

令和元年6月18日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18843

研究課題名(和文) マイクロ波常温乾燥による生物製剤のガラス化保存法の検証

研究課題名(英文) Possibility of Glassy Preservation by Microwave Room-Temperature Drying of Biological Proteins

研究代表者

鶴田 隆治 (TSURUTA, TAKAHARU)

九州工業大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：30172068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質を用いた医薬品が増えており、一般には凍結乾燥(FD)によって乾燥保存されている。しかし、乾燥に長時間・高エネルギーを要するうえ、凍結過程でタンパク質が失活、凝集する危険性がある。そこでFDに代わる高速・高品位な乾燥方法としてマイクロ波常温乾燥法(MVD)に着目し、実際に卵白の分子構造が維持され、リゾチームの分解活性も保存されることを確認できた。また、熱に敏感なプロテアーゼについても、MVDによる乾燥時間の大幅な短縮と分子構造維持を確認した。さらに、マイクロ波出力と真空度を調整して発泡状態にすると、更なる高速化が可能なのことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体高分子を用いたタンパク質系の生物製剤は、近年の医療技術において非常に注目されているが、物理化学的に不安定なため、その製造・保存法において革新的な技術の登場が切望されている。本研究課題は、この期待に応えることのできる方法としてマイクロ波常温乾燥法を提案し、その有効性を示したものである。乾燥後においてもタンパク質構造を維持でき、その活性を損なうことなく保存できることを実際に検証し、実証したものである。特に、一般的な凍結乾燥に比べて乾燥時間を短縮でき、さらには発泡乾燥とすることによって乾燥時間が格段に短くなることを見出し、製薬業界に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：High quality drying of therapeutic protein solution is important in medical and pharmaceutical processing. Freeze-drying is mostly used, but it takes a long drying time and causes damages of protein structures. In order to improve the drying quality and time, we propose a microwave vacuum drying performed at ambient temperatures under low-pressure conditions. We are focusing on the glassy preservation by evaporative drying at room-temperature because the vitrification temperature increases with the protein concentration. Circular dichroism spectroscopy is used to detect protein conformation changes during the drying of egg white or lysozyme. We also make a UV measurement of the residual activity of lysozyme by using the micrococcus luteus. It is concluded that the microwave vacuum drying at room temperature can preserve the protein conformation. Also, we can find that the formation of foam shortens the drying time drastically.

研究分野：熱工学

キーワード：タンパク質乾燥 マイクロ波真空乾燥 ガラス化保存 生物製剤 発泡乾燥 常温乾燥

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質系の生物製剤は1980年代に発明されたもので、タンパク質本来の生理活性に基づく優れた薬効が期待されているほか、従来の低分子医薬品とは投与方法が異なるため速攻性や治療範囲の面でも利点がある。近年、バイオテクノロジーや遺伝子組み換え技術の発展に伴い、タンパク質などの生体高分子を用いた医薬品が増えているが、溶液状態での安定性確保が困難なことが多く、保存可能期間は短いため、多くのタンパク質製剤は、凍結乾燥（以下FDと略す）により乾燥状態で保存されている。しかし、FDは氷の昇華を伴う乾燥のため長時間かかり、また大きなエネルギーを要する。さらに凍結濃縮による水和状態の変化や氷晶などからの物理的なダメージを受け、タンパク質が失活、凝集してしまうことがある。そのため、タンパク質製剤に化合物や添加物を加えることでそれらの変性を防ぐ研究が行われている⁽¹⁾。

一方、我々は、マイクロ波真空乾燥（以下MVD）を用いることによって乾燥を常温下において高速に行う技術を開発しており^(2,3)、収縮や変形の少ない乾燥を実現することを報告している⁽⁴⁾。MVDは減圧下で水の蒸発を促進させ、蒸発時に奪われる潜熱をマイクロ波により供給し、結果として常温に近い温度で乾燥できる方法である。これにより、内部からの水分排出効果による乾燥時間の大幅な短縮とともに、常温での乾燥処理が可能となる。

そこで、このMVDをタンパク質水溶液の乾燥に用いれば、加熱や冷却のプロセスを回避できるため、タンパク質に損傷を加えることなく、その活性を維持した状態で完走できるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクロ波を用いた常温乾燥技術であるMVDを用いることにより、常温状態のまま超急速な水分蒸発によってガラス化保存が可能となり、タンパク質の機能を失活させない新たな乾燥方法の可能性を検証することにある。また、従来技術であるFDとの比較から、乾燥時間短縮の優位性を示すことを目的としている。

