

タイトル：吸着流動床 – カラムと工程デザインにおける挑戦と進歩–

著者： Zuwei Jin

(Pharmaceutical Engineering, 2015, Vol 35 No.1, 1-12)

翻訳： 京都大学大学院医学研究科 薬剤疫学分野 大学院生 平形 美樹人 (Mikito Hirakata)

本稿では、吸着流動床の種々カラムデザインの比較について紹介する。

吸着流動床 (Expanded Bed Adsorption ; EBA) を用いたクロマトグラフィーの概念が初めて紹介されたのは 1990 年代の初めであった¹。このアイデアの主な利点は、目的産物の生物学的供給原料を含んだ微粒子を直接処理できることであるが、いまだ、十分な高分離効率は古典的なカラムクロマトグラフィー以外では達成されていない。EBA はいくつかの古典的な操作工程、すなわち遠心分離、ろ過、キャプチャークロマトグラフィーの組み合わせ、に取って代わる能力を有する。EBA は有意に全工程の時間を短縮し、収率を増加し、図 1 に示すような、生物学的な精製工程にかかる、資本投資と操作コストの双方を削減することが可能である。

EBA は古典的な化学工業で使用される流動床とは異なる²。担体ビーズは、流動床における全攪拌工程の代わりに、局所で流動させることで合理的な高分離効率 (段数) を得るために用いられる。

典型的な EBA 工程は、次のようなステップで構成される：図 2 に示すようにベッドの安定化/平衡化、試料添加、洗浄、溶出、再生と洗浄、再平衡化からなる。沈降した EBA ベッドは最初に担体ビーズを流動させるに十分な速さで、上流をかけることにより拡張される。供給原料を含んだ微粒子を平衡化したカラムに直接添加する。目的のたん白質や小分子が EBA 吸着材に結合し、核酸や脂質のような、その他の夾雑物は通過する。洗浄は、新鮮なバッファーを用いて行い、試料添加後に緩く結合した夾雑分子を除去する。溶出ステップでは、通常、上部のアダプターを下降させ、下流をかけ、充填層として行う。吸着材に結合した目的たん白質もしくは目的分子は、カラムから溶出し回収される。カラムは水酸化ナトリウムのような強力な試薬で洗浄/再生され、次の工程のために初期バッファーで再平衡化される。

初期の EBA カラムは分配器内にファウリングと詰まりが生じやすい。EBA 工程の主な欠点は、衛生的な問題とベッドの安定性である。EBA テクノロジーにおいて、均一な流量を分配させるのに重要な部品である分配器に問題点があった。ある種の高流量抵抗性の部品が流量の分配に必要であるが、分配器の内部の高抵抗性部品の上流で、細胞やバイオマスが徐々に凝集してできた凝集体を、洗浄除去することが難しいことがわかった³。時々、

バイオマスの凝集や担体と細胞残渣の相互作用が、ベッドの安定性やチャネリングの問題を引起す。第一世代の EBA カラムは細胞溶解液からの供給原料を扱う際、困難となるベッド部分の安定性および分配器の衛生的な問題のため広い適応が見出せなかった。

EBA テクノロジーは、カラムの底部に流量を分配させるための、可動式のアームを持った、特許化された分配器を特徴とする第二世代が開発された。分配概念について図 4 に示す。第二世代の EBA カラムは、分配器内の開放流路デザインと上部のアダプターへのバイパスを有し、それゆえ、洗浄の問題を有しない。分配器はカラムの下部において有意な逆混合を誘導する。担体粉碎、動作信頼性、維持費用についての懸念がある。さらに、溶出が拡張床状態でのみ実施可能である。それゆえ、工程での濃縮係数が古典的 EBA よりも低下している。

第二世代の EBA カラムは、ほとんど発売されていない。実際、いくつかの主要な業者は、第二世代の発売後すぐに、製造と販売を中止した。

EBA は明白な利点を有しているが、EBA 工程の開発には、流路の衛生的なデザイン、拡張床の安定性、(十分な分離効率の達成に必要な) 分配流の均一性の維持の課題がある。

ベッドと独立した開放洗浄流路を有する水流分配器は、EBA を確固たるテクノロジーにするための重要な課題である。高抵抗性部品の上流ではファウリングや詰まりが起り、流量それ自体では、洗浄が不可能なことから、高抵抗性部品(例えば第一世代における有孔プレートと厚みのあるメッシュ)に頼った、古典的な分配器では衛生的な要求を満たせない。通常の高時間の試料添加工程において、ベッド内や分配器内で形成した凝集体を、溶出開始前までに必要な、効果的で信頼性のある洗浄を行うことは不可能である。

一方、多くの開放系分配器では、EBA ベッドに障害を起こさずに流量の分配を行うことは不可能である。それゆえ、高流量抵抗性部品を使用せずに均一的な流量を分配する方法を見出すことは、科学技術上の課題である。

