【公開版】

平成２９年度

戦略的基盤技術高度化・連携支援事業

戦略的基盤技術高度化支援事業

「高品質かつ低コストのペプチド・核酸医薬原体の製造を可能にする高性能二段階孔構造精製担体の汎用化のための技術開発」

研究開発成果等報告書

平成３０年３月

担当局　近畿経済産業局

補助事業者　公益財団法人京都高度技術研究所

【公開版】

【公開版】

目　次

第１章　　研究開発の概要 1
１－１　研究開発の背景・研究目的及び目標 1
１－２　研究体制 9
１－３　成果概要 10
１－４　当該研究開発の連絡窓口 11
第２章　　本論　研究開発実施内容と成果 12
２－１　研究開発課題１．二段階孔粒子の粉砕・分級技術の開発 12
２－２　研究開発課題２．二段階孔粒子の構造設計技術の開発 17
２－３　研究開発課題３．二段階孔粒子の充填技術とペプチド精製計測技術の開発 23
第３章　　全体総括 29
３－１　複数年の研究開発成果 29
３－２　補助事業の成果に係る知的財産権の出願及び取得並びに論文掲載の有無及び内容 30
３－３　研究開発後の課題 30
３－４　事業化展開 31

【公開版】

第１章　　研究開発の概要

１－１　研究開発の背景・研究目的及び目標

（ａ）序論

今後の医薬品市場の成長拡大を牽引するペプチド医薬において、高品質かつ低コストの医薬品製造を可能にすることは、今後高成長は期待できない国民経済において最新の医学の進歩を国民が享受するために喫緊の課題である。本事業では、基礎技術の発明者が所属する大学・公設研究所・ならびに新規材料メーカーと材料加工装置メーカーが一体となり、川上ユーザーをはじめ製薬メーカーである川下ユーザーをもアドバイザーとする All in One 体制で、ペプチドや核酸医薬（以下、ペプチド医薬）のような巨大分子の医薬原体の分析から製造に対して、高品質かつ低コストな製造を可能にするクロマト精製技術の開発を目的とした（図 1）。

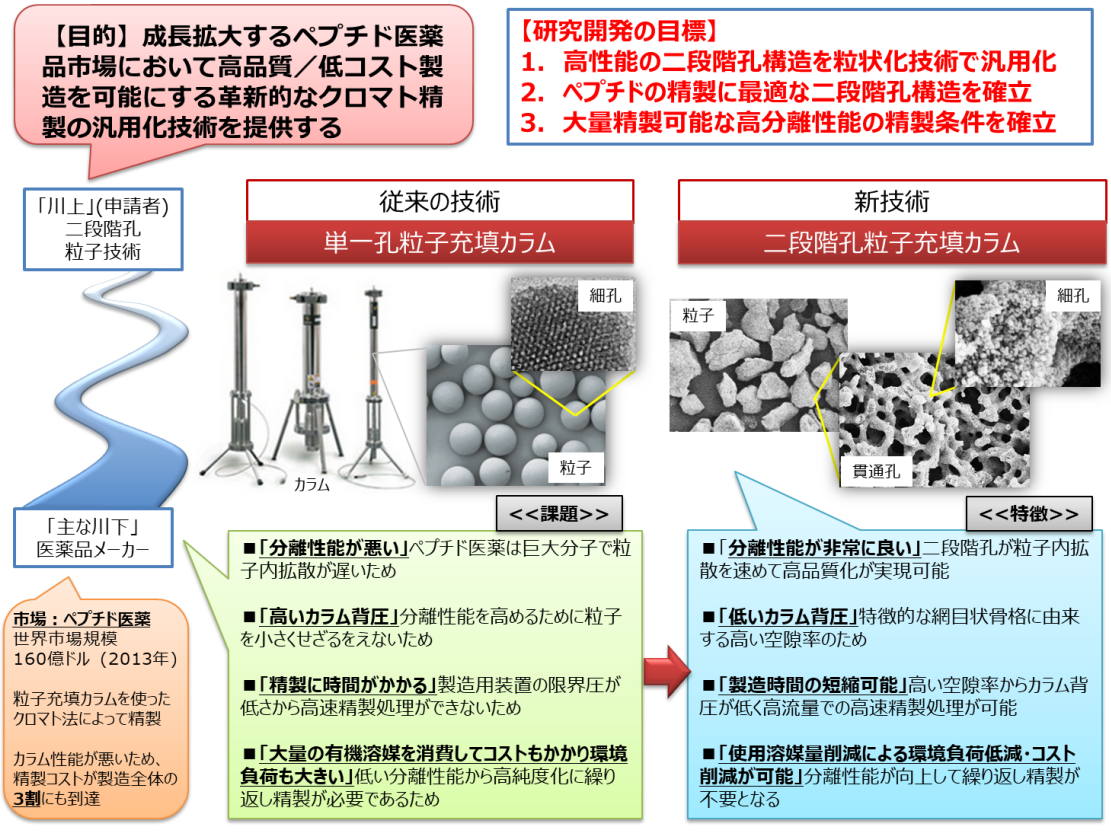


図 1　従来の精製技術の課題／ニーズと実現を目指した新精製技術

ペプチド医薬品の市場・基礎的研究開発の背景として、ペプチド医薬品の市場は伸長しており、世界市場で 2013 年には 160 億ドルに達している（図 2）。ペプチド医薬は、アミノ酸から化学合成される副作用の少ない理想的な医薬品とされる。しかし一方で、ペプチド医薬が

従来の低分子医薬と大きく異なる点として、クロマトグラフィー分取精製（クロマト精製）に依存したプロセスを経て医薬品として必要な純度を確保しなければならない。しかし現在の分取精製カラムの技術では分離性能は限界に達していることから製造コストが増大する要因になっており、高価な医薬品になっているのが現状である。また今後開発されるペプチド医薬品はさらに複雑となり、長鎖あるいは高次立体構造有しており精製がますます困難になっている(図 3)。そのため製造コストがさらに高くなることから高価格化に繋がり、今後ひっ迫する国民医療経済にとって大きく懸念材料にもなっていることがわかっている。

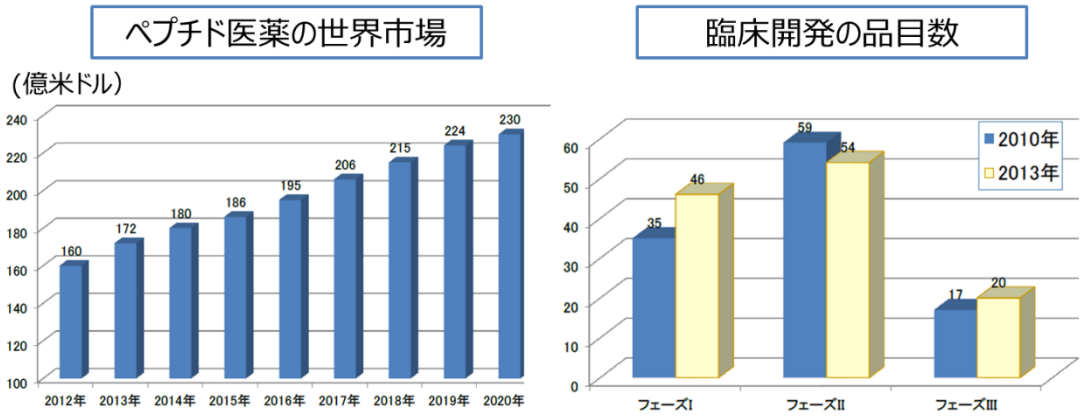


図 2　医薬品市場を牽引するペプチド医薬の世界市場と臨床開発品目

図 3　高度化するペプチド医薬品開発

次世代医薬品として期待される核酸医薬品も DNA や RNA の元となるオリゴヌクレオチドから合成されるが、ペプチド医薬と同様に分取精製により高純度を確保する必要があり、高品質かつ低コストを可能にする精製手段に対する期待が非常に大きい。

クロマト分離にはシリカゲル粒子が分離担体として通常用いられており、前処理・本精製・後処理の三工程に様々なクロマトカラムを組み合わせて効率よく高純度に精製するプロセス設計が検討され、各工程において分離性能を向上させ、かつ高負荷量・高流速により高効率でコスト削減を可能にするクロマトグラフィー精製方法が強く求められている（図 4)。

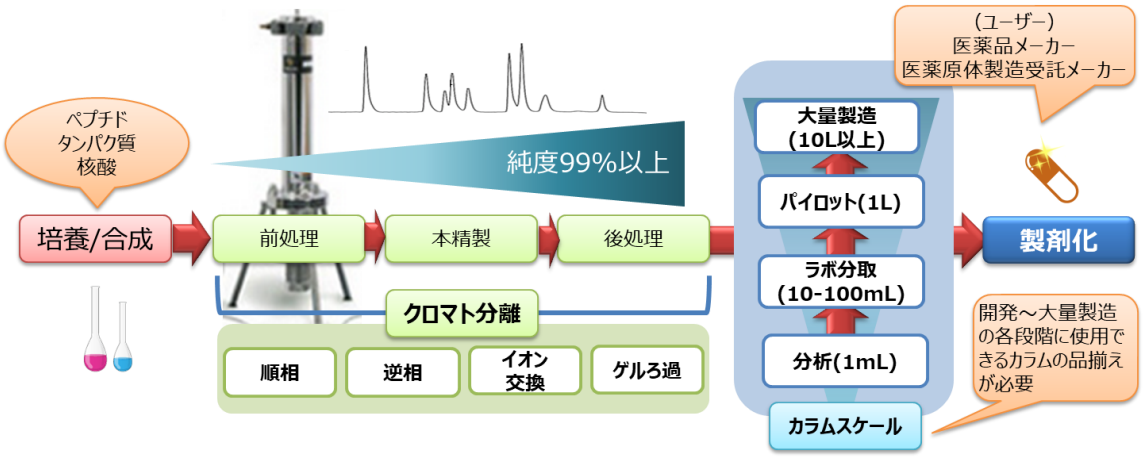


図 4　ペプチド医薬の製造工程におけるクロマト分離

医薬品原体の製造では、製造ラインのプロセスを設計するために「分析カラムでの分離能評価」、「ラボスケールでの分取精製評価」、「パイロットスケールでの製造評価」、「製造ラインでの試作製造評価」と順次スケールアップさせ、各段階の検討を経て製造方法が確定される。そのため従来から、0.1mLほどの小容量の分析用スケールから、製造用の100L超の大型カラムまで、様々な容量のカラムにシリカゲルを充填してクロマト分離カラムとして使用している。

従来シリカ粒子では分離性能を上げるために、粒子径数ミクロン～数十ミクロン程度の粒子直径に小粒径化させて有効表面積を増加させ、その表面にさまざまな官能基を化学修飾することで前処理から本精製・後処理での各工程の分離精製に使用できるよう開発されている。しかしながら小粒径化によりカラム背圧は上昇し流速が上げられず、また細孔径が小さいため高分子の分離能が低く、これを解決する新たな手段が強く望まれていた（図 5）。

図 5　従来技術・シリカモノリスの短所・問題点と新技術の比較

（b）新技術開発の背景

従来技術の問題点を解決できる技術としてシリカモノリス技術があり、低背圧・高性能を発揮する分析用クロマト分離用担体として既に商品化され高い評価を受けているが、このシリカモノリスをそのまま一体型カラムで分析～製造用途に用いるためには、それぞれのユーザーの用途に適した、ユーザーが要望する多様なサイズのシリカモノリスカラムを特注で設計・製造することになり、高性能は期待できるがコストが割高になり、デメリットが大きいとユーザーから指摘を受けていた。

そこで（株）エスエヌジーはシリカモノリス技術をさらに発展させ、高性能を発揮しつつも、容易にカラムのスケールアップが可能で従来技術と全く同様に使用できる新技術の開発に着手した（図 5 右）。これまでに粒子径 140μm の粒状シリカモノリスを作製し、ペプチドに対する分離能について川下ユーザーである浜理薬品工業（株）の協力のもとで検討を行った。その結果、新技術の粒状シリカモノリスカラム（粒子径 140μm）では 5 種類のペプチドが完全に分離されるのに対し、同様の粒子径の従来技術のシリカ粒子カラムでは分子量が大きな 4 と 5 のペプチドが全く分離せず、さらに粒子径 20μm とした従来技術のカラムですら 4 と 5 のペプチドは明確には分離することは困難であり、新技術がペプチドといった巨大分子に対して高い分離性能を発揮することが判明した（図 6）。

