

CO<sub>2</sub>

溶存二酸化炭素シリーズ

## 現在の溶存二酸化炭素測定技術

©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.

111003180/00 — 03/2021

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4月16日





## 目次

概要 .....	4
1. PAT の原則に従って溶存 CO <sub>2</sub> を監視する .....	5
2. 導出による間接測定（ソフトセンサー） .....	8
3. 血液ガス分析計による CO <sub>2</sub> 測定 .....	10
4. オンライン測定　オフガス分析計の使用 .....	11
5. インライン測定 .....	13
5.1 pH プロブから生まれた電気化学センサー：セベリングハウス電極の原理 .....	13
5.2 光化学および分光センサー .....	16
6. まとめ .....	18
用語集 .....	20
参考文献 .....	24

## 概要

溶存 CO<sub>2</sub> は、バイオ医薬品プロセスにおける重要なプロセスパラメーター (CPP) であることが知られており、このパラメーターによる制御は製品の歩留まりとその品質の向上など、プロセスの改善に非常に有益なものです。バイオリアクター内の CO<sub>2</sub> を測定する一般的な方法はいくつかありますが、それぞれに長所と短所があります。

本書では、CO<sub>2</sub> 測定の方法を選択する際に考慮すべき要素と、バイオプロセス制御での使用に関連する各方法の優れた点と課題について説明しています。また直接対象物を測定する方法以外のものとして数学的手法と関連パラメーターを用い測定するソフトウェアセンサー、血液ガス分析装置 (BGA) などのオフライン分析装置、オフガスセンサー形式のオンライン測定、セベリングハウスの原理を使用したインライン測定、光学/分光などのテクノロジーの可能性について説明しています。

---

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、バイオリアクター、PAT、インライン測定、本来あるべき場所での測定 (in-situ)、オンライン測定、オフライン測定、重要なプロセスパラメーター (CPP)、リアルタイム制御、セベリングハウス、NDIR 分光法、ソフトセンサー、オフガス分析、BGA (血液ガス分析)

## 1. PAT の原則に従って溶存 CO<sub>2</sub> を監視する

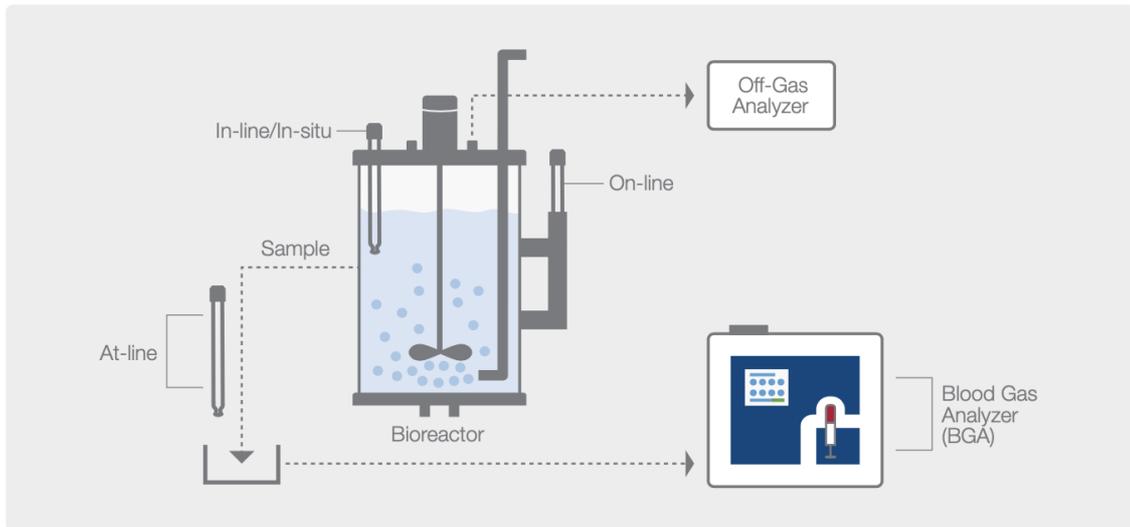
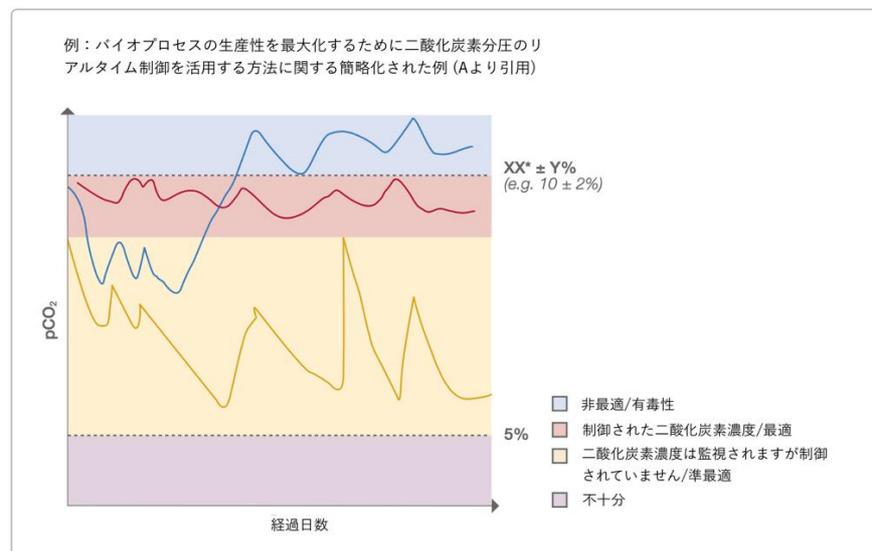


