

学位論文要旨 (Summary of the Doctoral Dissertation)	
学位論文題目 (Dissertation Title)	抗体製造プロセスにおける旋光度利用による抗体濃度モニタリング (Antibody concentration monitoring by optical rotation for monoclonal antibody manufacturing processes)
氏名 (Name)	稲葉英憲
<p>抗体の製造プロセスは、細胞を用いて抗体を生産する培養工程と生産した抗体を不純物から分離・精製して高品質な医薬品として取得する精製工程で構成されている。さらに、培養工程は細胞を増加させる複数の種培養工程と細胞を増加させながら抗体を生産する生産培養工程、精製工程は細胞の除去/澄清化、複数のクロマトグラフィー工程、ウイルス不活化工程、ウイルス濾過工程、濃縮/バッファー交換工程、最終濾過工程と多くの工程で構成されている。この製造プロセス中における各種パラメータのモニタリングはプロセスの安定化へ非常に重要であり、オフライン、アットライン、オンライン、インラインといった各手法によりモニタリングがなされている。オフラインとアットラインは、製造プロセスから採取したサンプルを持ち運び分析する手法であり、分析機器が製造プロセスから遠隔している場合をオフライン、近接している場合をアットラインと呼ぶ。オンラインは自動的にサンプリングを行い製造プロセスに近接した機器で分析を行う手法、インラインは製造プロセス中に分析センサーを組み込み分析する手法である。上記のような抗体の製造プロセスにおいて、生成物である抗体の濃度は非常に重要なパラメータとなっている。抗体濃度をモニタリングするための標準的な方法は 280 nm での紫外線吸収法 (A280 法) であるが、一般的な光路長 1cm のセルを用いた分光光度計では測定できる抗体濃度は 3 g/L 以下といった低濃度の範囲に限られている。近年では細胞培養プロセスと細胞工学技術の進化により培養工程における抗体濃度は上昇し、精製工程では 10g/L 以上の抗体濃度をモニタリングする場合がある。そのため、製造プロセス中の抗体濃度をインラインでモニタリングすることは容易でなく、一般的な A280 法ではオフラインでの希釈手順が必要となる。また、A280 法には紫外線を吸収する不純物による干渉を受けるといった欠点もあり、例えば、培養上清液中の抗体濃度は、宿主細胞由来のタンパク質や DNA だけでなく、紫外線を吸収する培地成分などが含まれているため、A280 法では直接測定できない。このような欠点を克服する濃度測定法として、我々は最近、旋光度を利用した抗体濃度の測定法に着目している。旋光度は光が光学活性物質を通過するとき特定の方向に回転する現象であり、その程度は光学活性物質の量に比例する。旋光度はアミノ酸や糖などの光学活性物質濃度を測定するために使用されているが、タンパク質定量の標準的なメソッドとしては使用されていない。そこで我々は種々の抗体サンプルの濃度測定を実施し、その実用の可能性について検証を行った。</p> <p>最初に 1 章では、序論として上記の本研究の背景及び目的を述べ、論文の構成を示した。</p> <p>第 2 章では、一般的なタンパク質濃度の測定法についてその特徴を整理した。</p> <p>第 3 章では、旋光度の抗体濃度測定への適用性を評価した。その結果、上限は 80 g/L といった高い抗体濃度まで、旋光度は抗体濃度に対して良好な直線性を示した。また、下限となる定量限界は 0.30 g/L と算出され、広範囲の濃度へ適用可能であることが示された。また、各種クロマト工程液を用いた添加回収試験を行い、A280 法と回収率の比較を行った。その結果、回収率の値はいずれも 100% に近く、両者に大きな違いはない結果となった。A280 による濃度測定には適切な希釈が必要であるが、旋光度は直</p>	

様式7号(第12条,第31条関係)

