silva, R. J. S., Sousa, M. F. Q., Pineda, E., Peixoto, C., Carrondo, M. J. T., Serra, M., and Alves, P. M.: Exploring continuous and integrated strategies for the up- and downstream processing of human mesenchymal stem cells, *J. Biotechnol.*, **213**, 37-108 (2015)
- Curcio, E., Piscioneri, A., Morelli, S., Salerno, S., Macchiarini, P., and De Bartolo, L.: Kinetics of oxygen uptake by cells potentially used in a tissue engineered trachea, *Biomaterials*, **35**, 6829-6837 (2014)
- Dang, S. M., Gerecht-Nir, S., Chen, J., Itskovitz-Eldor, J., and Zandstra, P. W.: Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture, *Stem Cells*, **22**, 275-282 (2004)
- Deshpande, R. R., and Heinzle, E.: On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of

- animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors, *Biotechnol. Lett.*, **26**, 763-767 (2004)
- DeZengotita, V. M., Kimura, R., and Miller, W. M.: Effects of CO₂ and osmolality on hybridoma cells: Growth, metabolism and monoclonal antibody production, *Cytotechnology*, **28**, 213-227 (1998)
- Dong, Y., Gao, W. Y., Man, S., Zuo, B., Wang, J., Huang, L., and Xiao, P.: Effect of bioreactor angle and aeration rate on growth and hydromechanics parameters in bioreactor culture of ginseng suspension cells, *Acta Physiol. Plant.*, **35**, 1497-1501 (2013)
- Fan, Y., Hsiung, M., Cheng, C., and Tzanakakis, E. S.: Facile engineering of xeno-free microcarriers for the scalable cultivation of human pluripotent stem cells in stirred suspension, *Tissue Eng. Part A*, **20**, 1-43 (2013)
- Fernandes-Platzgummer, A., Diogo, M. M., Baptista, R. P., Silva, C. L., and Cabral, J. M. S.: Scale-up of mouse embryonic stem cell expansion in stirred bioreactors, *Biotechnol. Prog.*, **27**, 1421-1432 (2011)
- Frisch, S. M., and Francis, H.: Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis, *J. Cell Biol.*, **124**, 619-626 (1994)
- Garcia-Briones, M., and Chalmers, J. J.: Cell-bubble interactions: mechanisms of suspended cell damage, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **665**, 219-229 (1992)
- Gaecía, M. C., Alfaro, M. C., Calero, N., and Muñoz, J.: Influence of gellan gum concentration on the dynamic viscoelasticity and transient flow of fluid gels, *Biochem. Eng. J.*, **55**, 73-81 (2011)
- Goh, T., Zhang, Z. Y., Chen, A. K. L., Reuveny, S., Choolani, M., Chan, J. K. Y., and Oh, S. K. W.: Microcarrier culture for efficient expansion and osteogenic differentiation of human fetal mesenchymal stem cells, *Biores. Open Access*, **2**, 84-97 (2013)
- Grossmann, J.: Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis - Anoikis", *Apoptosis*, **7**, 247-260 (2002)