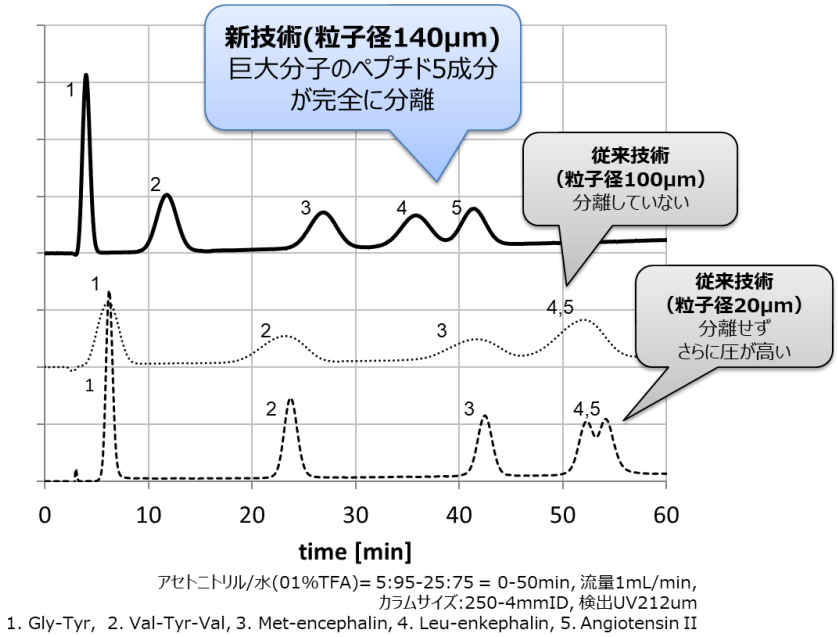


図 6　二段階孔粒子充填カラムによる標準ペプチドの分離性能比較

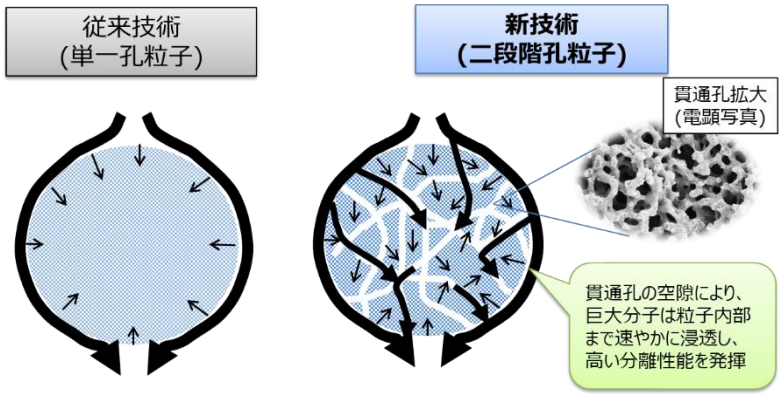


図 7　新技術の持つ特徴「パーフュージョン」

新技術の二段階孔を持つ粒状シリカモノリスが高性能を発揮する理由として、従来のシリカ粒子はナノスケールの細孔しかないので、分子拡散によって行われる粒内への試料の移動が分子拡散のみによって起こるため、特に高分子試料では粒内分配平衡に達するのが遅く、分離に長時間を要すると考えた。一方、新技術の二段階孔粒子内には多数のマイクロメートル領域の貫通孔が存在し、試料が溶媒と共に共同的に粒内を流動することにより高速に分配平衡が達成されるため、短時間での分離が可能になる。また細孔も有し大きな比表面積を確保できるので、試料負荷量を所望のレベルに増加させることが出来ると想定した（図 7）。

これまでに二段階孔構造を持つ粒子は市販品ではポリマー粒子でのみ1例存在し特徴的な性能を発揮するが、二段階孔構造の貫通孔径と細孔径を自在に制御できず貫通孔径も100ナノメートルスケールで、有機溶剤で膨潤して溶媒耐性が低い等用途が限定されていた。本事業で開発を目指すシリカによる二段階孔粒子は特徴的な構造を持った斬新な粒子担体で、どの様な流体力学的挙動を示すか科学的に未解明な点もまだ多く残されており、従来技術にはないポテンシャルを持つ素材であることも研究開発する意義が高い。

（ｃ）研究開発の高度化目標及び技術的目標と研究開発実施内容

本事業において新技術を実現するために解決すべき研究課題は「(十一）バイオに係る技術に関する事項・バイオに係る技術において達成すべき高度化目標」の（３）川下分野横断的な共通の事項「①川下製造業者等の課題及びニーズ」に関する。ペプチド医薬品製造における課題とニーズの詳細を図 ８に示す。

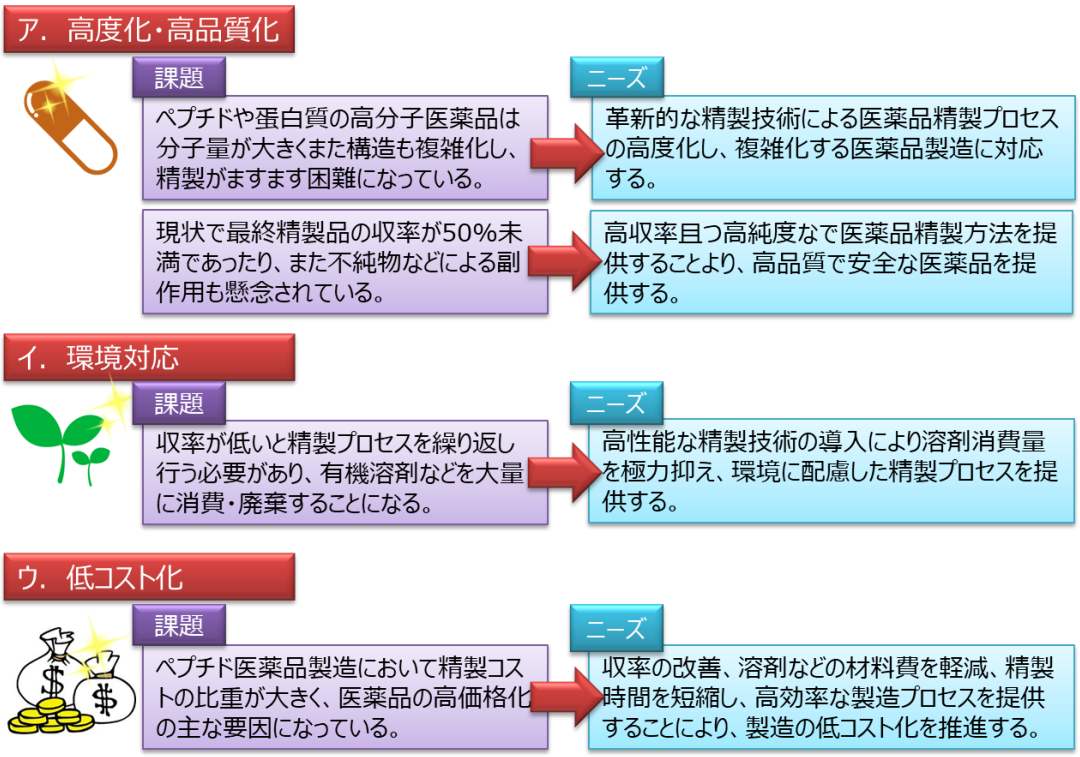


図 ８　川下製造業者等の課題及びニーズ

そこで、「ア．高度化・高品質化」「イ．環境対応」「ウ．低コスト化」それぞれのユーザーニーズ・課題に対応するため、以下の新技術の課題を解決して、高品質かつ低コストなペプチド

医薬品のクロマト精製の高機能化技術及び汎用化技術を実現を目指した（図 9）

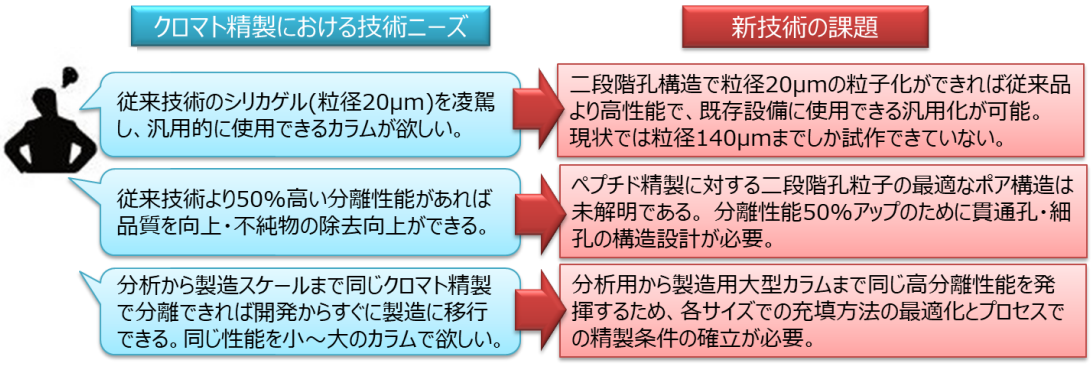


図 9　川下製造業者等の具体的な技術ニーズと解決するための新技術の課題

川下製造業者のニーズと研究開発の高度化目標に関して図 10に示す。新技術の高度化目標として「（十一）バイオに係る技術に関する事項」が該当する。詳細な内容は下記のとおりである。

ア．高度分析技術の開発及び利用

新技術である二段階孔粒子を用いたカラムを研究開発で用いる分析／分取精製用途の小型カラムから製造ラインで用いる大型カラムまで汎用的に対応することで、画期的な高分離性能を有するクロマト精製法を実現し、より高品質で安全な医薬原体の供給が可能になる。

ウ．生産性の向上

高分離性能のみならず、高流速分離・高試料負荷・精製サイクル数の削減などが実現される。そのため、精製プロセスに要する時間の短縮や作業の効率化が可能になる。これらにより、バイオ医薬品精製製造の生産性を向上できる。同時に分離工程に要する有機溶剤等の使用量を削減し、環境負荷の少ない精製プロセスを提供することが可能となる。

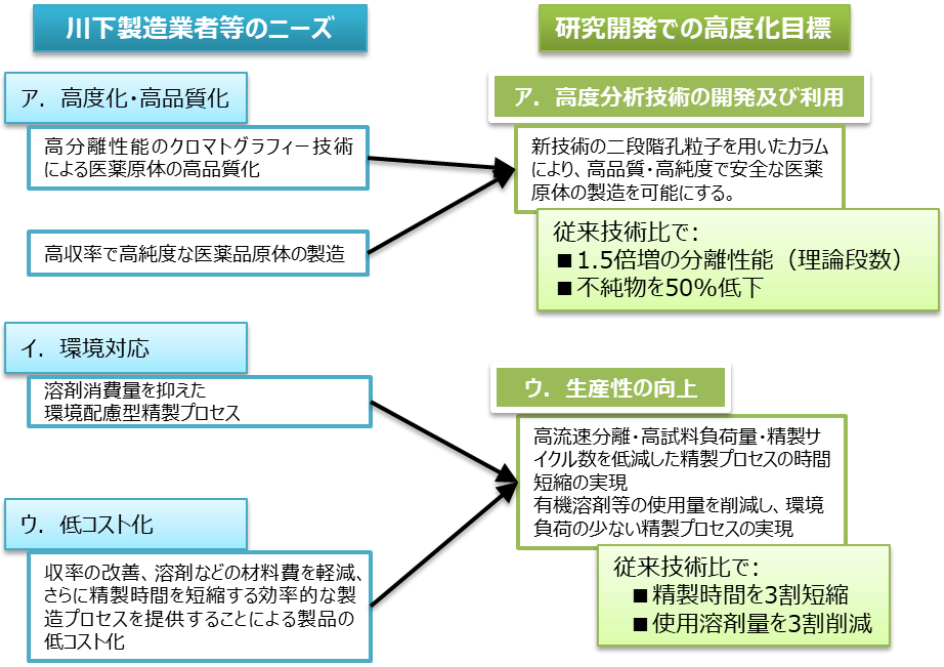


図 10　川下製造業者等のニーズと研究開発での高度化目標

新技術を実現するために解決すべき研究課題として、第一に大型シリカモノリスを粉砕して均一な二段階孔粒子を効率的に作製する技術確立が必要であるが、現状では粒子径140μmまでが限界であり、収率も10%以下と低く、製品としての採算性が乏しい。シリカモノリスは空隙率85%以上の脆弱な多孔体で過粉砕されやすく微細粒径化は困難で、また粉砕後は超低密度粒子となり分級による粒径の均一化も非常に難しい。そこで、本事業の申請チームの見解により、クロマト精製ニーズに対する新技術を実現するために図 11に示す３つの研究開発課題と、従来技術のシリカゲル粒子カラム（粒子径20～60μm）との比較を元に目標値を設定した。

