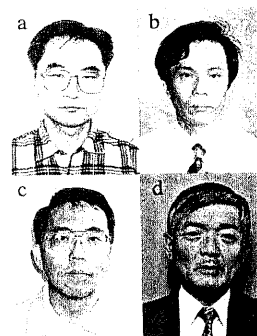


〔生物工学会誌 第76巻 第9号 389-397. 1998〕

総合論文

タクロリムス (Tacrolimus, FK506)
の工業化研究

(平成9年度 日本生物工学会技術賞受賞)

添田 慎介^{1*}a・明石 健志^{1b}・前田 清^{2c}
川北 毅^{3d}

Studies on the Development of Tacrolimus Production —Monograph—

SHINSUKE SOEDA,¹ TAKESHI AKASHI,¹ KIYOSHI MAEDA,² and TAKESHI KAWAGITA³ (*Fermentation Development Laboratories¹ and Nagoya plant,² Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 156 Nakagawara, Shinkawa-cho, Nishikasugai-gun, Aichi 452-0915 and Analytical Science Laboratories Co., Ltd., 2-1-6-Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532-8514³*) *Seibutsu-kogaku* 76: 389-397, 1998.

Tacrolimus is an immunosuppressant macrolide isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. It is used clinically to prevent the rejection of tissue transplants. To achieve the industrial production of tacrolimus, development research was aimed at breeding strains that efficiently produce tacrolimus, optimizing the cultivation conditions, determining an effective purification method, and establishing a means of rapid quantitative analysis. The wild-type *S. tsukubaensis* was sequentially treated with ultra violet light to furnish various types of morphologically altered mutants, from which a desired strain was selected and bred. For the fermentation of the new strain, a cultivation medium was formulated with a low viscosity and resistant to thermo-denaturation on sterilization. In a scale-up study, in which the fermentor size was increased from 30 l to 25 kl, the productivity of tacrolimus was found to be well reproduced by keeping both the dissolved oxygen and the agitation at low levels during the growth phase of the producing strain. As a result of these procedures, the concentration of tacrolimus in the fermentation broth was increased 300-fold over that obtained in the early stages of the research with the wild strain. *S. tsukubaensis* produces many kinds of proteins and oligosaccharides as well as various types of tacrolimus related compounds. To remove these impurities effectively, the cultivation broth was directly extracted with acetone. The extract was successively purified with a high porosity absorbance resin, and acidic and natural silica gel column chromatography, followed by recrystallization in aqueous acetonitrile, to obtain tacrolimus monohydrate. Tacrolimus itself is readily converted to optical and steric isomers in an aqueous solution. When tacrolimus was analyzed by HPLC at lower temperatures, the peaks corresponding to the macrolide were complex because of cis-trans isomerization in the column. The problem was overcome by heating the column to 50°C, when the isomerization rate was so high that the peaks were fused into a single, sharp one. The epimerization ratio was found to depend on the concentration of water in the solution, but the ratio remained constant when a Brij-35 solution used as a diluent. By these procedures, a simple, rapid and reliable analytical method was established. The industrial production of tacrolimus was thus achieved by a combination of fermentation, purification, and analytical investigations.

[Key words: tacrolimus, *Streptomyces*, breeding, isomerization, epimerization, HPLC]

はじめに

タクロリムス (一般名, 開発名 FK506, 商品名, プロ

グラフ) は, 1984年当社探索研究所・発酵担当によって筑波山の土壌より分離された *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993 の培養液中より発見された免疫抑制剤である。タ¹ 藤沢薬品工業株式会社工業化第二研究所, ² 名古屋工場製造企画部 (〒452-0915 愛知県西春日井郡新川町中河原156)³ 分析科学研究所 (〒532-8514 大阪府大阪市淀川区加島2-1-6)

*著者紹介 (代表) 1975年東京教育大学大学院農学研究科修士課程修了 藤沢薬品工業株式会社工業化第二研究所 主任研究員

TEL. 052-400-2623 FAX. 052-400-1380 E-mail: shinsuke-soeda@rd.fujisawa.co.jp

タクロリムスの生産性を上げる試みは、発見当初に培養条件の最適化により探索研究所・発酵担当にて行われ、十倍以上の生産性向上が成されていた。その後、1986年から前臨床評価用サンプル製造を目的とした菌株育種、培地培養条件の改良を含めた生産力価の向上および抽出精製法の改良が当研究所（工業化第二研究所）で行われた。生産菌株の改良および培養検討により、さらに数十倍の生産力価を得ることができた。並行して行った、微量に併産されるプログراف類縁物質の精製除去および簡便なHPLC定量法の開発においても良い結果を得た。この間開発も順調に進み、工業化に向けて培養・精製のスケールアップ検討を行い、多くの問題を解決して工業化に成功した。

1. 発酵工程工業化検討

1.1 研究戦略 タクロリムスは、数ミリグラムという微量の投与量で薬効が現れると考えられたため、一般の抗生物質発酵で求められる生産量の1/10量で十分に企業化が可能であると考えた。また発酵工程は経済性を強く意識し、小型で省力化され、できる限り無人化したいと考えた。そこで培養管理が単純化された生産プロセスの構築を意図し、バッチ培養で開発することとした。バッチ培養の利点は、フラスコ培養から生産培養まで一

貫した手法でスケールアップが可能であり、開発時間の短縮が図れること、かつ先に記したように省力化および発酵管理の単純化が図りやすいことにある。

1.2 菌株育種

1.2.1 菌株育種の目標 発酵工程工業化検討の中でもっとも重要な因子は、優良菌株の育種であると言っても過言でない。過去の幾多の事例を見ても、このことは明らかである。当研究所においても、工業化に適した性質を有するタクロリムス生産菌株の取得を最大の目標とした。そして、まずタクロリムスを発酵生産するうえで技術的に解決すべき問題点の抽出を、野生菌株を用いて行った (Fig. 1)。