- Gupta, P., Ismadi, M. Z., Verma, P. J., Fouras, A., Jadhav, S., Bellare, J., and Hourigan, K.: Optimization of agitation speed in spinner flask for microcarrier structural integrity and expansion of induced pluripotent stem cells, *Cytotechnology*, **68**, 45-59 (2016)
- Hamamoto, K., Ishimaru, K., and Tokashiki, M.: Perfusion culture of hybridoma cells using a centrifuge to separate cells from culture mixture, *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 190-194 (1989)
- Hang, H., Guo, Y., Liu, J., Bai, L., Xia, J., Guo, M., and Hui, M.: Computational fluid dynamics modeling of an inverted frustoconical shaking bioreactor for mammalian cell suspension culture, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **16**, 567-575 (2011)
- Hassel, T., Gleave, S., and Butler, M.: Growth inhibition in animal cell culture - The effect of lactate and ammonia, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **30**, 29-41 (1991)
- Hayter, P. M., Curling, E. M. A., Baines, A. J., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P. G., and Bull, A. T.: Chinese hamster ovary cell growth and interferon production kinetics in stirred batch culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 559-564 (1991)
- Heathman, T. R. J., Glyn, V. A. M., Picken, A., Rafiq, Q. A., Coopman, K., Nienow, A. W., Kara, B., and Hewitt, C. J.: Expansion, harvest and cryopreservation of human mesenchymal stem cells in a serum-free microcarrier process, *Biotechnol. Bioeng.*, **112**, 1696-1707 (2015)
- Higuchi, T., Miyagawa, S., Pearson, J. T., Fukushima, S., Saito, A., Tsuchimochi, H., Sonobe, T., Fujii, Y., Yagi, N., Astolfo, A., Shirai, M., and Sawa, Y.: Functional and electrical integration of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a myocardial infarction rat heart, *Cell Transplant.*, **24**, 2479-2489 (2015)
- Horiguchi, I., Urabe, Y., Kimura, K., and Sakai, Y.: Effects of glucose, lactate and basic FGF as limiting factors on the expansion of human induced pluripotent stem cells, *J. Biosci. Bioeng.*, **125**, 111-115 (2017)
- Ismadi, M. Z., Gupta, P., Fouras, A., Verma, P., Jadhav, S., Bellare, J., and Hourigan, K.: Flow characterization of a spinner flask for induced pluripotent stem cell culture application,

PLoS One, **9**, e106493 (2014)

James, P. E., Jackson, S. K., Grinberg, O. Y., and Swartz, H. M.: The effects of endotoxin on oxygen consumption of various cell types in vitro: An EPR oximetry study, *Free Radic. Biol. Med.*, **18**, 641-647 (1995)

Jayapal, K., Wlaschin, K. F., Hu, W. S., and Yap, G. S. M.: Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting, *Chem. Eng. Prog.*, **103**, 40-47 (2007)

Jing, D., Parikh, A., Canty, J. M., and Tzanakakis, E. S.: Stem cells for heart cell therapies, *Tissue Eng. Part B Rev.*, **14**, 393-406 (2008)

Jorjani, P., and Ozturk, S. S.: Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines, *Biotechnol. Bioeng.*, **64**, 349-356 (1999)

Jossen, V., Kaiser, S. C., Schirmaier, C., Herrmann, J., Tappe, A., Eibl, D., Siehoff, A., den Bos, C., and Eibl, R.: Modification and qualification of a stirred single-use bioreactor for the improved expansion of human mesenchymal stem cells at benchtop scale, *Pharm. Bioprocessing*, **2**, 311-322 (2014)

Jungbauer, A.: Continuous downstream processing of biopharmaceuticals, *Trends Biotechnol.*, **31**, 479-492 (2013)

Kagihiro, M., Fukumori, K., Aoki, T., Ungkulpasvich, U., Mizutani, M., Viravaidya-Pasuwat, K., and Kino-oka, M.: Kinetic analysis of cell decay during the filling process: Application to lot size determination in manufacturing systems for human induced pluripotent and mesenchymal stem cells, *Biochem. Eng. J.*, **131**, 31-38 (2018)

Karst, D. J., Steinebach, F., Soos, M., and Morbidelli, M.: Process performance and product quality in an integrated continuous antibody production process, *Biotechnol. Bioeng.*, **114**, 298-307 (2017)

Kawamura, M., Miyagawa, S., Fukushima, S., Saito, A., Miki, K., Ito, E., Sougawa, N., Kawamura, T., Daimon, T., Shimizu, T., Okano, T., Toda, K., and Sawa, Y.: Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the

- combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart, *Circulation*, **128**, 87-94 (2013)
- Khanchesar, S., Hashemi, S., Seyed, N., Shojaosadati, A., and Babaeipour, V.: Hydrodynamics and mass transfer in miniaturized bubble column bioreactors, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **42**, 257-266 (2019)
- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Onoe, H., Hayashi, T., Kawasaki, T., Saiki, H., Miyamoto, S., and Takahashi, J.: Survival of human induced pluripotent stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate model of Parkinson's disease, *J. Parkinsons Dis.*, **1**, 395-412 (2011)
- Kim, J. C., Seong, J. H., Lee, B., Hashimura, Y., Groux, D., and Oh, D. J.: Evaluation of a novel pneumatic bioreactor system for culture of recombinant Chinese hamster ovary cells, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **18**, 801-807 (2013)
- Kim, M. H., Takeuchi, K., and Kino-oka, M.: Role of cell-secreted extracellular matrix formation in aggregate formation and stability of human induced pluripotent stem cells in suspension culture, *J. Biosci. Bioeng.*, **127**, 372-380 (2019)
- Kim, S. U., and Vellis, J. De: Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: A review, *J. Neurosci. Res.*, **87**, 2183-2200 (2009)
- Kino-oka, M., Mizutani, M., and Medcalf, N.: Cell manufacturability, *Cell Gene Ther. Insights*, **5**, 1347-1359 (2019)
- Kino-oka, M., and Sakai, Y.: Preface of the special issue "Cell Manufacturability", *Regen. Ther.*, **12**, 1 (2019)
- Kong, D., Cardak, S., Chen, M., Gentz, R., and Zhang, J.: High cell density and productivity culture of Chinese hamster ovary cells in a fluidized bed bioreactor, *Cytotechnology*, **29**, 215-220 (1999)
- Kropp, C., Kempf, H., Halloin, C., Robles-Diaz, D., Franke, A., Scheper, T., Kinast, K., Knorpp, T., Joos, T. O., Haverich, A., Martin, U., Zweigerdt, R., and Olmer, R.: Impact of feeding

- strategies on the scalable expansion of human pluripotent stem cells in single-use stirred tank bioreactors, *Stem Cells Transl. Med.*, **5**, 1289-1301 (2016)
- Kropp, C., Massai, D., and Zweigerdt, R.: Progress and challenges in large-scale expansion of human pluripotent stem cells, *Process Biochem.*, **59**, 244-254 (2017)
- Krutty, J. D., Koesser, K., Schwartz, S., Yun, J., Murphy, W. L., and Gopalan, P.: Xeno-free bioreactor culture of human mesenchymal stromal cells on chemically defined microcarriers, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **7**, 617-625 (2021)
- Kunert, R., and Reinhart, D.: Advances in recombinant antibody manufacturing, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 3451-3461 (2016)
- Kunitake, R., Suzuki, A., Ichihashi, H., Matsuda, S., Hirai, O., and Morimoto, K.: Fully-automated roller bottle handling system for large scale culture of mammalian cells, *J. Biotechnol.*, **52**, 289-294 (1997)
- Kurokawa, H., Park, Y. S., Iijima, S., and Kobayashi, T.: Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations, *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 95-103 (1994)
- Kwok, C. K., Ueda, Y., Kadari, A., Günther, K., Ergün, S., Heron, A., Schnitzler, A. C., Rook, M., and Edenhofer, F.: Scalable stirred suspension culture for the generation of billions of human induced pluripotent stem cells using single-use bioreactors, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **12**, e1076-e1087 (2018)
- Lam, A. T. L., Li, J., Toh, J. P. W., Sim, E. J. H., Chen, A. K. L., Chan, J. K. Y., Choolani, M., Reuveny, S., Birch, W. R., and Oh, S. K. W.: Biodegradable poly- ϵ -caprolactone microcarriers for efficient production of human mesenchymal stromal cells and secreted cytokines in batch and fed-batch bioreactors, *Cytotherapy*, **19**, 419-432 (2017)
- Lam, A. T. L., Lee, A. P., Jayaraman, P., Tan, K. Y., Raghothaman, D., Lim, H. L., Cheng, H., Zhou, L. Tan, A. H. M., Reuveny, S., and Oh, S.: Multiomics analyses of cytokines, genes, miRNA, and regulatory networks in human mesenchymal stem cells expanded in stirred

