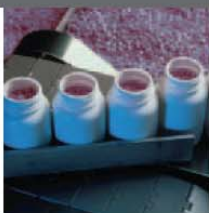




バイオテクノロジーにおける プロセス質量分析



質量分析計の分析時間によるプロセスの最適化

世界中の設置ベースにより現場で証明されたテクノロジー

オンラインプロセス分析技術（PAT）の応用はバイオテクノロジー工業において近年明確な努力目標となってきました。Thermo Scientific プロセス質量分析計は 1980 年代の初頭から発酵槽やバイオリアクターの入口、出口のガス流の成分監視の目的で発酵技術者によって広く用いられてきました。これら精密な測定は汚染の発生を事前に遮断すると同時に、細胞の呼吸や栄養の効果に関する価値ある情報をリアルタイムで提供します。

更に最新のプロセスでは、現在、より進歩したガス分析テクノロジー環境が有効です。新しい Thermo Fisher Scientific Prima PRO プロセス質量分析計は過酷な工業環境における閉ループ制御で高い信頼性を確保し、故障に耐える運転を行える最新の設計技術を備えております。



Thermo Scientific Prima PRO プロセス質量分析計： 次世代始動

30 年以上におよぶガス分析の経験に裏打ちされる様に、Prima PRO 質量分析計はプロセスの各ステージに関する非常に重要な情報をもたらす PAT ツールとなっております。プロセス設計と全生産量のスケールアップにより、次世代型ガス分析計はバイオテクノロジープロセスの多くを容易にし、運転の効率化を可能にします。すなわち：

- ・ 接種前の汚染の高速確認を実施
- ・ シードタンクからの接種物の転換を最適化
- ・ 代謝活動を監視
- ・ タイムリーな予測値（サンプル投与中止の必要なしに）与える状態方程式への入力を提供
 - － 活性細胞量
 - － グルコース消費率
 - － 培養基濃度
 - － アルコール生成率
 - － 生産物抑制
- ・ 養成神経ネットワークとハイブリッドモデルの為のデータ提供
- ・ 環境規準に適合する為除去する必要のある成分を同定し限定
- ・ 下記の制御を可能にする kLa の変化を監視する
 - － 攪拌回転数
 - － スパージガス流量
 - － スパージ酸素濃度
- ・ 溶存酸素プローブのドリフトを検知し、その大きさを測る
- ・ 代謝指標の監視：
 - － メタノール
 - － エタノール
 - － アセトン
 - － アンモニア
- ・ 特定の代謝を示す可能性のある新しい種類の分子を同定

Prima PRO プロセス質量分析計は無菌状態を汚染することなく全てを行います。それは 1 台の分析計で 60 の発酵槽やバイオリアクターを監視することにより、著しく生産性を上げ、装置のメンテナンスを削減します。

有意義な投資対効果をもたらす新モデル

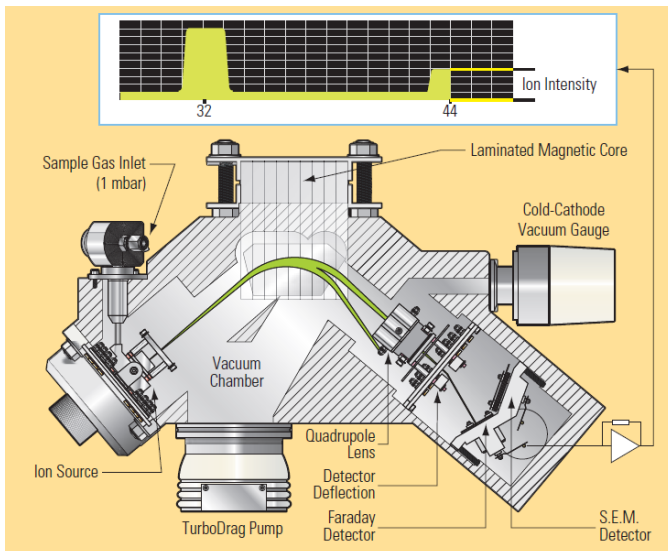
- ・ プロセスのダイナミックな変動を高精度で追跡する高速オンライン分析（1 点当り 1~20 秒）
- ・ 包括的で進歩的なプロセス制御モデル（APC）の為の多くのデータを提供
- ・ 校正間隔 30-90 日（自動）の安定性
- ・ 有効率 99.7% の信頼性と耐故障設計
- ・ 大型のシェルターを必要としない小さい設置スペース
- ・ 運転コストを削減する最小のメンテナンス部品

動作原理

Prima Pro は強力と自在性に富む走査磁場型質量分析計をベースとする高性能ガス分析計です。装置は高い信頼性と最小限の保守部品によって優れた分析性能を発揮するよう設計されています。

質量分析計は中性のサンプルガス分子をイオン化することによって動作し、それらの分子の重さによって生じた荷電粒子を選別します。多くの市販されているガス分析用質量分析計ではイオン化は熱フィラメントによって作られる電子ビームでガスサンプルに衝撃を与えることによってなされます。衝突を避けるため種々のイオンは真空中で選別されます。

Fig.1: 分析部 – 動作原理とピーク図



イオンを分別する為に導入された技術としてPrima PRO質量分析計では可変磁場によりイオンの軌道を制御する走査磁場を採用しています。これにより関心のあるイオンは一つの検出器に連続的に集められ、分析計は既知の成分を正確に定量し、未知のものを同定する為に全てのガスサンプルのスキャンを可能にします。検出器アセンブリはパーセントレベルや高ppmのガス濃度を測定するファラデーカップ検出器を内蔵しています。二次電子増倍管（SEM）検出器は低ppmやppb濃度を分析するためファラデーカップと共に用いられます。

