



ワクチン製造用
動物細胞培養攪拌槽
解析例

2020/07/22
株式会社ソフトフロー

目次

1. 概要	1
2. 動物細胞培養攪拌槽における物理・生化学現象.....	1
2.1 物理・生化学現象	1
2.2 理想とする細胞培養攪拌槽の特徴.....	2
3. 動物細胞培養攪拌槽の解析手法	3
3.1 流体の構成	3
3.2 物理・生化学モデル.....	4
3.2.1 ガスの溶解・析出モデル.....	4
3.2.2 細胞の生化学反応モデル.....	5
4. 動物細胞培養攪拌槽の解析例.....	6
4.1 攪拌槽内の流れの確認.....	6
4.2 細胞生育環境の確認.....	7
4.2.1 除熱能力の確認	7
4.2.2 通気状況の確認	8
4.3 細胞生育状況の確認.....	10
5. まとめ	10

1. 概要

本書では、ワクチン製造の方法の一つである「攪拌槽を用いた細胞培養」を対象に、培養攪拌槽内の流れ、細胞生育環境および細胞生育状況に関する情報を評価するための数値流体解析手法を紹介します。なお、本解析手法を用いれば、基本的に安定した培養が行え、高いワクチン収率得られる攪拌培養槽の設計に役立つと考えます。

特に、現在 COVID-19 感染症が深刻な状態であり、ワクチン開発のみならず、ワクチンを大量に、かつ安価に製造することも非常に重要となり、一刻も早く世の中に提供しなければならない状況です。細胞の培養周期は非常に長いので、バッチ製造式が殆どです。新規培養攪拌槽の製造・他の培養槽の改造による転用、そして培養攪拌槽の大型化（最もコストダウンに繋がる方法です）が必要となります。特に大型化においては、マルチスケールの多相流になるため、一般的にはスケールアップ時の相似則が成り立たず、培養攪拌槽の性能確認が必要不可欠です。

2. 動物細胞培養攪拌槽における物理・生化学現象

あらかじめ攪拌槽内に仕込んだ培養液（主にグルコース）中にワクチン株を含む初期細胞を投入し、そこから酸素・栄養の供給を行うための攪拌・通気をし、細胞培養を行います。細胞培養の周期は通常数週間程度ですが、その間、動物細胞の量や生息状況より幾つかの段階（例えば、初期・中期・末期、各段階における培養液の仕込み量が異なる）を経過し、それぞれの段階で最適な生息環境が異なります。

2.1 物理・生化学現象

細胞培養攪拌槽内では、主に以下の物理・生化学現象が存在します。従って、これらの現象を適切に解析手法に取り入れることが重要です。

- 攪拌による流れ
- 通気によるガスの溶解・析出
- 細胞の生化学による
 - 栄養（培養液、酸素）消費
 - 廃棄物（排泄物、二酸化炭素）の産出
 - ワクチン増加量
 - 細胞サイズの変化、および繁殖による細胞数の増加
 - 生化学による熱の発生とその除去（伝熱）

