

HAMILTON®

CO<sub>2</sub>

溶存二酸化炭素シリーズ

## 培養と溶存二酸化炭素

プロセスパラメータとしての必要性について

©2021 Hamilton Company. All rights reserved.

All other trademarks are owned and/or registered by Hamilton Company in the U.S. and/or other countries.

111003179/00 — 02/2021

翻訳：株式会社ティ・アンド・シー・テクニカル

商品開発課

2021年2月15日



## 目次

概要 .....	3
1. CO <sub>2</sub> の基礎：細胞培養の例.....	4
1.1 バッファースステムのpHを制御するためのCO <sub>2</sub> .....	5
1.1.1 重炭酸塩ベースの緩衝液システムの原理 .....	5
1.1.2 CO <sub>2</sub> スパージ（液中ガス拡散）によるpH調整 .....	8
1.2 細胞培養代謝の副産物 .....	10
1.3 バイオプロセス中のpCO <sub>2</sub> とpHの変化 .....	11
1.3.1 乳酸とpCO <sub>2</sub> の相互作用は培地のpHに影響を与える .....	11
1.3.2 細胞培養中におけるpH、pCO <sub>2</sub> 、VCD（生細胞密度）の状態 .....	12
2. 重要なプロセスパラメータとしてのCO <sub>2</sub> .....	14
2.1 培養への影響 高すぎず、低すぎず .....	15
2.2 培養/発酵タイプに応じた特定の影響.....	15
2.2.1 細胞培養（哺乳類） .....	16
2.2.2 発酵.....	16
3. CO <sub>2</sub> をリアルタイムで監視および制御する .....	19
3.1 制御戦略で考慮する点 .....	19
3.2 生産性：より長い実行可能フェーズと最大化された製品力価 .....	22
3.3 開発の生産性：スケールアップ/スケールダウンの反復を短縮する .....	25
4. 最後に.....	28
用語集.....	30
参考文献.....	35

## 概要

溶存二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) は、PAT (工程解析システム) ガイドラインに従ったバイオ医薬品製造プロセスにおける重要なプロセスパラメーター (CPP: Critical Process Parameters) です。細胞外および細胞内 pH などの他のパラメーターに影響を与えることにより、細胞増殖または生成物の形成と品質に関与するさまざまな代謝経路に影響を及ぼします。高濃度の二酸化炭素は、例えば、哺乳類の細胞培養の成長を阻害し、それらの生成物 (例えば、モノクローナル抗体またはウイルス) の力価 (濃度活性の測定値) を低下させる可能性があります。ならびにそれらの治療効果を損ないます (例えば、望ましくないグリコシル化パターンを有するモノクローナル抗体の生成)。また高すぎる CO<sub>2</sub> の濃度は、微生物発酵にも悪影響を及ぼします。

このため二酸化炭素は、特定のバイオプロセスアプリケーションごとに適切な飽和範囲内でリアルタイムに制御する必要があります。

CPP としては、KPI (主要業績評価指標: 生細胞密度、製品力価など) および CQA (重要品質属性: グリコシル化パターンなど) に影響を与えるため、リアルタイムで制御する必要があります。

本書では、バイオリアクター (生体触媒を用いて生化学反応を行う装置) における CO<sub>2</sub> の複雑な役割と、上流プロセスで目的のレベルを達成するために使用できる制御戦略について説明します。

本書は 3 つの章に分けて説明を行っています。

1 つ目は、バイオプロセスにおける CO<sub>2</sub> の多くの役割と、プロセス全体で CO<sub>2</sub> がどのように発生するかを説明することで基礎を築きます。第 2 章では、溶存 CO<sub>2</sub> がさまざまな培養や発酵の CPP と見なされる理由を分析しています。最後に、第 3 章では溶存 CO<sub>2</sub> をリアルタイムで制御する方法の概要、それによるバイオプロセスの効率をどのように改善できるかについて論じています。

---

本書で使われる重要な用語について

溶存二酸化炭素、CO<sub>2</sub>、pCO<sub>2</sub>、バイオプロセス、pH 制御、哺乳類細胞培養、微生物発酵、CHO、ベロ細胞、微生物、生細胞密度、製品力価、乳酸シフト、浸透圧、PAT、重要なプロセスパラメーター、リアルタイム制御、CPP、KPI、CQA、mAb、ワクチン、およびグリコシル化。

## 1. CO<sub>2</sub>の基礎：細胞培養の例

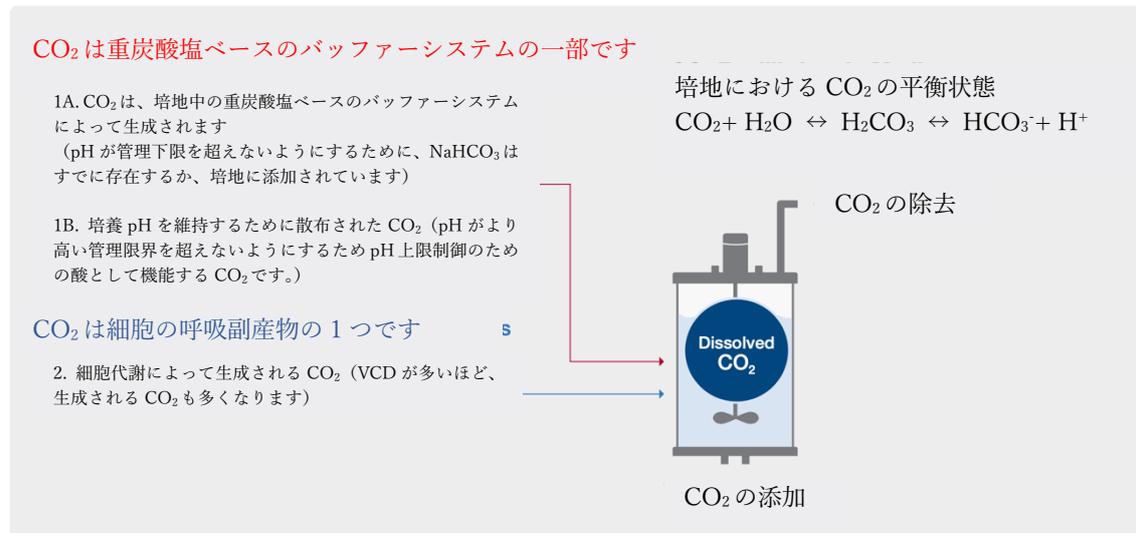


図1：細胞培養装置内の溶存CO<sub>2</sub>

細胞の代謝による生成されるものとバッファーとして外部から与えられる2つがある

二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) は生物生産の重要な部分です。通常、バイオ医薬品プロセス全体を通じてバイオリクター内でその濃度は増加します。このプロセスは、動物細胞培養と微生物発酵の両方のほぼすべての「好気性」バイオプロセスで起こります。

このようなプロセスに関与する生物は、呼吸プロセスの一部としてCO<sub>2</sub>を生成し、その後、CO<sub>2</sub>はバイオリクター培地に溶解します。細胞培養では、図1に示すように、溶解したCO<sub>2</sub> (DCO<sub>2</sub>)も培養の緩衝システムで一般的に重要な役割を果たします。

図のようにCO<sub>2</sub>はバイオリクターで複数の役割を果たしているため、O<sub>2</sub>などのパラメーターよりも、バイオプロセスでの理解と制御が複雑になります。CO<sub>2</sub>が関与する状態を理解し、PATガイドライン<sup>1</sup>によってCO<sub>2</sub>がクリティカルプロセスパラメータ (CPP)として定義されている理由を理解することが重要です。このため状態の複雑さを解き明かすため、最初にCO<sub>2</sub>がバイオリクターにどのように浸透するかを深く掘り下げる必要があります。

本書では、細胞培養と発酵の両方におけるこの複雑なバランスについて説明し、最初の章では主に細胞培養に焦点を当てます。

## 1.1 バッファーシステムの pH を制御するための CO<sub>2</sub>

### 1.1.1 重炭酸塩ベースの緩衝液システムの原理

細胞培養で最適な結果を得るには、pH 変動の不感帯が非常に狭い環境が必要になります。最大の生細胞密度と生産性は、細胞内培地であるサイトゾル（細胞質基質）が生理学的 pH 範囲内で安定している場合にのみ成立します。この細胞内 pH は、培地の pH と呼ばれる細胞外 pH と一致する傾向があります。そのため、バイオプロセスエンジニアは、培地の pH を制御することによって細胞内 pH を最適化するようにしています。

バイオリクター培地に必要な pH 設定値は通常 6.4~7.4 の間にあり、不感帯は多くの場合 ±0.1 pH（または ±0.05 程度）です。最適な pH は、細胞株、目的の製品、およびその他の要因によって異なります。この狭い範囲を維持するために、バイオプロセスにはバッファーシステムが含まれています。実験室での研究は通常、HEPES (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S) などの工業的に生産された生物学的緩衝液で機能しますが、生産環境では通常、CO<sub>2</sub>/重炭酸塩 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ベースの生理学的緩衝液を使用します<sup>2</sup>。CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ベースのバッファーシステムは、生物が最適な生理学的 pH を維持するために自然に使用するシステムと類似しているため、より一般的に使用されます。例えば、哺乳類の血液中で、ガス、栄養素、代謝物の変動に起因する有害な pH 変化を防ぐように働くなどです。重炭酸塩の緩衝は図 2 に示すルシャトリエの原理に従います。

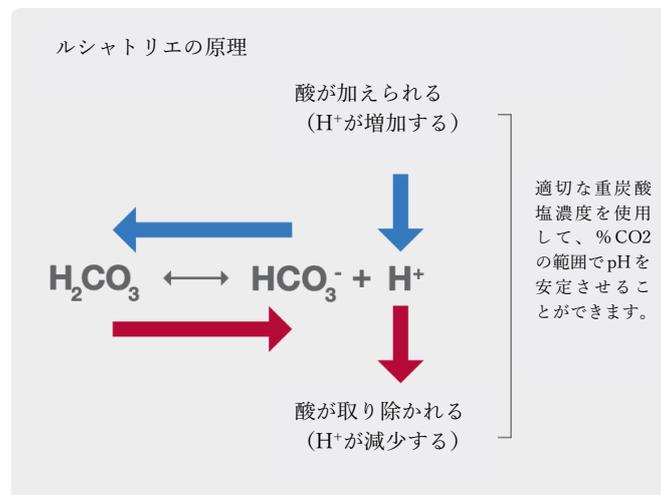
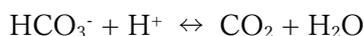


図 2：重炭酸塩緩衝の原理

<https://www.phe-culturecollections.org.uk> から例示<sup>3</sup>

培地の酸性度の増加は、水素イオン (H<sup>+</sup>) の増加を示しています。遊離の重炭酸イオンは遊離の H<sup>+</sup>イオンと反応して炭酸 (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) を形成し、反応を化学量論式 1 の右にシフトし、pH を安定させます。

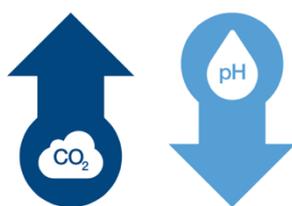
#### 化学量論式 1



生理学的 pH が 6.8~7.4 の培地

したがって

- 炭酸ナトリウム (NaHCO<sub>3</sub>) を添加し重炭酸イオン (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) を増加させると、培地の pH が上昇、酸性からアルカリ性へと近づきます。
- リアクター中のガスに含まれる CO<sub>2</sub> の分圧 (pCO<sub>2</sub>) が増加すると、培地内の溶存二酸化炭素 (DCO<sub>2</sub>) が増加します。その二酸化炭素が水と反応し水素イオンと炭酸イオンができます。結果 pH が低下します。



6.8<細胞培養における生理学的 pH<7.4

式 1 と図 2 は、培地製剤中の NaHCO<sub>3</sub> の量が、特定のバイオプロセスにおいて予測される pH 値調整に適切な場合、生理学的 pH をさまざまな DCO<sub>2</sub> レベルに維持できることを示しています。たとえば、RPMI などの細胞培養に一般的に使用される培地で pH 7 に到達するには、バイオリアクターで予想される公称 pCO<sub>2</sub> が 5% の場合、1.9~2.2 g/L の NaHCO<sub>3</sub> の濃度が必要です。DMEM などの別の培地では、最大 3.6g/L の NaHCO<sub>3</sub> で開始した場合、公称 pCO<sub>2</sub> が最大 10% になります<sup>4</sup>。結果として、培地の pH を厳密に制御するだけでは一貫した CO<sub>2</sub> を確保するには不十分なことに注意する必要があります。

pH 7 の水溶液では、DCO<sub>2</sub> は主に 2 つの無機形態、遊離二酸化炭素 (CO<sub>2</sub> (aq)) および重炭酸イオン (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) が発生します。ヘンリーの法則で説明されているように、2 種類の水溶液はヘッドスペースの pCO<sub>2</sub> に依存しています。