図 1 : PAT ガイダンス (2004) 1 およびその後の科学文献に従ったプロセス監視のさまざまな方法<sup>B</sup>

CO<sub>2</sub> は、広く行われているバイオプロセスにおいて様々な要素に影響を及ぼします。代謝による生成物と反応物の両方への影響があり、また一般的に使用される緩衝系に対し最適なレベルで制御するための不可欠な要素で、CO<sub>2</sub> 測定とその制御は製品の歩留まりと品質を大幅に向上することが広く認められています。プロセスに最適な溶存 CO<sub>2</sub> (DCO<sub>2</sub>) プロファイルを決定するには、バイオリアクターから連続的にデータを受け取ることができるインライン測定が必要になります。研究開発レベルで、最適なプロファイル (またはゴールデンバッチ) を開発することから始まり、スケールアップする中で適したプロファイルを求めていきます。その結果、最良の生産性と品質の達成が可能になってきます。



DCO<sub>2</sub>は、FDA<sup>1</sup>の工程分析技術（PAT）ガイドラインで定義されている重要な工程測定項目（CPP）です。CPPとして、バイオプロセスの生産性を向上させるためにリアルタイムで制御する必要があります。プロセスのスケールアップ中のインライン測定と自動制御の組み合わせは、プロセスの最適化とスケールアップ/スケールダウンの反復作業を削減する上で重要な方法になります。

（DCO<sub>2</sub>の測定と制御の重要性、その利点の詳細な紹介については、溶存二酸化炭素シリーズ1巻「培養と溶存二酸化炭素」を参照）

バイオリアクター内の DCO<sub>2</sub>を測定するためには、広く使用されるいくつかの異なる測定技術があります。本書では、オフライン、オンライン、およびインラインで使用される溶存二酸化炭素計測器の種類とその原理的の概要を説明します。

アプリケーションに最適な測定技術を決定する際には、考慮しなくてはならないいくつかの要素があります。他の分析機器と同様、理想的な DCO<sub>2</sub> センサーは、精度および測定の正確性に対し妥当なコストであること、行う培養要件を網羅する測定範囲であることが必要です。

例えば、哺乳類の培養では 30~110 mmHg (50~150 mbar) で精度と正確性（安定性）が必要です。またセンサーの測定寿命も非常に重要です。SIP および CIP のサイクルを含め、自動洗浄、滅菌などの洗浄を含むバイオプロセス全体の工程に計測器が耐えられない場合、測定器の利用価値が下がってしまいます。

様々な要件の中で特にプロセス分析計にとって最も難しいのは、測定対象の選択性です。CO<sub>2</sub>は、バイオリアクターに存在する他の揮発性物質と非常に類似した特性を持っているため、他の分析物の影響を受けにくいセンサーであることが求められます。この点を踏まえ、測定をオフライン、オンライン、インライン、または複数の測定器と組み合わせて行う必要があるか慎重に検討します。その結果、選択した測定器が実際には運用が困難なものになることがあります。たとえば、多くの代謝物はインラインで測定する必要がありますが、バイオプロセスでそのような測定を可能とする技術は広く受け入れられてはいません<sup>B</sup>。DCO<sub>2</sub>計測器も同様で、利用方法と測定原理からくる制約があり、またコストの問題も出てきます。

DCO<sub>2</sub>モニタリングの利点を完全に達成するには、最低限インラインで測定する必要があります、可能であれば自動制御を実施する必要があります（以下の例を参照）。このインラインであるという要件については既刊の「培養と溶存二酸化炭素」で詳細に説明されており、

PAT ガイドラインに準拠します。実用的な観点から、妥当な DCO<sub>2</sub> センサーとは、自動制御化に対応できる応答時間を持ち、アプリケーションに適した寸法と滅菌性を備えている必要があります。また理想的な測定技術であることは、保守要件が低く、複数の処理工程を経ても精度が損なわれず、また精度を維持できることなど、誤差が発生しにくい堅牢な測定能力を持つものであることが求められます。現在典型的なバイオ医薬品アプリケーションにおいて、左記のニーズを満たす DCO<sub>2</sub> 測定技術は残念ながらありません。このため本書では、ソフトセンサー、オフライン分析計、オンラインセンサー、オフガス分析計、インラインセンサーなどで、利用可能ないくつかの測定条件における測定値とその課題について、基本的な情報を提供することが目的になります。

## 2. 導出による間接測定（ソフトセンサー）



数学的モデリングまたは多変量データ分析（MVDA）を使用して、二酸化炭素濃度を概算で求める方法があります。これらは「ソフトウェアセンサー」または「ソフトセンサー」と呼ばれることがあります。

数学的モデリングではメカニズム解析により事前に定められた方程式を使用します。MVDA は統計に基づいて継続的に学習するアルゴリズムが使用されます。

どちらの方式も、複数の変数を使用して培地中の溶存二酸化炭素（DCO<sub>2</sub>）を概算出力する数学モデルを設計する必要があります。特に数学モデルをスケールアップ実験に使用する場合、さらに多くの要因を考慮する必要があります<sup>2</sup>。ヘンリーの法則などのガス法則は、バイオリアクターでの DCO<sub>2</sub> 相互作用の複雑さを表すには不十分なため、より複雑なモデリングが必要です。

ヘンリーの法則方程式

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

MVDA で DCO<sub>2</sub> を求める場合、通常考慮されるパラメータは、ヘンリーの法則によるリアクター排気の CO<sub>2</sub> 測定が含まれることがあります。この条件を計算に入れるには、「液体」（タンク内の培地）からヘッドスペース（タンク上部の気相）に存在する「気体」への CO<sub>2</sub> の移動（相関移動）をモデル化する必要があります<sup>3</sup>。また MVDA に取り込まれるインライン pH センサーのデータは、CO<sub>2</sub> により pH を制御していることから、緩衝系との関係を測定しています<sup>4</sup>。緩衝の状態や媒体の特性など、物質移動に影響を与える可能性のある測定項目もすべて含め、最後に細胞に関する情報として、細胞の呼吸データ、酸素レベル、生細胞集団に直接関連するその他の情報を考慮し含めるようにします<sup>5</sup>。