(様式7号)(Format No.7) 英語版

接測定が可能であることから、旋光度法が抗体の精製工程においてみられる高濃度サンプルの測定に非常に有望なことを示したと考えられる。最後に、細胞培養工程中の抗体濃度をモニタリングするために旋光度を適用した。細胞培養バイオリアクターから採取したサンプルを、HPLC、旋光度、および A280 法で分析した。その結果、A280 法による測定値の推移は HPLC で測定された値よりもはるかに高い結果となったが、旋光度は細胞培養液の着色といった不純物の影響によらず、HPLC による濃度推移とよく一致する結果を得ることができた。

第4章では、旋光度計のセルをフローセルへ改造し、精製工程中のインラインモニタリングについて実証を行った。第2章の細胞培養プロセスにおけるタンパク質濃度のモニタリングでは、サンプルを日にち単位で採取し、オフラインで旋光度の測定を行った。一方、処理時間の短い単位操作に対しては、インラインによるリアルタイムのモニタリングが重要となる。本検討ではまず、市販の旋光度セルをフローセルへ改造し、プラグフロー反応器と連続攪拌タンク反応器を一連に繋げたモデルへあてはめ、その応答曲線の解析を行った。その結果、モデル解析の結果は実験結果を良好に表現する結果が得られた。さらに、当該モデルを用いて線形増加、ガウス分布曲線、指数凸曲線といった異なる入力に対する適用性を検証し、当該モデル計算は特定の単位操作プロセスに対するフローセルの適用性を評価するのに有用であることを示した。また、フローセルによる検量線の傾きは第3章で検証したバッチ測定の傾きと同様であることも確認した。さらに、限外濾過膜を使用した接線流濾過によるタンパク質の濃縮工程の実験を行い、旋光度による抗体濃度のインラインモニタリングの検証を行った。約 10g/L の抗体溶液を 70/L まで濃縮した際の旋光度の推移を確認した結果、旋光度推移は抗体濃度推移と良好に一致し、濃縮中の濃度推移をインラインの旋光度により連続的にモニタリング可能であることを示した。最後に結論として本研究によって得られた知見を整理し、今後の展望や課題について述べている。

(和文 2,000 字程度 / 英文 800 語程度)
(about 800 words)

学 位 論 文 要 旨 (Summary of the Doctoral Dissertation)	
学位論文題目 (Dissertation Title)	抗体製造プロセスにおける抗体濃度モニタリング – 旋光度利用による高タンパク質濃度測定 (Protein concentration monitoring by optical rotation for monoclonal antibody manufacturing processes)
氏 名(Name)	HIDENORI Inaba
<p>The antibody manufacturing process consists of a cell culture process in which antibody is produced and a purification process in which the produced antibody is purified from impurities to obtain high-quality pharmaceuticals. Furthermore, the cell culture process includes multiple seed culture steps to increase the number of cells and a production culture step to produce antibody. The purification process includes cell removal/clarification, multiple chromatography, virus inactivation, virus inactivation, concentration/buffer exchange, and filtration steps. Monitoring of various parameters during the processes is crucial for stable manufacturing, and it is performed by off-line, at-line, on-line, and in-line methods. Off-line and at-line are methods for carrying and analyzing samples taken from the manufacturing process. When the analytical equipment is remote from the manufacturing process, the method is called off-line, and it is called at-line when equipment is close to the manufacturing process. On-line is a method that takes samples and implements analysis automatically near the manufacturing process and in-line is a method that incorporates an analytical sensor into the manufacturing process and implements analysis automatically. In the antibody manufacturing process as described above, the concentration of the antibody is a very important parameter. The standard method for monitoring antibody concentration is ultraviolet absorption at 280 nm (A280 method), but a spectrophotometer using a typical 1 cm path length cell can only measure low antibody concentration of up to 3 g/L. In recent years, antibody concentrations in the culture process have increased with advances of cell culture processes and cell engineering technology, and the antibody concentration of 10 g/L or higher needs to be monitored in the purification process. Therefore, it is not easy to monitor antibody concentration in-line during the manufacturing process. In addition, the A280 method has the disadvantage of being interfered by impurities that absorb ultraviolet rays. For example, the antibody concentration in the culture fluid is affected not only by proteins and DNA derived from host cells but also by medium components that absorb ultraviolet rays. As a concentration measurement method that overcomes these disadvantages, we recently focus on a method for measuring using optical rotation. Optical rotation is a phenomenon in which light rotates in a specific direction when passing through optically active substances. Optical rotation is utilized to measure the concentration of amino acids and sugars, but it is not used as a standard method for protein concentration measurement.</p> <p>In Chapter 1, the background, objectives and the structure of this paper are explained.</p> <p>In Chapter 2, the characteristics of common methods for measuring protein concentration is summarized.</p> <p>In Chapter 3, we evaluated the applicability of optical rotation method to antibody concentration measurement. As a result, the optical rotation showed good linearity with respect to antibody concentration up to a high antibody concentration of 80 g/L. In addition, the lower limit of quantification was calculated to be 0.30 g/L, indicating that optical rotation method is applicable to a wide range of antibody concentration measurement. We also conducted addition/recovery test using various chromatography step samples and compared recovery rates between optical rotation and A280 methods. As a result, both recovery rates were close to 100% and there was no significant difference between the two methods. While</p>	

