

## 総合論文

# 深在性真菌症治療薬ミカファンギン (FK463) の工業化研究

(平成16年度 日本生物工学会技術賞受賞)

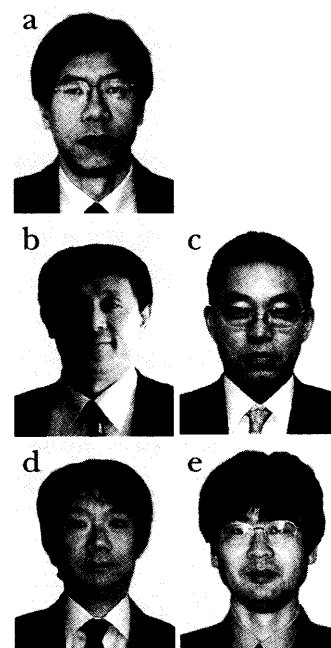
山下 道雄<sup>1\*a</sup>・松田 充功<sup>2b</sup>・大畑 暢敬<sup>3c</sup>神田 宗和<sup>3d</sup>・檜垣 知臣<sup>3e</sup>

## Study of Industrial Manufacturing Methods for Micafungin (FK463)

MICHIO YAMASHITA,<sup>1\*</sup> MITSUNORI MATSUDA,<sup>2</sup> NOBUTAKA OOHATA,<sup>3</sup> MUNEKAZU KANDA,<sup>3</sup> and TOMOJI HIGAKI<sup>3</sup> (*Environment and Safety*,<sup>1</sup> and *Administration & Product Management*,<sup>2</sup> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 3-4-7 Doshomachi, Chuo-ku, Osaka 541-8514, and *Fermentation Development Laboratories*,<sup>3</sup> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 156 Nakagawara, Shinkawa-cho, Nishikasugai-gun, Aichi 452-0915) *Seibutsu-kogaku* **83**: 123-131, 2005.

In 1989, in the course of our screening for new antifungal antibiotics with cell wall synthesis inhibition activity, FR901379 (WF11899A) was discovered in the culture broth of *Coleophoma empetri* F-11899. The strain was isolated from a soil sample collected in Iwaki city, Fukushima-prefecture, Japan. Because FR901379 had hemolytic activity, we decided to screen for semi-synthesis derivatives with low toxicity and high antifungal activity and evaluated many derivatives with substituted side chains. We started by using *Actinoplanes utahensis* to replace the palmitoyl group of FR901379 with other organic acids. After synthesizing several hundred organic acids and making repeated derivatives, we discovered FR131535, which had similar antifungal activity to FR901379 *in vitro* and *in vivo* and low hemolytic activity. It was not however selected as a development candidate because of insufficient antifungal activity. In the search for a more potent compound, we hypothesized that a compound with a similar molecular structure to FR131535 might produce a good antifungal drug. We therefore began the screening of Fujisawa's original acylase using a specially devised and effective screening system. After discovering "FR901379 Acylase" produced by *Streptomyces* sp. No. 6907, we continued with our evaluation of derivatives. We finally selected FK463 as a candidate compound for commercial drug development. In 1990, to establish an industrial manufacturing method for Micafungin (FK463), our laboratories (Fermentation Development Laboratories) commenced the following development research: (1) strain improvement of *Coleophoma*, (2) screening of "FR901379 Acylase"-producing strains, (3) studies to increase the scale of fermentation of FR901379 and "FR901379 Acylase", (4) determination of effective purification procedures for FR901379, a key intermediate of FR179642 and FK463, and (5) development of a HPLC assay system to measure the amount of objective compounds and impurities. Micafungin (general name, Trade mark: Funguard, Development No.: FK463) was launched in Japan on December 6, 2002. Approval in the USA and EU is pending and expected shortly.

[**Key words:** Micafungin, Funguard, FK463, FR901379, FR179642, FR901379 Acylase, cloning, deep-seated fungal disease, industrialization]



\*著者紹介(代表) <sup>1</sup>藤沢薬品工業株式会社総務部環境安全室(室長, 前醗酵技術研究所所長) 〒541-8514 大阪市中央区道修町3-4-7  
TEL. 06-6206-7858 FAX. 06-6206-7925 E-mail: michio\_yamashita@po.fujisawa.co.jp

1975年 慶應義塾大学大学院工学研究科修士課程修了, 工学博士 専門分野: 天然物有機化学, 発酵医薬品  
<sup>2</sup>現, 生産統括部 (前醗酵技術研究所担当主任研究員), <sup>3</sup>醗酵研究所 (前醗酵技術研究所主任研究員)

## はじめに

ミカファンギン（一般名，商品名：ファンガード，開発名：FK463）は，図1に示すように1989年に当社探索研究所・醗酵担当によって，福島県いわき市の土壌より分離された *Coleophoma empetri* F-11899 の培養液中より発見された FR901379<sup>1,2)</sup> を原体とし，FR901379 アシラーゼでアシル側鎖（パルミトイル基）を脱離した後，新たに合成した側鎖を導入することで創生された深在性真菌症治療薬である。