具体的には、図1に示す水溶液のガラス温度の濃度依存性を利用して、従来の凍結乾燥の状態変化（A→B→C→D）に代えて、室温での常温乾燥（A→D）の状態変化を可能とするMVD法によって、高速・高品位乾燥を実現して、その有効性を示す。

3. 研究の方法

(1) タンパク質水溶液の乾燥実験

乾燥試料として、5gの卵白（アルブミン）とリゾチーム水溶液、そしてプロテアーゼ水溶液（10wt%、ニホンコウジカビ由来）を用いた。図2(a)に凍結乾燥機の概略を示す。FDでは、試料を内径50mmのPFA（フッ素樹脂）シャーレに入れ、試料を-25℃の冷凍庫で12時間以上凍結させる。完全に凍結した試料を真空容器内にセットし、圧力40Pa以下で乾燥を行った。図2(b)にはマイクロ波常温乾燥機の概略を示す。マイクロ波出力、真空バルブを調整して真空容器内圧力を決定する。MVDでは、試料をPFAシャーレまたはガラスピーカーに入れ、真空容器内の中央に配置し、試料温度40℃以下の条件で、含水率比が0.05以下になるまで乾燥を行った。圧力条件については、発泡のない静的な乾燥は20kPaで行ったのに対し、発泡乾燥では40℃以下での試料の発泡を促進するため、より低い圧力5kPaで行った。

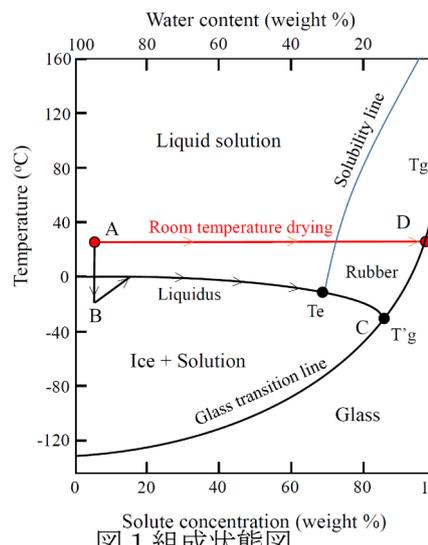


図1 組成状態図

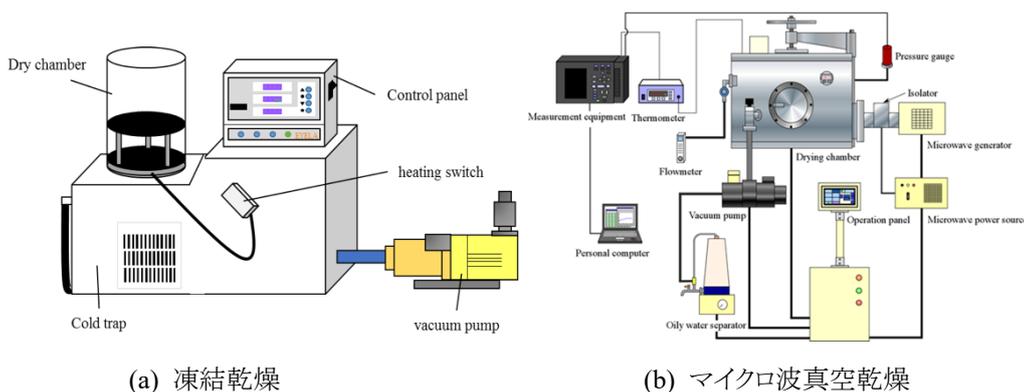


図2 乾燥実験装置

(2) 乾燥後の分子構造解析

タンパク質製剤の評価として、タンパク質の変性の有無を確認することは不可欠である。そのため、プロテアーゼの変性温度の測定、及び乾燥後の卵白、リゾチーム、プロテアーゼの分子構造の確認のため、円二色性分散計（以下 CD と略す；日本分光 J-820）を用いて分子構造解析を行った。プロテアーゼの変性温度測定は、25~85℃の範囲で 10℃ずつ測定温度を変化させて出力される波形を比較した。乾燥後の分子構造の確認は、乾燥処理を施した試料、および熱損傷を示す参照試料として 98℃で 10 分加熱した後 25℃で 20 分間静置した試料、そして何も施さない水溶液を用意し、波形を比較した。なお、紫外線可視分光光度計（以下 UV と略す；日立ハイテクサイエンス U-3310）を用いて同じ濃度となるよう調整し、その溶解液には全て超純水を用いた。