タクロリムス発酵の特徴を、以下にまとめる。

- ①発酵形態は、培養初期（培養3日目まで大量の酸素を必要とする生育期）と、培養中期以降（培養4日目以降、酸素をあまり必要としない生産期）の二相性であること
- ②培養液の粘度がきわめて高く、酸素供給不足となって発酵が停止すること
- ③高粘度液のため、ろ過性が著しく悪いことなどである。

これらの結果に基づき、工業化に適した性質を有するタクロリムス生産菌株の選別基準を以下のように決定し

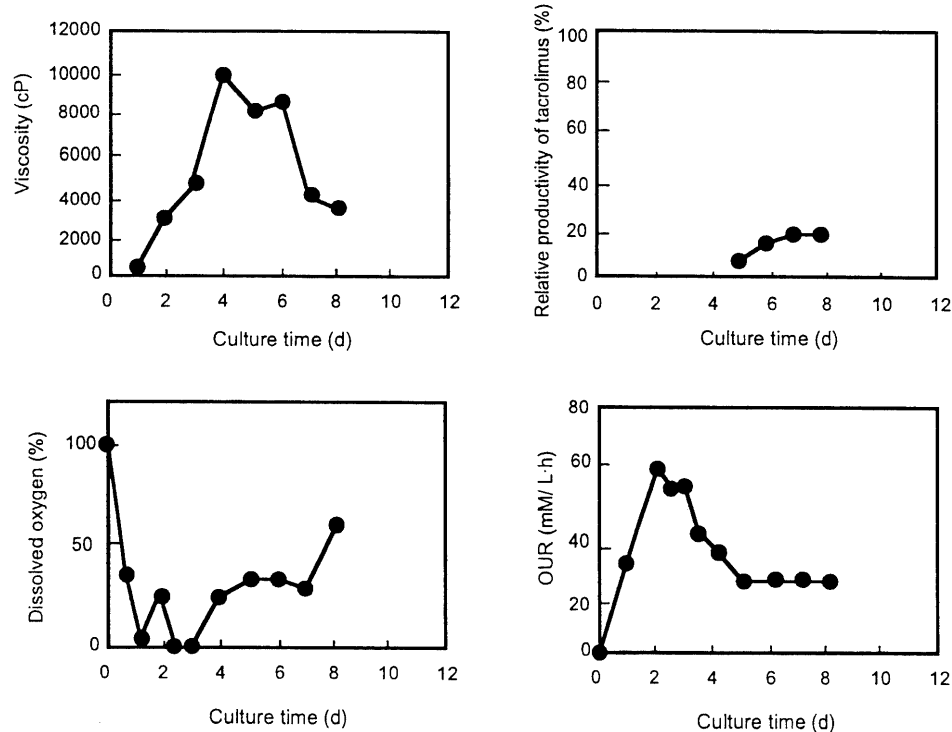


Fig. 1. Typical fermentation pattern of *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993.

た. すなわち,

イ. 培養中の液粘度の低い菌

ロ. 酸素要求の少ない菌

ハ. ろ過性のすぐれた菌

ニ. グルコースなど培養液の粘度に影響を与えない炭素源を利用できる菌

である.

培地組成は, Table 1 に示すように炭素源基質として酸化デンプンを用いており, 酸化デンプンによる培養液の高粘度化も将来の培地高濃度化検討において, 力価向上に対する阻害の一因と成りうると考えられた. そこで, グルコースなどデンプン以外の炭素源への代替も試みたが, デンプン以外の炭素源ではタクロリムスは, まったく生産されなかった. そのため我々は, 高粘度培養液対策の一環として, ニ項に示した菌株の取得も育種方針とした.

1.2.2 低粘度性菌の育種 菌株育種の課題の中で特に主要な問題は, 培養中に生産菌の増殖にともない粘度が増加し, 生産菌の要求する酸素量を十分に供給できない点であった. 一般に酸素供給は, 空気の通気や攪拌により行われる. しかし, タクロリムス発酵においては, これら条件の変更で対処することは, 以下の点から困難と考えられた. すなわち, ①培養液が高粘度となるため, 酸素供給を維持するためには高攪拌が必要となり, 生産菌の生育が阻害されたこと (Fig. 2), ②所要動力も膨大なものとなり, 設備能力を大幅に越えてしまうと推定されたこと, の2つの理由からである. このようなとき一般的な解決策として, 酸素富加空気または純酸素を用い高圧高通気培養によって大量の酸素を培養液中に供給する方法や, 培養液粘度を低下させる方法, 酸素要求量の低い菌株を取得するなどの方法が検討されている. 我々は, 培養液粘度の低減化に着目し, 培養液の粘度が高くなる要因を調べた. 高粘度の主な要因としては, 粘性物質の生成, 生産菌糸の伸長と絡み合い, デンプンなど高粘度培地成分の使用などが考えられた. これらの要因の中でタクロリムス発酵においては, 菌糸の伸長と絡み合いが主要因であることを見だし, 菌糸の短い菌または分岐が少ない菌の取得を菌株育種の第一目標とした. 培養液中の菌糸形態が変化した菌は寒天平板培地上でのコロニー形態が変化している菌株の中に存在すると考え, 親株とコロニー形態の異なる変異菌株を数多く集め, 培養の粘度とコロニー形態の関係を調べた. 寒天平板培地の組成を工夫し得られた低粘性菌の形態を変化させた後, さらに繰り返して改良を続け, 多くの新たな形態変

Table 1. Medium composition for tacrolimus fermentation.

