

インライン vs オフライン

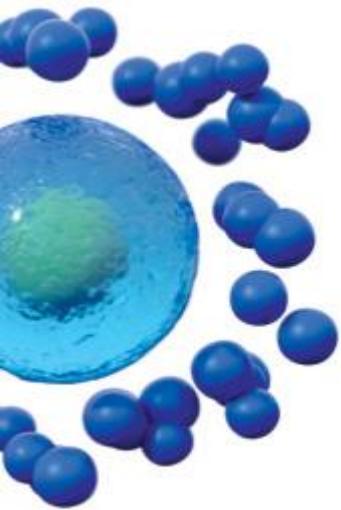
細胞培養モニタリングにおける
誘電率測定と生細胞数の比較

日本語訳：

 T&C Technical

細胞培養は複雑で手間のかかるプロセスであり、成功させるためには多くの重要なプロセスパラメータをバランスよく調整し、細胞の最適な成長、維持、および目標とする産物の生産に理想的な条件を維持することが必要です。生存細胞密度 (Viable Cell Density, VCD) は、重要なプロセスパラメータが培養の運用パフォーマンスに与える影響を示す主要な性能指標 (Key Performance Indicator, KPI) です。

VCD の動向は、製品の品質や収量に直接関連していることが多く、VCD の指標は、最適な培養力価または生産性を確保するために、シードの移送、植種、栄養補給、培養物の収穫などの特定のプロセスアクションのタイミングを決定するために一般的に使用されます。FDA が主導するプロセス分析技術 (Process Analytic Technologies, PAT) の改善の必要性に従い、従来のオフラインでの VCD 測定は、連続インライン測定技術によって徐々に置き換えられつつあります。



VCD の測定は、これまで主にオフラインで行われてきました。この方法では、細胞染色技術と画像解析またはフローサイトメトリーを組み合わせて、代表的な採取サンプル内の生細胞の濃度を定量化していました。最も古く、そして一般的に使用されているオフライン VCD 測定技術は、トリパンブルー染色法です。トリパンブルー染色法は、膜排除染色と画像ベース

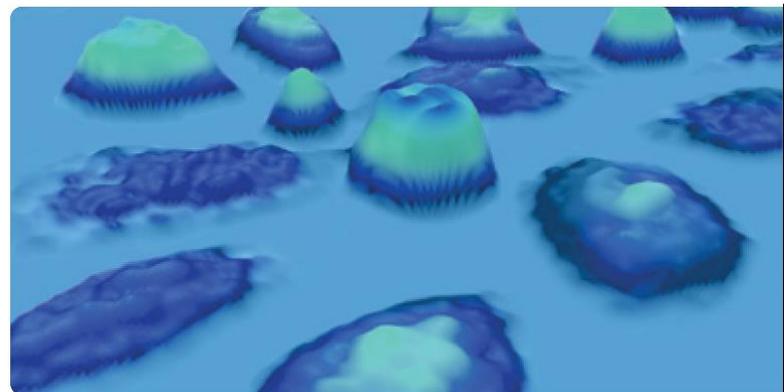
の手法を組み合わせ、生細胞と染色された死細胞の数をカウントします。その方法のシンプルさと定量化戦略の明確さから、トリパンブルーは VCD 測定における複雑さの少ない方法として広く利用されています。しかし、トリパンブルーは他のオフライン測定技術と同様に、FDA プロセス分析技術 (PAT) ガイドラインの完全な実施を妨げるいくつかの制約があります。それには労力を必要とする手動作業、サンプリングの頻度の制限、そしてサンプリングが培養の無菌性に与える影響が含まれます。

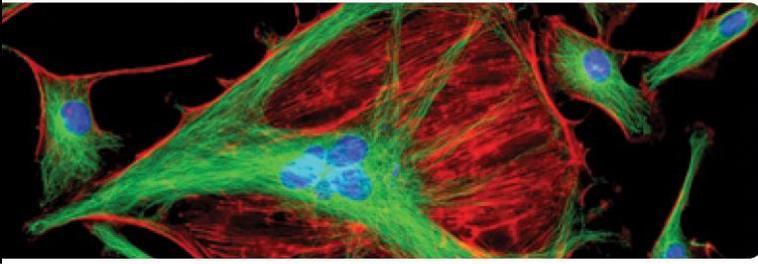
オフライン サンプリング方法の使用を最小限に抑えるために、リアルタイムにプロセス中の VCD を測定するインライン技術が使用されています。これらの技術は、培養の無菌性を維持しながら、手動による介入

