

TED Plaza

バイオ医薬品のためのタンパク質水溶液のマイクロ波常温発泡乾燥



鶴田 隆治

九州工業大学 教授
 工学研究院機械知能工学研究系
 tsuruta.takaharu393@mail.kyutech.jp

1. はじめに

バイオ医薬品は、遺伝子組換え技術や細胞培養技術を用いて製造されたタンパク質を有効成分とする医薬品である。化学合成の低分子医薬品に比べて分子量が大きく、構造も複雑であって、その特性や性質は製造工程自体に依存するため、異なる製造者が同じものを作ることは困難とも言われている（松崎，2013）。その開発は1980年代から本格的に行われ、タンパク質本来の生理活性に基づく優れた薬効や速攻性および治療範囲の広さから利用が急速に進んでいる。最近では、酵素、ホルモン、サイトカイン、インターフェロン、抗体、また本庶佑先生がノーベル医学生理学賞を受賞されたのを機に、がん免疫治療薬など、多くのバイオ医薬品の名を耳にする機会も多くなったのではないだろうか。

バイオ医薬品の製品形態としては、多くが注射剤として用いられるために液状の溶液製剤と、溶液での数カ月から数年間の保存安定性確保が困難なタンパク質の場合には、乾燥品としてのいわゆる用時溶解型製剤となっている。水溶液中のタンパク質分子は、活発な分子運動による化学変化や熱変性を受けやすく、また水溶液輸送時の振とうによる高次構造の崩壊などの物理変化を防止する必要もあり、保存安定性を向上させるために乾燥状態での製品化の必要性が高くなっている。

その方法としては凍結乾燥が主流となっているが、バイオ医薬品としての主薬の他に、水溶液状態でのタンパク質構造を物理・化学的に安定化させるための安定化（保護）剤、凍結過程を経ることによるpH変化に対するpH調整剤や、等張化剤、そして賦形剤などの添加剤を必要とし、製剤開発と実際の製造の各工程においてその最適化は重要となっている（伊豆津，2012）。特に、凍結乾燥過程はバイオ医薬品製造の最終工程になるため、添加剤とともに、複雑かつ長期間にわたる培養と精製過程を経て生産された主薬が凍結乾燥に進むことを考えれば、乾燥工程の失敗は許されるものではない。しかしながら、凍結乾燥では、添加剤を含むタンパク質水溶液の凍結プロセス（氷晶形成と成長）、低温・低圧下での氷晶の昇華である一次乾燥プロセス、そして氷晶昇華後にガラス化状態を保ちながら室温まで升温する二次乾燥プロセスなど、物理・化学的变化をもたらす可能性のある現象は多く介在して複雑なプロセスとなるため、新規に開発されるバイオ医薬品に最適な乾燥プロセスを設計するには多大な努力が必要とされる。また、一次乾燥には数日を要することも多く、真空ポンプや加熱・冷却のエネルギー消費を考えれば、極めて長い乾燥時間と多大なエネルギーは凍結乾燥の大きな課題である。そのため、新規薬剤開発を目指す製薬分野においては、凍結乾燥に代わる革新的な技術が切望されている（Walters, et al., 2014, Langford, et al., 2018）。

本稿では、常温乾燥法としてマイクロ波真空乾燥技術（鶴田，2017）を用いれば、タンパク質を失活させることなく乾燥できる可能性のあること、特に水溶液を泡状にすれば、より高速に乾燥が進むことを紹介する。