しかしながら、分配器、カラム、工程の改善に対する近年の技術開発により、十分に再評価されるうるテクノロジーとなった。再循環を伴う接線流量パターンの分配器への使用が提案された。概念は 2004 年の Prep にて最初にポスター発表された。同様の概念は US の特許出願にて開示された⁴。2010 年の特許では、放射状の接線流量と多彩な流路高の複雑な流路デザインが示された⁵⁻⁷。そこでは、ベッドと独立した均一的な流量の達成と完全な開放系で自己洗浄可能な流路について請求されていた。

現代の生物学的使用法は、細胞培養を基礎とする傾向にあり、目的産物は細胞から分泌される。供給原料は比較的きれいで、バイオマスの凝集やバイオマスと吸着材との相互作用は問題ではない。旧型の EBA デザインにあった分配器とメッシュの衛生的な問題は、完全な開放系で自己洗浄可能な流路とベッドと独立した流量分布を特徴とした新規のデザインによって解決されるかもしれない。

この論文の目的は、EBA テクノロジーにおける技術的な課題を解析し、EBA デザインの工業的な適応について評価することである。開放系流路を有したベッドと独立した流量分

配器は、EBA の主要な工業的課題であり、EBA テクノロジーの主要な利点を現実的にするかもしれない。EBA の将来は有望で、現代の生物学的使用法に適している。EBA は、従来の生物工学、生物製剤の工業への適応の可能性に加え、細胞工学がたん白質から細胞に移ったときの次の最大の分離課題である細胞分離にも適応可能であるかもしれない。

EBA テクノロジーの概要

操作概念

固定床式のクロマトグラフィーと同様、EBA の操作は図 2 に示すように、平衡化、試料添加、洗浄、溶出、洗浄と再生からなる。

沈降した EBA ベッドは、最初に、担体ビーズを流動させるに十分な速さの上流をかけることにより拡張される。ビーズは動力的に重力と上流による抗力によって釣り合いの取れた状態であり、ビーズの局所近傍では流動している。拡張床は動力的に安定化され、十分なバッファの適用後には化学的に平衡化される。次にカラムは次工程、試料添加へ進む。

供給原料を含有した微粒子をカラムに直接添加する。細胞、残渣、固形微粒子はベッドの隙間を通り抜ける。目的のたん白質、小分子は EBA の吸着材に結合するが、核酸や脂質のような夾雑物は結合しない。

試料添加が終了した後、新鮮バッファを適用することにより洗浄を開始する。洗浄中、EBA 吸着材に緩く結合した夾雑分子は溶出され、夾雑物は十分に洗浄除去される。次にカラムは溶出工程へ進む。

溶出は通常、固定床状態で下流により実施される。上流を最初に停止させ、可動式の上部アダプターを下降させて、緩く充填した固定床を形成させる。溶出バッファは上方より適用する。吸着材に結合した目的たん白質や分子は、EBA カラムから溶出され、回収される。次に、カラムは水酸化ナトリウムのような強力な試薬で洗浄／再生され、初期バッファによって再平衡化されて、次の使用に供される。

EBA は、いくつかの古典的な工程を、簡易な一工程に置換でき、全工程時間を大幅に短縮できる。供給原料の直接適用の可能性に加え、EBA 工程は結合能力の犠牲なしに高処理能力を可能にする。結合能力に処理能力を掛けた生産性は有意に増加する。クロマトグラフィー工程における長時間の試料添加工程は、もはや性能の障害ではなく、試料結合時のプロテアーゼに関しても心配事ではなくなるだろう。

分離効率の評価：段数と HETP

クロマトグラフィー用カラムの評価基準として通常使われている総段数と理論段高 (Height Equivalent To Plate : HETP) は、あわせて分離効率とも呼ばれる。総段数は滞留時間分布 (Residence Time Distribution : RTD) 理論に基づく概念である⁸。RTD 理論

に関して、完全な流動床や攪拌槽の様な完全混合状態は総段数が 1 であり、一方、逆混合がない押し出し流れでは総段数は無限大である。RTD 理論は完全混合槽 (Continuous Stirred Tanks; CSTR) 列モデルとして構築され、実際の流動系における RTD と同等の槽列の槽の数を理論上の総段数としている。実際の総段数は、パルスもしくはステップ応答法を用いた不活化トレーサーの実際の RTD データから算出される。

図 3 はパルス入力を利用した流動系の総段数測定について示している。入口から流動系へトレーサーをパルス入力し、出口におけるトレーサーの濃度と経過時間を測定する。

RTD 理論に関して、総段数である N は、流動系を通過するトレーサー物質の応答を基に計算される。

$$N = \frac{\tau^2}{\sigma^2} \quad (1)$$

ここで、

$$\tau = \int_0^{\infty} tE(t)dt \quad (2)$$

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - \tau)^2 E(t)dt \quad (3)$$

$$E(t) = \frac{c(t)}{\int_0^{\infty} c(t)dt} \quad (4)$$

t はトレーサーの平均滞在時間、 σ は滞在時間の標準偏差である。

HETP はカラムのベッド高を総段数で除したものと定義される。

$$HETP = \frac{H}{N} \quad (5)$$

H はベッド高、 N は総段数である。

総段数は吸着及び分配クロマトグラフィーの分離能における最も重要な要因のひとつである。押し出し流れは最高能力を達成したクロマトグラフィーにおける理想状態である。

EBA における総段数の増加は、総段数が 1 から数百に増加した際、担体の結合能力を劇的に向上させる。しかしながら、総段数が 1000 以上、もしくは吸着等温線が、吸着とバルク溶液中の目的物の濃度が独立した理想状態であった際、多くの吸着カラムで、総段数は分離能力に余り寄与しない。

