

分科会2, 培養工程連続化の現状と課題

村上 聖

培養工程の連続化のほとんどは灌流培養と呼ばれる方式で行われてきたが, 近年までは不安定な生産物を除き, 実生産で広く普及することはなかった. しかしながら, ここ数年の間に各種方法の研究や製品化が進展している. 本稿では現在行われている各培養方法の比較と, 正しく効果を評価するための課題, 今後の開発の方向について述べる.

各種培養方式

培養工程の連続化に関する各種培養方式を図1に示す. これらの特徴を以下に説明する.

回分培養 (Batch Culture) 培養開始時に必要な栄

養成分をすべて培地中に入れておく方法で, 小スケールではもっとも一般的に行われる培養方法であり, 設備ももっとも簡単である. しかしながら, 培養初期に糖やグルタミンの栄養成分濃度が高すぎるため, 乳酸やアンモニアの過剰産生を誘発し, 細胞の増殖が阻害される場合が多い. そのため培養可能期間も数日と短く, 生産性が低いという問題がある.

流加培養 (Fed-Batch Culture) 栄養成分を培養中に加えて行く方法を流加培養という. 培養初期の糖やグルタミンの濃度を低く抑えることができ, 乳酸やアンモニアの有害成分の過剰蓄積, 細胞増殖阻害を防止できる. 培地成分をもっとも有効に使い尽くす方法であるとともに, 装置もあまり複雑にならないため, 現在もっとも多くの生産培養で用いられている.

ケモスタット (Chemostat) 培養槽へ連続的に新鮮培地を供給し, 同時に同じ量の培養液を細胞ごと系外に排出して槽内の液体積を常に一定に保つ方法である. 流量制御以外に特別な装置を追加することなく細胞濃度, 基質濃度, 代謝産物濃度, 老廃物濃度などを一定に維持できる. 培地交換速度(培地投入流量/培養槽容量)は細胞希釈速度でもあり, その値が最大比増殖速度より大きい場合は細胞は希釈されて消滅する(Wash Out). 一方, 最大比増殖速度以下の場合, 希釈速度と比増殖速度が等しくなるところで一定になるが, このときの細胞密度はあまり高くない.

灌流培養 (Perfusion Culture) 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, 培地を供給するとともに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. この方法によれば栄養成分濃度, 老廃物濃度を一定に維持しながら細胞密度を高くすることができるため, 培養槽容量当たりのタンパク質生産速度が向上する. しかしながら, 灌流培養では老廃物とともに培地成分や生産物も連続的に抜き出すため, 培地ロスによるコスト増, 生産物濃度低下による精製コスト増というデメリットがある. 灌流培養に不可欠な細胞分離の方式としては, 半透過膜, 重力沈降, 遠心分離, 音響分離などがある. 死細胞の分解による宿主タンパク, 宿主DNA, RNA汚染や分解酵素の漏出による生産物分解を防止するために