を減らしつつ、より多くのデータを提供します。現在、リアルタイムインライン VCD 定量化用の複数のインラインセンサー技術が存在し、それぞれ測定原理と生成されるデータが異なります。

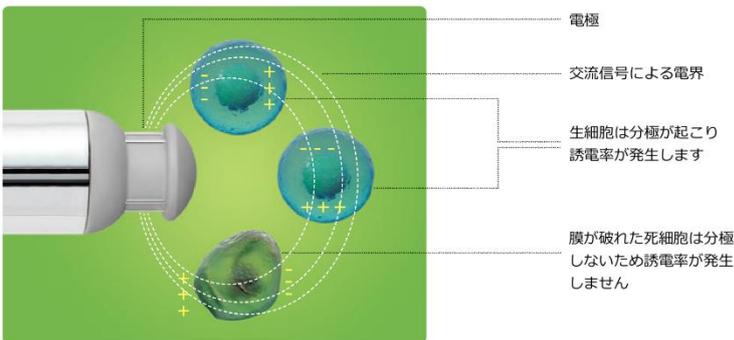
インライン測定技術の例としては以下があります：

Ovizio Imaging System などのイメージング技術は、3D デジタルホログラフィック顕微鏡を使用して、細胞を通過する光の位相変化を介して VCD を定量化します。この技術は、オフライン イメージング手法と比較して、化学ラベルを使用せずに生存細胞を判定できる利点があり、化学マーカーの有効性に頼ることなく細胞の代謝状態に関する追加情報を提供することができます (Pais, Galvão, et al. 2020)。デジタルホログラフィック顕微鏡は、データの配信と解釈に高度なアルゴリズムが必要であるという制限があります。





インサイチュ分光法であるラマン分光法や蛍光分光法などでは、プロセス中でのレーザー励起を利用して、VCDの定量を推定するとともに、培養中の化学組成に関する重要な情報を取得します (Abu-Absi et al. 2011; Pais et al. 2019)。重要なプロセス内データを提供する一方で、分光法技術はキャリブレーションとトレーニングデータセットに依存するという問題を抱えており、実用的なデータセットを生成するには厳密な分析が必要です。



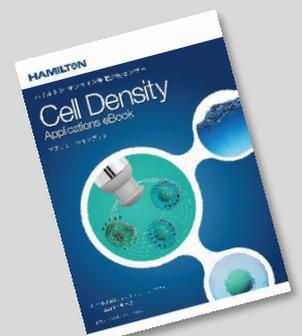
バイオキャパシタンスセンサーは誘電分光法の原理に基づいており、培養物内の生細胞の分極から得られる電荷の蓄積、つまりキャパシタンスを測定します。細胞に適用されると、この電荷の蓄積はバイオキャパシタンスとしても知られています。培養物内の細胞の誘電率の測定値は、全体的な生細胞濃度の推定に使用されますが、誘電場内の周波数依存の細胞応答は、細胞の生理学的変化による細胞特有の変化を捉えることができます。これにより細胞の生物量（バイオボリューム）の変化を追跡することができます。バイオボリュームは、生細胞濃度や細胞数とは異なり、生細胞の総体積を指します。つまり、同じ数の小さな細胞よりも大きな細胞が信号の中で相対的に大きな部分を占めます。測定原理とデータ出力は単純ですが、バイオキャパシタンスは生細胞のバイオボリュームを直接

測定します。細胞数が目的の出力である場合、細胞形状を考慮するために、既知の VCD 参照と相関させることができます。各インラインセンサー技術には複雑さと生成されるデータに関して明確な利点と欠点があるため、プロセスに最適な技術を選ぶことが難しい場合があります。次のセクションでは、容易に実装 VCD 測定技術としてバイオキャパシタンスを利用するケースを示し、他の測定ツールと組み合わせる場合と組み合わせない場合の両方について説明します。また、バイオキャパシタンスから得られる VCD 測定値がオフライン測定から得られる VCD 値と異なる理由についても説明します。測定結果が異なる場合、同じ培養の異なる側面を測定しているためであることを理解する必要があります。これについては、次のセクションで詳しく説明します。