#### ヘンリーの法則

$$H_{\text{CO}_2} = \frac{C_{\text{CO}_2, \text{L}}}{P_{\text{CO}_2}} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{L bar}} \right]$$

ヘンリーの法則は、分子濃度ではなく、CO<sub>2</sub> の分圧 (pCO<sub>2</sub>) の観点から DCO<sub>2</sub> が一般的に参照される理由を説明するのに役立ちます。

---

分圧の一般的な測定単位には、mbar、KPa、mmHg、または%-sat が含まれます。CO<sub>2</sub>の文献の測定単位は一般的に分野によって異なります。たとえば、生物学に焦点を当てた文献では、「mmHg」と「%Saturation」を使用する傾向があります。本書では理解を容易にするため、「溶存 CO<sub>2</sub> (DCO<sub>2</sub>)」という用語による換算表を用語集に含めるようにしています。

---

ヘンリーの法則に基づいて、pCO<sub>2</sub>は細胞内細胞質（代謝反応が起こる場所）と細胞外培地との間のCO<sub>2</sub>の交換に影響を与えます。培地中のpCO<sub>2</sub>と細胞内細胞質の間の大きな勾配は、細胞内へのCO<sub>2</sub>の流れを引き起こし、細胞内pHを変化させます。サイトゾル内のCO<sub>2</sub>の不均衡は、細胞内pHを生理学的範囲外にしてしまいます。代謝パターンを混乱させ生産性の低下やアポトーシス（調節された細胞の死）さえも生じてしまいます。このように培地中のCO<sub>2</sub>の分圧は、細胞の健康にとって重要なため、バッファーシステムコンポーネントとしての使用と並行して、多くのバイオプロセスパラメーターへの影響も考慮する必要があります。例として、培地の塩分、温度（図3）、静水圧などのパラメーターがあります。大規模生産のバイオリアクターは、リアクターの上部と下部の間で静水圧の変動が大きくなりCO<sub>2</sub>の分布に影響を与えます。バイオリアクターのCO<sub>2</sub>プロファイルを適切に理解するには、これらすべての要因を考慮する必要があります。

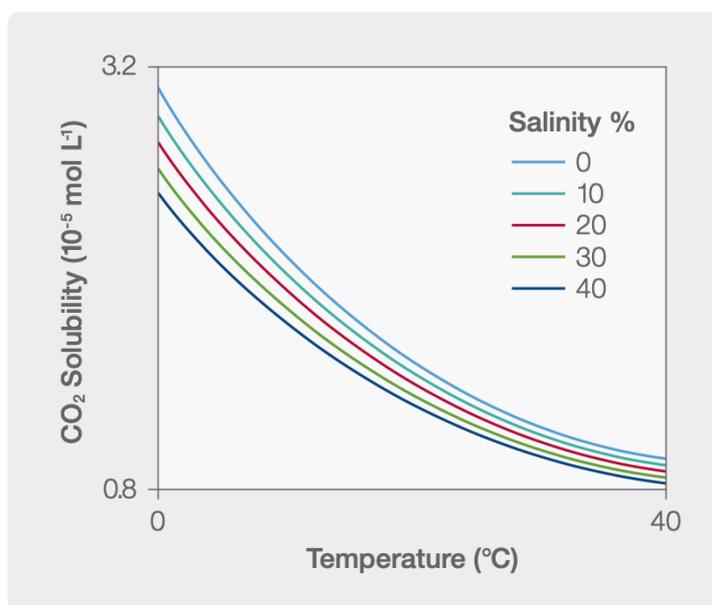


図3：さまざまな温度での二酸化炭素の水への溶解度。  
「Carbon Dioxide Sensing<sup>5</sup>」から

### 1.1.2 CO<sub>2</sub> スパージ（液中ガス拡散）による pH 調整

前のセクションで説明したように、目的の範囲で安定した細胞内 pH は、培養液の増殖と産物の発現に有利に働きます。バイオリアクターの複雑さの範囲内でこの安定した pH 設定値を維持するには、プロセス全体を通して微調整された制御戦略が必要です。制御戦略がないと、培地は酸性になる傾向があります。このため目的の pH を維持するために、すべての培地製剤にはバッファーが含まれています。本章ではこのバッファーシステムが産業用バイオプロセスでどのように機能するかについて説明します。

所望の pH 値に到達するために、バイオプロセスの開始時に、初期濃度の NaHCO<sub>3</sub> がバイオリアクターに添加されます。これによりプロセス全体を通して、バッファーは最適な培養 pH を維持します。場合によっては、バッファーシステムはブレンステッド酸（例：HCl）を添加して pH を下げるか、ブレンステッド塩基（NaOH など）を使用して pH を上げます。これは、バイオリアクター内で pH を一定に保つために広く使用されている戦略ですが、潜在的な問題があります。たとえば、このような添加によって継続的に調整すると、プロセス全体で培地の浸透圧が増加します。浸透圧は各プロセスに異なる影響を与える可能性があります。培養の生産性（つまり最終的なタンパク質力価）に悪影響を与えると一般に考えられています。モノクローナル抗体（mAb）またはワクチンの製造に使用される細胞培養の大部分は、現在、これらの欠陥を克服するため典型的なブレンステッド酸の代わりに CO<sub>2</sub> ベースの緩衝システムを使用しています。CO<sub>2</sub> は、主に 3 つの方法でバイオリアクターに追加できます。

- 容器の上部空間を覆うものとして
- リアクターの下からスパージ
- NaHCO<sub>3</sub> の添加により形成

DCO<sub>2</sub> は、バッファー容量と最終的には培地の pH を制御するために使用されるため、適切な量で追加する必要があります。CO<sub>2</sub> を追加すると、式 1 は図 4 に示す式 2 のように書き直すことができます。

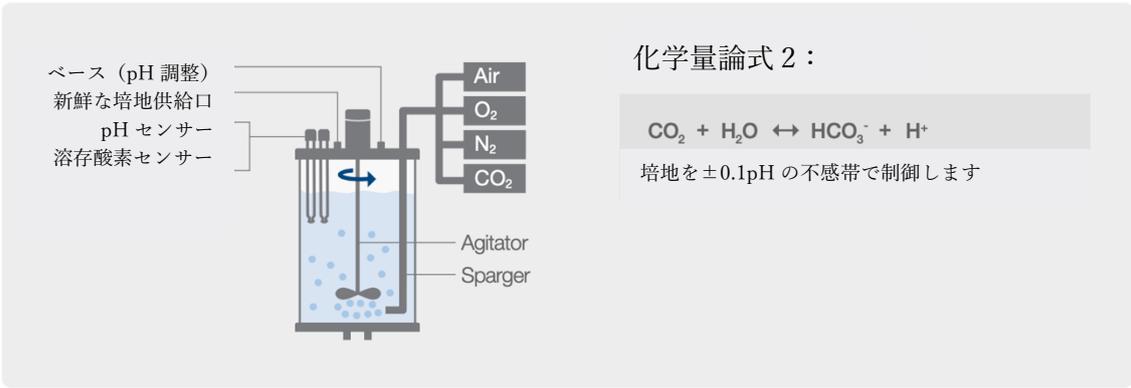


図 4 : スパージガス供給を持つバイオリクター

## 1.2 細胞培養代謝の副産物

上記の意図的なプロセスに加えて、細胞培養代謝の副産物としての  $\text{CO}_2$  もバイオリアクターに蓄積します。哺乳類細胞培養におけるこれらの反応の生物化学量論は、2つの主要なプロセスに要約できます。

最初のプロセスは呼吸です。これは、グルコース（ブドウ糖）が酸化されて、細胞内エネルギー交換の基本分子である ATP を生成します（式 3、図 5）。2 番目のプロセスでは、細胞増殖と mAb などの治療用タンパク質が生成されます（式 4、図 6）。



図 5：単純化した細胞好気性呼吸

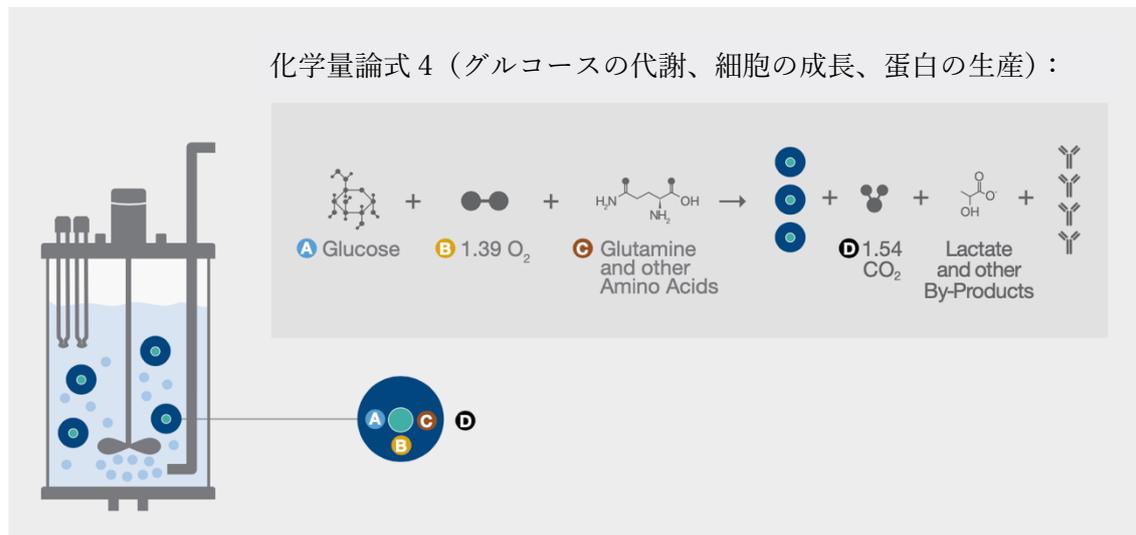


図 6：単純化したグルコース/乳酸代謝、細胞増殖、およびタンパク質生産

これらの反応は、酸素消費量、生細胞密度、製品力価、二酸化炭素生成、および乳酸生成の間にある関係を理解するのに役立ちます。これらの関係から、生成/消費される溶存酸素 (DO) と  $\text{CO}_2$  の関係からバイオプロセスの展開を評価することになります。酸素摂取率 (OUR)、炭素発生率 (CER)、呼吸商 (RQ) などのパラメーターを正確に決定するために特に必要です<sup>6</sup>。

### 1.3 バイオプロセス中の pCO<sub>2</sub> と pH の変化

先に説明したように、CO<sub>2</sub> は培地の pH と多面的な関係があります。これは細胞呼吸の典型的な産物であり、バッファシステムの主要な構成要素です（どちらも溶液中の酸形成と増加に寄与します）。CO<sub>2</sub> やバッファシステムと相互作用する乳酸など、培地の酸性度を高める他の要因も考慮する必要があります。本章では、典型的なプロセス全体の各パラメータを通じこれらの要因の相互作用と予想される作用について説明します。

#### 1.3.1 乳酸と pCO<sub>2</sub> の相互作用は培地の pH に影響を与える

図 6 で簡略に示している通り、CO<sub>2</sub> やその他の生成物に加えて、グルコースの代謝によって乳酸が生成されます。乳酸は成長期に多く生成され、バイオリアクターに蓄積します。

