

培養医薬生産設備の動向

村上 聖^{1*}・渋谷 啓介²

抗体医薬に代表されるバイオリジクス（医薬タンパク質）の市場は大きく成長しており、需要の高まりとともに世界中で抗体医薬製造プラントのような大規模な生産プラント建設が続いてきた。そのような中、バイオリジクスの生産設備においてもレギュレーション、生産性向上、環境問題などの観点から設備の設計に変化が見られるようになってきており、これらの動向ならびに生産性向上について述べる。

レギュレーション・基準の動向

医薬品の品質保証の大きな流れである QbD (Quality by Design) が低分子医薬品だけでなく、製造プロセスや生産物分子構造の複雑なバイオ医薬品にも適用が進められてきている。この QbD のバイオ医薬への応用を進展させるため、2008 年 8 月 Abbott, Amgen, Eli Lilly & Company, Genentech, GlaxoSmithKline, MedImmune および Pfizer の代表者が集まり CMC-Biotech Working Group を結成し、下記を目的としたケーススタディーを行うことになったり。

- ・産業界および当局における指導、学習に貢献する包括的なバイオテクノロジーケーススタディーを作製する
- ・ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) のガイドライン Q8 (R2), Q9, および Q10 に記載された原薬・製剤におけるより高度なプロセス原理とその実現の見通しを例示する
- ・あらかじめ蓄積された知識がいかにプロセスの理解の促進に適用できるかの概念を示す
- ・プロセス開発と商用化における継続的改善を達成するための効果的な技法を可能にする
- ・議論を活性化し、新しい概念を進展させるために現在の考え方を刺激、挑戦する
- ・科学・リスクベースのレギュレーション手法、ならびに最近の ICH ガイドラインの産業界における広範な応用を推進する先進概念の機会を評価する

最終的にこのケーススタディー結果は CASSS (An International Separation Science Society) と ISPE (International Society for Pharmaceutical Engineering) によりパブリックドメインとして 2009 年 10 月公開された。

ASME BPE はバイオ、無菌医薬品製造で要求される高レベルの無菌・洗浄性について、材料、設計、製作、

試験、検査ならびに認証の方法を規定している²⁾。2年ごとに改定され、最新のシステム、設備技術を反映したバイオ医薬製造設備の設計、建設、運転を可能とするものである。近年の改定内容の動向としては、多目的製造設備に適した標準化・互換性向上、高収率追求のための新規構造・材質（合金、熱可塑性樹脂、エラストマー）、ディスプレイ機器の仕様・品質要求の標準化などが挙げられる。2012 年版での検討課題として、溶接変色の許容値基準、圧力容器規格との整合性、合金成分・品質基準、バルブシール、メカニカルシール、ドキュメンテーション基準、計測器構造、CIP 用スプレーデバイス、ASME BPE 認証基準などが議論されている。

FDA では医薬品・医療機器開発への科学的手法の適用促進を目的とした Critical Path Initiative というプログラムを推進しており、そのひとつに CFD/Blood Damage Project がある。これは人工心臓における赤血球ダメージを CFD で予測、実験値との比較により評価するため、Round Robin 方式と呼ばれる複数団体の参加協力により計算結果の集約、評価を行うもので当社も参加している。最終的には FDA が医療器具を承認する際に CFD を適正に用いるためのガイドライン作成を目的としている。この結果の一部は FDA により American Society for Artificial Internal Organs で発表された³⁾。図 1 に示す各点はレーザー粒子流速測定による実測値、各線は各参加者から提出された CFD 計算結果である。同図に示すように一部の参

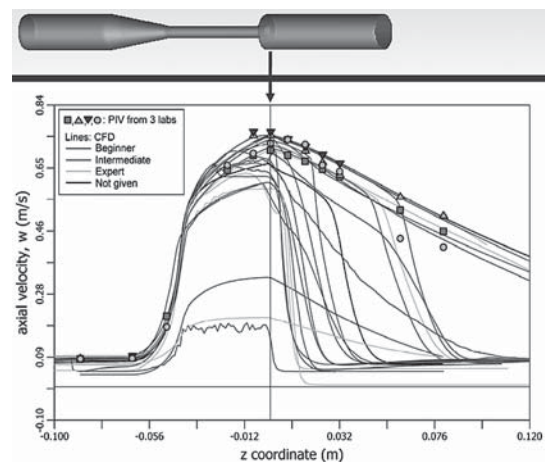


図 1. 流速分布の CFD と実験値の比較³⁾

* 著者紹介 ¹(株)日立プラントテクノロジー産業プラントシステム事業本部 (理事・副事業部長) E-mail: sei.murakami.dg@hitachi-pt.com
²(株)日立製作所日立研究所

