

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-529331

(P2011-529331A)

(43) 公表日 平成23年12月8日(2011.12.8)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)
C 1 2 M 3/00 (2006.01) C 1 2 M 3/00 A 4 B 0 2 9

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2011-513926 (P2011-513926)	(71) 出願人	504109610 バイエル・テクノロジー・サービシーズ・ ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテ ル・ハフツング Bayer Technology Se rvices GmbH ドイツ連邦共和国 5 1 3 6 8 レーフエルク ーゼン
(86) (22) 出願日	平成21年6月10日 (2009. 6. 10)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(85) 翻訳文提出日	平成23年2月18日 (2011. 2. 18)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/004200	(74) 代理人	100118625 弁理士 大島 康
(87) 国際公開番号	W02009/152990		
(87) 国際公開日	平成21年12月23日 (2009.12.23)		
(31) 優先権主張番号	102008029307.5		
(32) 優先日	平成20年6月20日 (2008. 6. 20)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞を保持し再循環させるための方法及び装置

(57) 【要約】

本発明は、流れが連続的又はバッチ的に通過する導管の中で細胞を保持し再循環させるための装置及び方法に関する。加えて、本発明は、流れが連続的又はバッチ的に通過する導管の中で細胞を保持し再循環させることが可能な装置を製造する方法に関する。

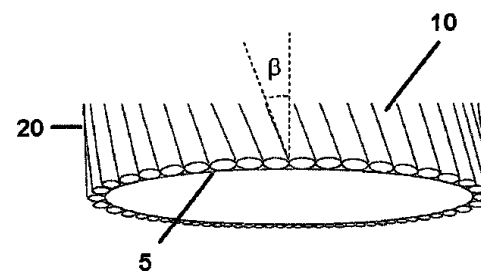


Fig. 5

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

流れが連続的又はバッチ的に通過する導管の中で細胞を保持し再循環させるための装置であって、

隣接して配列された多数の筒状管を備え、

前記筒状管が、直立した中空シリンダーを形成すると共に、前記中空シリンダーの長手方向に対して $+10^{\circ}$ と $+60^{\circ}$ との間の角度で傾けられている、装置。

【請求項 2】

前記筒状管が、下側に向かって幅が減少する断面、好ましくは円形又は楕円形の断面、を有していることを特徴とする、請求項 1 に記載の装置。

10

【請求項 3】

前記中空シリンダーの殻が、筒状管による層を $1 \sim 100$ 層備えていることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の装置。

【請求項 4】

前記筒状管が、 $3\text{ mm} \sim 30\text{ mm}$ の内径を有することを特徴とする、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 5】

前記筒状管が、可撓管、好ましくはシリコン管、で形成されていることを特徴とする、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 6】

前記筒状管の外表面及び / 又は中間空間をガスで処理する手段を更に備えていることを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の装置。

20

【請求項 7】

前記中空シリンダーを通過すると共に前記中空シリンダーの外表面に沿って流れる循環流れを発生させる手段を更に備えていることを特徴とする、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 8】

冷却装置が一体化されていることを特徴とする、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 9】

連続運転されるエアリフト・バイオリアクターのガイド管としての、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の装置の使用。

30

【請求項 10】

流れが連続的又はバッチ的に通過する導管の中で細胞を保持し再循環させる方法であって、

細胞含有培養基は、隣接して配列された多数の筒状管を通して輸送されており、前記細胞が前記筒状管の中で沈殿すると共に前記細胞が再度前記筒状管から滑り出て来るものであり、

前記筒状管が、直立した中空シリンダーを形成すると共に、前記中空シリンダーの長手方向に対して 10° と 60° との間の角度で傾けられていることを特徴とする、方法。

40

【請求項 11】

前記中空シリンダーを通過すると共にその外表面に沿って流れる前記培養基の循環流れが、ガス処理によって及び / 又は攪拌によって実施されることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

更に、前記筒状管の外表面及び / 又は前記筒状管間の中間空間もガス処理されることを特徴とする、請求項 10 又は 11 に記載の方法。

【請求項 13】

細胞を保持し再循環させるための装置を製造する方法であって、

その中空シリンダーの長手方向軸に対して傾斜した筒状管の層を 1 層又は複数層有する

50

中空シリンダーを形成するように、隣接して配列された筒状管又は溝を具備するフィルム又はマットが、渦巻状又は殻型の巻回によって、形作られていることを特徴とする、方法。

【請求項 14】

隣接して配列される筒状管を具備する前記マットは、管又は可撓管がシリンダーの周りに 1 ~ 100 層巻回され、隣接する巻回体が相互に機械的に接続され、且つ巻回体の複合物が前記シリンダーの周りで渦巻状に延伸する切断線に沿って分割されることによって、形成されている、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

隣接して配列される溝を具備する前記フィルムは、エンボス加工されたフィルム又は高温若しくは低温で成形されたフィルムがフィルム複合物を形成するように平滑なフィルムに連結されることによって、形成されている、請求項 13 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、流れが連続的又はバッチ的に通過する導管の中で細胞を保持し再循環させるための装置であって、バイオリアクターの内部又は外部で動作させることが可能な装置に関する。本発明は更に、バイオリアクターの内部又は外部で細胞を保持し再循環させる方法に関する。加えて、本発明は、流れが連続的又はバッチ的に通過する導管の中で細胞を保持し再循環させることが可能な装置を製造する方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

動物及び植物の細胞を培養することは、生物学的に活性な物質及び薬学的に活性な生成物を製造するのに、非常に重要である。細胞は、微生物と違って機械的せん断応力及び養分の供給不足に非常に弱いので、特に遊離懸濁液中の培養基でしばしば行われる細胞の培養は、大変な労力を要する。

【0003】

動物及び植物の細胞株は、通常はバッチ的に培養される。これには、基質、生成物、及びバイオマスの各密度が絶え間なく変化する結果、細胞を最適供給するのに常に困難が伴うという難点がある。加えて、発酵終了時に、例えば死細胞のような副産物が溜まる。この死細胞は、通常は、後の作業で苦労して除去しなければならない。前記理由により、特に不安定生成物を製造する際には、その生成物が例えばタンパク質分解攻撃によって損傷を受け易いため、連続運転されるバイオリアクターが好んで使用される。

30

【0004】

高生産性は高細胞濃度と関連があり、連続運転されるバイオリアクターを使用すれば、下記の要件が満足された場合に、高細胞濃度と高生産性を達成することができる。

- ・細胞に基質、特に溶解酸素、を十分に且つ低せん断応力で供給すること。
- ・呼吸によって生成される二酸化炭素を十分に取り除くこと。
- ・高細胞密度を構築するための、効率的でせん断応力が低く、防封鎖型の細胞保持システム。
- ・バイオリアクターの長期的安定性（滅菌面、流体力学的面）。

40

【0005】

保持システムは、例えば著しく高い細胞濃度を有する前培養体を培養するのに、使用することができる。その場合、その細胞保持システムは、事実上バイオマスが無い細胞培養上澄み液を取り出すために、間欠的に使用される。その後、新しい培養基で前培養リアクターを再度充填することができ、このような態様で、培養液の細胞濃度を、単純なバッチ的動作を用いた場合よりも高めることができる。

【0006】

低せん断応力で細胞に溶解酸素を供給するのに、膜による気泡を立てないガス導入がしばしば用いられる。例えば、可撓管として円筒形バスケット固定子上に膜を形成すること

50

ができる (Henzler, H. - J., Kauling, J., Oxygenation of cell cultures, Bioprocess Engineering, 9, 1993, 61 - 75, 欧州特許公開第 0172478 号, 欧州特許公開第 0240560 号)。大きな物質移動表面のための空間を作るために、それらの可撓管は、間隔をできるだけ狭くして、隣り合わせで密に配置される。

【0007】

ブレード攪拌器又はアンカー攪拌器といった放射状の輸送を行う低せん断応力の攪拌器エレメントを活用すれば、流れは、液体側の物質移動抵抗を低減するために同心状に配置された可撓管膜を、半径方向に通過する。

【0008】

細胞に溶解酸素を供給する更に別の可能性は、酸素含有ガスを用いて気泡ガス噴霧を行うことである。但し、粗気泡は特定相界面面積が小さく、それに関連して物質移動が少ないため、粗気泡ガス噴霧を用いること及び攪拌器エレメントを用いて気泡を散らばらせることは、細胞濃度が低い場合に限定される。加えて、細胞培養ではあまり例のない高性能範囲で攪拌器エレメントを用いて気泡を散らばせると、それに伴って起こる機械的せん断応力のために、細胞の生存能力が悪化する (国際公開第 03/020919 号パンフレット)。