一部のアプリケーションでは、MVDA またはメカニズム解析により推定される DCO<sub>2</sub> 値が現実の DCO<sub>2</sub> に近似する場合がありますが、この方法における以下に述べる課題を常に

考慮しておく必要があります。

本測定方法の主な課題は、

- 1) パラメーターや仮定される数学モデルを定め、それらを維持するために必要な複雑さとそれを設計実用化する労力

数学モデルは、相互に影響する多数の変動要因が含まれ、それぞれに許容誤差があります。最終的に得られた数学モデルは、これらのエラーの累積とそれにより決定される正確さが上限になります。この数学モデルは行列の構造を持ち、条件が限定されるため、特定アプリケーションでの適用になります。

- 2) 細胞培養または発酵は、絶えず変化するプロセスです。一定の条件と安定した環境を保つため様々な作業を人が判断し行っています。このためバイオリクターの内容物はプロセス全体を通して変化していきます。

ソフトセンサーは、条件が特定され安定したプロセスに適していますが、プロセス全体を通じて人が管理するバイオリクターは、数学モデルで  $\text{DCO}_2$  を推定することは困難です。

数学モデルでは補えない状況を改善するため、数学モデルに手動調整を組み合わせた制御戦略を取ることがあります。状況に適した方法で実行できる場合もありますが、この場合本来目的としていたことを実現できない数学モデル、それを補うための人の組み合わせでは、数学モデルを採用することに対し疑問が残ることになります。

数学モデルと現実の差が顕著になる状況

ゴールデンバッチ（「ゴールドスタンダード」と呼ばれることもあります）のための制御プロファイルの開発を行っているとき、このような状況が起こります。実験計画法（DoE）で状況に適した  $\text{DCO}_2$  になるよう数学モデルを設計し制御すると、 $\text{DCO}_2$  の値は DoE から推定されたものとは大きく異なる結果になります<sup>6</sup>。

以上の通り  $\text{DCO}_2$  測定器の選定を行う場合、可能であれば、数学的モデルに依存しないテクノロジーを選択することが最良です。プロセス全体の制御に対する信頼性は条件が限られる数学モデルに依存するより、実際の測定に依拠することで、多くのプロセスではより正確な制御を行えるようになります。

### 3. 血液ガス分析計（BGA）による CO<sub>2</sub>測定

バイオリアクターの CO<sub>2</sub>を測定するための一般的な方法は、独立した血液ガス分析装置（BGA）を使用することです<sup>7</sup>。

BGA は、多くのパラメータの参照用に使われる分析計として用いられ、R&D および実験室規模で特に一般的です。BGA を生産エリアへ設置しアットライン分析用に使用することもできますが、あまり一般的ではありません。その理由として、BGA がかなりのスペースを占有し、生産施設のすべてのクリーニングおよび互換性ルールに準拠する必要があり、現実的に運用は困難です。

複雑な機器全体で無菌性を維持することは、特にサンプリング手順やメンテナンス活動を含めた時、その運用は困難な場合があります。自動化されたアットライン分析を備えたサンプリングプローブの使用も可能ですが、実際には生産エリアでサンプリングし、サンプルとプローブをラボに持ち込んでオフラインチェックする方がはるかに一般的です。

オフラインチェックでは、標準分析メソッドとして使用され、エラー発生頻度が定義された測定値が提供されます。ただし、この章で説明する通り、本装置の複雑さはリアルタイム制御への適合は困難という問題があります。

オフライン卓上分析計は、バイオリアクターに追加のポートを必要とせずに測定を行うことができます。このためヘッドプレート上のポートの数やスペースが限られている場合、これは現実的で実行しやすく、また PAT で推奨されている重要なオンライン分析の対象から除外する根拠にもなっています。

CO<sub>2</sub>の測定に加えて、多くの BGA を他の測定装置と組み合わせることができます。これらは、pH、DO、代謝物、さらには生細胞密度などの細胞数を並行して分析できます。この場合、BGA は、多目的オフライン/アットライン分析計に組み込まれている測定技術の 1 つになります。インラインパラメーター（多くの場合、pH と DO）と重複している場合、それらの測定器を参照用測定器として使用できます。また BGA に複数のパラメータが組み合わさった総合的な測定器を使用する利点は、複数のバイオリアクターに対し一括で測定値を提供できることです。ただこれには多くのサンプルの可用性とランニングコストに関するいくつかの制限が含まれます（以下に説明します）。このため BGA と他の測定項目を単体で行う方法は注意が必要です。

インラインセンサーと BGA 分析の間の不一致に最も影響するものの 1 つは、サンプル処理から来ています。これは、CO<sub>2</sub> やその他の揮発性分析物に特に当てはまります。サンプリングは本質的にサンプルの圧力と温度の



BGAの測定レンジにおける最も高い測定精度



30～60 mmHgにおいて±5mmHg

変化につながり、CO<sub>2</sub>測定に影響を与えます。DCO<sub>2</sub>は通常分圧として測定されるため、システムの温度と全圧の違いにより、インライン測定とオフライン測定の間大きな違いが生じる可能性があります。名前が示すように、血液ガス分析装置は元々、血液サンプル中の pO<sub>2</sub> と pCO<sub>2</sub> を分析するために使用されていました。このようなデバイスは、人類生理学に近い測定範囲（たとえば、30～60mmHg の間で±5mmHg）で最高の精度を示しますが、100～200 mmHg などのより高い測定範囲では、測定値の偏りは最大±15mmHg になる可能性があります<sup>8</sup>。前述のように、これらのような分析装置は通常、サンプルが手動で採取されて分析装置に運ばれるオフライン測定に使用されます。一部のグループは、自動サンプリング（つまり、アットライン方式）を使用して、サンプリングの偏り、時間、および労力を軽減する場合がありますが、このアプローチには依然として課題があります。