誘電率に基づく生細胞密度 (VCD) による細胞培養モニタリング

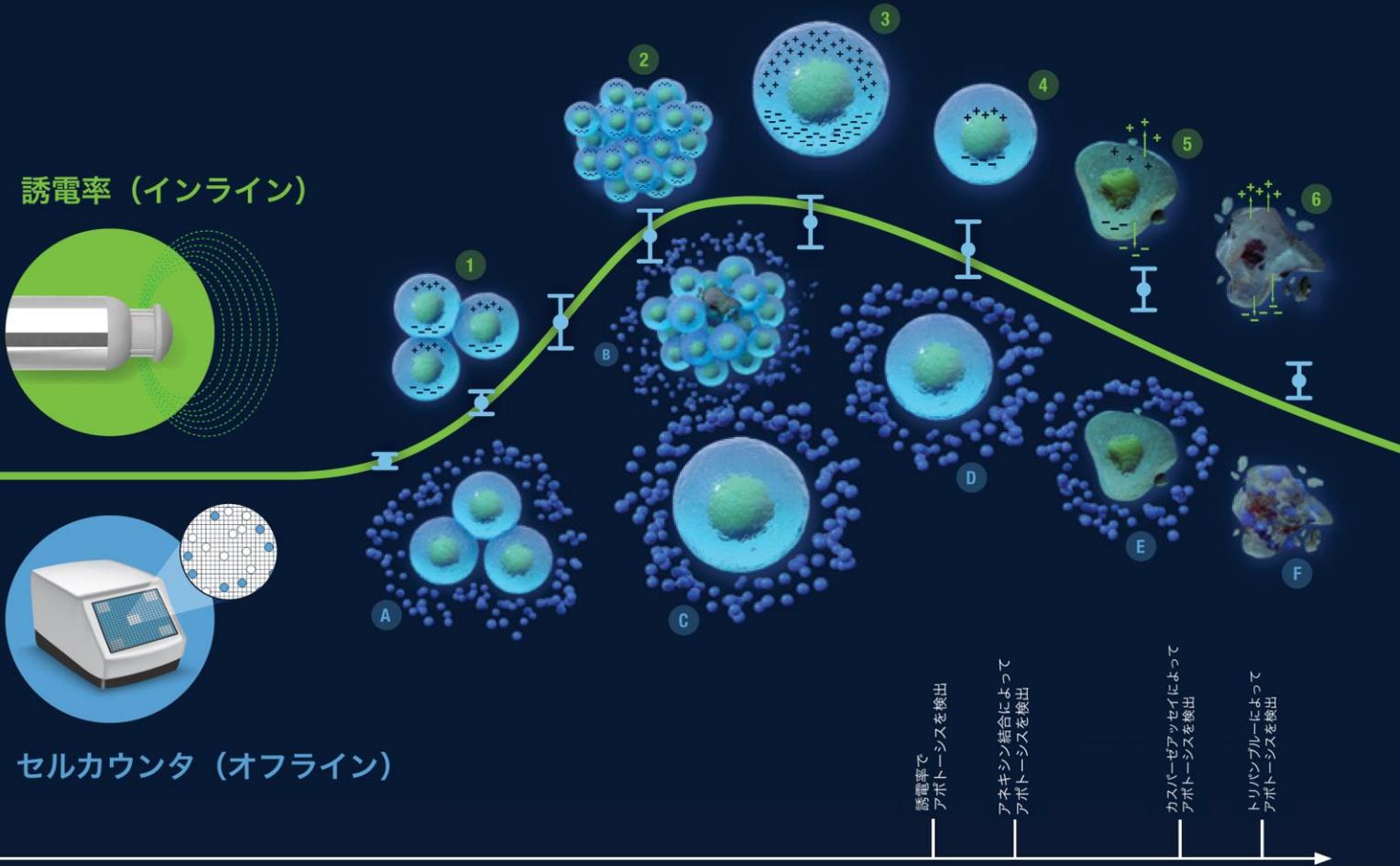
インライン誘電率センサーは、細胞培養内に実装することが一般的に簡単です。測定技術は、プロセスキャリブレーションやトレーニングデータセットを必要としません。測定は、たとえば培地の成分の変化などの影響を受けず、通常、VCD 測定を生成するために最小限のデータ処理や複雑なモデリングが必要です。このため、誘電率測定は、特定のオフライン測定値に基づいて検証された従来のプロセスやアプリケーションに適応するための理想的なインライン測定となり、誘電率測定をオフライン VCD 値に相関させるのに必要な労力は最小限です。誘電率測定は異なるプロセススケールに対応しており、あるスケールで得られた誘電率由来の指標は、スケールアップまたはスケールダウンの活動で直接転送可能です。