流動系の非理想的挙動は軸方向分散モデルにて表される⁸。分散モデルの基礎方程式は次のとおりである。

$$\frac{\partial c}{\partial t} + U \frac{\partial c}{\partial z} = D_a \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \quad (6)$$

濃度は径方向の平均、 U は空塔速度である。

閉鎖系では、 Da は軸方向分散モデルの特徴変数である。時々ペクレ数 Pe_r が代わりに使用される。

$$Pe_r = \frac{Ul}{D_a} \quad (7)$$

U はカラムの空塔速度、 l はカラム長である。

Pe_r は分散モデルに関して、トレーサー物質の RTD データを用いて算出される。

$$\frac{\sigma^2}{\tau^2} = \frac{2}{Pe_r} - \frac{2}{Pe_r^2}(1 - e^{-Pe_r}) \quad (8)$$

総段数は非理想流型や希釈による逆混合の増加により有意に減少する。カラム形状、操作状況、ベッド状態が直接総段数に影響し、通常 Van Deemter 方程式で表される。

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (9)$$

U は溶液の空塔速度、 A 、 B 、 C は定数である。

Van Deemeter の方程式は経験式であるが、Van Deemeter の方程式の A 、 B 、 C の物理的意味を与えるのに役立つ類似の形式での解析的解法がある。

方程式の 3 項は、短期的には、 A は基礎的なベッド構造の寄与について表し、 B はトレーサーの拡散率に比例するので、 B/u は異なる分子間の拡散混合を示し、 C はビーズ層の断面積に比例し、対流からの逆混合を示している。 u はカラム内の流量の線速度（空塔速度）である。

非理想的挙動（1 から無限大の間）は、総段数もしくはペクレ数で記述できる。総段数 N と $HETP$ は簡易で率直な物理的意味よりクロマトグラフィーのカラム性能の評価に最も一般的に用いられる。

EBA の最初の発想が追求する主要な利点の一つは、(流動床のような) 単段の吸着に比べて、比較的高段数であることである。しかしながら、凝集体の生成と洗浄可能性への考慮によりきわめて達成が困難なことが明らかとなっている。

EBA カラムと工程デザイン

拡張床は、径方向に均一な流速を得るのに必要な流量抵抗性を欠いているので、カラムの流量分配器は EBA 操作を支持するのに大変重要である。近年、妥当な流量分配と洗浄可能性を達成するためのカラムデザインと工程構成の発展がなされている。

いくつかの EBA カラムの初期デザインを図 4 に示す。最初のタイプではメッシュの下方に有孔プレートを使用している。通常、開けられた孔のところで渦ができ、それゆえ、カラム下部における逆混合がまだ課題である。メッシュとプレートの隙間は非衛生的で薬物生産には問題があった。二つ目のタイプはカラムの底に徐々に開放する形状の球状の逆止弁を使用している。流路は完全に開放であり洗浄可能であるが、流量分配は略図に示すとおり、まったく理想的ではない。三つ目のタイプは、ラージ・ビーズ分配器と呼ばれ、均一な流量分配が供給されるが、ビーズベッド内の衛生面にまだ課題がある。四つ目のタイプは厚みのある有孔プレートである。問題は同様に詰まりと洗浄である。五つ目のタイプは有孔の回転式アームである。洗浄可能なデザインであるが、カラム下部の逆混合が課題である。

有孔プレートとメッシュは市販され、第一世代の EBA デザインとなった。その他のタイプは、短期間市場に出た第二世代である回転式アーム以外は市販されていない。

有孔プレート—第一世代

図 5 に詳細に示すように、EBA カラムの第一世代デザインは古典的なメッシュサポートの固定床式カラムの改良版として導入された。メッシュの下部に、平板もしくはボウル状のプレートをメッシュと対面して設定している。ボウルの底に、いくつかの孔を対称に開け、メッシュとベッドに流量を導いている。

初期の研究者は、望ましい押し出し様流れを拡張床に供給するために、流量を事前分配する特別な分配器が必要であることに気がついた。種々のタイプの分配器について、幅広い研究が行われた^{10,11}。4 から 8 の多孔や複雑化した流路形状についての研究が行われた。ベッドの安定性と総段数が主な課題であった。2005 年までに、市場で入手可能な EBA は、有孔プレートデザインのみであった。有孔プレート分配器が選択され、開放流路分配器の多くは分離効率とベッド安定性の点で、有孔プレートほどの能力がないことに研究者たちは同意する傾向にあった。