加者では実験値と計算値で良い一致を示した一方、大きく異なる例もあり、乱流モデル、メッシュ、境界条件、その他の条件設定が計算精度に大きく影響することが考えられた。これらの影響を排除して計算者の経験、レベルによらず共通して計算精度を向上させるための検討が現在進められている。培養槽と人工心臓とは直接関係はしないが、医薬品生産に用いられる動物細胞と赤血球は共に脂質二重膜の細胞膜組成であり、今後細胞培養における細胞ダメージをCFDで評価するにあたって、本プロジェクトで得られた知見が活用できると考えられる。

生産性向上

抗体医薬に代表される拮抗薬は作用薬に比較して大量の投与を必要とする。一方低分子医薬品に比べてバイオ医薬品の生産コストはどうしても高くなるため、医療費抑制、患者負担軽減のためバイオ医薬品の生産コスト低減、生産性の更なる向上が強く望まれている。バイオ医薬品における生産性は次のように定義することができる。

$$\text{生産性} = \frac{\text{産出量}}{\text{投入量}} = \frac{\text{タンパク質生産量}}{\text{原料費} + \text{用役費} + \text{労務費} + \text{設備減価償却費}}$$

培養、精製それぞれの工程における生産性向上のためには生産量増加と共に、原料費、用役費、労務費、設備費の中で多くを占めるものに注目してプロセスを改良する必要がある。装置内の生産物濃度を上げることが一般的な生産性向上策であるが、培地などの原料費がコストの多くを占める場合には原料費あたりの生産量についても注目する必要がある。

培養工程

1) 培養環境の細胞代謝への影響 培養環境が製品の同等性/同質性ならびに生産性にどのような影響を及ぼすかを把握するには、実験による知見の蓄積に加えて、生産細胞の代謝の特徴をメカニズムとして把握しておくことが重要である。細胞代謝の知識は、遺伝子組換えによるタンパク質高生産細胞株の樹立^{2,3)}をはじめタンパク質生産に広く利用されている。

細胞代謝は培養環境の影響を受けやすく、培養プロセスが適切に維持されないと目的タンパク質の生産性および品質に影響を与える可能性がある。細胞代謝に影響を与える環境因子として、グルコース、グルタミンといった栄養基質、剪断応力、溶存酸素、溶存二酸化炭素が挙げられる。これら環境因子が及ぼす細胞代謝への影響については多数報告されている。

a) 栄養基質 グルコース、グルタミンといった栄養成分濃度の細胞代謝への影響は、Wongらによって報告されており、インターフェロン- γ (INF- γ) を産生するCHO細胞ではグルタミン濃度、グルコース濃度の違

いにより糖鎖付加のパターンが異なる⁴⁾。

b) 剪断応力 剪断応力の影響に関しては、ヒト成長ホルモン (hGH) を産生するCHO細胞で調べられており、剪断応力が強くなると細胞の酸素消費速度が高くなり、グルコースに対する乳酸比が低下するため非効率なエネルギー代謝をとる。また生産物であるhGHの産生も低下することが報告されている⁵⁾。

c) 溶存酸素 溶存酸素の影響に関しては、Kunkelらがモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞の培養で、溶存酸素濃度を低くすると解糖系フラックスが上昇しTCAサイクルのフラックスが低くなり、糖鎖付加の割合が減少することを報告している⁶⁾。

d) 溶存二酸化炭素 溶存二酸化炭素の影響については、Drapeauらは2500 l規模で行ったCHO細胞の培養において、溶存二酸化炭素が53から165 mmHgに増加すると増殖速度が52%、組換えタンパク質の生産速度が56%に低下すると報告した⁷⁾。Grayらも同様に、CHO細胞の灌流培養で溶存二酸化炭素が36から148 mmHgに増加することにより、細胞密度およびウイルス抗体を生産するCHO細胞の比生産速度がそれぞれ33%および44%低下すると報告している⁸⁾。筆者らの実験によるCHO細胞での溶存二酸化炭素の細胞代謝に及ぼす影響を図2に示す。溶存二酸化炭素濃度が高くなるとグルコース増殖収率、グルタミン増殖収率は共に低くなり、栄養基質に対する増殖が抑えられているため、非効率なエネルギー代謝になることがわかる。