【0009】

このため、最近になって、細胞に溶解酸素を供給するための微細気泡ガス噴霧が確立された (Nienow, A. W., Reactor Engineering in Large Scale Animal Cell Culture, Cytotechnology, 50, 1 - 3, 2006, 9 - 33, Varley, J., Birch, J., Reactor design for large scale suspension animal cell culture, Cytotechnology, 29, 3, 2004, 177 - 205)。

【0010】

微細気泡ガス噴霧は、金属材料及びセラミック材料で作製された特別なシンター本体、フィルタープレート又はレーザーで穿孔されたプレートを用いて生成される。この場合、その細孔又は穴は、全般的に $15\text{ }\mu\text{m}$ よりも小さい。 0.5 m/h を下回る低速の表面ガス速度では、非常に微細な気泡が発生する。これらの気泡は、細胞培養で通常使用される培養基中では、合体する傾向が低い。攪拌器は、単にバイオリアクターの微細気泡を分散させる役割を担っているに過ぎず、気泡を発生させる役割は担っていない。

【0011】

連続運転されるバイオリアクターで高細胞濃度 (> 2000 万個 / ml の生細胞) を達成するためには、上記に加えて、細胞を効率的に保持することも必要である。必要とされる保持度合いは、この場合、細胞の成長速度及び灌流速度 q/V (バイオリアクター体積 V 当たりの培養基スループット q) に依存する。

【0012】

連続運転されるバイオリアクター用に、これまで様々な細胞保持システムが提案されてきた。これらのシステムは、大抵の場合、バイオリアクター外部に配置される。そのようにする理由は、保守及び清掃の目的で細胞保持システムにアクセスするのが容易だからである。

【0013】

バイオリアクター外部での細胞への損傷、特に酸素の供給及び二酸化炭素の除去が不十分であることによるもの、をできるだけ低く保つためには、作業体積が小さく、それに関連して細胞の滞在時間が短い細胞保持システムが望ましい。

【0014】

膜フィルターの他に、固定膜及び可動膜、特別な遠心分離機、並びに重力分離器を用いた十字流濾過方式の原理で動作する機器も使用される。

【0015】

10

20

30

40

50

膜フィルターを用いて細胞を保持する場合、長時間にわたる高信頼性無保守動作を阻害する堆積物及び／又は付着物が観察される。その堆積現象は、膜表面での流れが速ければ減る可能性がある。しかし、この要件は、低せん断応力細胞培養発酵という基本的前提条件に反する。

【0016】

遠心力場で細胞の分別を行うために、特別な低せん断応力遠心分離機が開発された。しかし、これらの遠心分離機は、保守作業がなければ、単に数週間にわたって動作するに過ぎない。保守作業時には遠心分離機エレメントの交換が必要となるが、交換を行うと、滅菌効果が薄れるというリスクが増大する。

【0017】

細胞培養液から細胞を分別する更に別の可能性は、重力分離器を使用することである。その重力分離器は、主に細胞培養で用いられるものであり、沈殿導管と傾斜筒状管分離器のことである。傾斜筒状管分離器は、単純な沈殿導管と比較して、体積がかなり小さいという利点を有する。1つの文献(Henzler, H. - J., Chemie - Technik, 1, 1992, 3)が、逆流、十字流、及び並流で動作できる傾斜筒状管分離器での細胞保持について記述している。流れが通過する筒状管の断面には、プレート又は管を設けることができる。米国特許公開第5,817,505号及び欧州特許明細書第0699101号は、逆流分離器で細胞を保持するために傾斜筒状管分離器を使用することを請求項に記載している。とりわけ国際公開第2003020919号パンフレットには、逆流分離器及び十字流分離器について、更には細胞を保持するための種々の予備分離器(例えば液体サイクロン)との組み合わせについても、記述されている。

【0018】

上記傾斜筒状管分離器は、外部回路を介してバイオリアクターに接続される。これには可撓管配管及びポンプが必要となるが、これらを使用することでプラントが一層複雑化し、ひいては故障のリスクが増大する。加えて、細胞のせん断応力が増大する。

【0019】

重力分離器での細胞の代謝活動及び固化を低減するために、その重力分離器への経路上で細胞培養液を冷却することが提案されている。低温で代謝活動を低下させることは、細胞がバイオリアクター外部で比較的長時間滞在する場合には、確かに有利なことである。重力分離器内部に温度勾配及び濃度勾配が生じると、自由対流という効率を低下させる流れ現象が生じる場合があるが、こういった勾配の発生は、冷却温度に制約を加えることで回避される。

【0020】

細胞保持システムが内部に配置されているバイオリアクターについても記述されている。欧州特許明細書第0227774号は、連続運転される発酵ケトルについて記述している。この場合、細胞は、エアリフトループ反応器内部に保持される。エアリフトループの流れは、細胞懸濁液を、垂直間仕切り壁によって形成された内部流れ緩和沈殿ゾーンの周りに送る。その沈殿ゾーンに堆積している細胞は、攪拌された細胞懸濁液へと再循環されるが、培養上澄み液は、沈殿ゾーン上端部で取り去られる。しかし、前述の垂直に作用する保持器具の難点は、大型化が困難なことである。このため、分離器の体積が、発酵ゾーンと比較して、比例しない形で拡大されることになる。その結果、不十分にしか供給できない分離器の中での細胞の滞在回数が多くなり、結果的に、反応器システムの生産性が低下する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

そのため、従来技術に鑑みて、本目的は、連続的又はバッチ的に動作させる方法で動物及び植物の細胞を保持し再循環させるための効率的方法であって、細胞が機械的せん断応力に弱いこと及び細胞に十分に養分を供給することを考慮に入れており、保守、清掃、及び滅菌性についての薬剤業界の要件を満たしており、且つそれを用いれば複雑度が軽減さ

10

20

30

40

50

れると共に、故障のリスクが低下する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0022】

そのため、本発明は、流れが通過する導管の中で細胞を保持し再循環させるための装置であって、隣接して配列された多数の筒状管を備え、それらの筒状管が、直立した中空シリンダーを形成すると共に、その中空シリンダーの長手方向軸に対して $10^{\circ} \sim 60^{\circ}$ の角度で傾けられている装置に関する。

【0023】

流れが通過する上記導管は、細胞保持及び細胞再循環を行うためのバイオリアクター又はバイオリアクターに接続された導管とすることができる。

10

【0024】

その流れは、連続的又はパッチ的にその導管を通過することができ、連続的に通過することが好ましい。

【0025】

上記筒状管は、下端部が開いている。それらの筒状管は、上端部で少なくとも1本の配管を有する共通の環状空間に入り込んでおり、この配管を介して、導管から収集流が輸送されることになる。

【0026】

細胞と細胞培養溶液は、筒状管の中で分離される。バイオリアクターから連続的に収集流を取り出すことの結果として、細胞培養溶液及び細胞は、筒状管に引き込まれる。それらの細胞は、傾斜して配列された筒状管の中で沈殿し、古典的傾斜筒状管分離器の中にあるときと同様に流入する収集流に逆らって再び筒状管から滑り出て、それによって導管の中に残存する。細胞から分離された細胞培養溶液は、筒状管によって筒状管上方の環状空間に搬入され、最終的に導管から搬出される。

20

【0027】

筒状管は、多角形、楕円形、又は円形の断面を有する。従来技術で知られている傾斜筒状管プレートは、断面形状が四角形である。諸々の四角形の断面形状において、沈殿する細胞のための分離表面領域は、平面になるように設計されている。断面幅 d を有する四角形の筒状管は、同一の直径 d を有する円形の筒状管よりも大きな分離表面積を有する。しかし、意外にも、直径 d を有する円形の筒状管の中での細胞の保持効率及び再循環効率は、分離表面積が小さいにもかかわらず、断面幅 d を有する四角形の筒状管の効率に匹敵することが分かっている。断面が円形の場合、接触面積が小さいために沈殿した細胞と筒状管内壁との間の摩擦が小さくなり、したがって細胞はより容易に滑り落ちることができるということは、その説明として考えられないことではない。更に、なだれ効果が関与することも想定可能である。円形の筒状管断面の中で沈殿しつつある細胞は、垂直軸の最下点に向かう付加的な凝縮プロセスのせいである。また、他の細胞の上に溜まっていくため、これらの細胞は、断面が四角形の場合よりも一層容易に相互に引き合う。このため、存在する細胞は、分離器の中では究極的には減少し、その結果、自由流れ断面では増加する。