しかしながら、分配器内の有孔プレートは流路の巨大な閉鎖空間の原因となった。この空間は、内部で凝集が発生しても、流量による自己洗浄が不可能であった。このような凝集は、長時間の試料添加工程において起こりやすい。形成された凝集体は、溶出前に確実に洗浄することは不可能で、それゆえ溶出時に産物に夾雑した。図 6 に第一世代分配器の内部に蓄積した凝集体について示す¹²。強力な化学物質を使用する CIP サイクルにおいてさえ、閉鎖空間におけるこのような凝集を洗浄するのは困難であった。

第一世代分配器のこのような欠点により、EBA テクノロジーの適応の可能性は限られたものとなった。

可動式アーム—第二世代分配器

EBA の第二世代は、第一世代 EBA カラムの重大な洗浄可能性問題の解決が必要であった。洗浄可能性は医薬品工業において、現実的な適応を見出すための EBA の最優先課題となった。

図 7 に示すとおり、第二世代 EBA カラムには底部のネットがない。代わりに、有孔の複数のアームがついた可動式の装置がカラムの底部中央に設置されている。試料は中央の管より供給され、放射状に伸びた有孔のアームに流される。試料は通常、カラムの底部に向けて下向きに開けられた孔よりカラム内に分配される。これらの管は、試料を均一に分配するために、作動中、回転もしくは振動する。流入路にはネットや多孔質体はない。

流れの向きを下降から上昇に変化させ、カラム底部のベッドを可動式アームで攪拌する必要があるため、図 4 に示すように、第二世代のデザインでは逆混合が重要な課題である。

底部のネットがないため、下流を使用した固定床での溶出が、第二世代カラムでは実施できない。拡張床状態で溶出を行う結果として、固定床と比べて低い段数になるため、工程の濃縮率が低下する。このデザインのもうひとつの欠点は、回転／振動するアームが偶

発的に吸着体を破碎することである。カラム内の可動し磨耗する部品は、操作の信頼性と保守点検の増加の懸念を惹き起こす。

再還流を伴う分配器—第三世代

EBA カラムの第三世代は、分配器内のメッシュの下方に再還流機構を導入した¹³。初期のアイデアでは、分配器の片側からメッシュに接線方向に流量を供給し、分配器内でのファウリングを避け、凝集を洗浄するために、反対側から排出する¹³。最初のアイデアでは、流量分配を考慮しておらず、明らかに大口径のカラムには適応できない。

図 8 に示すような、多彩な流路高の複雑な多階層流路による流路パターンが再還流分配器として提案された⁵。ネットの接線方向に多数の孔を有するノズルが分配器のメッシュ直下の底部アダプター中央に設定された。分配器内に、上部流路方向と下部流路方向の空間を分けるように分配器コアが存在する。供給流は中央にある注入口を通して分配器内に流入し、ノズルを通して上部分配流路に導入される。そして、再還流用の下部戻り流路より戻ってくる。

分配器コアは、径方向に均一な圧力をかけ、流路内の洗浄可能性を確保するように形成されており、特に重要である。均一な圧力は径方向からベッドに均一な分配流を導入する。

外部のポンプによる可動を前提とした、上記の外部再還流路に加え、図 8 に示すように、均質性の改善のために上部流路と下部流路間に内部再還流路を導入している。この様な内部再還流路は径方向の均一な分配流をさらに改善し、均一な分配流の達成に要求される再還流率を低減させる。

カラム効率と工程能力

多くの固定床クロマトグラフィー用カラムの段数は 3000/m 以上である。高分離カラムでは 10000 から 20000/m である。吸着クロマトグラフィーの能力は段数が 1 から数百に上昇したとき有意に改善し、多くの使用法で、段数は 1000 を超えると非制御要因となる。

有孔プレートを使用した古典的な EBA カラムでは、総段数は 30 から 150/m くらいである¹¹。EBA カラムの段数を増加させることは、カラムの直接結合能力を有意に向上させる。

分配器のデザイン

理想の押し出し流れからの逸脱は、段数減少の主な理由である。EBA カラムにおいて、逆混合は分配器、カラムの双方で発生する。固定床用の改良版である古典的な有孔分配器では、分配器がカラム下部での逆混合の原因となっている。

可動式アームを有する第二世代の EBA カラムでもカラム下部での逆混合が原因で、段数が改善されなかった。段数は 5 から 20 の範囲と報告されている¹⁴。分配器のアームからの下流は、転回して上昇する必要がある、可動式アームはベッドに対して恒常的な障害となる。最高なのは、適度な線流速と中位の振動頻度の状態であった。

対流路拡散と分子拡散による希釈が理想の押し出し流れからの逸脱の別形態である。過剰に拡張したベッドと不適切にデザインされた巨大なデッドスペースを有する分配器が試料濃度の不必要な希釈の原因となり、段数と分離効率の低下を引き起こした。

第一世代と第二世代の古典的な EBA カラムは、最良の段数の達成に 2.5 から 3.0 の拡張率（拡張ベッド高を沈降ベッド高で除したもの）が必要である¹⁴。第二世代カラムのベッド拡張の一例を図 9 に示す。ベッドの望ましくない希釈が重要な課題である。

