

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7695993号  
(P7695993)

(45)発行日 令和7年6月19日(2025.6.19)

(24)登録日 令和7年6月11日(2025.6.11)

(51)国際特許分類 F I  
C 0 7 C 41/40 (2006.01) C 0 7 C 41/40  
C 0 7 C 43/23 (2006.01) C 0 7 C 43/23 G

請求項の数 6 (全17頁)

(21)出願番号	特願2023-508901(P2023-508901)	(73)特許権者	000000941 株式会社カネカ 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号
(86)(22)出願日	令和4年3月4日(2022.3.4)	(74)代理人	110002572 弁理士法人平木国際特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/JP2022/009360	(72)発明者	谷崎 昂 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内
(87)国際公開番号	WO2022/202213	(72)発明者	大野 直生 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内
(87)国際公開日	令和4年9月29日(2022.9.29)	(72)発明者	橋本 貴識 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内
審査請求日	令和7年2月20日(2025.2.20)		
(31)優先権主張番号	特願2021-52888(P2021-52888)		
(32)優先日	令和3年3月26日(2021.3.26)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶又はその結晶性固体の製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルコールと還元型補酵素 Q 1 0 とを含有する混合液に、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶を種晶として添加すること、及び、

前記種晶の添加後の前記混合液中で F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶を析出させることを含み、

前記析出において、ホルマジン濁度 ( F T U ) が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の 7 0 % 以上の時間、F T U 変化率を 4 5 F T U / m i n 以下に維持する、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶又はその結晶性固体の製造方法。

【請求項 2】

前記期間における混合液の温度が 3 0 ~ 4 3 である、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】

前記析出において、ホルマジン濁度 ( F T U ) が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の 7 0 % 以上の時間、F T U 変化率を 0 F T U / m i n 超に維持する、請求項 1 又は 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】

前記アルコールが、炭素数 1 ~ 5 の 1 価のアルコールである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 5】

前記炭素数 1 ~ 5 の 1 価のアルコールが、エタノールである、請求項 4 に記載の製造方

法。

【請求項 6】

前記アルコールが、水とアルコールとの総量に対して、95重量%以上のアルコールである、請求項1～5のいずれか1項に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、安定性に優れたForm II型の還元型補酵素Q10結晶又はその結晶性固体の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

補酵素Qは、細菌から哺乳動物まで広く生体に分布する必須成分であり、生体内の細胞中におけるミトコンドリアの電子伝達系構成成分として知られている。補酵素Qは、ミトコンドリア内で酸化と還元を繰り返すことで、電子伝達系における伝達成分としての機能を担っているほか、還元型補酵素Qは抗酸化作用を持つことが知られている。ヒトでは、補酵素Qの側鎖が繰り返し構造を10個持つ補酵素Q10が主成分であり、生体内においては、通常、40～90%程度が還元型として存在している。補酵素Qの生理的作用としては、ミトコンドリア賦活作用によるエネルギー生産の活性化、心機能の活性化、細胞膜の安定化効果、抗酸化作用による細胞の保護効果等が挙げられている。

【0003】

現在製造・販売されている補酵素Q10の多くは酸化型補酵素Q10であるが、近年では、酸化型補酵素Q10に比べて高い経口吸収性を示す還元型補酵素Q10も市場に登場し、用いられるようになってきている。

【0004】

還元型補酵素Q10を得る一般的な方法は既に開示されている（特許文献1）。さらに、還元型補酵素Q10を結晶として得る方法についても、いくつかの方法が知られている。例えば、還元型補酵素Q10をアルコール溶液及び/又はケトン溶液中において晶出させ、結晶を製造する方法（特許文献2）や、還元型補酵素Q10の高濃度液相を貧溶媒中に添加することで結晶化を行う方法（特許文献3）などが報告されている。

【0005】

一方、特許文献4には、還元型補酵素Q10に結晶多形現象が見られることが記載されており、新たに出現した結晶形（以下、この結晶をForm II型の還元型補酵素Q10結晶、又は、Form II型結晶と呼称する）は従来の還元型補酵素Q10（以下、この結晶をForm I型の還元型補酵素Q10結晶、又は、Form I型結晶と呼称する）より非常に安定で、その他の物理特性にも優れていると報告されている。また、特許文献5には、Form II型の還元型補酵素Q10結晶の製造方法が記載されている。特許文献5では、請求項1において、アルコール、炭化水素、脂肪酸エステル及び窒素化合物からなる群より選択される少なくとも1種の有機溶媒と、還元型補酵素Q10とを含有する、温度が32～43の溶液に、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を種晶として添加して、混合液を調製すること、及び、前記混合液中でForm II型の還元型補酵素Q10結晶を析出させることを含む、Form II型の還元型補酵素Q10結晶の製造方法が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【文献】特開平10-109933号公報

