

APPLICATION NOTE

TIME-GATED®分光法による 細胞培養培地のモニタリング

進化する分析ツール

CONTACT US:
TIMEGATE INSTRUMENTS LTD

Tutkijantie 7
FI-90590 Oulu
FINLAND
www.timegate.com
info@timegate.com

INTRODUCTION

インスリンは、抗体以外で最初のタンパク質ベースの治療薬として1922年に使用され始めました。しかし、動物由来インスリンの入手可能性、コスト、免疫原性に関する問題から、1970年代に組換えタンパク質治療薬が導入されるまで60年を要しました。[1,2] それ以降、組換えDNA技術および細胞培養を基盤とした製造プロセスが開発され、バイオ医薬品分野は急成長を遂げ、現在では数十億ユーロ規模の売上を生み出しています。グローバルな生物製剤市場は、2019年から2027年にかけて年平均成長率(CAGR)7.6%を示すと予測されています。[3]

細胞培養を通じて生産される生物学的医薬品は、複雑かつ相互に関連した生化学的経路を伴います。そのため、これらの細胞を健康に維持し、製造プロセスを一貫して行うことが重要です。調整された細胞培養培地の最適条件を維持することは、最終製品が治療目的に必要な一次、二次、三次、または四次構造を持つために重要な要素となります。この観点から、バイオプロセスの各段階で培地をモニタリングすることが欠かせません。しかし、バイオプロセスには物理的、化学的、分子レベルの複雑性が内在しています。

現在、細胞培養培地の品質を一貫して分析するために、LC-MS（液体クロマトグラフィー-質量分析）が頻繁に使用されています[4]。しかしながら、バイオプロセス中に培地を非破壊的にオンラインでモニタリングするというニーズは依然として満たされていません。このため、蛍光[5]、赤外線、ラマン分光法などの分光技術と、ケモメトリクスおよび統計的データ解析 [6] が現在探求されています。

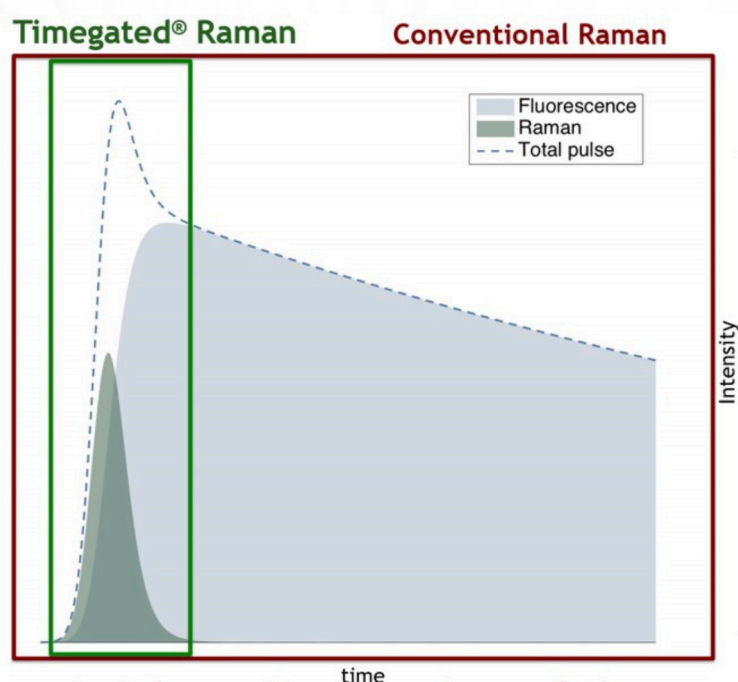


図1:従来のラマン分光法とタイムゲートラマン分光法のプロセスの概略比較

ラマン分光法は、迅速かつ堅牢なデータ取得と、サンプルの定性・定量情報を非破壊的に抽出できるため、他の技術と比較して水溶液の分析に非常に適しています。しかし、高い蛍光分子種を多く含むサンプルでは、蛍光が課題となってきました。

