

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究(C)	
研究期間：2006年度～2008年度	
課題番号：18560722	
研究課題名(和文)	PEG化生理活性蛋白質の新規噴霧乾燥手法の構築
研究課題名(英文)	Powderization of PEGylated enzyme by a newly developed spray-drying process
研究代表者	古田 武 (FURUTA TAKESHI) 鳥取大学・工学研究科・教授 研究者番号：10026164

研究成果の概要：

生物から得られた酵素蛋白質はポリエチレングリコール(PEG)を結合させることにより、体内での安定性が改善される。本研究は、PEG化カタラーゼの噴霧乾燥粉末化における、失活防止を目的としたものである。マンニトールを賦形剤とした場合、PEG化により乾燥中の活性安定性が改善された。マンニトールは60℃という非常に低い熱風温度においてカタラーゼを噴霧乾燥できたが、乾燥中に結晶化しやすく、これを防止する賦形剤の選定が重要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,500,000	0	2,500,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	330,000	3,930,000

研究分野：化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学，化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：PEG化カタラーゼ，噴霧乾燥酵素粉末，カタラーゼ，結晶化，マンニトール

1. 研究開始当初の背景

蛋白質製剤は医薬品として確実な地位を築きつつあるが、一般に体内での安定性、抗原性に問題がある。これらの問題点を解決させるための一手段としてポリエチレングリコール(PEG)誘導体による修飾化が進められており、C型肝炎治療薬としてのPEG-IFN α -2bをはじめとして、徐々に医薬品としての地位を築きつつある。このPEG生理活性蛋白質は凍結乾燥法により作製されているが、本製剤を必要とする患者を有する国では、噴霧乾燥などの安価な製造手法が切望されている。噴霧乾燥法は高温の熱風を使

用するため、乾燥中に蛋白質が熱変性し、活性低下を招く恐れがある。しかしながら、PEG化蛋白質を噴霧乾燥中に安定に保持するための粉末化手法についての研究は、まったく実施されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、噴霧乾燥法による生理活性分子の粉末化で最も深刻かつ緊急の問題である乾燥中の失活防止を目的としたものであり、以下の点を検討する。

(1) PEG化および蛋白質添加による生理活性分子の噴霧乾燥安定化と気液界面への吸着

阻害に関する工学的解析

(2) 噴霧乾燥粒子内の生理活性分子の存在分布測定と乾燥中の拡散理論による解析

(3) 噴霧乾燥生理活性分子の保存安定性と噴霧乾燥粒子形態との関連性

3. 研究の方法

アルコール脱水素酵素(ADH), カタラーゼをモデル生理活性物質とし, 主たる賦形剤としてトレハロース, マンニトール, マルトデキストリンおよびそれらの混合物を用いた. 噴霧乾燥器は Büchi B-290 型を使用した. 種々の乾燥条件における, 噴霧乾燥粉末酵素の活性残存率を測定した. また, PEG 化酵素として, これらの酵素の PEG 誘導体を作製したが, 誘導体酵素の活性低下が激しく, 研究材料として使用することができなかつたため, PEG 化酵素としては市販の PEG 化カタラーゼを使用した. 噴霧乾燥による粉末作製法および酵素活性測定法の詳細に関しては雑誌論文②, ③, および⑫, 学会発表①, ③, ⑨, ⑫, ⑬, ⑱および⑲を参照.

4. 研究成果

(1) ADH の噴霧乾燥における酵素活性保持の研究

ADH をトレハロース賦形剤で噴霧乾燥する際に, 蛋白質 Bovine Serum Albumin (BSA), Lactoglobulin (β -Lg) を賦形剤溶液に微量添加し, 酵素活性残存率, 粉末形状に及ぼす影響について検討した.

① ADH 残存活性に与える酵素濃度の影響

図1は噴霧乾燥した ADH 粉末の残存活性を噴霧溶液中の ADH 濃度に対して点綴した結果である. ADH の濃度と共に粉末の ADH 残存活性は増加するが, 1.0 mg/g-トレハロース以上の濃度で一定値に漸近した.