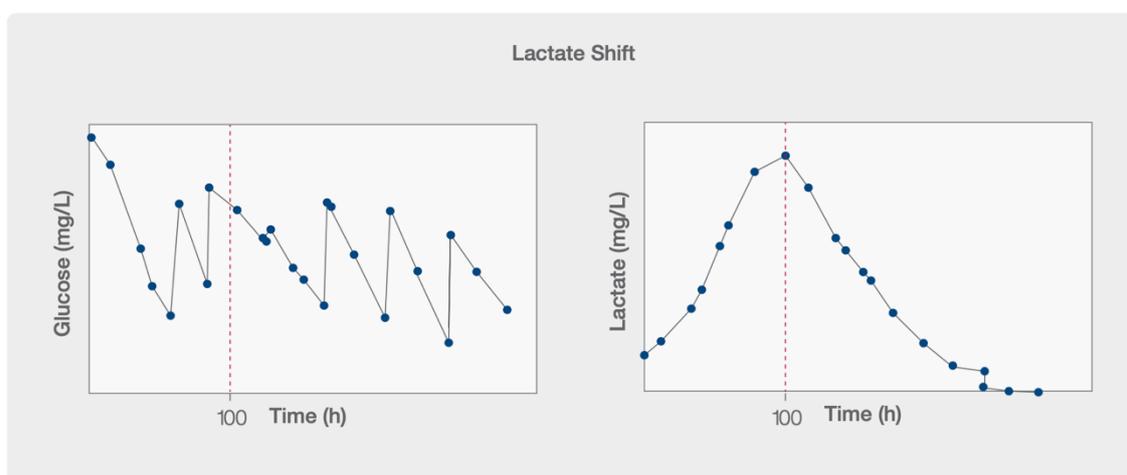


図 7：健康な細胞培養は、一定時間後に消費をグルコースからラクテイト（乳酸）にシフトすることが期待されます。この例では 100 時間です。

これはブレンステッド酸として作用し H<sup>+</sup>イオンを生成、培地の pH を低下させます。この効果は、十分なバッファ容量がある限り、バッファシステムによって相殺されます。中和せずに放置すると、乳酸の蓄積は培養に対して有毒になります。バイオプロセスが期待どおりに実行される限り、細胞培養は定常期に入ると、栄養源として自ら生成した乳酸を消費し、炭素源としてグルコースの消費を始めます。この変化は乳酸シフトと呼ばれ、一般的に望ましいと見なされています。このシフトは、乳酸の蓄積を防ぎ、同時に必要なブドウ糖の供給を減らします。この重要なイベントは、培養寿命の延長と最終製品の力価にも関係しています<sup>7</sup>。プロセスで乳酸シフトが発生する時、通常、培養が定常期に入る時期に始まります。研究によると、バッチ培養および流加培養での pCO<sub>2</sub> の上昇（pCO<sub>2</sub> 値が低い対照培養と比較して）は、このシフトの遅延または完全な欠如につながります。このような状況では、乳酸の蓄積に対し望ましい pH レベルを維持するため、塩基の添加で継続的に補償する必要があります<sup>27</sup>。塩基を継続的に添加すると培地の浸透圧が増加します。前述のように、これは毒性または逆効果をもたらす可能性があります。言い換えれば、特定のバイオプロセスに

適切な pCO<sub>2</sub> レベルを特定し制御することで、乳酸シフトが確実に発生し（または早期に発生し）、生産性が向上します。

### 1.3.2 細胞培養中における pH、pCO<sub>2</sub>、VCD（生細胞密度）の状態

バイオプロセスにおける pH と CO<sub>2</sub> の重要な役割は複雑な関係を持っています<sup>8</sup>。これは主に CO<sub>2</sub> が pH を調整するために使用されていることによります。また pH を制御することで CO<sub>2</sub> も制御されているという誤った仮定につながる可能性もあります。図 8 は、これが当てはまらないことを示しています。この代表的な例では<sup>9,10</sup>、pH は 6.9 に制御され、不感帯は ±0.1 です。ただし、CO<sub>2</sub> の変動軌跡（プロファイル）には、プロセスに関連する可能性のある大きな変動があります。図 9 は、CO<sub>2</sub>、塩基添加、乳酸と培地の pH との関係を示しています。

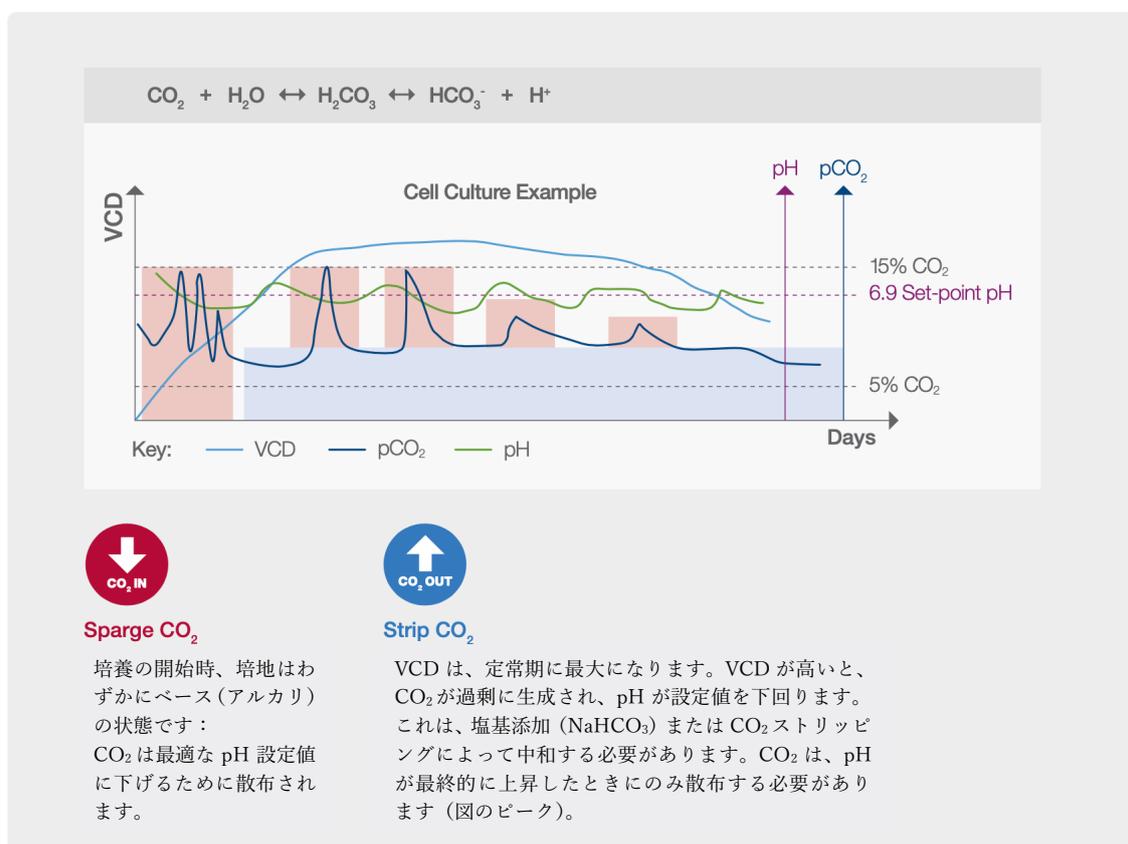


図 8：pH が制御され、pCO<sub>2</sub> が監視されている場合の細胞培養・流加培養における pH、pCO<sub>2</sub>、および VCD の変化。

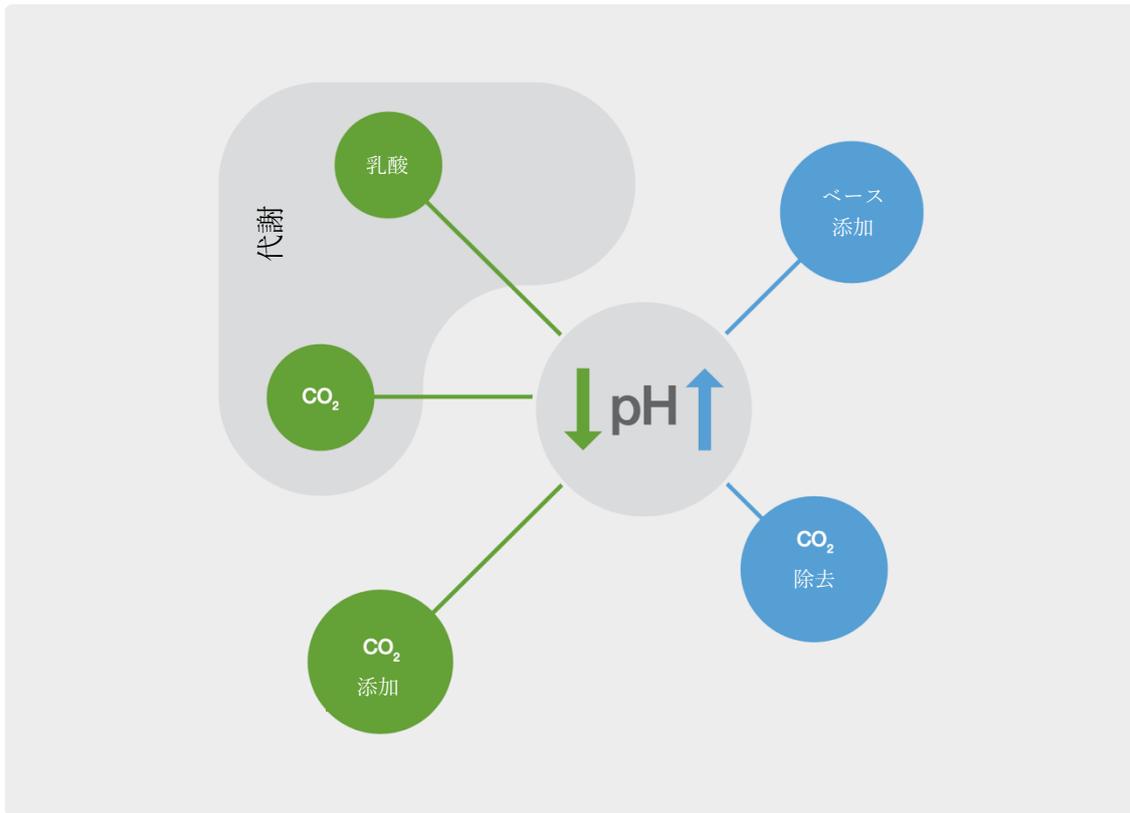


図 9：細胞培養の pH における鍵となる影響

この章の情報は、DCO<sub>2</sub>が重要なプロセスパラメータである理由を理解するために必要な詳細を提供します。これについては第 2 章で概説し、続いてリアルタイム CO<sub>2</sub>制御の有益な効果について第 3 章で説明します。

## 2. 重要なプロセスパラメータとしての CO<sub>2</sub>

バイオプロセス中の CO<sub>2</sub> プロファイルは、前述のように細胞培養を良好に保つための指標ですが、それ以上に重要なプロセスパラメーター（CPP）です。Process Analytical Technologies (PAT) Initiative<sup>1</sup>によれば、これは、pCO<sub>2</sub>（および pH や温度などのパラメーター）がバイオリクター制御における実用的なパラメーターであることを意味します<sup>11</sup>。CPP は、生細胞密度などの主要業績評価指標（KPI）や、グリコシル化パターンなどの最終製品の重要品質属性（CQA）に直接影響します<sup>33</sup>。CPP として、CO<sub>2</sub> には、「ゴールドンバッチ」とも呼ばれる理想的なバッチの定義済みセットポイントと定義済みプロファイルが必要です。本章では、さまざまなアプリケーションで pCO<sub>2</sub> がどのように見えるか、および pCO<sub>2</sub> が重要である理由について説明します。

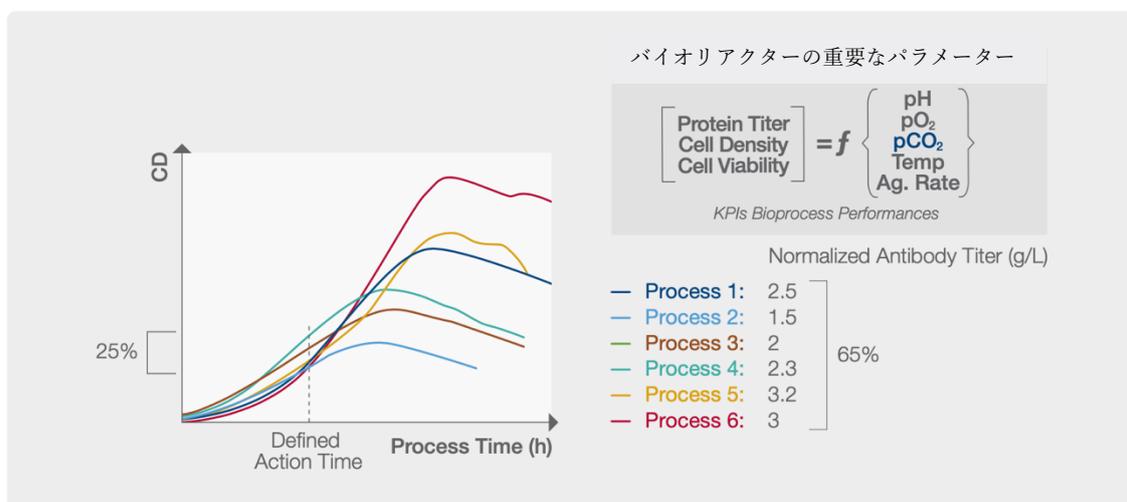


図 10：バイオプロセスの主要業績評価指標に影響を与える PAT の重要なプロセスパラメータ

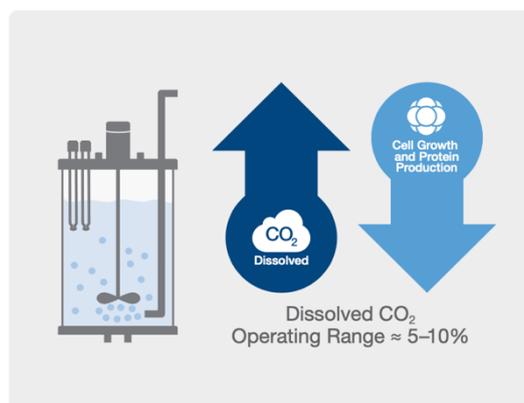


図 11：細胞培養における pCO<sub>2</sub> の有害/毒性レベルの単純化  
WuXI Biologics バイオリクターの細胞培養における溶存 O<sub>2</sub> と CO<sub>2</sub> の役割の理解<sup>12</sup>