走査磁場からの出力信号は各々の質量のイオンの数に比例した大きさを持つ一連のフラットトップピークとなります。完全に左右対称のピークがPrima PROプロセス質量分析計を用いれば容易に得られます。正確な強度測定は各ピークが一貫した大きさを持つ目標となるので正確なピーク飛越に依存しません。マスポジションの比較的大きなズレでさえも大きさ測定の大きな誤差にならないので、Prima PROプロセス質量分析計の磁場では本質的に誤差範囲として記述され得るものです。更に領域はコンタミから生じる避けられない部分的な表面電荷や絶縁層によって容易に偏向されない比較的高いエネルギーイオンビーム（1KV）を用います。

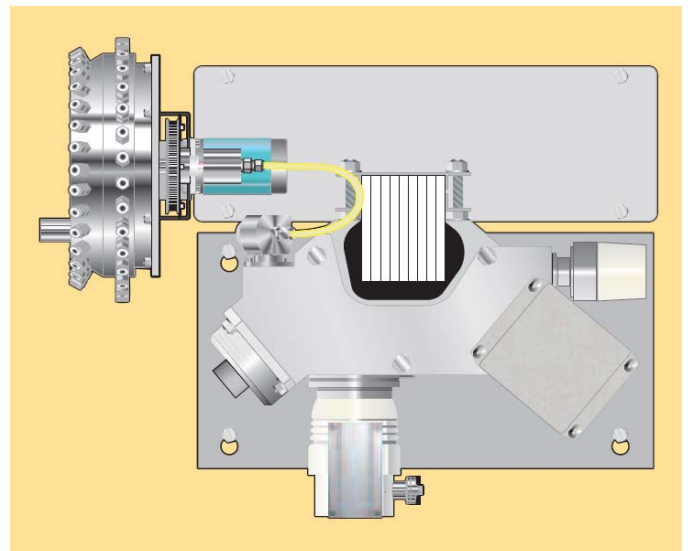
これは四重極方式の非常に低いイオンエネルギーと比較する時、この方式の質量分析計の故障許容性を更に高めます。最後に、高エネルギーはイオン化領域からの引出が早く（低エネルギー重極より）イオン分子相互作用が減り、リニアリティーが改善されます。0.01%の長期間の再現性が容易に達成されます。

多流路インレット

多くのPrima Proシステムは高速多点サンプラー（RMS）を備えています。これは分析計に送られるサンプルの質を落とすことなくサンプル流路を切り替える信頼性の高い装置です。

RMSは僅かの或は保守なしで年に600万回（年1年と）の流路切換えの証明された性能をもって極めて堅固な信頼性の長期の記録もっています。これは1台のMSで63の発酵槽又はバイオリクターを監視できることを示します。ステッパーモーター駆動装置は同時に1つのサンプル流路を質量分析計に振り向け、順番に各流路の流量を記録します。装置は120°Cまで加熱でき、メタノール、エタノール及びアンモニアのような極性を持つ物質の応答を早くするよう設計されています。

Fig. 2: 分析部と64ポート高速多点流路サンプラー
1年に6,000,000回流路切り替えを行います、
ノーメンテナンス



数日で利益に変えるガス分析計



工業による発酵及び細胞培養

発酵は工業では多くの重要な用途があり、厳密に言えば、嫌気性生物の工程を示すものです。工業における発酵は一般的に高酸素化された媒質で働く生きた細胞を用いて有機物を分解することや、他の物質に変換することを表します。微生物発酵はしばしば極端な条件でも成長する原生物質やバクテリア、菌類及び原生動物にも当てはまります。細胞培養という言葉は最もしばしば植物、昆虫及び哺乳動物の細胞のような高い順位の者にも使われます。微生物発酵と細胞培養との区別は丈夫なバクテリアは温度、pH 及び攪拌と曝気によって生じる偏向力の厳密な制御を必要とする哺乳動物細胞よりもプロセス変化に対して許容性があるのでプロセス制御の観点から重要です。溶存二酸化炭素の制御も細胞培養制御には重要です。最新のガス分析テクノロジー装置を基に、Prima PRO プロセス質量分析計はリアルタイムで情報を提供する為に設計され、工業用の発酵や細胞培養における厳格なプロセス制御を可能にしています。



Prima PRO プロセス質量分析計: 多才、高い信頼性、容易なメンテナンス

多才な Prima PRO プロセス質量分析計は製品の生産増加のみならず、製品管理全体の改良の為、多くのバイオテクノロジープロセスの最適化を可能にします。フルスケール生産で運転する為、スケールアッププロセスの各段階を促進し、以下の複合的な製造に関連するリスクを軽減します。

- ・ バイオエネルギー
- ・ 工業的酵素
- ・ 生体適合物質
- ・ バイオマス
- ・ 食品添加物
- ・ ビタミン
- ・ 医薬
 - 予防薬
 - ワクチン
 - 発育因子
 - モノクロナル抗体
 - ホルモン
 - 融解蛋白質
 - 細胞分裂
 - 抗生物質
 - インシュリン
 - 血液凝固剤