FR901379 は溶血活性を有しており原体のままでは開発が不可能であったので，溶血活性の弱い誘導体の創出を目指し探索研究所・醗酵担当，化学研究所と薬理研究所が協力して，合成および薬理評価研究を精力的に行っ

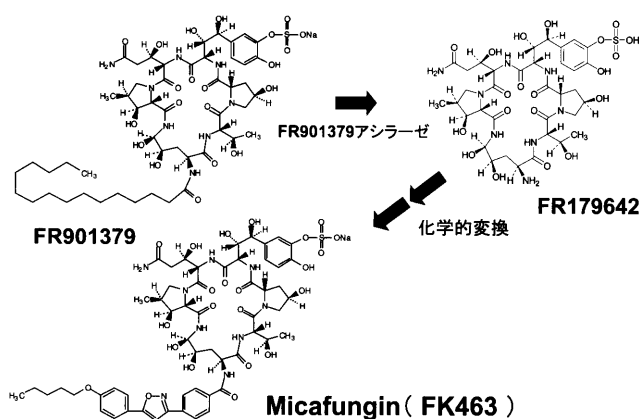


図1. FK463の合成ルート

た。発酵原体である FR901379 物質の生産性向上は，当初筑波の探索研究所・醗酵担当で行われたが，1990年からは誘導体研究用や前臨床試験用などのサンプル製造を目的として名古屋の醗酵技術研究所で菌株育種改良，培地培養条件最適化，抽出精製法の最適化検討がスタートした。また研究当初，FR901379 のアシル側鎖の脱離には *Actinoplanes utahensis* 由来のリポペプチドアシラーゼを用いたが，溶血活性が大幅に低減した FR131535 を創出したことによりこの周辺化合物からの抗真菌薬開発の可能性が高まり，工業化に向けてフジサワ独自のアシラーゼを見いだすことが急務になった。そこで，我々は1995 年から放線菌の培養液を中心に精力的にスクリーニングを行い，*Streptomyces* sp. No. 6907 が産生する FR901379 アシラーゼを発見した。一方で，FR131535 よりもさらに抗真菌活性が高く安全性にすぐれた化合物の創出を目指して合成・薬理評価を継続し，最終的に FK463 が開発候補品として選択された。

*C. empetri* F-11899 の発酵液の中には多くの類縁物質が併産される（図2）。側鎖アシル基のみの違いであれば，脱アシル後に同じ中間体 FR179642 となるので問題ないが，それ以外の部分（たとえば母核中の構成アミノ酸など）が違う類縁物質については，不純物としてある基準値以下に低減しなければならない。効率的かつ精緻に工業化研究を進めるためには，精製法の最適化研究と共に HPLC 検定法の速やかな確立は重要な要素のひとつとなる。

ミカファンギンは，2002 年 12 月に日本で承認され，

$C_{51}H_{81}N_8NaO_{21}S$   
Exact Mass: 1196.5135  
Mol. Wt: 1197.2846

|                      | R1 | R2                 | R3 | R4              | R5 | (Side chain)<br>$CH_3(CH_2)_nCO-$ |
|----------------------|----|--------------------|----|-----------------|----|-----------------------------------|
| FR901379 (WF11899A)  | OH | CH <sub>3</sub>    | OH | CH <sub>3</sub> | H  | n=14                              |
| FR901381 (WF11899B)  | H  | CH <sub>3</sub>    | OH | CH <sub>3</sub> | H  | 14                                |
| FR901382 (WF11899C)  | H  | CH <sub>3</sub>    | H  | CH <sub>3</sub> | H  | 14                                |
| WF11899 α            | OH | CH <sub>3</sub>    | OH | CH <sub>3</sub> | H  | 12                                |
| WF11899 β            | OH | CH <sub>3</sub>    | OH | CH <sub>3</sub> | H  | 13                                |
| FR209523 (WF11899 γ) | OH | H                  | OH | CH <sub>3</sub> | H  | 14                                |
| Epi-FR901379         | OH | CH <sub>3</sub>    | OH | CH <sub>3</sub> | H  | 14                                |
| FR240727             | OH | CH <sub>2</sub> OH | OH | CH <sub>3</sub> | H  | 14                                |
| FR240728             | OH | CH <sub>3</sub>    | OH | CH <sub>3</sub> | OH | 14                                |
| FR238230             | OH | CH <sub>3</sub>    | OH | H               | OH | 14                                |
| FR248810             | H  | CH <sub>3</sub>    | OH | CH <sub>3</sub> | OH | 14                                |
| FR209602             | H  | CH <sub>3</sub>    | OH | H               | H  | 14                                |
| FR209604             | H  | CH <sub>3</sub>    | H  | H               | H  | 14                                |

図2. WF11899物質群

ファンガードとして上市された。2003年11月からはトッブシェア商品となり、月平均15億円程度の売り上げを示すまでに成長している。現在欧米でも申請中で、2005年第一四半期には米国で承認予定である。