- microcarrier-spinner cultures, *Stem Cell Res.*, **53**, 102272 (2021)
- Lange, H., Taillandier, P., and Riba, J. P.: Effect of high shear stress on microbial viability, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **76**, 501-505 (2001)
- Lao, M. S., and Toth, D.: Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture, *Biotechnol. Prog.*, **13**, 688-691 (1997)
- Lawson, T., Kehoe, D. E., Schnitzler, A. C., Rapiejko, P. J., Der, K. A., Philbrick, K., Punreddy, S., Rigby, S., Smith, R., Feng, Q., Murrell, J. R., and Rook, M. S.: Process development for expansion of human mesenchymal stromal cells in a 50 L single-use stirred tank bioreactor, *Biochem. Eng. J.*, **120**, 49-62 (2017)
- Lee, G. M., Kim, E. J., Kim, N. S., Yoon, S. K., Ahn, Y. H., and Song, J. Y.: Development of a serum-free medium for the production of erythropoietin by suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary cells using a statistical design, *J. Biotechnol.*, **69**, 85-93 (1999)
- Lepperhof, V., Polchynski, O., Kruttwig, K., Brüggemann, C., Neef, K., Drey, F., Zheng, Y., Ackermann, J. P., Choi, YH., Wunderlich, T. F., Hoehn, M., Hescheler, J., and Šarić, T.: Bioluminescent imaging of genetically selected induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes after transplantation into infarcted heart of syngeneic recipients, *PLoS One*, **9**, e107363 (2014)
- Li, Y., and Ma, T.: Bioprocessing of cryopreservation for large-scale banking of human pluripotent stem cells, *Biores. Open Access*, **1**, 205-214 (2012)
- Liu, N., Li, Y., and Yang, S. T.: Expansion of embryonic stem cells in suspension and fibrous bed bioreactors, *J. Biotechnol.*, **178**, 54-64 (2014)
- Ludwig, A., Kretzmer, G., and Schügerl, K.: Determination of a "critical shear stress level" applied to adherent mammalian cells, *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 209-213 (1992)
- Ludwig, T. E., Bergendahl, V., Levenstein, M. E., Yu, J., Probasco, M. D., and Thomson, J. A.: a. Feeder-independent culture of human embryonic stem cells, *Nat. Methods*, **3**, 637-646 (2006)

- Lütkemeyer, D., Heidemann, R., Tebbe, H., Gudermann, F., Lehmann, J., Schmidt, M., and Raditsch, M.: Pilot scale production of human prothrombin using a recombinant CHO cell line, *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products*, 99-101 (2008)
- Marks, D. M.: Equipment design considerations for large scale cell culture, *Cytotechnology*, **42**, 21-33 (2003)
- Marsh, D. T. J., Lye, G. J., Micheletti, M., Odeleye, A. O. O., Ducci, A., and Osborne, M. D.: Fluid dynamic characterization of a laboratory scale rocked bag bioreactor, *AIChE J.*, **63**, 4177-4187 (2017)
- Matsuura, K., Wada, M., Shimizu, T., Haraguchi, Y., Sato, F., Sugiyama, K., Konishi, K., Shiba, Y., Ichikawa, H., Tachibana, A., Ikeda, U., Yamato, M., Hagiwara, N., and Okano, T.: Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **425**, 321-327 (2012)
- Meier, S. J., Hatton, T. A., and Wang, D. I. C.: Cell death from bursting bubbles: Role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors, *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 468-478 (1999)
- Meng, G., Liu, S., Poon, A., and Rancourt, D. E.: Optimizing human induced pluripotent stem cell expansion in stirred-suspension culture, *Stem Cell Dev.*, **26**, 1804-1817 (2017)
- Metze, S., Ruhl, S., Greller, G., Grimm, C., and Scholz, J.: Monitoring online biomass with a capacitance sensor during scale-up of industrially relevant CHO cell culture fed-batch processes in single-use bioreactors, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **48**, 193-205 (2020)
- Mizukami, A., Fernandes-Platzgummer, A., Carmelo, J. G., Swiech, K., Covas, D. T., Cabral, J. M. S., and da Silva, C. L.: Stirred tank bioreactor culture combined with serum-/xenogeneic-free culture medium enables an efficient expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells, *Biotechnol. J.*, **11**, 1048-1059 (2016)
- Mohamet, L., Lea, M. L., and Ward, C. M.: Abrogation of E-cadherin-mediated cellular aggregation allows proliferation of pluripotent mouse embryonic stem cells in shake flask bioreactors, *PLoS One*, **5**, e12921 (2010)