【文献】国際公開2003/006409号

【文献】特開2003-089669号公報

【文献】国際公開2012/176842号

【文献】国際公開2020/045571号

10

20

30

40

50

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

特許文献4には、Form II型の還元型補酵素Q10結晶の取得方法として、特定の条件で晶析を行う方法が記載されているが、長時間を要する上に回収量が少ない場合があり、必ずしも工業的には最適とはいえない方法である。特許文献5に開示された方法は、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を得るための工業的規模での生産にも適した効率的な製造方法を提供することを目的とするものであり、主に温度に着目した方法が開示されている。本発明者らは、温度以外の要素に着目することにより、より効率的な製造方法を提供することができるのではないかと考えた。

10

## 【0008】

すなわち、本開示は、安定型の結晶形であるForm II型の還元型補酵素Q10結晶又はその結晶性固体を得るための効率的な製造方法を提供することを目的とする。

## 【0009】

また、本発明者らは、製造方法を検討する中で、その製造条件によってForm II型の還元型補酵素Q10結晶の中でも、結晶の酸化安定性に差が生じることを見出した。そこで本開示は酸化安定性に優れるForm II型の還元型補酵素Q10結晶又はその結晶性固体を得るための製造方法を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

アルコールと還元型補酵素Q10とを含有する混合液中でForm II型の還元型補酵素Q10結晶を析出させる際には、析出が進むにつれて、混合液中のForm II型の還元型補酵素Q10結晶が増えるために濁度が増加する。本発明者らは、この濁度の変化率を制御することにより、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を効率的に製造できること、得られるForm II型の還元型補酵素Q10結晶又はその結晶性固体が酸化安定性に優れることを見出した。

20

## 【0011】

本実施形態の態様例は、以下の通りに記載される。

(1) アルコールと還元型補酵素Q10とを含有する混合液に、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を種晶として添加すること、及び、

30

前記種晶の添加後の前記混合液中でForm II型の還元型補酵素Q10結晶を析出させることを含み、

前記析出において、ホルマジン濁度(FTU)が1,000から10,000になるまでの期間の70%以上の時間、FTU変化率を45FTU/min以下に維持する、Form II型の還元型補酵素Q10結晶又はその結晶性固体の製造方法。

(2) 前記期間における混合液の温度が30~43である、(1)に記載の製造方法。

(3) 前記析出において、ホルマジン濁度(FTU)が1,000から10,000になるまでの期間の70%以上の時間、FTU変化率を0FTU/min超に維持する、(1)又は(2)に記載の製造方法。

(4) 前記アルコールが、炭素数1~5の1価のアルコールである、(1)~(3)のいずれか1つに記載の製造方法。

40

(5) 前記炭素数1~5の1価のアルコールが、エタノールである、(4)に記載の製造方法。

(6) 前記アルコールが、水とアルコールとの総量に対して、95重量%以上のアルコールである、(1)~(5)のいずれか1つに記載の製造方法。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2021-052888号の開示内容を包含する。

## 【発明の効果】

## 【0012】

本開示の方法によれば、Form II型の還元型補酵素Q10結晶又はその結晶性固体

50

を効率よく製造することができる。また、本開示の方法により得られる F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶又はその結晶性固体は酸化安定性に優れる。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 4 】

<還元型補酵素 Q 1 0 >

本明細書における「還元型補酵素 Q 1 0」とは、還元型補酵素 Q 1 0 を主成分とする限り、その一部に酸化型補酵素 Q 1 0 を含んでいてもよい。なお、ここで主成分とは、例えば 5 0 重量%以上、通常 6 0 重量%以上、好ましくは 7 0 重量%以上、より好ましくは 8 0 重量%以上、さらに好ましくは 9 0 重量%以上、特に好ましくは 9 5 重量%以上、とりわけ好ましくは 9 8 重量%以上含まれていることを意味する。ここで前記割合は、補酵素 Q 1 0 の総量に対する、還元型補酵素 Q 1 0 の割合である。

10

【 0 0 1 5 】

なお、上述したように、還元型補酵素 Q 1 0 には、従来から知られている F o r m I 型と、最近になって新たに見出された F o r m I I 型の 2 種の結晶多形が存在する。具体的には、融点が 4 8 付近で、粉末エックス線 ( C u - K ) 回析において、回折角 (  $2 \pm 0.2^\circ$  ) 3 . 1 °、1 8 . 7 °、1 9 . 0 °、2 0 . 2 °、2 3 . 0 ° に特徴的なピークを示す還元型補酵素 Q 1 0 の結晶形が F o r m I 型であり、融点が 5 2 付近で、粉末エックス線 ( C u - K ) 回析において、回折角 (  $2 \pm 0.2^\circ$  ) 1 1 . 5 °、1 8 . 2 °、1 9 . 3 °、2 2 . 3 °、2 3 . 0 °、3 3 . 3 ° に特徴的なピークを示す還元型補酵素 Q 1 0 の結晶形が F o r m I I 型である。本明細書においては、示差走査熱量測定 ( D S C ) により、5 / 分の速度で昇温した場合において  $5 4 \pm 2$  に吸熱ピークを有するか、昇温速度 1 / 分において同様に測定をおこなった場合、 $5 2 \pm 2$  に吸熱ピークを有するか、粉末エックス線 ( C u - K ) 回析において、回折角 (  $2 \pm 0.2^\circ$  ) 1 1 . 5 °、1 8 . 2 °、1 9 . 3 °、2 2 . 3 °、2 3 . 0 ° 及び 3 3 . 3 ° に特徴的なピークを示すか、そのうち 1 つでも満たす還元型補酵素 Q 1 0 の結晶を「F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 の結晶」という。もちろん、全ての条件を満たすものであってかまわない。