## 2.1 培養への影響 高すぎず、低すぎず

すべてのバイオリクターCPP (DO、pH など) と同様に、CO<sub>2</sub>が多すぎたり少なすぎたりすると、バイオプロセスに悪影響を与える可能性があります。二酸化炭素と細胞、または微生物との相互作用のメカニズムは、培養の種類によって異なる最適範囲に影響を与えます。影響と最適範囲については次の章で説明します。

プロセスに十分な溶存二酸化炭素がない場合、主に2つの状態を生じます。第一に、pH 緩衝システムはその緩衝能力を保持しません。第二に、反応物として CO<sub>2</sub> に依存するアナプレロティック反応 (代謝中間体を形成する反応) が制限されます。どちらの状態も、細胞の生存率と最終的にはバイオプロセスの生産性に悪影響を及ぼします。文献によると、5%飽和未満の CO<sub>2</sub> レベルに下限があることが知られています<sup>11</sup>。たとえば、物質移動が適切に制御されておらず、大量の CO<sub>2</sub> が除去または中和された場合に発生する可能性があります。実際にはバイオリクター内の CO<sub>2</sub> の低下はまれにしか発生しません。それよりはるかに頻繁に起こることは、バイオリクター内に過剰な CO<sub>2</sub> が存在する状態です。濃度が高すぎると、細胞培養と発酵に対する毒性作用があり、細胞の生存率と最終製品の力価にとって有害になります<sup>13</sup>。緩衝液システムは、過剰な二酸化炭素を補償することにより、培地の pH を生理学的に有効なレベルに保ちますが、その容量には限界があります。その点を超えると、細胞代謝が遅くなり、最終的には機能を停止し細胞をアポトーシスに導きます。これを補うために塩基 (例えば、NaHCO<sub>3</sub>) を追加してバッファー容量を増やすと、培地の全体的な浸透圧が上がります。前述のように、浸透圧の増加は細胞の生存率と製品の力価にも悪影響を与えるため、注意して実施する必要があります。各バイオプロセスには特定の耐性がありますが、哺乳類の培養では20%の飽和が一般的な毒性レベルです。感度の程度と CO<sub>2</sub> の許容レベルは、培養の種類 (哺乳類と細菌など) と用途によって大きく異なりますが、すべてのプロセスに共通するのは、それぞれに最適な CO<sub>2</sub> レベルがあり、それより上または下では有害な場合となることです<sup>14</sup>。

## 2.2 培養/発酵タイプに応じた特定の影響

細胞培養 (CHO や Vero など) は、細菌発酵よりも高 pCO<sub>2</sub> に敏感である傾向があります<sup>15</sup>、すべてのバイオプロセスには、最悪の場合に毒性がある、少なくとも生産性に悪影響を与えるレベルの DCO<sub>2</sub> があります。細胞培養と発酵の間には大きな違いがあるだけでなく、同じ細胞タイプの異なる菌株でさえ、異なる最適レベルの CO<sub>2</sub> を持っていることに留意することが重要です。表 1 は、現在の文献の調査によって確認されたさまざまな生物タイプの一般的な CO<sub>2</sub> の制限値をまとめたものです。次の章では、培養/発酵の実行可能性、および可能な場合は生産性 (製品の力価/品質など) に対する CO<sub>2</sub> の影響に関する文献の調

査結果について簡単に紹介します。

### 2.2.1 細胞培養（哺乳類）

哺乳類の細胞培養は、通常、治療用タンパク質またはワクチンの製造に使用されます。たとえば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は、mAb 産生によく使用されますが、ペロ細胞（アフリカミドリザル腎臓上皮由来）は多くのワクチンを産生します。一部の培養では、二酸化炭素が 30%飽和（300 mbar）の場合、成長率が 60%低下し、最適レベルをはるかに上回っています<sup>15</sup>。特に CHO 細胞に関しては実験により灌流培養での細胞生存率が 20%低下することが示されています。他の研究では、ハイブリドーマ細胞培養で同様の効果を示されています<sup>15</sup>。T 細胞療法の培養の成長に対する CO<sub>2</sub> の影響に関する最近の研究も発表されています<sup>16</sup>。これらの場合、20%という低い CO<sub>2</sub> レベルは、生存率と代謝の両方に悪影響を及ぼします。

一般に、さまざまな CO<sub>2</sub> レベルが特定の生産性に影響を与えます<sup>17</sup>。最適レベルを超える pCO<sub>2</sub> の値は、タンパク質力価を最大 70%低下させることが示されています。製品の品質または治療効果に関して、HCO<sub>3</sub> レベルの上昇（増加する CO<sub>2</sub> を緩衝するために必要）は、グリカン値の 40%の減少など、重要な CQA に悪影響を及ぼします<sup>27</sup>。

### 2.2.2 発酵

#### バクテリア

哺乳類の細胞と同様に、バクテリアも溶存二酸化炭素レベルの上昇により苦しみます。しかし、バクテリアは哺乳類の細胞に比較しより高い CO<sub>2</sub> 濃度に対して耐性があるので、有害な影響は主に成長速度に限定されます。たとえば、枯草菌の増殖速度は、17%の pCO<sub>2</sub> で最大 40%阻害されます。E.Coli は、バイオリアクターの曝気に 20%を超える CO<sub>2</sub> が含まれている場合、グルコースからバイオマスへの変換率が大幅に低下することが示されています<sup>15</sup>。DCO<sub>2</sub> が 30%に増加すると、最大成長率は 30%減少し、発酵は 2 倍の酢酸塩形成を示します。L-リジンの生産に使用した場合、コリネバクテリウム・グルタミカム（*C.glutamicum*）の培養物でも pCO<sub>2</sub> と増殖の依存性が観察されています：加圧バイオリアクターでは、約 20%から 80%の CO<sub>2</sub> の範囲で、成長は約 40%低下しました。

バクテリア発酵では、CPP としての CO<sub>2</sub> に関連しもう 1 つの重要な側面があります。バクテリア発酵（E. Coli など）が炭素源としてグルコースなどの単純な分子を使用する場合、有害な副産物である酢酸塩の生成を最小限に抑えるために、単純な分子は非常に迅速に消費されます。消費は非常に速いので、直接ブドウ糖をモニタリングする方法では自動給餌を

確立するには十分ではありません。代わりに、炭素発生率（CER）などの間接 KPI を使用する必要があります<sup>18</sup>。したがって、CER の正確な推定に必要な DCO<sub>2</sub> の直接測定は、細菌のバイオプロセスの自動化を確立するための前提条件です。

## 酵母

哺乳類や細菌のプロセスと比較して、酵母培養は高 pCO<sub>2</sub> に対する感受性は低くなります。ただし、50% CO<sub>2</sub> では、最大 40% の深刻な成長の低下が見られます。サッカロマイセス・セレビシエ (*S. Cerevisiae*) の培養物は、50% (500 mbar) の pCO<sub>2</sub> ではるかにゆっくりと分裂することがわかっています。このような高レベルの CO<sub>2</sub> は、成長を妨げる代謝副産物である大量のエタノールにも関係しています。それでも、pCO<sub>2</sub> が 60% (600 mbar) を超えた場合にのみ、成長の低下は最大 25% になります。ここまでの内容から成長に対する有害な影響は、主に好気性培養で観察されていることに注意する必要があります<sup>19</sup>。嫌気性培養は、高 pCO<sub>2</sub> による影響をほとんど示しません。

酵母プロセスの場合、DCO<sub>2</sub> は呼吸

商 (RQ) を正しく計算するために重要です。RQ は、呼吸と、O<sub>2</sub> を生成して CO<sub>2</sub> を消費する他の反応との間の分布を反映しています。このため RQ は培養代謝状態を説明するために使用することができます。1 に近い RQ はグルコースの酸化的 (好気性) 成長を示し、1 より大きい RQ はオーバーフロー代謝 (好気性) を示し、1 未満の RQ はエタノール消費を示します。

表 1. 培養/発酵による pCO<sub>2</sub> 平均毒性レベル

培養種類	高 pCO <sub>2</sub>	pCO <sub>2</sub> 毒性平均水準
 <i>Mammalian</i>	Up to -60% Growth Rate  Up to -70% Protein Titer  Up to -50% Product Quality (Glycosilation)	>20% (>200 mbar)  (> 30% in Continuous Culture)
 <i>Bacteria</i>	Up to -40% Growth Rate	> 30% (150/300 mbar)
 <i>Yeast</i>	Up to -25% Growth Rate	> 50% (500 mbar) Can Survive and Adapt Even at Higher Dissolved CO <sub>2</sub>
 <i>Fungi</i>	Up to -36% Antibiotic Content	> 15% (150 mbar)

\*本文で参照された文献、本書の最後にある参考文献で説明されている科学文献から統合されています

## 菌類

真菌のプロセスでは、成長阻害は8%CO<sub>2</sub>飽和（80 mbar）まで低下することが観察されますが、その数はペニシリウム・クリソゲナムのように高くなる可能性があります。この阻害のメカニズムはまだ完全には特定されていませんが、代謝前駆体合成への干渉に関連している可能性があります。pCO<sub>2</sub>が多すぎるとペニシリンの前駆体に悪影響を与えるため、生産の過程に影響を与えることになり、抗生物質の産生を妨げられます。同じことが、セファロスポリン C の生産に使用されるアクレモニウム・クリソゲナムの培養でも見られます。この場合、15%DCO<sub>2</sub>を超える培養を開始すると、抗生物質の産生が最大 36%減少しています<sup>15</sup>。菌類に置いても最適でない CO<sub>2</sub> の悪影響は、DCO<sub>2</sub> が重要である理由と、それを正確に監視および制御する必要があることを示しています。実際、DCO<sub>2</sub> 制御は、説明されている有害な毒性作用から保護するためのツール以上のもので、バイオプロセスを最適化するためのツールでもあります。これについては、次の章で詳しく説明します。

### 3. CO<sub>2</sub>をリアルタイムで監視および制御する

ここまでの説明を通じ、バイオプロセスにおける CO<sub>2</sub>の役割とは何か、そして各プロセスに最適な CO<sub>2</sub> 開発プロファイルを研究することの大切さを知っていただけたと思います。プロファイルの利点を最高のもとし、次善の条件による悪影響を回避するために、CO<sub>2</sub>をリアルタイムで、理想的には現場/インラインで監視および制御する必要があります<sup>21</sup>。継続的な CO<sub>2</sub> モニタリングは、バイオプロセスの問題（代謝の変化、汚染など）をすぐ確認するのに役立ちますが、自動制御を組み合わせることでプロセス全体を通じて CO<sub>2</sub> が最適なレベルに保たれることで品質を維持することが可能になります。

この章では、制御戦略の考慮事項について説明し、より高い歩留まりやより効率的なスケールアップなど、DCO<sub>2</sub>のリアルタイム監視と制御の具体的なメリットについて詳しく説明します。

#### 3.1 制御戦略で考慮する点

CO<sub>2</sub>をリアルタイムで管理することで得られるメリットを説明するにあたり、1つ必ず理解しておくことがあります。それは「すべてのバイオプロセスに適用できる普遍的な戦略は存在しない」ということです。言い換えれば、すべての細胞培養または発酵に最適な 1 つの pCO<sub>2</sub> 値または 1 つの制御戦略はありません。この例として 2 つの異なる給餌戦略（流加培養と灌流）の場合の CO<sub>2</sub> 設定値の違いを考えてみるとわかりやすくなります。

##### ■流加（またはバッチ）培養プロセス：

現在、細胞培養および発酵のための最も一般的なバイオプロセスタイプです。制御されていない CO<sub>2</sub> プロファイルは、これらのプロセスの規模によって大きく異なります。生産規模の反応器は、通常、数千リットルの比較的大きな容量を持っています。体積が大きくなると、表面積と体積の比率が低下し、物質移動が遅くなり、CO<sub>2</sub>の蓄積が多くなります。このためこれらのバイオプロセスは、pCO<sub>2</sub>が約 15%と低くそれにより悪影響が生じます。また培地は一般的に灌流リアクターよりも低い緩衝能を必要とします。

