

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

学位論文題目	巨大バイオ分子のクロマトグラフィー分離挙動の解析と効率的な精製プロセスの開発 (Analysis of Chromatographic Separation Behavior and Development of Efficient Purification Process for Large Biomolecules)
氏 名	瀧地 正嵩

医薬品分野において、抗体医薬品や血液凝固因子といったバイオ医薬品の売上高は増加し続けており、その市場規模は、2015年の16兆円から2020年には30兆円にまで拡大すると予想されている。これらバイオ医薬品は体内への大量投与が必要なため、分離・精製プロセスでは各種クロマトグラフィーを組み合わせ、不純物を安全なレベルまで除去・低減される必要がある。一方で、バイオ医薬品は複雑な構造を持つ糖タンパク質であり、一般的な低分子合成医薬品と比べて分子量が10万を超える巨大バイオ分子も存在する。このような巨大バイオ分子のクロマトグラフィー分離挙動を解析した報告は少なく、工程の最適化が十分に行われていない場合が多い。近年の遺伝子組換え医薬品においては、産生細胞の発現系や培養方法の改良などによって、タンパク発現量が増大してきており、クロマトグラフィープロセスの処理能力の向上やコストダウンは重要な課題である。そこで本研究では、効率的な巨大バイオ分子のクロマトグラフィー精製プロセスを構築することを目的とし、特に一体型クロマトグラフィー分離剤であるモノリスに着目し、巨大バイオ分子の分離特性を分子拡散、吸着サイト数、動的吸着量等のデータに基づいて考察した。以下に各章の概要を示す。

第1章では、血漿分画製剤を例に巨大バイオ分子のクロマトグラフィー精製における課題をまとめた。

第2章では、巨大バイオ分子の流体力学的性質(大きさ)がクロマトグラフィー分離特性に与える影響について、分子の流体力学的半径  $R_h$ 、分子量  $M_w$ 、細孔内拡散係数  $D_s$ 、分子拡散係数  $D_m$  等のデータに基づいて考察した。 $D_m$  の測定方法として Taylor 法と動的光散乱法を使用し、はじめに、それぞれの方法で正確で信頼できる値を求めるための条件について検討した。次に、通常のタンパク質とさまざまな分子量の水溶性高分子 PEG(polyethylene glycol)を結合させた修飾タンパク質の  $D_m$  を測定した。どちらの方法からも、ほぼ同じ値が得られたが、それぞれの方法の特徴と制約因子に基づいて巨大バイオ分子の拡散係数測定における注意点をまとめた。球状タンパク質の  $D_m$  は  $M_w^{0.33}$  に比例して低下するが、一本鎖 DNA や線状のタンパク質の  $D_m$  値は球状タンパク質よりも小さな値となり、分子形状の影響が大きいことが示唆された。アガロースクロマト担体における細孔内拡散係数  $D_s$  は、 $D_m$  よりさらに低下し、 $D_s/D_m$  は分配係数  $K$  によく相関された。以上の結果から、巨大バイオ分子のクロマトグラフィー分離は、従来のような多孔性微粒子充填カラムによる分離は困難であり、モノリスのような貫通孔をもつ分離剤が有効であると考えられた。

第3章では、巨大バイオ分子をモノリスクロマトグラフィーで分離する際の最適なポアサイズについて層流細管流モデルに基づいて圧力損失、吸着サイト数、動的吸着量等のデータに基づいて考察した。圧力損失および動的吸着量はポアサイズに相関し、ポアサイズが大きいほど圧力損失は低い値となったが、吸着に使用できる表面積も減少するため、動的吸着量も低い値となった。一方、吸着サイト数は、ポアサイズに依存せず一定の値となり、モノリスのリガンド密度は同様であることが示された。また、ピーク幅の値も、ポアサイズに依存せず一定の値となり、Axial Flow モノリスクロマトグラフィーの結果とも一致した。この結果、生産スケールで使用する Radial Flow チューブ型モノリスへのスケールアップは容易であり、圧力損失や動的吸着量の点から最適なポアサイズを選択することが重要であることが示された。

第4章では、モノリスカラムのタンパク質吸着時の圧力損失について、分子サイズやタンパク質吸着層厚さに基づき解析を行い、最適なポアサイズについて考察した。サンプル吸着時には、ポア内に吸着層が形成されることでポアサイズが減少し、圧力損失が増加することが知られている。このポアサイズの減少は、理論的に分子半径とポアサイズを考慮して計算することができた。1.5 $\mu\text{m}$  のような小さなポアサイズでは、圧力損失が高すぎることもあり、急激な圧力上昇といったトラブルにもつながる。動的吸着量が低下するが、高流速で操作が可能な、大きいポアサイズのモノリスが良い選択である場合があった。ポアサイズは、圧力損失と動的吸着量を考慮して注意深く調整することが重要である。