オフラインまたはアットラインの構成に関係なく、多目的分析計は、比較的低頻度の離散した測定点の分析にのみ使用できます。このデータを使用して制御方法を確立することは非常に困難であり、PAT の方針によって指示された継続的な自動制御はほとんど不可能です。サンプリング頻度を増やすことは、各サンプルでバイオリアクターから除去される量となるため、特に小さなリアクターでは非現実的です。これは、サンプリング量が比較的少ない限外濾過および透析サンプリングプローブの場合にも当てはまります。また高価な消耗品である分析カートリッジを使用するため、高い初期費用と非常に高い維持費を伴う傾向があります。分析的および統計的観点から信頼性のある測定値と判断するには、測定を3回は実行する必要があります。制御に十分な頻度で測定を行うにはコストが非常に高くなります。このためバイオリアクターごとに1日あたり最大3つのサンプルの分析に使用されることが一般的です。

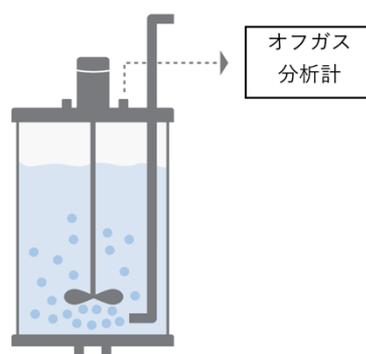
オフラインデバイスは依然として主要な標準分析器ですが、リアルタイム制御戦略で使用するにはかなりの制限があります。

#### 4. オンライン測定 オフガス分析計の使用

オフガス測定は、バイオリアクターのヘッドスペース内の CO<sub>2</sub> の量を知るのに役立つ、

DCO<sub>2</sub>測定と組み合わせて使用することで、炭素発生率（CER）などのパラメーターを計算できます<sup>3,19</sup>。

オフガスセンサーの主な利点は、リアクターの滅菌壁の外に設置できることで、インラインセンサーで必要とされる滅菌要件を必要としないことがあります。また、間接的な電気化学的方法ではなく赤外線（IR）測定に基づいているため、他のタイプのCO<sub>2</sub>センサー技術で発生するドリフトの問題も発生しません。IR測定により、センサーはオフガス酸素や水の比率などを追加した測定データを提供することができます。これらの利点により、オフガスCO<sub>2</sub>測定は他のCO<sub>2</sub>分析方法と同様重要な測定要素と言えます。



オフガス測定により、反応器全体の平均CO<sub>2</sub>レベルを把握できますが、ローカル環境（サンプルが採取された場所など）からの測定値を提供するDCO<sub>2</sub>分析とは異なります。これらは2つの異なるパラメータを測定していますが、オフガスCO<sub>2</sub>測定を行うと、相間関係がある程度予想でき、DCO<sub>2</sub>の測定に対し冗長性を確保できるようになります。この予想される関係により、溶存CO<sub>2</sub>の代用としてオフガス測定を使用することがよくありますが<sup>9</sup>、注意して行う必要があります。

2つの測定タイプ間の推定される同等性は、液体媒体の分圧が気体のヘッドスペースと「平衡状態」にあるという仮定に基づいています。平衡はヘンリーの法則を使用して計算できますが、必ずしも実際のバイオリアクターの状態を正確に表したものではありません。

ヘンリーの定数に影響を与える主な要因として、プロセスの過程で平衡が成立しない状況があり、また相条件に依存する脱着によるものがあります。

一般に、CO<sub>2</sub>の分圧は、気体よりも液体の方が高く、この差により気相への脱着が生じています。この状態でオフガス測定のみでDCO<sub>2</sub>を推定する場合、DCO<sub>2</sub>の値が実際より極端に少なくなる可能性があります<sup>10</sup>。

平衡状態が成立する条件として、いくつかの文献では、低い物質移動速度および非定常状態条件<sup>11</sup>、または無細胞バイオプロセスなど、特定の限られた条件下でのみ許容できる方法であることを示しています<sup>12</sup>。

DCO<sub>2</sub> とオフガス CO<sub>2</sub> のバランスの違いは、表面積と体積の比率が小さいバイオリクターよりも、はるかに小さい比率となる大容量のバイオリクターの場合、誤差が大きくなる可能性があります。液相と気相の間の大きな不一致の原因は、消泡剤が制限されている、あるいは消泡剤が無いプロセスで発生してきます。液体媒体とヘッドスペースの間の界面に泡が形成され、ヘンリーの法則で求められる値よりも多くの CO<sub>2</sub> やその他のガスが液体に蓄積されます。液相にガスが予想より多く保持されると、オフガス分析装置によるガスの検出が妨げられてしまいます。

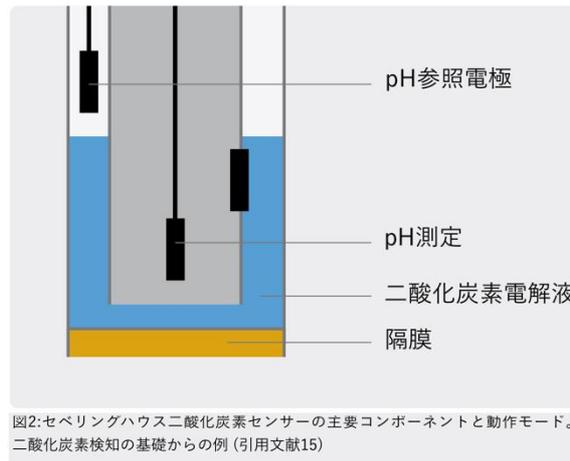
オフガス分析は、一般的に特定の条件下でのみリアルタイムの DCO<sub>2</sub> 制御に適しています。すでに述べたとおりバイオリクターにおける利用での最大のリスクは、バイオリクター内の pCO<sub>2</sub> を過小評価することによる培養への負の影響が生じることです。研究によると、プロセスの初期段階で培養許容限界を超える CO<sub>2</sub> への短時間の変動後、pCO<sub>2</sub> が標準値に戻ったとしても、長期にわたり培養に有害な影響を与える可能性があることが報告されています<sup>13</sup>。このことから、可能な限り DCO<sub>2</sub> 制御にインライン/in-situ 測定を選択することが重要です。