30

【0028】

そのため、筒状管は、下側に向かって幅が減少する断面を有することが好ましい。下側の筒状管の断面は、半円形状又は楕円形状を有することがとりわけ好ましい。従来技術に係る真直ぐなプレートではなく、下側に向かって幅が減少する断面を有する筒状管を用いれば、細胞は著しく高速化されて滑落することになり、したがって、筒状管の中の溶解酸素が枯渇する可能性を抑制することができる。本発明に係る装置の好適な実施形態において、筒状管は円形の断面を有する。

40

【0029】

筒状管の大きさを設定すること（本数、直径、長さ）は、いずれの場合も、保持対象細胞のタイプ、バイオリアクターの大きさ、及びスループットに依存する。

【0030】

式1によれば、要求される分離表面積 $A_{e, r, f}$ は、沈殿速度 w_s 、灌流速度 q/V （バ

50

イオリアクター体積V当たりの培養基スループットq)、及びバイオリアクター体積によって与えられる。効率 は、垂直な分離器と比較して傾斜筒状管分離器の性能が低下することを考慮したものである(式2)。

【0031】

四角形の断面及び円筒形の断面に対する理論的分離表面積 A_{th} は、文献(H. - J. Binder, Sedimentation aus Ein- und Mehrkorn suspensionen in schräg stehenden, laminar durchströmten Kreis- und Rechteckrohren [傾斜した層流円形管及び四角形管における単一粒子懸濁液及び多重粒子懸濁液からの沈殿], Dissertation Berlin, 1980)に公開された手法に係る式3及び式4から近似的に定めることができる。

10

【0032】

【数1】

$$A_{eff} = \frac{\text{灌流速度 } V}{ws} \quad (\text{式1})$$

【0033】

【数2】

$$A_{th} = \frac{A_{eff}}{\eta} \quad (\text{式2})$$

20

【0034】

【数3】

$$\text{四角形: } A_{th} \approx Z \cdot \sin(\beta) \cdot d \cdot L \quad (\text{式3})$$

【0035】

【数4】

$$\text{円筒形: } A_{th} \approx \frac{3 \cdot \pi}{16} \cdot Z \cdot \sin(\beta) \cdot d \cdot L \quad (\text{式4})$$

30

【0036】

ここに、Zは筒状管数、 β は重力方向に対して筒状管が傾いている角度、dは筒状管の内径、Lは筒状管長である。 π は円の数学的定数である($\pi = 3.14159 \dots$)。

【0037】

角度 β は、細胞の沈殿及び滑落の性質によって異なり、 $10^\circ \sim 60^\circ$ であることが好ましい。好適な実施形態において、角度 β は $15^\circ \sim 45^\circ$ であり、特に好ましくは $25^\circ \sim 35^\circ$ である。滑落作用を向上させるために、例えば空気振動器又は電気振動器のような適切な手段によって、装置を振動させてもよい。体積密度、即ち細胞濃度、が > 2000 万細胞/mlと高くなっており且つ振動の可能性が制限されている場合、角度は $20^\circ \sim 35^\circ$ であることがとりわけ好ましい。

40

【0038】

筒状管の長さによって角度を変化させることが、想定されている。

【0039】

筒状管幅d(最大断面幅、断面が円形の場合は筒状管の直径)は、筒状管の封鎖を防止するためには、 $d > 3 \text{ mm}$ であることが好ましい。好適な実施形態において、1次的には封鎖状態を確実に防止し、2次的には生産性を低下させる分離器空間及びバイオリアクター空間の体積比率をできるだけ低く保つために、 $3 \text{ mm} \sim 100 \text{ mm}$ 、好ましくは $5 \text{ mm} \sim 20 \text{ mm}$ 、とりわけ好ましくは 5 mm 、の筒状管幅を有する筒状管が用いられる。

50

【0040】

筒状菅の長さを設定する際に、層流条件 ($Re < 2300$; Re = レイノルズ数) を維持することを考慮する必要がある。容器の中に実装するに当たり、筒状菅長は、容器の利用可能な垂直方向の内部寸法及び / 又は反応器の中で達成すべき充填レベルによって異なる。筒状菅長が短いと、圧力低下が減少する結果として、分散の問題につながるおそれがある。この問題のために、特に上方環状空間から収集溶液を取り出すときに、取り出し速度を低下させるための複雑な分散装置が必要となることにもなる。取り出し部位における動的圧力は、この場合、筒状菅の中での圧力低下分の $1/5 \sim 1/10$ 以下でなければならない。この点に関して、筒状菅長は 0.1 m 以上であれば、おそらく工業的に達成可能であろう。但し、筒状菅長は $0.2\text{ m} \sim 5\text{ m}$ であることが好ましく、しかも / 或いは $0.4 \sim 2\text{ m}$ であることがとりわけ好ましい。

10

【0041】

本発明に係る装置は、 $2 \sim 10^6$ 本、好ましくは $10 \sim 100000$ 本、とりわけ好ましくは $100 \sim 10000$ 本、の筒状菅を備える。

【0042】

複数の筒状菅で形成される上記直立中空シリンダーの殻は、筒状菅の層を 1 層又は複数層備える。それは、 $1 \sim 100$ 層、特にバイオリアクターの内部に実装する場合に、とりわけ好ましくは $1 \sim 10$ 層、の層を備えることが好ましい。それらの層は、相互の周りに輪形で配置してもよければ、渦巻状に配置してもよい。それらの層は、機械的支持を提供する固定子に接続してもよい。

20

【0043】

バイオリアクターの中に実装するに当たり、シリンダーは、バイオリアクターの充填高さの $30\% \sim 95\%$ 、とりわけ好ましくは $60\% \sim 90\%$ 、の高さを有することが好ましい。このように実装することで、シリンダーを通過する流れを誘導することが可能になる。そのように流れにシリンダーを通過させることで、円筒形バイオリアクター壁を、上記に加えて熱交換にも又は分離器装置を実装する際にセンサーを収納することにも利用できるという利点が得られる。加えて、循環流れは、粒子の浮遊を誘発又は促進する。適切になされたバイオリアクターの底部形状は、丸められた角部を有するか、又はへこませた底部若しくは円形の底部として構築される。底部付近で集中給気が行われる場合、例えば微生物細胞又は真核性細胞等の沈殿しつつある粒子は、循環流れによって底部中央に輸送され、そこで、もしそれが適切であるなら攪拌器システムの支援を受けて、これらの粒子は上方に向かうガス処理誘発流れによって引き上げられ、再度浮遊させられる。前記実装条件下で、好ましいシリンダー直径は、収納対象の分離器の表面積及び / 又は装着対象の輪形筒状菅層若しくは渦巻き筒状菅層の層数に応じて、反応器の直径の $50 \sim 85\%$ となる。この場合、バイオリアクター壁と固定子との間に位置する環状表面が、シリンダー断面の $5 \sim 300\%$ 、とりわけ好ましくは 100% 、を占有できることが、確保される必要がある。このような態様で、過度の摩擦損失を生じずに高効率で循環流れを誘発できることが確保される。要求される分離器表面積は、細胞の沈殿特性によって異なり、求められる灌流速度及び細胞密度によっても異なる。好適な灌流速度は、 $0.2 \sim 401$ / 日の範囲、とりわけ好ましくは $0.5 \sim 201$ / 日の間、である。バイオリアクター体積当たりの好適な分離器表面積は、細胞の沈殿特性に応じて (細胞の密度、大きさ、及び集塊性向に応じて)、 $0.1 \sim 100\text{ m}^2 / \text{m}^3$ の間、とりわけ好ましくは $2 \sim 20\text{ m}^2 / \text{m}^3$ の間、の範囲である。

30

40

【0044】

細胞が筒状菅の中間空間に侵入するのを防止し、ひいては汚損を防止するために、シリンダーの殻の外方向に向いた表面及び内方向に向いた表面は、封止しておくことが好ましい。

【0045】

シリンダーは、本明細書では、2つの平行な平面 (底面及び上面) 及び複数の平行線によって形成される殻表面又はシリンダー表面によって境界が定められる。シリンダーは、

50

この平面内には位置しない直線に沿って平面の案内曲線を変位させることによって形成される。したがって、筒状管群によって形成されるシリンダーは、種々の形状を有することができる。それは、例えば円形シリンダー、楕円の底面を有するシリンダー、又はプリズム、即ち底面として多角形（三角形、四角形、五角形、・・・）を有するシリンダー、とすることができる。例えば頭を切った円錐形状の筒状管群の配列体等の他の形状も、想定可能である。それは、円形又は楕円形の底面を有するシリンダーであることが好ましい。そのシリンダーは、殻表面に平行に延伸する内部筒状管（中空シリンダー）を有すると共に、好ましくは底面と同一の断面形状を有する。