- Mohan, C., Kim, Y. G., Koo, J., and Lee, G. M.: Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells, *Biotechnol. J.*, **3**, 624-630 (2008)
- Møller, P. C. F., Mewis, J., and Bonn, D.: Yield stress and thixotropy: On the difficulty of measuring yield stresses in practice, *Soft Matter*, **2**, 274-283 (2006)
- Monteil, D. T., Juvet, V., Paz, J., Moniatte, M., Baldi, L., Hacker, D. L., and Wurm, F. M.: A comparison of orbitally-shaken and stirred-tank bioreactors: pH modulation and bioreactor type affect CHO cell growth and protein glycosylation, *Biotechnol. Prog.*, **32**, 1174-1180 (2016)
- Mougin, N., Magnin, A., and Piau, J. M.: The significant influence of internal stresses on the dynamics of bubbles in a yield stress fluid, *J. Nonnewton. Fluid Mech.*, **171-172**, 42-55 (2012)
- Murhammer, D. W., and Goochee, C. F.: Scale up of insect cell cultures: Protective effects of pluronic F-68, *Nat. Biotechnol.*, **6**, 1411-1418 (1988)
- Nakagawa, M., Taniguchi, Y., Senda, S., Takizawa, N., Ichisaka, T., Asano, K., Morizane, A., Doi, D., Takahashi, J., Nishizawa, M., Yoshida, Y., Toyoda, T., Osafune, K., Sekiguchi, K., and Yamanaka, S.: A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells, *Sci. Rep.*, **4**, 3594 (2014)
- Nath, S. C., Horie, M., Nagamori, E., and Kino-oka, M.: Size- and time-dependent growth properties of human induced pluripotent stem cells in the culture of single aggregate, *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 469-475 (2017)
- Nath, S. C., Nagamori, E., Horie, M., and Kino-oka, M.: Culture medium refinement by dialysis for the expansion of human induced pluripotent stem cells in suspension culture, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **40**, 123-131 (2017)
- Nath, S. C., Tokura, T., Kim, M., and Kino-oka, M.: Botulinum hemagglutinin-mediated *in situ* break-up of human induced pluripotent stem cell aggregates for high-density suspension culture, *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 910-920 (2018)

- Nogueira, D. E. S., Rodrigues, C. A. V., Carvalho, M. S., Miranda, C. C., Hashimura, Y., Jung, S., Lee, B., and Cabral, J. M. S.: Strategies for the expansion of human induced pluripotent stem cells as aggregates in single-use Vertical-Wheel™ bioreactors, *J. Biol. Eng.*, **13**, 1-14 (2019)
- O'Beirne, D., and Hamer, G.: Oxygen availability and the growth of Escherichia coli W3110: A problem exacerbated by scale-up, *Bioprocess Eng.*, **23**, 487-494 (2000)
- Oh, S. K. W., Nienow, A. W., Al-Rubeai, M., and Emery, A. N.: Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging, *J. Biotechnol.*, **22**, 245-270 (1992)
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J., Saji, H., and Yamanaka, S.: A more efficient method to generate integration-free human iPS cells, *Nat. Methods.*, **8**, 409-412 (2011)
- Olmer, R., Lange, A., Selzer, S., Kasper, C., Haverich, A., Martin, U., and Zweigerdt, R.: Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors, *Tissue Eng. Part C Methods*, **18**, 772-784 (2012)
- Otsuji T. G., Bin, J., Yoshimura, A., Tomura, M., Tateyama, D., Minami, I., Yoshikawa, Y., Aiba, K., Heuser, J. E., Nishino, T., Hasegawa, K., and Nakatsuji, N.: A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production, *Stem Cell Reports*, **2**, 734-745 (2014)
- Ozturk, S. S., Riley, M. R., and Palsson, B. O.: Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production, *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 418-431 (1992)
- Price, P. J.: Best practices for media selection for mammalian cells, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **53**, 673-681 (2017)
- Prins, A., and van't Riet, K.: Proteins and surface effects in fermentation: foam, antifoam and mass transfer, *Trends Biotechnol.*, **5**, 296-301 (1987)