Oxidized starch	10 %
Wheat germ meal	2 %
Dried yeast	1 %
Corn steep liquor	2 %
Calcium carbonate	0.1%
Cobalt chloride	5 ppm
Sodium iodide	0.4 ppm

異株を取得し, 培養液中の粘度のきわめて低下した変異株を取得するのに成功した (Fig. 3). 同時に, ろ過性も改善された. また, 培養液の粘度が低下したことにより, 培地濃度を増量し生産菌量を増やすことも可能となり, タクロリムスの生産性を向上することができた.

1.2.3 胞子形成能の脱落 胞子形成能の低下が, 菌株育種による生産性向上が進むにつれて, 認められた (Fig. 4). 胞子形成は, 菌株の保存や変異処理操作など育種改良を進めるうえでもっとも重要な要因であると言える. そこで, 胞子形成能回復の検討を行った結果, 平板培地やスラント培地検討の結果, 微量元素の添加と資化されにくい炭素源を用いた培地にすることにより, 胞子形成能が回復する傾向にあることを見いだした.

1.2.4 液体培養中の低力価菌の出現 フラスコやジャーフェーマンターを用いた液体培養評価において, 生産力価の低い菌株が, 培養液中に出現する現象が認められた. また, 生産力価の低い菌株は, 培養日数を経るに従って増加することも分かった. これらの菌株は, 寒天平板培地上でコロニーの形態が通常のものとは異なる. このことを利用して, 優良菌株の選別法として, フラスコ培養を数代継続して行い (継代培養法), 得られた培養液を寒天平板培地上に撒き, 異形コロニーの出現頻度が

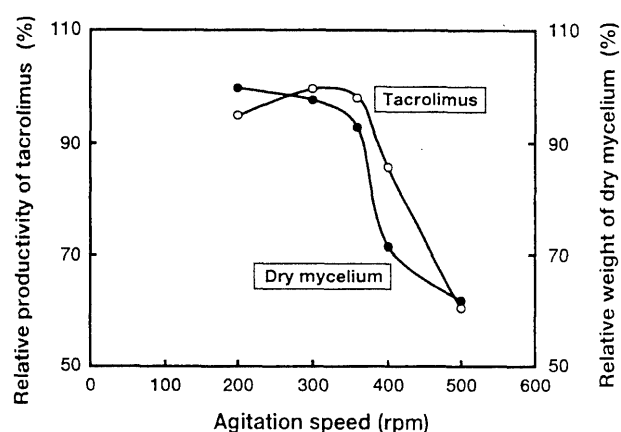
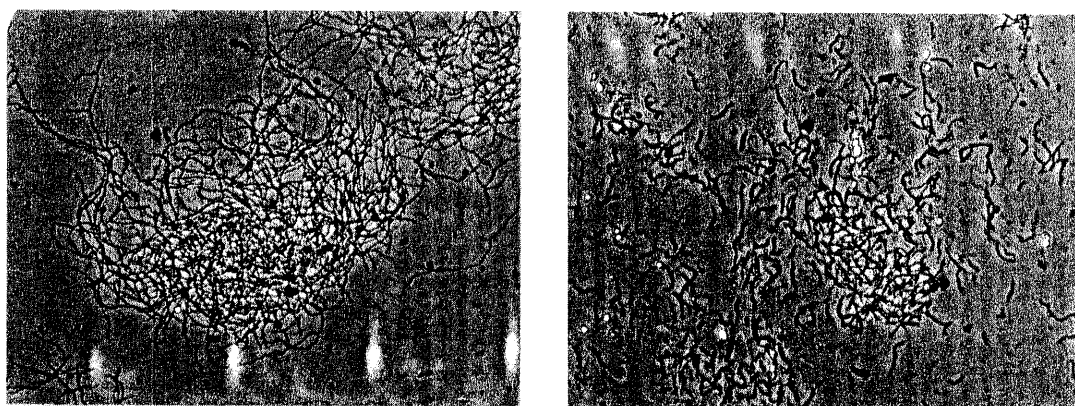


Fig. 2. Effect of agitation speed in early phase on tacrolimus productivity.



Wild strain

Improved strain

Fig. 3. Morphology of wild and improved strains in submerged culture.

少ない菌株を取得する方法を考案した。このような方法を繰り返し行うことにより、培養中に低力価菌が出現する頻度の少ない菌株を得ることができた。

1.3 培地改良検討 前にも述べたように、タクロリムスの発酵生産においてデンプンは必須成分である。しかし、培養液の粘度が極端に高くなるという問題点があった。そこで、デンプンをグルコースなどの単糖類や少糖類に代替する検討を行ったが、滅菌操作ででき上がる培地の品質が劣化することおよびグルコースによる代謝阻害が生ずることにより、良い結果は得られなかった。そこで、滅菌操作によっても品質が変化せず、培養中のpH変動の少ない培地組成の検討と、少糖類による代謝阻害を受けにくい菌株育種検討を進めた。その結果、改良株と酸処理をしたデンプンを炭素源に用いることにより培養時の液粘度が低下し、培地組成の適正化により最適pH推移を保持させることができ、タクロリムス生産量も増加した。しかも、培養スケールの違いによる滅菌

条件の変化によって培地の品質が変化しない培地を開発することができたことにより、次のスケールアップ検討を容易にすることができた。

1.4 スケールアップ検討

1.4.1 攪拌の影響 フラスコ培養から、通気攪拌培養へのスケールアップには、溶存酸素濃度や攪拌せん断力の影響が考えられる。まず、攪拌回転数の影響を30 l容ジャーフェンターで調べたところ (Fig. 2) タクロリムスの生産には360 rpmが至適であるが、培養3日目までの攪拌を高くすると菌の生育に遅れが現れることが判明した。また、培養4日目以降には、回転数が400 rpm以下の条件ではタクロリムスの生産がきわめて低下することも判った (Fig. 5)。この現象は、培養液の粘度がきわめて高いために十分に混合されず、菌に栄養が供給されないためと考えられた。