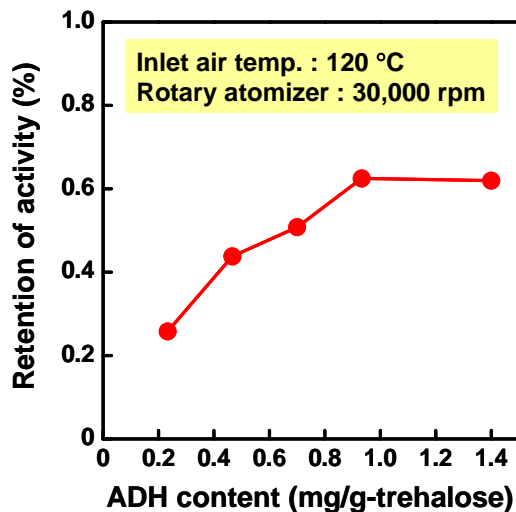


図1 噴霧溶液中の ADH 濃度が残存活性に与える影響

② ADH 残存活性に与える蛋白質の影響

図2は乾燥粉末の ADH 残存率を, ADH と添加蛋白質 (BSA または β -Lg) 量の和に対して表したものである. 蛋白質を添加することによって, ADH 活性は添加しない場合と比べて顕著に増加している. このことは, これらの蛋白質を添加することにより, 蛋白質濃度を増加させる以外の付加的な効果が現れていることを示している.

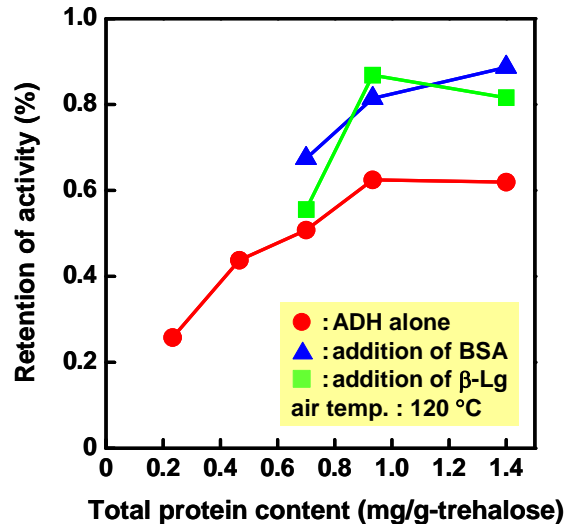


図2 微量蛋白質の添加が ADH 残存活性に与える影響

乾燥粉末の表面組成を ESCA によって測定したところ, 乾燥溶液中に添加した蛋白質量の増加に比例して粒子表面の蛋白質濃度が増加し, ADH の存在割合が減少していた. このことから添加した BSA または β -Lg は, 競争的に液滴表面に配向し, ADH と熱風との直接接触を保護し, ADH の活性が保持されたのではないかと推測できる.

③ ADH 残存活性に与える熱風温度の影響

図3は噴霧乾燥前後の酵素活性残存率に対

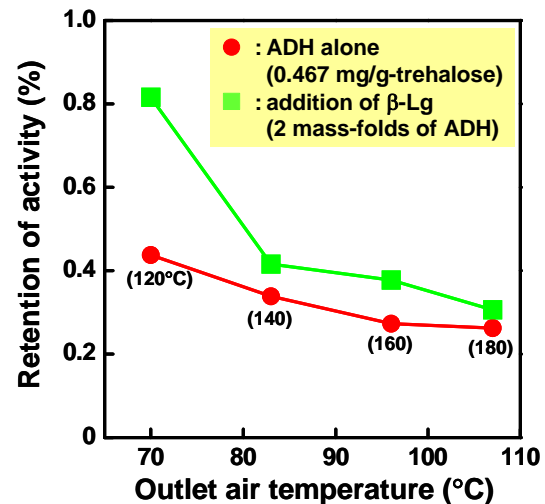


図3 乾燥空気温度が残存活性に与える影響

する出口温度（図中の括弧内の数値は、対応する入口熱風温度を示す）を表したものである。出口温度の上昇により酵素活性残存率は低下したが、蛋白質無添加の場合と比べ、ADH 量に対し 2 重量倍の β -Lg を添加した粉末の方が残存活性率が高い。これは添加する蛋白質量を増加させることにより酵素活性残存率が高くなったように、蛋白質の添加が熱風から ADH を保護しているのではないかと考えられる。

③ 噴霧乾燥粒子の形状変化

噴霧乾燥 ADH 粒子の SEM 写真を図 4 に示す。BSA や β -Lg を添加しない粒子は表面が滑らかな球状粒子であるが、BSA や β -Lg を微量添加した乾燥粒子は表面に不規則な凹凸が生じている。すなわち、これらの蛋白質が液滴表面に配位し、表面が特異な形状になったと考えられる。