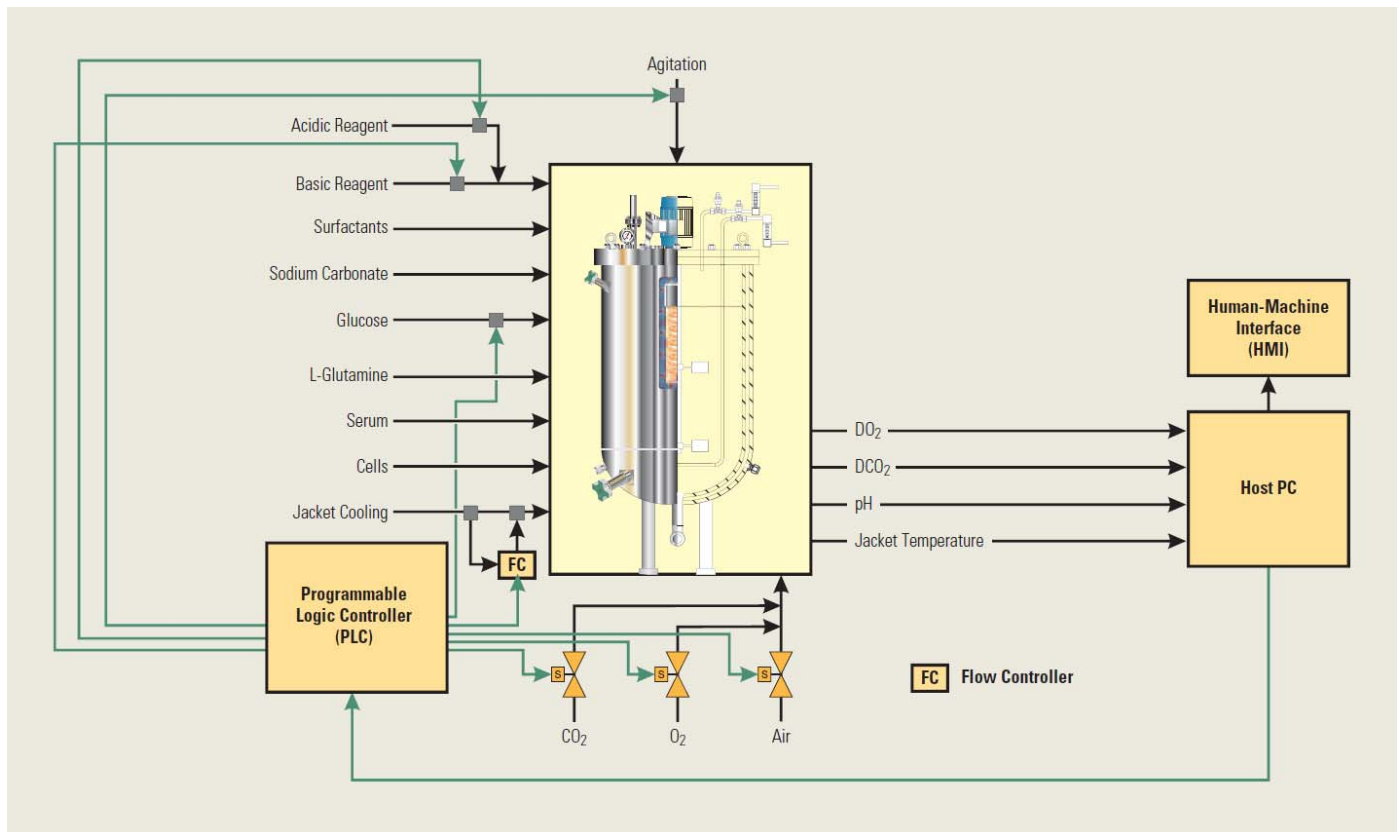
簡単なバイオリアクターの制御

従来の小分子合成と比較した時、生化学プロセスは非常に複雑です。各細胞は 1 秒間に多くの化学反応を行う能力を持っており、しばしば、それらの反応のたった一つが目標分子を作る結果となります。どのように反応が進んだかは温度、栄養素の効果、蓄積された廃棄物の量、利用できる酸素、反応を推進する酵素の濃度及び作られる蛋白質からのアミノ酸基礎単位のような主要なファクターによって決定されます。簡単な発酵槽の場合、培質は滅菌に次いで充填され、ブロー（broth）は細胞と共に接種されます。比較的安定なスパージガス流量とインペラー回転数は媒質を通して十分な酸素量を確実に保持します。細胞が繁殖し始めると過剰な熱は冷却水によって除かれ pH の調整は酸とアルカリ試薬を用いてなされます。溶存酸素 (DO2) は連続的に監視され、手動分析は細胞密度と培養基の組成を取り込みます。

もし DO2 が予定のレベル以下に下がれば、短時間酸素バルブを開い

て酸素が加えられます。哺乳動物細胞培養の場合、同様の制御方法が溶存二酸化炭素 (DCO2) に用いられます。統計的なプロセス制御 (SPC) ツールはプロセスがラボ分析から手動で入力されたデータに基づいた適切な軌線を追従しているかどうか決定するのに用いられます。これらのデータは又収穫に適する時を決めるのにもつかわれます。これらの状況の下で、バッチ毎の変化は著しく、差の大きさのレベルは異常ではありません。製薬製品の場合、もし回収された実際の製薬材料 (API) が一定の品質基準以下であった場合、全バッチは廃棄されねばなりません。明らかに信頼度の高いオンライン PAT を持つ Prima PRO プロセス質量分析計は製品品質と収益性を改善する為に必要なツールをご提供します。

Fig. 3: バイオリアクターの制御例



リアルタイムでのバッチ経過を追跡

プロセス変化量

生物学的生産に用いられる殆どのバクテリアはそれらが成長し、分割する前に水、炭素、窒素及びエネルギー源が必要です。前に述べたように、それらはまた温度、pH 及びガス供給も含まれます。栄養素は幾つかの自然生産物 (Fig.4 参照) を含む可能性のある複雑な成長媒質又は自然のバッチ間変化が示す問題があるプロセスで化学的に明らかにされ得る媒質に備えられます。両タイプの媒質は目標細胞の密度が達成されるまで急速な対数的成長を促進するため最適な濃度の栄養素を供給するよう設計されます。この時点で、最初の炭素源は製品形成を進める第二の栄養源に切り替える為、細胞に強力に消費させることとなります。追加成分は製品生成を最大にし、毒性のある副産物の蓄積を最小にするため抑制又は特定の代謝経路を促進します。