4. 研究成果

計画当初は、静的なフィルム状乾燥を想定していたが、発泡現象を伴うダイナミックな泡乾燥を行えば非常に高速な乾燥が可能になることがわかり、特許申請に繋がったので、この発泡乾燥についての成果を中心に報告する。

(1) 卵白アルブミンの発泡乾燥特性

発泡を伴わない静的な乾燥に比べ、試料を発泡させる乾燥は乾燥時間の大幅な短縮が期待できる。そこでマイクロ波出力条件を 200W, 150W, 100W, 50W と変化させて、乾燥試料の形態、およびその形態の違いによる乾燥時間の変化を調べた。乾燥後の卵白ようすを図 3 に示す。出力が 200W, 150W では乾燥開始から終了まで発泡は確認できたが、100W では乾燥終盤では発泡が収まり、50W では気泡は見られるが、その後気泡が膨らむことはなかった。図 4 にそれぞれの乾燥時間を比較しており、発泡した試料は静的なフィルム乾燥に比べて乾燥時間が非常に短くなり、FD と比較すると乾燥時間は 10 分の 1 ほどに短縮できることがわかった。また、その際の状態変化を温度情報とともに図 5 に示すが、発泡により問題なくガラス転移している。

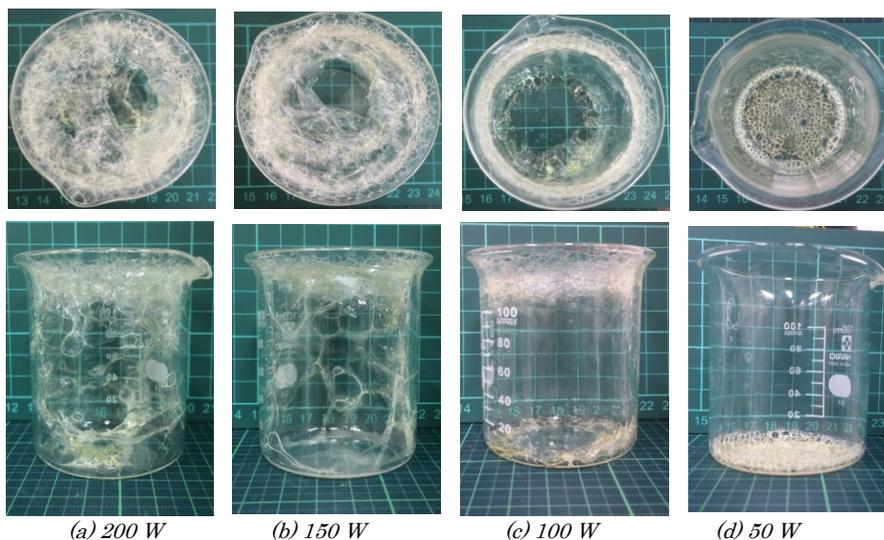


図 3 乾燥後の卵白の状態

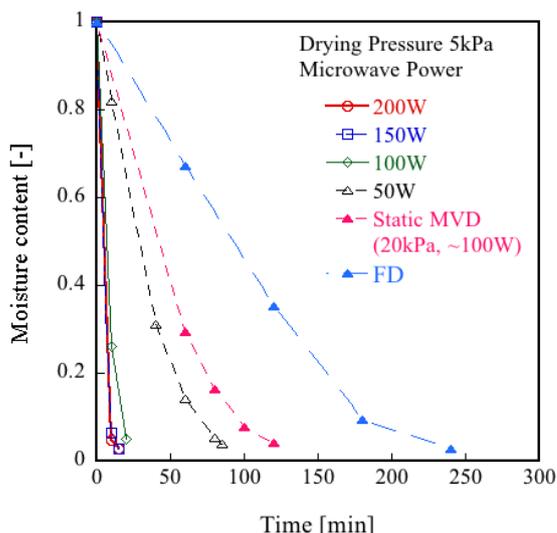


図 4 卵白の乾燥速度

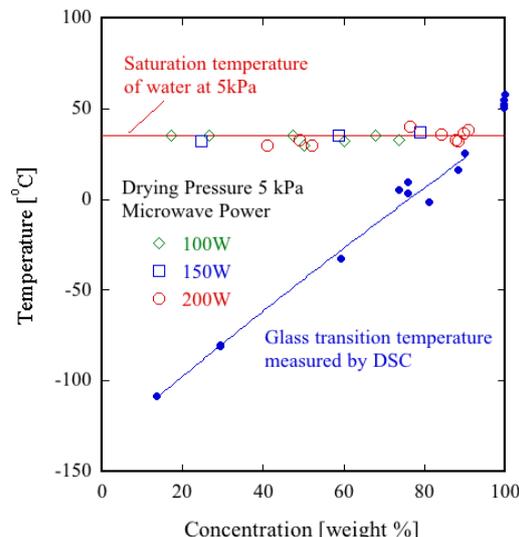


図 5 卵白の発泡乾燥時の状態（温度）変化

(2) 卵白アルブミンの分子構造解析