【0046】

筒状管としては、管又は可撓管が用いられることが好ましい。検討の対象となる材料は、例えばプラスチック又は金属である。テフロン、シリコーンゴム（本明細書では、短くシリコーンと呼ぶ）、ポリエチレン、又はポリプロピレンといった当業者にとって公知のプラスチックを使用することが好ましい。その管又は可撓管には、バイオマスの付着傾向が低い材料を使用することが好ましい。薬学プロセスにとって十分な程度の品質で非常にうまく処理できることから、極めて適切な材料はシリコーンである。加えて、それは酸素透過性であり、したがって、筒状管の中でもある程度の酸素供給を達成することができる。このためには、筒状管周辺の外部空間に、酸素含有ガスを豊富に流せばよい。これは、給気配管及び排気配管によって、筒状管の中間空間、即ち上方筒状管ホルダーと下方筒状管ホルダーとの間、に送り込まれる。

【0047】

清掃の問題を回避するために、本発明に係る装置の全体又は装置の一部を、使い捨て物品として構築できることが好ましい。

【0048】

本発明に係る装置の好適な実施形態では、筒状管としてシリコーン管が使用される。それらのシリコーン管は、好ましくはマットを形成するように相互に連結され、1層又は複数層の形で、所望の分離表面積が達成されるまで円筒形固定子の上に巻回される。傾斜した複数の可撓管によるそのマットは、使い捨てエレメントとして構築されることが好ましい。そうすれば、薬学的原理に従って浄化される保持システムを提供するための出費は、最低限にまで下がる。

【0049】

本発明に係る装置を製造する好適な方法では、筒状管として、可撓管又は管がシリンダーの上に巻回される。この場合、個々の巻回体は、相互に緊密に隣接していることが好ましい。複数の筒状管層が装置に必要な場合、一方が他方の上になるように可撓管又は管による層を複数層巻回してもよい。個々の巻回体は、例えば接着剤で機械的に相互に連結されることが好ましい。後で筒状管となる部分の長さは、シリンダーに周設された巻回体の円周に相当する。筒状管の延長部分を無視すれば、筒状管長 L は、シリンダーの円周 U を用いて、式5によって与えられる（ e = 円の数学的定数）。

【0050】

【数5】

$$L = \frac{U}{\pi} \quad (\text{式5})$$

【0051】

巻回体の本数は、後で筒状管となる部分の本数 Z を与える。

【0052】

次に、巻回されたその管又は可撓管は、巻回体に対して横方向に切断される。この切断は、シリンダーの周りで渦巻状に行われる（例えば図3参照）。この場合、渦巻き線の勾配は、後でとなる傾斜した筒状管の角度を与える。結果は、傾斜した筒状管群による層の1層又は複数層から成るマットである（例えば図4参照）。そのマットを、靴下のようなもの（中空シリンダー）が形成されるように、その傾斜端部で連結することができる。

必要に応じて、このマットを引っ張って支持体（固定子）に周設することができる（例えば図5参照）。筒状管の下面は開いたままであるが、上面は、筒状管上方に環状空間が形成されるような態様でホルダーに連結されており、装置の動作時に、個々の筒状管を通過する液体の各流れがこの環状空間に進入して合流する。

【0053】

細胞培養溶液及び細胞が筒状管間の中間空間に侵入して汚損を引き起こすのを防止するためには、中空シリンダーの内側及び外側を外部から封止することが賢明である。同様に、細胞培養溶液及び細胞の侵入を防止するためには、中空シリンダーの下側及び上側で、筒状管間の中間空間を密閉閉鎖する必要がある。筒状管の外部空間を密閉封止するというこのような特別な設計を特徴的に備えることにより、この空間に酸素富化ガスを豊富に流すことができる。筒状管に酸素透過性材料、好ましくはシリコン、を使用することにより、分離器空間の中に保持された細胞に酸素を供給することができる。

10

【0054】

更に別の好適な製造方法によれば、本発明に係る装置は、構造化フィルムで形成される（例えば図6参照）。構造化フィルムは、平坦な面と、一定間隔で一連のリッジ及び溝を有する面と、を備えることが好ましい。そのフィルムを1層又は複数層、例えば固定子上に渦巻状又は鞘形状に巻回すると、筒状管が出来る。この場合、それらの溝の開いた側はそれぞれ、隣接する層の平坦面又は固定子の壁によって閉鎖される。

【0055】

筒状管の形状寸法は、筒状管幅 b に対するリッジの高さ h_s の比で定義される。技術的に達成可能な h_s / b 比は、諸々の特性（変形性、弾力性、深絞り能力）に応じて $0.3 \sim 5$ の間となる。この場合、 h_s 及び b の寸法は共に 3 mm 以上でなければならず、 5 mm 以上であることが好ましいことに留意すべきである。好適な h_s / b 比は、 $0.5 \sim 3$ である。リッジ幅 b_s は、フィルム材料の機械的安定性によって決まる。分離器の単位体積当たりのせん断面積として大きな値を実現するためには、リッジ幅 b_s をできるだけ小さくする必要がある。同時に、形状を変化させることなく下層に非侵襲的に連結することを可能にするためには、リッジ幅が狭くなりすぎるとなるとはならない。

20

【0056】

渦巻状に巻回する場合、遷移部で発酵槽空間と取り出し空間との間の軸方向の封止を達成するために、マットへの勾配状の接続及び閉合が必要となる。

30

【0057】

鞘形状に巻回する場合、個々の層の安定性を高めるために、筒状管の方向を、層毎に入射角の正と負との間で交互に変えることは論理的であろう。そのため、本発明に係る装置の一実施形態では、筒状管が傾斜して配列されたマットは、鞘形状で配置される。この場合、中空シリンダーから形作られる殻はそれぞれ、1枚のマットによって形成される。個々のマットは、そのマットのいくつかの長手方向軸のうちの1本を中心に 180° だけ、隣接するマットに対して回転させることができる。好適な実施形態では、1つおきの殻について、そのマットを 180° 回転させる。

【0058】

構造化フィルムは、フィルムを製造するその場で形作ることによって又はエンボス加工フィルム、高温成形フィルム、若しくは低温成形フィルムを平滑なフィルム上に（例えば接着で）連結することによって、入手することができる。エンボス加工フィルム及び平滑フィルムの材料特性は、最適に、即ち当業者に公知で相応の表面品質を有する適切な材料を選択することによって、各フィルムの異なる機能に適合させることができる（エンボス加工フィルムの良好な滑動特性及び形状安定性、平滑フィルムの良好な密度特性）。

40

【0059】

フィルム筒状管を用いた製造方法で出来上がる装置では、高い費用を費やしないと、筒状管の周りでのガスの激流及びそれによって誘発し得る物質移動を達成するのは無理であろう。このため、このタイプの装置は、バイオリアクター外部での使用に供されることが好ましい。

50

【 0 0 6 0 】

前述の方法によって、細胞を保持し再循環させるための装置を簡単且つ安価に製造することが可能になる。管又は可撓管が周囲に巻回されるシリンダーを選択することにより、巻回体数、巻回体間隔、層数及び切断渦巻き体の勾配、後で装置となる物の形状寸法を簡単且つ正確に定義することができる。同様に、穿孔されたフィルム及び巻回体（層）数を選択することによっても、後で装置となる物の形状寸法を簡単且つ正確に定義することができる。

【 0 0 6 1 】

前述の方法によって、特に使い捨てエレメントを安価に製造することが可能になる。このエレメントを用いると、薬学的原理に従って浄化される保持システムを提供するための出費は、最低限にまで下がる。

10

【 0 0 6 2 】

本発明に係る装置は、バイオリアクターの内部又は外部で接続し動作させることができる。接続、動作、及び保守に、問題など存在しない。本発明に係る装置又は装置の一部を使い捨てエレメントとして設計することで、清掃の問題は排除される。

【 0 0 6 3 】

本発明に係る装置をバイオリアクター内部で使用することで、沈殿ゾーンには温度勾配及び濃度勾配があまり発生しなくなり、したがって、無用な対流及びそれに関連する細胞保持効率に対する悪影響を確実に回避することができる。更に、バイオリアクター内部に配置することで、例えば傾斜筒状管プレート分離器を外部に配置することと比較して、設備全体の複雑性及び故障のリスクも下がる。

20

【 0 0 6 4 】

そのため、好適な実施形態において、分離器設備は、バイオリアクター内部で使用される。そこでは、その設備が、発酵ゾーンを円筒形内部空間と環状外部空間の2つの領域に分割する。