Fig. 4: 成長媒質の構成

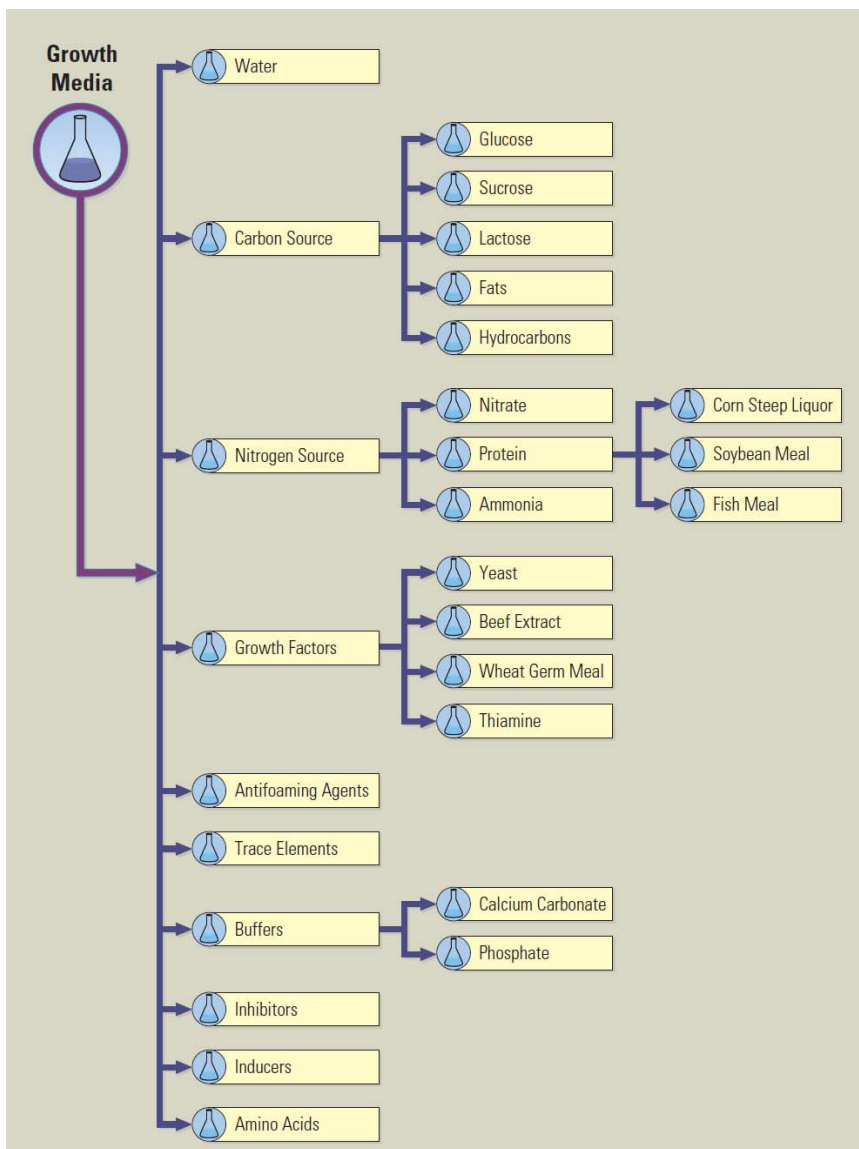


Fig. 5: オートクレーブ型ベンチトップ培養装置



プロセスのスケールアップ

プロセス開発の典型的な手順では 1–10 L/min レンジの容量を持つ多様なベンチトップバイオリアクター又は発酵槽の使用を含みます。種々のプロセスレシピは最も活発で効果のある組み合わせを決める為に異なる細胞系と組み合わせられます。一度最適な候補グループが選択されると、プロセスは 200L スケール (パイロットスケール) までスケールアップされます。これは重要な制御変化量が許容範囲と効力を完全にテストされるところです。pH、温度、攪拌回転数、DO2 及び DCO2 に加えてポテンシャル制御変数も含まれるかもしれません。

- ・ 栄養素供給率
- ・ 背圧
- ・ 上掛けガスの組成
- ・ スパージガスの組成と流量

プロセス質量分析計： リアルタイムモニタリング及び制御

リアルタイムで栄養素を供給し、ガス組成を制御する為、プロセスの化学的性質又は反応機排出ガスのリアルタイムの組成分析の両方が必要です。最新のプロセス制御技術をベースとするモデルは一定の出力変数の測定された変化に応じてこれらの追加的な制御変数を変化させるのに用いられます。フーリエ変換近赤外 (FT-NIR) スペクトルは液体濃度を測定する為に適した技術です。ガス濃度測定をおこなうのに最良の技術は磁場型質量分析計で、分析能力と柔軟性を大きく引き出す Prima PRO プロセス質量分析計の決定的な要素です。