卵白に含まれるタンパク質の大部分はアルブミンであり、CD スペクトルの 210nm と 220nm 付近に負の極大値が見られることが知られている。その CD スペクトル特性を分子構造維持の指標と考え、結果を図 6 に示す。98°C で変性させた試料は 210nm と 220nm 付近の極大値が消えるのに対し、発泡させずに静的に乾燥した試料、および発泡乾燥した試料とも未処理の試料と同様に 2 つの極大値が確認でき、卵白の分子構造が乾燥後も維持されることがわかった。

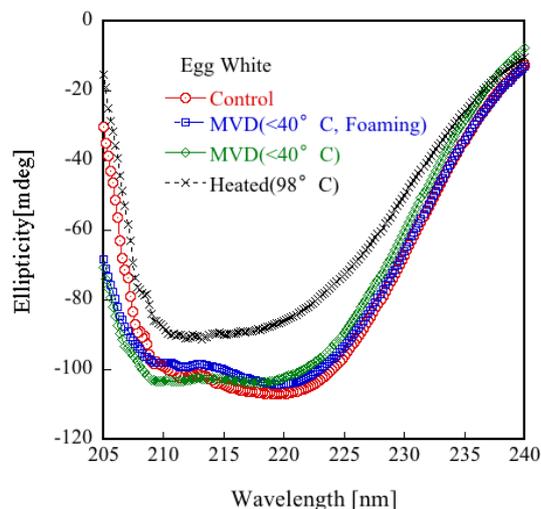


図 6 卵白アルブミンの α ヘリックス構造を示す CD スペクトル特性

(3) プロテアーゼの乾燥特性と分子構造解析

プロテアーゼは種類によって変性温度が異なるため、あらかじめ変性温度を測定し、乾燥温度の目安とした。その結果より、プロテアーゼは CD スペクトルの波長 230nm 付近に負の極大値を持ち、その極大値は温度の上昇に伴って小さくなり、45°C から 55°C にかけて最も波形の変化が大きくなることから、プロテアーゼの変性温度はおよそ 50°C と推定され、卵白やリゾチームと比較して変性温度が低く、熱による影響を受けやすいことがわかった。

そこでプロテアーゼの MVD においては、40°C 以下で乾燥を行った。図 7 はそれぞれの乾燥時間の比較であり、プロテアーゼにおいても卵白と同様に、発泡乾燥を用いることで乾燥時間を大幅に短縮することができた。また、プロテアーゼの構造解析の結果を図 8 に示すが、マイクロ波を用いて乾燥したプロテアーゼは未処理のものと同様の CD スペクトルとなっており、構造が維持されていることが確認できた。この結果より、リゾチームよりも変性温度が低いプロテアーゼにおいても、MVD および発泡乾燥の適応が可能と考えられる。