- Ponnudurai, T., Lensen, A. H.W., and Meuwissen, J. H.E.T.: An automated large-scale culture system of plasmodium falciparum using tangential flow filtration for medium change, *Parasitology*, **87**, 439-445 (1983)
- Puthli, M. S., Rathod, V. K., and Pandit, A. B.: Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor, *Biochem. Eng. J.*, **23**, 25-30 (2005)
- Putz, A. M. V., Burghilea, T. I., Frigaard, I. A., Martinez, D. M.: Settling of an isolated spherical particle in a yield stress shear thinning fluid, *Phys. Fluids*, **20**, 033102 (2008)
- Radoniqi, F., Zhang, H., Bardliving, C. L., Shamlou, P., and Coffman, J.: Computational fluid dynamic modeling of alternating tangential flow filtration for perfusion cell culture, *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 2751-2759 (2018)
- Rafiq, Q. A., Brosnan, K. M., Coopman, K., Nienow, A. W., and Hewitt, C. J.: Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor, *Biotechnol. Lett.*, **35**, 1233-1245 (2013)
- Rafiq, Q. A., Coopman, K., Nienow, A. W., and Hewitt, C. J.: Systematic microcarrier screening and agitated culture conditions improves human mesenchymal stem cell yield in bioreactors, *Biotechnol. J.*, **11**, 473-486 (2016)
- Reinhart, D., Damjanovic, L., Kaisermayer, C., and Kunert, R.: Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 4645-4657 (2015)
- Rham, C. De, and Villard, J.: Potential and limitation of HLA-based banking of human pluripotent stem cells for cell therapy, *J. Immunol. Res.*, **2014**, Article ID 518135 (2014)
- Rodrigues, C. A.V., Silva, T. P., Nogueira, D. E. S., Fernandes, T. G., Hashimura, Y., Wesselschmidt, R., and Diogo, M. M., Lee, B., Cabral, J. M. S.: Scalable culture of human induced pluripotent cells on microcarriers under xeno-free conditions using single-use vertical-wheel™ bioreactors, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **93**, 3597-3606 (2018)
- Sandadi, S., Pedersen, H., Bowers, J. S., and Rendeiro, D.: A comprehensive comparison of mixing,

- mass transfer, Chinese hamster ovary cell growth, and antibody production using Rushton turbine and marine impellers, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **34**, 819-832 (2011)
- Santiago, P. A., Giordano, R. de C., and Suazo, C. A. T.: Performance of a vortex flow bioreactor for cultivation of CHO-K1 cells on microcarriers, *Process Biochem.*, **46**, 35-45 (2011)
- Schirmaier, C., Jossen, V., Kaiser, S. C., Jüngerkes, F., Brill, S., Safavi-Nab, A., Siehoff, A., van den Bos, C., Eibl, D., and Eibl, R.: Scale-up of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell production in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions, *Eng. Life Sci.*, **14**, 292-303 (2014)
- Schop, D., Janssen, F. W., van Rijn, L. D.S., Fernandes, H., Bloem, R. M., de Bruijn, J. D., and van Dijkhuizen-Radersma, R.: Growth, metabolism, and growth inhibitors of mesenchymal stem cells, *Tissue Eng. Part A*, **15**, 1877-1886 (2009)
- Serra, M., Brito, C., Sousa, M. F.Q., Jensen, J., Tostões, R., Clemente, J., Strehl, R., Hyllner, J., Carrondo, M. J.T., and Alves, P. M.: Improving expansion of pluripotent human embryonic stem cells in perfused bioreactors through oxygen control, *J. Biotechnol.*, **148**, 208-215 (2010)
- Shafa, M., Day, B., Yamashita, A., Meng, G., Liu, S., K., and Rancourt, D. E.: Derivation of iPSCs in stirred suspension bioreactors, *Nat. Methods*, **9**, 465-466 (2012)
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., and Yamanaka, S.: Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **16**, 115-130 (2017)
- Shi, Y., Ryu, D. Y., and Park, S. H.: Performance of mammalian cell culture bioreactor with a new impeller design, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 260-270 (1992)
- Singh, H., Mok, P., Balakrishnan, T., Rahmat, S. N. B., and Zweigerdt, R.: Up-scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells, *Stem Cell Res.*, **4**, 165-179 (2010)
- Smelko, J. P., Wiltberger, K. R., Hickman, E. F., Morris, B. J., Blackburn, T. J., and Ryll, T.: Performance of high intensity fed-batch mammalian cell cultures in disposable