2. 凍結乾燥法とマイクロ波常温乾燥法の比較

まず、広範なタンパク質に利用可能な安定剤とされるショ糖水溶液を例とし、Franks・寺島の解説 (Franks, 寺島, 1996) をもとに、凍結乾燥プロセスの状態変化から紹介する. 図1では、溶質(ショ糖)濃度の増加とともに非晶質となるガラス転移温度 T_g が上昇する様子を示すとともに、各濃度に対する平衡凝固点と溶解度を示している. ただし、概略の説明のために数値的な厳密さは追求していない. 図中のAから始まる凍結乾燥過程では、冷却によって平衡凝固点を越えた過冷却状態Bで氷核生成が生じ、その後、氷結晶の成長とともに溶質の排除による凍結濃縮が進行する. それに伴い凝固点降下が生じ、引き続き冷却によって平衡凝固曲線上を高濃度側に進むと、やがて溶解度曲線との交点である共晶点 T_e に到達する. NaCl水溶液などは、明瞭な共晶点が存在して析出が始まるが、糖類の水溶液では凍結濃縮の進行によって残存溶液の粘性が非常に高くなるために糖が結晶になりづらく、共晶現象は生じないことが知られている. この領域では、溶液はシロップ状になり、次いでゴム状になるため、ゴム領域と呼ばれている. この間の粘度上昇は数桁にも上り、やがてC点でガラス転移曲線と交わり、事実上の凍結はこの点で終了する. この点の温度は T'_g と表され、最大濃縮相のガラス転移温度であり、濃縮相がガラス状態になっているため、この点より温度を下げて、さらなる凍結濃縮や氷結晶の成長、組成変化は生じない. ガラス状態の中に残る水は不凍水となる. したがって、凍結乾燥の一次乾燥はこの点を目標に行われ、氷晶の昇華後に多孔質状となった固体からの水分蒸発を行う二次乾燥に移行し、ガラス転移曲線上をCからDに進んで、凍結乾燥が終了する.

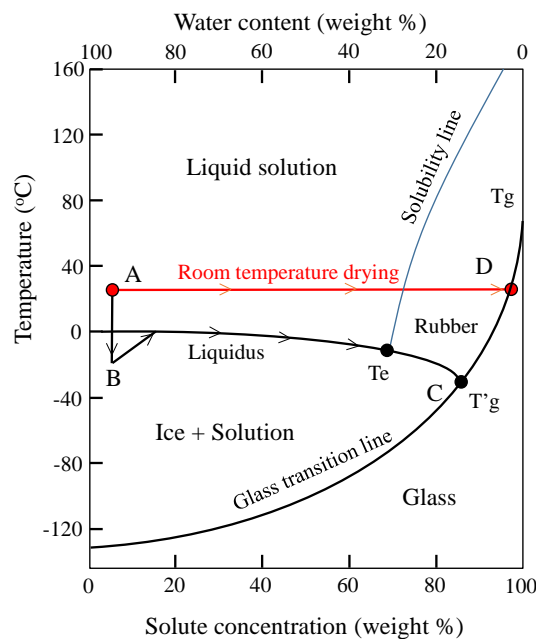


Fig. 1 Drying processes in solid/liquid phase diagram of the sucrose solution.

ガラス領域では、極度に高粘度になるため、物質の拡散速度が極めて低く、物理的、化学的、そして生物学的変化はおこらず、物質は安定に保たれる. 余談にはなるが、生体の凍結保存はこのガラス領域を利用するもので、A点から超急速冷却によってB点の氷核生成を回避してガラス領域に入り、解凍時にも水の再結晶化を回避してA点に戻るものである. 一方、雨で蘇る乾燥昆虫もこのガラス化によって代謝活動を制御し、生命活動を回復することが「乾眠」として知られている (古木他, 2009). この場合は、凍結の絡まない常温での乾燥によるガラス化で、恐らく本稿の主目的である常温乾燥A→Dの現象になろう.

つまり、図1の同じ出発点Aと目的点Dに対して、凍結乾燥の長くかつ複雑なプロセス(A→B→C→D)ではなく、常温のまま直接(A→D)となるプロセスが実現できれば、凍結乾燥よりも高い温度で水分蒸発が行われ、短時間の乾燥工程とすることが可能である. Franks・寺島の解説

によれば、この方法はパーマザイム法 (Permazyme Process) と呼ばれ、すでに特許化されて製薬会社などで採用されている。具体的な方法としては、室温程度の常温である必要性から真空乾燥や、ある程度の高温に耐えられる製品の場合にはスプレー乾燥が施される。さらに最近では、2018年9月にスペインのバレンシアで開催された第21回国際乾燥シンポジウム IDS'2018 において、米国Pfizer社のDr. Satoshi Ohtake が”Beyond freeze-drying of biologics: Vacuum-foam drying and spray freeze-drying”と題したキーノート講演を行なっており、真空泡乾燥やスプレー凍結乾燥が凍結乾燥を超える期待される技術であると紹介している (Langford, et al., 2018)。