なお、ミカファンギンの製造ノウハウは企業秘密であり、詳細は明らかにできない。そのため、以下の記述には具体的な数字や物質名を省略した部分が多々ある。その点をご了解いただきたい。

## 1. FR901379 工程

**1.1. FR901379 生産菌の育種改良** 野生株 F-11899 株を用い 8 世代にわたる生産菌の育種改良を行い、工業用生産菌株を得た。変異は、分生子あるいはプロトプラストに対して UV を照射することで行った。「はじめに」の項に記載した理由から、工業化を行う際には目的物質である FR901379 の生産性を向上させるだけでなく、類縁物質の低減も重要である。そこで、両方の性質を兼ね備えた生産菌を取得することを目標に置いて育種改良を行った。得られた変異株は、寒天平板上での FR901379 生産能力、生理代謝、形態変化などを指標に一次選抜を行ったのち、フラスコを用いた液体培養での FR901379 生産量、不純物量や培養性状を評価して優良株を選別した。フラスコ培養で優良な性質を示した株は、通気攪拌培養系での性質や必要に応じて最終製品の品質などを確認した上で、変異の親株として用い、更なる優良株取得のための育種改良を繰り返した。

変異株は、生産性が増加するにつれて、1) コロニーサイズが小さくなり、2) 黒色色素生産性が弱くなった(図 3)。また、分生子着生能が徐々に低下したが、各種検討により着生能回復に成功した。

変異株-5 の生産性は、フラスコ発酵で比較したところ、野生株に比して数十倍向上したことが確認できた。

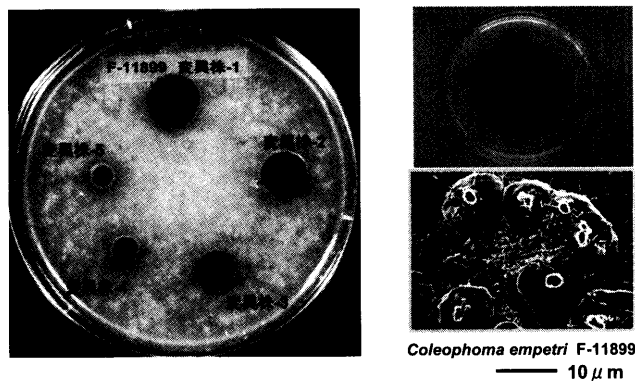


図3. FR901379 生産菌と変異株

## 1.2. FR901379 発酵

**1.2.1. 特徴** FR901379 発酵の特徴として、1) 大量の酸素を必要とする、2) 発酵液中の酸素供給が不足すると菌糸が網目状に伸びて粘性がきわめて高くなる、3) 発泡が激しい、4) 2) および 3) の理由により発酵ロットによって生産量がばらつく、などが挙げられる。そこで、工業化に向けて発酵の改良・検討ポイントを、1) 低粘性化(菌糸の生育状態のペレット化)、2) 発泡抑制、3) 発酵ロットによる生産量・類縁体量のばらつき最小化、4) ラボスケールから生産スケールへのスムーズなスケールアップを実現するためのパラメータ確定、などとした。

**1.2.2. 培地最適化検討** 表 1 の左側の PM-1 培地(オリジナル培地)は、探索研究所・醗酵担当で発見当時に用いていたものである。その後、醗酵技術研究所で種々検討の結果、FR901379 発酵には硫酸アンモニウム水のような無機窒素源の利用が可能であることが分かった。これらの使用は、発酵液の粘性を抑える効果があり、上記の問題を解決するのに有効であった。そこで、アンモニウム消費をより促進させるのに有効な有機窒素源 A を選

表1. 基本培地組成構築

| オリジナル発酵培地 PM-1                                       |      |   |
|------------------------------------------------------|------|---|
| コーンスターチ                                              | 3    | % |
| グルコース                                                | 1    |   |
| 小麦胚芽                                                 | 0.2  |   |
| ファーマメディア                                             | 2    |   |
| グルテンミール                                              | 0.5  |   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 2    |   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ・12H <sub>2</sub> O | 1.5  |   |
| ZnSO <sub>4</sub>                                    | 0.6  |   |
| 消泡剤                                                  | 0.05 |   |

| 改良発酵培地 PM-2           |               |   |
|-----------------------|---------------|---|
| デンプン                  | 12            | % |
| 油                     | 3             |   |
| 有機窒素源 A               | 4             |   |
| 硫酸アンモニウム              | 1             |   |
| 希アンモニウム水連続添加<br>pH 制御 | 発酵開始<br>～終了まで |   |
| 無機塩 B                 | 0.5           |   |
| 無機塩 C                 | 0.1           |   |
| 消泡剤                   | 0.34          |   |