20

【 0 0 1 6 】

また、本明細書における「結晶性固体」とは、結晶構造を有する部分とともに、結晶構造を有さない非晶質成分をその中に含んでいる固体を意味する。すなわち、「F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶又はその結晶性固体」における「その結晶性固体」とは、「F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶の結晶構造を有する部分と共に、結晶構造を有さない非晶質成分をその中に含んでいる固体」を意味する。

30

【 0 0 1 7 】

<アルコール>

本発明者らは、アルコール中では、F o r m I I 型結晶の飽和濃度が、F o r m I 型結晶の飽和濃度よりも小さいために、還元型補酵素 Q 1 0 の溶媒としてアルコールを用いることにより、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶を効率的に析出させることが可能であることを見出した。

40

【 0 0 1 8 】

アルコールとしては、炭素数 1 ~ 5 の 1 価のアルコールであることが好ましい。炭素数 1 ~ 5 の 1 価のアルコールとしては、例えば、メタノール、エタノール、n - プロパノール、イソプロパノール、n - ブタノール、イソブタノール、n - ペンタノールが挙げられる。アルコールとしては、F o r m I I 型結晶の飽和濃度が、F o r m I 型結晶の飽和濃度よりも十分に小さく、取扱いが容易なエタノールが特に好ましい。なお、アルコールとしては、上記例示したものを単独で用いてもよく、2 種以上を混合して用いてもよい。

【 0 0 1 9 】

本明細書におけるアルコールは、アルコールを主成分とする溶媒であればよく、水を含

50

む含水アルコールであってもよい。アルコールとしては、含水量が低いほど F o r m I I 型結晶の選択的な析出が容易である。このためアルコールは、水とアルコールとの総量に対して、アルコール濃度は例えば 80 重量%以上、通常は 90 重量%以上、好ましくは 95 重量%以上、より好ましくは 97 重量%以上、さらに好ましくは 99 重量%以上、特に好ましくは 99.5 重量%以上である。なお、アルコール濃度が 99.5 重量%以上のアルコールは、無水アルコールを意味する。また、アルコール濃度の上限としては、100 重量%以下である。

【0020】

アルコールとしては、含水エタノール又は無水エタノールが特に好ましい。エタノールとしては、水とエタノールとの総量に対して、エタノール濃度は、例えば 80 重量%以上、通常は 90 重量%以上、好ましくは 95 重量%以上、より好ましくは 97 重量%以上、さらに好ましくは 99 重量%以上、特に好ましくは 99.5 重量%以上である。また、エタノール濃度の上限としては、100 重量%以下である。

10

【0021】

< F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 10 結晶又はその結晶性固体の製造方法 >

本実施形態に係る、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 10 結晶又はその結晶性固体の製造方法は、アルコールと還元型補酵素 Q 10 とを含有する混合液に、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 10 結晶を種晶として添加すること、及び、前記種晶の添加後の前記混合液中で F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 10 結晶を析出させることを含み、前記析出において、ホルマジン濁度 (F T U) が 1,000 から 10,000 になるまでの期間の 70% 以上の時間、F T U 変化率を 45 F T U / m i n 以下に維持する、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 10 結晶又はその結晶性固体の製造方法である。

20

【0022】

以下の説明では F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 10 結晶を種晶として添加する工程を「種晶添加工程」、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 10 結晶を析出させる工程を「結晶析出工程」と称する場合がある。

【0023】

アルコールと還元型補酵素 Q 10 とを含有する混合液は、アルコールと還元型補酵素 Q 10 を含有していれば特に限定されず、還元型補酵素 Q 10 がアルコールに溶解した均一な溶液であってもよいし、還元型補酵素 Q 10 の一部がアルコールに溶解しているが一部が溶解せずに懸濁したスラリーであっても良いが、好ましくは、還元型補酵素 Q 10 がアルコールに溶解した均一な溶液である。

30

【0024】

アルコールと還元型補酵素 Q 10 とを含有する混合液に使用される還元型補酵素 Q 10 としては、結晶、非晶状態を問わず、またその結晶多形も問わない。従って、従来公知の F o r m I 型の還元型補酵素 Q 10 を使用することもできる。また、結晶析出においてその純度を高めることが可能なため、不純物を有するものや、未精製・粗精製の還元型補酵素 Q 10 であってもよい。さらに、従来公知の方法によって得られた還元型補酵素 Q 10 の抽出液や、公知の還元方法で酸化型補酵素 Q 10 から得られた還元型補酵素 Q 10 を含有する反応液を、そのまま、あるいは必要に応じて精製及び/又は溶媒置換したものを、前記混合液として使用することもできる。