2.2 理想とする細胞培養攪拌槽の特徴

細胞を安定的に培養できるため、培養攪拌槽の設計に様々な工夫が施されています。以下に主な特徴を示します。

- チップスピードの制約：
流体せん断力、乱流渦（渦スケールとそのエネルギーに依存）などの流体力が細胞にダメージを与える可能性があるため、回転翼形状（せん断、剥離の少ないものを採用する）、翼回転速度（例えば、チップスピードを 1 [m/s]以下に制約する）などの工夫や制限があります。
- 通気時の気泡サイズの制約
細胞に酸素を供給するため、攪拌槽底部から通気を行う設計がほとんどですが、スパージャーから出る気泡が上昇していく過程で、分裂により発生する衝撃（波）は細胞にダメージを与える可能性があります。特に小さい気泡が分裂する際の衝撃は強いので、特に注意が必要です。しかし、気泡サイズがマイクロオーダーになると、逆に分裂がしにくい状態になるので、その分影響が低減されます。
- 速やかな酸素供給と二酸化炭素除去
細胞培養を効率よく行うためには、酸素の供給と排出された二酸化炭素の除去を速やかに行う必要があります。通気したガス（空気あるいは純酸素）の気泡から酸素が培養液に溶解し、溶存酸素となり、細胞培養液に使われます。それと同時に、細胞が排出した溶存二酸化炭素も気泡（ガス）へ析出していきます。この溶解・析出はヘンリーの法則に従っており、ガスの分圧が高いほど、表面積濃度が高いほど、溶解・析出が早くなります。従って、通気時の気泡サイズが小さいほど有利になるため、マイクロバブルを用いるケースもあります。
- 培養液（栄養）供給、排泄物（毒素）除去
細胞培養中は基本的に培養液の入れ替えはないですが、細胞の培養段階を踏まえて培養液量を継ぎ足すことがあります。
※排泄物（毒素）除去については具体的な方法を見つけることができませんでした。
- 適切な運動（動き）を細胞に与えることが必要
流れ（よどみ部+密度差による細胞沈降堆積）
- 適切な温度管理が必要
細胞生息に最適な温度範囲が存在します、特に動物細胞はその範囲が狭いため、適切な攪拌槽内温度管理が欠かせないです。温度管理するために、槽外部に水ジャケット、槽中にインナーチューブなどを設けることが多いです。
- 水圧の影響
動物細胞はあまり大きな水圧が耐えられないので、深い培養攪拌装置はあまり使いません。
- 細胞の密集具合

細胞である程度の数密度（密集具合）になると、成長が鈍くなりますが、あまりにも細胞同士が離れすぎていても、正常な成長が出来なくなります。

つまり、細胞にストレスを与えないことが動物細胞培養のコツと言えます。

3. 動物細胞培養攪拌槽の解析手法

3.1 流体の構成

ここで紹介する解析手法はオイラー多成分多相熱流体モデルをベースとするものになります。攪拌槽内の流体構成は以下と考えますが、解析の目的より、成分・相の増減も考えられます。この流体システムを対象に連続の式・NS（ナビエ・ストークス）方程式・乱流モデルを用いて、基本となる流れ解析を行います。