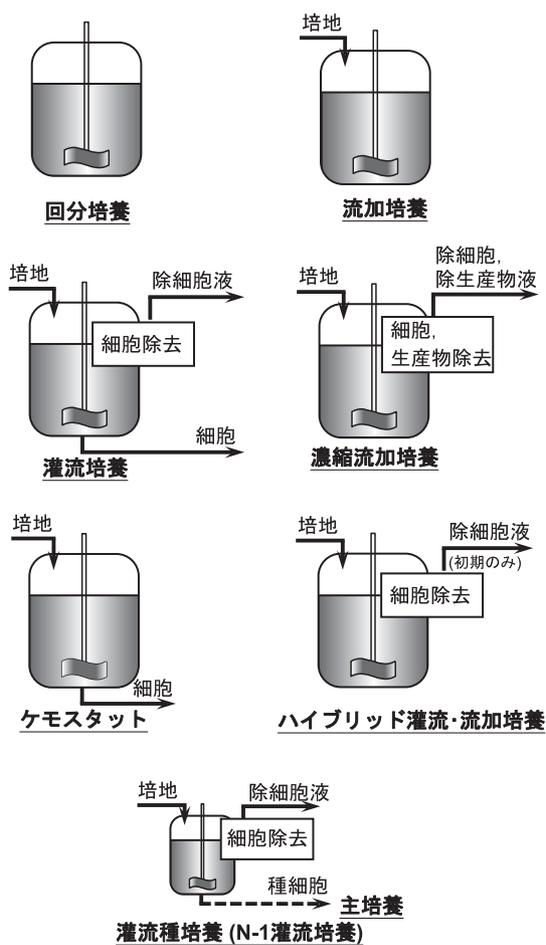


図1. 各種培養方式

は、高細胞密度においても細胞活性を高く維持する必要がある。そのため細胞の一部を抜き出し、細胞密度を一定に保つブリーディングという方法が用いられる^{1,2)}。

濃縮流加培養（Concentrated Fed-Batch Culture）³⁾
前述のように、灌流培養では老廃物とともに生産物も連続的に抜き出すため、培養槽内、抽出液ともに生産物濃度が低く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しながら老廃物を排出する方法が開発されている⁴⁾。ここでいう生産物濃度は培養槽内のみ注目した局所的な濃度である。全消費培地あたりの生産量で見た場合、濃縮による培養槽内抗体濃度の上昇よりも培地消費量の方が上回り、さらに、細胞あたりの抗体生産性（pg/cell/day）も培養環境の悪化により従来の流加培養より低い結果が報告されている⁵⁾。また、濃縮流加培養では、回分、流加、灌流いずれの培養方式よりも産生抗体量あたりの培地コストが高くなるという結果も報告されている⁵⁾。

ハイブリッド灌流・流加培養（Hybrid Perfusion Fed-Batch Culture）⁶⁾ 培養初期に灌流培養を行い、細胞増殖後に流加培養に切り替えることで、未使用培地の排出を削減する方法である。培養後半の流加培養では培地成分が有効に利用されるものの、この方法では従来の流加培養と比較して、抗体収量の向上を上回る培地消費が必要であり、消費培地あたりの生産量は向上していない⁶⁾。

灌流種培養（Perfusion Seed Culture）⁷⁾ N-1灌流培養（N-1 perfusion）とも呼ばれる。生産培養前の種培養（N-1培養）を灌流培養で行い、そこで得られる高密度の種細胞を生産培養槽に移送して流加培養することで、生産培養において短時間で細胞を高密度化し、時間当たりの生産性を向上させるものである。この方法では生産培養において従来の流加培養とほぼ同じ生産物濃度が短期間で得られる一方、比較的大型の種培養槽容積の3～9倍の量の培地を灌流種培養に用いる⁸⁾ため、消費培地あたりの生産量は悪化する。

培養工程連続化の効果

連続化の期待効果 連続培養方法として灌流培養は1980年代から広く知られていた。不安定なタンパク質を生産するためには、細胞から代謝されたタンパク質を、短時間で培養槽から回収し、精製するため灌流培養が唯一の選択肢であったが、抗体などの比較的安定なタンパク質の場合には流加培養でも十分な生産性が得られたため、近年まであまり広く行われてこなかった。しかしながら、バイオ医薬品の品質向上、コスト低下の要請の高まりを受け灌流培養が再度見直されている。

バイオ医薬品における培養工程の連続化により一般的に下記効果が期待されている。しかしながら単に連続化しただけで実現できるわけではなく、効果実現のためには多くの課題解決が必要である。

小型化 [期待] バッチプラントと比較して、装置の設置面積が大幅に減少。[課題] 原料・中間体・製品それぞれにバッチプロセスと連続プロセスの接合部や、生産速度差を吸収するための貯槽が必要になり、設置面積削減は限定的になりがち。生産速度調整や、工程連続化範囲の拡大などによるプラント全体の小型化が必要。

多品種少量生産 [期待] 多品種少量生産にも対応しやすい。[課題] 連続プロセスにおいて、定常状態では系内が安定しているものの、運転開始・停止、品種切替などの非定常状態では品質確保が困難。非定常運転時の品質が逸脱した生産物は廃棄される。非定常状態の最短化、最適化、品質確保や品種混同対策が必要。