40

【0025】

アルコールと還元型補酵素 Q 10 とを含有する混合液は、アルコール(含水アルコールを含む)以外の他の有機溶媒を更に含んでも良いが、溶媒成分全量あたりのアルコールの含有量(アルコールの純度)は好ましくは、95 重量%以上、97 重量%以上、99 重量%以上であり、上限としては 100 重量%以下が好ましい。アルコールの純度は、最も好ましくは 99.5 重量%以上である。他の有機溶媒としては、炭化水素、脂肪酸エステル及び窒素化合物からなる群より選択される少なくとも 1 種が例示できる。

【0026】

アルコールと還元型補酵素 Q 10 とを含有する混合液中の、種晶添加前の還元型補酵素

50

Q 1 0 の溶存濃度は、例えば 2 重量 % 以上、好ましくは 3 重量 % 以上、より好ましくは 5 重量 % 以上、さらに好ましくは 7 重量 % 以上、特に好ましくは 9 重量 % 以上である。種晶添加前の還元型補酵素 Q 1 0 の溶存濃度は、例えば 5 0 重量 % 以下、好ましくは 4 5 重量 % 以下、より好ましくは 3 0 重量 % 以下、さらに好ましくは 2 0 重量 % 以下、特に好ましくは 1 5 重量 % 以下である。

#### 【 0 0 2 7 】

アルコールと還元型補酵素 Q 1 0 とを含有する混合液は、アルコールと還元型補酵素 Q 1 0 とを含有する原料混合物を例えば 4 2 以上の温度に加熱して、還元型補酵素 Q 1 0 を溶解させることにより得られる。該温度としては、好ましくは 7 0 以下、より好ましくは 5 5 以下の温度である。還元型補酵素 Q 1 0 を溶解させた後、種晶を添加する前に、アルコールと還元型補酵素 Q 1 0 とを含有する混合液は、後述の種晶を添加する際の温度まで冷却することが好ましい。

10

#### 【 0 0 2 8 】

種晶となる F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶の添加量（種晶添加量）としては、特に限定されないが、種晶の添加前の前記混合液中の還元型補酵素 Q 1 0 の量（1 0 0 重量 %）に対して 0 . 1 重量 % 以上が好ましく、0 . 5 重量 % 以上がより好ましく、0 . 8 重量 % 以上がさらに好ましく、1 重量 % 以上が特に好ましい。上限は特に制限されないが、種晶添加前の前記混合液中の還元型補酵素 Q 1 0 の量（1 0 0 重量 %）に対して、2 0 重量 % 以下が好ましく、4 重量 % 以下がより好ましく、2 . 2 重量 % 以下がさらに好ましい。なお、種晶に使用される還元型補酵素 Q 1 0 結晶は、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶を含む限り、F o r m I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶や非結晶を含むものであっても差し支えないが、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶の純度が高い方が好ましい。種晶としては F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶が、例えば 5 0 重量 % 以上、好ましくは 7 5 重量 % 以上、さらに好ましくは 8 0 重量 % 以上、より好ましくは 9 0 重量 % 以上のものを使用するのがよい。

20

#### 【 0 0 2 9 】

種晶を添加する時点での前記混合液の温度は、3 0 ~ 4 3 であることが好ましい。種晶を添加する時点での前記混合液の温度は、3 2 以上がより好ましく、3 4 以上が特に好ましい、又 4 0 以下がより好ましい。該範囲では、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶の選択的な析出が容易である。

30

#### 【 0 0 3 0 】

結晶析出工程は、ホルマジン濁度（F T U）が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の 7 0 % 以上の時間、F T U 変化率を 4 5 F T U / m i n 以下に維持することを含む。該 F T U 変化率は、4 3 F T U / m i n 以下であることが好ましく、4 0 F T U / m i n 以下であることがより好ましい。結晶の析出が進むにつれて F T U は上昇するが、F T U が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の 7 0 % 以上の時間、F T U 変化率を前記範囲に維持することにより、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶を効率よく製造することができると共に、得られる F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶は酸化安定性に優れる。この理由を本発明者らは、F T U の上昇は、結晶の析出が進行していることを意味し、F T U 変化率を特定の範囲とすることにより、急激な析出による不安定な結晶生成を抑制することが可能であり、酸化安定性に優れる F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶を安定的に製造することができるためと推測した。また、F T U が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の一部において、F T U 変化率が上記特定の範囲から外れる場合であっても F T U が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の 7 0 % 以上の時間において、F T U 変化率が上記特定の範囲にあれば、酸化安定性に優れる F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶を安定的に製造することができることを見出した。なお、F T U が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の 7 0 % 以上の時間とは、例えば F T U が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでに、3 0 0 分を要する場合には、2 1 0 分以上の時間を意味し、9 0 0 分を要する場合には、6 3 0 分以上の時間を意味する。