## 5. インライン測定

### 5.1 pH プロブから生まれた電気化学センサー：セベリングハウス電極の原理

PAT ガイドラインで説明されているように、黄金のプロファイルに一致するよう DCO<sub>2</sub> レベルを維持することで、最も効果的な培養を行うことができます。オフラインの方法は、培地の CO<sub>2</sub> を監視するために長い間信頼されてきましたが、この方式では、自動制御システムで使用するのに十分な頻度のデータを取得できない問題があります。一方、DCO<sub>2</sub> は溶解酸素を検知するために開発された電気化学センサーのように水中で還元されないため、その技術を使用することができません。

バイオリクター用のインライン DCO<sub>2</sub> センサーはこの課題を克服する技術としてセベリングハウス (Severinghaus) 電極の原理を採用しています。この方式はバイオ医薬品アプリケーションの多くの要件を満たせるよう設計されています<sup>14</sup>。



セベリングハウス電極の技術は、1957年にジョンW.セベリングハウス博士によってpH、隔膜、電解液を一つの構造としてまとめ設計され<sup>16</sup>、その後の研究開発により現在の形になりました。電位差測定を行うCO<sub>2</sub>センサーであるセベリングハウスの原理は、その誕生以来、構造をほとんど変えることなく現在も使用され、ほとんどのオフラインBGAの基本的なセンサーとして使用されています。また標準液とインラインデータを簡単に比較校正できます。

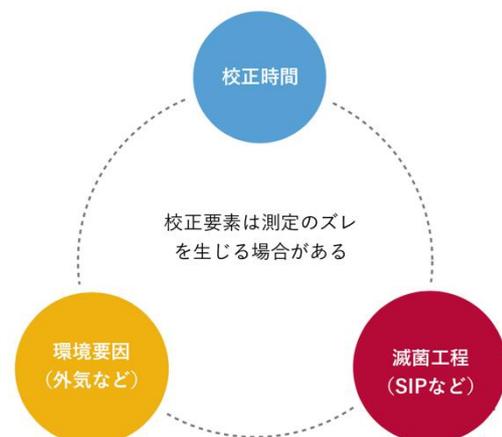
セベリングハウスの原理を採用しているセンサーは、CO<sub>2</sub>が気体または液体の測定に使用でき、その場でのリアルタイム測定を可能にします。これらのセンサーは、CO<sub>2</sub>がCO<sub>2</sub>透過膜（通常はPTFEまたはシリコン）を通過して電解質溶液（通常は重炭酸塩：HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>）に変換、それにより生じるpHの変化を測定する間接測定法を使用しています。

CO<sub>2</sub>濃度の増加は内部溶液を酸性化します。その結果生じるpHの低下量を検知しDCO<sub>2</sub>分圧に変換しています。これらの計算はソフトウェアで自動的に実行されます。

求められたデータを使用する際、センサー内のCO<sub>2</sub>とpHの相互作用については注意が必要です<sup>17</sup>。この原理は、典型的なバイオプロセスで効果的である一方、取り扱いと使用に関し十分な理解と慎重な保守作業が伴います。

本センサーは、頻繁に交換または修理が必要となる連続して動作する複数のコンポーネントで構成されています。通常メンテナンスが必要となるコンポーネントは電解液です。DCO<sub>2</sub>測定は、汚れまたは電解液濃度の影響を受けることがあるため、校正の前に溶液を補充あるいは交換をする必要があります。隔膜も校正の前に交換する必要があるため、この部品の再利用はできません。

このためプロセスやバッチを実行する前に隔膜を交換し校正を行わなくてはなりません。特に慎重な保守が必要なものとして、高価なpHセンサーがあります。このコンポーネントは、隔膜や電解質ほど頻繁に交換する必要はありませんが、複数回のオートクレーブにさらされると、通常の



pH センサーのように感度が不安定となり、正常に測定できない問題が発生します。さらに、pH ガラスは細心の注意を払って取り扱う必要があります。意図したコンポーネント（電解液、緩衝液、隔膜など）以外のものと接触すると、修復不可能な損傷を引き起こす可能性があります。熟練した技術者は、手やその他の表面でガラスに触れないようにする必要があります。

セベリングハウスの原理を採用したセンサーの校正は煩雑で、誤差が発生しやすいものです。校正作業の最初のステップでは、pH ガラスに触れずに膜本体を慎重に取り外す作業があり、内部 pH センサーを従来の pH センサーと同様に校正する必要があります。メーカーの推奨事項により、pH7 の緩衝液で少なくとも 10 分浸漬することが求められます。

pH 電極校正作業は通常の pH 電極同様、ゼロ点電位の判定、pH 校正カーブの判定、応答試験などを行います。pH センサーが校正されたら、新しい隔膜に電解質を充填し（気泡を可能な限り除去します）、pH ガラス電極の上に慎重に取り付ける必要があります。最後に、センサーキャップスリーブを交換、その後センサーを取り付けることができます。電気化学的 CO<sub>2</sub> センサーの校正は、フィールド条件下で、未知の変化する組成の溶液で測定を実行する場合困難が伴います。測定溶液と校正溶液の組成が大幅に異なる場合、分析的に決定された CO<sub>2</sub> 濃度とセンサーで測定された CO<sub>2</sub> 濃度との間にかなりの偏差が発生する可能性があります<sup>15</sup>。