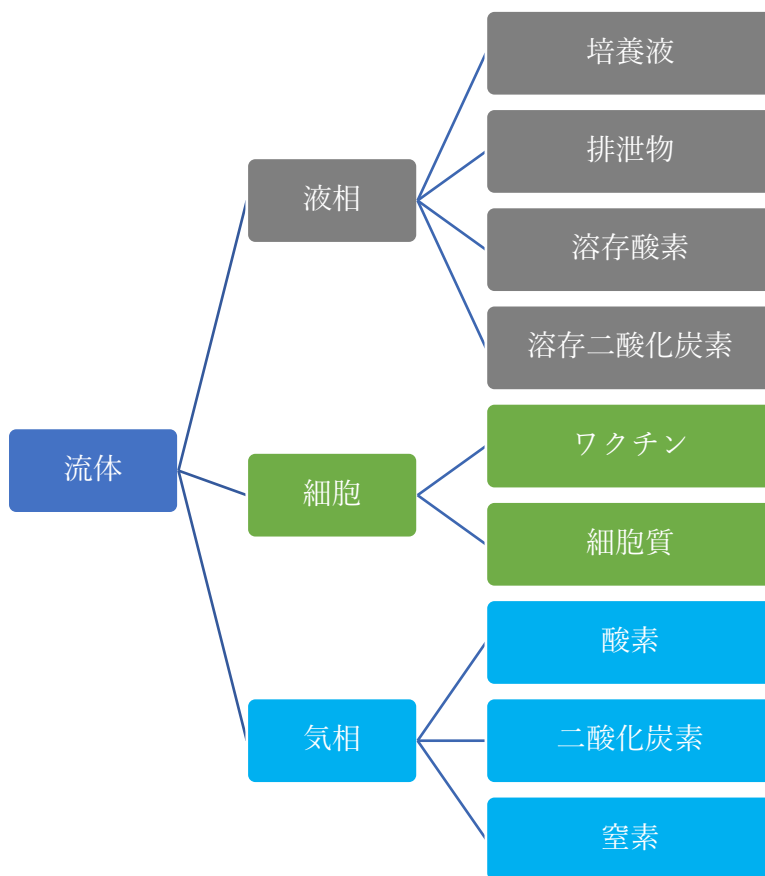


図1 攪拌槽内の流体構成

3.2 物理・生化学モデル

更に第 2.1 節で紹介した細胞培養攪拌槽内の物理・生化学現象を考慮するために以下のモデルを用います。

3.2.1 ガスの溶解・析出モデル

通気によるガス (O₂、CO₂) の溶解・析出は以下のヘンリーの法則に従うものとします。

ヘンリーの法則

$$p_i = K_H x_i \quad (1)$$

ここで、 p はガスの分圧 (あるいは蒸気圧[Pa])、 x は溶剤中におけるモル分率([-])であり、 K_H はヘンリー常数 ([Pa]) となります。例えば、O₂ と CO₂ が水に溶解する際 (常温: 298.15 [K])、それぞれのヘンリー常数は約 4420 [MPa]、165.8[MPa] となります。つまり、ヘンリー常数が大きいほど、溶解しにくいです。なお、実際の培地における各種ガスのヘンリー常数は実測が必要と考えます。

また、ヘンリー常数の温度依存性を考慮する際、一般的以下の式を用います。

$$\ln\left(\frac{H}{H_0}\right) = A\left(1 - \frac{T}{T_0}\right) + B\ln\left(\frac{T}{T_0}\right) + C\left(\frac{T}{T_0} - 1\right) \quad (2)$$

ここで、 T_0 は基準温度 (298.15 [K]) であり、 H_0 は基準温度におけるヘンリー常数となります。但し、OpenFOAM において、以下の無次元ヘンリー常数の逆数 ($1/K'_H$) が入力値として使われており、単位換算が必要となります。

$$C_g = K'_H C_l \quad (3)$$

ここで、 C は濃度 ([kg/m³]) であり、下添え字 l と g はそれぞれ液と気相を意味します。よって、以下の関係が得られます。

$$K_H = \frac{p_i}{x_i} = \frac{(C_{gi}/M_{wi})RT}{(C_{li}M_{wl})/(\rho_l M_{wi})}, \quad K_H = \frac{p_i}{x_i} = \frac{C_{gi} RT \rho_l}{C_{li} M_{wl}} = K'_H \frac{RT \rho_l}{M_{wl}} \quad (4)$$

$$K'_H = K_H \frac{M_{wl}}{RT \rho_l} \quad (5)$$

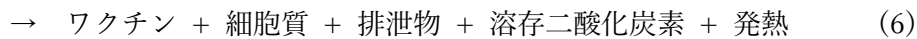
従って、常温常圧の水空気系における酸素、二酸化炭素、空気の場合、OpenFOAM における無次元ヘンリー常数とその逆数は以下となります。

溶媒	溶媒密度 [kg/m ³]	モル重量 [kg/mol]	温度 [K]	ガス	モル重量 [kg/mol]	通常				OpenFOAM				OpenFOAM
						ヘンリー常 数 [MPa]	分圧 [Pa]	モル分率 [-]	質量分率 [-]	ヘンリー常 数 [-]	気中濃度 [kg/m ³]	液中濃度 [kg/m ³]	質量分率 [-]	ヘンリー 常数の逆数 [-]
H2O	1000	0.018	298.15	O2	0.032	4420	1.00E+05	2.26E-05	4.02E-05	32.1	1.29E+00	4.02E-02	4.02E-05	3.12E-02
H2O	1000	0.018	298.15	CO2	0.044	165.8	1.00E+05	6.03E-04	1.47E-03	1.2	1.78E+00	1.47E+00	1.47E-03	8.31E-01
H2O	1000	0.018	298.15	Air	0.0289	7260	1.00E+05	1.38E-05	2.21E-05	52.7	1.17E+00	2.21E-02	2.21E-05	1.90E-02