40

50

## 【 0 0 3 1 】

種晶を添加する時点での前記混合液は還元型補酵素 Q 1 0 がアルコールに溶解した均一溶解していることが好ましい。種晶を添加する時点での前記混合液の F T U は、通常は 0 ~ 2 5 0 であり、好ましくは 0 ~ 2 3 0 であり、より好ましくは 0 ~ 2 0 0 である。該範囲では、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶が優先的に析出するため好ましい。

## 【 0 0 3 2 】

ある時点 ( T ) の F T U 変化率は、以下の式により算出することができる。

$$F T U \text{ 変化率 } \tau ( F T U / m i n ) = ( \text{濁度測定値 } \tau ( F T U ) - \text{濁度測定値 } \tau - 2 0 ( F T U ) ) / 2 0 ( m i n )$$

( 上記式において、F T U 変化率  $\tau$  は時点 ( T ) における F T U 変化率を意味し、濁度測定値  $\tau ( F T U )$  は時点 ( T ) における F T U の測定値を意味し、濁度測定値  $\tau - 2 0 ( F T U )$  は時点 T の 2 0 分前における F T U の測定値を意味する。 )

10

## 【 0 0 3 3 】

すなわち、本実施形態では F T U 変化率は、F T U を 2 0 分毎に測定し、その間の F T U の増加量を 2 0 分で除することにより算出することができる。つまり、仮にある態様において、ごく短時間 ( 例えば 1 分 ) の間、F T U 変化率が本実施形態の範囲外であったとしても、F T U を 2 0 分毎に測定した際に、F T U 変化率が本実施形態の範囲内である場合には、該態様は F T U 変化率が本実施形態の要件を満たしているものとする。

## 【 0 0 3 4 】

本実施形態では、ホルマジン濁度 ( F T U ) が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の 7 0 % 以上の時間、F T U 変化率を 0 F T U / m i n 超に維持することが好ましい。該 F T U 変化率は、例えば 5 F T U / m i n 以上であることがより好ましい。

20

## 【 0 0 3 5 】

本実施形態では F T U 変化率は、ホルマジン濁度 ( F T U ) が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の 7 0 % 以上の時間、上述の特定の範囲であることにより、酸化安定性に優れる F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶を効率よく製造することができる。F T U 変化率としては、ホルマジン濁度 ( F T U ) が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の 7 0 % 以上の時間、F T U 変化率を 5 F T U / m i n 以上 4 5 F T U / m i n 以下に維持することが好ましい態様の一つである。

## 【 0 0 3 6 】

本実施形態では F T U 変化率を F T U が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の 8 0 % 以上の時間、F T U 変化率が後述の特定の範囲にあることが、酸化安定性に優れる F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶を安定的に製造する観点から好ましい態様の一つである。本実施形態では F T U 変化率は、ホルマジン濁度 ( F T U ) が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の 8 0 % 以上の時間、F T U 変化率を 0 F T U / m i n 超 4 5 F T U / m i n 以下に維持することが好ましく、F T U 変化率を 0 F T U / m i n 超 3 0 F T U / m i n 以下に維持することがより好ましい。

30

## 【 0 0 3 7 】

本実施形態では F T U 変化率を F T U が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の全期間 ( 1 0 0 % の時間 ) 、上述の特定の範囲、例えば F T U 変化率が 4 5 F T U / m i n 以下、好ましくは 0 F T U / m i n 超 4 5 F T U / m i n 以下、より好ましくは 5 F T U / m i n 以上 4 5 F T U / m i n 以下に維持することが、酸化安定性に優れる F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶を安定的に製造する観点から好ましい態様の一つである。

40

## 【 0 0 3 8 】

ホルマジン濁度 ( F T U ) が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 になるまでの期間の、混合液の温度は 3 0 以上 4 3 以下であることが好ましく、3 0 . 5 以上 4 2 以下であることがより好ましく、3 1 以上 4 1 以下であることが特に好ましい。前記範囲内では、F T U 変化率を前記範囲に維持することが容易であるため好ましい。

## 【 0 0 3 9 】

50

F T Uが10,000の時点での、混合液の温度は29以上38以下であることが好ましく、30以上37以下であることがより好ましく、31以上36以下であることが特に好ましい。

#### 【0040】

結晶析出工程では混合液の温度は、その時点でのホルマジン濁度、F T U変化率に応じて、適宜調節することができる。混合液の温度は一定であってもよいが、段階的に又は連続的に低下させてもよい。また、混合液の温度は一定期間一定の温度に保持した後に、段階的に又は連続的に低下させてもよい。好ましい一態様においては、種晶を添加する時点での混合液の温度は34以上38以下であり、F T Uが10,000の時点での混合液の温度は30以上37以下であり、F T Uが10,000の時点での温度が、種晶を添加する時点の温度よりも0.4以上8以下低いことが好ましい。なお、一定の温度に保持とは、好ましくは所定温度(設定温度) $\pm 3$ に保持することを意味し、より好ましくは所定温度(設定温度) $\pm 1$ に保持することを意味する。