現在までに、誘電率は多数の細胞株およびアプリケーションでうまく実装されています。一般的な細胞の種類とアプリケーションの例についてまとめた資料をご用意しております。詳しくはお問い合わせください。



オフライン VCD とインライン誘電率が相関しない場合

確立されたプロセスでインライン誘電率を導入する際、誘電率信号を過去のオフライン VCD 値と比較することは、誘電率信号を継続的な生細胞数の代理として使用するための重要なステップです。多くの場合、誘電率信号の傾向はオフライン VCD 指標と直線的に相関しますが、誘電率測定とオフライン VCD の測定手法の違いにより、測定相関の度合いに差異が生じる場合があります。



誘電率 (インライン)

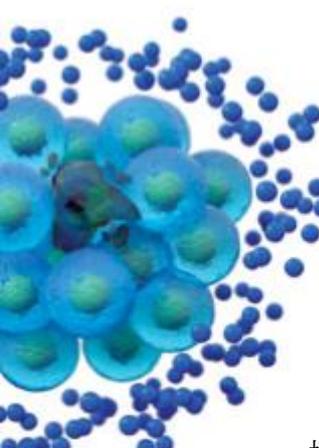
- 1: 静電容量を持つ細胞
- 2: 密集した細胞はすべて誘電率に寄与
- 3: 大きな細胞は誘電率に比例して大きく寄与
- 4: アポトーシス前の細胞は誘電率測定に悪影響を与える
- 5: 誘電率とアネキシン結合によって細胞漏出が検出される
- 6: 死んだ細胞は静電容量を示さない

セルカウンタ (オフライン)

- A: 生細胞はトリパンブルーを吸収しない
- B: 細胞凝集により誤カウントが発生、死細胞が隠れる場合がある
- C: 大きな細胞は単一細胞としてカウントされる
- D: アポトーシス前の細胞は生細胞と区別がつかない
- E: カスパーゼは死にかけている細胞に入り込むがトリパンブルーは入らない
- F: トリパンブルーは死細胞に入り込む



高細胞濃度



高細胞濃度（哺乳類培養では通常 1×10^7 cell/mL 以上と考えられる）では、オフライン VCD 測定では測定前に希釈する必要があり、サンプリング誤差が増加します（Cadena-Herrera et al. 2015）。さらに、高細胞濃度は細胞凝集を伴うことが多く、細胞の塊がオフライン画像ベースの細胞カウントアルゴリズムに影響を与えます。インライン誘電率センサーは希釈を必要とせず、測定は細胞凝集の影響を最小限にとどめるため、オフライン VCD 測定と比較して測定誤差が少なくなります。

接着細胞培養

オフライン VCD 測定では、通常、分析前に細胞をマイクロキャリアまたは他のマトリックスから剥離する必要があります。この剥離が必要なため、不完全な剥離や部分的な再接着が発生することがあり、VCD カウントが歪む可能性があります。細胞剥離によく使用されるトリプシンも、繰り返し曝露されたり、長時間曝露されたりすることで、細胞に毒性の影響を与えることがあります。インライン誘電率測定は、市販されているほとんどの接着基質の影響を受けず、細胞剥離や有毒化学物質への曝露なしに、接着細胞株の生存細胞密度を直接測定することができます（Justice et al. 2011）。

不規則な細胞形状

産業上重要な細胞株の多くはほぼ球形ですが、より不規則な細胞形状の細胞株も存在します。これらの細胞株は、細胞の不均一性が、オフライン画像ベースの測定で 2D 画像上の個々の細胞を分解する一貫性に影響を与えるため、オフライン測定で効果的に定量化することが困難です。

誘電率は、細胞の形状に関係なく細胞のバイオボリュームを継続的に測定し、連続測定により細胞形状の影響を平均化して、堅牢な総合 VCD 測定を提供します。

細胞生存率の定量化

細胞アポトーシスの重要な特徴は、膜の完全性が失われ、最終的に膜の漏出につながることです。

オフラインのサイトメトリーまたはイメージング手法は、分子染料または特定の結合タグを使用して、損傷した膜を物理的に貫通するか、アポトーシスのさまざまな段階でアクセス可能になる特定の膜成分に結合します。