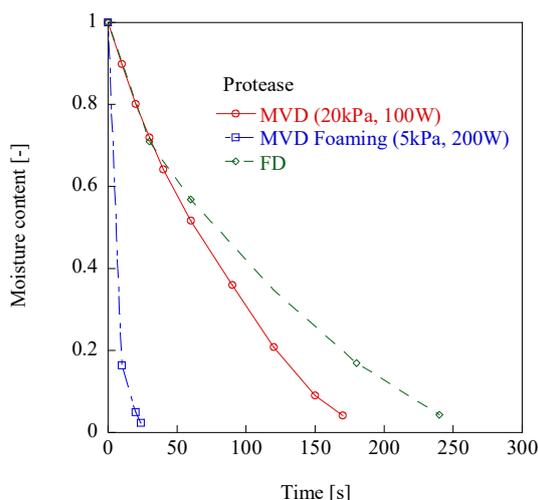


図 7 プロテアーゼの乾燥特性比較

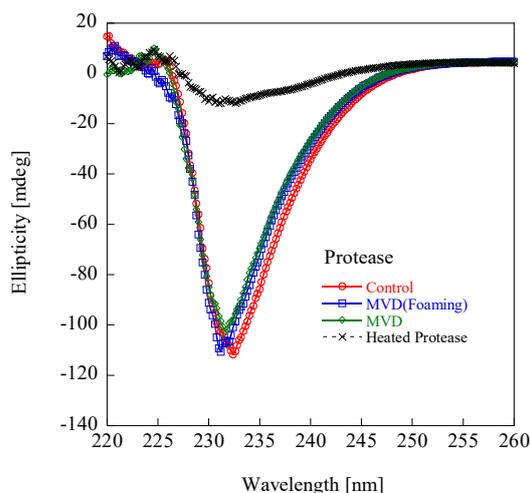


図 8 プロテアーゼの構造解析結果

(4) マイクロ波発泡乾燥の有効性と今後の課題

マイクロ波を用いて減圧乾燥を行えば、タンパク質水溶液を常温（室温）下において乾燥濃縮することができ、濃縮によるガラス転移温度の上昇によって、やがてはガラス転移が生じるため、タンパク質のガラス化保存が可能なが実証された。さらに、静的なフィルム乾燥だけでなく、発泡を伴う泡乾燥とすれば、より高速な乾燥とすることができ、適正な温度管理を行えば、タン

パク質の構造が維持されることを明らかにした。

今後は、高度に濃縮された高粘度の状態での泡形成の可能性、つまりは乾燥速度を如何に維持するかが課題である。

<引用文献>

- (1) Vázquez-Rey, M.; Lang, D.A. Review; Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnology and Bioengineering* 2011, 108 (7), 1494-1508.
- (2) 鶴田隆治, 林伊久, マイクロ波を用いた減圧乾燥法, 特許第 4474506, 2010 年登録
- (3) Tsuruta, T.; Hayashi, T. Enhancement of microwave drying under reduced pressure condition by irradiation control and external air supply. In *Proceedings of the Third Nordic Drying Conference NDC2005*, Karlstad, Sweden, June 15-17, 2005.
- (4) Tsuruta, T.; Tanigawa, H.; Sashi, H. Study on shrinkage deformation of food in microwave-vacuum drying. *Drying Technology* 2015, 33(5), 1830-1836.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) Takaharu TSURUTA, Takuma OGAWA, Ryosuke ABE, Hirofumi TANIGAWA, Ambient temperature drying of therapeutic protein solution with use of microwave, *Proceedings of 21st International Drying Symposium*, 査読有, 2018, pp.651-658.
DOI:10.4995/ids2018.2018.7537

[学会発表] (計 3 件)

- (1) Takaharu Tsuruta, Takuma Ogawa, Kotone Fujita, Hirofumi Tanigawa, Microwave Foam-Drying of Egg White, *EuroDrying' 2019*, 7th European Drying Conference, 2019.
- (2) 藤田琴音, 小川拓馬, 鶴田隆治, 谷川洋文, 生物由来タンパク質製剤のマイクロ波発泡乾燥の可能性, 第 56 回日本伝熱シンポジウム, 2019.
- (3) 小川拓馬, 鶴田隆治, 谷川洋文, 生物由来水溶性タンパク質のマイクロ波真空発泡乾燥, 日本機械学会熱工学コンファレンス 2018, 2018.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 生体由来の水溶性高分子乾燥品の製造方法及びその製造装置

発明者: 鶴田隆治

権利者: 国立大学法人九州工業大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-124490

出願年: 2018 年

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.heat.mech.kyutech.ac.jp>