10

#### 【0041】

混合液の温度を低下させる際の冷却速度としては、0.05/h以上20/h以下が好ましく、0.1/h以上15/h以下がより好ましい。冷却速度を経時的に変化させることも好ましい態様である。例えば、種晶を添加した後、一定時間、例えば0.5~8時間は温度を維持し、その後3~20時間は冷却速度を0.05/h以上0.5/h未満とし、その後冷却速度を0.5/h以上15/h以下とする態様、種晶を添加した後、3~20時間は冷却速度を0.05/h以上0.5/h未満とし、その後冷却速度を0.5/h以上15/h以下とする態様が挙げられる。

20

#### 【0042】

結晶析出工程では、ホルマジン濁度が10,000に到達した後も混合液の温度を低下させ、結晶の析出を行うことが好ましい。その際の冷却速度としては、例えば、前述の範囲に基づき設定することができる。また、混合液の温度が23~34に到達した時点で、混合液中に含まれる還元型補酵素Q10の大半が既に析出しているため、温度が23~34に到達した後は、例えば冷却速度を、1/h以上20/h以下と大きくすることも可能である。

#### 【0043】

結晶析出工程を終了する時点の温度、すなわち、終点到達温度は、好ましくは25以下、より好ましくは20以下、より好ましくは10以下、より好ましくは7以下、より好ましくは5以下である。前記終点温度の下限は前記混合液の系の固化温度であるが、好ましくは0以上である。

30

#### 【0044】

結晶の析出は、混合液を強制流動させながら実施するのが好ましい。過飽和の形成を抑制し、スムーズに核化・結晶成長を行う観点、或いは、高品質化の観点から、単位容積当たりの攪拌所要動力として、通常0.003kW/m<sup>3</sup>以上、好ましくは0.004kW/m<sup>3</sup>以上、より好ましくは0.005kW/m<sup>3</sup>以上、さらに好ましくは0.006kW/m<sup>3</sup>以上の流動を前記混合液に与えるのがよい。また、攪拌所要動力として、通常は0.1kW/m<sup>3</sup>以下、好ましくは0.03kW/m<sup>3</sup>以下の流動を前記混合液に与えるのがよい。上記の強制流動は、通常、攪拌翼の回転により与えられるが、上記流動が得られれば必ずしも攪拌翼を用いる必要はなく、例えば、混合液の循環による方法などを利用しても良い。

40

#### 【0045】

上記方法によって得られたForm II型の還元型補酵素Q10結晶は、例えば、特許文献2や3に記載されたような従来公知の方法により、固液分離・乾燥の工程を経て回収される。例えば固液分離には加圧ろ過、遠心ろ過などが使用できる。また、乾燥後の結晶や結晶性固体を必要に応じて粉碎、分級(ふるい分け)して回収することもできる。

#### 【0046】

50

本実施形態においては、より好ましい態様の一つとして、上記固液分離後の F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶の乾燥を、加温下で行うことで F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶の含有割合の向上を図ることもできる。この目的において、乾燥温度としては、4 6 以上が好ましく、4 7 以上がより好ましく、4 9 以上がさらに好ましい。上限としては通常 5 2 以下、好ましくは 5 1 以下である。4 6 未満の場合、乾燥は進むが、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶の含有割合はほとんど向上しない。また、5 2 を超える場合は、乾燥中に還元型補酵素 Q 1 0 結晶が融解してしまうことがある。

【 0 0 4 7 】

なお、結晶析出工程において既に目的とする F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶の含有割合に達成している場合は上記の限りではなく、例えば 2 5 以上、好ましくは 3 0 以上、より好ましくは 3 5 以上で乾燥を実施すれば良い。

10

【 0 0 4 8 】

また、乾燥を行う場合の加温時間も特に限定されないが、4 時間以上が好ましく、1 0 時間以上が好ましく、2 0 時間以上がより好ましい。加温時間の上限としては特に制限はないが、通常は 7 2 時間以下、好ましくは 4 8 時間以下、より好ましくは 3 6 時間以下である。

【 0 0 4 9 】

なお、本実施形態の方法における各工程、具体的には、上記で説明した種晶添加工程、及び結晶析出工程、並びに固液分離や乾燥などの回収工程、その他その後の処理工程などは、脱酸素雰囲気下にて実施するのが好ましい。脱酸素雰囲気は、雰囲気の不活性ガスによる置換、減圧、沸騰やこれらを組み合わせることにより達成できる。少なくとも、雰囲気の不活性ガスによる置換、即ち、不活性ガス雰囲気を用いるのが好適である。上記不活性ガスとしては、例えば、窒素ガス、ヘリウムガス、アルゴンガス、水素ガス、炭酸ガス等を挙げることができ、好ましくは窒素ガスである。