【 0 0 6 5 】

本発明に係る装置は、循環流れを発生させるための手段と組み合わせられることが好ましい。その循環流れは、円筒形装置の外面に沿って円筒形内部空間を通過し、環状外部空間を経由し、再度円筒形内部空間を通過しながら、細胞培養溶液を、中に含有する細胞と一緒に輸送する。循環流れを発生させるための適切な手段には、例えば機械的攪拌器又はガス処理システムがある。循環流れは、微細気泡を用いた処理用のシステムによって達成されることがとりわけ好ましい。そうすれば、余分な攪拌器エレメントを使用しなくても、気泡を用いたその処理によって酸素の注入を実施できるだけでなく、両発酵領域間の自然循環を誘発することができる。このような態様で、一体性が極めて高い前述の反応器は、細胞培養発酵において、数々の利点をもたらす。

30

- ・循環反応器は、せん断応力が低く、混合作用及びガス供給作用に優れる。

- ・ループ流の結果として、分離器の内部であるにもかかわらず、反応器壁を、上記に加えて熱交換にも使用することができ、したがって、既存の発酵ユニットへの一体化が確保される。

- ・拡張性のある（即ち、分離器体積をバイオリアクター体積に比例して大きくさせた）保持表面領域をバイオリアクター内部に実装することで、バイオリアクターとオートクレープ処理下流の分離器とを結合することが不要になる。この結合は、感染のリスクが高まることと関連がある。加えて、全ての細胞輸送ポンプを、更に多数の外部可撓管配管も、無くして構わない。上記の結果として特筆すべきは、冷却分離器ゾーンと再加熱発酵ゾーンとの間の温度変化が無くなること、せん断応力が低下すること、及びプロセスの耐性が増すことである。

40

- ・収集流に対する逆流の中で分離器から滑落してバイオリアクターの中に戻って来る細胞は、迅速に且つ余分なポンプを用いずに、循環流れによって特にせん断応力が低い態様で、バイオリアクターの十分に供給がなされているパーツ領域の中に還送される。

【 0 0 6 6 】

50

とりわけ好適な実施形態において、本発明に係る装置と組み合わされるバイオリアクターは、エアリフト・バイオリアクターとして構築される（例えば欧州特許明細書第0227774号参照）。この場合、例えば空気等のガスは、そのバイオリアクターの当該技術分野では上昇管とも呼ばれている上を向いたパーツに導入される。微細気泡による処理が起こることが好ましい。この場合、泡立ちを防止するために、更に高せん断応力ガス性界面から細胞を離しておくためにも、表面活性剤の使用が役立つであろう。その上昇管は、上端部及び下端部において、当該技術分野では降下管とも呼ばれている別の上を向いたパーツの上端部及び下端部に接続される。広く用いられている本質的に円筒形のエアリフト・バイオリアクターの変形例は、中央に配置された円筒形のガイド管を備える。このガイド管は、そのエアリフト・バイオリアクターを、ガイド管内の上昇パーツ（上昇管）と、エアリフト・バイオリアクターのガイド管と容器外壁との間にある環状空間内の下降パーツ（降下管）と、に分割する。その上昇パーツは、ガイド管と容器外壁との間の環状空間でも、同程度にしばしば散見される場合があり、その下降パーツがガイド管内で散見される場合もある。上昇管の下端部で例えば酸素富化ガスを供給すると、上昇管中の懸濁培養物の平均濃度が低下し、上昇管中に上向きの液流をもたらす。この液流は、結果として、その降下管の液体内容物を置換し、この内容物が上昇管の下端部に逆流する。このような態様で、懸濁培養物を十分に混合すると共に細胞を浮かし続ける、即ち遊離懸濁の状態に保つ、液体循環が発生する。かかる態様で攪拌されるバイオリアクターの利点は、培養基に溶解された酸素を細胞に十分に与えると共に呼吸から生成される二酸化炭素を十分に取り除くようにすれば、機械的攪拌器等の動くパーツは何も必要がないことである。上昇管及び降下管の断面表面積は、本質的に同一である。

10

20

【0067】

特に好適な実施形態において、本発明に係る装置は、連続運転されるエアリフト・バイオリアクターの降下管と上昇管との間にガイド管を形成する。同等の温度の懸濁培養物が本発明に係る装置の周りを流れることによって、自由対流が流れる現象が回避される。

【0068】

更に別の好適な実施形態は、発酵ゾーンと分離器ゾーンとを空間的に隔絶して配置することである。即ち、本発明に係る装置は、外部からバイオリアクターに接続される。分離器への供給は、少なくとも2つのポンプ、好ましくは低せん断応力蠕動ポンプ、によって確保される。これらのポンプによって、バイオリアクター空間から細胞培養溶液を取り出すこと、熱交換器による冷却後に細胞培養溶液を沈殿機器に供給すること、沈殿機器から収集流を取り出すこと、及び濃縮流をバイオリアクターに還送すること、が可能になる。

30

【0069】

発酵媒体を冷却するために必要となる冷却装置は、好ましくは使い捨てエレメントとして構築されている分離器の筐体に一体化することができ、それによって同様にこの冷却装置も使い捨てエレメントとして構築することができる。その結果、この必須装置に必要なとされる清掃に対する要求事項も不要になる。

【0070】

バイオリアクター及び内部又は外部の保持器具で構成される灌流反応器を、公知の態様で運転することができる。培養基は連続的に供給され、低細胞の細胞培養上澄み液は連続的に除去される。それが生物学上意味のあることであり且つ分離器表面積が十分に与えられているのであれば、その灌流反応器を、高灌流速度 q/V （バイオリアクター体積 V 当たりの培養基スループット q ）で運転することができる。

40

【0071】

同様に、内部又は外部の保持装置を有するバイオリアクターを、最初はバッチ的に培養物を育成するという態様で運転することができる。バイオマスがあまり大量に発生できなくなる水準にまでこの培養基が消費されると、事実上バイオマスの無い培養体上澄み液が、その内部又は外部の保持装置によって取り出される。次いで、新しい培養基を供給するために、そのバイオリアクターの中で得られた空間を利用することができる。その結果、更なる成長、ひいてはより高いバイオマス全体の生産性、が可能になる。この方法は、非

50

常に大型のバイオリアクターに応用されることになるであろう前培養の例として提案されている。というのは、それは、既存の前培養反応器の生産性を増大できるからである。

【0072】

バイオリアクターは、インビトロで且つ遊離懸濁液中又はマイクロキャリア上で成長する細胞を培養するのに使用することが可能である。好適な細胞の例として原生動物が挙げられ、更には人間、動物、又は植物由来の接着性及び非接着性真核性細胞も挙げられる。これらの細胞は、例えば遺伝子組み換えによって、ウィルス、タンパク質、酵素、抗生物質、又は診断用構造体といった特別な活性薬剤を生み出すことができる。例えば纖毛虫、昆虫細胞、Baby Hamster Kidney (BHK) 細胞、Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞、HK293細胞株をヒトBurkittリンパ腫細胞株2B8と融合させた結果として)、又はハイブリドーマ細胞のような薬学的に高性能な生産に適した細胞が使用されることが、とりわけ好ましい。

10

【0073】

本発明は更に、流れが通過する導管の中で細胞を保持し再循環させる方法に関する。新しい培養基及び/又は処理済の培養基が、連続的又はバッチ的にその導管に供給され、使い果たされた培養基は、その導管内に所在する細胞を保持し再循環させるための装置によって除去される。装置は、傾斜して配列された多数の筒状管で構成される。これらの筒状管は、直立した中空シリンダーを形成し、その中空シリンダーの長手方向に対して10°~60°との間の角度、好ましくは15°~45°の間の角度、とりわけ好ましくは25°~35°の間の角度で傾けられている。

20

【0074】

傾斜して配列されたそれら筒状管において、 $Re < 2300$ に従って層流状態を維持することを可能にする流速が支配的となることが好ましく、それによって、効率低下につながる重力場に逆らった堆積細胞の再懸濁が回避される。

【0075】

レイノルズ数 Re は、式6に従って、断面全体で平均化された流速 w 、流れする培養基の動粘性率 ν 、及び1本の筒状管が有する内径 d から計算することができる。

【0076】

【数6】

$$Re = (w \cdot d / \nu) \quad (\text{式6})$$

30

【0077】

この場合、筒状管中央よりも筒状管内壁の方で、遅い流速が支配的となる。細胞は筒状管の中で沈殿し、流れ方向に逆らって、筒状管の底部側面上を底部筒状管端部まで滑動する。好ましいことに、導管の中では、底部筒状管端部の細胞を取り込み、それらを導管の中で分散させる循環流れが支配的である。好ましいことに、循環流れは、ループ流として、筒状管の直立中空シリンダーの内面及び外面の周りを進む。したがって、本発明に係る方法は、流れが連続的に通過する導管の中の循環流れと組み合わせることが好ましい。細胞が除かれた細胞培養溶液は、筒状管によって輸送され、筒状管上方に配置された環状空間に入って、最終的に導管から搬出される。