最新バイオリクター

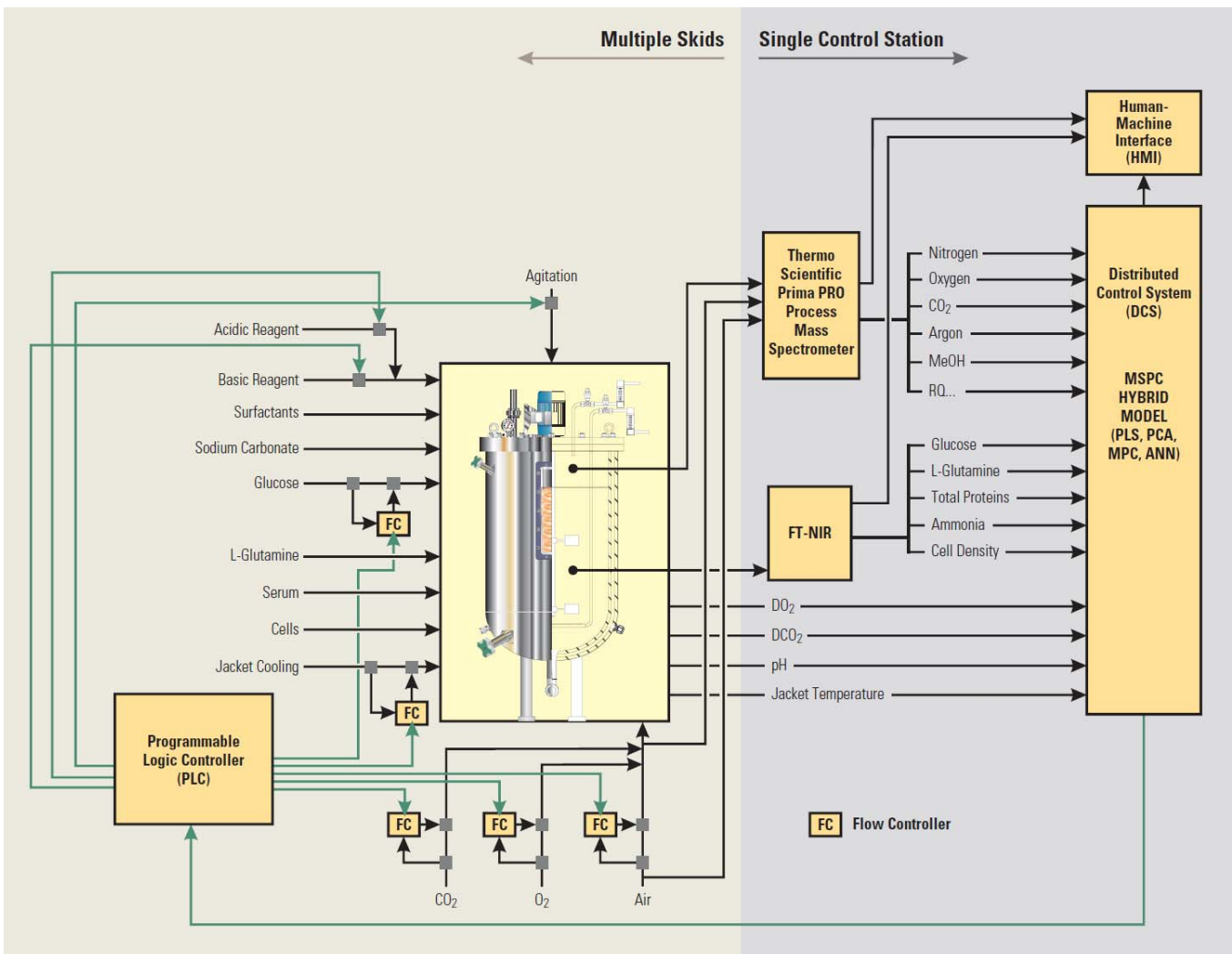
ダイナミックモデル

細胞量、製品濃度（滴定濃度、力価）及び培養基を測定する為に最も頻りに用いられる方法は微分方程式の使用を想定しています。これらの状態方程式は互いに依存し、初期条件とリアルタイム測定に基づく妥当な結果を生ずる為に同時に解決されねばなりません。初期条件は培養基の量（初期炭素源）、開始細胞量、ブロス（broth）量などを含みます。リアルタイム測定は酸素摂取率（OUR）、二酸化炭素生産率（CER）、呼吸商（RQ）及び溶存酸素測定値を含みます。モデルからの出力は最適な製品構成物のための理想的なプロフィールを規定するゴールデンバッチの既知の軌跡を持つ結果との比較によって各バッチの経過を追跡する為に用いられます。この方法は制約する条件及びコンタミネーションができるだけ早く定められ補正され得ることを保証します。

アドバンスドコントロール技術

予測制御モデル（MPC）を実行するための前進的な方法は幾つか浮かび上がります。これらのモデルは一定の形式によった（決定論的な）モデルと人工的な神経ネットワーク（ANN）とのハイブリッドな組み合わせができます。基本的に、ANN モデルは一義的な分析ができない場合のギャップを埋めます。それらはそう呼ばれます何故ならそれらの構造は相互に接続された節、脳のニューロンに類似の構造、の層に基礎を置かれます。これらのネットワークモデル動作は歴史的機能に基づきます。大きなトレーニングデータセットはしばしば統計の成果は特定の範囲内で特定のプロセス変数降下の結果であることを示します。結合の正式な説明を導き出すのは非常に難しいかもしれませんが、これらの関係はプロセス制御に未だに用いられています。質量分析計によるバイオリクター排出ガスの広範な分析は神経ネットワークのような訓練を受けて用いられるデータを提供することができます。他の数学的モデリング技術は元素成分分析（PCA）及び部分最小二乗法（PLS）回帰を含みます。これらは大きなデータセットにおける調査様式及び関係の数学的手順です。データ収集を容易にすることにより、Prima PRO プロセス質量分析計はMPCの実行において成功するカギとなっております。