1.4.2 溶存酸素量の影響 培養3日目までを菌の生育期、タクロリムス生産が開始される培養4日目以降を

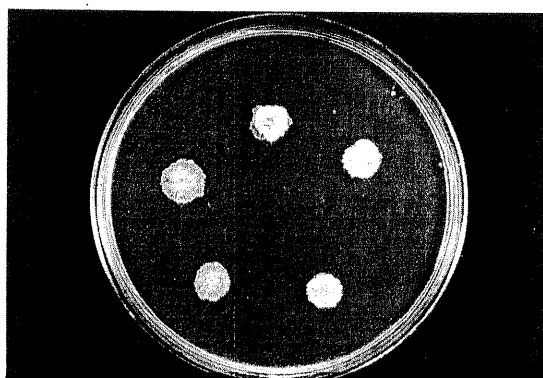


Fig. 4. Colony types of strains obtained during breeding (clockwise). As breeding progressed, the colonies tended to become non-sporulative types.

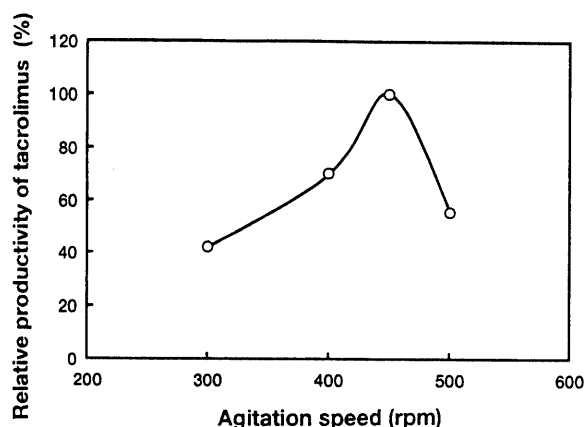


Fig. 5. Effect of agitation speed in late production phase on tacrolimus productivity.

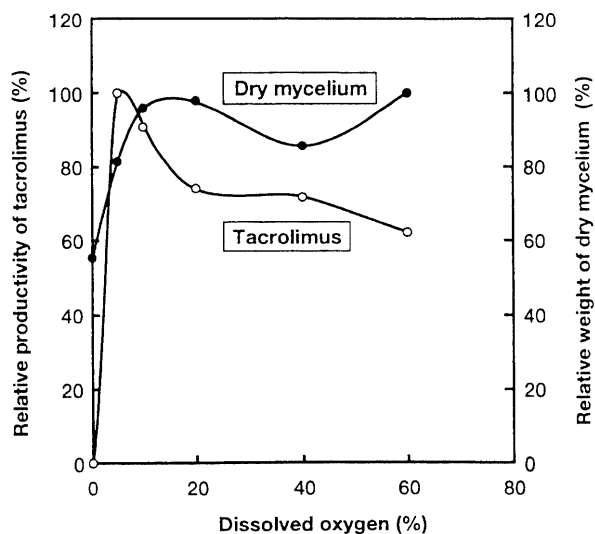


Fig. 6. Effect of dissolved oxygen level on tacrolimus productivity.

生産期として溶存酸素濃度の影響を30 l容ジャーフェメンターで調べた。その結果、タクロリムス発酵工程において、生育期は溶存酸素濃度と生産とは負の相関関係にあり、溶存酸素濃度を低く保つ発酵方式が望ましく、最大生産を与える溶存酸素濃度は0.3 ppmであった (Fig. 6)。一方、生産期における溶存酸素濃度とタクロリムス生産の間には何らの相関も見られなかった。

これらに結果から、初発回転数の設定がスケールアップの要点であることが明らかとなった。各種スケールアップ指標を用いて30 lジャーフェメンターと1 klタンク、4 klタンクの培養状態と初発回転数の影響の関係について調べたところ、攪拌慣性力 $=\rho N^2 D$ と初期培養推移やタクロリムス生産に強い相関が見られた。そこで、上記の式を回転数設定基準として、生育期の溶存酸素濃度を0.3 ppmレベルに維持するという指標でスケールアップを行ったところ、ジャーフェメンター培養から生産培養までのスケールアップの間で培養推移はほとんど同じであり、タクロリムス生産量も95%とよく一致した

Table 2. Summary of scale-up study on tacrolimus fermentation.

Fermentor size (kl)	Tacrolimus productivity (%)
0.0001	95
0.03	98
1	100
4	98
25	95
Commercial scale	95

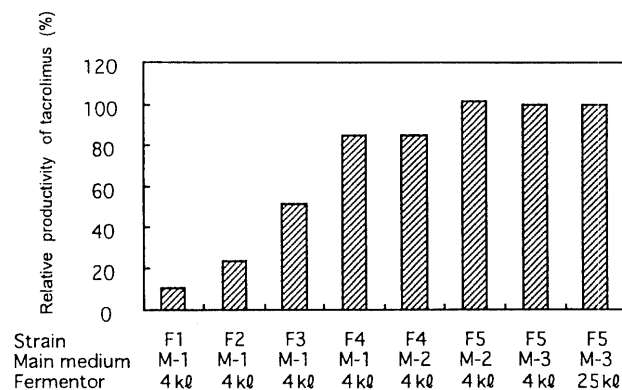


Fig. 7. Tacrolimus production with different strains.

(Table 2).