40

【0078】

本発明に係る方法は、バイオリアクター内部で実施することができる。この場合、細胞は、そのバイオリアクター内部に保持される。バイオリアクターの中及び分離器ゾーンの中では温度が均一化し、その結果、分離器の中では対流は排除される。但し、これらの条件下では、細胞は、他方では代謝及び空気呼吸も継続することができる。装置の外部空間に酸素富化ガスを豊富に流すことによって、酸素の消費を打ち消すことができ、その生物学的結果を緩和することができる。この場合、その酸素は、酸素透過性筒状管壁を通過して筒状管の中に拡散する。この酸素は、少なくとも下方筒状管断面、即ち高細胞密度領域、において、そこで活発に進行している供給及び沈殿の各プロセスによって、比較的良好

50

に混ざると考えることができる。滑落すると共にこれらの領域に所在する細胞が有するシステムでの滞在時間はほんの短時間であり、したがって、細胞の最適供給密度が短時間だけ不足しても全般的に大丈夫であって、損傷も起こらない。上端筒状管断面での細胞の供給は、場合によっては滞在時間が10～45分と非常に長いためにはるかに重要であり、したがって、これらの領域での酸素供給が特に役立つことになる。

【0079】

本発明に係る方法は、バイオリアクター外部でも実施することができる。このために、細胞培養溶液は、細胞と一緒に、そのバイオリアクターから導管に搬入される。この導管の中には、傾斜して配置された多数の筒状管が、直立中空シリンダーの形態で配列される。この導管の中では、細胞と、筒状管を通して混合体の中に輸送されている細胞培養溶液とは、分離されている。細胞はそこで沈殿し、流れ方向に逆らって筒状管端部にまで滑動し、最終的に沈殿ゾーンに進入する。この沈殿ゾーンから再度、これらの細胞をバイオリアクターに還送することができる。代謝を抑制し、それによって生産性を低下させる細胞の供給不足を打ち消すためには、その外部導管の中で細胞を冷却することが好ましい。冷却された懸濁液では、外部から筒状管に激流を流すことによって沈殿細胞に酸素を供給することは、絶対にしなければならないというものではない。通常は、細胞培養溶液を分離器の周囲温度まで冷却すれば全く十分であって、代謝作用が期待通りになるだけでなく、対流も安全に回避される。

【0080】

本発明に係る方法を用いれば、流れが連続的に通過する導管の中で、細胞を効果的に保持し再循環させることができる。保持及び再循環が行われる際に、細胞には中程度のせん断力しか働かず、全般的に細胞はこの力に対して十分な耐性がある。筒状管の中の細胞は、発酵温度又は低い温度レベルに保たれると共に養分が与えられる。もし必要であれば、筒状管の中間空間又は筒状管外面に更なるガス処理を施すことによって、物質移動を最適化することができる。

【0081】

同様に、その方法を用いれば、培養基交換を行わないバッチ的な培養プロセスの場合よりも高い細胞濃度を連続的又は間欠的に培養基を交換することによってその中に実現することが可能になされている導管の中で、細胞を保持し再循環させることができる。前培養反応器の生産性を高めるために、このような態様で上記方法を好都合に使用することができる。この前培養反応器のバイオマスは、超大型バッチ動作バイオリアクターに細胞を移植するのに用いられる。加えて、上記方法は、反復フェッドバッチモードと称されるモードで新たな発酵槽に細胞を移植する目的で、生成物収集時にバイオマスが中に捕集されるフェッドバッチ発酵槽を使用することの可能性を、拡張することができる。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1】本発明に係る装置の一実施形態を模式的に示す図である。

【図2】円形の断面を有する筒状管の中で細胞が分離される状況を模式的に示す図である。

【図3】傾斜して配列された複数の筒状管からマットを製造する方法を模式的に示す図である。

【図4】円形の断面を有する複数の筒状管のマットを模式的に示す図である。

【図5】本発明に係る装置の底に近い部分を、斜視図で模式的に示す図である。

【図6】構造化フィルムの例(a)、及び該フィルムのB-B線による断面図(b)を示す図である。

【図7】接着剤によって連結されたエンボス加工フィルムと平滑な封止フィルムの複合物としての構造化フィルム(a)、及び3枚の構造化フィルムを連結した様子(b)を示す図である。

【図8】本発明に係る装置の1つのデザインを示す、複数の筒状管で形成された中空シリンダーの長手方向軸に垂直な断面図である。

10

20

30

40

50

【図 9】細胞保持システムを気泡曝気バイオリアクターの中に実装した様子を示す断面図である。

【図 10】複数の層（可撓管のマット）を形成するように巻回されると共に、下方接合部位及び上方接合部位で固定された可撓管の形態を成す筒状管の配列を示す図である。

【図 11】分離器設備に一体化された細胞保持システムを外部に配した、古典的方法の模式図である。

【図 12】筐体に一体化された、細胞保持システムと冷却装置とを具備する分離器を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0083】

10

以下では、図面を参照して、但し本発明をそれらの図面に限定することなく、本発明の例示的实施形態についてより詳細に説明することにする。

【0084】

図 1 は、本発明に係る装置の一実施形態を模式的に示している。円形の断面を有する複数の筒状管（10）が、中空の円形シリンダー（20）を形成している。その円形シリンダーの殻は、傾斜して配列された複数の筒状管による層を 1 層備えている。各筒状管は、円形シリンダーの長手方向軸に対して角度 だけ傾いている。動作時は、その長手方向軸は、重力方向と同一であることが好ましい。図 1（a）は側面図であり、図 1（b）は、図 1（a）のシリンダー（20）を通過する破線に沿った断面を上から又は下から見た図である。

20

【0085】

図 2 は、円形の断面を有する筒状管（10）の中で細胞が分離される状況を模式的に示している。筒状管（10）には、底部から細胞懸濁液が注入（1）されている。収集流（2）は、その筒状管の上端部から取り出される。細胞の未透過物（3）は筒状管の下側に沈殿し、流れ方向に逆らって下方筒状管端部まで滑動する。

【0086】

図 3 は、傾斜して配列された複数の筒状管からマットを製造する方法を模式的に示している。管又は可撓管（200）が、シリンダー（300）の上に巻回されている。この場合、各巻回体は相互に密接しており、小さな空間に最大限の分離器表面積を収納できている。後で切断されたときでも筒状管の向きを確保するために、各巻回体は、相互に機械的に連結されることが好ましい。このために、点若しくは面で直接的に又は例えば織布若しくは不織布のような担持層によってシリンダー外面を介して、それらの筒状管を相互に連結することができる。好適な連結は、接着によって行われる。適切な接着剤は、筒状管の材料及び表面特性に整合した接着成分であり、当業者にとっては公知である。シリコンによる管の場合、所定の FDA 品質クラスのもものが市場で入手可能なシリコン接着剤を使用することが好ましい。接着時は、ガス透過性筒状管の周りにガスを流せるようにするために、封止するような形では絶対にそれらの可撓管を相互に連結しないように、注意を払わなければならない。接着後に、可撓管のマットは、シリンダーの周りの渦巻状に延伸する破線の切断線（210）に沿って切断され、シリンダーから外される。成果物は、図 4 に示すように、傾斜して配列された複数の筒状管によるマットである。

30

40

【0087】

図 4 は、円形の断面を有する複数の筒状管（10）のマット（220）を模式的に示しており、筒状管は、筒状管の下側に沿う理論線に対して 的角度で配列されている。かかるマット（220）は、図 3 に示されると共に図 3 についての記述で説明された方法で入手することができる。細胞を保持し再循環させるための本発明に係る装置の分離器筒状管による層を 1 層入手するために、傾斜した長手方向側面（230, 231）を相互に連結することができる。表面積を拡大するために、複数の層を長手方向側面（230, 231）に沿って相互に接着して、靴形状にしてもよい。同様に、そのマットを、複数の層を得るように一方の層の上に他の層を巻回して、渦巻形状にしてもよい。ここでは両方の場合において、傾斜して配列された複数の筒状管（10）による層を 1 層又は複数層有する靴

50

下のようなもの（中空シリンダー（２０））が形成されている（例えば図１、図５参照）。これを引っ張って、機械的支持体（固定子）に周設することができる。

【００８８】

図５は、本発明に係る装置の底に近い部分を、斜視図で模式的に示している。円形の断面を有する複数の筒状管（１０）による層が１層、管状の固定子（５）に周設されている。それらの筒状管は、中空シリンダー（２０）の長手方向軸に対して角度 だけ傾いている。