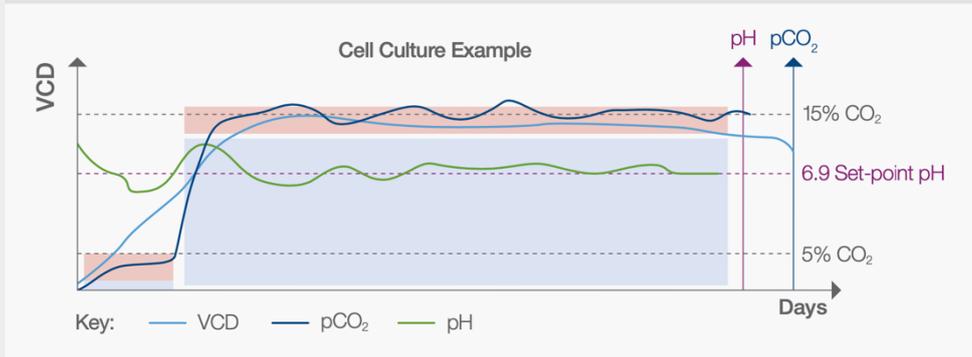
##### ■灌流培養プロセス：

細胞培養を用いたバイオプロダクションで高い評価を得ている培養方法です。通常、灌流リアクターは、高いバッファー容量を持つ培地を使用します。これは CO<sub>2</sub>の蓄積時間が長く、セル密度が高いこと、また溶液中に最大 30%の pCO<sub>2</sub>が存在する場合もあるため、その特性を考慮する必要があります。

それぞれの特徴から各アプリケーションに適した設定値を特定する必要があります。その後、それを制御するために選択された戦略が重要な役割を果たします。バイオプロセスが有害または有毒な CO<sub>2</sub> レベルを蓄積するリスクがある場合、それを中和するか、培地から取り除くための戦略を立てる必要があります。実際 K<sub>L</sub>A（特定の一連の操作条件で酸素をバイオリアクターに供給することができる効率を表す体積物質移動係数）などのプロセス物質移動パラメータを決定しますが、酸素移動を最適化し、その次に CO<sub>2</sub> 移動を最適化しますがこれは困難が伴います。その大きな理由として CO<sub>2</sub> は O<sub>2</sub> よりも水性媒体に 20 倍溶けやすく、それに対応した別のアプローチが必要です。そうしない場合、酸素移動の最適化が CO<sub>2</sub> 規制と矛盾することになります。例として、酸素の物質移動に最適な添加手段は、酸素交換面全体に及ぶように小さな気泡を生成するスパージャーを利用することですが、一方 CO<sub>2</sub> の効率的な散布/ストリップングは、「より大きな気泡」で最も効率よく行うことができ酸素とは相反する方法になります。ダブルスパージャー（1 つは空気用、もう 1 つは N<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> 用）はすべてのバイオリアクターの一般的な方法とは言えず、生産規模に応じ適切な CO<sub>2</sub> 制御戦略を実施する必要があります。それが行われなかった場合、CO<sub>2</sub> が有害なレベルまで培地に蓄積する危険があります。課題について簡単にまとめますと、最適な CO<sub>2</sub> 制御戦略を決定する際には、影響力のあるすべてのバイオプロセスパラメータを考慮することが重要ということになります。パラメーターに関連する要因は次のとおりです。

- 細胞株（例：pCO<sub>2</sub> 耐性）
- 培地の処方（例：緩衝液の組成、栄養素）
- バイオプロセス/バイオリアクタータイプ（例：バッチ、流加、灌流）
- スパージャータイプ（例：シングルまたはダブル、大または小の泡）
- バイオリアクターのスケール/容量

これらの要因の各組み合わせには、最適な pCO<sub>2</sub> の特定と識別、それを制御するための戦略が必要です。ただし、すべてのバイオプロセスに共通するのは、生産性を最大化するには CO<sub>2</sub> のリアルタイム制御が必要なことです。図 12 は、CO<sub>2</sub> 管理から得られるメリットを示しています。図 8 の制御されていない CO<sub>2</sub> と比較すると、制御されたプロセスは、最大 VCD で大幅に延長された生産段階を示しています。この図は、CO<sub>2</sub> をより厳密に制御することで、pH をより厳密に制御できることも示しています<sup>9, 28</sup>。これについては 3.2 章および 3.3 章で例を挙げてさらに説明します。



### Sparge CO<sub>2</sub>

培養の開始時、培地はわずかにベース（アルカリ）です：  
CO<sub>2</sub>は、pHを最適な設定値まで下げるために散布されます。固定相では、CO<sub>2</sub>はpHだけでなく設定値までリアルタイムで制御します。この場合、CO<sub>2</sub>の大きな変動はなく、pH制御の結果は微調整され、制御も向上します。



### Strip CO<sub>2</sub>

定常期ではVCDは最大になり、ストリップピングは微調整のため必要です。それでも、pHとpCO<sub>2</sub>の両方が安定しているため、培養物は同じバッチで最大のVCDを長期間維持します。

図 12：pH と pCO<sub>2</sub> の両方が制御されている場合の、細胞培養流加培養における pH、pCO<sub>2</sub>、および VCD の発生の例

### 3.2 生産性：より長い実行可能フェーズと最大化された製品力価

各バイオプロセスの CO<sub>2</sub> セットポイントとリアルタイム制御戦略を最適化すると、その生産性が最大化されるため、最適化の研究開発とその検証は PD の段階で行う必要があります。厳格な CO<sub>2</sub> 管理は、バイオプロセスの生産性に実質的に役立つことがグラフで示されています。たとえば、ある研究では、2 つの同等の生細胞密度流加培養を調査しました。1 つは pCO<sub>2</sub> を 10% に制御し、もう 1 つは CO<sub>2</sub> を 20% まで蓄積させたものです<sup>9</sup>。CO<sub>2</sub> 制御は、同等の pH 制御 ( $6.85 \pm 0.05$ ) でも、より長い生産段階とより高いタンパク質力価をもたらしました (図 13)。

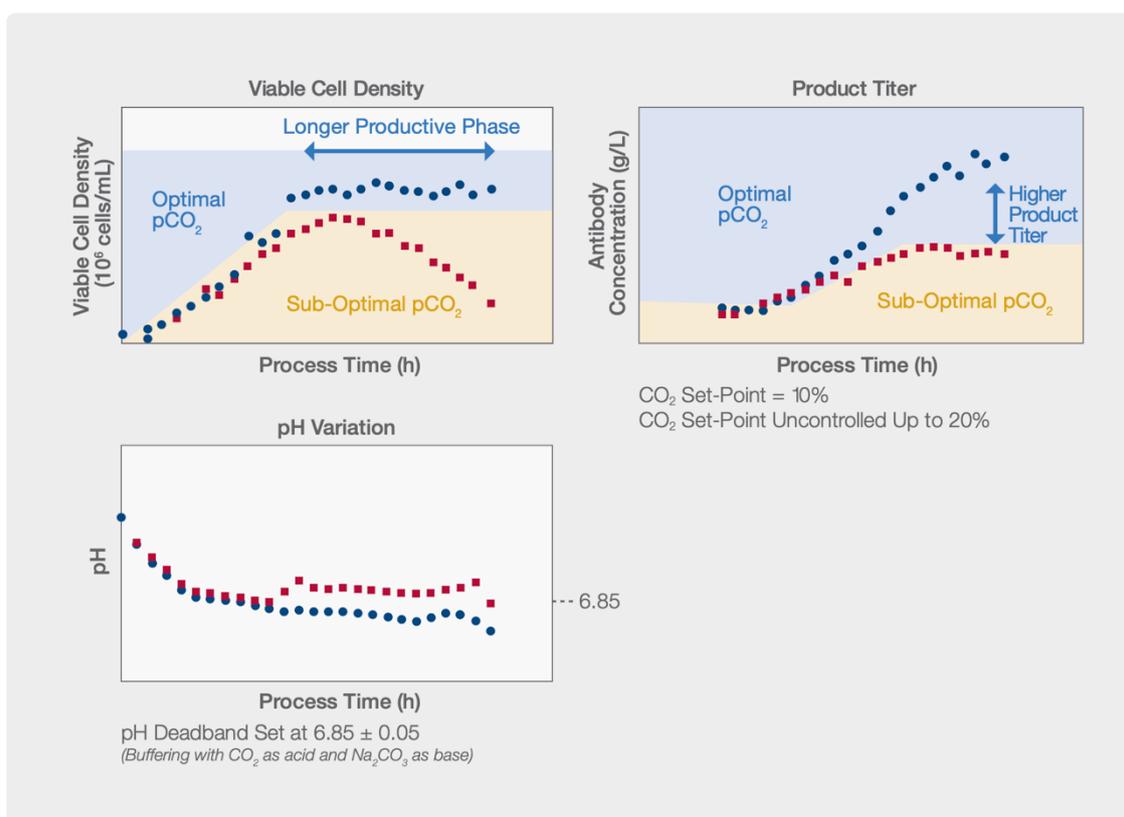


図 13: シュトゥットガルト大学の生化学工学研究所とベーリンガーインゲルハイムファーマ GmBH によって発表された最初の共同研究から例示された CHO 流加プロセスの例における pCO<sub>2</sub> の影響<sup>9</sup>

グラフからは pH 制御だけでは、プロセスを最大限に効率を上げるには不十分であることを示しています。専用の CO<sub>2</sub> 測定と制御で補完することで、生産性を向上させることができます。CO<sub>2</sub> 管理の重要性に対する認識が高まるにつれ、企業は自社のプロセスでこのパラメーターを活用するための革新的な措置を講じています。前述のように、浸透圧の増加を避けるために、可能であれば酸と塩基を添加せずに CO<sub>2</sub> を制御する必要があります。このような戦略の一例は、CO<sub>2</sub> の散布と除去のみで行っています。この方法は、リアルタ

イムのインライン CO<sub>2</sub> 制御を通じて、組換えタンパク質生産の生産性を高めることを目的とした特許で、Roche によって説明されています<sup>22</sup>。図 14 は、インライン pCO<sub>2</sub> センサーフィードバック応答に基づく 2 台の縦列配置した PID (Proportional Integral Derivative) コントローラーを使用したアプローチを示しており、ストリッピングガスとして N<sub>2</sub> を使用する Microflow Controller (MFC) により CO<sub>2</sub> のスパージ/ストリッピングを調整しています。リアルタイムの CO<sub>2</sub> モニタリングと制御により、プロセスのばらつきが減少するだけでなく、タンパク質力価が高くなるという形で生産性が向上します<sup>22</sup>。特にこの特許は、CO<sub>2</sub> 設定値制御によるポーラス導入後の乳酸ピークなどのイベントに対する細胞の感受性の低下を説明しており、最終的には対照実験よりも 50% 高いタンパク質力価をもたらします。他の溶存 CO<sub>2</sub> 制御戦略は、スパージング/ストリッピング戦略に加えて、攪拌速度に関するモーターを制御するためのインラインセンサーフィードバックを実装しています<sup>23</sup>。