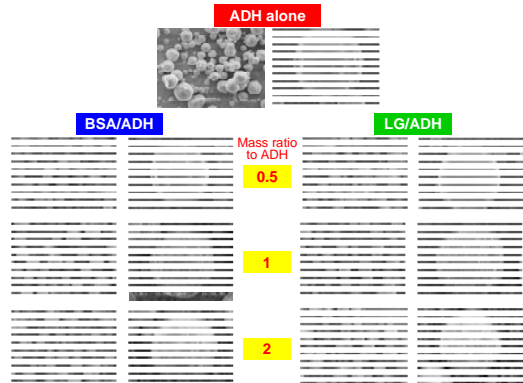


図 4 噴霧乾燥 ADH 粒子の SEM 画像。微量蛋白質添加が粒子形状に与える影響

(2) カタラーゼおよび PEG 化カタラーゼの噴霧乾燥における酵素活性保持の研究

カタラーゼまたは PEG 化カタラーゼを、マンニトールを賦形剤として噴霧乾燥し、作製した酵素粉末中の酵素活性残存率を測定し

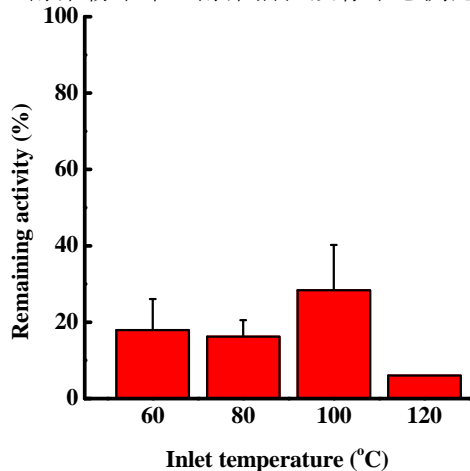


図 5 噴霧乾燥カタラーゼの酵素活性残存率に与える熱風入口温度の影響

た。

① 噴霧乾燥カタラーゼの酵素活性残存率に与える乾燥条件の影響

マンニトールを賦形剤として利用することによって、従来粉末化が非常に困難であった噴霧入口熱風温度 60 °C での酵素の粉末化が可能となった。しかしながら、粉末化したカタラーゼの残存酵素活性は図 5 から明らかなように、30 % 以下という非常に低い値を示した。これは、噴霧乾燥中にマンニトールの結晶析出が起こり、これによってカタラーゼが変性するためと考えられる。図 5 から明らかなように、マンニトールを主賦形剤とした場合、入口熱風温度 100 °C において最も高い活性残存率を示した。

② 賦形剤の残留酵素活性への影響

噴霧乾燥中のマンニトールの結晶析出を阻害する目的で、マルトデキストリン (MD, DE = 11) をマンニトールに等量混合し、賦形剤として使用した。図 6 にマンニトールと MD の等量混合物を賦形剤として、カタラーゼを噴霧乾燥した場合の酵素活性残存率を入口熱風温度に対して示す。図 5, 6 を比較すると、すべての入口熱風温度において MD 等量混合賦形剤を使用した方が残留酵素活性は著しく増加した。これは、後述するように、MD を混合することにより、マンニトールの結晶化が阻害されたためと考えられる。また、図 5 と同様に入口熱風温度 100 °C において最も高い酵素活性残存率を示した。マンニトールを主賦形剤とした場合の酵素粉末中の含水率が約 0.04 wt% であったのに対し、マンニトールと MD を等量混合した場合は約 5~6 wt% の含水率を示した。ADH 噴霧乾燥粉末の場合、粉末含水率が高い方がより高い活性残存率を示すことが報告されている。従って、MD を等量混合することによって粉末含水率が増加したことも残存酵素活性の改