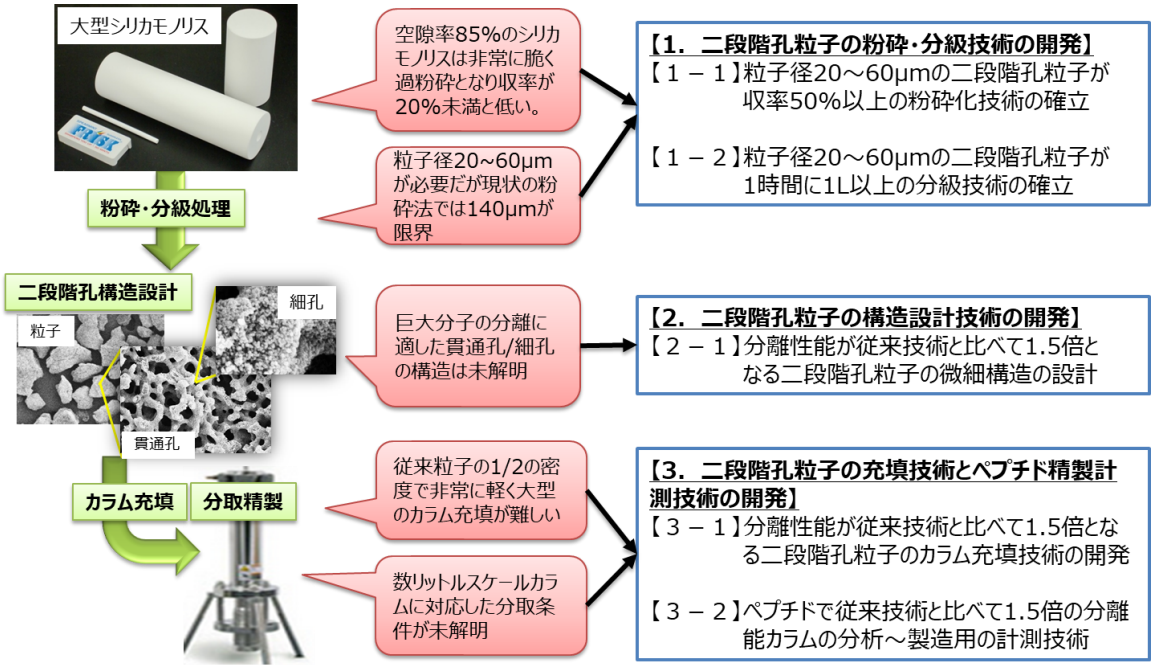


図 11 技術課題に対する研究開発課題と目標値の概要

１－２　研究体制

本体制では各技術分野の専門家である協力機関・研究機関と緊密に連携し研究開発を進めた。開発完了時点での組織体制を図 12 に、また研究者及び協力者氏名を表 1 に示す。アドバイザーについて、浜理薬品工業㈱はペプチド医薬品の受託製造を行う国内古参の中堅メーカーで本事業の川下ユーザーにあたる。㈱ジーエルサイエンスは川上製造業者であり、アンジェスエムジー㈱は川下ユーザーに相当する。これら企業アドバイザーは、業界の市場ニーズを当事者として十分に把握しており、本開発に対し積極的な助言を行い、また実際の製造医薬品による精製検討を協力した。

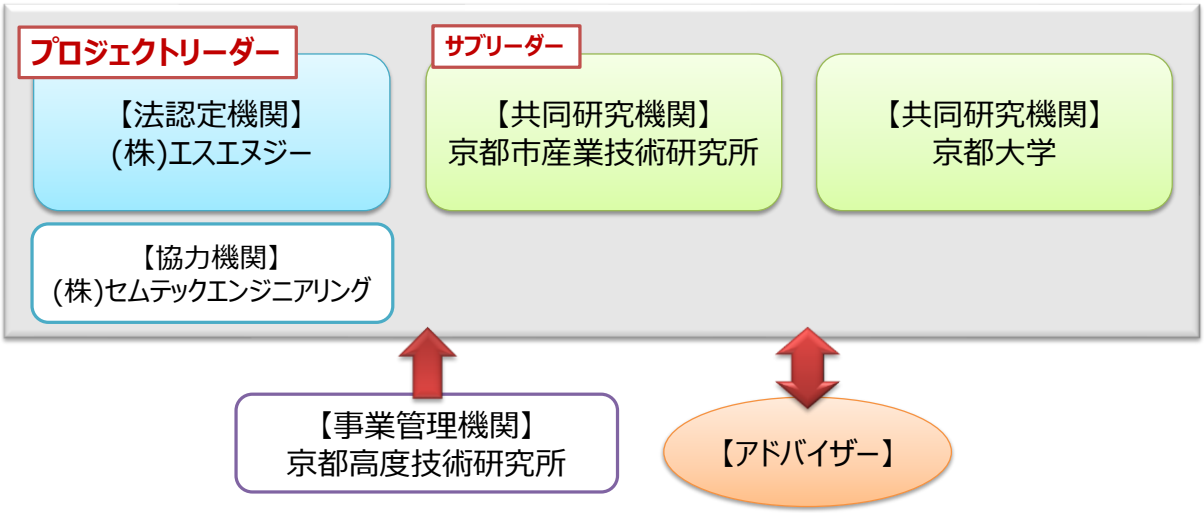


図 12　本事業実施体制

表 1　研究者及び協力者氏名・担当開発項目

機関名　担当開発項目	氏名
㈱エスエヌジー 【1．二段階孔粒子の粉砕・分級技術の開発】 【2．二段階孔粒子の構造設計技術の開発】 【3．二段階孔粒子の充填技術とペプチド精製計測技術の開発】	白　鴻志（プロジェクトリーダー） 宮本　利一 山添　裕司 深川　康子
京都市産業技術研究所 窯業チーム 【1．二段階孔粒子の粉砕・分級技術の開発】	高石　大吾（サブリーダー） 稲田　博文 荒川　裕也
京都市産業技術研究所 バイオチーム 【3．二段階孔粒子の充填技術とペプチド精製計測技術の開発】	山本　佳宏 泊　直宏
京都大学大学院理学研究科 【2．二段階孔粒子の構造設計技術の開発】 【3．二段階孔粒子の充填技術とペプチド精製計測技術の開発】	中西　和樹 高　大明 梶原　侑希
アドバイザー	大谷　隆（浜理薬品工業㈱研究開発部長） 古野　正浩（元ジーエルサイエンス㈱執行役員） 中塚　琢磨（元アンジェス MG㈱CFO）

1－3　成果概要

（a）研究開発課題に対する成果概要

【1．二段階孔粒子の粉砕・分級技術の開発】試作製造バッチあたり 10 リットルとした二段階孔粒子製造での微粉除去・連続的湿式分級方法の技術検討によって、目標値「試作製造条件で 50%以上粉砕収率と分級 1L／時以上」を満たす技術を確立した。

【２．二段階孔粒子の構造設計技術の開発】二段階孔粒子構造の最適パラメータとして設計した分離性能 150%増となる貫通孔範囲（0.1～3μm）、細孔範囲（12～30nm）を設計し、実分析による性能実証試験を行うことで目標値「分離性能 150%の微細構造の設計」を満たす技術を実現した。

【３．二段階孔粒子の充填技術とペプチド精製計測技術の開発】ペプチド実薬を模したタンパク分解ペプチドを使用し、製造規模の試験装置を使用して分離性能の実証実験を実施することで、精製時間と溶媒消費量をともに目標値「従来技術と比べて１．５倍の分離性能」を満たす技術であることを実証した。

（ｂ）高度化目標に対する成果概要

【ア．高度分析技術の開発及び利用】開発品をペプチド・タンパク質など生体由来分子の精製に用いた場合、同一粒子径の従来技術を用いた場合と比較して、1.5 倍増以上の分離性能を発揮することを実証した。また、開発品をペプチド実薬精製に用いた場合、同一粒子径の従来技術を用いた場合と比較して、医薬品粗精製品中の不純物を５０％以上の比率で低下することを実証した。

【ウ．生産性の向上】製造規模の試験装置を使用して分離性能の実証実験を実施することで、同一粒子径の従来技術を用いた場合と比較して、精製時間と使用溶剤量をともに 3 割以上削減できうることを実証した。

１－４　当該研究開発の連絡窓口

株式会社エスエヌジー　ゼネラルマネージャー　宮本　利一
TEL: 075-874-5643　FAX: 075-874-5743
E-mail: info@sng-inc.co.jp

第２章　　本論　研究開発実施内容と成果

２－１　研究開発課題１．二段階孔粒子の粉砕・分級技術の開発

シリカモノリスはその材料・構造の特徴から、軽く脆い特性を持ち、粉砕時の衝撃でサブミクロンオーダーまで一気に粉砕されてしまう。シリカモノリスを数十マイクロメートルのサイズに粒子化するためには、単純にシリカモノリスを目的の粒子径まで一気に粉砕するだけでは目標達成は困難であり、粉砕前の予備加工によるサイズ制御が重要であることを突き止めた。そこで、粉砕前加工機により大型のシリカモノリスを一辺 0.5～3mm の範囲で精密前破砕し、さらに、段階的に目標の粒子径となるように粉砕することにより、粒子径 20～63μm の範囲にて回収率 50%以上となる粉砕方法を確定し、粒子径 20～60μm の範囲で収率を 65%程度まで安定して伸ばすことに成功した（図 13）。

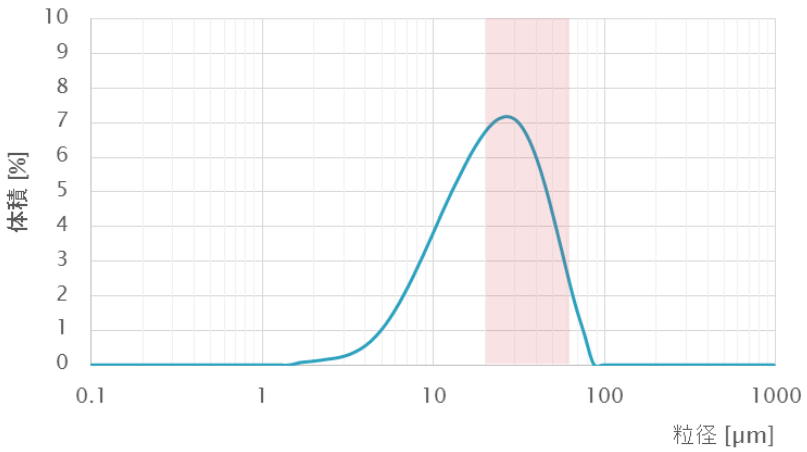


図 13　粉砕後の二段階孔粒子の粒度分布。赤字が 20-60μm の範囲であり、収率 50%～65%で推移している。

超低密度脆弱多孔質体シリカモノリスの微細粒子化方法や分級方法の開発において、二段階孔粒子の粉体物性を明らかにすることが粉砕・分級条件を最適化していくために特に重要である。そこで、種々の条件で粉砕した二段階孔粒子について、粉体評価装置を用いて粉体特性評価手法の確立と製法の最適化を狙い粉体物性について検討した。シリカモノリスは空隙率 85%・密度 0.2g/mL の超低密度粒子であり、そのため粉砕で得られる粉粒体はとても軽量であり湿度や静電気等の影響を受けやすく、取り扱いが困難である。このような粉粒体の評価に関する情報は少