要点としては、バイオ医薬品の活性低下につながる水分領域を短時間に通過すること、具体的には高粘度のゴム領域を高速で通過してガラス状態に移行することである。したがって、熱・物質輸送の観点に立てば、抵抗の小さい薄膜や微細液滴が有力であることは容易に想像できる。

3. マイクロ波常温乾燥法によるフィルム乾燥と泡乾燥

高速の常温乾燥を施す方法として、水の沸点を下げるために真空環境を用い、蒸発潜熱の供給にマイクロ波を用いる方法がある。ここで重要なのは、あくまで蒸発に必要な潜熱を供給することであり、蒸発を速めようとして不必要にマイクロ波強度を高めても、結果的に顕熱にしかならず、品温を上げてしまうことがある。この点に注意し、タンパク質水溶液を慎重にフィルム状に乾燥させた例と、より積極的に発泡をとまなげて乾燥させた場合について紹介する。なお、マイクロ波乾燥装置の詳細は、文献 (Tsuruta, et al., 2015) を参照願いたい。

3.1 静的なフィルム乾燥について

最初に、フィルム状に乾燥させた結果から紹介する (Tsuruta, et al., 2018)。図2は、卵白をマイクロ波真空乾燥 (MVD)、凍結乾燥 (FD)、そして1時間のMVDを行った後にFDで乾燥を行なったときの乾燥後の様子を比較したものである。MVDの圧力は20kPaとし、温度を40°C以下に保って行った。卵白は、およそ88%が水で、タンパク質の主成分は α ヘリックス構造を持つアルブミンである。容器は、直径50mm、高さ12mmのPFA皿で、試料として5gの卵白を入れると厚みが3mm程度となる。写真からもわかるように、MVDではとところどころに気泡痕があるものの、大半は生の状態と同じく無色透明の状態にあり、ガラス状態になっていることが伺える。

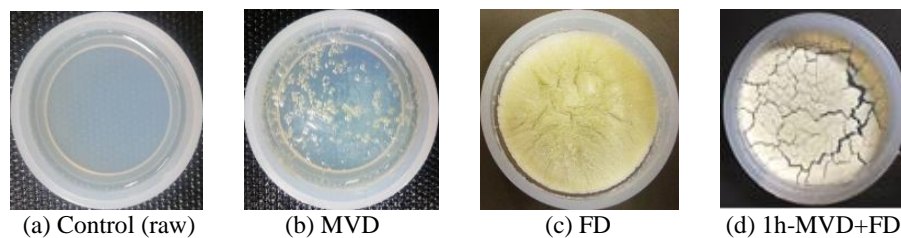


Fig. 2 Comparison of dried egg whites.

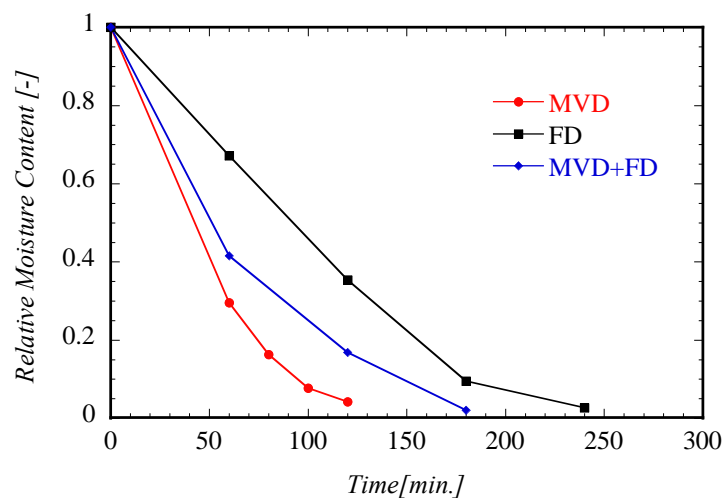


Fig. 3 Time transitions of moisture content ratio of egg whites.