たとえば、アネキシン V は、細胞アポトーシスの初期段階で露出する膜結合タンパク質であるホスファチジルセリンに結合します。一方、カスパーゼアッセイは、通常細胞内で形成され、細胞アポトーシスの中期段階で分泌される酵素であるカスパーゼの存在を定量化します。トリバンプルーは、膜の物理的分解により色素が浸透し、生存できない細胞を染色できる後期アポトーシスでのみ、細胞生存率の定量化に有効となります。



誘電率測定は細胞内のイオン分離に基づいており、細胞膜の能動的輸送障害による細胞内導電率の低下など、細胞質の導電率の変化に敏感です。そのため、誘電率は多くの染色法や分子結合オフライン技術と比較して、より早い段階で生存能力の喪失を検出します（A. Henslee et al. 2016）。

細胞容積と膜特性の変化があるプロセス

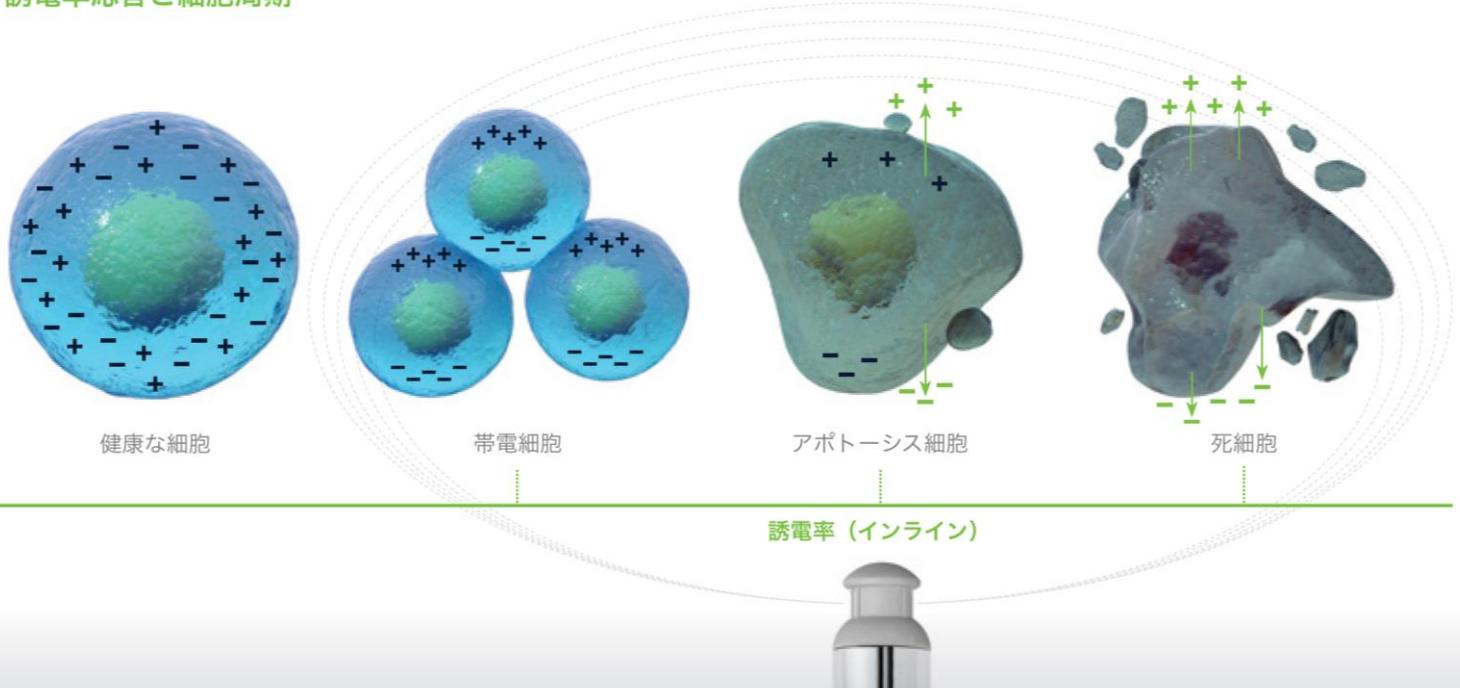
ほとんどのアプリケーションでは、生細胞密度数（通常は cell/mL、生細胞濃度とも呼ばれる）と高い相関関係にあります。誘電率の測定は基本的に細胞膜内の生細胞容積を測定するものです。これにより、細胞培養に影響を与える環境要因と生理的要因の両方による細胞容積の変化を捉えることができます。