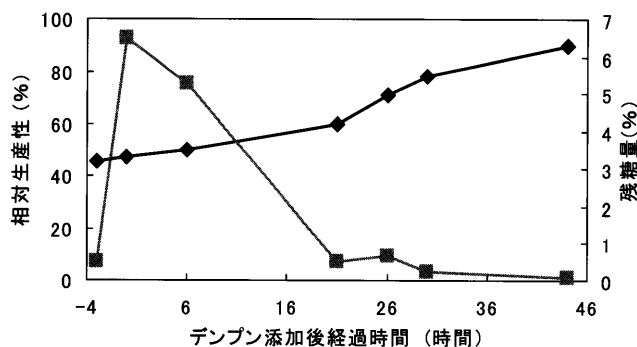


図4. デンブン途中添加後の生産性および残糖量推移. ◆, FR901379 (%); ■, 残糖量 (%).

択するとともにデンブンの種類の変更と高濃度化を行った。また、発泡を抑えるために炭素源の一部を油に代えるとともに消泡剤を増量した (PM-2培地)。更なる検討の結果、アンモニアを連続的に消費させるために、pH制御を兼ねて、希アンモニア水の連続添加法を採用した。これに加え残糖量と生産性に負の相関 (図4) が見いだされたため、大量のデンブンを最初に高濃度で添加あるいは連続添加する方法を止め、発酵途中に何回かに分割して添加するフェドバッチ法を採用したことで、低粘性・高生産性を実現することができた。20,000cP以上あった粘度が10,000cP以下に下がり、生産性もほぼ2倍に向上させることができた。

**1.2.3. 発酵法最適化検討** それでもまだ、ロットによっては高粘性・低生産性の発酵になった。そこで、更なる低粘性化・安定化検討が必要となり、1) 1000cP以下となる発酵条件開発、2) 高生産安定化達成、を目標として掲げ検討を行った。

30 l ジャーファーマンターでの検討において、まずタービン翼を2段から3段にすることで発酵槽内の完全混合時間を実用レベルにまで短縮することができた。神鋼環境ソリューション社製のフルゾーン翼 (図5) を用いると、低粘度の模擬液の場合はもちろん高粘度の模擬液を使った場合でも発酵槽内の完全混合時間が大幅に短

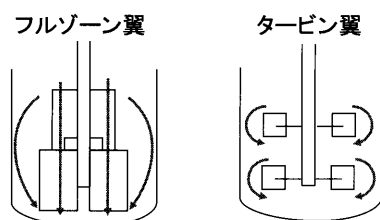


図5. フルゾーン翼の特性

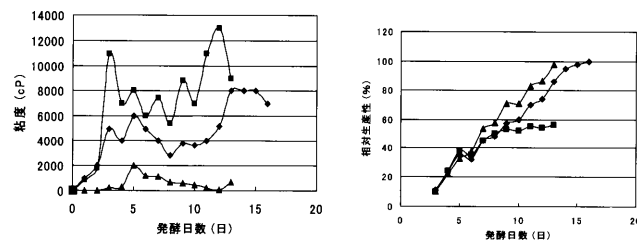


図6. タービン翼とフルゾーン翼の比較. ■, タービン翼 (ロット1); ◆, タービン翼 (ロット2); ▲, フルゾーン翼.

縮され、タービン翼よりも攪拌効率が良くなることが分かった。フルゾーン翼を用いた時の発酵の特性として、1) 高粘度流体に対するすぐれた混合特性、2) 槽内の完全混合が可能、3) 蒸発などによる液量変化に対して混合効率の変化が少ない、4) せん断による菌へのダメージが少ない、などが挙げられる。

図6に示すように、タービン翼2段では発酵に振れが見られたが、フルゾーン翼にすると粘性が低下し、生産性も持続して最高力価到達までの発酵日数が3日間短縮され13日となった。

発泡抑制については、PM-2培地とフルゾーン翼の組み合わせ、および通気量の低減により達成できた。これは上記の検討によって発酵液の粘性を低下させることに成功したため、低通気でもFR901379生産に十分な酸素供給が可能となったことによる。

**1.2.4. スケールアップパラメータ** 詳細は省略するが、各種検討の結果、 $k_{La}$ を指標としてスケールアップを行ったところ、生産性が安定し、スケールギャップの小さなノウハウが構築できた。

## 2. FR179642工程

### 2.1. FR901379アシラーゼのスクリーニング

FR901379アシラーゼ<sup>3)</sup>のスクリーニングに先立ち、簡便かつ効率的なスクリーニングが可能なプレート法を確立した (図7)。まず、シャーレ中のFR901379入り寒天培地上に、スクリーニングにかける放線菌やカビを培