細胞、細胞残渣、微粒子の通過には不要だけでなく、カラム下部で発生する不可避の逆混合を克服する放射状の均一の流量にも不要であるので、このような高度なベッドの拡張に留意することは重要である。

ベッドの拡張度は、次の式で定義される拡張比を用いて表され、

$$\frac{H}{H_0} = \frac{(1-\varepsilon_0)}{(1-\varepsilon)} \quad (10)$$

H は拡張ベッド高、 H_0 は沈降ベッド高、 ε_0 は拡張ベッド間隙率、 ε は沈降ベッド間隙率である。

EBA カラムの第三世代は分配器のメッシュの下方に再還流機構を導入した⁷。このアイデアはもともとアダプターメッシュ上のファウリングに対処するためであったが、後に、再還流の流れが径方向の均一な分配流の大きな助けになることがわかった。

以前の項で記載したように、この分配器は、放射状の流路パターンと複雑で多彩な流路高の多階層流路を有している。分配器内に分配器コアがあり、分配器内を上部分配流路と下部戻り流路に空間を分離している。分配器コアの形状により、径方向に沿っての均一の圧力と洗浄可能な流路が達成される可能性がある。内部再還流路は圧力の均質性の改善のために上部流路と下部流路の間に導入されている。メッシュ下部の圧力はほぼ均質であるため、試料は押し出し流れのように一体となってメッシュとベッドを通過するだろう。

第三世代のデザインは、開放再還流路の結果として、より高い段数と完全に自己洗浄可能な流路を有することが期待されている。トレーサー物質を用いて、押し出し様流れを実証した試験の結果が報告されている⁵。CFD モデリングは、放射状の流量パターンが径方向に沿った均一の分配流を導くことを支持している⁵。再還流量をより高くすればするほど、分配流はより均一になり、カラム径を大きくすればするほど、均一な流量の能力の改善がより重要になると報告されている。

最大の段数の達成には、第一世代と第二世代のカラムでは 2.5 から 3.0 の拡張度が必要であるが、第三世代のカラムでは、より高い段数 (>50) が、より小さいベッドの拡張度 (~1.5) での達成が期待される。

吸着材の開発

EBA 吸着材は通常の固定床クロマトグラフィーに使用される担体ビーズよりも高密度である必要がある。拡張ベッド時、ビーズは重力と流量による抗力のバランスが取れており、

より高密度のビーズにより、ベッドの過剰拡張や洗浄除去なしにより大きな処理能力を得られる。

大部分の EBA 吸着材は高密度のコアを多孔質の基質で被覆することにより作成される。最も一般的に使用されるコアは石英、ジルコニウム、タングステン、ステンレス鋼でできている¹⁵⁻¹⁸。表 A にいくつかの市販されている EBA 担体と物理学的性質についてまとめた。

非吸着コアはビーズの機能性空間から離れない。目的分子が到達しないように拡散を制限しているため、担体ビーズのコアはほとんど有効結合には関与しないと長い間認識されてきた。それゆえ、担体ビーズに内部コアをおくことによるビーズの有効結合能力の減少はないであろう。一方で、より重いビーズは工程の処理能力をより高める。結果として、EBA 工程の生産性は古典的な固定床クロマトグラフィーの生産性より高くなるだろう。追加の利点として、目的分子の劣化の回避、好収率の維持に重要な、試料添加工程における試料の保持時間を減少させる。しかしながら、より重い EBA 吸着材の開発はカラム効率とベッドの安定性の改善には限定的にしか影響を与えていない。

吸着材の密度の改善は分配流やカラム効率に影響しないことは注目に値する。主要な利点は工程の処理能力の向上である。表 A からわかるように、運用速度は、アガロース/石英担体が最初に GE Healthcare 社で開発された初期には、たった 300 cm/hr だったが、現在市販の EBA 担体での最高平均密度は約 3.5 g/mL (UpFront 社製) で、運用速度は 900 cm/hr である。一方、高密度は高段数を達成する拡張特性の改善の役には立たない。Biogen Idec 社の研究¹⁴が示すように、より高密度の担体を用いたカラム (例えば第二世代のカラム) でも最高総段数を達成するには、低い密度の担体のカラムと同程度の拡張 (2.5 から 3.0) が必要である。

開放流路と自己洗浄性

古典的なクロマトグラフィーのカラムデザインにおいても分配流の均一流量は課題であるが、固定床自体の比較的高流量抵抗性により弱められている。拡張床状態において、ベッド自体にはもはや抵抗性はないので、ベッドの流量抵抗性とほぼ無関係にベッドに分配するための流量が必要である。

EBA ベッドは大きな流量抵抗性を供給できず、(第二世代のデザインのような) 開放流路分配器は期待した流量パターンを供給できず、低分離効率になってしまった。EBA ベッドの下部では、一般的に、逆混合が多く発生し、EBA カラムが低段数になる主な理由となっている。