BuckleyとRyderは、バイオ医薬品産業におけるさまざまなラマン分光技術の応用について包括的にレビューし、蛍光の影響を軽減するためのタイムゲート技術やTimegate Instrumentsについて言及しています[7]。

この課題は、Timegate Instrumentsの特許技術によって解決されています。この技術は、蛍光が発生する前にラマンスペクトルを記録します。ラマン光子とその他の蛍光を含む妨害光（フォトルミネッセンス）との間に時間差が存在する場合、タイムゲーティングによりラマン散乱光子を分離することが可能です（図1）。他のフォトルミネッセンス効果が排除されるため、ラマン分光法はもはや暗室で行う手法ではなくなります。この技術により、分析サンプルにおけるフォトルミネッセンスの妨害を受けることなく、膨大な情報を提供することが可能になります。また、付属のソフトウェアパッケージにより、この機器は多くの用途で使いやすい設計となっています。

本研究では、Timegated®ラマン技術の能力を実証することを目的とし、細胞培養培地中の重要なアミノ酸の一つであるフェニルアラニンを定量化する試みを行いました。

MATERIALS AND METHODS

本研究では、培養培地として、90%のDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) と10%の胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) からなる細胞培養培地を包括的に分析しました。

さらに、この培地にフェニルアラニンを添加し、6.25mM、3.125mM、2.8125mM、2.5mM、2.1875mM、1.875mM、1.562mM、0.781mM、0.391mM、0.195mMの濃度となる培地溶液を作製しました。

これらの培地溶液は、ラマン分光計で532 nmのレーザー励起下で測定を行いました。使用した機器は、連続波(CW)のThermo Scientific DXR2xiラマンイメージング顕微鏡と、パルスレーザーを搭載したTimegate Instrument PicoRamanで、B&W Tek BAC100-532Eマイクロプローブ（スポットサイズ85 μm ）と結合されています。

試料は直径約2 cmのステンレス製容器に入れて測定を行いました。

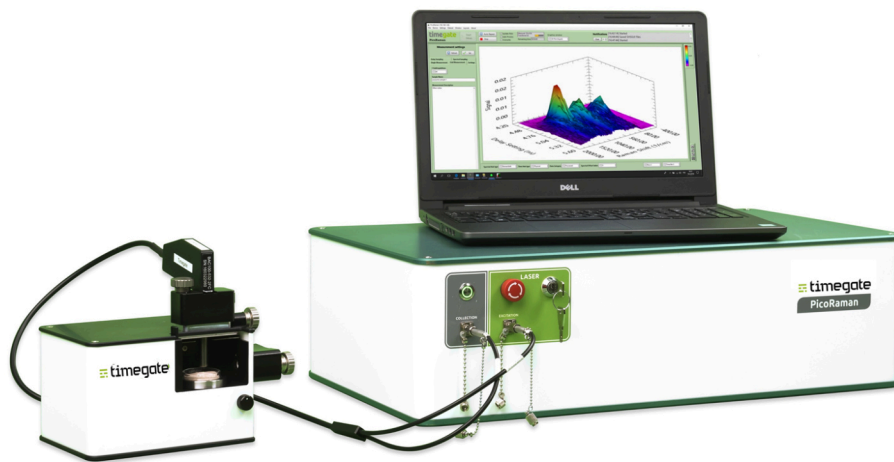


図2: タイムゲート式PicoRaman 532 nm分光計

RESULTS AND DISCUSSION

ラマン分光法を用いて、細胞培養培地にフェニルアラニンを添加したさまざまな濃度の溶液からスペクトルを取得しました。データの前処理を行った後、フェニルアラニンを添加した各濃度の培養培地溶液に対して平均スペクトルを算出しました。PicoRamanを使用して測定された、濃度6.25 mM、3.125 mM、2.81 mM、2.5 mM、2.1875 mM、1.875 mM、1.56 mM、0.78 mM、0.39 mM、および0.195 mMのフェニルアラニンを含む培地溶液の平均スペクトルを図2に示します。また、連続波ラマンとPicoRamanを用いて測定された、6.25 mMのフェニルアラニンを添加した培地のラマンスペクトルを図3に示します。