完全な校正を行ったとしても、測定精度に関して考慮しなくてはならないいくつかの要因があります。たとえば、前述のように、滅菌工程によりセンサーの読み取りに大きな影響を与える可能性があります。自動洗浄およびその他の滅菌プロトコル（SIP など）は、バイオリアクターで使用されている標準のガスによる校正測定結果に対しオフセットを与える可能性があります。それを補正する必要があります。また一定期間保管されると、センサーが周囲の空気により、電解質の一部が膜から蒸発する可能性があります。この場合、電解液濃度が増加し、測定値にズレとなってその影響が現れてきます。このため保存されていた場合、使用前に電解液を交換する必要があります。長期の測定では、電解質と膜本体が不安定になるため、大きな測定誤差が発生する可能性もあります。これは揮発性成分と弱酸（揮発性ギ酸など）は電極内電解質と相互作用し電解質を還元、それによって測定値が変化する可能性があります（ほとんどの動物細胞の培養プロセスでは問題となる低い pH レベルに達しないため、この現象はかなり稀です）。誤差を生じる潜在的な要因により、仕様内の測定精度を維持するにはプロセスの途中でもセンサーを頻繁に再校正する必要があります。

取り付けにおいて忘れてはならない事として、pH センサーと同様に、セベリングハウス原理の DCO<sub>2</sub> センサーは、工業規模のバイオリアクターでは適切な電解質接触を維持するために、適切な角度で設置する必要があります。

## 5.2 光化学および分光センサー

インラインセンサーは、PAT に示される方針によるリアルタイム測定において明確な利点がありますが、現在それに唯一適合するのは、セベリングハウス電極の原理を採用するセンサーとなります。

光ファイバースプローブを使用して大規模な分光計に接続し測定することも可能ですが、このタイプの測定はプロセス用途ではコストが高過ぎ複雑であるため、ほとんどの場合バイオリアクターで採用できるものではありません。以前は分光法ベースの光ファイバー（光化学方式）プローブ式センサーの形で代替品が利用可能でしたが、この興味深い技術を採用した測定器を見つけることは現在非常に困難です。

### 光化学センサー：蛍光分光法

本センサーは、蛍光分光法（UV-vis スペクトル）を利用しバイオリアクター内の CO<sub>2</sub> 濃度を測定する方法でした。センサーをバイオリアクターに統合するために、電解質と染料（HPTS）溶液を含む取り外し可能なカプセルをセンサー本体に挿入するようになっています。セベリングハウス電極と同様に、カプセル内の電解質は CO<sub>2</sub> の存在によって酸性化されます。溶液に含まれる色素は、2つの蛍光発光波長を持ち、これら2つのピークの発光強度の比率が pH によって異なります。この特性から、蛍光発光のレシオメトリック分析を使用して溶液の pH を決定し、培地中の DCO<sub>2</sub> の濃度を決定することができます。Pattison et al による注目すべき研究として、この技術は溶存 CO<sub>2</sub> センサーの求められている利点の多くを持っていることが発見されました<sup>18</sup>。第1章で説明したように、適切なセンサーは、適切な測定範囲、応答時間、精度、およびプロセスの変化に対する感度が低い必要がありますが、本センサーの6分の応答時間は、動物細胞の培養の一般的な変化率とその調整の必要性に適しています。またこの時間は、BGA 測定に含まれるサンプリングと分析に要する時間よりも十分短く、インラインセンサーデータに基づくプロセス制御を可能にします。測定範囲は 0~180 mmHG CO<sub>2</sub> で指定され、動物細胞培養における DCO<sub>2</sub> の典型的な測定範囲をカバーします。この研究では、プロセス期間（スケールが異なれば影響も異なります）、温度変化、または代謝物濃度の変化に伴う有意なドリフトや精度の低下が見られず、BGA との比較試験も行われました。BGA は標準ガスで十分校正され、その結果インライン測定とオフライン測定とのオフセットは比較的一定という結果でした。

測定タイプの違いは、ガス放出などのサンプリング効果に基づいて予想されますが、インライン測定とオフライン測定とのオフセットが一定の結果から、インライン測定はプロセス条件をより正確に捉えていると見なすことができます。

その他の利点として光退色による誤差、光源強度の変化、光路長の変化、およびその他の変動に対する補正機能を持つことから、レシオメトリック分析の優位性がある一方、セベリングハウスの電極と光学技術を組み合わせていることにより、両方のタイプの難点も持ちます。セベリングハウスの原理のセンサーについては、5.1 章で説明した通りです。

分光学的または光化学的なセンサーは、通常、信号を適切に取得し二酸化炭素濃度に変換するためのデータ処理と別個の光学テーブルを必要とします。この複雑さが増すと、コス

ト、測定の障害要因、トラブルシューティングに必要なトレーニングが増える可能性があります。また校正については 30L スケールのバイオリアクターでは最大 4 時間かかることもあります。これらの問題からインラインによる DCO<sub>2</sub> 測定は実用的ではないという結果となっています。

## 分光法

光化学および中赤外分光インラインセンサーは、バイオプロセッシング向けに多くの利点を備えています。染料を必要としない非分散型赤外線 (NDIR) 技術の利点は多くの可能性を持っています。

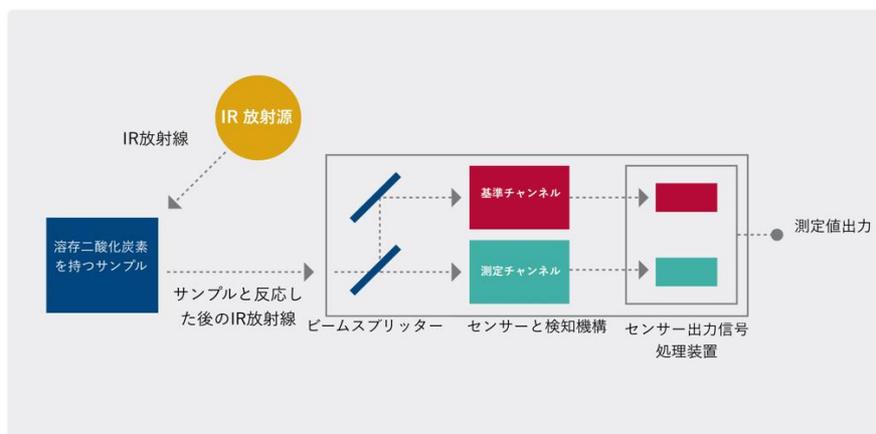
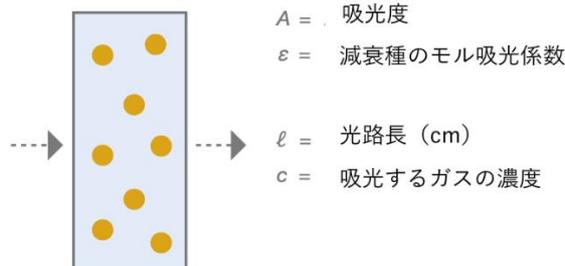