高流量抵抗性部品の上流は、ファウリングや詰まりが発生しやすく、流量それ自体での洗浄が不可能なので、(第一世代にあるような有孔プレートや厚みのあるメッシュのような) 高流量抵抗性部品に依存した古典的な EBA 分配器では衛生的な要求を満たせない。

一方、開放流路分配器の多くは EBA ベッドに多くの障害を起こすことなしに、流量を分

配することができない。言い換えると、多くの開放流路分配器は、ベッドが存在している状態で動かさねばならないので、今までのところベッド非依存分配器として試せていない。

第一世代、第二世代の EBA カラムはともに、非常に低い段数しか得られない。第二世代では可動式分配アームの使用によって洗浄可能性は改善した。

以前の項で述べたように、第三世代のデザインは、高段数と完全な洗浄可能性の達成に近づいているかもしれない。EBA ベッドに均一な流量を供給し、万一凝集がメッシュの下部に発生したときには、再還流時にメッシュから取り除かれるだろう。原料が再還流槽に戻ってくる前に、凝集は目の粗いインラインフィルターによって取り除かれることが示されている⁵。第三世代のデザインはベッド非依存的に均一な分配流を供給し、完全な開放で自己洗浄可能な流路を有している。

カラム内部の洗浄性を保証するために、分配器に加え、第二世代、第三世代のカラムは、EBA ベッドから凝集を除去するために上方のメッシュを開放するバイパスを有している。さらに慎重なデザインとして、第三世代のデザインでのバイパスの変わりに、逆流の利用が公表されている。

再還流

再還流は、最初、分配器内のメッシュ下方の凝集を除去する手段として提案された。高再還流量はメッシュ下方で発生するファウリングを防げるであろう。再還流は均一な分配流の助けにもなる強力な道具になった。

カラム流量に対する再還流量の割合により、ベッドへの分配流に望ましい影響を及ぼすことができた。以前に言及したように、カラム流量に対する再還流量の割合を増加することで、均一な分配流を改善することができると、トレーサー物質を使用した研究で示されている。原理は CFD 研究でも証明されている。

多くの場合、再還流なしの放射流でも、すでに十分な均一分配流であった⁵。カラム径を大きくすればするほど、更なる改善が必要になる。しかしながら、多くの動物細胞が過敏であるせん断ストレスが、問題となるかもしれない。

多くの動物細胞がせん断に過敏である。CHO 細胞はせん断に比較的高い耐久性がある。せん断ストレスは EBA カラムや分配器のそれまでのデザインでは問題とは考えられていなかった。動物細胞のような、せん断感受性の供給原料は、有孔プレート、メッシュ、可動式アームの孔には耐えることができると証明されてきた。しかしながら、分配器の再還流デザインでは、せん断ストレスは注意して考えなければならないかもしれない。

高い再還流率は、細胞に不必要なせん断ストレスを与え、細胞の破壊の原因となり、細胞内成分や細胞膜成分は結合に競合するので、徐々に吸着能力が悪化していく。

EBA にとって細胞の破壊は問題であるので、すべてのクロマトグラフィー工程にとって問題である。細胞の破壊は遠心時や TFF ろ過時にも発生する。このような上限は種々の供給原料の性質によって、通常決定されている。再還流量の細胞破壊に対する影響に関して、

余り報告はない。

デザインの視点から、この問題を軽減するひとつの方法は、供給原料が配管を通過するのと同じレベルに、せん断ストレスを流路においても維持することである。それまでのデザインのように新しいデザインにおいてもせん断ストレスを維持することは、流路のサイズを注意深く調整することで可能である。

第三世代の放射流デザインにおいて、再還流なしの分配流は、すでに前世代から大きな改善を見せている。これは、ベッド非依存性の分配流が再還流量に余り依存していないことを本質的には意味している。再還流量を使用することなく、放射流多段層分配器と必要時のメッシュ上方からの逆流及びメッシュ下方の清掃流が分配器内で発生する凝集やファウリングを十分に防ぐだろう。

それゆえ、カラム流量に対する再還流量の割合は、特殊な取り扱いに対しての工学的なデザインのよりいっそうの問題点である。これは、市販品が入手できるまで、器材供給者が試験を継続する余地を残している。

工程制御と担体の取り扱い

第三世代のカラムは、操作をするのに少し異なるシステムセットアップが必要である⁴⁷。図 10 に示すような、修正操作図が第三世代カラムの使用に提案された。

バッファーは最初に底部アダプター上の中央注入口からカラム内部に注入される。バッファーの大部分は、EBA ベッド内に流入し、残りは再度注入するために、再還流槽に戻される。新鮮バッファーが再還流槽に常に供給される。押し出し様流れが EBA ベッドを通過し、ベッドを物理的、化学的によい状態に調整する。