3.2.2 細胞の生化学反応モデル

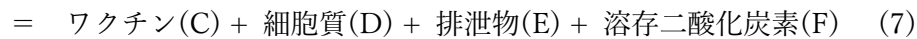
実際の細胞の生化学現象はかなり複雑なものであり、影響要因も多く存在しますが、ここでは単純化し細胞の生化学反応は以下の簡易モデルを用いて評価します。その際、細胞の体積変化（球形仮定、常に径が一定とする）は考慮せず、その代わりに細胞質を用いて細胞数（細胞数＝細胞質/細胞密度/細胞体積）を表現します。

培養液 + 溶存酸素



なお、上反応式中の質量比は例えば以下と仮定します。

培養液(A) + 溶存酸素(B)



本来、生化学反応速度は多くの要因（培養液、溶存酸素、排泄物、溶存二酸化炭素、細胞質、温度など）に影響されますが、ここでは、単純に下式に示す細胞質の1次関数の形で与えます。

$$\mathbf{m}_{body} = \mathbf{k}_r \mathbf{C}_{body} \quad (8)$$

ここで、 \mathbf{m}_r は細胞質の生成速度[kg/m³/s]、 \mathbf{k}_r は反応速度[1/s]、 \mathbf{C}_{body} は細胞質の濃度[kg/m³]です。更に、上記式(7)の関係より、他の物質の消費または生成速度は以下となります。

$$\text{培養液} \quad \mathbf{m}_{glucose} = -\frac{A}{D} \mathbf{m}_{body} \quad (9)$$

$$\text{溶存酸素} \quad \mathbf{m}_{O2} = -\frac{B}{D} \mathbf{m}_{body} \quad (10)$$

$$\text{ワクチン} \quad \mathbf{m}_{glucose} = \frac{C}{D} \mathbf{m}_{body} \quad (11)$$

$$\text{排泄物} \quad \mathbf{m}_{waste} = \frac{E}{D} \mathbf{m}_{body} \quad (12)$$

$$\text{溶存二酸化炭素} \quad \mathbf{m}_{CO2} = \frac{F}{D} \mathbf{m}_{body} \quad (13)$$

しかし、実際の反応速度は、培養液濃度、溶存酸素濃度、および溶存二酸化炭素濃度にも制限されます。

また、反応熱 Q [W/m³] は下式で評価します。細胞質の生成速度 [kg/m³/s] と比例関係（係数 k_q [J/kg]）を持ちます。

$$Q = k_q m_{body} \quad (14)$$

4. 動物細胞培養攪拌槽の解析例

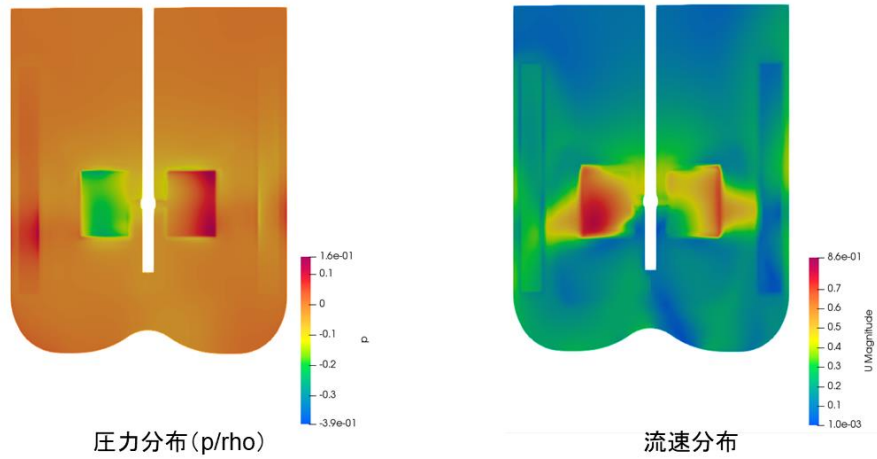
上記モデルを同時に考慮し、解析するのが理想的ですが、計算時間が長くなるため、段階を踏んで実施することをお勧めします。なおこの分野の一般的な解析は、下記「4.2.2 通気状況の確認」とどまるものが殆どであり、「4.3」以後の細胞の生化学反応を考慮した解析はあまり公開されていません。恐らく、生化学反応の複雑さ・データの欠如・秘密保持上の考慮によるものと考えます。