培養浸透圧などの環境ストレス因子は、細胞が浸透圧のバランスを調整する能力に影響を与え、懸濁液のイオン濃度の強さに応じて、細胞が膨張したり収

縮したりすることがあります。栄養素の制限も細胞サイズに影響を与える可能性があり、代謝段階の移行を促進し、培養物内の細胞集団のサイズに変化をもたらすことがあります (Pan et al. 2017)。細胞サイズは、アプリケーションまたはターゲット製品によっても異なる場合があります。たとえば、ウイルスベクターアプリケーションでは、トランスフェクションと細胞内ウイルス生成に応じて細胞の膨張と膜特性の変化が観察されています。

これらの各ケースでは、誘電率センサーは生細胞の数が変わらない場合でも、バイオボリュームの増加を測定します。その結果、誘電率信号は、生存細胞濃度の定量化と細胞生理学的変化の両方を示すことになります。誘電率測定は、他の VCD 測定の指標の有無にかかわらず効果的に使用できます。測定原理が定量化された値に与える影響と測定技術の違いを理解することで、各技術を最も効果的に活用するための情報に基づいた決定が可能になります。

誘電率応答と細胞周期



プロセス洞察のための誘電率

前のセクションで説明したように、連続的なバイオキャパシタンスベースの測定では、一般的なオフライン分析では得られない独自の培養情報を生成することができます。誘電分光法の実際のアプリケーションでは、バイオキャパシタンスプローブは、誘電体場内の細胞の全周波数応答分布を生成します。これをベータ分散曲線と呼びます。ベータ分散曲線を Cole-Cole モデルに当てはめた経験的な適合によって決定される多変量パラメータは、ベータ分散曲線の形状と大きさの変化を特徴付けるのに役立ちます (Dabros et al. 2009)。多変量パラメータの有用性は、細胞特性の変化をリアルタイムで捉えようとするときに明らかになります。実行可能なプロセス制御指標として使用される誘電率は、細胞培養の傾向と VCD の監視と表示以外にも実用的な応用があります。以下は、誘電率測定の独自の利点を活用して、他の測定技術では不可能な方法でプロセスを強化した 3 つの応用例です。

ウイルスベクターの生産

ウイルスベクターの生産は、ウイルス蓄積およびウイルス分泌メカニズムに起因する細胞の形態変化から生じる細胞生理学のかなり劇的な変化に関するアプリケーションです。これらのメカニズムは細胞膜の特性に影響を与えます。

誘電率は、昆虫 (Petiot et al. 2017) 及び哺乳類宿主システム (Ansoerge et al. 2011) の両方で、ウイルス成分の合成と放出の異なる段階を捉えるために効果的に使用されています。ウイルスのトランスフェクション培養特性を直接応用することで、高パフォーマンスと低パフォーマンスの培養を判別することができ、さらに誘電率測定から得られる多変量パラメータを使用して最適な培養収穫のタイミングを予測することができました (Pais, Brown, et al. 2020)。

栄養素の制限の特定

栄養素の制限もバイオキャパシタンスを使用して fscan と多変量パラメータの変化を通じてうまく観察されています。誘電率とそれに伴う多変量パラメータの両方を継続的に測定することで、VCD の減少という形で培養の健康状態の変化を容易に識別することができます。

たとえば、VCD プロファイルのわずかな減少が特定されると、過去の成長曲線からの誘電率信号の矛盾を調査することで、培養の成長に影響を与える栄養素の欠乏が明らかになりました。

その後、観察された時点で欠乏している栄養素を追加するボラス投与を変更することで、成長段階で生成される最大 VCD が改善され、生存可能な生産段階が拡大しました (Ansoerge, Esteban, Schmid 2010)。また、多変量パラメータは、栄養制限に対して独自に反応することが示されており、細胞代謝が変化する際の細胞の細胞内特性の変化を捉える能力があることが実証されています (Ansoerge et al. 2010)。