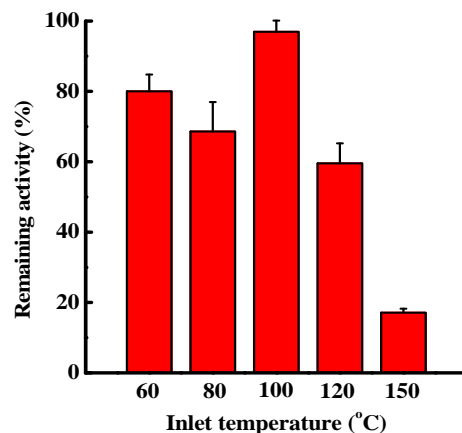


図 6 マルトデキストリンとマンニトールの等量混合賦形剤が残留酵素活性に与える影響

善の一因と推察される。

③ 噴霧乾燥マンニトール粉末の X 線回折
MD がマンニトールの結晶化に与える影響を調べるために、噴霧乾燥粉末の X 線回折を測定した。図 7 は 10wt% のマンニトール水溶液と、マンニトールと MD の等量混合粉末の 10 wt% 水溶液を、入口熱風温度 100°C で噴霧乾燥して得られた粉末の X 線回折結果である。マンニトールと MD の等量混合粉末の X 線強度はマンニトール粉末のそれに比して約 1/7 以下になっており、マンニトールの結晶化を著しく阻害している。図 6 で示したように、マンニトールと MD の等量混合粉末を賦形剤とした酵素粉末の残存活性が高いのは、MD によるマンニトールの結晶化阻害の結果と考えることができる。

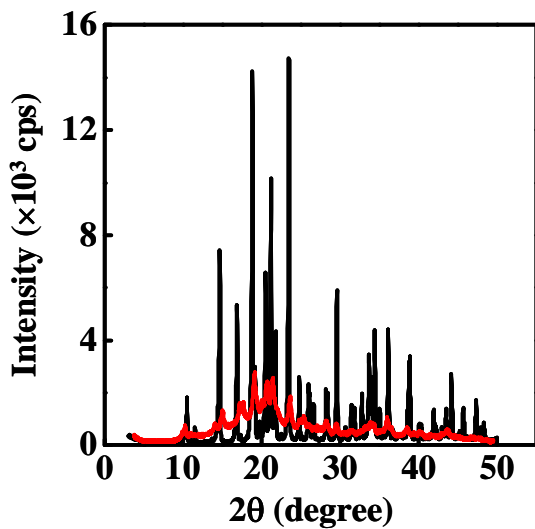


図 7 噴霧乾燥マンニトール粉末の X 線回折
— マンニトール粉末
— マンニトールと MD の混合粉末

④ PEG 化カタラーゼ水溶液の熱安定性と噴霧乾燥 PEG 化カタラーゼ粉末の酵素活性残存率

PEG 化カタラーゼ水溶液の熱安定性の測定結果を図 8 に示す。PEG 化カタラーゼの熱失活は加熱初期 20 min に著しく、特に 50 °C ではこの間に約 50 % が失活する。しかしながら 40 °C 以下では安定であり、30 °C においては 120 min 後もほぼ 100 % の安定性が得られている。

マンニトールを賦形剤とし PEG 化カタラーゼを噴霧乾燥した場合の入口熱風温度と酵素活性残存率の関係を図 9 に示す。図 5 と比較すると、PEG 化カタラーゼ粉末は約 2~3 倍の残存酵素活性を示した。これは、PEG 化によりカタラーゼの熱安定性が向上したためと推察される。PEG 化カタラーゼの残存酵素活性は入口熱風温度の増加と共に一様に減少した。