2) 細胞代謝フラックス解析 培養プロセスの環境因子を適正に管理することは生産性および品質管理の上で重要であるが、細胞株ごとに環境因子の感受性も異なるため、個々に細胞代謝への影響を調べる必要がある。

細胞代謝への影響を調べる方法の一つとして細胞内の代謝の流れ(フラックス)を解析する方法がある。環境因子により変化する細胞内の代謝を定量するためには高

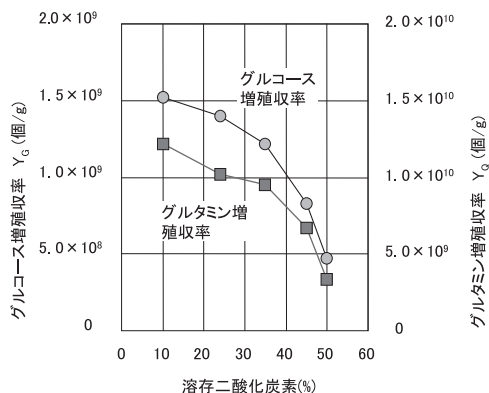


図2. CHO細胞のグルコース収率とグルタミン収率に及ぼす溶存二酸化炭素の影響

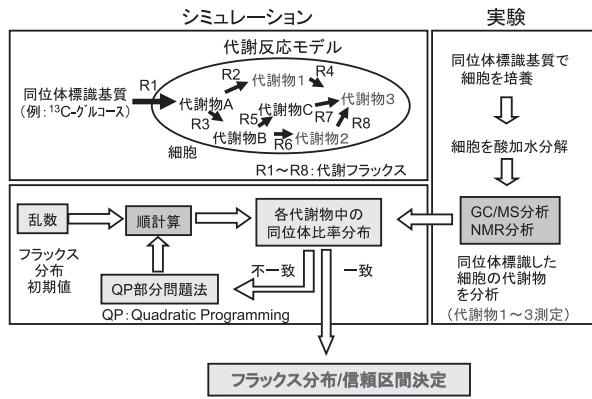


図3. 同位体標識基質を用いた代謝フラックス解析

精度で解析する必要があり、そのために同位体標識基質を用いた代謝フラックス解析が開発されている^{9,10)}。この解析方法は実験と計算シミュレーションを組み合わせた方法であり、その概要を図3に示す。¹³C標識されたグルコースなどの基質を代謝させ、細胞内に蓄積した代謝物質（アミノ酸など）の同位体炭素数比をガスクロマトグラフ-質量分析（GC-MS）や核磁気共鳴（NMR）を用いて分析する。一方、シミュレーションでは、測定する細胞における代謝反応モデルより、定常状態（各代謝成分について生成フラックスと消費フラックスが均衡にある状態）を仮定した各代謝反応の連立方程式を立てておき、細胞内代謝フラックスの値を与えることで細胞内代謝物質の同位体炭素数比を計算することができる。最初にランダムな代謝フラックスの値（図3中R1からR8）を与え、代謝反応モデルを基に、細胞内の各代謝物質に含まれる同位体炭素の数の比を計算する。この計算値と実験で測定した細胞内代謝物質の同位体炭素数比との比較を行い、統計学的に有意に差がない場合、細胞内代謝フラックスの値として決定され、統計学的に有意に差がある場合（異なっている場合）は、平均二乗誤差が最小となるようにシミュレーションによる代謝フラックスの値を修正し、有意差がなくなるまで以上の操作を繰り返す。数学的・統計学的に各代謝フラックスの値について信頼区間を設け、培養環境を変えた際に生じた細胞内代謝フラックス変化が環境因子の影響によるものか、実験誤差によるものか判別する。代謝フラックス解析の手法は、これまで代謝反応が単純な微生物に広く用いられてきたが、近年は複雑な代謝反応を持つ動物細胞にも代謝モデルを単純化した形で適用されており、また高度な代謝モデルを取り入れた代謝解析法の開発も試みられている。