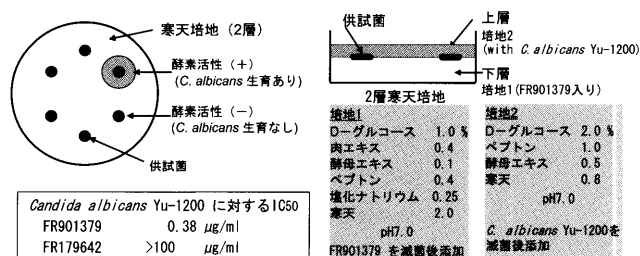


図7. FR901379アシラーゼのスクリーニング

養する。菌が生えたところで *Candida albicans* 入りの寒天培地を重層する。FR901379 アシラーゼを産生する菌の周辺では、埋め込まれた FR901379 側鎖が切断されることにより抗菌活性が数 10 分の 1 以下に低下するため、*Candida* の生育ゾーンが観察できる。このような菌を選択し、2 次スクリーニングにかける。すなわち、アシラーゼ活性の確認のため FR901379 に酵素培養液を作用させ、パルミトイル基が切断された FR179642 の生成を HPLC で確認する。こうして、多くの菌株が FR901379 アシラーゼ活性を有することを見いだした。この中から高活性を示す放線菌 3 株を選別し、更なる検討を行った。

選択した 3 株の放線菌のうち、高活性であること、かつ菌体外に活性が漏れ出さないのでろ過操作で簡単に全酵素画分を捕捉し使用することができる、という 2 点から、No. 6907 株を選択した。これはストレプトマイセス属の菌で *Streptomyces* sp. No. 6907 と命名した。

**2.2. FR901379 アシラーゼの性質** 図 8 は *Streptomyces* sp. No. 6907 を培養した時の酵素活性の経時変化を示している。この培養液を使用して FR901379 アシラーゼの性質を調べた。

*Streptomyces* sp. No. 6907 の培養液と *A. utahensis* の培養液の酵素活性を比較すると、*Streptomyces* sp. No.6907 の産生するアシラーゼ (FR901379 アシラーゼ) の方が FR901379 に対してより高い基質特異性を有していた (表 2)。FR901379 アシラーゼのアミノ酸配列を決定する

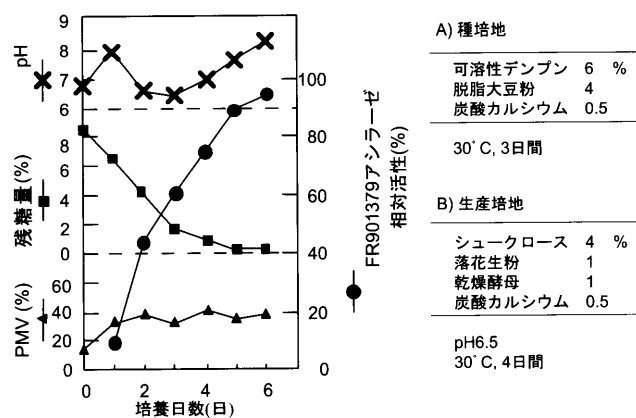


図 8. *Streptomyces* sp. No. 6907 の培養経過

表 2. FR901379 アシラーゼの基質特異性 (相対値)

| 培養液                              | 基質 | FR901379 | Echinocandin B |
|----------------------------------|----|----------|----------------|
| <i>A. utahensis</i> NRRL12052    |    | 420      | 100            |
| <i>Streptomyces</i> sp. No. 6907 |    | 3900     | 438            |

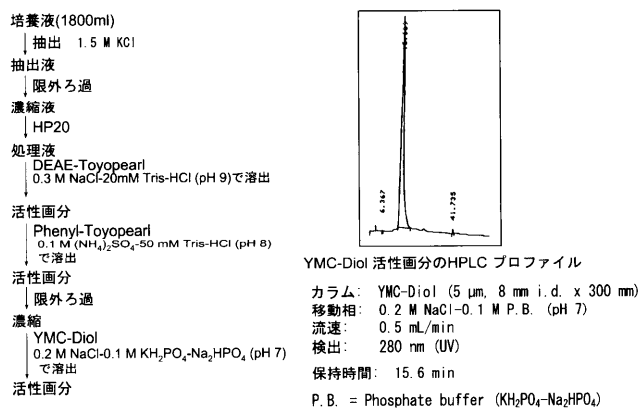


図 9. FR901379 アシラーゼの精製

ために、限外ろ過、DEAE-Toyoparl, Phenyl-Toyoparl などを用いて精製を行った。精製後の HPLC プロファイルを図 9 に示す。FR901379 アシラーゼは、Lineweaver-Burk plot から非拮抗型であることが分かった。

**2.3. N 末端アミノ酸配列の決定** 精製した FR901379 アシラーゼを HPLC および SDS-PAGE で分析したところ、本酵素は *A. utahensis* 由来のリポペプチドアシラーゼと同様にラージペプチドとスモールペプチドの 2 つのサブユニットから構成されていることが示唆された (図 10, 11)。それぞれを HPLC 分取し、N 末端アミノ酸配列決定を行い、FR901379 アシラーゼのラージペプチドとスモールペプチドの N 末端 20 アミノ酸残基の