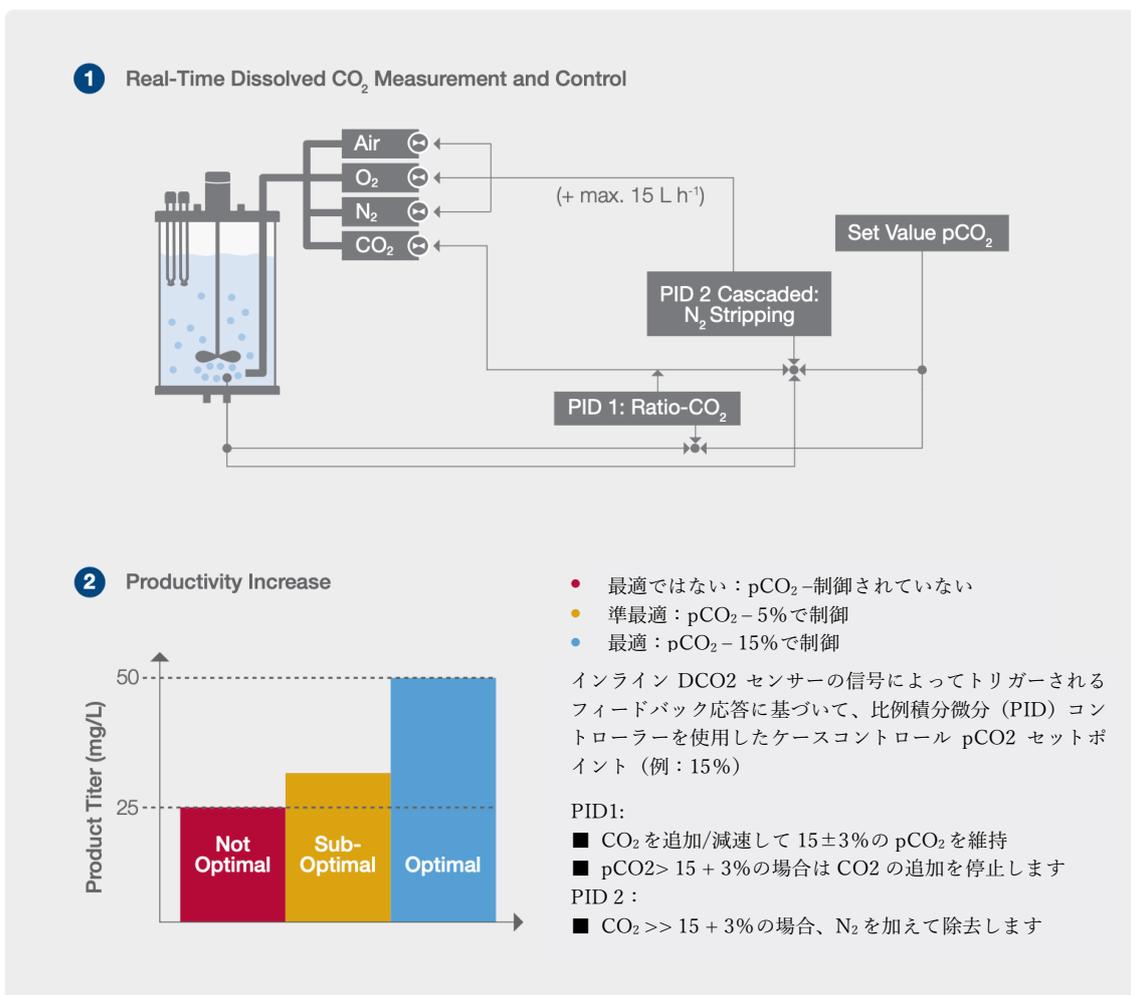


図 14：pCO<sub>2</sub> in-situ モニタリングおよび制御による、CHO 流加プロセスにおける製品力価の増加 欧州特許庁出願 09719289.2.22

最適化されたスパージング/ストリッピング戦略による CO<sub>2</sub> の自動監視と制御は、これらの各ケースでバイオプロセスに大きなメリットをもたらしました。それが制御されたとき、最大の生細胞密度のために、物理的に損傷を与える濃度の DCO<sub>2</sub> を回避することができました。バッチ間の再現性は、特に大量または長時間のプロセスで向上させることができます。最近の出版物の中には、実験室から製造までのすべてのスケールにおいて、pH を調整するために酸や塩基を用いずスパージングガスのみを使用する可能性さえ強調しています<sup>24</sup>。バイオプロセスの生産性は、DCO<sub>2</sub> リアルタイム制御のための最適化された戦略となっています。

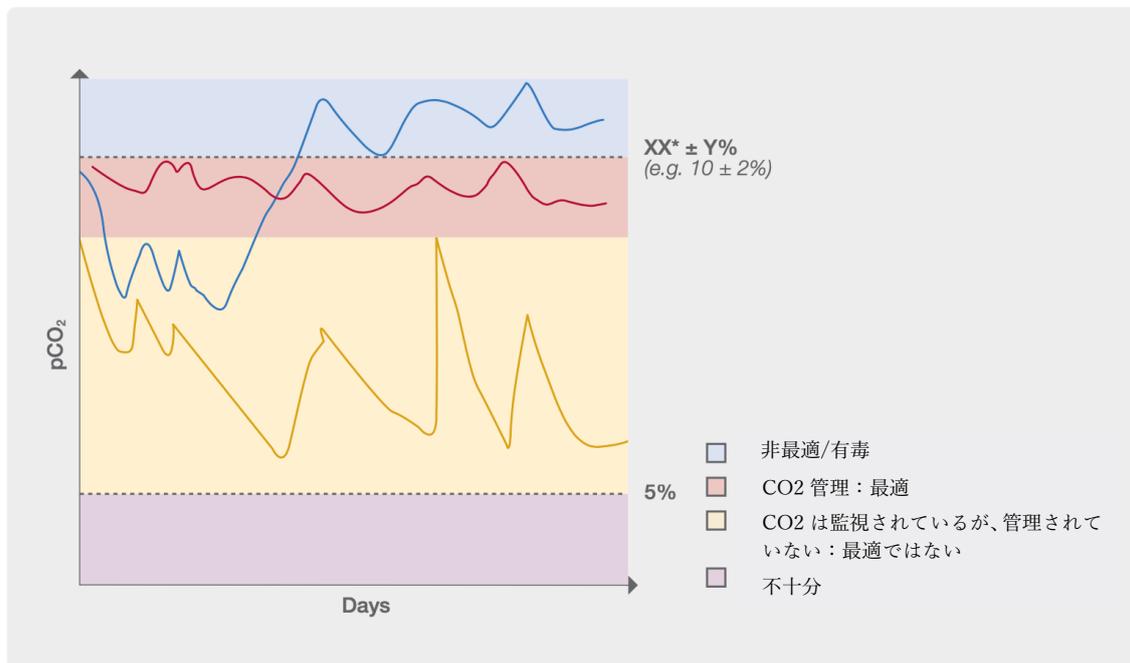


図 15: バイオプロセスの生産性を最大化するために pCO<sub>2</sub> リアルタイム制御を活用する方法に関する簡単な例

### 3.3 開発の生産性：スケールアップ/スケールダウンの反復を短縮する

CO<sub>2</sub>を管理するメリットは明らかですが、開発規模と最終生産規模の間でCO<sub>2</sub>濃度を一定に保つには大きな課題があります<sup>25</sup>。開発規模でのDCO<sub>2</sub>のリアルタイム測定と制御がなければ、実験室と生産の間のスケールアップ/スケールダウンの反復中に一貫性が達成されることはめったにありません(図16)。CO<sub>2</sub>は、表面と液体の比率が小さく、静水圧が小さい実験室規模のリアクターでは簡単に除去されます<sup>27</sup>。小規模バイオリアクターでは、DCO<sub>2</sub>の大部分が表面曝気によって除去され、大規模なバイオリアクターでは、液体の表面と体積の比率が低下するため、CO<sub>2</sub>除去のための他の戦略が必要になります<sup>28</sup>。この違いから制御戦略を大幅に調整しないと、CO<sub>2</sub>は特にバイオリアクターの底に蓄積する傾向があります。

したがって、図17に示すように、CO<sub>2</sub>の適切なK<sub>L</sub>Aを決定し、その設定値をリアルタイムで監視して、二酸化炭素の有害な蓄積なしに適切なスケラビリティを確保する必要があります。これらのスケールの不一致は、乳酸シフトの変化など、バイオプロセスに大きな変化をもたらす可能性、最終的にはバイオプロセスのKPI(力価など)とCQA(グリコシル化パターンなど)に大きな違いをもたらす可能性があります。CO<sub>2</sub>のリアルタイムの監視と制御を採用することにより、さまざまな規模のプロセスに追加のCPPが加わり、プロセス全体で一貫性を保つ(または「正しくスケールアップする」)ことができます(図18を参照)。この一貫性により、CO<sub>2</sub>とその多くの影響に関連するスケールアップおよびスケールダウン実験の時間とコストが削減されます。

---

プロセス全体を通じてCO<sub>2</sub>を継続的に監視および制御することで、スケールアップ/スケールダウンの反復を減らして製造プロセスを最適化することもできます。

---

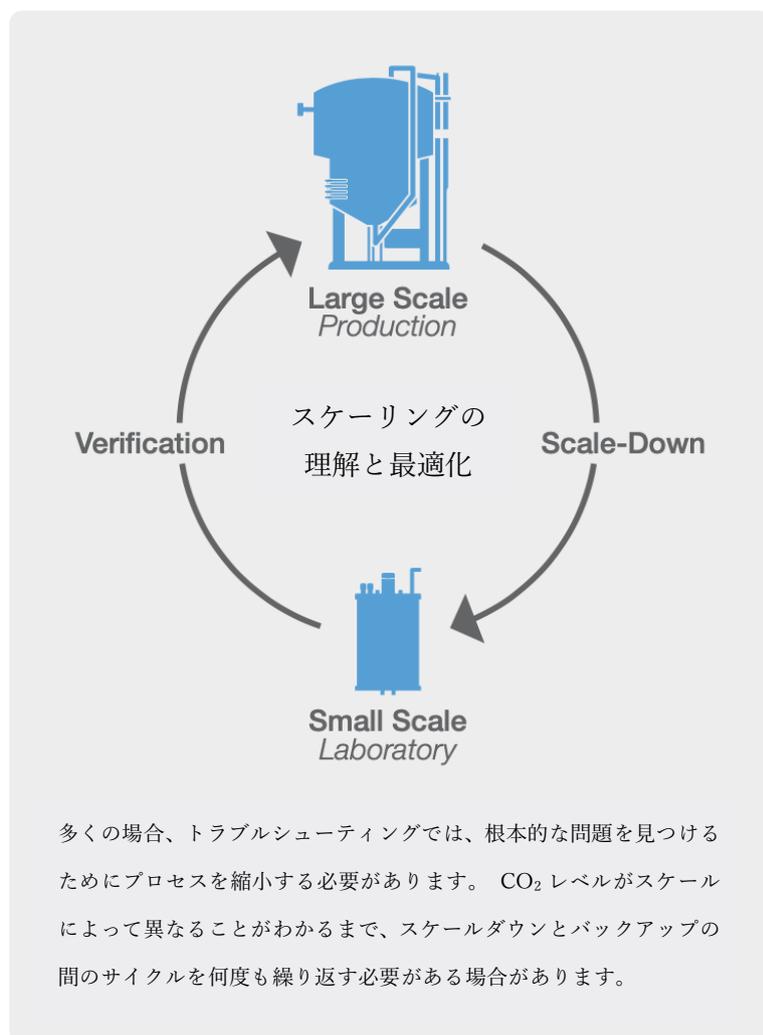


図 16：スケール間でパフォーマンスを調整する従来のアプローチは、複数のスケールアップ/スケールダウンの「test and see」実験を繰り返すことです。これは、市場投入までの時間、特にワクチン、mAb、細胞療法などのますます必要とされる製品に大きな影響を及ぼします。