なく、事業化を見据えた粉体特性データを蓄積することは非常に重要である。導入したパウダーテスターでは、安息角、崩潰角、差角、ゆるめかさ密度、固めかさ密度、圧縮度、分散度、均一度、凝集度、スパチュラ角を測定し、各測定から、粉体の「流動性」と「噴流性」を定量的に評価可能である。粉体層流動性評価装置では、二段階孔粒子の流動性（内部摩擦角）、付着性、応力緩和性、せん断応力、充填性、成形性、壁面摩擦性などを評価可能である（図 14）。これら多様な物性値を高精度で再現性良く評価できれば、粉砕条件の最適化のための指標となるだけでなく、事業化のためのスケールアップの際の条件の最適化にも対応できるうえ、実生産での品質管理にも適用できると期待される。そこで物性評価においては、特に分級と充填条件に重要なファクターとなるせん断応力に関する測定を重要視し、同一粒径（同分級条件）で孔径の異なる二段階孔粒子についてせん断試験を実施した。

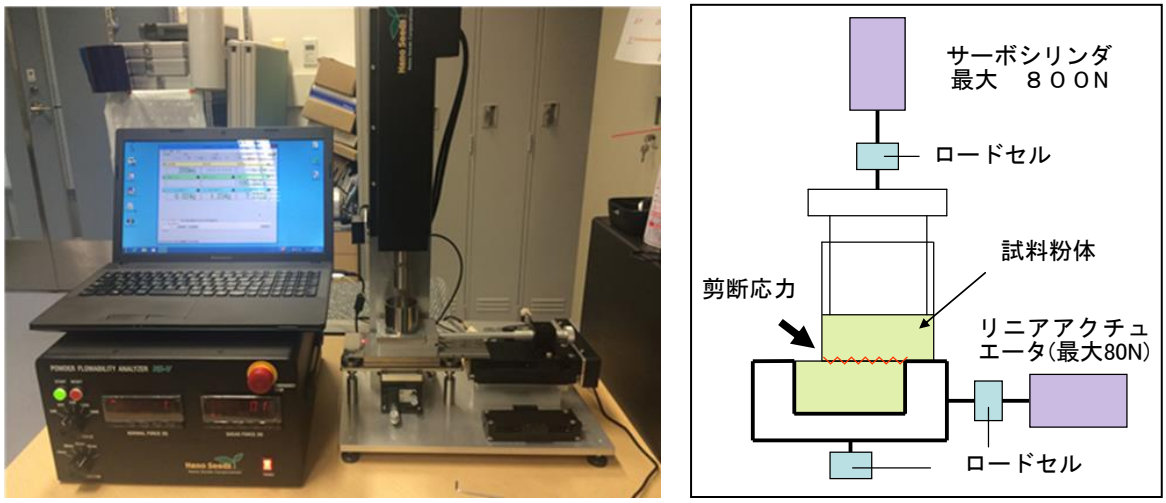


図 14　粉体層せん断試験外観と概略図

粉体物性におけるせん断試験結果では、同じ粒径を有する二段階孔粒子であっても、細孔径の違いにより粉体特性が異なることが示唆された（表 2）。細孔径が同じでロットが異なる Lot#:PM094（貫通孔径 1um 細孔径 30nm）及び Lot#:PM108（貫通孔径 1um 細孔径 30nm）では、せん断付着応力や単軸崩壊応力の数値はほぼ同じであったが、他の 2 種類のサンプルは違いが見られた。粉砕や分級の工程において、付着性や流動性といった因子は作業性や収率に大きく影響することが予想され、本装置による測定・解析は粉砕・分級技術の高度化・効率化に有効なデータを得られたと評価した。しかしながら、小容量セルを用いたパウダーテス

ターによる粉体特性測定では、二段階孔粒子は安息角・スパチュラ角・崩潰角、差角の粉体特性について測定不可能な項目があり、一般的な粉末とは大きく物性が異なることから特殊なハンドリング法が必要であることが明らかとなった。

表 2　二段階孔粒子の粉体物性。粒子径 20/63μm・貫通孔径 0.5-1μm

サンプル名	PM094	MS030	PM105	PM108
細孔径［nm］	30	8	10	30
分体層厚み　［mm］	18.97	22.81	20.08	27.23
密度［g/cm^3］	0.36	0.18	0.16	0.15
内部摩擦角［°］	35.6	34.9	33.9	36.3
せん断付着応力［kPa］	7	4.3	7.2	9.9
単軸崩壊応力［kPa］	27.3	16.4	26.9	39.2
垂直応力エンドポイント［kPa]*	76.5	92.3	93.7	82.7
せん断応力エンドポイント［kPa]*	59.9	67.2	67.5	68.4
最大主応力［kPa］	167.2	196.7	190.2	187.5
流動性指数 FI［m］	7.67	9.23	17.3	26.3

*測定開始時

二段階孔粒子の分級方法の検討において、20μm以下の微粒子の乾式分級装置は殆ど市販されておらず、従来の分級方法を採用した装置の検討は困難である。特に二段階孔粒子は低密度で非常に軽量であるため、壁面への付着や凝集・浮遊や拡散などが起こりやすく、取り扱い・輸送が非常に難しい。国内外の微粒子向け分級装置で二段階孔粒子の分級に対応可能な装置を調査した結果、国内で１機種のみであったが、分級テストにより当該装置では篩の目詰まりが起こりやすく、数%程度の極度に低い収率しか期待できず非現実的であることが判明した。また、独自の乾式分級方法の検討では、シリカモノリスおよびその粒子自体が非常に低密度である性質から（図 15)、サブミクロンの粒子が静電気でバインダーとなり凝集する性質であることが判明した。そのため、乾式分級法の検討として、凝集抑制・除電等による分級条件検討を実施したが、いずれのケースでも静電気による凝集が顕著に発生するため、通常の乾式による二段階孔粒子の分級では現時点では課題達成が困難であると結論づけた。

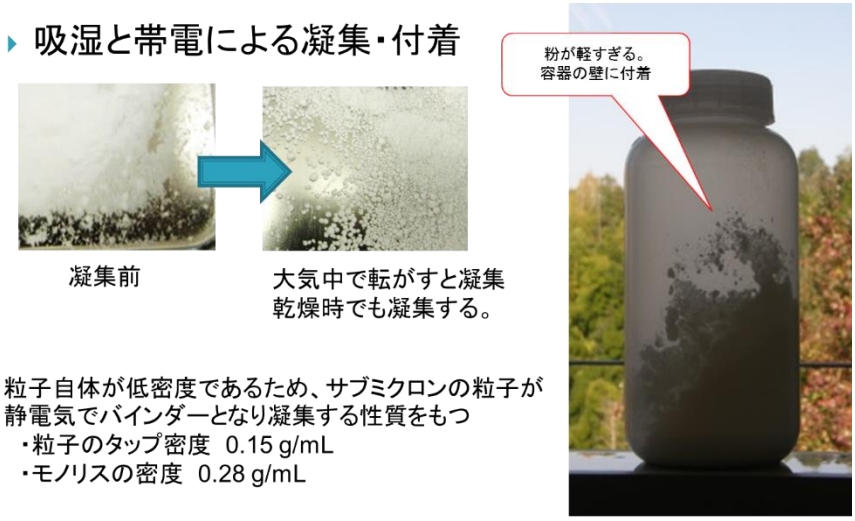


図 15　乾式分級での粒子の凝集形成

湿式分級法の検討においても、乾式と同様にサブミクロンの微粒子の存在がスラリー中に分散した粒子のバインダーとなり、一定濃度以上では凝集を形成する作用があることが判明した。そこで、スラリー中の粒子の沈降の有無によって分級する古典的な水簸（すいひ）の方法を多段で繰り返すことによって、沈降速度が極端に遅い5μm以下の微粒子を選択的に除去することで、迅速に分級する方法を確立させた（図 16）。

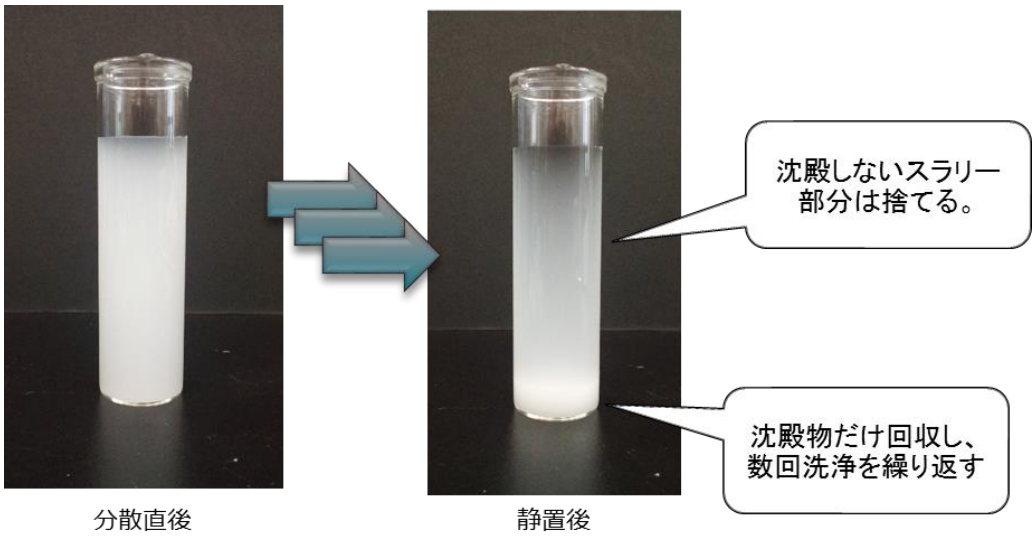


図 16　水簸による微粒子の除去

水簸にて微粒子を除去すると、サブミクロンオーダー以下の微粒子を除去することにより、篩の網目状で粒子が濃縮された際に粒子が凝集する効果を防ぐことができると考えられる（図 17）。そして、古典的な手法ではあるが、目篩を使用した手作業での分級において1時間で1リットルの分級効率で粒径範囲20/63μmの粒子を回収することに成功した。

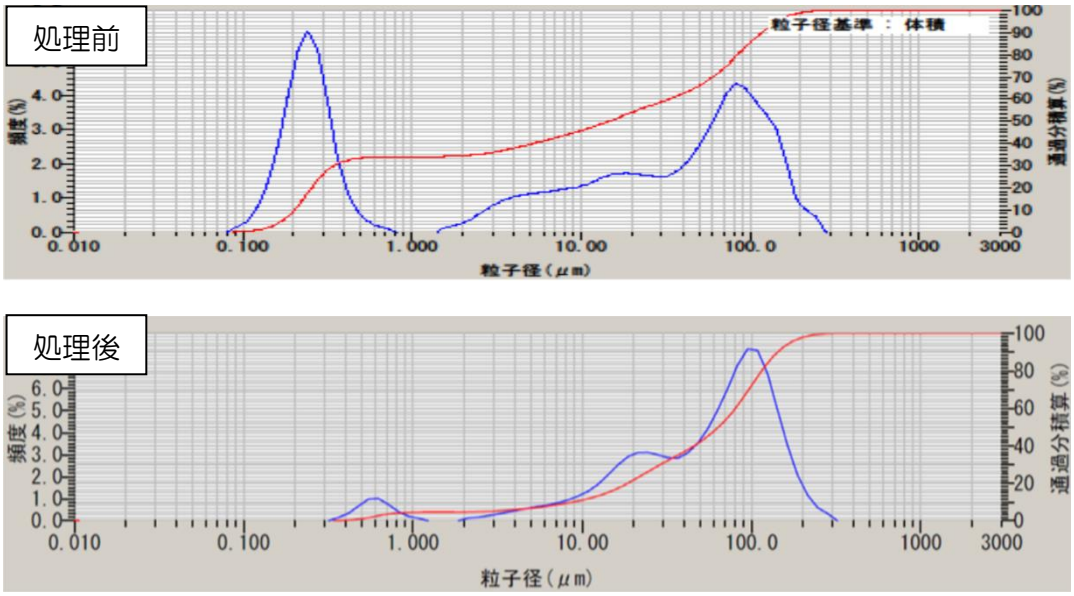


図 17　水簸処理前後の二段階孔粒子の粒度分布測定結果

２－２　研究開発課題２．二段階孔粒子の構造設計技術の開発

科学的に未解明な二段階孔粒子の流体力学的解析を行い、巨大分子であるペプチドの分離に最適な貫通孔/細孔構造の設計を実施した。二段階孔をもつ塊状高純度シリカの最も成功した応用例として、マイクロメートル領域に狭い貫通孔径分布をもつ一体型シリカ担体を用いた「モノリス型シリカカラム」が開発・上市されている。本研究開発課題は、このモノリス型シリカカラムの分離媒体と同等な内部多孔構造をもつ数十ミクロン以上の粒子を、粒子充填カラムとして改めて充填し、大粒子径に基づくカラム内流路径の拡大と、粒子内細孔に基づく高性能な分離を、両立させようとするものである。二段階孔粒子は粒子間のみならず、粒子内にも無視できない移動相流速を生じる。従って、粒子内細孔に流動の生じない充填粒子を仮定した従来の流動モデルの適用が不可能となるため、ブリュッセル自由大学のグループが開発した流体力学シミュレーションの手法によって、液体クロマトグラフィーカラムとしての最高性能を発揮しうる最適のマクロ孔構造を予測し、実際の材料の設計指針として役立てることを目的とした。