様式 7 号 (第 12 条, 第 31 条関係)

(様式 7 号) (Format No.7) 英語版

A280 method requires appropriate dilution, but optical rotation can measure a wide range concentration directly. Therefore, the optical rotation method should be considered as a promising method for measuring highly concentrated samples in the antibody purification process. Finally, optical rotation method was applied to the cell culture process. Samples taken from the cell culture bioreactor were analyzed by HPLC, optical rotation and A280 methods. The A280 trend was much higher than HPLC due to impurities having ultraviolet absorbance, but the optical rotation shows similar trend with antibody concentration measured by HPLC.

In Chapter 4, we modified the standard polarimeter cell into a flow cell and demonstrated the in-line monitoring with optical rotation in the concentration step. In this study, we first confirmed response curves of the in-line flow cell experimentally by monitoring several concentration samples (5, 10, 15, 20 g/L). Then we analyzed the response curve by applying the in-line flow cell to a model in which a plug flow line and a continuous stirred tank were connected in series. As a result, the numerical calculation result agreed well with the experimental result. The slope of calibration curve from the flow cell was similar with the batch analysis conducted in Chapter 3. In addition, we verified the model applicability by using different inputs such as a linear increase, a Gaussian distribution curve and an exponential curve. Furthermore, we conduct a protein concentration experiment and tested in-line concentration monitoring with optical rotation. As a result, the optical rotation trend monitored continuously by the established flow cell matched well with the antibody concentration when concentrating the antibody solution from about 10 g/L to 70/L. Finally, the results and discussions in this study are summarized as a conclusion.

(和文 2,000 字程度 / 英文 800 語程度)
(about 800 words)

(様式 14 号)