以上の検討結果を受けて、順次改良を重ねながら最適化を行うことにより、大型通気攪拌培養槽へのスケールアップに成功し、かつ数十倍の生産性向上を短期間に達成することができた (Fig. 7)。

2. 精製の工業化検討

微生物の培養液の中には、多くのタンパク質や多糖類が併産されている。またタクロリムス生産菌 *S. tsukubaensis* No. 9993 の培養液中には、他の天然物生理活性物質同

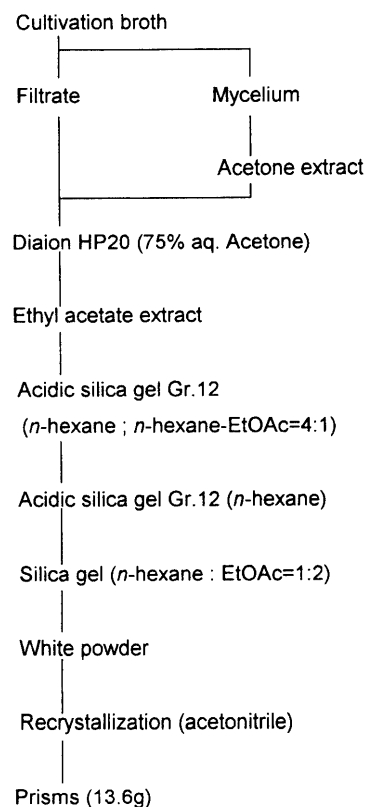


Fig. 8. Procedure for tacrolimus isolation.

様に, FR900520, FR900525, FR901154, FR901155, FR901429 などの多量のタクロリムス類縁物質が併産されている.¹⁻³⁾ これら不純物を除去し, 高純度のタクロリムスを取得するために, 探索研究所・発酵担当において, タクロリムス発見当初に確立された精製法は, Fig. 8 に示した通りである. この精製法の特徴は, ①タクロリムスが発酵上澄液中と菌体内の両方に存在するので, 両者から精製していること, ② HP20 や SP207 などのハイポラス型吸着樹脂を用いて多くのタンパク質や多糖類を除去していること, ③酸性シリカゲルやシリカゲルを用いてカラムクロマトグラムを行うことで, 多くの関連物質を除去していること, ④結晶化において, アセトニトリルやアルコールなどの有機溶媒のみを使用し, 互変異性体 (Fig. 9) を生成しないようにすることな

どである. タクロリムスは, 含水溶媒の中では容易に互変異性体を形成するが, 互変異性体については, 次項 (3. タクロリムスの HPLC 定量法の確立⁴⁾) で詳しく述べる.

その後, 開発が進み, 工業化第二研究所でタクロリムスの前臨床評価用サンプル製造を開始した時, 将来の治験用サンプル製造や工業化を睨んで, 我々は以下のような研究戦略を立て, 検討を進めた. すなわち, 高品質・低コストでしかも環境に優しい工業的精製法を確立することである. 構造類縁物質は, たとえ活性や毒性の強さが同じであっても GMP (Good Manufacturing Practice) による品質管理においては不純物と見なされる. タクロリムスは, 海外でも並行して開発を進めることになっていたため, GMP に則った精製法の確立が必須であった.