【００８９】

図６（ａ）は、構造化フィルム（２５０）の例を示している。そのフィルムは、一連の一定間隔の溝（２５１）及びリッジ（２５２）を備えている。

【００９０】

図６（ｂ）は、図６（ａ）のフィルムのＢ－Ｂ線による断面図を示している。フィルムを切断してマットを形成することができる。かかるマットのあるものは、単なる例として紹介すると、断面がちょうど図６（ｂ）のフィルム断面図のようになっている。１つのマットを他のマットの上に水平に載置することができ、それらのマットは、相互に連結される。この場合、それらの溝がそれらのリッジに沿って閉鎖された筒状管を形成するような形で、マットのリッジ（２５２）が、その上に位置するマットの平滑な下側に連結される。次いで、直立中空シリンダーを形成するようにそれら連結済みマットの形状を定めることができ、図４の例と同様の態様で、該マットを側面で連結することができる。同様に、固定子の周りに１層又は複数層の形で、構造化フィルムを巻回することができる。この場合、開いた側に面する溝（２５１）は、いずれの場合も隣接する層又は固定子の壁で封止されて筒状管を形成する。

【００９１】

図６（ａ）及び（ｂ）のタイプのフィルムの場合、四角形の断面形状を有する筒状管が形成される。同様に、他の断面形状を有するフィルムを使用することも、想定可能である。図６（ｃ）に、例えば半円溝の断面形状を有するフィルムを示す。他の筒状管形状は、それ相応に形成することにより製造される。

【００９２】

図７（ａ）は、例示を目的に、接着剤（２７０）によって連結されたエンボス加工フィルム（２６０）と平滑な封止フィルム（２６５）の複合物としての構造化フィルムを示している。

【００９３】

図７（ｂ）は、３枚の構造化フィルム（２５０）を連結した様子を示している。この場合、いずれの場合も、フィルムの平滑な下側をその下のフィルムのリッジに連結しており、それによって、隣接して配列された多数の筒状管（１０）を提供している。

【００９４】

図８は、本発明に係る装置の１つのデザインを、複数の筒状管（１０－１，１０－２）で形成された中空シリンダーの長手方向軸に垂直な断面図で示している。円形の基部を有する中空シリンダーは、円形の断面を有する複数の筒状管の上に輪形で配列された２つの層を備える（（１０－１＝第１の層の筒状管），（１０－２＝第２の層の筒状管））。筒状管（１０－１，１０－２）間の中間空間（１５）に細胞が進入して汚損を引き起こすことが決してないように、中空シリンダーは、外側も内側も殻によって封止されることが好ましい（外殻（１３）、内殻（１４））。

【００９５】

図９に、例示を目的に、細胞保持システム（４００）を気泡曝気バイオリアクター（１００）の中に実装した様子を断面図で示す。細胞保持システムは、傾斜して配列された複数の筒状管（１０）を備えている。これらの筒状管は、複数層の形で、可撓管固定子（５）に周設されている。筒状管（１０）は、図示し易いように、その図面では垂直に描かれている。但し、本発明によれば、筒状管は、可撓管固定子（５）の長手方向軸に対して傾けられている。ガス分散器（４０）によって生成された好ましくは超微細な気泡が、ガス

10

20

30

40

50

で処理される例示の中央反応器ゾーン（５１）であって、流れが上方に通過する中央反応器ゾーンと、壁に接近した非ガス処理反応器ゾーン（５２）であって、流れが下方に通過する非ガス処理反応器ゾーンとの間の自然循環を確保する。このような態様で、酸素輸送の他に反応器の良好な混合作用も、ガス-液体手段によって確保される。収集流（２）は、細胞保持システム（４００）での細胞分離後に、バイオリアクター（１００）の上端部ポートから取り出される。細胞保持システム（４００）で分別された粒子は、循環流れと一緒に、ガス処理反応器中央部の中に還送される。反応器での沈殿は同時に、循環流れによって効率的に阻止される。排気ガスは、反応器上端部のポート（４２）を介して除去される。分離器可撓管周辺の外部空間のガス処理は、細胞保持システム（４００）に接続された給気配管及び排気配管（２１）及び（２２）によって行われる。ループ反応器（１０

10

20

30

40

50

【００９６】

図１０は、複数の層（可撓管のマット）を形成するように巻回されると共に、下方接合部位（１１）及び上方接合部位（１２）で固定された可撓管の形態を成す筒状管（１０）の配列を示している。筒状管（１０）は、図示し易いように、その図面では垂直に描かれている。但し、本発明によれば、筒状管は、可撓管固定子（５）の長手方向軸に対して傾けられている。接合部位（１１）及び（１２）を形成する材料は、好ましくはシリコンで作製され且つ筒状管（１０）を形成する可撓管をしっかりと封入する、例えば当業者に公知の可撓性接着材料であり、例えば好ましくはシリコンを利用したものである。この接着材料は、内側及び外側に対し、両半径方向に平滑な封止面を提供する。それらの封止面によって、可撓管固定子（５）に対し、更に殻（１３）対しても、封止作用を実施することができる。殻（１３）は、可撓管マットを越えて突出し、可撓性管固定子（５）に連結された上端エレメント（２７）に接しているカラーによって封止されている。図８に示す封止構造により、可撓管の周辺空間は、液体で充填されることが絶対にない。好適な構成では、沈殿過程時の沈殿した細胞への酸素供給を向上するために、可撓管間のこの中間空間に、酸素富化ガスが豊富に流される。上端パーツ（２７）は、細胞の堆積を防止することを意図されたスロープ（２８）によって、可撓管固定子（５）に連結されている。スロープ（２８）に溶接で入れ込まれた収集ポート（２２）は、筒状管（１０）の直ぐ上の環状空間（２４）に向かって開いている。収集ポートの本数が制限されている場合に、良好な液体分散を確保するには、例えば接線流ガイド、フラクタル流れ分散、又はバッフルプレート（２５）の実装が得策である。

【００９７】

図１１に、分離器設備（１１０）に一体化された細胞保持システム（４００）を外部に配した、古典的方法の模式図を示す。バイオリアクターの一連の動作における細胞の呼吸を低減するために、取り出された後に冷却装置（９０）で、その温度はできるだけ直接的に一層低いレベルにまで下げられる。このような態様で、細胞は、酸素が制限された状態で細胞保持システム（４００）の中にあまりに長く留まることを阻止される。そうしないと、細胞は、生物学的に損傷を受けるおそれがある。図示の例では、分離器（１１０）は、細胞保持システム（４００）と、一体化冷却装置（９０）と、で構成されている。バイオリアクター（１００）と分離器（１１０）との間の液流は、低せん断応力ポンプ（９１）及び（９２）によって調整される。例えば２つのポンプ（９１）及び（９２）のうちのいずれか一方をバイオリアクター出口に配設するといった他の回路構成も、同様に想定可能であろう。

【００９８】

図１２に、筐体（８０）に一体化された、細胞保持システム（４００）と冷却装置（９０）とを具備する分離器（１１０）を示す。細胞培養溶液（１）は、縦樋（７２）を介して分離器に導入されて冷却され、細胞保持システム（４００）の下へ進む。この縦樋は、そうすることが適切な場合には、脱気してもよい。冷却は、下に流れる細胞培養溶液とは

逆に流れる形で冷却水が上がって行く上昇管（７７）に沿って行われる。特に良好な熱伝達及びそれによる冷却器のコンパクトな構造は、上昇管（７７）の薄い壁厚、上昇管及び浸漬管（７６）及び（７７）両者間の間隙にある冷却媒体の速い速度によって、更には縦樋（７２）と上昇管（７６）との間の細胞培養溶液に内在的な渦巻状流れによっても、確保される。既に堆積している集結細胞マスが再度舞い上げられてしまうのを防止するためには、円錐体に入る前に細胞培養溶液の速度を落としておくのが得策である。大きな流入断面を確保するために、冷却装置は、取り込み領域まで真直ぐに降ろしてはならない。速度によっては、バッフルプレート（７４）を追加的に実装することが得策である。細胞沈殿物が細胞保持システム（４００）から滑落によって円錐体（７０）の中に戻った後で、円錐体の先端で細胞未透過物（３）を除去することができる。２０°～７０°の円錐角が使用可能であることが分かっている。構造体の高さが高くなりすぎるのを回避するために、円錐角度はできるだけ小さいことが好適なはずであるが、そのような角度は、封鎖状態を確実に回避してしまう可能性がある。そのため、好適な実施形態の中には、円錐角が４０°～６０°のものもある。振動が適切に行われる場合は、４５°の円錐角がとりわけ好ましい。沈殿した細胞マスへの酸素供給用に、筐体（８０）に溶接で入れ込まれた接続ポートを介して、外から給気（２１）及びガス取り出し（２２）を実施することができる。ガス処理を施すためには、可撓管で作製された筒状管（１０）を使用することが必要とされる。