フェニルアラニンを添加していない培地では、524（タンパク質中のS-S伸縮）、666（シスチン）、743（トリプトファン/フェニルアラニン）、808（ホスホジエステル）、832（チロシン）、867（単糖類）、913（グルコース）、1026（グリコーゲン）、1097（C-N振動）、1408（免疫グロブリンG）、1418（C=C伸縮）、1609（アミドI）、1665 cm^{-1} （アミドI）にピークが見られました。

一方で、フェニルアラニンを添加した培地では、743、1000、1034、1216、1886、1602 cm^{-1} にピークが現れ、これらはフェニルアラニンに起因するものです。これらのピークは、フェニルアラニンの濃度に応じて強度が変化しました。

正規化されたスペクトルは、多変量部分最小二乗（PLS）回帰分析にかけられました。構築されたPLSモデルは、累積変動99.46%を説明する2つの潜在変数でフェニルアラニン濃度関連の情報を抽出しました。

このPLSモデルは、交差検証による二乗平均平方根誤差（RMSE）が0.549 mMで、予測濃度と調製濃度の間に非常に良好な線形関係（ $y=0.91887x+0.17265$; $R^2=1$ ）を示しました（図4参照）

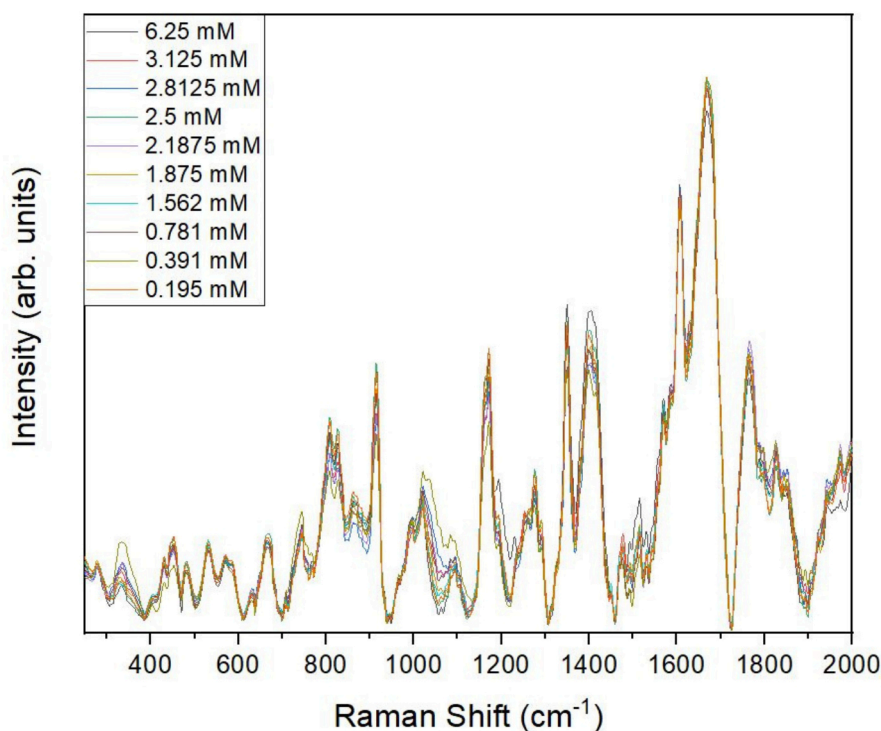


図3. ベースライン補正されたTime-gatedラマン分光法による、異なる濃度のフェニルアラニンを添加した培地溶液のスペクトル

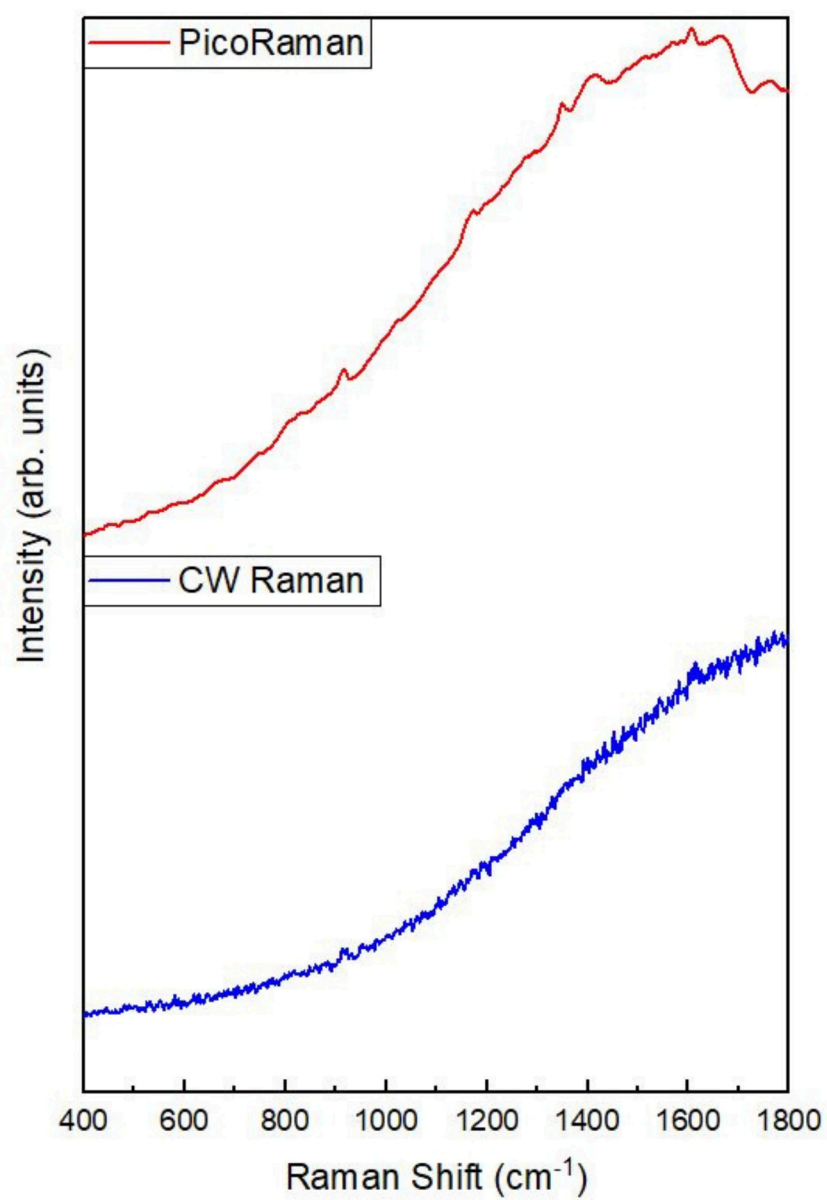


図4. 6.25 mMのフェニルアラニンを添加した培地のラマンスペクトル
連続波(CW)ラマン分光法(青)およびPicoRaman(赤)