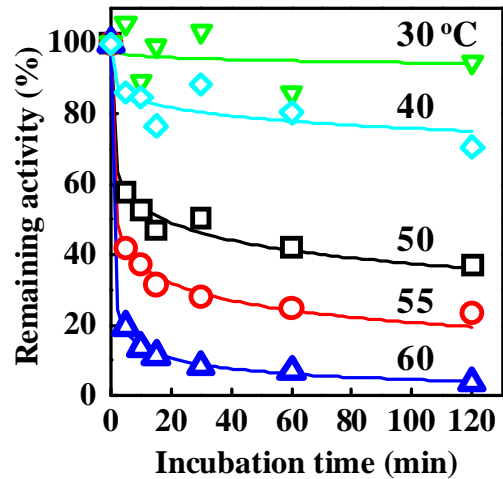


図 8 PEG 化カタラーゼ水溶液の熱安定性

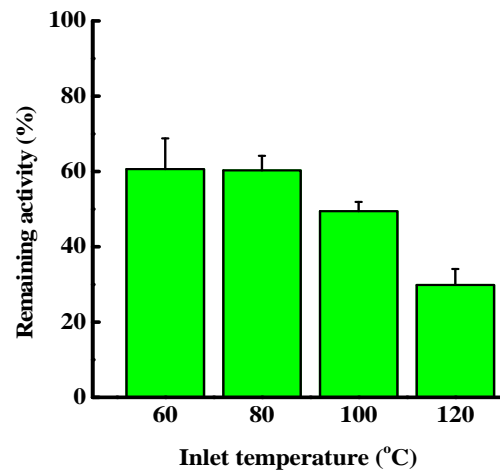


図 9 種々の入口熱風温度における噴霧乾燥 PEG 化カタラーゼ粉末の酵素活性残存率

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① T. L. Neoh, K. Yamauchi, H. Yoshii and T. Furuta, Kinetic study of thermally stimulated dissociation of inclusion complex of 1-methylcyclopropene with α -cyclodextrin by thermal analysis, J. Phy. Chem. B, 49, 15914-15920 (2008), 査読有
- ② H. Yoshii, T. L. Neoh, T. Furuta and M. Ohkawara, Encapsulation of protein by spray drying and crystal transformation method, Drying Technol., 26, 1308-1312 (2008), 査読有
- ③ H. Yoshii, F. Buche, N. Takeuchi, C. Terrol, M. Ohgawara, T. Furuta, Effects of protein on retention of ADH enzyme activity

- encapsulated in trehalose matrices by spray drying, *J. Food Eng.*, 87, 34-39 (2008), 査読有
- ④ 大橋 哲也, 渋谷 孝, 奥 和之, 吉井英文, 古田 武, 多孔性無水結晶糖質による亜麻油の包括粉末化, *日本食品科学工学会誌*, 55, 13-17 (2008), 査読有
- ⑤ T. L. Neoh, K. Yamauchi, H. Yoshii and T. Furuta, Kinetics of Molecular encapsulation of 1-methylcyclopropene into α -cyclodextrin, *J. Agric. Food Sci.*, 55, 26, 11020-11026 (2007), 査読有
- ⑥ A. Sootitawat, Y. Ikuta, H. Yoshii, T. Furuta, M. Päivi, F. Pirkko and P. Kaisa, Visual observation of hydrolyzed potato starch granules by α -amylase with confocal laser scanning microscopy, *Starch/Stärke*, 59, 543-548 (2007), 査読有
- ⑦ H. Yoshii, A. Sakane, D. Kawamura, T-L. Neoh, H. Kajiwara and T. Furuta, Release kinetics of (-)-menthol from chewing gum, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.*, 57, 591-596 (2007), 査読有
- ⑧ A. Sootitawat, J. Peiney, Y. Uekaji, H. Yoshii, T. Furuta, M. Ohkawara, P. Linko, Structural analysis of spray-dried powders by confocal laser scanning microscopy, *Asia-Pac. J. Chem. Eng.*, 2(1), 41-46 (2007), 査読有
- ⑨ T. Ohashi, H. Yoshii, and T. Furuta, Innovative crystal transformation of dihydrate trehalose to anhydrous trehalose using ethanol, *Carbohydr. Res.*, 342, 819-825 (2007), 査読有
- ⑩ T. Ohashi, H. Yoshii, T. Furuta, Effect of drying methods on crystal transformation of trehalose, *Drying Technology*, 25, 1305-1311 (2007), 査読有
- ⑪ T-L. Neoh, H. Yoshii and T. Furuta, Encapsulation and release characteristics of carbon dioxide in α -cyclodextrin, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.*, 56, 125-133 (2006), 査読有
- ⑫ H. Yoshii, T. Ohashi, T. Furuta and P. Linko, Enzyme encapsulation with crystal transformation of anhydrous maltose or anhydrous trehalose, *J. Appl. Glycosci.*, 53, 99-103 (2006), 査読有
- ⑬ 古田 武, 食品工学および粉末化学に関する研究, *日本食品工学会誌*, 7, 153-161 (2006), 査読有
- ⑭ 古田 武, 噴霧乾燥による液状食品の粉末化技術, *粉体と工業*, 38, 30-40 (2006), 査読有
- 文, 噴霧乾燥による酵素の粉末化, 2009年3月, 横浜国立大学
- ② V. Lauruengtana1, H. Yoshii, T. Furuta, Y. Murakami, M. Kanai, H. Iefuji, Spray drying of *Saccharomyces cerevisiae* K-9 containing S-Adenosyl-L-methionine, 日本農芸化学会2009年大会, 2009年3月, 福岡
- ③ 吉井英文, 山内浩資, H. JOREAU, 古田武, マンニトールを基本賦形剤とした酵素粉末の作製, 日本農芸化学会2009年大会, 2009年3月, 福岡
- ④ V. Paramita, K. Iida, H. Yoshii and T. Furuta, Effect of Feed Liquid Temperature on the Morphology of Spray-dried Powder, Proceedings of the 16th International Drying Symposium (IDS2008), Hyderabad, India, 159-164, November 2008.
- ⑤ 山内浩資, 吉井英文, 古田 武, Influence of protein-pectin multilayer interfacial membranes on O/W emulsion, 日本食品工学会2008年大会, 2008年8月, 東京海洋大学
- ⑥ H. Yoshii, T-L. Neoh, T. Furuta and S. Inoue, Coagulation Inhibition of Soy Milk with Nigari by Soybean Water-soluble Polysaccharides, 10th International Congress on Engineering and Food, Viña del Mar, Chile, J19, April 2008.
- ⑦ V. Paramita, K. Iida, T-L. Neoh, H. Yoshii and T. Furuta, Influential Drying Conditions on Morphology of Spray-dried Powders of Model *d*-Limonene Emulsion, 10th International Congress on Engineering and Food, Viña del Mar, Chile, Q14, April 2008.
- ⑧ H. Yoshii, M. Yasuda, H. Tobe, T-L. Neoh, and T. Furuta, Encapsulation of MCT oil in modified starches by spray drying, 233rd American Chemical Society National Meeting, AGFD 81, Chicago, August 2007
- ⑨ H. Yoshii, T-L. Neoh, M. Ohkawara and T. Furuta, Encapsulation of proteins by spray drying and crystal transformation method, The Proceeding of the 5th Asian-Pacific Drying Conference, 17-24, 2007
- ⑩ H. Yoshii, D. Kawamura, T-L. Neoh, M. Ohkawara and T. Furuta, Visualization of flavor release in the spray-dried particle by confocal laser scanning microscopy, The Proceeding of the 5th Asian-Pacific Drying Conference, 317-336, 2007
- ⑪ H. Yoshii, A. Sootitawat, K. Iida, M. Ohgawara and T. Furuta, Effect of additives on the formation of hollow particles in spray-dried powders, Proceedings of the 15th International Drying Symposium, Budapest, Hungary, 1339-1344, August 2006.