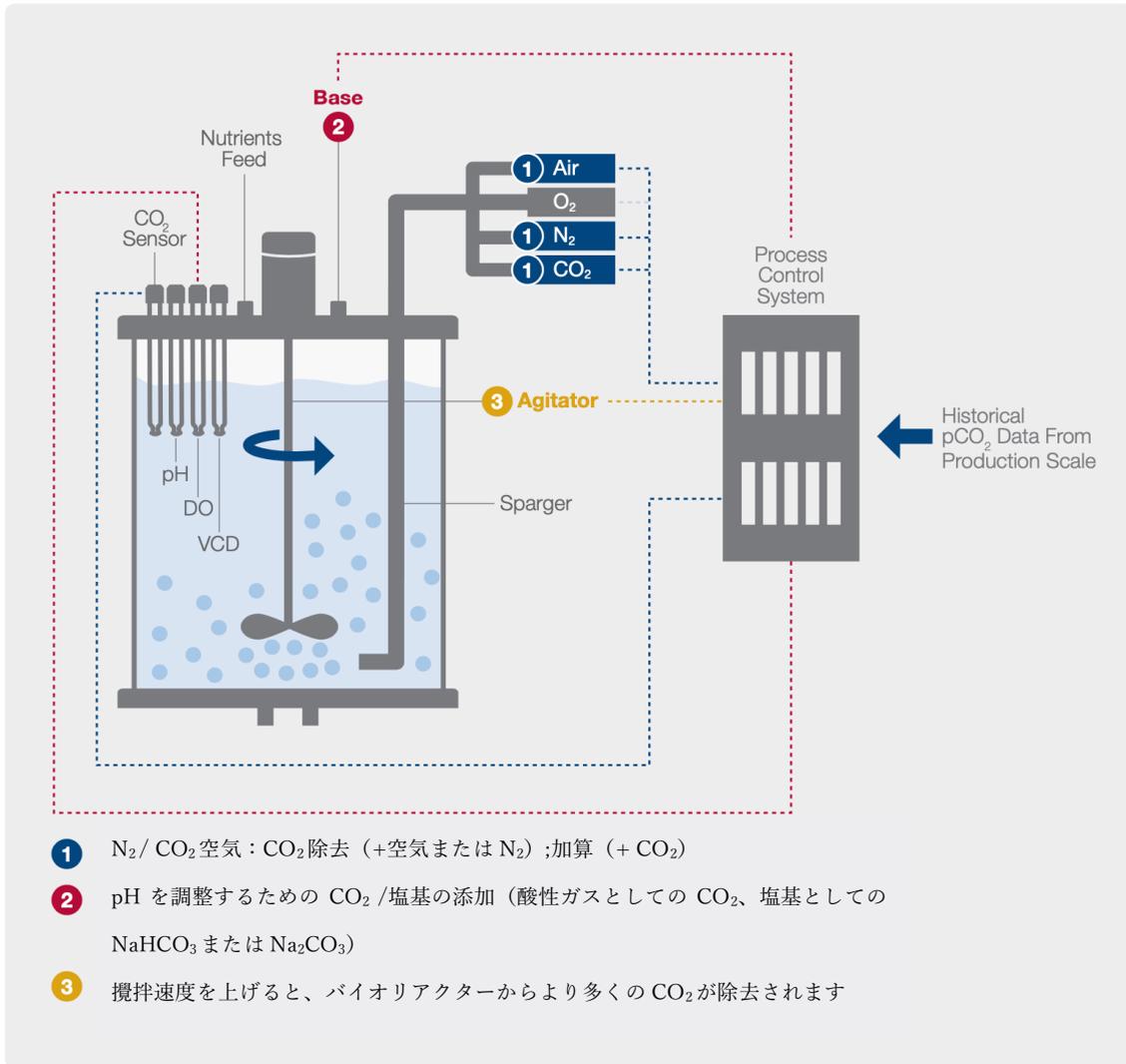


図 17：生産規模の pCO<sub>2</sub> プロファイルを模倣するために実験室のバイオリアクターを設定する方法について

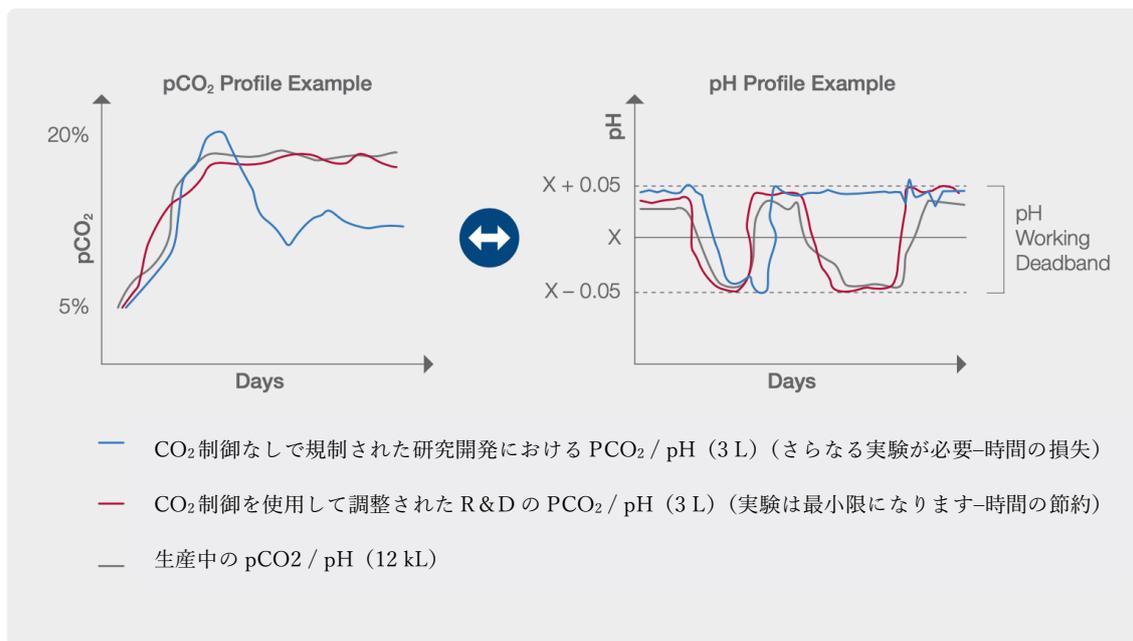


図 18：pCO<sub>2</sub> リアルタイム制御がある場合とない場合のスケールダウンの比較  
 コントロールケースでは、生産スケールと同じ DCO<sub>2</sub> プロファイルを模倣するために、  
 実験室スケールのバイオリアクターが制御されています。  
 ESACT 2019 Congress で発表されたオリジナルより<sup>27</sup>

#### 4. 最後に

CO<sub>2</sub> はすべてのバイオプロセスにおいて重要な役割を果たしています。これは、代謝プロセスの生成物と反応物の両方であり、重炭酸塩システムなど、最も一般的に使用されるバッファシステムの構成要素です。それはまた、乳酸消費シフトの重要な要因であることが示されています。バイオプロセスで非常に多くの重要な役割を持つプロセスパラメータ (CPP) として、DCO<sub>2</sub> には、各スケールでそのポイントを維持するための独自の定義済みセットポイント、制御戦略が必要になります。pH や DO と同様に、研究開発ラボから生産現場までのバイオプロセスの最適化と実装には、CO<sub>2</sub> のリアルタイム監視と自動制御が必要です。このようなアプローチを通じて、より高い生細胞密度、長期の増殖期、および期待される品質を維持し、より高い製品収量をもたらすと考えられます。

本書で説明されている利点を完全に実現するには、リアルタイムの CO<sub>2</sub> 測定のための正確かつ安定した、できれば費用対効果の高いテクノロジーが必要です。CO<sub>2</sub> 測定に一般的に使用されるオフライン、アットライン、およびオンラインテクノロジーのレビューは、次回「溶存二酸化炭素シリーズ」で紹介する予定です。



## 用語集

本用語集の定義は、特に明記されていない限り、ハミルトン White Paper A、B、または PAT ガイドラインに基づいています。

### バイオプロセスタイプ-バッチ

バッチプロセスは、特に発酵のために、バイオ医薬品業界で採用された最初のプロセスと見なされることがよくあります。

微生物は、グルコース、グルタミン、その他のアミノ酸やミネラルなどの栄養素が事前に充填されたバイオリアクターの培地に添加されます。メディアはプロセス全体を通して同じままであり、継続的な補充、補充、交換をされることはありません。最初の遅滞期の後、微生物の数は成長期に急激に増加します。次に、一時増殖が停止した集団となる定常期の後、培養集団は死の段階を迎え減少します。減少の原因は、栄養培地の枯渇と有毒物質の蓄積に関係している可能性があります。

### バイオプロセスタイプ-流加培養

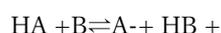
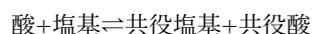
流加培養は、細胞培養と微生物発酵の両方で主要なバイオプロセッシング法です。流加プロセスは、細胞増殖を最大化するために段階的に栄養素を追加するという点で、従来のバッチプロセスとは異なります。バイオリアクターは、初期の細胞増殖をサポートするために基本量の培地で満たされています。増加する細胞集団によって枯渇した栄養素を置き換える必要がある場合、フィードメディアが追加されます。細胞とその生成物は、実行が終了するまでバイオリアクターに残ります。この設定により、栄養レベルまたは生細胞密度に応じて飼料培地の添加を自動的に調整することができます。

### バイオプロセスタイプ-灌流

「連続バイオプロセッシング」という用語は、主に「灌流」技術を指します。バイオリアクターは、固定容量および固定細胞濃度で 30~90 日間、または細胞株に応じてそれ以上稼働します。この間、供給媒体は絶えず更新され、二次毒性代謝物が除去され、同時に細胞はさらなる処理のために採取されます。灌流技術は、細胞培養プロセスの最新の方法の 1 つです。

### ブレンステッド酸/塩基

ブレンステッド-ローリー理論では、酸と塩基は互いに反応する方法によって定義され、より一般性を高めることができます。定義は、平衡式で表されます。



酸 HA を使用すると、方程式は次のように象徴的に記述できます。

反応は順方向と逆方向の両方で発生する可能性があるため、平衡記号 ( $\rightleftharpoons$ ) が使用されます。酸 HA は、プロトンを失って共役塩基 A<sup>-</sup>になる可能性があります。塩基 B は、プロトンを受け入れて共役酸 HB<sup>+</sup>になることができます。ほとんどの酸塩基反応は速いので、反応の成分は通常互いに動的平衡にあります。

#### 炭素発生率 (CER)

これは、細胞培養および/または微生物発酵によって生成される CO<sub>2</sub> (mol/lh) に対応します。CER は、時間の経過に伴う無機炭素プールの発生を差し引いて計算できます (CTR から、時間の経過に伴う NaHCO<sub>3</sub> の発生<sup>29)</sup>。

$$\text{CER} = \text{CTR} - (\text{時間の経過に伴う無機炭素プール})$$

#### クリティカルプロセスパラメータ (CPP)

PAT の命名法に従った重要なプロセスパラメータ。これは、その変動性が重要な品質属性 (CQA) に影響を与えるパラメーターであるため、プロセスが目的の品質を確実に取得できるように監視または制御する必要があります。

CPP の例：pH、溶存酸素、溶存 CO<sub>2</sub>

#### 重要な品質属性 (CQA)

PAT の命名法に従った重要な品質属性。望ましい製品品質を確保するために適切な制限、範囲、または分布内にある必要がある物理的、化学的、生物学的、または微生物学的な特性です。

CQA の例：モノクローナル抗体のグリコシル化パターン。グリコシル化パターンが正しくない場合、タンパク質は予想とは異なる方法で折りたたまれ、治療効果が失われます。

#### 炭素移動率 (CTR)

炭素移動速度は、バイオリアクター内の気相から液相への CO<sub>2</sub> の移動速度 (mol/lh) に対応します。

#### 溶存 CO<sub>2</sub>

溶存 CO<sub>2</sub> (または DCO<sub>2</sub>) は、バイオプロセスの重要なプロセスパラメータです。

より高い溶存二酸化炭素レベルは毒性があり、細胞増殖を阻害し、モノクローナル抗体 (mAb) などの代謝物の生成を減らす可能性があります。溶存 CO<sub>2</sub> は、一般的に「CO<sub>2</sub> の分圧」(pCO<sub>2</sub>) で識別されます。pCO<sub>2</sub> は、プロセス分析のさまざまな単位で表現されていることがわかります。サプライヤーと科学文献の比較を容易にするために、最も一般的な pCO<sub>2</sub> 単位変換の表を示します。

pCO <sub>2</sub> Units	mbar	kPa	mmHg	%Vol*
mbar	1	0.1	0.750	0.1
kPa	10	1	7.50	1
mmHg	1.33	0.133	1	0.13
%Vol	10	1	7.5	1

\*At temperature = 25°C | Atmospheric Pressure P = 1,013 mbar

## 溶存酸素

溶存酸素 (DO または pO<sub>2</sub>) は、バイオプロセスの重要なプロセスパラメータです。細胞の酸素需要をサポートするために、空気または酸素富化空気がバイオリアクターに供給されます。酸素は細胞呼吸と細胞成長に使用されます。重要なことですが、DO は、細胞増殖速度や製品の品質に大きな影響を与えることなく、pH よりも広い範囲で制御できます。好気性培養の一般的な DO 動作範囲は、30~40%の空気飽和度です。この範囲を下回る DO レベルは細胞の生存率に影響を与えますが、過剰な DO レベルは最終製品を酸化する可能性があります。

## 欧州動物細胞技術学会 (ESACT)

これは、動物細胞を扱う科学者、エンジニア、その他の専門家が一堂に会し、ヨーロッパと国際の研究者間の経験のコミュニケーションを促進し、それらから派生した細胞システムと生産物の開発を進めるための協会です。

## 米国食品医薬品局 (FDA)

FDA は、米国政府のためにヒト用および動物用医薬品の安全性、有効性、およびセキュリティを確保することにより、公衆衛生を保護する責任があります。

## K<sub>L</sub>A

K<sub>L</sub>A は、バイオリアクターの酸素または CO<sub>2</sub> の体積物質移動係数に対応し、それを特徴付ける次元の 1 つです<sup>6</sup>。

## 主要業績評価指標 (KPI)

PAT の命名法による主要業績評価指標。 KPI は、各生産ステップのステータスのメトリックです。 KPI は CQA に関連しているため、CPP の影響も受けます。 CPP は事前定義された制限内にとどまるため、KPI は、各生産ステップがそれに応じて進行し、最終的には CQA も適切な制限内にある製品になることを示す必要があります。