Fig. 6 : Prima PRO 質量分析計により可能なモデル予測制御型高度バイオリクター



汚染と成長する細胞集合体の最大化を正確な見極め

最新バイオリアクターモニタリング

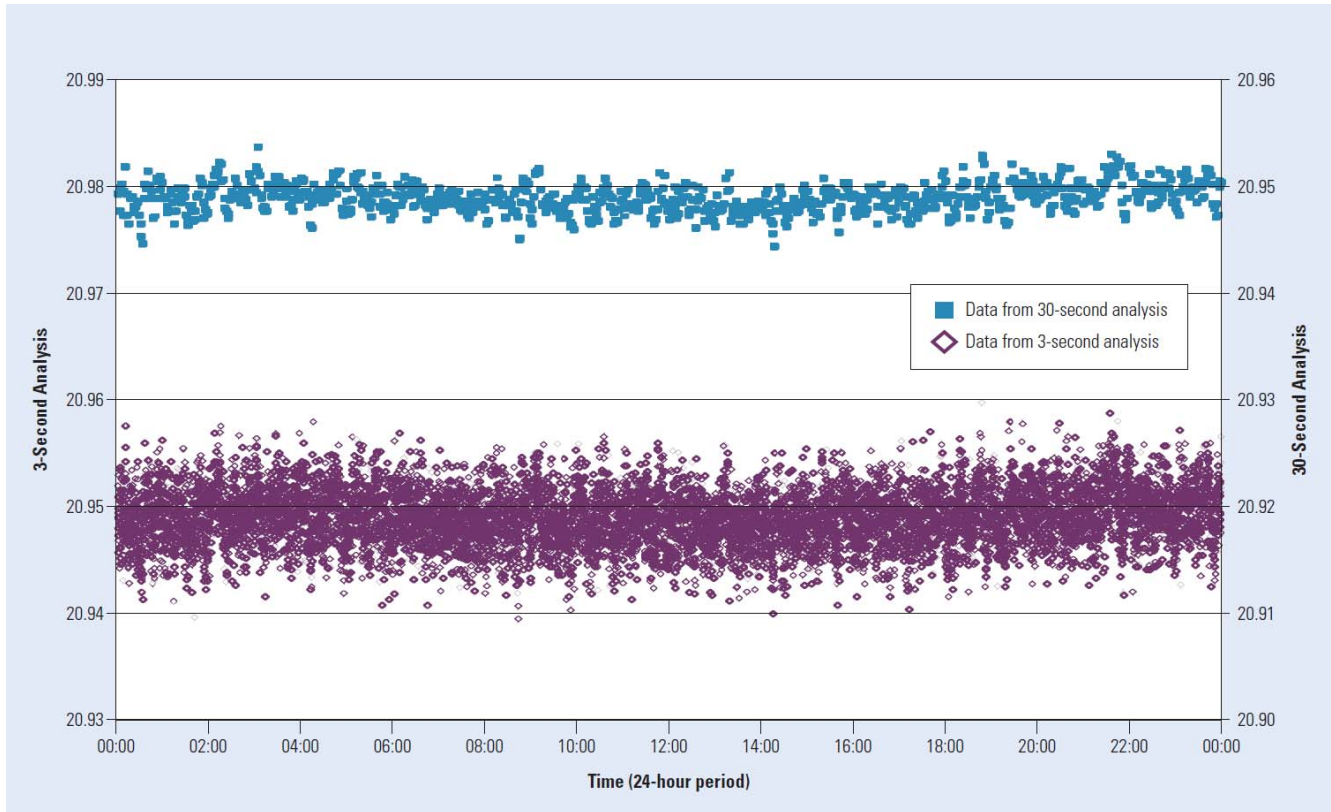


Fig. 7: Prima PRO プロセス質量分析計による酸素 (O2) 安定性プロット

質量分析計データの特性

Prima PRO は Fig.7 の酸素安定性プロット及び表 1 の関連統計データから見られるように非常に精密な測定を行います。Prima PRO プロセス質量分析計は発酵槽がドライエアで散布される時、50ppm 以下の酸素消費を容易に検出できる為、21%O₂ を 30 秒分析した際の標準偏差は 13ppm となります。この測定はバクテリアの呼吸がスパージガスの組成と排出ガスの組成とを比較することによって検出できるので接種前の汚染を確認するのに非常に有効です。酸素濃度の僅かの減少が二酸化炭素の同様の mol%増加に関連がある時、バクテリア汚染が明らかに示されます。

ガス流路中の各成分の濃度測定に費やす時間はソフトウェアによって構成され、モニターされる各プロセスのサンプルポイントの数と動的特質によって変わってします為、分析速度と精度との同時に満たしています。通常の分析時間は窒素、酸素、アルゴン及び二酸化炭素の測定で 5 秒、更にメタノールとエタノールの測定には 3 秒加算され、フラッシング時間 5 秒を加算して流路毎の全分析時間は 10 秒 (メタノールとエタノールを含む場合は 13 秒) となります。哺乳動物細胞の培養では状態変化は微生物発酵において進行するよりもゆっくりであるので、バイオリアクターでは発酵槽よりも分析回数を少なくして精密にモニターできます。

分析時間	データポイント	% 平均	絶対標準偏差	相関標準偏差
3 秒	9,598	20.949	0.00268	0.01281
30 秒	960	20.949	0.00134	0.00642

分析値	Bio 1 スパージ	Bio 2 排出ガス
窒素	78.082%	78.081%
酸素	20.951%	18.735%
アルゴン	0.939%	0.939%
CO ₂	0.028%	2.244%
メタノール		450.010 ppm
エタノール		173.156 ppm
酢酸		0.001 ppm
アセトン		0.000 ppm
H ₂ S		17.429 ppm
OUR		2.216
CER		2.216
RQ		1.000
サンプル流量	250.713 mL	180.655 mL

酸素摂取率 (OUR)

Prima PRO プロセス質量分析計によって得られるスパージガスと反応槽排出ガスの酸素濃度はプロセス制御コンピューターに送られます。そのデータは培養菌の酸素摂取量の計算のため流量測定とバッチの量と結合されます。

酸素摂取率 (OUR) の計算式

$$\text{OUR} = \frac{\text{スパージ流量} \times \left(\text{スパージ O}_2 - \frac{\text{流出量}}{\text{流出 O}_2} \right)}{\text{液量}}$$

OUR のリアルタイムでの計算はしばしばシードタンク内の活性細胞の密度を決めるのに用いられ、植付けに適切な時間が決定することができます。

Fig.8 では Prima PRO プロセス質量分析計を用いた OUR オンラインをモニターした値を表しています。一見したところでは、黄色の曲線は単に細胞の密度を示している様に見え、そのバッチが正常に進行している事を想定している様に見えます。増加の割合において小さな変化を除けば、そこでは個体数の健全な増加がみられます。ただ残念なことに、細胞の死亡率の増加により 70 時間で細胞の生存力の著しい低下がみられ、死滅した細胞は価値を持ちません。細胞の生存力は入力として OUR を必要とする状態変化となります (死んだ細胞は呼吸もしません)。Prima PRO プロセス質量分析計によって得られた OUR 曲線は原因が分かればすぐに補修できる制限状態の