以下では、幾つか典型的な解析例を紹介します。

4.1 攪拌槽内の流れの確認

解析手法	液单相を対象に連続式、NS 式、そして乱流モデルを用いて解析を行います。
計算コスト	解析手法がシンプルで、定常解析ができ、短時間で解析結果が得られるメリットがあります。
得られる情報	全体的な流れ、せん断、乱れなどの情報が得られます。
応用方法	攪拌槽形状（縦横比、底面形状、邪魔板）・攪拌翼の設計に利用できます。

解析結果



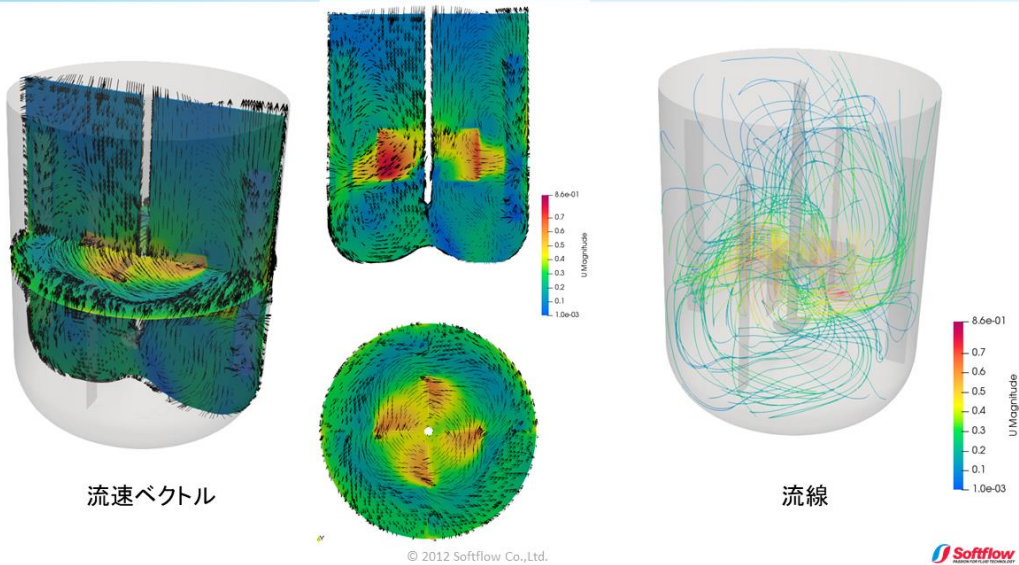
6

© 2012 Softflow Co.,Ltd.



図 2-1 攪拌槽内流れ解析のサンプル

解析結果



7

© 2012 Softflow Co.,Ltd.