この時の乾燥速度の比較を図3に示すが、最終水分率5%までにFDでは240分を要しているのに対し、MVDでは半分の120分で感想を終了している。なお、MVDとFDとを組合せた乾燥を行なったのは、乾燥品の溶解性を考え、FDによる多孔質化を重視したためである。

乾燥後の卵白アルブミンが、果たして元の構造である α ヘリックス構造を維持しているかどうかについては、円二色性分散計(CD)を用いてCDスペクトル解析を行い、波長210nmと220nm近傍に二つの負のピークを持つという α ヘリックス構造の特徴が確認できた(図8)。

また、タンパク質の構造だけでなく、その機能が失活していないかの確認も重要であるため、糖質加水分解酵素であるリゾチームがマイクロコッカス・ルテウスという細菌の細胞壁を分解することを利用して、残存活性の評価を行った。図4にその結果を紹介する。分光光度計を用いた吸光度の変化によってマイクロコッカス・ルテウスの濃度変化を把握する方法であるが、比較対象として98°Cに加熱処理をしたリゾチームの結果も示しており、加熱処理を行うと細菌濃度が減少しないことが確認できる。したがって、この結果が示すように、ここで示した3つの乾燥法の全てが、リゾチームの活性機能を保存できることがわかった。

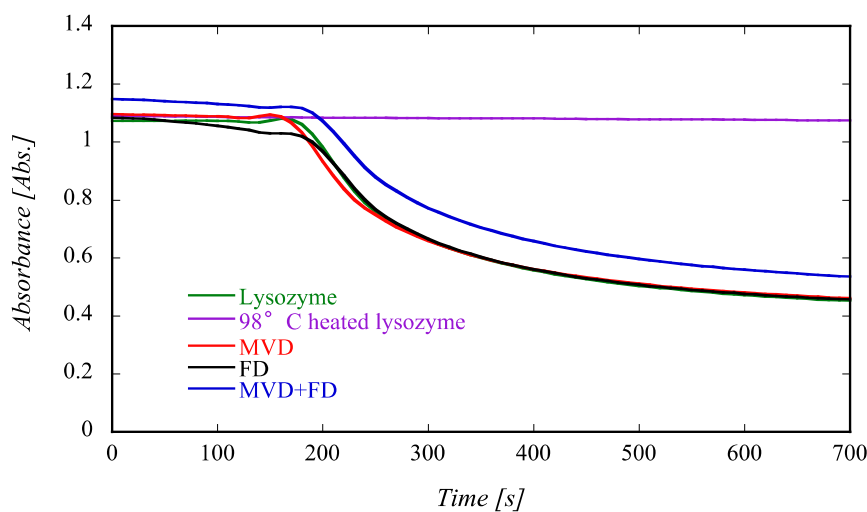


Fig. 4 Evaluation of residual activity of lysozyme with use of micrococcus luteus.

3・2 動的な発泡乾燥について

静的なフィルム状の乾燥では、図3に比較したように、さほどの乾燥速度の改善にはなっていないように思われる。そこで、圧力をより低圧の5kPa(飽和温度:33°C)とし、マイクロ波出力を変えて実験を行なった。その結果を図5と図6に示す。試料は同じく5gの卵白であるが、容器直径は50mmと同じであるものの、高さ70mmのガラス製ビーカーとした(Tsuruta, et al., 2019)。

図5は、乾燥終了後の卵白の様子を示しているが、マイクロ波照射強度が大きくなるにしたがって、泡の状態が多く残っているのがわかる。卵白はもともと発泡性が良いため、攪拌することによってメレンゲを作ることなど、日常でもよく目にするが、減圧下でのマイクロ波加熱でも泡状になることがわかる。50Wの照射強度では容器底部に気泡が発生するのみで、泡となってビーカー上部に上昇することはなかった。そのため、容器底部で小さな気泡痕を形成して乾燥を終えており、気泡痕の密度は多いものの、図2(b)で示したフィルム状でのガラス化乾燥と同様の乾燥形態にあると判断する。それに対して100W以上のマイクロ波照射強度では、容器底部で気泡が多く発生し、成長をともなって上部に一斉に上昇していった。この実験では、ビーカー上部から溢れることはなかったが、写真に見られるように70mmの高さまで到達している。乾燥の初期では、溶質濃度もまだ低く、粘度もさほど大きくはないため、泡となって上部に達した溶液は泡の消滅によってビーカー内面を重力によって流下する。図5(c)はこの時の泡の形成と安定性の関係を非常によく表現している。すなわち、泡が安定した状態のまま上部に留まってガラス化したものと、流下して下部に留まり、そのままフィルム状にガラス化したものに二分化されている。

150W以上にマイクロ波照射が大きいと、写真のように下部に溶液はほとんど残らず、その全てが泡の形態でガラス化乾燥している。つまり、底部の溶液層で発生する泡の上昇が、上部から