流体力学シミュレーションは、まずモデル構造とその幾何学パラメータを決定し、流体力学計算によって流速（v）分布を可視化できるように、定常状態における流路内での流体の運動量分布を計算した。幾何学モデルの構築には Gambit、流体力学計算には Fluent 社の市販ソフトウェアを用いた。また、静的な分配係数や典型的な液体内および固体表面・溶液間の物質移動係数の既知データを援用して、代表的な移動相組成・溶質についてクロマトグラフィー分離を行った場合の理論段高（h :カラム長を理論段数で除した量）の計算を行った。

モデル充填構造の構築に当たり、流路内への粒子の充填は、原則として粒子間隙率（bed porosity: ε_{bed}）が 40%となるように調整した。この値は従来全多孔性微粒子の充填カラムにおいて知られている代表的な値として採用した。計算の便宜上、粒子内の構造単位サイズを一定にし、構造単位間の距離を変更することによって（したがって粒子径も変化させて）粒子内気孔率（particle porosity: ε_{part}）を変化させた。直径 2 μm の構造単位では、ε_{part} = 0.6 のとき粒子径 dp = 21.1 μm、ε_{part} = 0.8 のとき粒子径 dp = 29.5 μm である。上記の ε_{bed} =0.4 以外に、粒子間隙内により小さい直径（およそ 30%を想定）をもつ粒子を充填した構造についても調査した。様々な粒子間隙率（ε_{bed}）および粒子内気孔率（ε_{part}）をもつモデル流路における、流速分布の一覧を図 18 に示す。

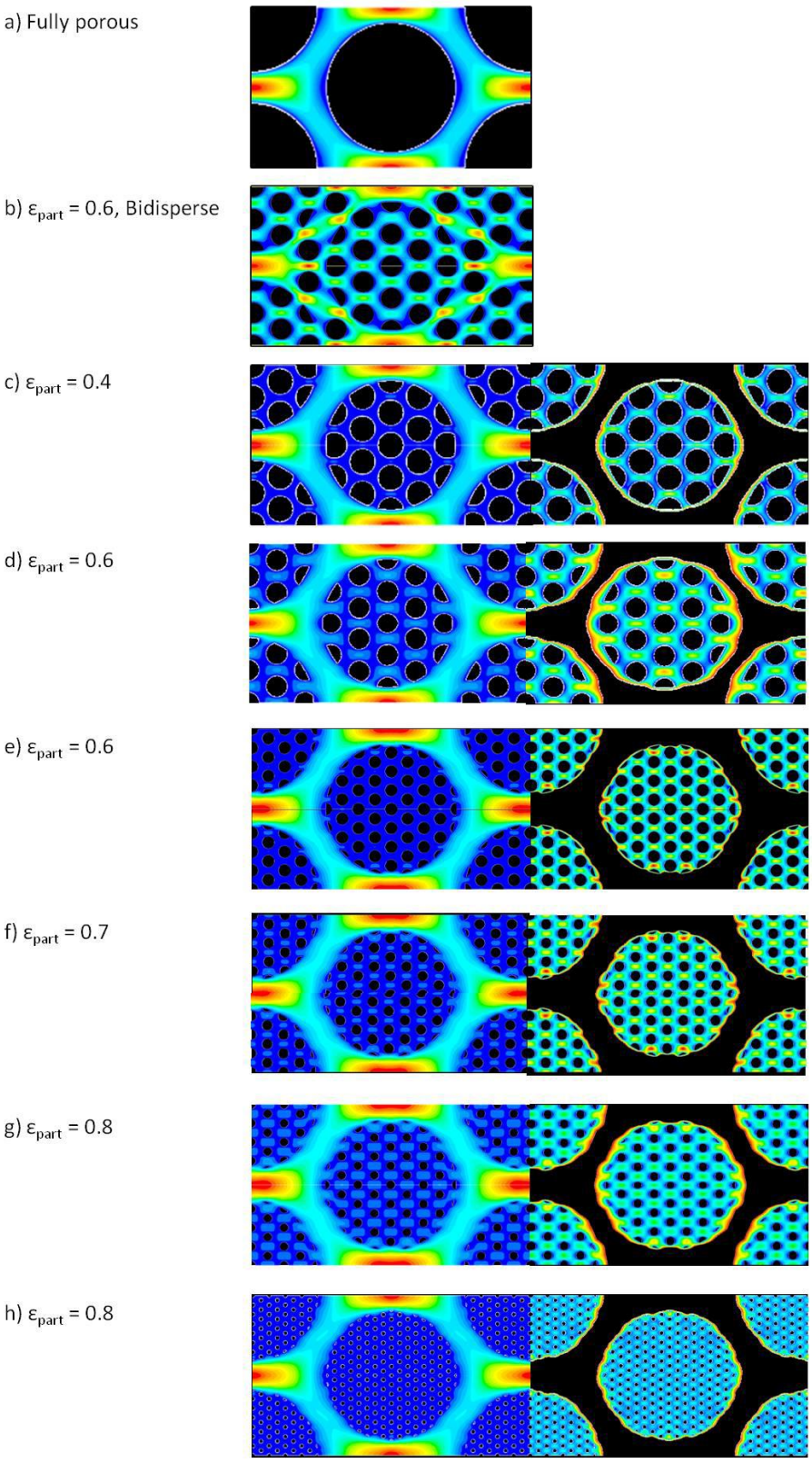


図 18　様々な粒子間隙率（ε_{bed}）および粒子内気孔率（ε_{part}）をもつモデル流路における流速分布

⑷は粒子内の流動が実質的に起こらない全多孔性粒子である。黄色から赤が比較的高流速、青が濃くなるほど低流速（黒はほぼ流速ゼロ）を表している。粒子内に流れが起こらない場合は、流速方向に開いている流路において流速は最も高い。⑹は次項で述べる２種類の粒子径をもつ粒子による充填モデルであり、⑹のモデルにおける粒子間隙に、さらに小さい構造単位を埋め込んだような流路になっている。このように大きい粒子の隙間を小さい粒子で埋めると、カラム背圧が高くなる反面、粒子内間隙への流動は多くなり、パーフュージョンによる分離効率が高くなることが予測できる。ところが、一種類の粒子径だけで構成した流路では（⑹以外）いずれも粒子間隙部の流速が極めて高く、粒内の流速は相対的に低くなってしまう。そこで流路内の高流速部分を黒にして、より低い流速の部分をクローズアップしたものが、⑹以下の右半分の図である。直感的な予想どおり、粒子内の気孔率が高く（構造単位の間隔が大きく）なるほど、粒子間隙の流速の一部が粒子内へも入り込むことが分かる。直径 20～30 ミクロンの粒子については、2 ミクロン内外の貫通孔径の場合に、後述の分離挙動に強い影響を与えるような粒子内流動が起こるが、1 ミクロンまで小さくなると粒子内流速が無視しうる程度になることが明らかとなった。

次に、それぞれの流路モデルについて、クロマトグラフィー分離性能を計算し、理論段高と線流速の関係（van Deemter 曲線）として表した（図 19）。h の値は小さいほど分離性能が高いことに対応するが、全多孔性粒子を充填したカラムでは最も曲線の傾きが大きく、高流速において分離性能が低下しやすい。他方、粒子内に流動がおこる気孔率 40%と 60%の場合を比較すると、粒子内気孔率の高い場合に、流速が高くなっても分離性能の低下が起こりにくくなることが明確であった。溶質の保持の強さが変わっても、計算結果は大きく変動していないことから、この分離性能の変化は、主に流路構造と粒子内気孔率によって支配されていることが明らかとなった。

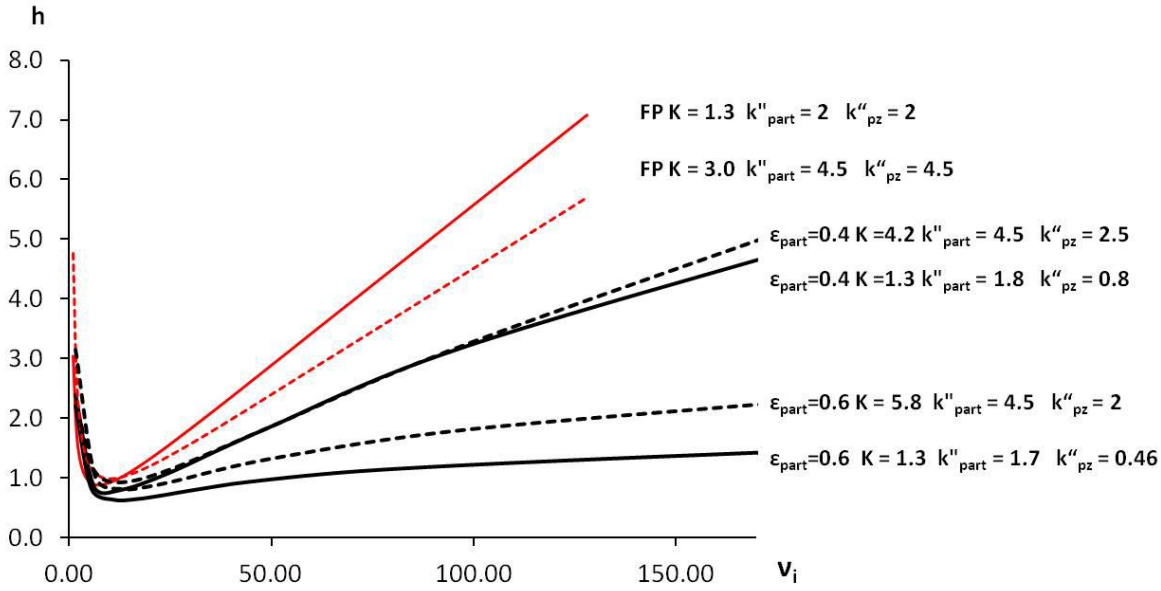


図 19　様々な流路モデルの充填カラムについて計算された h-v 曲線。赤線は全多孔性（マクロ孔なし）粒子、黒実線（上）は気孔率 40%、黒実線（下）は気孔率 60%の場合。実線は固定相への保持が弱い溶質、破線は保持の強い溶質に関する計算結果。

これらの結果から、このモデル系では、粒子内気孔率 60%以上、貫通孔径は粒子径の概ね 5 %以上であることが、高性能かつ高速な分離のために好適な条件であることが明らかになった。すなわち粒径範囲 20～63μm の粒子を考慮すると、最適な貫通孔径範囲は 1～3μm となると考えられ、さらに、二段階孔粒子は粒子径 3μm 程度まで破砕できることから、貫通孔径は最小 0.1μm 程度が妥当であるといえる。

さらに補足として、上述のモデル流路は、２次元への単純化と規則配列したピラー間の流動という空間制限を含むため、実際の粒子充填構造よりも粒子径に比較して大きめの流路が作られている。そこで大粒径および小粒径粒子の混合した充填挙動を予測も実施した。図 20 に図 19 中のモデル構造の一部について、理論段高と移動相流速の関係を計算した結果を示す。赤線は(a)の全多孔性粒子を充填したカラムに対応し、流速が上がると粒子内分配の速さが粒子間の移動相流速に追いつかず、段高の増加（性能の低下）が起こる。ところが粒子内に 60%のマクロ孔を含む（ε_{part} =0.6）二段階孔粒子を充填したカラムでは、流速に対する性能低下は非常に小さくなることが分かる。これらと比較して、大径粒子の約 30%の直径をもつ小径粒子を、大径粒子の充填構造の隙間に配置した（Bidisperse）