細胞内代謝フラックス解析では代謝に関与する主要な経路を網羅的に解析するため、従来のように細胞の生存

率、増殖速度、酸素消費あるいは細胞外代謝物などの細胞の状態の一面を測定する方法に比べ、環境因子による影響を代謝モデルの範囲内で漏れなく解析することができる。このため環境因子の最適化においては単に生産性向上だけでなく、それに付随する副生成物の増減に関しても最適化することが可能である。栄養成分の検討といった上記適用例の他、剪断応力、溶存酸素、溶存二酸化炭素などの環境因子の最適化に関しても適用可能である。

3) 流加培養 培養工程における生産性は下記のように定義できる。

$$P = \frac{\int_0^{t_c} (Y_{p/x} x - L) dt}{t_c} \quad (1)$$

ここで、 $Y_{p/x}$ ：細胞あたりの生産速度 (g/cell/h)、 x ：細胞密度 (cells/ml)、 L ：分解・変性などによるタンパク質のロス (g/ml/h)、 t_c ：1バッチあたりのサイクルタイム (h)

したがって培養工程における生産性向上のためには、宿主・プロモータの改良による細胞あたりの生産性 ($Y_{p/x}$) の向上、培地、培養方法の改良による細胞活性 ($Y_{p/x}$)、細胞密度 (x) の向上が必要である。この培養方法の改良として栄養成分を培養中に加えていく流加培養がある。

培養細胞は、培地中の栄養成分を消費してアンモニアや乳酸などの細胞の増殖を阻害する老廃物を代謝する。図4に示すように、抗フィブロネクチン免疫グロブリンG抗体 (immunoglobulin G, IgG) を産生するマウスハイブリドーマ細胞CRL-1606の培養において、培養液中のアンモニア濃度が2 mM以上で見かけの比増殖速度 μ ($= \mu_m - k_d$) は減少し、5.4 mM以上では細胞の死滅が増殖速度を上回る。回分培養における生細胞数 x_v 、死細胞数 x_D および総細胞数 x_T の経時変化を図5に示す。これらの老廃物の代謝を低く抑えるためには、グルコース、グルタミンなどの基質濃度を低く維持する流加培養が有効である。

XieとWangらは上記CRL-1606を用いた流加培養で流加培地の組成を細胞の増殖によって消費される栄養濃度の比率で化学量論的な設計を行い、グルタミン濃度を

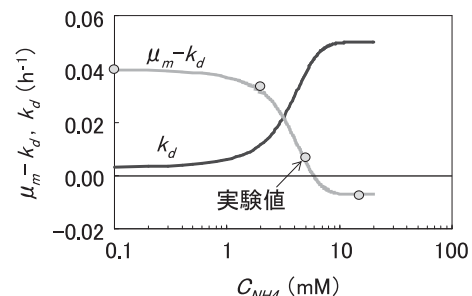


図4. CRL-1606細胞におけるアンモニア濃度の増殖阻害

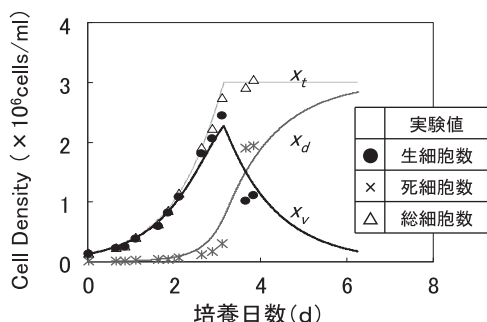


図5. 回分培養によるアンモニア阻害. 点, 実験値; 線, シミュレーション結果.

1 mM以下に低く制御することで抗体生産性を向上した¹¹⁾.