流れ落ちる溶液の流下を妨げつつ，泡の形状を保ったまま容器の内壁一面に付着し，その状態のままガラス化していると判断できる．泡の形成とその安定性が非常に重要なことを示している．

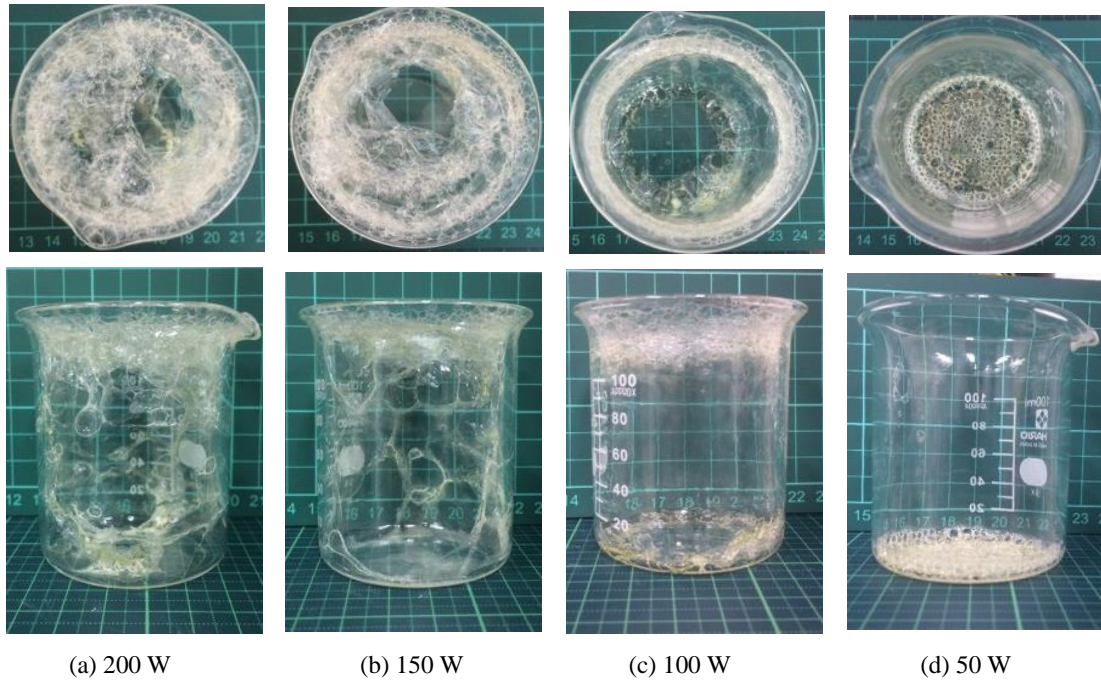


Fig. 5. Comparison of forming of egg white after microwave vacuum drying.

このときの乾燥速度を図 6 に見れば，発泡した試料の乾燥時間は非常に短くなっており，短時間に乾燥が終了している．FD と比較すれば，乾燥時間は 10 分の 1 ほどに短縮されており，泡形成が非常に有効であることがわかる．

この間の温度変化がはたしてどうなっていたかについては，図 7 に卵白の濃度を時間の代わりにとって示している．なお，この図は図 1 と同様に卵白の相図にもなっている．

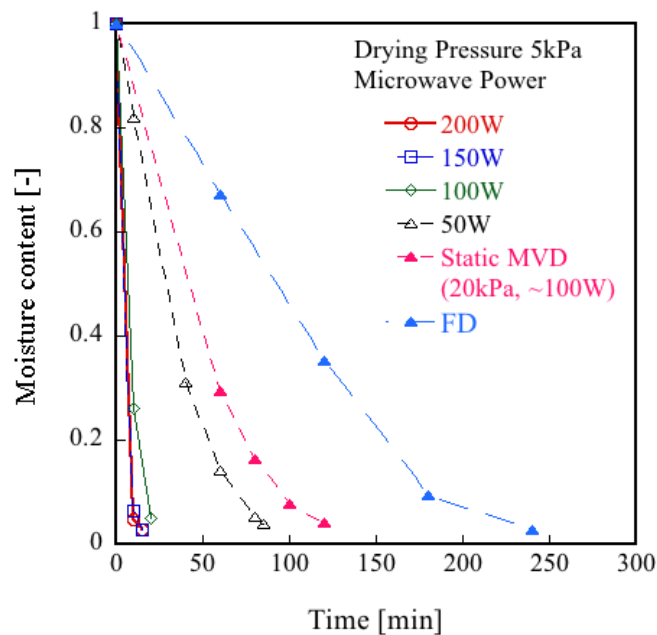


Fig.6 Comparison of drying rate of 5g egg white.