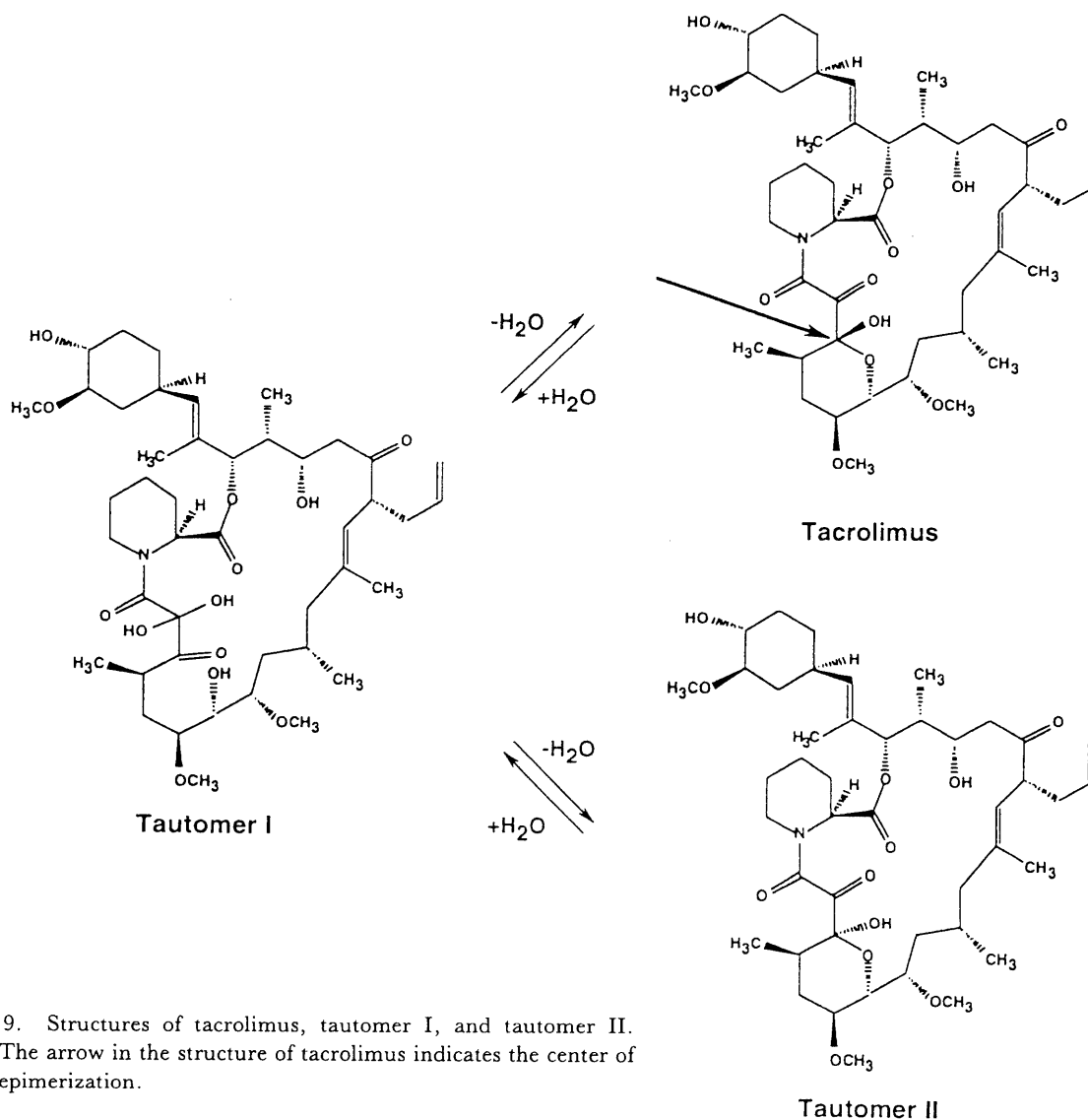


Fig. 9. Structures of tacrolimus, tautomer I, and tautomer II. The arrow in the structure of tacrolimus indicates the center of epimerization.

我々は、各不純物の HPLC 純度が各々 0.2% 以下に、また、不純物のトータルが 2.0% 以下になるように工業スケールでの精製法確立を目指した。

工業化第二研究所で行った、タクロリムスの工業化研究において得られた知見のいくつかを以下に紹介する。開発初期は、活性物質の溶媒での抽出率が低かったため、ろ液と菌体に分けてから菌体のアセトン抽出を行い、その後、ろ液と合わせて HP20 による一次処理を行っていたが、菌株育種改良と培養検討の結果、生産性が向上してからは培養液に直接アセトンを加えて抽出しても収率よく抽出できるようになったので、そのように精製法の変更を行った。先に述べたように、タクロリムスは、含水溶媒の中では容易に互変異性体を形成するが、非極性溶媒中では、タクロリムスのみに収束させることができる。そこで、一次処理としては、タンパク質や多糖類を除去することに主眼をおき、互変異性体を多く生成してしまいが、敢えて水を使うことによりタクロリムスを他の互変異性体とともに樹脂に吸着させ、タンパク質や多糖類を完全に除去した後、タクロリムス群を同一画分に溶出できる HP20 や SP207 などのハイポーラス型吸着樹脂を用いることとした。ただし、溶出剤はより互変異性体を生成しにくいように、また、その後のクロマト工程のために非水系溶媒に置換しやすいように、75% アセトン水から 100% 非極性溶媒に変更した。互変異性体が形成されにくいようにした。その後の工程も、できる限り水を使用しない精製手段を採用すべく検討を重ねた。また、コストの点から工業的製造法には取り入れなかったが、活性炭カラムも有効な一次処理法であった。

なお、当時発展期にあった大量分取用の ODS および ODP などの逆相系担体を用いるカラムクロマトグラフでは、展開剤として水-溶媒系混合溶液を使用するので、カラム中でタクロリムスの互変異性体が形成され、それらが不純物とともに分離されてしまう。それは結果的にタクロリムスの精製収率低下につながるため、タクロリムスの精製には適さない。そこで我々は、一次処理に続くクロマト工程には、有機溶剤のみを使用するシリカゲル中心の精製法を検討し確立した。なお、各種シリカゲルカラムを検討する中で、大岳らによる専門書など^{5,6)}に紹介されている、構造の似通った化合物を不飽和結合の有無によって分離する手段として、硝酸銀を含有したシリカゲルが有効であるということは、たとえばタクロリムスと FR901556 (FR075451) の分離においても有効であった。さらに、結晶化検討では単一溶媒よりも互変異性体を形成する恐れはあるが、水を添加した方

が他の不純物の除去率が良かったので、あえて水を添加して結晶化することとした。タクロリムスは 1 水和物として結晶化されてくるので、その点からも水を添加する意味はある。このようにいろいろな角度から検討を重ね、それらの結果にコストや環境負荷を考慮して最終精製法を設定した。こうして最終的には、各不純物 0.1% 以下、トータル不純物 1.0% 以下の高純度原薬を工業スケールで製造することを可能にした。

3. タクロリムス (FK506) の HPLC 定量法の確立

工業化研究において、不可欠な基盤技術 (インフラストラクチャー・テクノロジー) の 1 つとして、目的物の定量が挙げられる。発酵生産の工業化研究においては、菌株育種改良のスクリーニング手段として、培養・精製工程の最適化や評価手段として簡便で迅速な分析方法が要求される。また、発酵生産物の定量分析では、類縁物質を含む発酵副生産物や培地由来不純物の妨害があり、それらを分離して定量できる HPLC 分析は無くしてはならない手段である。タクロリムスは 14 個の光学活性中心と 2 個の炭素-炭素二重結合を有する大環状ラクトンである。HPLC 分析においては、そのユニークな物性に由来する立体異性化反応により興味あるクロマトパターンを示すことが明らかとなった。タクロリムスの定量分析法の研究プロセスで得られた知見について、以下に述べる。

3.1 シス・トランス互変異性体のクロマトグラムへの影響 タクロリムスは、溶液中でシス・トランス変換による幾何学的互変異性化とピペコリン酸部分での光学的互変異性化による、多種の立体異性体 (幾何異性体・光学異性体) の複雑な平衡状態にあることが知られている^{7,8)} (Fig. 9)。タクロリムス溶液を逆相 HPLC で分析すると、カラム温度により溶出パターンがまったく異なるクロマトグラムが得られる (Fig. 10)。この現象は、シス・トランス異性化が影響しており、⁹⁾カラム内での異性化反応によるものと説明できる。5°C では異性化スピードが遅く、シス・トランス体は分離され、さらにカラム中で生成した変換体が両ピークの間連続的に溶出されて、特徴のあるクロマトグラムを形成する。15°C ではシス・トランス変換スピードが速くなるために、カラム中でシス・トランス体の融合体としてブロードなピークを形成する。さらに、カラム温度を高温にすることにより、カラム中でのシス・トランス変換が高速となり、融合ピークはシャープになる。定量分析では、よりシャープなピークが望ましいが、カラムの耐久性を考慮