図 2-2 攪拌槽内流れ解析のサンプル

4.2 細胞生育環境の確認

4.2.1 除熱能力の確認

解析手法	上記 4.1 の手法に更にエネルギー保存式を加えて温度の解析も行いま
------	------------------------------------

	す。但し、単純化のため、実際の細胞の生化学反応による発熱ではなく、一定の体積発熱 ($[W/m^3]$) を与えて解析します。
計算コスト	解析手法がシンプルで、且つ、定常解析ができ、短時間で解析結果が得られるメリットがあります。
得られる情報	流れの情報に加えて、槽内の温度分布・除熱量が得られます。
応用方法	攪拌槽の冷却方法 (水ジャケット・インナーチューブなど) 設計に利用できます。

解析結果

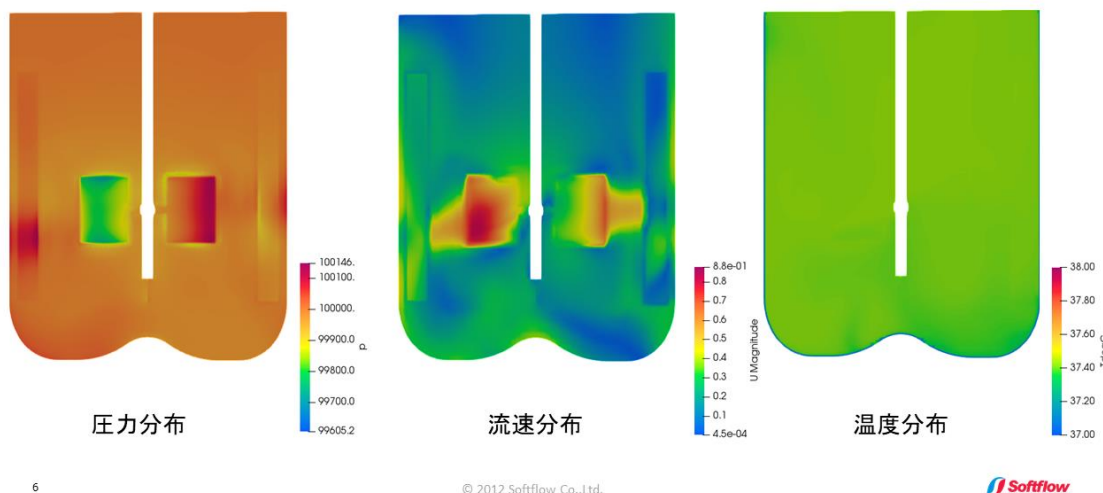
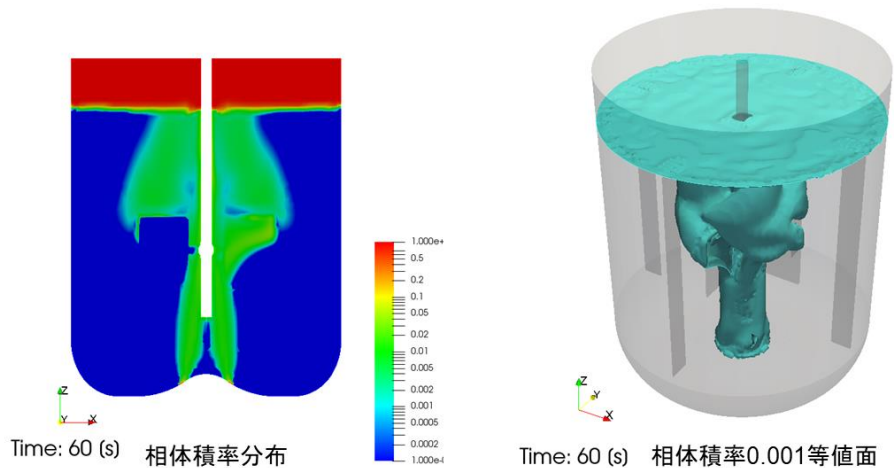


図3 徐熱解析のサンプル

4.2.2 通気状況の確認

解析手法	気液二相を考慮した解析手法となります。気相中のガス成分および液相中の溶存ガス成分も考慮し、ガスの溶解・析出モデルを取り入れます。
計算コスト	非定常解析になりますので、計算時間は長くなります。
得られる情報	上記 4.1 の流れ情報に加え、ガス、溶存酸素・溶存二酸化炭素の分散状況が得られ、酸素供給・二酸化炭素除去能力がわかります。ただし、実際の細胞の生化学反応による溶存ガスの変化は考慮できず、単純なガス溶解・析出現象となる点に注意が必要です。
応用方法	ガスの供給方法 (スパージャータイプや配置など) の設計に利用できます。