[学会発表] (計20件)

- ① 古田 武, 山内浩資, H. JOREAU, 吉井英

- ⑫ H. Yoshii, F. Buche, N. Takeuchi, M. Ohgawara and T. Furuta, Effect of protein on retention of ADH enzyme activity encapsulated in trehalose matrices by spray drying, CHISA 2006, P1.281-0, October 2006.
- ⑬ H. Yoshii, F. Buche, N. Takeuchi, M. Ohgawara and T. Furuta, Effects of fortifying protein on conservation of ADH enzyme activity encapsulated in trehalose matrices by spray drying, Proceedings of the 15th International Drying Symposium, Budapest, Hungary, August 2006, 1139-1142, 2006.
- ⑭ H. Yoshii, A. Sakane, D. Kawamura, T.L. Neoh, H. Kajiwara and T. Furuta, Release kinetics of menthol from chewing gum. Proceedings of the 13th International Cyclodextrin Symposium, Torino, May 2006, 6-P02-0, 2006.
- ⑮ T. Ohashi, H. Yoshii and T. Furuta, Innovative crystal transformation of trehalose by the use of ethanol and the structure of the transformed anhydrous trehalose. Proceedings of the 15th International Drying Symposium, Budapest, Hungary, August 2006, 1287-1292, 2006.
- ⑯ A. Soottitantawat¹, T. Yamamoto, A. Endo, T. Ohmori, M. Nakaiwa, H. Yoshii and T. Furuta, The releasing of encapsulated flavor from the spray dried powder, Proceedings of the 15th International Drying Symposium, Budapest, Hungary, August 2006, 1356-1360, 2006.
- ⑰ 竹内奈緒美, 古田 武, 吉井英文, 大橋哲也, 大川原正明, アルコール脱水素酵素の噴霧乾燥法による作製. 化学工学会第38会秋季大会, 2006年9月, 福岡大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

古田 武(FURUTA TAKESHI)

鳥取大学・工学研究科・教授

研究者番号：10026164

(2)研究分担者

吉井 英文(YOSHII HIDEFUMI)

鳥取大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60174885