図3: NDIR二酸化炭素濃度センサーの基本的な構造

NDIR を用いる二酸化炭素濃度センサーは、IR 範囲の電磁放射の濃度依存の吸収率を使用します。材料またはガス混合物を識別するために使用される従来の分光計とは異なり、NDIR センサーは分散光学コンポーネントを含みません (図 3)。このコンポーネントは分光計の最も高価な要素の 1 つですが、NDIR センサーは従来の分光計よりもはるかに安価です。このタイプの分析では、スペクトル全体ではなく、対象ガス (この場合は CO<sub>2</sub>) の特徴的な吸収帯に対応する単一の透過波長 (赤外線) を利用します。CO<sub>2</sub> 濃度が高くなると、ランベルトベールの法則に従って指定された波長をより多く吸収します。次に、この波長の減衰を測定し CO<sub>2</sub> 濃度を決定できます。

### ランベルトベールの法則

$$A = \epsilon l c$$



このセンサー技術は、CO<sub>2</sub> の正確な測定をリアルタイムで実行できる可能性を秘めています。

ます。さらに、ほとんどの場合、個体素子のセンサーであるため、任意の角度で取り付けることができます。現在、利用可能な NDIR CO<sub>2</sub> センサーは豊富にあります。それらの用途は、大気の測定、インキュベーター、または温室内の換気制御、環境および燃焼制御、自動車用途、および淡水中の溶存 CO<sub>2</sub> の測定を目的としています。

この技術をバイオリアクターで使用できるようにするには、光路からの水の除去が必要のため、技術的に非常に困難です。私たちの知る限り、12 mm フォーマット (PG 13.5) の小型化、滅菌および洗浄手順など、バイオファーマ業界の要求事項と互換性のある溶存 CO<sub>2</sub> を測定するための NDIR ははまだありません。

## 6. まとめ

現在、バイオリアクター内の溶存 CO<sub>2</sub> を監視する方法はたくさんあり、特定のアプリケーションに最も適切な方法を選択する際に考慮すべき多くの要因があります (表 1)。多くのアプリケーションでは、複数の方法の組み合わせが最も効果的な測定になります。

他の測定データを用いるソフトセンサーは複雑であり、マトリックスに依存しない正確な CO<sub>2</sub> 分析には手間がかかりすぎる問題があります。オフライン測定では、標準との比較に非常に役立ちますが、真の制御戦略を実現するのに必要十分な頻度のデータを取得することが困難です。オンラインのオフガス測定は、より継続的な情報を提供しますが、溶存 CO<sub>2</sub> を実際に測定するわけではありません。CO<sub>2</sub> 測定から最大限プロセスの効率化を実現するにはインライン測定が必要です。セベリングハウスの原理を用いたセンサーは、DCO<sub>2</sub> に関するリアルタイムの連続データを提供します。現時点では、このセンサーが利用可能な唯一のインラインオプションです。残念ながら、それはメンテナンスの必要性が高く、一般にバイオプロセス制御の精度と堅牢性が許容できないほど低いとされています<sup>B</sup>。インライン IR 光学センサーは、これらの欠陥を克服する可能性を示していますが、バイオ医薬品アプリケーションに適した再利用可能なセンサーの形で利用できる技術はまだありません。したがって、DCO<sub>2</sub> センシングに向けた将来の改善には、プロセス制御においてメンテナンスが少なく、精度および長期に正確な測定が行える堅牢なインラインセンサーが必要です。このようなセンサーは、衛生的な設計や安定性など、バイオ医薬品センサーに必要な特性を持つ必要もあります。

表1. 最も一般的なCO2測定技術の長所と短所の評価

	リアルタイム モニタリング	In-Situ モニタリング	50-150mmbar 正確なプロセス制 御/モニタリング	堅牢性 (SIP対応)	溶存二酸化炭素 選択性	省保守 省訓練	単独 取り付け 角度
ソフトセンサー	+	N/A	+	N/A	+	-	N/A
オンライン (オフガス)	+	N/A	+	N/A	+	+	+
オフラインBGA セベリングハウス	-	N/A	+ (Low Range) - (High Range)	N/A	-	++	N/A
電気化学方式 セベリングハウス	++	+	+ (Low Range) - (High Range)	+	-	-	-
光学式 セベリングハウス	++	+	+	+	-	+	+
In-Situ/In-Line 光学NDIR	++	N/A	++	++	++	++	++

## 用語集

この用語集の定義は、特に明記されていない限り、ハミルトン社溶存二酸化炭素シリーズ、または PAT ガイドラインに基づいています。

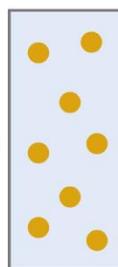
### ランベルトベールの法則

光の減衰を、光が通過する材料の特性に関連付けます。この法則は、一般に次のように適用されます。化学分析測定であり、光子、中性子、または希薄ガスの物理光学における減衰を理解するために使用されます<sup>23</sup>。