- bioreactor systems, *Biotechnol. Prog.* **27**, 1358-1364 (2011)
- Sousa, M. F. Q., Silva, M. M., Giroux, D., Hashimura, Y., Wesselschmidt, R., Lee, B., Roldão, A., Carrondo, M. J. T., and Alves, P. M.: Production of oncolytic adenovirus and human mesenchymal stem cells in a single-use, Vertical-Wheel bioreactor system: Impact of bioreactor design on performance of microcarrier-based cell culture processes, *Biotechnol. Prog.*, **31**, 1600-1612 (2015)
- Stacey, G.: Banking stem cells for research and clinical applications, *Prog. Brain Res.*, **200**, 41-58 (2012)
- Stathopoulos, N. A., and Hellums, J. D.: Shear stress effects on human embryonic kidney cells *in vitro*, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1021-1026 (1985)
- Steinebach, F., Ulmer, N., Wolf, M., Decker, L., Schneider, V., Wälchli, R., Karst, D., Souquet, J., and Morbidelli, M.: Design and operation of a continuous integrated monoclonal antibody production process, *Biotechnol. Prog.* **33**, 1303-1313 (2017)
- Takahashi, J.: Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic: The Kyoto trial, *Prog. Brain Res.*, **230**, 213-226 (2017)
- Takahashi, J.: iPS cell-based therapy for Parkinson's disease: A Kyoto trial, *Regen. Ther.*, **13**, 18-22 (2020)
- Takahashi, K., and Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663-676 (2006)
- Takahashi, K., Tanabe, M., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**, 861-872 (2007)
- Takebe, T., Sekine, K., Kimura, M., Yoshizawa, E., Ayano, S., Koido, M., Funayama, S., Nakanishi, N., Hisai, T., Kobayashi, T., Kasai, T., Kitada, R., Mori, A., Ayabe, H., Ejiri, Y., Amimoto, N., Yamazaki, Y., Ogawa, S., Ishikawa, M., Kiyota, Y., Sato, Y., Nozawa, K., Okamoto, S., Ueno, Y., and Taniguchi, H.: Massive and reproducible production of liver buds

- entirely from human pluripotent stem cells, *Cell Reports*, **21**, 2661-2670 (2017)
- Tanzeglock, T., Soos, M., Stephanopoulos, G., and Morbidelli, M.: Induction of mammalian cell death by simple shear and extensional flows, *Biotechnol. Bioeng.*, **104**, 360-370 (2009)
- Toh, Y. C., and Voldman, J.: Fluid shear stress primes mouse embryonic stem cells for differentiation in a self-renewing environment via heparan sulfate proteoglycans transduction, *FASEB J.*, **25**, 1208-1217 (2011)
- Tohyama, S., Fujita, J., Fujita, C., Yamaguchi, M., Kanaami, S., Ohno, R., Sakamoto, K., Kodama, M., Kurokawa, J., Kanazawa, H., Seki, T., Kishino, Y., Okada, M., Nakajima, K., Tanosaki, S., Someya, S., Hirano, A., Kawaguchi, S., Kobayashi, E., and Fukuda, K.: Efficient large-scale 2D culture system for human induced pluripotent stem cells and differentiated cardiomyocytes, *Stem Cell Reports*, **9**, 1406-1414 (2017)
- Torizal, F. G., Lau, Q. Y., Ibuki, M., Kawai, Y., Horikawa, M., Minami, M., Michiue, T., Horiguchi, I., Nishikawa, M., and Sakai, Y.: A miniature dialysis-culture device allows high-density human-induced pluripotent stem cells expansion from growth factor accumulation, *Commun. Biol.*, **4**, 1-13 (2021)
- Tsai, A., Liu, Y., and Ma, T.: Expansion of human mesenchymal stem cells in fibrous bed bioreactor, *Biochem. Eng. J.*, **108**, 51-57 (2016)
- Votruba, J., and Sobotka, M.: Physiological similarity and bioreactor scale-up, *Folia Microbiol.*, **37**, 331-345 (1992)
- Wang, L., Isobe, R., Okano, Y., Kino-Oka, M., Matsuda, H., and Tokura, T.: Bayesian optimization for hydrodynamic characterization of a cylindrical orbitally shaken bioreactor with a bump at the bottom, *J. Chem. Eng. Japan*, **54**, 493-499 (2021)
- Wang, Y., Chou, B. K., Dowey, S., He, C., Gerecht, S., and Cheng, L.: Scalable expansion of human induced pluripotent stem cells in the defined xeno-free E8 medium under adherent and suspension culture conditions, *Stem Cell Res.*, **11**, 1103-1116 (2013)
- Wu, J., Rostami, M. R., Cadavid Olaya, D. P., and Tzanakakis, E. S.: Oxygen transport and stem cell