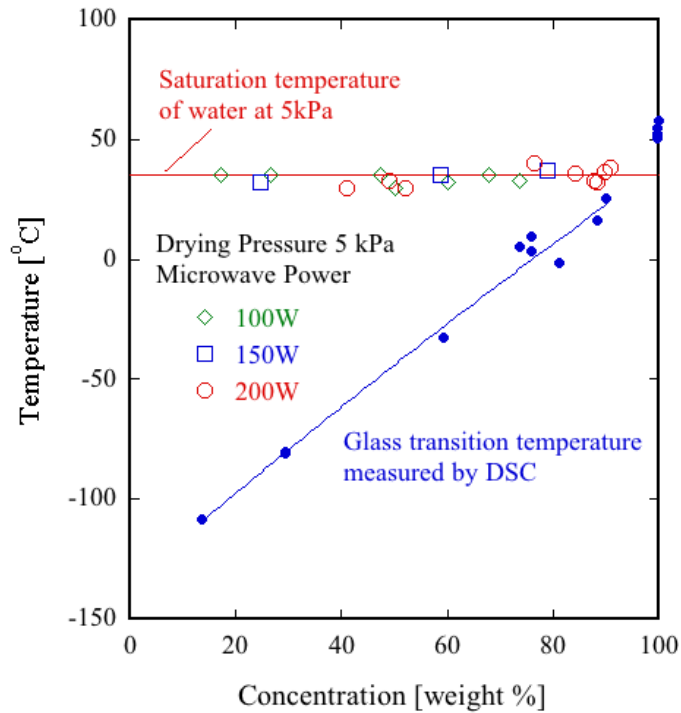


Fig. 7 Temperature changes of egg white in microwave foam drying as a function of concentration.

乾燥中の卵白の温度は、容器底部に設置した光ファイバー温度計によって測定しているが、底部に卵白がなくなった時の温度についての信頼性は低いものの、その出力値は圧力に対する飽和温度にほぼ保たれており、大きな差はないものと考えている。なお、図中の卵白のガラス転移温度は、示差走査熱量計（DSC）で実際に測定したものであり、乾燥終盤でガラス転移温度とほぼ交差していることから、乾燥後の状態はガラス状態にあると推定される。

実際に、フィルム乾燥の場合と同様に、CD スペクトル解析によって分子の構造解析を行うと、図 8 に示すように、98°Cに過熱処理した際には見られない、卵白アルブミンの α ヘリックス構造の特徴を示す二つの負のピーク値が確認でき、分子構造を維持していることが確認できる。

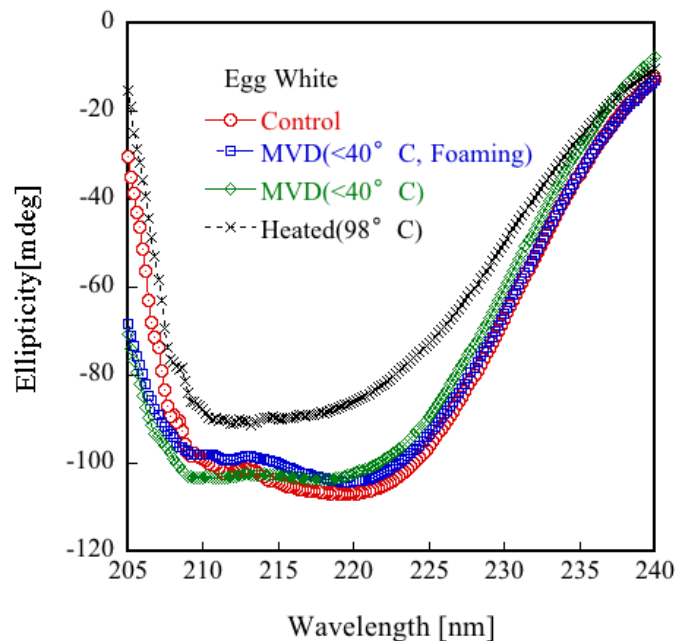


Fig. 8 CD spectrum change of dried egg white to examine the α -helix structure.