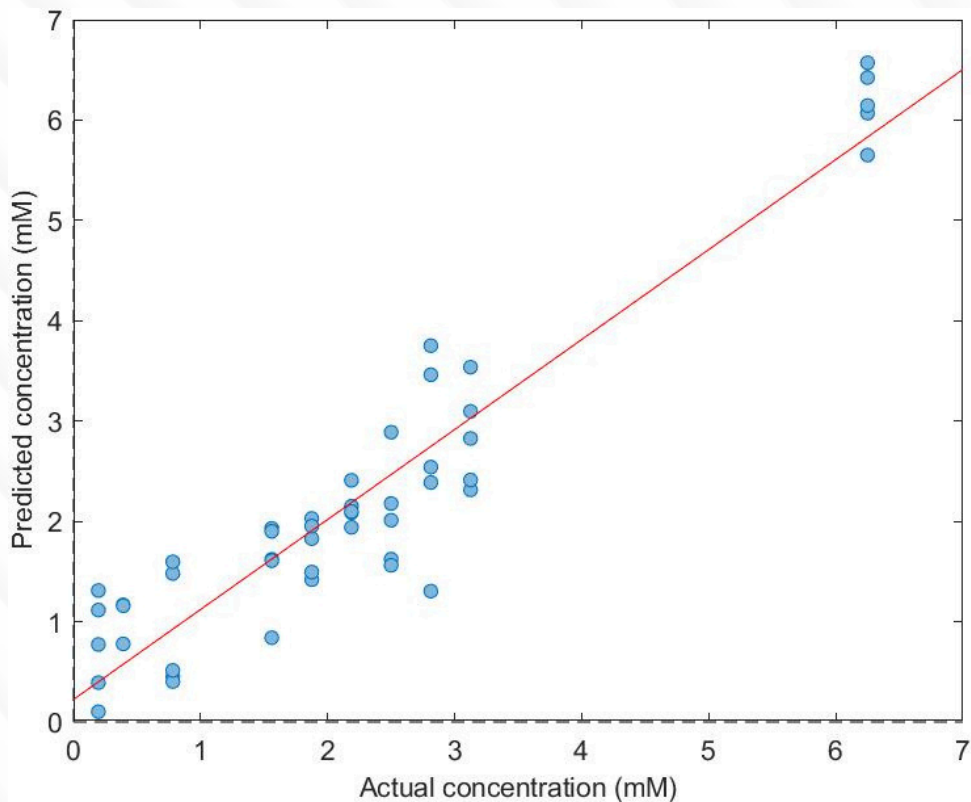


図5. 細胞培養液中のフェニルアラニンの実際の濃度と予測濃度のキャリブレーション曲線。実線は誤差ゼロ曲線を表しています。

分析システムを特徴づけるためには、通常、検出限界（LoD）と定量限界（LoQ）という重要なパラメーターを求める必要があります。このシステムのLoDは0.5603mMol、LoQは1.70mMolであることが分かりました。

CONCLUDING REMARKS

本研究では、Time-gatedラマン分光法とケモメトリック手法を組み合わせることで、従来の方法では不可能だった高蛍光の重なりが存在する条件下においても、細胞培養培地中の極めて重要なアミノ酸を微量でも定量化できる可能性を実証しました。結論として、Timegate® PicoRaman分光計の有効性が明確に示され、高品質のラマンスペクトルデータを取得するだけでなく、蛍光減衰特性を研究する追加的な利点があることも明らかになりました。

ACKNOWLEDGEMENT

本研究のために、連続波ラマンスペクトルのサンプル取得にあたり、実験施設を提供いただいたオウル大学医学部物理学・工学科のSimo Saarakkala教授に感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1.Kamarck, M.E.. “Building Biomanufacturing Capacity—the Chapter and Verse”. Nat. Biotechnol 2006; 24(5): 503–505.
- 2.Zhu, J.W. . “Mammalian Cell Protein Expression for Biopharmaceutical Production”. Biotechnol. Adv 2012; 30(5): 1158–1170.
- 3.<https://www.globenewswire.com/news-release/2020/04/03/2011472/0/en/Global-Biologics-Market-to-surpass-US-456-83-8-Billion-by-2027-Says-CMI.html>
- 4.Patrick Mayrhofer, David Reinhart, Andreas Castan, Renate Kunert, “Monitoring of heat- and light exposure of cell culture media by RAMANspectroscopy: Towards an analytical tool for cell culture media quality control”. Biochemical Engineering Journal. 166,2021, 107845.
- 5.P.W. Ryan, B. Li, M. Shanahan, K.J. Leister, A.G. Ryder, Prediction of Cell Culture Media Performance Using Fluorescence Spectroscopy, Anal. Chem. 82 (2010) 1311–1317.
- 6.A.S. Rathore, D. Kumar, N. Kateja, Role of raw materials in biopharmaceutical manufacturing: risk analysis and fingerprinting, Current Opinion in Biotechnology. 53 (2018) 99–105.
- 7.K Buckley & AG Ryder, “Applications of Raman Spectroscopy in Biopharmaceutical Manufacturing: A Short Review”, Applied Spectroscopy, 2017, Vol. 71(6)1085–1116.