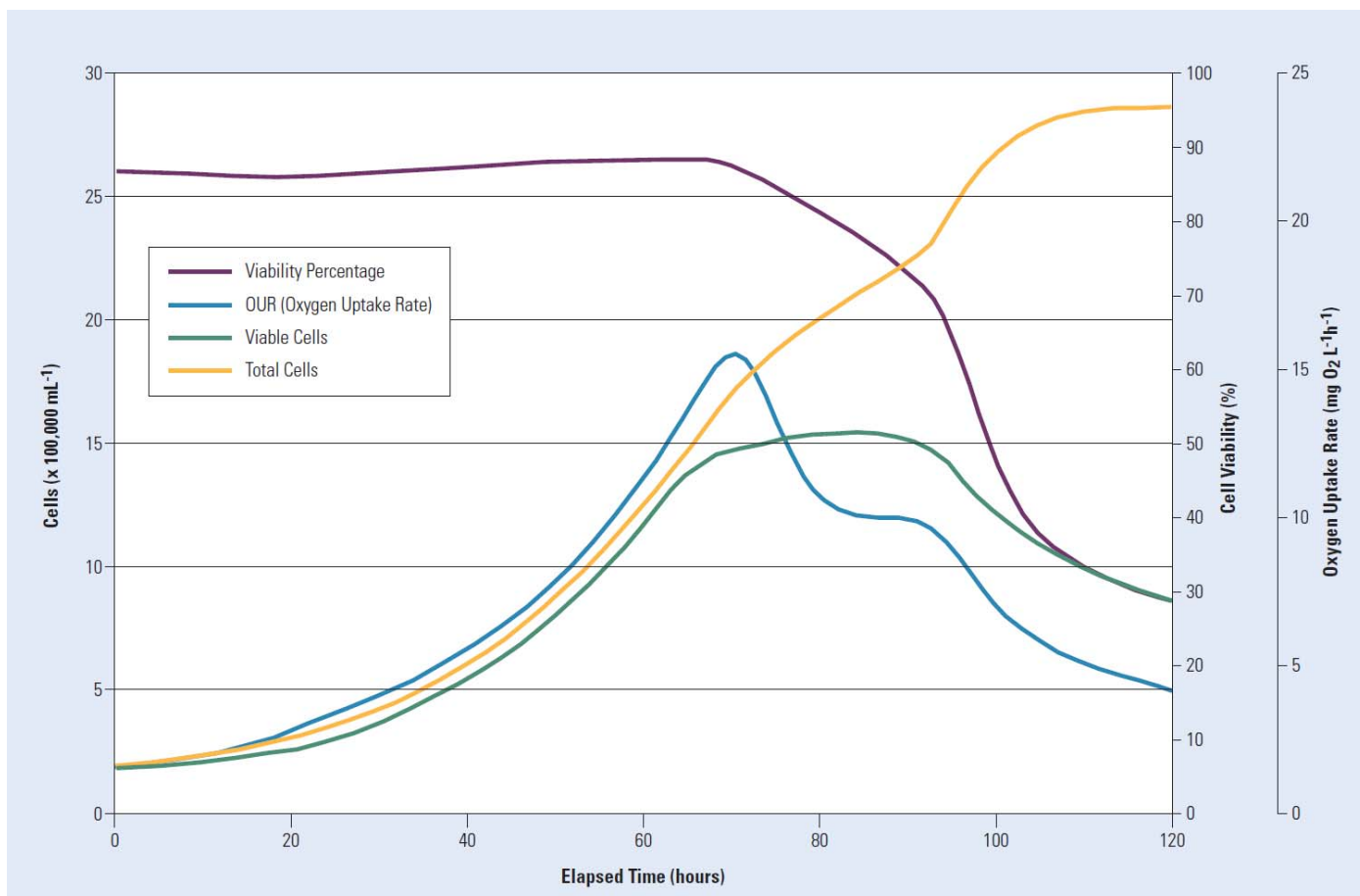
開始を明確に示しています。この場合、問題はグルタミンの減少でした。

酸素量転換率 (kLa) の計算式

$$kLa = \frac{\text{OUR}}{(\text{DO}_2 @ \text{平衡値} - \text{DO}_2 \text{ 測定値})}$$

上記の式はガス状の酸素が液媒質を介して転換される効率を示しています。これは発酵の進行時に攪拌機やスパージャーを設計する際に回転数やスパージガスの流量を設定するために知る重要なパラメーターです。質量分析計が使用されない時、活動的な体系は溶存酸素が DO2 プロブを用いてモニターされる間に酸素レベルは広く変化します。Prima PRO プロセス質量分析計を用いれば、OUR 測定は連続的な kLa の推測が可能になります。酸素量転換はブロス (broth) の密度が変化する様に変わります。そこで微生物学者はパイロットスケールに移る前にこの関係を理解する必要があります。kLa の動特性が理解されれば、通常の軌道からのズレは DO2 プロブのドリフトを検知し補正するのに用いることができます。kLa での変動をモニターすることにより、Prima PRO プロセス質量分析計は攪拌機の回転数やスパージガスの流量、スパージ酸素濃度の制御を容易にします。

Fig.8: Prima PRO プロセス質量分析計による 10L ハイブリドーマ曲



1 台の分析計で 60 基以上の培養槽やバイオリクターをモニター

二酸化炭素放出と細胞の呼吸

出口ガス分析から計算される最も重要な変数は呼吸商 (RQ) です。これは発酵と細胞培養—成長と維持の両方に現れる二つの別々な形の作用です。RQ は二酸化炭素放出率 (CER) 割る酸素摂取率 (OUR) として表されます。Prima PRO プロセス質量分析計は現行の代謝活動を測定し、グルコース供給率 (GFR) を含むある種の変数の閉ループ制御を潜在的に可能にすることに用いられる RQ のタイムリーな推定値を提供できます。