場合には、さらなる段高の減少と、非常に弱い移動相流速依存性が予想された。

すなわち、大径粒子の真球状粒子を気孔率 40%で規則充填した場合には、粒子内気孔率を 60%程度まで高めることによって、高流速条件でも分離性能が低下しにくいことが予測され、また、粒子径を 2 種類にして、大きい粒子の隙間に小さい粒子を充填した構造では、カラム背圧が非常に高くなるが、高流速条件での性能低下はさらに抑制出来ると予想された。

シミュレーション解析の結論として、小径粒子を模した構造による大径粒子間隙の充填は、粒子間と粒子内の流速の差を小さくし、全体のカラム内空間が小さくなってカラム圧が上がることと引き替えに、高い理論段数のカラムが得られる可能性が強く示唆された。この結果は、将来的に粒径の異なる二段階孔粒子の混合した充填カラムによって、さらなるカラム性能の発展を示唆するものである。

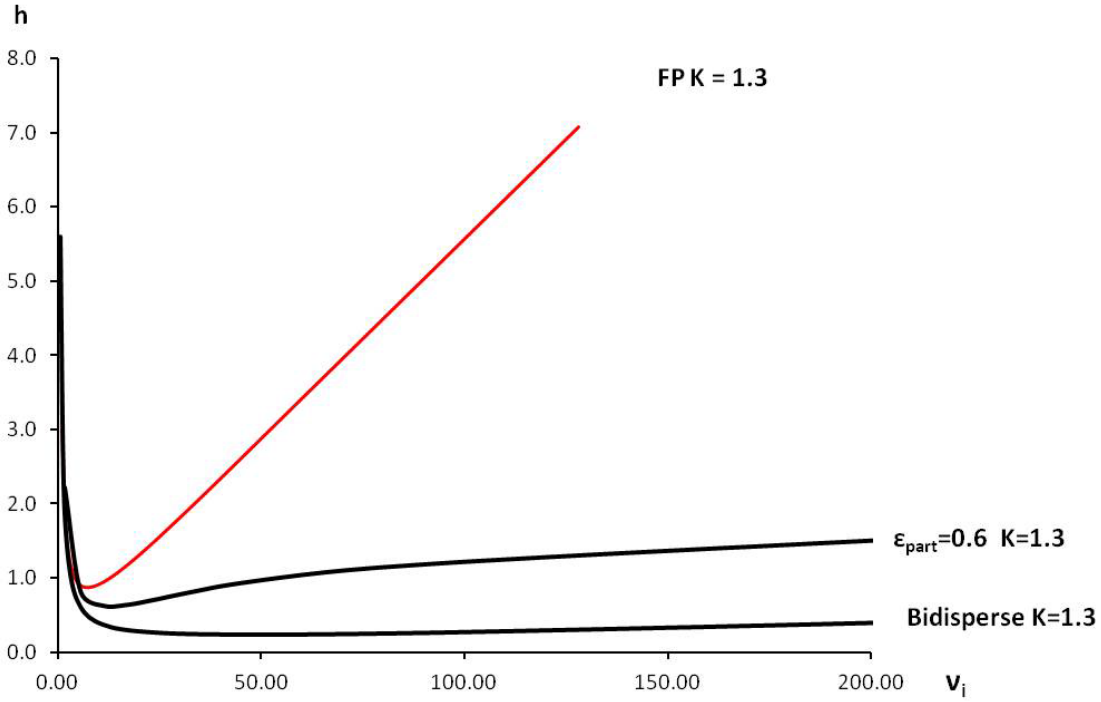


図 20 単一および二種類の粒子径をもつ粒子による充填カラムについて計算された h-v 曲線。赤線は全多孔性（マクロ孔なし）粒子、黒実線（上）は気孔率 60%の単一径粒子、黒実線（下）は二種類の粒子径をもつ粒子による充填（Bidisperse Packing）

二段階孔粒子内に存在する貫通孔径は分布をもつため、最適な細孔径の決定として、貫通孔径を1～2μmと固定して細孔径を変化させた粒子を試作し、直径4.6mm×長さ250mmのカラムにより同一分離精製条件にてペプチド・タンパク質の分離挙動を比較検証することで標家した。ピーク1～4のペプチドにおいては細孔径の増大につれて分離傾向となることが明らかとなり、細孔30nm以上で完全分離となることが判明した（図 21）。また、ピーク6～9のタンパク質については細孔径の増大につれてピークがブロード化し、ピーク8、9については保持が低下する傾向が確認された。これらのことからペプチドとタンパク質の両方でシャープなピークと単離を満たすためには、細孔径は範囲12-30nm、中心径20nmが妥当であると評価した。

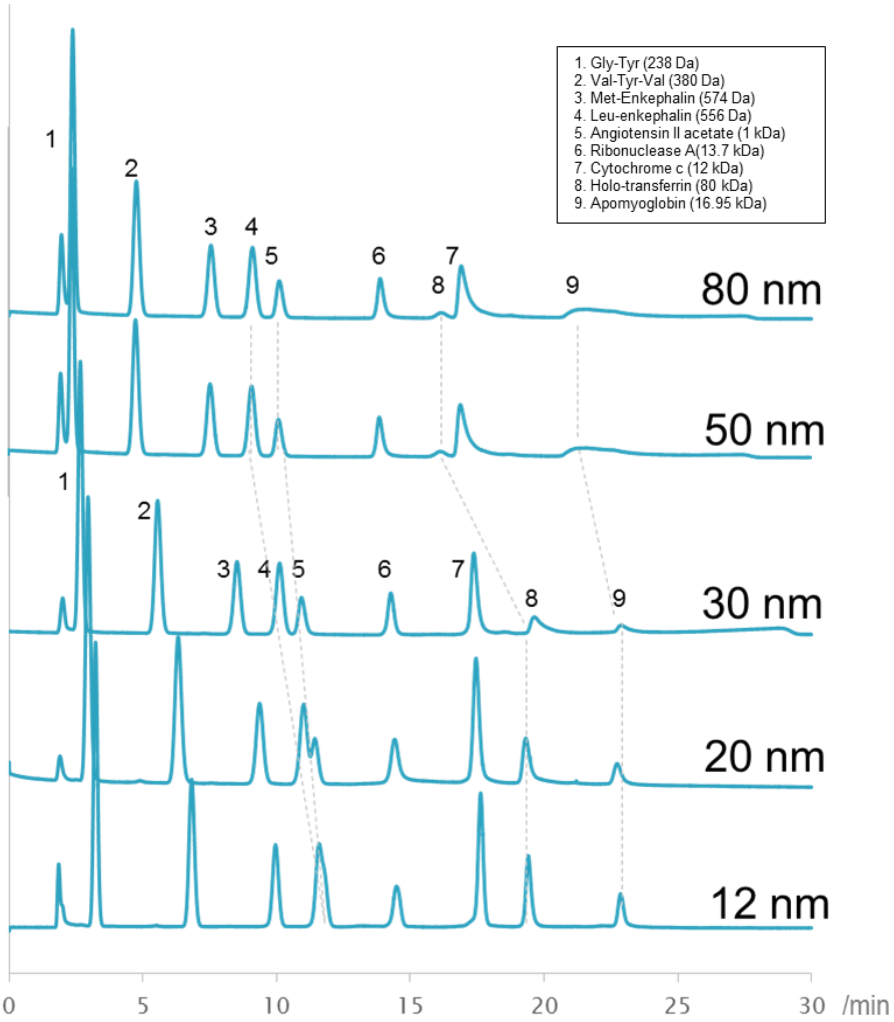


図 21　細孔径を変化させた粒子充填カラムでの標準ペプチド・タンパク質分離クロマトグラム。
acetonitrile : water = 5 : 95 – 60 : 40 (v/v), t_g = 0 – 30 min, 流量 2 mL/min, カラム温度 40 °C, Injection 10 μL of the mixture of peptide standard (0.25 mg/mL) and protein standard (0.5 mg/mL), Sigma Aldrich. 貫通孔径: 1-2 μm, 粒子径: 20/45 μm (12, 20 nm) or 20/63 μm (30, 50, 80 nm), カラムサイズ: 250 – 4.6 mmID.

２－３　研究開発課題３．二段階孔粒子の充填技術とペプチド精製計測技術の開発

【３－１】カラム充填技術の開発

二段階孔粒子をカラムに充填する技術開発では、逆相系・順相系に対応できる粒子の分散溶媒として両新媒性の有機溶媒を数種類選定し、ガラスカラムを用いた目視確認による二段階孔粒子スラリー充填の検討を実施した。目視確認による二段階孔粒子スラリー充填の速度・圧力的条件検討を実施し、追加導入したカラムパーツ等を活用することによって直径 50mm のガラスカラム（図 22）の作製にも成功した。

図 22　ガラスカラム

さらに、ペプチド分離に適したカラムを選択すべく、試作した直径 4mm のカラムを用いてカラム理論段数としての基本的性能を比較検討した。本事業で開発されるカラムは、製造もしくは抽出したペプチドの分離・回収での応用が想定されるため、サンプル分取機能をもつ FPLC 装置 ÄKTA explorer 10S（GE ヘルスケアバイオサイエンス社製）を使用して分離能の評価を実施した。分離サンプル: toluene 100 ppm (200 µL injection)、移動相: エタノール 100%、流量: 1.0 mL/min の測定条件のもと、カラム理論段数及びカラム圧力の比較検討を実施した（図 23・表 3)。結果として、二段階孔粒子充填カラムの理論段数は 1545 であり、同一粒子径の従来粒子充填カラムの理論段数 590～956 と比べて 160%～260%増の理論段数となることを実証した。

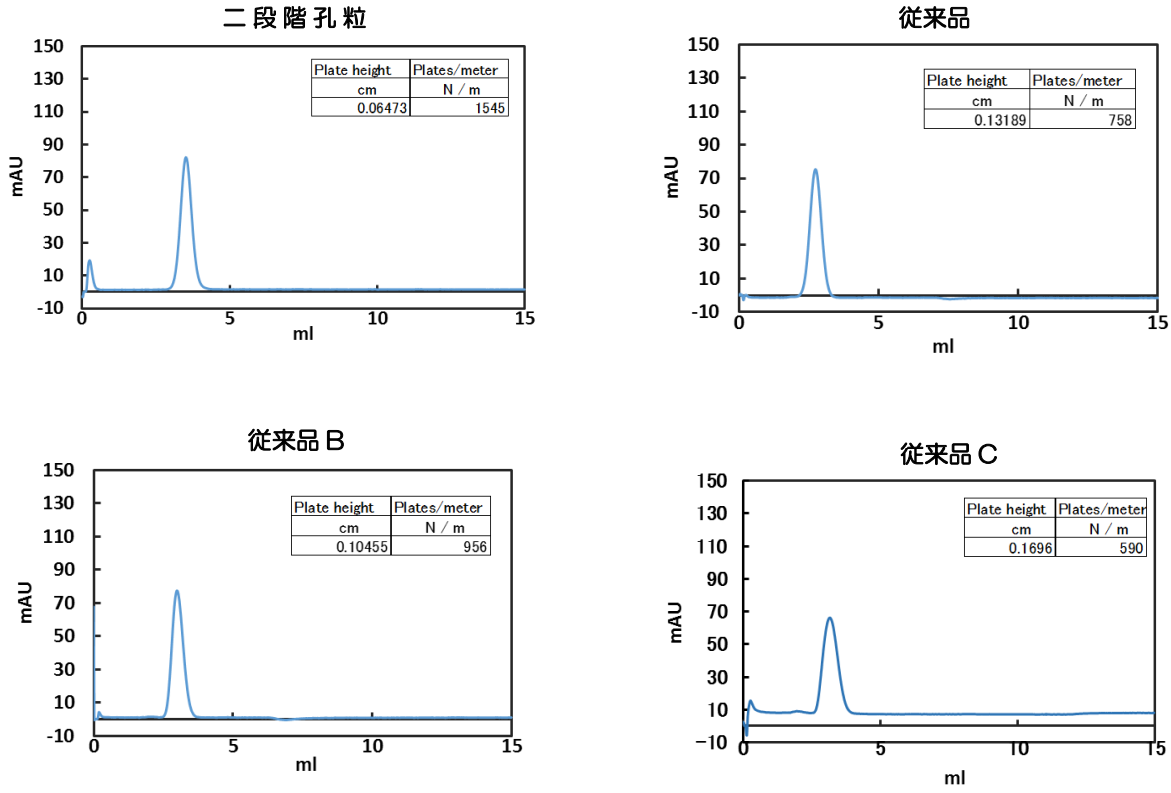


図 23　二段階孔粒子充填カラムと従来粒子充填カラムのクロマトグラム

表 3　カラム理論段数の基本的性能評価結果

カラムの種類	粒子径［μm］	細孔径［nm］	理論段数 N	理論段高さ［μm］
二段階孔粒子	20/63	20	1545	64.7
従来品 A	40/63	3.5	758	132
従来品 B	40/63	6	956	105
従来品 C	35/70	15	590	170