- aggregation in stirred-suspension bioreactor cultures, *PLoS One*, **9**, e102486 (2014)
- Xiao, C., Huang, Z., Li, W., Hu, X., Qu, W., Gao, L., and Liu, G.: High density and scale-up cultivation of recombinant CHO cell line and hybridomas with porous microcarrier Cytopore, *Cytotechnology*, **30**, 143-147 (1999)
- Xu, S., Gavin, J., Jiang, R., and Chen, H.: Bioreactor productivity and media cost comparison for different intensified cell culture processes, *Biotechnol. Prog.*, **33**, 867-878 (2017)
- Ye, J., Kober, V., Tellers, M., Naji, Z., Salmon, P., and Markusen, J. F.: High-level protein expression in scalable CHO transient transfection, *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 542-551 (2009)
- Zamzam, Z., Yoshikawa, S., Ookawara, S., and Kato, Y.: A new model for estimation of just-suspension speed based on lift force for solid-liquid suspension in a stirred tank, *J. Chem. Eng. Japan*, **49**, 737-746 (2016)
- Zhang, S., Handa-Corrigan, A., and Spier, R. E.: Foaming and media surfactant effects on the cultivation of animal cells in stirred and sparged bioreactors, *J. Biotechnol.*, **25**, 289-306 (1992)
- Zhu, M. M., Goyal, A., Rank, D. L., Gupta, S. K., Vanden Boom, T., Lee, S. S.: Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: A case study, *Biotechnol. Prog.*, **21**, 70-77 (2005)
- Zur Nieden, N. I., Cormier, J. T., Rancourt, D. E., and Kallos, M. S.: Embryonic stem cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors, *J. Biotechnol.*, **129**, 421-432 (2007)

本報に関する論文

Yamamoto, R., and Kino-oka M.: Design of suspension culture system with bubble sparging for human induced pluripotent stem cells in a plastic fluid, *J. Biosci. Bioeng.*, **132**, 190-197 (2021)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、格別のご指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科の紀ノ岡正博教授に心より感謝申し上げます。また本論文の作成、審査にあたり丁寧なご指導、ご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科の大政健史教授、並びに本田孝祐教授に厚く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、日頃からのご指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科の金美海准教授、堀口一樹助教、大阪工業大学の長森英二准教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、様々なご指導、ご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科の堂田丈明招聘研究員、藤森工業株式会社の松田博行氏、矢野貴之氏、都倉知浩氏、並びに大阪市立大学の尾島由紘准教授に深く感謝申し上げます。

さらに本研究を遂行するにあたり、公私ともに多くのご協力をいただきました大阪大学大学院工学研究科生物プロセスシステム工学領域の皆様心より感謝申し上げます。

最後に、これまで支えてくださった父の山本暢、母の山本礼子に心から感謝の意を表します。