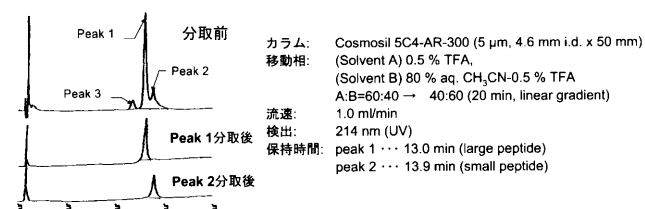


図 10. FR901379 アシラーゼの HPLC プロファイル

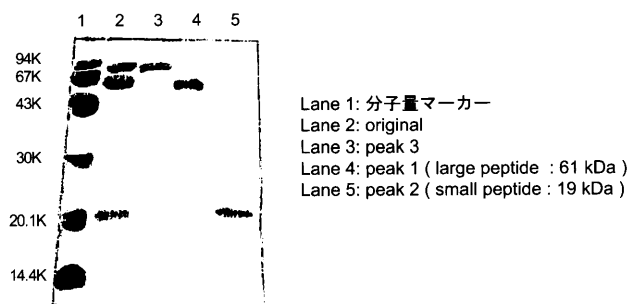


図 11. FR901379 アシラーゼの SDS-PAGE

**A. utahensis NRRL12052** リボペプチド アシラーゼ A & B subunit と45%の相同性

NII-Electronic Library Service

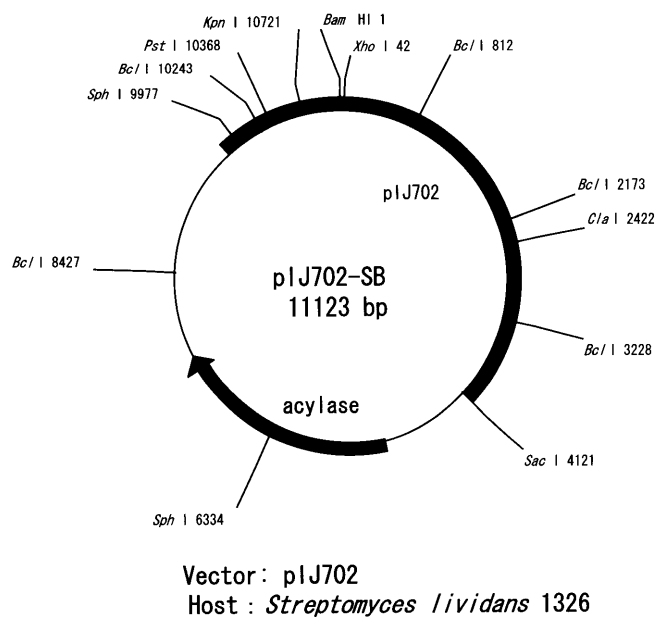
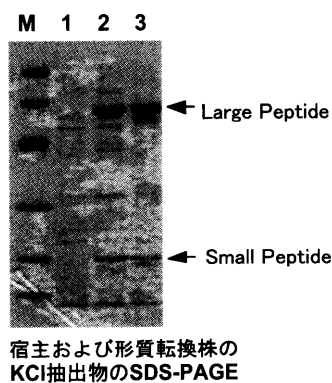


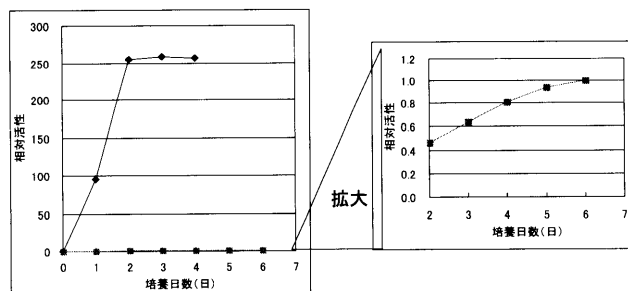
図14. pIJ702-SBの遺伝子地図

図15. FR901379アシラーゼの発現。M, L.M.W. marker ; 1, *S. lividans* ; 2, *S. lividans*/pIJ702-SB ; 3, *Streptomyces* sp. No.6907 FR901379アシラーゼ。

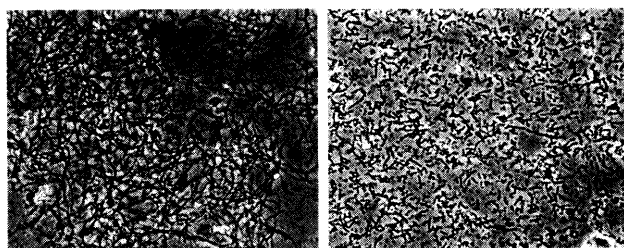
の相対活性は250と非常に高い値を示した。また、形質転換株は培養日数2日目に最高活性に到達し、培養日数を大幅に短縮させる可能性を示唆した。このように、FR901379アシラーゼを生産する組換え微生物を作製することで、我々は250倍という大幅な活性向上を達成した(図16)。