4) 還流培養, 生産物濃縮 流加培養が培養中に培地を供給して培養液量を次第に増加させていくのに対し, 細胞を残しながら培養液のみを抜き出して培養液量を一定に保つ方法が灌流培養である. この方法によれば老廃物を連続的に除去できるため培養槽内の細胞密度, タンパク質生産速度がさらに向上する. しかしながら灌流培養では老廃物と共に生産物も連続的に抜き出すため生産物濃度が低く, 培地コスト, 精製コストが割高になるというデメリットがあった. そのため生産物と老廃物の分子量差を利用して生産物は培養槽内に残す方法も開発されている^{12,13)}. この方法により 10 g/l を超える抗体濃度も報告されるようになってきた. ただしこれは培養槽内のみ注目した局所的な抗体濃度であり, 消費培地全体で見ただけの場合に培地あたりの生産量が向上しているのかどうかについて十分注意する必要がある. 培養槽が小さくなくても, 培養生産コストの多くを占める培地の全消費量あたりの生産性向上とならない場合もある. 次式のように消費培地あたりの生産量 ($Y_{p/s}$) の評価が必要である.

$$Y_{p/s} = \frac{\int_0^{t_c} (Y_{p/x} x - L) dt}{1 + \int_0^{t_c} D dt} \quad (2)$$

ここで, $Y_{p/s}$: 培地あたりのタンパク質生産量 (g/ml), D : 灌流率 (h^{-1})

5) スケールアップ 動物細胞培養のスケールアップは微生物培養と異なり, 培養環境が及ぼす影響のため多くの困難を伴う. これらの問題を回避し, スケールアップ後も生産性を維持するためには生産プラントにおいて実験室レベルと同じ環境を維持するか, あらかじめ大量生産時の環境を把握した上でのプロセス開発が必要になる.

動物細胞培養槽の運転においては槽内のガス交換, 流体ダメージ, 混合 (培地中の栄養基質の均一性や pH 調整剤添加濃度分布に影響), および発泡をそれぞれ適正

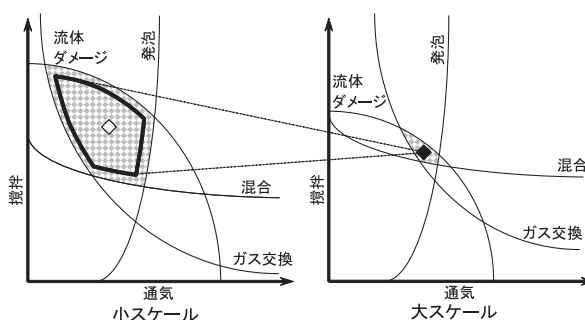


図6. スケールアップウィンドウ. □, 培養可能領域; ◇, 小スケールでの最適運転条件; ◆, 大スケールでの最適運転条件.

範囲内に収める必要がある. 図6に示すように, ガス交換, 流体ダメージ, 混合, および発泡のそれぞれについて許容限界線を引いた運転可能範囲 (スケールアップウィンドウ) は相似形スケールアップと共に幾何学的に小さくなっていく¹⁴⁾. バイオ医薬品の大量生産のためには, このスケールアップウィンドウをできるだけ広く取れるような設計が重要となる. そのためには相似形に依存した実験式だけでなく, 任意の形状, 運転条件で最適化し, 培養可能範囲を広げる必要がある.

培養生産設備の動向について紹介したが, これからも QbD による各工程のプロセスパラメータと品質特性の関係解明がさらに進み, 部分的な改良にとどまらない包括的な品質・生産性向上が図られ, 患者の QOL, 経済負担軽減に貢献していくことが期待される.

文献

- 1) A-Mab: a Case Study in Bioprocess Development, CMC Biotech Working Group (2009).
- 2) ASME BPE-2009, the American Society of Mechanical Engineers (2009).
- 3) Malinauskas, R. et al.: *ASAIO-IFAO Annual Conference* (2009).
- 4) Chee Fung Wong, D. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **89**, 164 (2005).
- 5) Keane, J. T. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **81**, 211 (2003).
- 6) Kunkel, J. P. et al.: *J. Biotechnol.*, **62**, 55 (1998).
- 7) Drapeau, D. et al.: *Annual Meeting of the Society of Industrial Microbiology* (1990).
- 8) Gray, D. R. S. et al.: *Cytotechnology*, **22**, 65 (1996).
- 9) Antoniewicz, M. R. et al.: *Metab. Eng.*, **8**, 324 (2006).
- 10) Antoniewicz, M. R. et al.: *Metab. Eng.*, **9**, 68 (2007).
- 11) Xie, L. and Wang, D. I. C.: *Cytotechnology*, **15**, 17 (1994).
- 12) 特開昭62-269694
- 13) 特表2009-543565
- 14) 村上 聖, 難波 勝: 化学工学会第40回秋季大会講演要旨集, B316 (2008).