解析結果（静止画@60s）



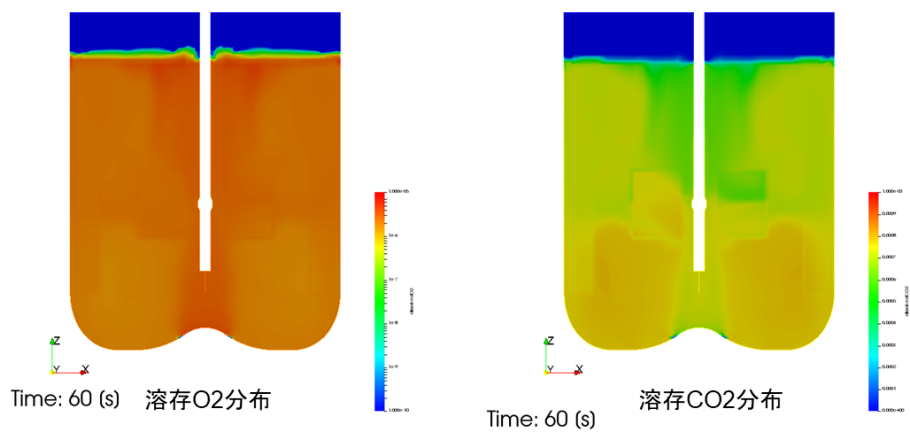
13

© 2012 Softflow Co.,Ltd.



図 4-1 通気解析のサンプル

解析結果（静止画@60s）



15

© 2012 Softflow Co.,Ltd.



図 4-2 通気解析のサンプル

更に、細胞相を考慮すれば、よどみなどによる細胞の堆積、流動状態（動き）が確認できます。

4.3 細胞生育状況の確認

解析手法	第3節で説明した手法となります。
計算コスト	非定常解析になります。考慮する相・成分、モデルが更に多いため、計算時間がかかります。
得られる情報	より実現象に近い、流れ場、温度分布（除熱能力）、通気状況がわかり、更に、培養液消費、排泄物の増加、細胞の成長、ワクチン生成量も確認することができます。
応用方法	培養攪拌槽の最終的性能確認・最適化に適します。

解析例：（その他、より現実に近い解析事例については逐次公開予定）

注意点：細胞の成長が良い ≠ ワクチン量（収率）の増加。ここで使われた生化学反応速度を一定値とするシンプルなモデルはあくまでも一例であり、細胞の生化学反応を疑似的に模擬したものになります。

5. まとめ

今回、動物細胞培養攪拌槽に関するいくつかの手法を紹介しました。これらの解析を実施することで、攪拌槽の設計をより効率よく行うことができるのではないかと考えます。

しかし、動物細胞の生化学反応に関しては不明点が非常に多く、現象の単純化や、主要因を的確に選択することが非常に重要です。数値解析と言うと完璧なものを想像してしまいがちですが、まずは、定量より定性（あるいは半定量的）の評価から始めてみるのが良いのではないのでしょうか。

今回は攪拌槽の性能を一部生化学反応も含めた物理量で評価する方法を紹介しましたが、実際の製造現場では、時々状況に応じたコントロールもしているのではないかと想像します。今後実際の運転状況なども加味することで、より現実に近い解析ができるのではないかと期待しています。

解析の設定方法等について

今回のサンプル解析はすべて OpenFOAM で行っています。各サンプルの解析手法や条件設定の資料も提供可能です。なお、本資料はすでに OpenFOAM を使用している方、もしくは流体解析の知識がある方向けの内容となっておりますので、あらかじめご承知おきください。

具体的な解析資料をご希望の方は、お手数ですが下記問い合わせフォームよりご請求ください。

<https://www.softflow.jp/inquiry/>