**2.7. FR901379アシラーゼの生産性向上** FR901379アシラーゼ生産菌の培養では、培養時間と共に培養液の粘性が非常に高くなる。その原因は、菌糸の伸長および絡み合いである。そこで、菌糸の断片化を指標に育種改良を行い、高生産菌を取得した。

取得菌の通気攪拌系での培養の特徴は、1) 培養液中の菌糸の断片化レベルとアシラーゼ活性に相関がある、



形質転換株の培養経過

図16. 形質転換株のFR901379アシラーゼ発現経過。◆, *S. lividans*/pIJ702-SB ; ■, *Streptomyces* sp. No.6907。

親株

変異株

図17. FR901379 Acylase生産菌の育種改良

2) 培養液の粘性が経時的に極めて高くなる、3) 培養液は発泡性を有するが消泡剤濃度が高いと酵素生成が抑制される、などであった。

そこで、菌糸が断片化する菌株の育種改良と低粘性の培養液となる培地の組み合わせ、かつ攪拌によるボルトックス効果で物理的に消泡させる条件を確立した。こうして、図17の右側写真のように菌糸が断片化し培養液の粘性が低下する培養法の開発に成功した。これにより、単位容積あたりの酵素活性を100倍以上向上させることができた。

### 3. 精製の最適化検討

FK463製造は先に説明したように、FR901379工程、FR179642工程、FK463工程の3つの工程に分けられる(図18)。製造工程の概略を以下に示す。菌体からFR901379を有機溶媒で抽出し、吸着樹脂で類縁物質を集める、続いて酵素菌体を用いて脱アシル化し、吸着樹脂でFR179642を多く含む画分を集め、晶析を行い、高純度の中間体FR179642を得る。得られたFR179642に、側鎖を化学的に縮合しFK463を合成、結晶化で高純度のFK463を取得する、というものである。FR901379工程では、当初シリカゲル、ジクロロメタンといった使い捨

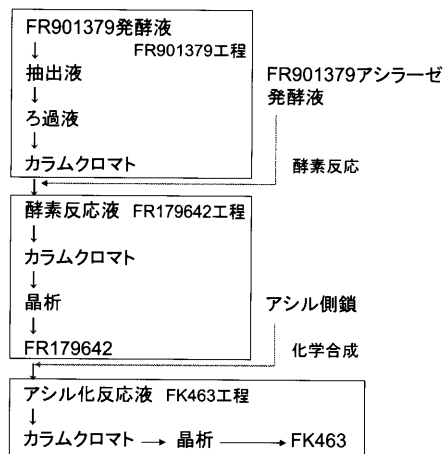


図18. 中間体FR179642およびFK463の精製法

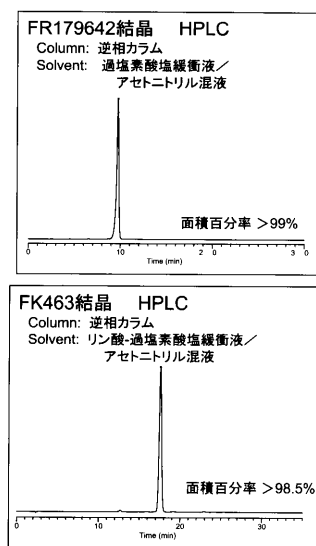


図19. FR179642およびFK463のHPLC検定

て原材料や塩素系有機溶媒を使用していた。しかし、地球環境にやさしい工業化ノウハウにするために、カラム担体を再生可能なものに、かつ使用溶媒を非塩素系のものに切り替えた。取得した中間体FR179642とFK463のHPLC分析結果は、図19に示す通りである。

**3.1. FR901379精製工程** FR901379発酵液には母核が同じで側鎖の長さが異なる類縁物質も併産されている。そこで、まず粗精製として発酵由来のタンパク質や多糖類を除去したのち、FR901379関連物質を同一画分にまとめて溶出できるハイポラス型吸着樹脂を用いることとした。溶出剤は次工程の酵素反応に影響を与えないものを選択した。

FR901379発酵液はカビ特有の高粘性溶液で、また、FR901379は菌体内に蓄積されるため、効率よく抽出す

るためにpH、温度、溶媒などの最適組み合わせを検索した。また、FR901379は1つの分子の中に親水基（硫酸エステル基）と疎水基（パルミトイル基）を併せ持つ構造であることから、水溶液中ではミセル構造を取り、溶媒に対する溶解度は非線形（たとえばメタノールでは20%濃度に溶解度ピークがある）となる性質を持つ。加えて、さまざまな基材に特異的に吸着するため、精製担体や溶媒濃度についても工夫が必要であった。工場生産における自動化では、本物質そのものが発泡しやすいことも考慮する必要があった。