学位論文審査の結果及び試験, 試問の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	稲葉 英憲
審 査 委 員	主 査: 吉本 則子
	副 査: 田中 一宏
	副 査: 星田 尚司
	副 査: 吉本 誠
	副 査: 通阪 栄一
	副 査: 山本 修一
論 文 題 目	抗体製造プロセスにおける旋光度利用による抗体濃度モニタリング (Antibody concentration monitoring by optical rotation for monoclonal antibody manufacturing processes)
<p>【論文審査の結果及び試験, 試問の結果】</p> <p>抗体は、細胞培養工程と複数のクロマトグラフィーや膜を利用した精製工程で製造される。各工程のモニタリングはプロセスの安定化に必要であり、特に目的生成物である抗体濃度 C_P は非常に重要である。標準的な 280 nm での紫外線吸収法 (A280 法) では、$C_P < 2$ g/L のような低濃度範囲に限られ、オフラインでの希釈手順が必要となる、不純物による妨害を受けるといった課題がある。</p> <p>本研究では、タンパク質の旋光性に着目し、旋光度による高濃度タンパク質 (抗体) のモニタリングを検討した。第1章で、本研究の背景及び目的を述べ、論文の構成を示した。第2章では、一般的なタンパク質濃度測定法についてその特徴を整理した。第3章では、旋光度の抗体濃度測定への適用性を評価し、$C_P = 80$ g/L の高濃度まで良好な直線性を示し、定量下限は 0.30 g/L であり、広範囲の濃度測定が可能であった。培養工程中のサンプルを、HPLC、旋光度、および A280 法で分析した結果、A280 法では不純物による妨害で正確な測定が不可能であったが旋光度と HPLC の値は一致した。第4章では、旋光度計セルをフローセルへ改造し、限外濾過膜による連続濃縮のインラインモニタリングを実証した。また応答曲線のモデル化とモデルシミュレーションによりフローセルの特性解析も行い適用可能な条件を考察した。最後に本研究の知見を整理し、今後の展望や課題について述べた。</p> <p>公聴会には、本学の教員・学生以外に製薬会社や化学会社から多数の研究者が参加し、多くの質問があった。</p> <p>主な質問は、不純物や抗体の構造変化の影響や、セルの応答特性に基づいた最適</p>	

(様式 14 号)

なセルのデザインの推定についてであった。

どの質問に対しても発表者からの確かつ明確に回答がなされた。

以上により本研究は独創性、信頼性、有効性、実用性ともに優れ、博士(生命科学)の論文に十分値するものと判断した。

試験および試問として、4 名の副査から以下の内容の課題が課された。

1. 化学工学の物質収支と熱収支の知識を問う課題
2. 酵素反応を応用するバイオリアクターの設計と操作を問う課題
3. クロマトグラフィーでの分離対象となる物質の、遺伝子工学的な生産技術を問う課題
4. 研究対象とした物質の DDS 技術を問う課題

これらの試問に対し、詳細な解答がレポート形式で提出され、また口頭試問に対しても満足のいく回答がなされた。さらに、語学については英文論文が発表されていること、米国に 3 年間勤務したことから判断して、十分な外国語能力を有するものと判断した。

論文内容および審査会、公聴会での試問応答など総合的に判断して、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記のとおりである。

関連論文 計 3 編

(1) 著者氏名: Hidenori Inaba, Kosuke Wakabayashi, Ikuo Tsujimoto, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto

論文題目: Measurement of High Protein Concentrations by Optical Rotation: A Case Study for Monitoring of Monoclonal Antibody Drug Downstream Processes

学術雑誌名: Current Protein and Peptide Science

巻、号、頁: Volume 22, Issue 12, Page 898-904

DOI: <https://doi.org/10.2174/1389203722666211210121258>

発行年月: 2021 年 12 月

(2) 著者氏名: Hidenori Inaba, Tomoki Sugiyama, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto

論文題目: Continuous monitoring of high protein concentrations by optical rotation – A case study for continuous monitoring of monoclonal antibody concentrations during ultrafiltration

学術雑誌名: Japan Journal of Food Engineering

DOI: <https://doi.org/10.11301/jsfe.23635>

巻、号、頁: Vol. 24, No.4, Page 113-117

発行年月: 2023 年 12 月発行

(3) 著者氏名: Hidenori Inaba, Kosuke Wakabayashi, Ikuo Tsujimoto, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto

論文題目: Antibody Concentration Measurement Using Optical Rotation: Toward Process Analytical Technology

学術雑誌名: MATEC Web of Conferences, The 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE 2019)

巻、号、頁: Vol. 333, Article No.15002

DOI: <https://doi.org/10.1051/mateconf/202133315002>

発行年月: 2021 年 1 月発行