EBA ベッドが平衡化バッファーにより、安定化、平衡化された後、試料添加が開始される。再還流を継続しながら、新鮮な供給原料をバッファーの代わりに再還流槽に添加する。槽の大きさは再還流の維持に十分な大きさが必要だが、最初に試料を希釈するため、必要以上に大きくしないように、注意深い選択が必要である。大部分の供給原料は均一流によりベッドに流入するが、残りは再還流ポンプに戻される。カラム流量に対する再還流割合は、特定の取り扱いに依存している。多くの場合、非常に小さい再還流割合を維持する必要がある。ネット上方での必要に応じた逆流を、ネット下方の起こりうる凝集の除去のために適用してもよい。すべての供給原料が添加された後、洗浄をスタートする。

再還流を維持しながら、再還流槽に新鮮バッファーを再添加する。緩く結合した分子や原料中の他の夾雑物を除去するまで洗浄を継続する。次に、カラムは溶出工程に進む。

再還流が不要かどうかによって、溶出バッファーを再還流槽、もしくはポンプに直接添加する。溶出は下流もしくは上流モードのいずれでも実施できる。拡張度が小さいので、拡張モードの上流も、充填モードの下流も十分な溶出特性を与える。第三世代デザインでは追加部品となる下流モードにおける可動式の上部アダプターは、同様な理由により不要と思われる。

産物を回収し、溶出が終了した後、カラムを洗浄し再生させる。洗浄用試薬を再還流槽に添加し、十分な化合物量と時間、再還流を継続する。カラムはすすぎと再平衡化が必要となる。

新鮮バッファを再還流を維持しながら、再還流槽に適用する。十分なバッファが EBA ベッドを通過するまで継続し、カラムが再平衡化され、次の使用に適用できる。

再還流槽のサイズは、適切に選択しなければならない。できる限り小さく、空洞化現象なしに再還流を維持するのに十分な大きさが必要である。槽内の液量はレベルセンサーやロードセルを使用して制御する。

図 11 に示すような、より自動化された EBA 担体の新規の操作法が提案された。粒子の終端速度以上の流量自体により、EBA 担体は、カラム内もしくはカラム外に充填され、または開梱される。これは特に工業スケールにおいて、工程の自動化にとっての大きな利点である。

適応

EBA 供給原料は、担体やカラムに強い負荷をかける、細胞、細胞塊、細胞残渣、細胞膜や脂質、核酸のような細胞内物質からの夾雑物を含んでいるかもしれない。分泌細胞系や細胞内発現系が、EBA 工程が効果的か否かに影響する最初の要因かもしれない。細胞を壊さず、膜成分や DNA、脂質、その他のたん白質のような細胞内夾雑物を放出させないことが重要である。細菌性細胞の外膜に関する巨大分子はクロマトグラフィー担体を汚染することが知られている。極性微粒子はイオン交換体として作用し、たん白質に吸着する。バイオマス、細胞、細胞残渣は低 pH で凝集する傾向にあり、EBA ベッドに適用/添加時に、ベッドの安定性への問題と流路の詰まりを引起すかもしれない。

EBA は、植物抽出物や鶏卵白などのような厄介な細胞内発現系からの細胞溶解物に適応できるが、適切な溶液系と工程開発時にバイオマスと吸着材との相互作用を回避する吸着材の選択が重要となる。それゆえ、EBA の効率性は、供給原料や溶液の化学的性質の種類に依存し、ケースバイケースである。カラムと分配器のデザインよりも、バイオマスと担体ビーズ間の化学的性質のほうがよりベッドの安定性に影響する。種々の pH や伝導度の種々の溶液系の選択毎に、工程開発時に、EBA ベッドの選択は、最適化しなければならない主要な要素である。

EBA は市場での成功は限られてきた。供給原料の前処理の費用が EBA 適応の利点を上回るかもしれないため、工程前に細胞溶解が必要な細胞内発現系への、EBA の数少ない適応に工業的な可能性がある。

衛生的な問題や操作信頼性のテクノロジーへの要求が低い、比較的きれいな分泌細胞系でさえ、EBA は生物医薬品工業において広範には受け入れられていない。阻害要因は大体が分配器やメッシュのファウリング、分配器内、下部及び上部メッシュ直下の流路の詰まりである。これらの問題は、短期の操作では明らかではないが、繰り返しの生産操作にお

いて重要な要素である。

rHSA とモノクローナル抗体への適応が興味深い。酵母発酵溶液からの rHSA の精製における EBA の使用について報告された^{18,19}。動物細胞培養液からモノクローナル抗体 (Monoclonal Antibody : MAb) 産物を、EBA を使用してかなり大規模に獲得することに成功した²⁰⁻²²。

モノクローナル抗体精製 : MAb は、通常トン単位で生産され、生物医薬品企業のけん引役となっている。2012 年には、15 種のブロックバスター医薬品の約 50% が MAb で、2020 年までには 80% を超えると期待されている。担体と細胞の相互作用やベッドの安定性に関するいくつかの懸念が報告されている。MAb は動物細胞から分泌され、細胞培養液は EBA が効率的に適応できるタイプの原料である。