プロセスの初期段階で捉えられれば、栄養素の制限の修正は、培養物内のアポトーシスの発生を軽減するこ

とができます。誘電率信号の多変量特性は、早期のアポトーシス発生を特定し、プロセス修正の時間を確保し、その後、正常な細胞生理機能への回復を示す指標として機能するために使用されています。その結果、誘電場内の細胞の多変量特性の積極的に監視することは、VCD に相関する指標を生成するだけでなく、アポトーシスや代謝の変化など、連続測定フィンガープリント内で実用的な細胞メカニズムの変化を捉えるためにも役立ちます (Ma et al. 2019)。

修正された細胞培養計算と給餌戦略

固定時間ボラス給餌の代替として、誘電率を生細胞濃度の積分、または成長曲線下の面積を計算するためのパラメータとして使用する戦略が成功裏に実施されています。この戦略では、誘電率がオフライン VCD 測定に取って代わり、培養全体の成長を計算します (Moore, Sanford, Zhang 2019, Fernandes et al. 2019)。誘電率信号は、オフライン VCD 測定と比較して細胞濃度の変化と細胞サイズの変化の両方を捉える形で、給餌制御に独自の利点をもたらします。細胞ライフサイクルの段階や培養の段階 (成長または静止) に応じて、細胞サイズは異なる場合があります。細胞が大きいほど、同じ細胞代謝に対してより多くの栄養素が必要になります。このような場合、オフラインの VCD 測定のみに基づいた給餌では、効果的な栄養投与には不十分である可能性があります (Downey et al. 2014)。プロセスの監視、特性評価、制御という形での効果的な PAT の必要性は、バイオ医薬品コミュニティ内での議論の重要なトピックとなっています。バイオキャパシタンスは、この目標を達成するための重要なツールです。このインラインでリアルタイムな連続 VCD 測定ツールは、多数の細胞培養アプリケーションで実績のある成熟した技術であり、時間の経過とともに利用能力が拡大し続けます。

プロセスの監視、特性評価、制御という形での効果的な PAT の必要性は、バイオ医薬品コミュニティ内で議論が高まっているトピックです。バイオキャパシタンスは、この目標を達成するための重要なツールです。