# 学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

## (博士後期課程博士用)

山口大学大学院医学系研究科

報告番号	医博甲 第 1501 号	氏名	濱地 正嵩
最終試験担当者		主 査	山本 修一
		審査委員	赤田 倫治
		審査委員	堤 宏守
		審査委員	田中 一宏
		審査委員	吉本 則子
【論文題目】			
巨大バイオ分子のクロマトグラフィー分離挙動の解析と効率的な精製プロセスの開発 (Analysis of Chromatographic Separation Behavior and Development of Efficient Purification Process for Large Biomolecules)			
【論文審査の結果及び最終試験の結果】			
<p>抗体医薬品や血液凝固因子といったバイオ医薬品の売上高は増加し続けており、2020年には30兆円に到達すると予想されている。バイオ医薬品は体内への大量投与が必要なため、分離・精製プロセスでは各種クロマトグラフィーを組み合わせ、不純物を安全なレベルまで除去・低減する必要がある。一方で、バイオ医薬品は複雑な構造を持ち、低分子合成医薬品と比べて分子量が10万を超える巨大バイオ分子も存在する。このような巨大バイオ分子のクロマトグラフィー分離挙動を解析した報告は少なく、工程の最適化が十分に行われていない場合が多い。近年の遺伝子組換え医薬品においては、産生細胞の発現系や培養方法の改良などによって、タンパク発現量が増大してきており、クロマトグラフィープロセスの処理能力の向上やコストダウンは重要な課題である。</p> <p>本研究では、効率的な巨大バイオ分子のクロマトグラフィー精製プロセスを構築することを目的とし、巨大バイオ分子の分離挙動を分子拡散、吸着サイト数、動的吸着量等の分離特性のデータに基づいて考察し新たな知見を得ている。論文の構成は以下のとおりである。</p> <p>第1章では、血漿分画製剤を例に巨大バイオ分子のクロマトグラフィー精製における課題をまとめている。</p> <p>第2章では、巨大バイオ分子の流体力学的性質がクロマトグラフィー分離吸着性能に与える影響について、分子の流体力学的半径 <math>R_h</math>、分子量 <math>M_w</math>、細孔内拡散係数 <math>D_s</math>、分子拡散係数 <math>D_m</math> 等のデータに基づいて考察した。細管内層流分布に基づく Taylor 法と動的光散乱(DLS)法を用いて測定した <math>D_m</math> は、<math>M_w</math> に依存し、球状タンパク質では Young らの式で示されるように <math>M_w^{-0.33}</math> に比例して低下した。一方、一本鎖 DNA である Poly T も同様に <math>M_w</math> の増加とともに <math>D_m</math> は低下したが、その値は球状タンパク質よりも小さな値となった。これは、一本鎖 DNA の分子構造が影響していると考えられた。PEG(polyethylene glycol)で修飾されたタンパク質 BSA は、拡散係数が低下したが、これは PEG 修飾による <math>R_h</math> の増加によるものであると考えられた。以上の結果から、巨大バイオ分子のクロマトグラフィー分離は、従来のような多孔性微粒子充填カラムによる分離は困難であり、モリスカラムのような貫通孔をもつ粒子が有効であると考えられた。</p>			

第3章では、分子量10万を超える巨大バイオ分子をモノリスで分離精製するときの最適なポアサイズについて圧力損失、吸着サイト数、動的吸着量DBC等の分離特性のデータに基づいて考察した。圧力損失および動的吸着量はポアサイズに相関し、ポアサイズが大きいほど圧力損失は低い値となったが、吸着に使用できる表面積も減少するため、DBCも低い値となった。一方、吸着サイト数は、ポアサイズに依存せず一定の値となり、モノリスのリガンド密度は同様であることが示された。ピーク幅も、ポアサイズに依存せず一定の値となり、Axial Flow モノリスクロマトグラフィーの結果とも一致した。この結果、生産スケールで使用するRadial Flow チューブ型モノリスへのスケールアップは容易であり、圧力損失や動的吸着量の点から最適なポアサイズを選択することが重要であることが示された。

第4章では、モノリスカラムのタンパク質吸着時の圧力損失について、分子サイズやタンパク質吸着層厚さに基づき解析を行い、最適なポアサイズについて考察した。サンプル吸着時には、ポア内に吸着層が形成されることでポアサイズが減少し、圧力損失が増加する。ポアサイズの減少は、理論的に分子半径とポアサイズを考慮して計算することができた。1.5  $\mu\text{m}$  のような小さなポアサイズでは、急激な圧力上昇によるトラブルにもつながる。DBCは低下するが、高流速操作が可能な、大きいポアサイズが良い場合もある。ポアサイズは、圧力損失とDBCを考慮して注意深く選定すべきである。

公聴会には、本学の教員・学生に加えて、化学会社、製薬会社の研究者が参加し、活発な質疑応答がなされた。主な質問は、以下の3点についてであった。

- [1] 操作中のモノリスの圧力増加: 洗浄で元に戻るのか。タンパク質の吸着時の構造変化は影響しているのか。どこまでの圧力が許容範囲なのか。
- [2] モデルによる予測: 空隙率が同じモノリスでも、内部構造が異なると圧力損失は異なるのでは。
- [3] 膜型からチューブ型へのスケールアップ: 容易であると結論づけているが、問題点はないのか。

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。

以上より、本研究は独創性、新規性に優れ、博士(生命科学)論文に十分値するものと判定した。論文内容および審査会、公聴会での質問に対する応答などから、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 (査読付き国際会議のプロシーディング1編含む)

- (1) 著者氏名: Ales Podgornik, Masataka Hamachi, Yu Isakari, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto  
論文題目: Effect of pore size on performance of monolithic tube chromatography of large biomolecules  
学術雑誌名: Electrophoresis  
巻、号、頁: Vol. 38, No. 22-23, pp. 2892-2899  
発行年月: 2017年12月発行
- (2) 著者氏名: 濱地正嵩, 吉本則子, 山本修一  
論文題目: 巨大なタンパク質やバイオナノ粒子の拡散係数の測定方法  
学術雑誌名: 日本食品工学会誌  
巻、号、頁: Vol. 18, No. 4, pp. 187--191  
発行年月: 2017年12月発行
- (3) 著者氏名: Masataka Hamachi, Joao Cardoso, Noriko Yoshimoto and Shuichi Yamamoto  
論文題目: Retention and diffusion behaviours of large biomacromolecules in chromatography solid phase  
学術雑誌名: Proceedings of 3rd International Symposium on Multiscale Multiphase Process Engineering  
巻、号、頁: pp.243-247  
発行年月: 2017年5月発行