リコンビナントヒト血清アルブミン (Recombinant Human Serum Albumin : rHSA) : rHSA は年間推定 100 トンが世界中で必要とされ戦略的に重要な医薬品のひとつである。rHSA は酵母細胞から分泌され、EBA は目的 rHSA の精製に効率的に適応できる。

ミルクからのトランスジェニックたん白質 : 牛などの動物で生産されたトランスジェニック医薬品のミルクからの精製が必要となるかもしれない。ミルクはその他のたん白質や脂質を大量に含有し、高粘性のため、固定床クロマトグラフィーではベッドの詰まりと過剰圧のような問題にしばしば遭遇する。EBA は潜在的に、このような供給原料の工程に理想的な選択肢であり、全体の工程を簡略化し、費用を削減できる。

低価格産物では一般的に、この特殊なテクノロジーを用いるインセンティブは小さい。一つの例外として、*E.coli* 細胞からの抗生物質の精製がある。このような工程は、通常 (年間 10 トンを超えるような) 大変大規模になり、下流工程の容量が経済的な制限を満たすことが重要である。現在の抗生物質の多くは医薬品として必要な純度まで精製するのにクロマトグラフィーが必要である。この工程のいくつかで、精密ろ過後でも凝集塊が形成されることが知られており、古典的な固定床が使用できない。このような場合に、EBA は完璧な解決策となりうる。

最後に細胞分離である。次世代の生物医薬品は細胞産物周辺で発展していくと思われる。細胞分離技術は、細胞療法の発展の重要な側面になると思われる。細胞がカラムで容易に詰まり、破碎圧力を受けるので、固定床を使用した古典的なクロマトグラフィーは細胞分離には使えない。しかしながら、EBA は細胞分離によく適応できるだろう。

結論及び今後の方向性

EBA は原料を含んだすべての微粒子の、直接処理のための普遍的な解決法ではない。非分泌たん白質産物を得るために細胞を溶解した結果、多量の核酸、脂質、その他のバイオマスがあるような状態では、前処置よりも EBA による直接処理のほうが、より経済的かもしれない。しかしながら、EBA は、供給原料が比較的きれいで、凝集が生じない近代の適応の大部分によく適合する。バイオマスや細胞凝集塊の洗浄問題は分配器やカラムの開放

流路によって、効率的に解決できる。

EBA は結合能を犠牲にせずに処理能力の向上をもたらす。結果として、工程の生産性は古典的な 3 工程よりもより高くできる。特に、プレキャプチャー工程における試料保持時間の減少による技術的な利点を有している。

EBA における全下流工程時間は古典的な 3 工程の 60% (5 日間の工程を 3 日間で実施できる) であるとするのは不当ではない。全収量は、3 工程を 1 工程にまとめる結果として 6%向上することができる。もし、生産費用の 80%が、(大部分の製造工程に見られる) 時間に依存した労働と間接諸経費だとすると、標準製造原価 (Standard Production Cost : SPC) は下流工程の SPC を考慮すると、おおよそ 34%削減できると推定できる。この推定では、工程における消耗品の減少と、高価な遠心分離と膜ろ過が不要になるため、初期投資が従来の一になるかもしれないことが含まれていない。

原材料がどれだけ高価であるか、及び、特殊な製品における上流工程の相対的な費用が、この 35%が全 SPC における意味ある削減になるのかどうかに寄与している。

技術的な感覚では EBA はすでに工業的に適応できる。しかしながら、制御調節に伴うリスクが経済的な利点につりあわないので、製薬工業における現工程を変更するには十分ではない。GE Healthcare 社と Pall 社が市場からの撤退を表明した後、市場化の推進力は尽きた。EBA の主要な市場化活動は、現状、UpFront 社のみである。UpFront 社は振動分配器技術を GE Healthcare 社にライセンスし、EBA 技術の商業化で DSM 社と Biogen Idec 社と協業した。

おそらく、EBA 周辺の商業環境への失望のため再還流分配器は市場化活動が見られていない。再還流分配器と第三世代 EBA の主要な不確実性は、流路における細胞のせん断圧力にある。現実の生物学的供給原料への技術の適応に研究を集中する必要がある、デザインの詳細が現実化には重要である。

経済的な利点は現状で市場化の新しい潮流を起こすにはまだ十分ではないが、次期の分離技術である細胞分離の将来性を考慮すると、産業界は違った見方をし始めるかもしれない。

本文以上

<図表の説明>

表 A 市販されている EBA 担体と物理学的性質（会社のウェブサイトと製品概要書）

図 1 古典的下流精製工程と EBA 適応事例の比較

図 2 EBA 操作法の概念

図 3 トレーサー物質を使用した滞留時間分布（RTD）の測定

図 4 種々の EBA 分配器の比較

図 5 第一世代 EBA カラムデザイン¹⁰

図 6 第一世代分配器における、ファウリングと凝集¹²

図 7 第二世代分配器：回転／振動アーム¹³

図 8 第三世代分配器：再還流⁵

図 9 第二世代 EBA カラムにおける操作範囲¹⁴

図 10 再還流分配器を有する EBA の工程流れ図

図 11 EBA カラムにおける溶液操作