開発期間短縮 [期待] スケールアップが不要なため開発期間を短縮できる。[課題] 連続反応の各単位操作において、一定の品質が得られる流量範囲には限界があり、それを超えると同一品質の生産物が得られなくなる。単位操作あたりの流量を変えず、運転時間、装置数を増加する手法（スケールアウト）もあるが、運転時間変更に伴う定常運転時間中の品質変化や、複数装置への分配均一化などの課題がある。これらの対処ができなければ、スケールアップ技術の構築が必要となる。

コスト削減 [期待] 装置の小型化、設置面積縮小、自動化による人件費減などによりコスト削減。[課題] 灌流培養では、細胞維持のため培養槽中に一定濃度の栄養成分が不可欠であるが、生産物を抜き出す際にその培地有効成分も排出してしまい、培地コスト増により、その他のコスト削減効果を相殺。培地コスト低減、培地有効利用などの対策が必要。

上記以外にも、長期間培養による細胞変異、長期間無菌維持、不具合発生時の品質逸脱工程範囲の特定、不純物蓄積、センサー精度変化などの多くの課題がある。

生産性向上

生産性指標 培養工程における生産性として、細胞密度cells/mL、培養槽内生産物濃度g/L、培養槽体積当たり生産速度g/L/day、消費培地量あたり生産量g/Lなど、多種の指標が用いられている。生産性指標において、細胞密度、ならびに培養槽体積当たり生産速度は装置の小型化による設備費低減に関与する。一方、消費培地あたり生産量は原料費に関係するが、一般に回分培養、流加培養と比較して、灌流培養は高濃度の培地有効成分を排

出してしまうため消費培地あたり生産量は低い。

前記はそれぞれ重要な指標ではあるが、各培養方式を評価する際、指標の選択によって優劣が左右されてしまうため、往々にして混乱が生じている。個別指標ではなく、全体としての統一した生産性評価を行うには、生産コストに影響する全要因を網羅する必要がある。バイオ医薬品生産における生産性は下記のように定義することができる⁹⁾。

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

BioPhorum Operations Group (BPOG) が2017年に発表したバイオ医薬生産技術の現状と今後のロードマップ (Biomufacturing Technology Roadmap) においては、培養工程を回分式から連続式にすることにより製造コストは約8%上昇してしまうことが報告されている¹⁰⁾。これは連続化 (灌流培養) によって装置コストが低減しても、培地コストの増加がそれを上回ってしまうためである。この報告における製造コストの計算は上記の生産性の定義の各項目を網羅しており、計算入力値は、現在の欧米バイオ医薬品メーカーにおける代表的な値を用いた結果である。

培地消費削減 原材料費の多くを占める培地消費量あたりのタンパク質生産量は次のように表される。

$$\frac{\text{タンパク質生産量}}{\text{培地消費量}} = \frac{\text{細胞によるタンパク質生産量}}{\text{細胞による培地消費量} + \text{装置からの培地排出量}}$$

上式のそれぞれの項目の改善には以下の課題がある。

- 1) 細胞によるタンパク質生産量増加
ベクター改良, 代謝経路増幅, 品質劣化防止などの開発が進められている¹¹⁾。
- 2) 細胞による培地消費量低減
タンパク質産生以外に用いられる細胞増殖, 活性維持のための栄養成分消費を最小化し, 細胞あたりの培地

消費を低減させる培養方法^{12,13)}が報告されている。

3) 装置からの培地排出量低減

細胞が消費する培地成分以外に、運転方法、装置特有の有効栄養成分の排出が生じる。

培養終了時に細胞活性が低下しても栄養成分を限界まで使い尽くす流加培養に対し、灌流培養では細胞活性を維持できる栄養成分濃度を保つ必要があり、灌流培養または灌流・流加の組み合わせで有効栄養成分漏出量が流加培養を下回るのは原理的に無理がある。

今後培地価格自体の低減が進めば、この問題が占める比率も低減していくことが期待される。灌流培養は生産物の槽内滞留時間短縮による品質向上が期待できるので、品質と生産性のバランスにより方式を選択する必要がある。