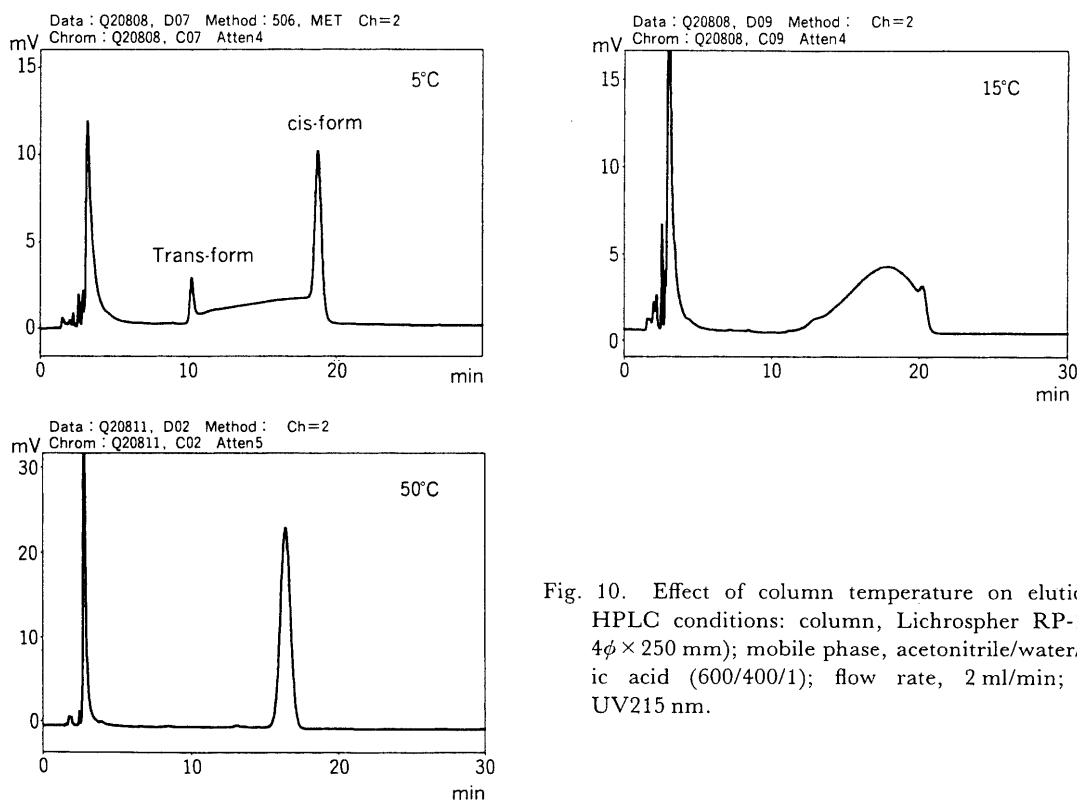


Fig. 10. Effect of column temperature on elution profile. HPLC conditions: column, Lichrospher RP-18(e) (5 μ , 4 ϕ \times 250 mm); mobile phase, acetonitrile/water/phosphoric acid (600/400/1); flow rate, 2 ml/min; detection, UV215 nm.

して、カラム温度は 50°C に設定することにした。

3.2 互変異性の形成によるエピマー体のクロマトグラムへの影響 タクロリムスの溶液を上記のように設定した条件で分析すると、メインピークの他にエピマー（互変異性体 II）およびその中間体（互変異性体 I）のピークが認められる (Fig. 11)。タクロリムスを含めたこれらのピーク面積の比率は、同一濃度に調製した試料溶液間においても水分含量の違いにより異なっていることが分かり、これらの現象に水の含量が関与していると推

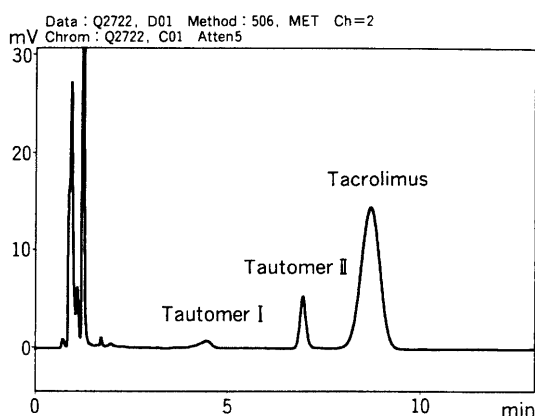


Fig. 11. Typical chromatogram of tacrolimus in acetonitrile-water solution (50-50, v/v). The chromatographic conditions were the same as in Fig. 10. The column temperature was 50°C.

測した。この現象は、ピークの面積または高さをデータとして用いる HPLC 定量分析では致命的な欠陥であるため、この平衡機序を調べた。溶液中の平衡化現象に関わる因子として、水濃度、pH、温度の影響を実験した。Fig. 12 に示すように、溶液中の水濃度により各ピークの面積比率は異なっている。水濃度の増加とともにタクロリムス、互変異性体 II のピークは小さくなり、互変

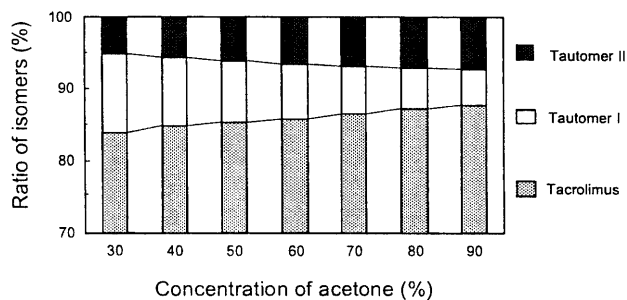


Fig. 12. Effect of water concentration on tautomeric equilibrium. A solution of tacrolimus (100 μ g/ml) was left overnight at ambient temperature and then analyzed by HPLC. The equilibrium of the tautomerism is represented by percentage ratio of each peak area of tacrolimus and tautomers I and II. For example, the percentage ratio of tautomer I was calculated as follows: Ratio (%) of tautomer I = $AI \times 100 / (AI + AII + At)$, where AI, AII and At are the peaks area of tautomers I and II and tacrolimus, respectively.