20

【 0 0 5 0 】

得られた還元型補酵素 Q 1 0 の結晶又はその結晶性固体中に、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶が含有されているかどうかやその含有割合は、例えば示差走査熱量計 ( D S C ) で測定することにより判別が可能である。

【 0 0 5 1 】

前述したとおり、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶は、D S C により昇温速度 1 / 分において測定を行った場合、 $5 2 \pm 2$  付近に吸熱ピークを示し、F o r m I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶は、同条件において、 $4 8 \pm 1$  付近に吸熱ピークを示す。F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶が、従来の F o r m I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶あるいはその結晶性固体と混合された状態であっても、前記  $5 2 \pm 2$  付近のピークの有無やその吸熱ピークの高さや吸熱量の比により F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶の存在の有無やその含有割合を判別することができる。本発明によれば、高純度の F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶又はその結晶性固体を効率的に得ることができる。本実施形態によれば、結晶析出工程により、F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶を得ることができるが、その後の乾燥工程等によって、一部の結晶が熔融すること等により、結晶性固体が得られることがある。このため、本実施形態は、結晶が得られる場合、結晶性固体が得られる場合を包含する。また、得られる F o r m I I 型の還元型補酵素 Q 1 0 結晶又はその結晶性固体は、酸化安定性に優れる。

30

40

【実施例】

【 0 0 5 2 】

以下、実施例を挙げて本実施形態を説明するが、本開示はこれらの例によって限定されるものではない。

【 0 0 5 3 】

< 還元型補酵素 Q 1 0 結晶における F o r m I I 型結晶の比率 >

実施例、比較例で得られた還元型補酵素 Q 1 0 結晶中の F o r m I I 型結晶の比率は、

50

結晶を下記条件によるDSC測定により分析し、得られたForm I型結晶の吸熱ピークの高さ(Y差)(以下、Form IのY差)およびForm II型結晶の吸熱ピークの高さ(Y差)(以下、Form IIのY差)より、下記の式に基づき算出した。

Form II比率(%) = Form IIのY差 / (Form IのY差 + Form IIのY差) × 100

【0054】

(DSC測定条件)

装置：DSC 6220 (SIIナノテクノロジー製)

サンプル容器：アルミ製パン&カバー (SSC000C008)

昇温速度：1 / min

サンプル量：5 ± 2 mg

【0055】

<酸化安定性(相対QH比)の評価方法>

実施例、比較例で得られた還元型補酵素Q10結晶の酸化安定性を以下の方法で評価した。

【0056】

40 RH(相対湿度)75%および25 RH60%に設定した恒温槽において、開放系で実施例、比較例で得られた還元型補酵素Q10結晶を1ヶ月又は2ヶ月保存し、その後高速液体クロマトグラフィーを用いて還元型補酵素Q10(QH)および酸化型補酵素Q10の含量比を算出する。

【0057】

恒温槽で保存する前のinitialの還元型補酵素Q10結晶の還元型補酵素Q10の含量比、すなわち、実施例、比較例により得られた結晶を用いて、結晶取得後速やかに測定した際の還元型補酵素Q10の含量比を100とした相対値で、還元型補酵素Q10結晶の酸化安定性を、下記式により相対QH比として算出した。

相対QH比(%) = 保存後の還元型補酵素Q10比 / initialの還元型補酵素Q10比 × 100

【0058】

還元型補酵素Q10濃度および酸化型補酵素Q10濃度を測定した高速液体クロマトグラフィーの条件を以下に示す。

(HPLC条件)

カラム：SYMMETRY C18 (Waters製)、250 mm(長さ)、4.6 mm(内径)

移動相：C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH : CH<sub>3</sub>OH = 4 : 3 (v : v)

検出波長：210 nm

流速：1 ml / min

【0059】

<FTU変化率の測定方法>

実施例、比較例におけるFTU変化率は、エタノールと還元型補酵素Q10との混合液のホルマジン濁度(FTU)を濁度計で測定し、時点(T)のFTU変化率は、以下の式により算出した。また、本実施形態で使用した濁度計は、還元型補酵素Q10の結晶が混合液中に40000 mg / Lの濃度で存在する時の濁度(FTU)を9,999 FTUとして校正した。

FTU変化率<sub>T</sub> (FTU / min) = (濁度測定値<sub>T</sub> (FTU) - 濁度測定値<sub>T-20</sub> (FTU)) / 20 (min)

(上記式において、FTU変化率<sub>T</sub>は時点(T)におけるFTU変化率を意味し、濁度測定値<sub>T</sub> (FTU)は時点(T)におけるFTUの測定値を意味し、濁度測定値<sub>T-20</sub> (FTU)は時点Tの20分前におけるFTUの測定値を意味する。)

濁度計：後方散乱光式濁度センサ (InPro 8200、メトラー・トレド株式会社)