10

【符号の説明】

20

【００９９】

- １ 細胞培養溶液
- ２ 収集流
- ３ 細胞未透過物
- ５ 可撓管固定子
- １０ 傾斜筒状管
- １１ 下方接合部位
- １２ 上方接合部位
- １３ 外殻
- １４ 内殻
- １５ 中間空間
- ２０ シリンダー
- ２１ 給気
- ２２ ガス取り出し
- ２４ 輪形筒状管
- ２５ バッフルプレート
- ２７ 上端パーツ
- ２８ 滑動表面
- ３０ 培養基給送
- ４０ ガス分散器
- ４１ ガス供給
- ４２ ガス除去
- ５０ ループ流
- ５１ 上向きの流れ
- ５２ 下向きの流れ
- ６０ ジャケット
- ６１ 温度制御媒体の給送
- ６２ 温度制御媒体の排出
- ７０ 円錐体
- ７１ 円錐角
- ７２ 縦樋

30

40

50

- 7 3 渦巻
- 7 4 バッフルプレート
- 7 6 浸漬管
- 7 7 上昇管
- 8 0 筐体
- 8 1 フレーム
- 8 2 振動器
- 9 0 冷却器
- 9 1 帰還ポンプ
- 9 2 収集ポンプ
- 1 0 0 バイオリアクター
- 1 1 0 一体化分離器
- 2 0 0 管／可撓管
- 2 1 0 切断線
- 2 2 0 管／可撓管のマット
- 2 3 0 マットの長手方向側面
- 2 3 1 マットの長手方向側面
- 2 5 0 構造化フィルム
- 2 5 1 溝
- 2 5 2 リッジ
- 2 6 0 エンボス加工フィルム
- 2 6 5 封止フィルム
- 2 7 0 接着剤
- 3 0 0 シリンダー
- 4 0 0 細胞保持システム

10

20

【図 1】

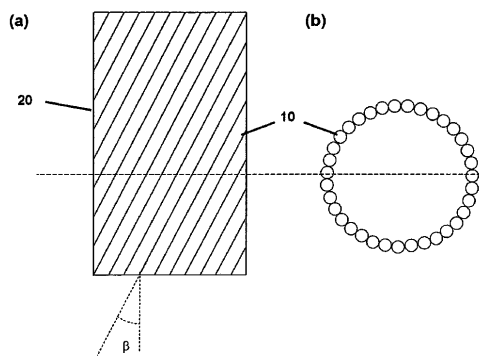


Fig. 1

【図 2】

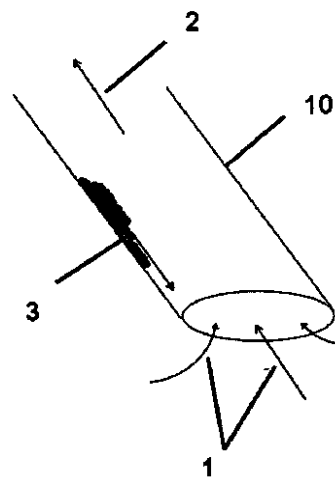


Fig. 2

【図 3】

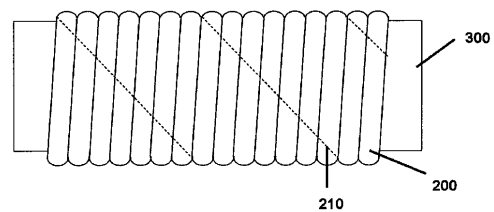


Fig. 3

【 図 4 】

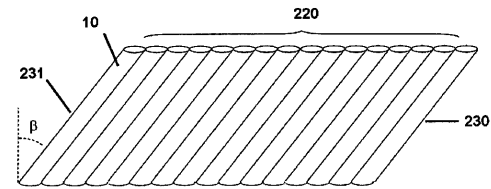


Fig. 4

【 図 5 】

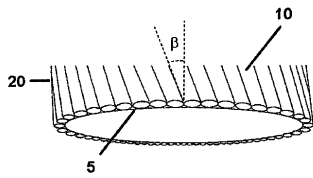
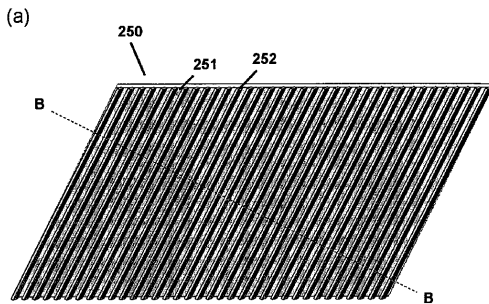


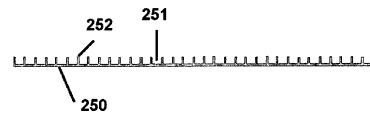
Fig. 5

【 図 6 (a) 】



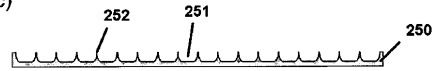
【 図 6 (b) 】

(b)



【 図 6 (c) 】

(c)



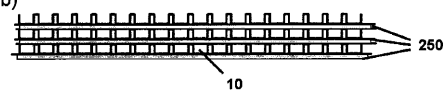
【 図 7 (a) 】

(a)



【 図 7 (b) 】

(b)



【 図 8 】

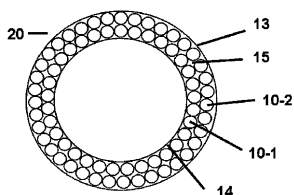


Fig. 8

【 図 9 】

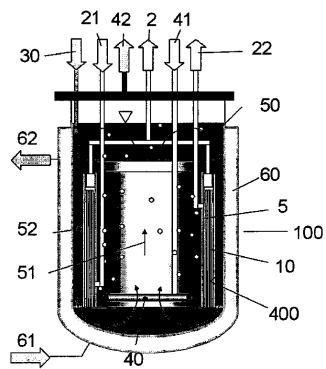


Fig. 9

【 図 10 】

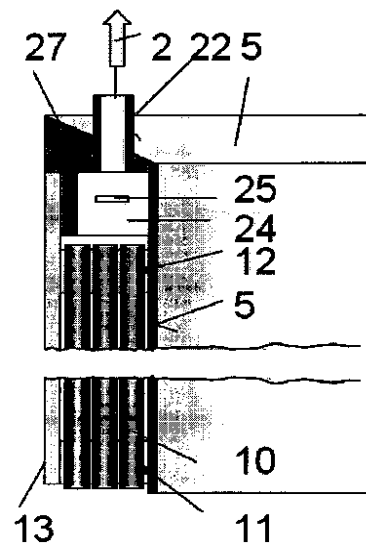


Fig. 10

【 図 1 1 】

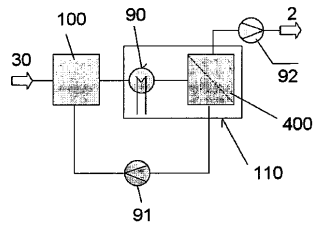


Fig. 11

【 図 1 2 】

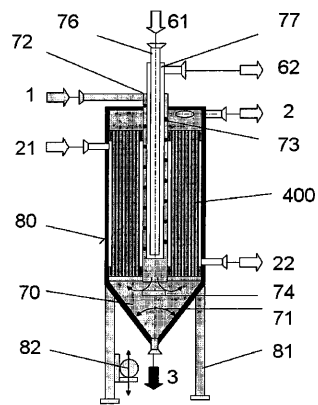


Fig. 12

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

１．テフロン

(74)代理人 100144200

弁理士 奥西 祐之

(72)発明者 イェルク・カウリング

ドイツ 5 1 0 6 9 ケルン、ゼールスハイダーヴェーク 2 0 番

(72)発明者 ビエルン・フラーム

ドイツ 4 0 6 9 9 エルクラート、シュミーデシュトラッセ 1 番

(72)発明者 マルク・イェンネ

ドイツ 5 1 3 7 5 レーフエルクーゼン、ザールシュトラッセ 1 2 番

(72)発明者 ヘルムート・ブロート

ドイツ 5 1 0 6 1 ケルン、モルゲングラベン 3 番

(72)発明者 シュテファン・キルヒナー

ドイツ 4 2 1 1 3 ヴッパータール、アム・アイゲンバッハ 1 0 番

(72)発明者 アルント・ブラウン

ドイツ 4 2 8 5 9 レムシャイト、ドッデシュトラッセ 4 0 番

Fターム(参考) 4B029 AA02 BB11 BB12 CC11 DA04 DA08 DB15