異性体 I のピークが大きくなる。この現象はアセトン、アセトニトリル、エタノールなどの含水溶液で共通しており、水を含まない有機溶媒溶液では互変異性体の生成は見られなかった。また、溶液の pH により、これらの異性体間の平衡状態は変化しないものの、平衡化スピードは大きく影響を受けることが分かった。すなわち、酸性域では平衡状態到達スピードが遅く、中性域では速くなる。同様に溶液温度も平衡状態到達スピードに影響し、高温ほど平衡状態到達スピードは速くなることが観察された。

3.3 HPLC 定量法の確立 上記の実験より、タクロリムス、互変異性体 I、互変異性体 II の平衡は水分含量に依存していることが分かった。このことは、含水量が一定でない試料間では平衡状態が異なり、HPLC 分析より得られるピークのデータは一定にはならないことを示している。一般に、HPLC 分析では、標準品溶液と試料溶液から得られたピークのデータの比較によって定量するので、標準品溶液と水分含量の異なる試料の定量はできないことになる。そこで、発酵液からの溶媒抽出液を代表とする含水試料の分析系の確立を目的に検討を行った。標準品溶液と試料溶液におけるタクロリムスの平衡状態を一定とするために、水分含量を一定にコントロールするように希釈すれば良いが、タクロリムスは水には溶けにくい水希釈液として用いることはできない。また、試料を有機溶媒で希釈することは、揮散による容量変化があるため望ましくない。そこで、タクロリムスの水への溶解性を増すために界面活性剤の使用を試みた。そして、タクロリムスの溶解性と HPLC の検出手段である紫外吸収性を考慮して、ポリエチレン・ラウリル・アルコール・エーテル (Polyoxyethylene lauryl alcohol ether = Brij-35) 溶液を希釈液として用いる方法を開発した。さらには、希釈後の平衡状態誘導時間を短縮するため、Brij-35 水溶液を pH 7 の緩衝液とした。Brij-35 溶液で希釈したタクロリムスは、室温にて約 15 分で平衡に到達し、希釈後の溶媒濃度が 16% 以下であれば平衡状態は一定となることが分かった。この条件下で、メインピークである FK506 ピークの高さ値を用いて定量することが可能となった。このようにして、簡便で信頼性の高いタクロリムスの HPLC 定量法を確立した。

おわりに

我々工業化第二研究所が、本格的な医療用医薬品を発酵産物から世に送り出したのは、タクロリムスが初めて

であり、GMP の知識もまだ十分とは言えない時期であったので、その工業化研究は戸惑いも多かった。しかも、日米欧三極ほぼ同時開発ということで、それまで経験したことのない FDA や MCA への対応もあり、この研究・開発を通じて GMP も含めて多くのことを学んだ。工業化検討では、菌株の変更、培地の変更、精製法の変更などを行う場合、それぞれの過程で、不純物プロフィールが変化しないようチェックしながら進めなければならない。そのため、菌株育種改良、培養検討、精製検討、分析検討それぞれの担当者が連携を密にし、効率的に仕事を進められるよう努力した。研究所がタクロリムスの工業化に向かって一丸となって仕事に取り組み、成功裏に仕事が完結できた喜びは、苦労が多かっただけにひとしおであった。その仕事が、今こうして技術賞という形で評価されたことは、感慨深いものがある。これは、我々 4 人がというよりも工業化第二研究所全体が頂いた栄誉と受け止めている。平成 9 年度生物工学会技術賞を推挙して下さった皆様に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えていただきました、当社今中宏博士（現相談役）、青木初夫博士（専務取締役）、向阪正信博士（研究本部長）、山下道雄博士（工業化第二研究所長）に感謝します。また、研究にご協力いただきました、探索研究所、物性研究所、工業化第一研究所、富山工場の皆さんに深謝します。

文 献

- 1) Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H., and Imanaka, H.: *J. Antibiotics*, **40**, 1249-1255 (1987).
- 2) Hatanaka, H., Kino, T., Asano, M., Goto, T., Tanaka, H., and Okuhara, M.: *J. Antibiotics*, **42**, 620-622 (1989).
- 3) Japan Koukai 86-148181, 88-017884, and 90-131590 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.).
- 4) Akashi, T., Nefuji, T., Yoshida, M., and Hosoda, J.: *J. Pharm. and Biomed. Analysis*, **14**, 330-346 (1996).
- 5) 大岳 望, 鈴木昭憲, 高橋信孝, 室伏 旭, 米原 弘: 物質の単離と精製, p. 70, 東大出版 (1980).
- 6) Ghosh, A., Hoque, M., and Dutta, J.: *J. Chromatogr.*, **69**, 207 (1972).
- 7) Hane, K., Fujioka, M., Namiki, Y., Kitagawa, N., Kihara, K., and Shimatani, K.: *Iyakuhin Kenkyu*, **23**, 33-43 (1992).
- 8) Namiki, Y., Kihara, N., Hane, K., Yasuda, T., and Chang, Y. C.: *J. Antibiotics*, **46**, 1149-1155 (1993).
- 9) Nishikawa, T., Hasumi, H., Suzuki, S., Kubo, H., and Ohtani, H.: *Pharm. Res.*, **10**, 1785-1789 (1993).