**3.2. FR179642精製工程** FR179642工程は脱アシル酵素反応からスタートする。生成するFR179642は極性が高くなり、通常の吸着樹脂への吸着力が極端に弱くなる。そこで、種々検討しFR179642に対する保持力が強い樹脂を選択した。吸着時の液濃度と吸着総量を制御することも樹脂への吸着能を向上させるためには重要である。吸着後、溶出溶媒の濃度を段階的に変更することでクロマト的溶出を行い、純度95%以上のFR179642を得た。また、FR901379は弱酸性側、FR179642は酸性側に安定域があることから、各工程では許容pH領域に注意をしながら製造ノウハウを構築した。さらに結晶化検討を行い、結晶の粒度分布をコントロールするために「温度スウィング法」を、結晶水分をコントロールために「真空度制御乾燥法」を導入し、最終的に99%以上の高純度中間体を生産スケールで製造するノウハウを確立した。

**3.3. FK463精製工程** 醗酵技術研究所での精製検討において、FK463精製工程については、主に結晶化検討を実施した。pHと複数溶媒の組み合わせ条件の最適化で98.5%以上の高純度の針状結晶を取得することに成功した。

#### 4. HPLC検定法の確立

発酵由来医薬品の工業化研究を短期間で成し遂げるには、化合物を正確・迅速に定量する技術は欠くことができない。発酵生産の工業化研究において菌株の育種改良には微生物の発酵液のような夾雑物の多い溶液を複雑な前処理なしに簡便に定量する分析法の確立が要求される。培養・精製工程の最適化研究では、目的物質や関連物質・類縁物質を含む多くの発酵生産物、培地由来不純物などの挙動を定性的・定量的に把握しなければスピーディかつ精緻な製造法確立はできない。これらの検討を効率的に行うために、特に以下のことに留意しながら我々は発酵原体FR901379、中間体FR179642のHPLC高感度・高分離能検定法を確立した。

先にも述べた通り、FR901379は水溶液中ではミセルを形成するので、分析サンプル中の溶媒濃度によって定量値が変動する。各工程液の溶媒濃度を一定に保つことは難しく、その問題を解決するために界面活性剤の使用を検討した。その結果、UV吸収のないBrij-35®溶液を希釈液として用いることとした。FR179642は側鎖が脱離されて極性が高くなりカラムに対する吸着力が極端に弱くなるため、関連物質の分離度が高かつ耐久性のある担体を選択した。また、FR901379およびFR179642はそれぞれに安定な至適pH領域を持つため、サンプルの安定性を確保するため、分析サンプルの調製方法にも細かく手順を決めて行った。さらに、HPLC検定法を設定したのち、それぞれの分析法での化合物同士の相関関係を確認するためにLC-MS分析を実施し、それぞれの化合物の分取を行い、脱アシルや側鎖導入など誘導体合成も行った。こうして完成させた定量法は、効率的な製造ノウハウ構築に大きく寄与した。

### おわりに

我々醗酵技術研究所がミカファンギンの工業化研究を行った頃は、ちょうど免疫抑制剤タクロリムスの増産プロジェクト実施時期と重なり、大変忙しい時期であった。しかし、タクロリムスの工業化研究の経験を生かし、GMP(医薬品の製造管理および品質管理に関する国際基準)に配慮しつつ、不純物プロファイルが変化しないようチェックしながら、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2つのプ

ロジェクトを成功させようと一丸となって仕事に取り組み、成功裏に完結できた喜びは、苦労が多かっただけにひとしおであった。その仕事が、今こうして平成16年度の日本生物工学会技術賞という形で評価されたことには、感慨深いものがある。これは、我々5人が受賞したというよりも醗酵技術研究所全体が頂いた荣誉と受け止めている。なお、当研究所が日本生物工学会技術賞を受賞したのは、平成9年度の「タクロリムス(FK506)の工業化研究」に続いて2度目である。平成16年度日本生物工学会技術賞に推挙して下さった先生方に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えてくださった、当社今中宏博士(前専務取締役)、青木初夫博士(社長)、向阪正信博士(前常務取締役)、後藤俊男博士(研究本部長)に感謝します。また、研究にご協力下さった探索研究所、化学研究所、薬理研究所、物性研究所、合成技術研究所、化成品事業部名古屋工場を始め本プロジェクトに関係された皆さんに深謝します。

### 文 献

- 1) Iwamoto, T., Fujie, A., Sakamoto, K., Tsurumi, Y., Shigematsu, N., Yamashita, M., Hashimoto, S., Okuhara, M., and Kohsaka, M.: *J. Antibiotics*, **47**, 1084-1091 (1994).
- 2) Iwamoto, T., Sakamoto, K., Yamashita, M., Ezaki, M., Hashimoto, S., Furuta, T., Okuhara, M., and Kohsaka, M.: *Abstr. 33<sup>rd</sup> ICAAC*, No.F37, New Orleans, USA (1993).
- 3) Ueda, S., Tanaka, M., Ezaki, M., Sakamoto, K., Hashimoto, S., Ito, K., Nagao, K., Higaki, T., Oohata, N., Tsuboi, M., and Yamashita, M.: *Abstr. 38th ICAAC*, No.F145, San Diego, USA (1998).