二段階孔粒子カラムの貫通孔径 1 μm、カラムサイズφ4×250mm

【3－2】　ペプチド精製計測技術の開発

小型カラムから大型カラムまであらゆるサイズのペプチド分離性能を一貫して評価するためには、大型カラムの分析を念頭に置いたペプチド標準物質の量的確保が必要となる。本事業で開発する大型カラムにおいてその分離能を評価する場合、最終的に 1 分析あたり 5mg 程度のペプチドを使用することが想定されるが、市販のペプチド標準物質として例えば 10 アミノ酸が連なったペプチドを製造委託・購入する場合 1mg あたり数十万円ほどかかり、コストが膨大なものと

なる。そこで、市販の塩化リゾチーム（グラムあたり数千円）をトリプシン分解しペプチド化したものをカラム性能評価用ペプチド標準サンプルとして検討し、コストを抑えつつも大型カラムの性能評価手法への適応可能性を狙った。ペプチド標準サンプルとして分子量 14000Da 程度の比較的小さなタンパク質であるリゾチームを選定した。リゾチームを選定した理由としては、プロテアーゼであるトリプシンで分解しても、発生するペプチドの数が限られると予想された。これを検証するために、トリプシン分解したリゾチームで生ずるペプチドを MALDI-TOF-MS にて分析した結果、予想断片も含めて分子量約 100～3000Da ほどのペプチドが 30 種類ほど再現性良く得られることを確認した（図 24）。

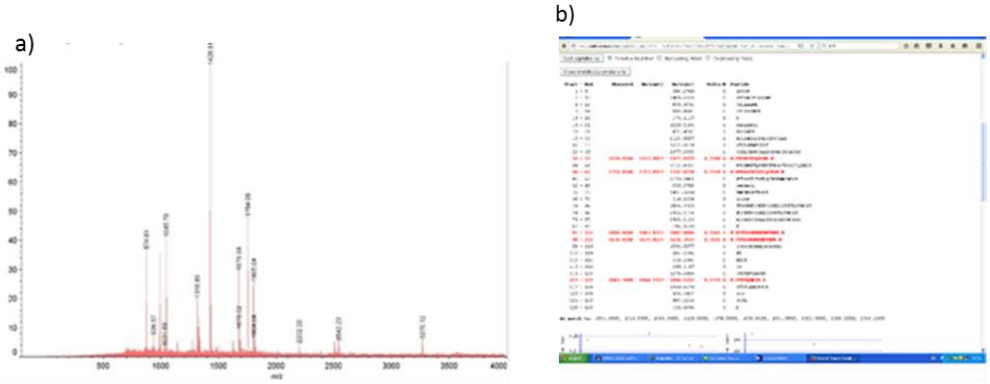


図 24　a)リゾチーム分解ペプチドの MALDI-TOF/MS スペクトル
b)トリプシン消化により生じるリゾチーム由来ペプチド一覧

このトリプシン分解ペプチドサンプルを用いて、二段階孔粒子充填カラムの分離性能をリニアグラジエント法による逆相クロマトグラフィーにて検討した。分析スケールによる小型カラムでの検討の結果、二段階孔粒子充填カラムでは複数のピークが確認され、混合ペプチドが確実に分離されているのが明らかとなった。また、二段階孔粒子充填カラムの圧力は 2MPa 以下であり、分取精製用装置 ÄKTA pilot の装置耐圧（2MPa 以下）を満たしており、スケールアップファクターを合わせて同じ分離条件とすることで、分取スケールの大型カラムとした場合においても適用できることを確認した。

次に、大型カラムでのペプチド分離性能の評価のため、これまで使用してきた FPLC 装置 AKTA explorer10S をスケールアップした AKTA pilot（図 26）を使用してペプチドの分離性能を計測した。分離ピークの分解能と精製時間の検討において、濃度 2mg/mL のトリプシン分解ペプチドサンプルを 10mL カラムにインジェクトし、流量 50mL/min にてアセトニトリ

ル濃度 0-30%にてリニアグラジエントプログラムを設定し、グラジエント溶媒の消費量を 11→7→5 CV（CV=カラムボリューム）として分離したクロマトグラムを比較することで使用溶媒量と分離時間の短縮が計れるかについて調査した。これらの条件のもと、二段階孔粒子充填カラムと従来粒子充填カラムの分離パターンを比較した結果、図 27 内に円で示したとおり 11→5 CV と使用溶媒量と精製時間を同時に減らしても二段階孔粒子充填カラムは特定成分の分離が可能であることが実証できた。すなわち、分析時間の短縮に伴い、使用溶媒量も削減することが可能となり、使用溶媒量と精製時間を同時に 50%程度まで削減できることが可能となり、開発した二段階孔粒子カラムの分離性能が従来粒子と比べて優れていることが実証された。

ペプチド実薬を模したタンパク分解ペプチドを使用し、製造規模の試験装置を使用して分離性能の実証実験を実施することで、精製時間と溶媒消費量をともに目標値「従来技術と比べて１．５倍の分離性能」を満たす技術であることを実証した。

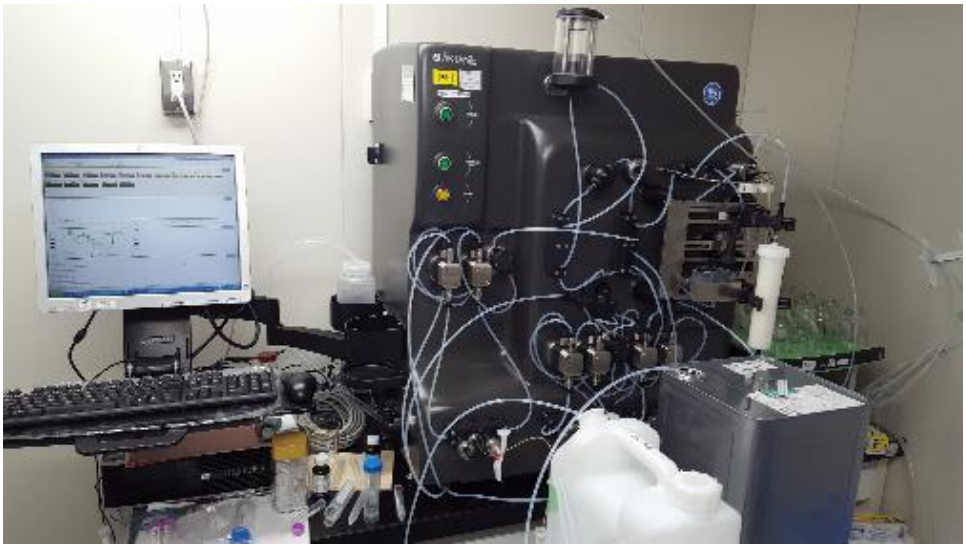


図 25　ペプチド/タンパク質精製パイロット製造用クロマトグラフィーシステム ÄKTA Pilot での試験状況の写真

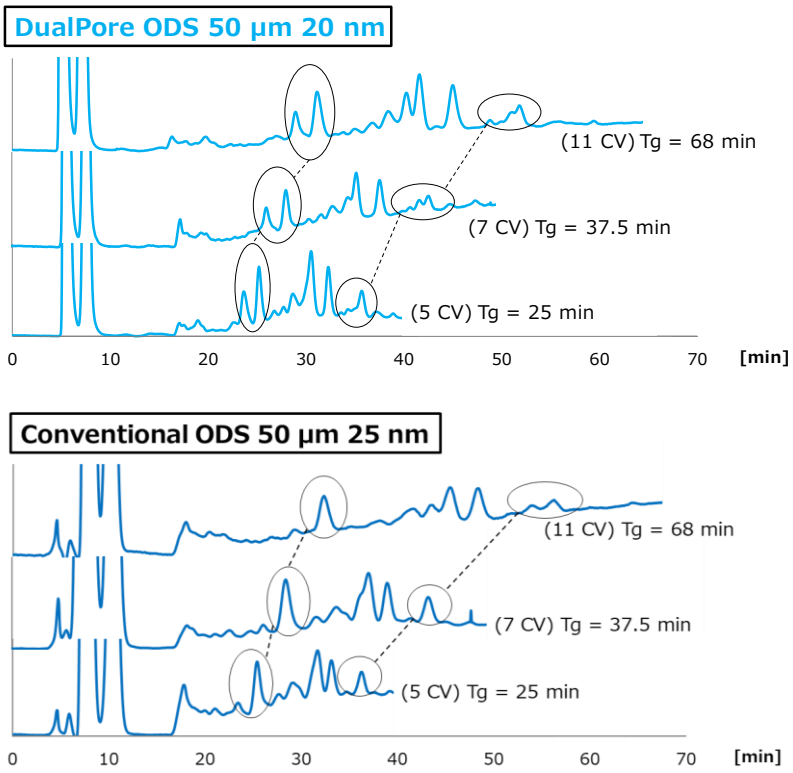


図 26　ÄKTA Pilot システムを用いたトリプシン分解物ペプチドの分離クロマトグラム比較

Flow rate: 50 mL/min, Eluent: Acetonitrile/water(0.05% Formic acid), Linear gradient of ACN 0-30% in 10 min of the starting time and the gradient end are in figure, Sample: digested lysozyme by trypsin, Loading: 0.1 gram, Detection: 220 nm, Temperature: 4 ° C, Injection: 0.1% loading, Column size: Φ40 × 182 mm (100 gram)

最終的に作製したカラムがペプチド実薬の精製において目標を達成するかどうか、分子量約4000／アミノ酸残基数35程度の合成ペプチド実薬の粗精製体（アドバイザーの浜理薬品工業(株)提供）の分離精製の検証を実施した（図 27・図 28）。二段階孔粒子充填カラムと従来粒子充填カラムのそれぞれで、最適な回収量となるグラジエントプログラムを定めたうえで逆相分取クロマトグラフィーを実施し、目的成分の分画から収率・純度を算出した。その結果、純度90%以上の分画では、医薬品粗精製品中の不純物を５０%以上の比率で低下することが確認され、従来粒子で50%の収率が二段階孔粒子では80%まで向上するという結果が得られた。また、実際のパイロット製造スケールで二段階孔粒子充填カラム（直径150 mm）を作製して合成ペプチド実薬の分離精製テストを実施し、先に実施したカラム内径10 mm・50 mm・150 mmの3種類の二段階孔粒子充填カラムに対して、スケーラビリティを有するかについて収率・純度を比較検証した。なお、内径50 mmと100 mmのカラムはDACシステムカラムを用いた。結果として、カラムサイズが増加しても粒状モノリス充填カラムの精製では

収率・純度が低下することなく、一貫して高い値が得られた。カラムサイズの増加に伴って収率が向上している点については、DACシステムにより充填効率が上がり分離性能に反映されたと考えられる。この結果により、DAC式大型カラムでのスラリー充填技術とペプチド実薬での分離性能の実証実験を実施し、粒状モノリスが実薬製造での分取精製で実用的であり、また広い範囲でのスケーラビリティをもつと評価された。