ランベルトベールの法則の一般的で実用的な表現は、均一な濃度の単一の減衰種 (CO<sub>2</sub> など) を含む物理的材料の光減衰を、サンプルを通る光路長と種の吸収性に関連付けます。この式は次のとおりです。

### ランベルトベールの法則

$$A = \epsilon \ell c$$



A = 吸光度  
ε = 減衰種のモル吸光係数  
ℓ = 光路長 (cm)  
c = 吸光するガスの濃度

### 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/1h) に対応します。CER は、CTR から、時間の経過に伴う無機炭素プールの発生 (時間の経過に伴う NaHCO<sub>3</sub> の発生に対応) を差し引いて計算できます<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または特性です。

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。

## CTR-炭素移動率

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 / l h) 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。サブ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 and 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。重要なこととして、DO は、細胞の成長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。

## 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。

## ヘンリーの法則

pH 7 の水溶液では、溶解した CO<sub>2</sub> は主に 2 つの無機形態で発生します：遊離二酸化炭素 (CO<sub>2</sub> (aq)) と重炭酸イオン (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)。水溶液中の CO<sub>2</sub> の溶解度は、説明にあるようにヘッドスペース内の pCO<sub>2</sub> に依存し、溶解度はヘンリーの法則によります。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さいに用います<sup>4</sup>。

$$H_{CO_2} = \frac{C_{CO_2,L}}{P_{CO_2}} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{L bar}} \right]$$

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

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測定値・単位です。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

## 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から取り出され、分離され、プロセスストリームのすぐ近くで分析される測定。

## 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除去されず、侵襲的または非侵襲的である可能性がある測定。

## 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。

## 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/h) 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/h)。

## プロセス分析技術 (PAT)

Process Analytical Technology ガイダンスは、2004 年に FDA によって公開されました。これは革新的な医薬品開発、製造、および品質保証の自主的な開発と実施を促進する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迅速な測定方法です<sup>32</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）を指す用語です。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。スケールアップにより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に影響を与えます。さらに、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を正確に予測するには、スケールアッププロセスで酸素の物質移動係数  $K_LA$  を一定に保つ必要があります。溶存酸素の制御アルゴリズムを調整するには、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. 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.
3. A. W. Nienow, *Mass Transfer and Mixing Across the Scales in Animal Cell Culture*, Springer, *Animal Cell Culture*, p. 137–167.
4. 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.
5. 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.
6. J. Glassey (coordinator), *General framework for data representation with small batch numbers, across process scales*, EU-Horizon 2020 - Marie Curie ITN project BIORAPID, Ref. Ares(2017) 3271006 - 29/06/2017.
7. C. Klinger, V. Trinkaus, T. Wallocha, *Novel Carbon Dioxide-Based Method for Accurate Determination of pH and pCO<sub>2</sub> in Mammalian Cell Culture Processes*, MDPI, *Processes*, 28 April 2020.
8. *Stat Profile® PRIMETM CCS Analyzer - Prime CCS Instructions for Use Manual*, Nova Biomedical Corporation, 2014.
9. B. Frahm, HC. Blank, P. Cornand P, W. Oelssner, U. Guth, P. Lane, A. Munack, K. Johannsen, R. Pörtner, *Determination of dissolved CO<sub>2</sub> concentration and production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement*, Elsevier, *Journal of Biotechnology*, Volume 99, Issue 2, p. 133–148, 23 October 2002.
10. H. Bühler, R. Bucher, *Application of electrochemical sensors, Dissolved Carbon Dioxide*, *Bioprocess Technology*: p. 158–167, 1990.
11. Frahm B., Pörtner R. *CO<sub>2</sub> - off-gas measurements for animal cell culture processes*, Technische Universität Hamburg-Harburg, *Bioprozess- und Bioverfahrenstechnik*, 13th ESACT UK Meeting, January 2003.
12. C. Klinger, H. Müller, *Carbon dioxide driven pH reference method for transfer and scaling of fermentation processes*, Application report, <https://www.bluesens.com/>.
13. 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.
14. W. Oelßner, J. Zosel, *CO<sub>2</sub> Measurement in Biotechnology and Industrial Processes*, Wiley-VCH, *Carbon Dioxide Sensing*: p. 349–366, 2019.

15. M. Deckter, W. Oelßner, J. Zosel, *Electrochemical CO<sub>2</sub> Sensors with Liquid or Pasty Electrolyte*, Wiley-VCH, *Carbon Dioxide Sensing*: p. 87–116, 2019.
16. J. W. Severinghaus, *The invention and development of blood gas analysis apparatus*, *Anesthesiology*, 97(1):253–6, July 2002.
17. J. Zosel, W. Oelßner, M. Decker, G. Gerlach, U. Guth, *The measurement of dissolved and gaseous carbon dioxide concentration*, IOP Publishing, *Measurement Science Technology*, Vol 22, 2011.
18. 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.
19. 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 Engineering*, September 2013.
20. G. Gerlach, *Non-dispersive Infrared Sensors*, Wiley-VCH, *Carbon Dioxide Sensing*: p. 157–190, 2019.
21. A.K. Srivastava, S. Gupta, *Comprehensive Biotechnology*, Academic Press, 2011.
22. 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)*, 45<sup>th</sup> ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, <https://www.slideshare.net/kbibipharma/establishing-improved-o2-supply-lower-dco2-built-up-and-ph-control-in-large-scale-singleuse-bioreactors>, 2013.
23. [https://en.wikipedia.org/wiki/Beer-Lambert\\_law](https://en.wikipedia.org/wiki/Beer-Lambert_law), February 2021.

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

A. Should CO<sub>2</sub> Be a Critical Process Parameter?, REF. 1110031179, 2021.

White Paper | Are Current Dissolved CO<sub>2</sub> Measurement Technologies Good Enough?

B. Biopharma PAT. Quality Attributes, Critical Process Parameters & Key Performance Indicators at the Bioreactor, REF. 695237, 2018.



©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