参考文献

1. Abu-Absi, Nicholas R., Brian M. Kenty, Maryann Ehly Cuellar, Michael C. Borys, Sivakesava Sakhamuri, David J. Strachan, Michael C. Hausladen, and Zheng Jian Li. 2011. "Real Time Monitoring of Multiple Parameters in Mammalian Cell Culture Bioreactors Using an In-Line Raman Spectroscopy Probe." *Biotechnology and Bioengineering* 108 (5): 1215–21. <https://doi.org/10.1002/bit.23023>
2. A. Henslee, Erin, Ruth M. Torcal Serrano, Fatima H. Labeed, Rita I. Jabr, Christopher H. Fry, Michael P. Hughes, and Kai F. Hoettges. 2016. "Accurate Quantification of Apoptosis Progression and Toxicity Using a Dielectrophoretic Approach." *Analyst* 141 (23): 6408–15. <https://doi.org/10.1039/C6AN01596D>
3. Ansonge, Sven, Geoffrey Esteban, and Georg Schmid. 2010. "On-Line Monitoring of Responses to Nutrient Feed Additions by Multi-Frequency Permittivity Measurements in Fed-Batch Cultivations of CHO Cells." *Cytotechnology* 62 (2): 121–32. <https://doi.org/10.1007/s10616-010-9267-z>
4. Ansonge, Sven, Olivier Henry, Marc Aucoin, Robert Voyer, John P. Carvell, and Amine Kamen. 2010. "Monitoring the Cell Size Distribution of Mammalian Cell Cultures Using On-Line Capacitance Measurements." In *Cells and Culture*, edited by Thomas Noll, 853–59. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3419-9_150
5. Ansonge, Sven, Stéphane Lanthier, Julia Transfiguración, Olivier Henry, and Amine Kamen. 2011. "Monitoring Lentiviral Vector Production Kinetics Using Online Permittivity Measurements." *Biochemical Engineering Journal* 54 (1): 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.01.002>
6. Cadena-Herrera, Daniela, Joshua E. Esparza-De Lara, Nancy D. Ramírez-Ibañez, Carlos A. López-Morales, Néstor O. Pérez, Luis F. Flores-Ortiz, and Emilio Medina-Rivero. 2015. "Validation of Three Viable-Cell Counting Methods: Manual, Semi-Automated, and Automated." *Biotechnology Reports* 7 (September): 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.04.004>
7. Dabros, Michal, Danielle Dennewald, David J. Currie, Mark H. Lee, Robert W. Todd, Ian W. Marison, and Urs von Stockar. 2009. "Cole-Cole, Linear and Multivariate Modeling of Capacitance Data for on-Line Monitoring of Biomass." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 32 (2): 161–73. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0234-4>
8. Downey, Brandon J., Lisa J. Graham, Jeffrey F. Breit, and Nathaniel K. Glutting. 2014. "A Novel Approach for Using Dielectric Spectroscopy to Predict Viable Cell Volume (VCV) in Early Process Development." *Biotechnology Progress* 30 (2): 479–87. <https://doi.org/10.1002/btpr.1845>
9. Fernandes, Juhi, Jayme Currie, Kevin Ramer, and An Zhang. 2019. "Development of Capacitance Tools: At-Line Method for Assessing Biomass of Mammalian Cell Culture and Fixed Cell Calibration Standard." *Biotechnology Journal* 14 (4): e1800283. <https://doi.org/10.1002/biot.201800283>
10. Justice, C., J. Leber, D. Freimark, P. Pino Grace, M. Kraume, and P. Czermak. 2011. "Online- and Offline- Monitoring of Stem Cell Expansion on Microcarrier." *Cytotechnology* 63 (4): 325–35. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9359-4>
11. Ma, Fuduo, An Zhang, David Chang, Orlin D. Velev, Kelly Wiltberger, and Rashmi Kshirsagar. 2019. "Real-Time Monitoring and Control of CHO Cell Apoptosis by in Situ Multifrequency Scanning Dielectric Spectroscopy." *Process Biochemistry* 80 (May): 138–45. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.017>
12. Moore, Brandon, Ryan Sanford, and An Zhang. 2019. "Case Study: The Characterization and Implementation of Dielectric Spectroscopy (Biocapacitance) for Process Control in a Commercial GMP CHO Manufacturing Process." *Biotechnology Progress* 35 (3): e2782. <https://doi.org/10.1002/btpr.2782>
13. Pais, Daniel A. M., Chris Brown, Anastasia Neuman, Krishanu Mathur, Ines A. Isidro, Paula M. Alves, and Peter G. Slade. 2020. "Dielectric Spectroscopy to Improve the Production of RAAV Used in Gene Therapy." *Processes* 8 (11): 1456. <https://doi.org/10.3390/pr8111456>
14. Pais, Daniel A. M., Paulo Galrao, Anastasiya Kryzhanska, Jeremie Barbau, Ines A. Isidro, and Paula Alves. 2020. "Holographic Imaging of Insect Cell Cultures: Online Non-Invasive Monitoring of Adeno-Associated Virus Production and Cell Concentration." *Processes* 8 (4): 487. <https://doi.org/10.3390/pr8040487>
15. Pais, Daniel A. M., Rui M. C. Portela, Manuel J. T. Carrondo, Ines A. Isidro, and Paula M. Alves. 2019. "Enabling PAT in Insect Cell Bioprocesses: In Situ Monitoring of Recombinant Adeno-associated Virus Production by Fluorescence Spectroscopy." *Biotechnology and Bioengineering* 116 (11): 2803–14. <https://doi.org/10.1002/bit.27117>
16. Pan, Xiao, Ciska Dalm, Rene H. Wijffels, and Dirk E. Martens. 2017. "Metabolic Characterization of a CHO Cell Size Increase Phase in Fed-Batch Cultures." *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (22): 8101–13. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8531-y>
17. Petiot, Emma, Sven Ansonge, Manuel Rosa-Calatrava, and Amine Kamen. 2017. "Critical Phases of Viral Production Processes Monitored by Capacitance." *Journal of Biotechnology* 242 (January): 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.010>

本書はハミルトン社が提供する資料 (Lit. No. L30026 — 03/2021) を翻訳したものです。翻訳はできる限り正確に行いましたが、原著の精度に勝るものではありません。より正確な理解のためには原著をご参照ください。

本書に記載された情報は作成時点のものです。内容は予告なしで変更することがありますので予めご了承ください。

2024年11月更新

お問い合わせ先

MAIL : toiawase@tactec.co.jp

TEL : 03-3871-1750

ハミルトン担当窓口まで

Hamilton プロセスセンサー 日本国正規代理店

株式会社ティ・アンド・シー・テクニカル

本社 : 〒110-0003 東京都台東区根岸 1-2-17

ホームページ : <https://www.tactec.co.jp>