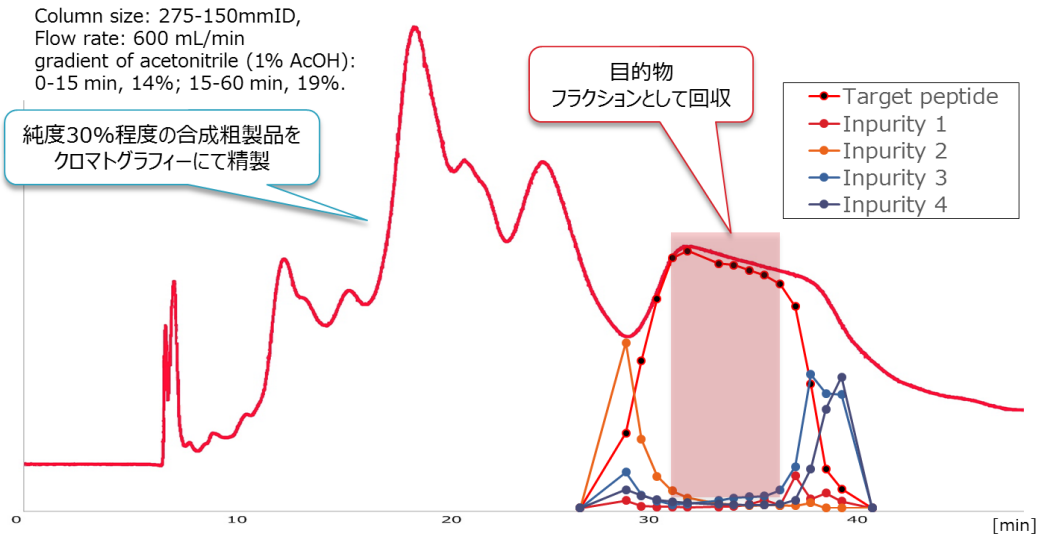


図 27　オクタデシル化二段階孔粒子充填 DAC 式大型カラム（φ150×275mm）での高分子ペプチド医薬品精製（分子量約 4 kDa）のクロマトグラム

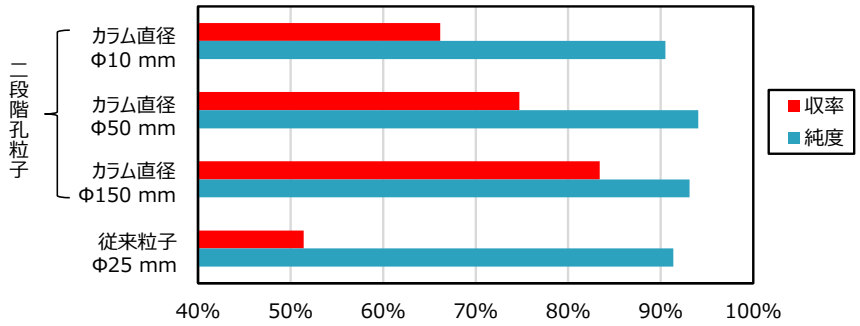


図 28　粒状モノリスと従来粒子のサイズの異なる分取精製用充填カラムにおける高分子ペプチド医薬品（分子量約 4 kDa）の逆相液体クロマトグラフィー精製後の収率と純度。

カラム長さ 250 mm．粒状モノリスの粒子径 20/45 μm・細孔径 20 nm，従来粒子の粒子径 20 μm・細孔径 25 nm

第3章　全体総括

3－1　複数年の研究開発成果

各開発課題の研究開発成果について表 4・表 5・表 6 に示した。

表 4　【1.二段階孔粒子の粉砕・分級技術の開発】

年度目標	進捗状況
（第一年度） 粉砕法確定と 20μm 粒径の回収率 50%以上	精密高速粉砕することにより、粒子径 20～63μm の範囲にて回収率 50%以上となる粉砕方法を確定した。
（第二年度） 分級効率 1 時間 1 リットルの目途	水簸での微粉除去等の連続湿式分級の開発を実施し、分級速度 1 時間 1 リットル以上となる分級技術を確立した。
（第三年度） 試作製造条件で 50%以上粉砕収率と分級 1L／時	試作製造バッチあたり 10 リットルとした二段階孔粒子製造での微粉除去・連続湿式分級方法の技術検討によって 50%以上の粉砕収率と分級速度 1 時間 1 リットル以上となる技術を確立した。

表 5　【2.二段階孔粒子の構造設計技術の開発】

年度目標	進捗状況
（第一年度） HPLC カラムでの粒状化カラムでシミュレーション化	二段階孔粒子の HPLC 粒状化カラムシミュレーションを実現し、粒子内気孔率 60%以上、貫通孔径は粒子径の概ね 5 %以上であることが、高性能かつ高速分離に好適な条件であることを確認した。
（第二年度） 大型カラムでの貫通孔・細孔の最適設計	流体力学シミュレーション解析を反映させた二段階孔粒子充填カラムを試作し、高性能分離に適した粒子径と貫通孔・細孔の相関を検証する開発を実施し、大型カラムに適した二段階孔粒子の貫通孔・細孔のパラメータとして、 ⑴貫通孔（最適範囲 0.1～3μm・中心 2 μm） ⑵細孔（最適範囲 12～30nm・中心 20nm） の最適値を設計した。
（第三年度） 分離性能 150%の微細構造の設計	二段階孔粒子構造の最適パラメータとして設計した分離性能 150%増となる貫通孔範囲（0.1～3μm）、細孔範囲（12～30nm）を設計し、実分析による性能実証試験を行うことで分離性能 150%増以上となる構造設計を完了した。

表 6　【3.二段階孔粒子の充填技術とペプチド精製計測技術の開発】

年度目標	進捗状況
（第一年度） カラムの必要仕様の設定と計測技術の検討	トリプシン分解リゾチームを用いた新たなペプチド計測技術開発に成功した。分析用小型カラムを分取用大型化する際に同様の分離条件となるスケールアップファクターの仕様設計を完了させた。
（第二年度） カラム充填技術を確立し分取条件を計測	ミニスケールから大型カラムでの低濃度スラリー粒子フロー充填技術を開発し、その再現性の検証からカラム充填技術を確立させた。さらに、ミニ～500mL カラムでリゾチームを酵素で消化分解させたペプチド混合物を用いた場合と、ペプチド実薬を用いた場合のそれぞれにて分取条件計測の開発を実施し、高分離性能を満たす条件設計を完了させた。
（第三年度） 2L カラムで精製時間 30%削減の条件確立	ペプチド実薬を模したタンパク分解ペプチドを使用し、製造規模の試験装置を使用して分離性能の実証実験を実施し、精製時間 30%以上削減可能な条件を確立した。

３－２　補助事業の成果に係る知的財産権の出願及び取得並びに論文掲載の有無及び内容

- 知的財産権出願：なし
- 論文掲載：２件
  - 分離技術 第 46 巻６号（2016）pp.9-16
  - Peptide Science 2015（日本ペプチド化学会）pp.103-106

３－３　研究開発後の課題

課題１：事業機関で得られたポジティブデータの事業化段階への反映

開発課題「2.二段階孔粒子の構造設計技術の開発」のシミュレーション結果で得られた二粒径混合モデルでの性能向上に関するデータなど、開発品の性能をさらに向上させる可能性を残す結果が多く得られている。これらのポジティブデータを研究開発後の事業化段階でどのように反映していくかが新しい課題となる。

課題２：学術的信頼性の確保

今回の開発を通して、学会発表・論文投稿等の数が少ない結果にて終了している。引き続き、学術的な知見から開発成果をまとめ上げ学術論文などで発表し、学術的信頼性が確保された開発製品として引き続き開発活動を持続することが課題となる。

課題３：品質保証体制の構築

開発した二段階孔粒子はペプチド医薬製造に用いられる場合、研究開発での初期検討が川下ユーザーで完了した場合、製薬製造工程に導入されることが容易に想定される。その場合は GMP や ISO 企画へ対応することが要求されるため、これらの国際規格・基準に対応する製品製造を実施する課題が生ずる。

３－４　事業化展開

（ａ）開発製品について・補助事業の成果・効果

開発した二段階孔粒子を DualPore（二段階孔）として名称設定する。開発した DualPore 技術により川下ユーザーはペプチド・核酸医薬の精製能力を飛躍的に高めることが可能となる。中低圧クロマトグラフィーの用途として、逆相フラッシュクロマトグラフィー用カラムおよびその充填材としての製品販売を行う。分離精製用カラムに従来技術比で 1.5 倍の分離性能をもたらすことで、医薬精製品に残留する不純物を 50%低下できる。これに伴い、ペプチドを大量製造レベルでも同様に分析カラムに相当する純度で分離精製できるようになるため、精製時間と使用溶剤量をいずれも 3 割削減できるようになる。これら川下ニーズに基づく高度化目標をすべて達成することで、川下であるユーザー側では製造コストの 3 割を占める精製工程コストを 30%削減でき、結果的に全製造コストを約 10%削減することが可能になる。ペプチド医薬の世界市場規模（約 160 億米ドル・2013 年）を鑑みれば、全製造コストを約 10%削減するだけでメーカーにとって相当するコストダウンに繋がり、補助事業の成果によって生み出される DualPore 粒子充填カラムは従来技術と比較して高い優位性を持つと考えている。

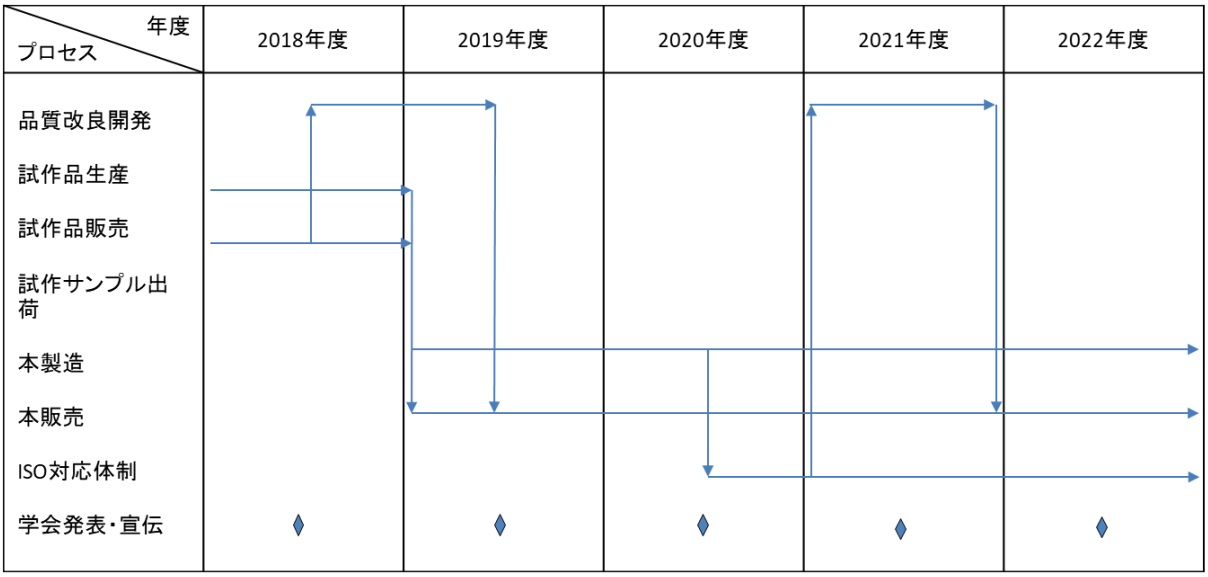
（ｂ）想定ユーザー、マーケット、市場規模等

具体的なユーザーはペプチド医薬品メーカーを主とする。製薬用消費材の世界市場は 2012 年における 1800 億円である（JSR 社 2012 年株主説明資料）。このセグメントでの本技術である高性能分取精製カラム技術が応用できる領域では 2012 年で合計 855 億円の市場を形成している。これはアフィニティ精製・イオン交換・HIC /Mix Mode・SEC・Monolith および連続クロマトにあたる領域である。さらに、全市場では 2020 年に 3000 億円と年率 10%の伸びで拡大すると予想されている。また、ペプチド医薬の世界市場規模は 2013 年で約 160 億米ドルである。ペプチド医薬市場の拡大に伴い、分取精製カラムも含めた精製プロセス消費財市場は今後さらに伸長すると予想している。

（ｃ）事業化見込み

- 事業名：　ペプチド／核酸医薬分離精製用二段階孔粒子充填カラム DualPore の製造販売
- 事業者名：　当事業実施機関を主とするジョイントベンチャー株式会社ディーピーエス
- 設立：　2017 年 10 月
- 事業開始時期：　2018 年4月
- 売り上げ規模：　約６０百万円（２０１８年度）→約４００百万円（２０２２年度）
- 事業化スケジュール：　表 7 に示した。

表 7　事業化遂行方法・スケジュール



以上