技術研究組合での連続生産取組

次世代バイオ医薬品製造技術研究組合 (Manufacturing Technology Association of Biologics : MAB) においては平成29年度まで動物細胞を用いたバイオ医薬品生産におけるさまざまな研究開発を行ってきた。これらの研究の一部は、経済産業省の「平成25年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発 (国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術)」及び「平成26年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術)」, 及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の課題番号 (JP17ac0101003) の支援によって行われた¹¹⁾。

平成30年度からは、AMEDの同事業の支援を受け、「バイオ医薬品の高度製造技術の開発」を開始した。

(課題番号 JP18ac0101056, JP18ac0101057) 「バイオ医薬品連続生産における各要素技術及びプラットフォーム技術の開発」では、図2に示すようなバイオ医薬品の連続生産プロセスにおける各要素技術、ならびに

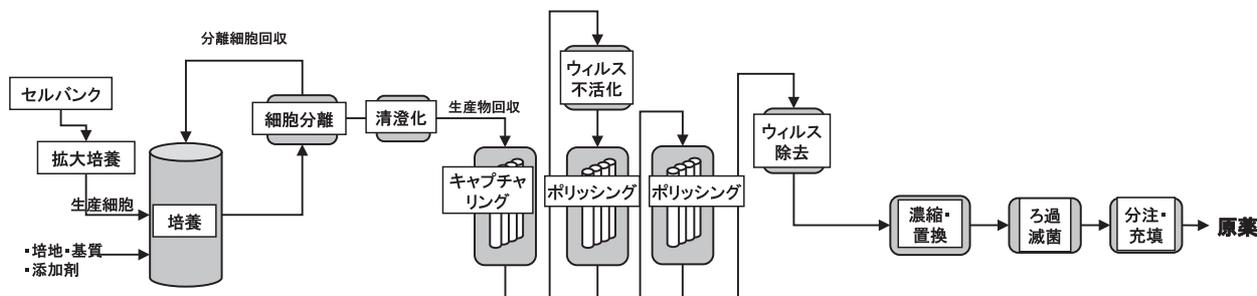


図2. 連続生産プロセスイメージ

プロセスの開発を目指す。培養工程においては、高効率化と経済性を両立する灌流培養システムを構築する。また、長期に品質変化が少なく、安定した抗体などを生産可能な培養プロセス、ならびに、後段の精製工程への負荷を低減可能で、かつ、フレキシブルにスケール変更が可能な培養技術の開発を行う。

（課題番号JP18ae0101058）「バイオ医薬品製造技術の実証研究」では連続生産プロセスの構築および製造実証を行い、品質リスク、生産性、経済性をベースとした評価指標の設定により連続生産プロセスの成立性評価を行う。加えて、データ解析基盤となるインフラを整備し、製造実証データを多角的視点で網羅的に解析し、連続生産プロセスにおける新規知見の探索を試み、連続生産プロセス技術基盤の一助とする予定である。

文 献

- 1) Bielser, J. M. *et al.*: *Biotechnol. Adv.*, **36**, 1328 (2018).
- 2) 村上 聖ら：特許第2107354号 (1996).
- 3) Yang, W. C. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **217**, 1 (2016).
- 4) ジールストラ, ヘルベン, メールら：特許第5092129号 (2012).
- 5) Xu, S. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **33**, 867 (2017).
- 6) Hiller, G. W. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **114**, 1438 (2017).
- 7) ヤン, ウイリアム, シーら：特表2017-500017 (2017)
- 8) Yang, W. C. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **30**, 616 (2014).
- 9) 村上 聖ら：生物工学, **89**, 295 (2011).
- 10) BPOG, *Bio manufacturing Technology Roadmap, Overview*, p. 44 (2017).
- 11) 次世代バイオ医薬品製造技術研究組合：「国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術」研究成果報告会 (2018.6.1)
- 12) Du, Z. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **112**, 141 (2015).
- 13) Wolf, M. K. F. *et al.*: *Biotechnol. J.*, **14**, 1700722 (2018).