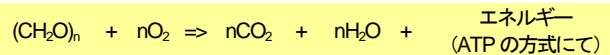
ガス状窒素を固定しない発酵における RQ

$$RQ = \frac{(\text{放出 CO}_2 \times \frac{\text{スパージ N}_2}{\text{放出 N}_2}) - \text{スパージ CO}_2}{\text{スパージ O}_2 - (\text{放出 O}_2 \times \frac{\text{スパージ N}_2}{\text{放出 N}_2})}$$

ガス状窒素を固定した発酵における RQ

$$RQ = \frac{(\text{放出 CO}_2 \times \frac{\text{スパージ Ar}}{\text{放出 Ar}}) - \text{スパージ CO}_2}{\text{スパージ O}_2 - (\text{放出 O}_2 \times \frac{\text{スパージ Ar}}{\text{放出 Ar}})}$$

窒素とアルゴンの比は水蒸気の飽和とバイオリクター放出ガスの希釈によって起こる分圧変化を補正します。例えば、RQ = 1 は成育段階でのエネルギー生成用のグルコースの酸化です。



例えば RQ = 0.7 の場合、菌類の発酵の生産段階でしばしばエネルギーを供給するステアリン酸の酸化に由来します。結果、CO₂ の 18 分子を O₂ の 26 分子で割ることからもたらされます。

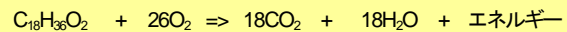


Fig.9 は代謝が脂肪酸炭素源に切り替わった時、発酵中 50 時間での明らかな培養基の消費を示します。もし OUR が十分な活性細胞の密度を示すならば、発酵は続行可能です。さもなければ、成育段階を延長するために自動的なグルコースの添加が開始されます。

Fig.10 は Prima PRO プロセス質量分析計により得られる RQ 予測値が原料供給バッチ発酵槽で活性細胞を最大にするためグルコース添加のトリガーに用いられた場合の結果を示しています。

Fig.9 : 200L 菌類発酵の RQ 曲線

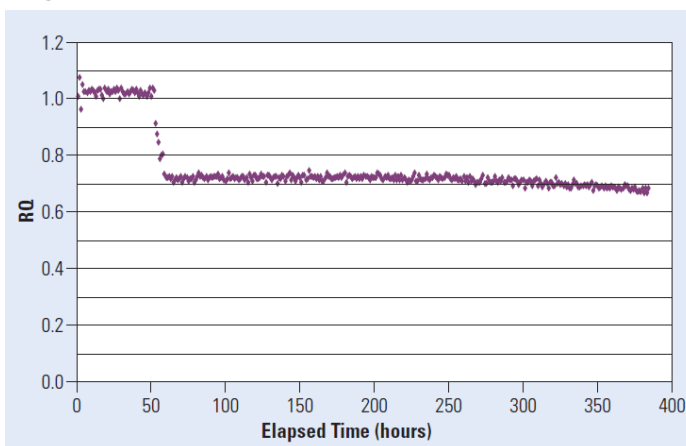
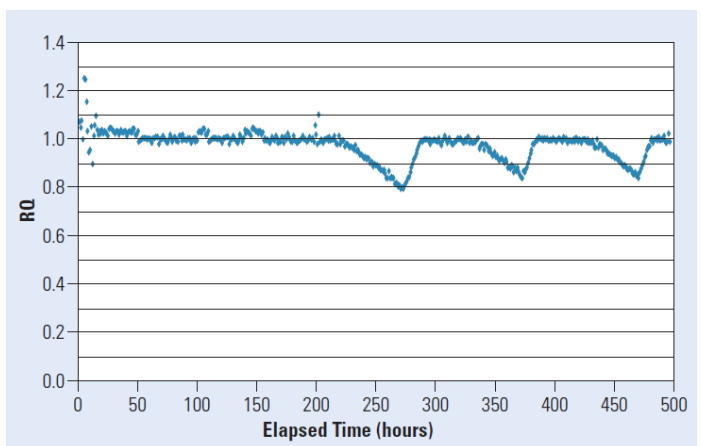


Fig. 10 : Prima PRO プロセス質量分析計によって得られた 200 L 原材料バッチ発酵槽での RQ 曲線



Delivering Value during Every Stage of Product Development

The complex manufacturing processes that are inherent in biotechnology require advanced instrumentation to ensure an optimal path to the final product. Mitigating risk throughout these processes is the key to increasing profits. The Prima PRO process mass spectrometer offers the speed and precision necessary to reliably track process dynamics, enabling timely corrective action to be taken. From research and development to creation of the final product, the Prima PRO process mass spectrometer helps bring products to market faster, increase yields and enhance profits for a rapid return on investment.



Process Mass Spectrometry in Biotechnology

お問い合わせ先



八洲貿易株式会社
Yashima Export & Import Co., Ltd.

第一事業本部 第一営業グループ

〒107-8484 東京都港区赤坂 3-9-1

TEL : 03-3588-6371 FAX : 03-3588-6312

URL : <http://www.ybk.co.jp>

© 2010 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Results may vary under different operating conditions. Specifications, terms and pricing are subject to change.
Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details. Literature Code: PI.2076.0710

14 Gormley Industrial Avenue, Unit 14
Gormley, Ontario L0H 1G0 CANADA

+1 (905) 888-8808
+1 (905) 888-8828 fax

Unit 702-715, 7/F Tower West
Yonghe Plaza No. 28, Andingmen East Street
Beijing 100007 CHINA

+86 (10) 8419-3588
+86 (10) 8419-3580 fax

A-101, ICC Trade Tower, Senapati Bapat Road
Pune 411016 Maharashtra INDIA

+91 (20) 6626 7000
+91 (20) 6626 7001 fax

Ion Path, Road Three, Winsford
Cheshire CW7 3GA UNITED KINGDOM

+44 (0) 1606 548700
+44 (0) 1606 548711 fax

Process Instruments

1410 Gillingham Lane
Sugar Land, TX 77478 USA

+1 (800) 437-7979
+1 (713) 272-0404
+1 (713) 272-4573 fax

www.thermoscientific.com/primapro

Thermo
SCIENTIFIC