KPI の例：生細胞密度、培養生存率、および製品力価

## 乳酸シフト

乳酸は、バイオプロセスの指数関数的成長期に強く生成されますが、細胞が定常期に入ると、その消費量が頻繁に観察されます。このような生産から消費への代謝シフトは「乳酸シフト」として識別され、最適

なプロセスパフォーマンスの状態とみられます<sup>30</sup>。

#### 最小必須培地 (MEM)

最小必須培地 (MEM) は、組織培養で細胞を維持するために使用され、1959 年に Science で最初に公開された Harry Eagle によって開発された合成細胞培養培地です。これは、1934 年にアールの塩に記載された 6 つの塩とグルコースに基づいています:(塩化カルシウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム)、13 の必須アミノ酸と 8 つのビタミン:チアミン (ビタミン B1)、リボフラビン (ビタミン B2)、ニコチンアミド (ビタミン B3)、パントテン酸 (ビタミン B5)、ピロドキシシン (ビタミン B6)、葉酸 (ビタミン B9)、コリン、およびミオイノシトール (元々はビタミン B8 として知られていました)。

#### ダルベッコの改良イーグル培地 (DMEM)

DMEM は、1959 年に発行された Dulbecco と Vogt によって、「アミノ酸とビタミンの 4 倍濃度」のイーグル培地として最初に提案されました。この培地の商用バージョンには、以下に詳述する追加の変更があります。

#### RPMI 1640 (RPMI ミディアム)

RPMI 培地としても知られる RPMI1640 は、細胞培養に使用されます。RPMI 1640 は、ジョージ E.ムーア、ロバート E.ガーナー、H.アディソンフランクリンによって 1966 年にロズウェルパーク記念研究所で開発され、その名前の由来となっています。マッコイの 5A 培地 (または RPMI 1630) の改良版で、元々は浮遊培養でリンパ芽球様細胞をサポートするように処方されましたが、多種多様な付着細胞もサポートできます。

#### アットラインの監視/測定

サンプルがプロセスストリームのすぐ近くで取り出され、分離され、分析される測定。

#### インライン/現場での監視/測定

サンプルがプロセスストリームから取られず、侵襲的または非侵襲的に行われる測定

#### オンラインでの監視/測定

サンプルが製造プロセスから転用され、プロセスストリームに戻される可能性がある測定

#### オフラインでの監視/測定

サンプルは無菌状態でバイオリアクターから取り出され、物理的な前処理 (ろ過や希釈など) の後にラボ

で分析されます。

#### 浸透圧

浸透圧は、溶液、たとえば完全な細胞培養培地の浸透圧の尺度です。培地の浸透圧は、invivo での細胞の自然環境の浸透圧と同様でなければなりません。ほとんどの脊椎動物細胞株の細胞培養培地の浸透圧は、260~320 mOSM/kg の狭い範囲に保たれています<sup>31</sup>。

#### 酸素移動速度 (OTR)

酸素移動速度は、バイオリアクター内の気相から液相への酸素の移動速度 (mol / lh) に対応します。

#### 酸素摂取率 (OUR)

OUR は、細胞培養および/または微生物発酵によって消費される酸素に対応します (mol / lh)。

#### プロセス分析技術 (PAT)

Process Analytical Technology ガイダンスは、FDA により 2004 年に定められました。これは、革新的な医薬品開発、製造、品質保証の自主的な開発と実施を奨励するための規制の枠組みを説明することを目的としています。

#### 呼吸商 (RQ)

呼吸商 (RQ) は、バイオプロセス中に培養によって消費される酸素 1 モルあたりに発生する二酸化炭素のモル数です。これは間接的ですが、増殖培地中の基質の不足を判断するためのかなり迅速な測定方法です<sup>32</sup>。次のようにも表されます<sup>28</sup>。

$$RQ = CER / OUR$$

#### スケールアップ/スケールダウン

スケールアップとスケールダウンは、研究開発段階からパイロット段階または生産段階へのバイオプロセスの移行 (スケールアップ) またはその逆 (スケールダウン) を指す単語です。生産/パイロットバイオリアクターの設計は、多くの場合、実験室で通常見られるものとは大きく異なります。スケールアップに起因するバイオリアクターの容量が大きくなると、OTR が遅くなり、CER に影響を与え、さらに、たとえば DO の検出が遅くなります。PID 制御アルゴリズムが小規模に設定されている場合、応答は不正確になります。OTR または CER を正確に予測するためのスケールアッププロセスでは、溶存酸素の制御アルゴリズムを調整するための酸素の物質移動係数  $K_La$  を求めるために、頻繁にテストを実行する必要があります。

## 参考文献

1. U.S. Department of Health and Human Services: *Guidance for Industry. PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance*. Rockville, 2004.
2. J. Michl, K. C. Park, P. Swietach, *Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems*, *Communications Biology*, Volume 2, Article number: 144, 2019.
3. J. Cooper, *CO2 concentration and pH control in the cell culture laboratory*, <https://www.phc-culturecollections.org.uk>, *Public Health England*, Article published in 2019.
4. <https://www.lgcstandards-atcc.org>, *American Type Culture Collection Non-profit Organization*, FAQs “How does the sodium bicarbonate-carbon dioxide system buffer the pH of cell culture medium?”, Article updated in 2014.
5. D. Möller, M. Deckter, J. Zosel, W. Oelssner, *Carbon Dioxide in General*, Wiley-VCH, *Carbon Dioxide Sensing*: p. 7–44, 2019.
6. A. W. Nienow, *Mass Transfer and Mixing Across the Scales in Animal Cell Culture*, Springer, *Animal Cell Culture*: p. 137–167.
7. M. Brunner, P. Doppler, T. Klein, C. Herwig, J. Fricke, *Elevated pCO2 affects the lactate metabolic shift in CHO cell culture processes*, *Engineering in Life Science 00*: p. 1–11, WILEY-VCH Verlag GmbH, 2017.
8. W.-S. Hu, M. C. Oberg, *pH Control in Cell Culture*. Marcel Dekker, *Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology*, Chapter 16, *Monitoring and control of animal cell bioreactors: biochemical engineering considerations*, 1990.
9. M. Becker, L. Junghans, A. Teleki, J. Bechmann, R. Takors, *The Less the Better: How Suppressed Base Addition Boosts Production of Monoclonal Antibodies With Chinese Hamster Ovary Cells*, *Frontiers*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 7 Article 76, 2019.
10. V. Konakovsky, C. Clemens, M. M. Müller, J. Bechmann, M. Berger, S. Schlatter, C. Herwig, *Metabolic Control in Mammalian Fed-Batch Cell Cultures for Reduced Lactic Acid Accumulation and Improved Process Robustness*, *MDPI*, *Bioengineering*: pg. 3, 5, 2016.
11. R. Pörtner, *Bioreactors for Mammalian Cells*, Springer, *Animal Cell Culture*: p. 89–135.
12. WuXI Biologics, *Understanding the Role of Dissolved O2 & CO2 on Cell Culture in Bioreactors*, <https://www.wuxibiologics.com/two-minute-tuesday-videos/> – Two Minute Tuesday, 2016.
13. S. S. Mostafa 1, X-Gu, *Strategies for improved DCO2 removal in large-scale fed-batch cultures*, Wiley, *Biotechnology Progress*: p. 45–51, 2003.

14. H. Bühler, R. Bucher, *Application of electrochemical sensors, Dissolved Carbon Dioxide, Bioprocess Technolog: p. 158–167, 1990.*
15. B. Blombach, R. Takors, *CO<sub>2</sub> – Intrinsic product, essential substrate, and regulatory trigger of microbial and mammalian production processes. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Volume 3, Article 108, <http://www.frontiersin.org/>, 2015.*
16. V. Wiegmann, A. Amini, C. Bernal, *Using the AppliFlex ST to Investigate the Effect of CO<sub>2</sub> Concentration on the Expansion of T-cells, <https://www.applikon-biotechnology.com>, 2019.*
17. M. Brunner, J. Fricke, P. Kroll, C. Herwig, *Investigation of the interactions of critical scale-up parameters (pH, pO<sub>2</sub>, and pCO<sub>2</sub>) on CHO batch performance and critical quality attributes, Springer, Bioprocess and Biosystems Engineering, October 2016.*
18. A. V. Carvalho, V. M. Saucedo, *PAT in Recombinant Protein Cell Culture Processes in PAT Applied in Biopharmaceutical Process Development and Manufacturing, CRC Press: p. 114–116, 2012.*
19. B. R. Gibson, S. J. Lawrence, J. P. R. Leclaire, C. D. Powell, K. A. Smart, *Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling, FEMS Microbiol Rev 31: p. 535–569, 2007.*
20. H. Sundström, *Analytical tools for monitoring and control of fermentation processes (Thesis), Department of Bioprocess Technology School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, 2007.*
21. R. N. Pattison, J. Swamy, B. Mendenhall, C. Hwang, B. T. Frohlich, *Measurement and control of dissolved carbon dioxide in mammalian cell culture processes using an in situ fiber optic chemical sensor, Wiley, Biotechnology Progress 16: p. 769–774, 2000.*
22. D. Eisenkraetzer, J. Gaetgens, A. Jockwer, C. Klinger, T. Noll, B. Bezdek-suess, *Method for producing recombinant proteins with a constant content of pCO<sub>2</sub> in the medium, European Patent Office, Application 09719289.2, Bulletin 2013/01.*
23. B. Madsen, J. Cobia, N. Jones, *Continuous Process Performance Enhancements for 50 L to 500 L SingleUse Bioreactors: A Technical Comparison of Performance Characterization, Cell Culture, and Scale-Up Modeling, Thermo Fisher Scientific, <http://thermofisher.com/sut>, 2018.*
24. L. Hoshan, R. Jiang, J. Moroney, A. Bui, X. Zhang, T. Hang, S. Xu, *Effective Bioreactor pH Control Using Only Sparging Gases, Wiley, <http://wileyonlinelibrary.com>, November 2018.*
25. C. He, P. Ye, H. Wang, X. Liu, F. Li, *A systematic mass-transfer modeling approach for mammalian cell culture bioreactor scale-up, Elsevier, Biochemical Engineering Journal, Volume 141, p. 173-181, 2019*
26. J. Glassey (coordinator), *General framework for data representation with small batch numbers, across process scales, EU-Horizon 2020 - Marie Curie ITN project BIORAPID, Ref.*

27. L. Junghans, M. Löffler, F. Krause, T. Wucherpennig, S. Minning, K. Schwab, *Mimicking industrial scale CO<sub>2</sub> profiles in CHO small scale processes, 26th ESACT Meeting, Copenhagen, 2019.*
28. S. Rameez, *Establishing improved O<sub>2</sub> supply, lower DCO<sub>2</sub> built up and pH control in large scale Single-Use BioReactors (SUBR), 45th ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, <https://www.slideshare.net/kbibioharma/establishing-improved-o2-supply-lower-dco2-built-up-and-ph-control-in-large-scale-singleuse-bioreactors>, 2013.*
29. S. Winckler, R. Krueger, T. Schnitzler, W. Zang, R. Fischer, M. Biselli, *A sensitive monitoring system for mammalian cell cultivation processes: a PAT approach, Springer, Bioprocess Biosyst Eng, 2013.*
30. F. Zagari, M. Jordan, M. Stettler, H. Broly, F. M. Wurm, *Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity, New Biotechnology, Volume 30, Issue 2, 25: p. 238–245, Elsevier, January 2013.*
31. <https://www.lgcstandards-atcc.org>, *American Type Culture Collection Non-profit Organization, FAQs "Osmolality", Article published in 2012.*
32. A.K. Srivastava, S. Gupta, *Comprehensive Biotechnology, Academic Press, 2011.*
33. F. C. Castillo, B. Cooney, H. L. Levine, *Biopharmaceutical Manufacturing Process Validation and Quality Risk Management, ISPE, <https://ispe.org/pharmaceutical-engineering/may-june-2016>, 2016.*

*The Hamilton publications referred in the present document are available for download at [www.hamiltoncompany.com](http://www.hamiltoncompany.com).*

*A. Biopharma PAT. Quality Attributes, Critical Process Parameters and Key Performance Indicators at the Bioreactor, REF. 695237, 2018.*

*B. Measurement Challenges with Optical Dissolved Oxygen Sensors, REF. 111001451, 2019.*



©2021 Hamilton Company. All rights reserved.  
All other trademarks are owned and/or registered by Hamilton Company in the U.S. and/or other countries.  
REF 111003179/00 — 02/2021

©2021 Hamilton Company. All rights reserved.  
All other trademarks are owned and/or registered by Hamilton Company in the U.S. and/or other countries.  
111003179/00 — 02/2021  
翻訳：株式会社ティ・アンド・シー・テクニカル  
商品開発課  
2021年2月15日