4. おわりに

本稿では、バイオ医薬品製造のための乾燥技術として、最も多用されている凍結乾燥法について触れた後、凍結過程を経ない常温乾燥の利点を挙げ、現在取り組んでいるマイクロ波を利用した発泡乾燥について紹介した。常温であることからタンパク質の構造崩壊や機能の失活を防ぐことが可能なこと、および泡の形態により高速乾燥となることについて、卵白のケースを中心に述べている。泡立ちの良い卵白に限るのではとの懸念もあることから、リゾチームやプロテアーゼ、スクロース水溶液についての検討も行っており、泡形成によって高速乾燥になることと、分子構造が維持できることを確認している(小川他, 2018)。発泡は、粘性が桁違いに大きくなる前であれば可能であり、そのままの状態乾燥できれば、バイオ医薬品の常温乾燥技術として有効な方法になるものと期待している。

なお、泡については、食品だけでなく、洗浄や消火技術など、非常に広範囲にその応用技術が考えられている(石井他, 2005)。また、泡の構造とそのダイナミクスといった基礎的内容についても、ラメラと呼ばれる薄い包膜やプラトー境界には多くの興味深い現象が関わっている。その膜厚は数百 nm から数 nm になり、二つの界面を有することなども、熱および物質伝達の観点からの熱工学的興味は尽きることがない。

謝 辞

タンパク質の構造と機能性評価においては、九州工業大学工学研究院物質工学研究系の竹中繁織教授にご協力いただいた。また、科学研究費補助金の挑戦的研究(萌芽) No.17K18843 および基盤研究(B) No.19H02081 を受けていることを記し、謝意を表す。

文献

- Franks, F., 寺島公信, 生物製剤の長期常温安定化への道, 蛋白質 核酸 酵素, Vol.41, No.6 (1996), pp.810-816.
- 古木隆生, 奥田隆, 黄川田隆洋, 櫻井実, 雨で蘇る乾燥昆虫の謎-ガラス化したトレハロースが水代替作用, *Netsu Sokutei*, Vol.36, No.2 (2009), pp.105-111.
- 石井淑夫編集, 泡のエンジニアリング, テクノシステム (2005).
- 伊豆津健一, タンパク質医薬品の凍結乾燥, 薬剤学, Vol.72, No.6 (2012), pp.353-358.
- Langford, A., Balthazor, B., Bhatnagar, B., Tchessalov, S., Hageman, M.J., Luka, A., Plitzko, M., Luy, B., Ohtake, S., Beyond freeze-drying of biologics: vacuum-foam drying and spray freeze-drying, IDS'2018 – Proceedings of the International Drying Symposium, Editorial Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain(2018), pp. 41-48.
- 松崎淳一, バイオ医薬品産業の現状と課題, 生物工学, Vol.91, No.9 (2013), pp.495-498.
- 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 講演論文集(2018), Paper No.0141.
- 鶴田隆治, マイクロ波を用いた多孔質体内の水分輸送促進と食品乾燥への応用, 伝熱, Vol.56, No.234(2017), pp.17-24.
- Tsuruta, T., Tanigawa, H., Sashi, H., Study on shrinkage deformation of food in microwave-vacuum drying, *Drying Technology*, Vol.33, No.5(2015), pp.1830-1836.
- Tsuruta, T., Ogawa, T., Abe, R., Tanigawa, H., Ambient temperature drying of therapeutic protein solution with use of microwave, IDS'2018 – Proceedings of the 21st International Drying Symposium, Editorial Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain (2018), pp. 651-658.
- Tsuruta, T., Ogawa, T., Fujita, K., Tanigawa, H., Microwave foam-drying of egg white, Proceedings of the Eurodrying'2019, Torino, Italy(2019), Paper No.84.
- Walters, R.H., Bhatnagar, B., Tchessalov, S., Izutsu, K.I., Tsumoto, K., Ohtake, S., Next generation drying technologies for pharmaceutical applications, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.103, No.9 (2014), pp.2673-2695.