測定範囲：0 ~ 10,000 FTU

10

20

30

40

50

## 【0060】

F T Uの測定は、種晶の添加直後から、F T Uが測定上限である10,000に到達するまで行い、F T U変化率は、F T Uが1,000~10,000である期間算出した。ある時点TのF T U変化率は上記式で示したように、時点TのF T Uの、20分前の時点(T-20min)のF T Uからの増加量を算出し、20分で除すことにより求めた。

## 【0061】

## [実施例1]

容積3Lのセパラブルフラスコを窒素置換した後、還元型補酵素Q10を144gと純度99.5重量%以上エタノール1296gを入れ(還元型補酵素Q10濃度:10wt%)、攪拌翼により攪拌(攪拌所要動力0.03kw/m<sup>3</sup>)しながら50℃まで加温し均一な還元型補酵素Q10溶液(QH溶液)(1440g、1800ml)とした。

10

## 【0062】

50℃のQH溶液を、攪拌翼により攪拌(攪拌所要動力0.03kw/m<sup>3</sup>)しながら35.5℃まで冷却した。35.5℃まで冷却したQH溶液(F T U124)に、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を種晶として2.9g(2.0wt%)添加し、還元型補酵素Q10結晶の析出(晶析)を開始した。以下では、種晶を添加したQH溶液を「晶析混合液」と称する。

## 【0063】

種晶添加後は35.5℃で1時間保持した後、35.5℃から0.15℃/hrで33.5℃まで冷却した(一次冷却)。その後、25℃までは1℃/hrで冷却を行い、25℃から1℃までは10℃/hrで冷却した。

20

## 【0064】

晶析中は、晶析混合液のホルマジン濁度(F T U)を濁度計にて測定し、前記ホルマジン濁度(F T U)が1,000から10,000になるまでの期間の全期間における、F T U変化率の最大が22.2F T U/min、最小が3.1F T U/minであること、F T Uが1,000から10,000になるまでの期間の70%以上の時間において、F T U変化率が5~22.2F T U/minに維持されていることを確認した。

## 【0065】

1℃まで冷却後、得られたスラリーをろ過により固液分離を行い、得られた結晶を40℃で24時間減圧乾燥し、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を得た。

30

## 【0066】

得られた還元型補酵素Q10結晶におけるForm II型結晶比率は100%であり、Form I型の還元型補酵素Q10結晶は含まれていなかった。また、得られたForm II型の還元型補酵素Q10結晶の25℃RH60%1ヶ月における相対QH比は94.5%であり、25℃RH60%2ヶ月における相対QH比は91.5%であり、40℃RH75%1ヶ月における相対QH比は88.0%であった。

## 【0067】

## [実施例2]

実施例1と同様の方法でQH溶液を調製し、35.5℃まで冷却したQH溶液を得た。種晶添加後の晶析混合液の35.5℃での保持時間を5時間に変え、一次冷却を32.5℃まで0.3℃/hrで行った以外は実施例1と同様の方法でForm II型の還元型補酵素Q10結晶を得た。

40

## 【0068】

晶析中は、晶析混合液のホルマジン濁度(F T U)を濁度計にて測定し、前記ホルマジン濁度(F T U)が1,000から10,000になるまでの期間の全期間における、F T U変化率の最大が19.3F T U/min、最小が2.8F T U/minであること、F T Uが1,000から10,000になるまでの期間の70%以上の時間において、F T U変化率が5~19.3F T U/minに維持されていることを確認した。

## 【0069】

得られた還元型補酵素Q10結晶におけるForm II型結晶比率は100%であり、

50

Form I型の還元型補酵素Q10結晶は含まれていなかった。また、得られたForm II型の還元型補酵素Q10結晶の25 RH60%1ヶ月における相対QH比は95.4%であり、25 RH60%2ヶ月における相対QH比は92.3%であり、40 RH75%1ヶ月における相対QH比は90.4%であった。

【0070】

[実施例3]

実施例1と同様の方法でQH溶液を調製し、36.0まで冷却したQH溶液(FTU68)を得た。種晶添加温度を36.0に変え、添加後の保持をせず、一次冷却を33.5まで0.15/hrで行った以外は実施例1と同様の方法でForm II型の還元型補酵素Q10結晶を得た。

10

【0071】

晶析中は、晶析混合液のホルマジン濁度(FTU)を濁度計にて測定し、前記ホルマジン濁度(FTU)が1,000から10,000になるまでの期間の全期間における、FTU変化率の最大が21.2FTU/min、最小が5.3FTU/minであることを確認した。

【0072】

得られた還元型補酵素Q10結晶におけるForm I型結晶比率は100%であり、Form I型の還元型補酵素Q10結晶は含まれていなかった。また、得られたForm II型の還元型補酵素Q10結晶の25 RH60%1ヶ月における相対QH比は95.0%であり、25 RH60%2ヶ月における相対QH比は92.1%であり、40 RH75%1ヶ月における相対QH比は91.0%であった。

20

【0073】

[実施例4]

実施例1と同様の方法でQH溶液を調製し、36.0まで冷却したQH溶液(FTU118)を得た。種晶添加温度を36.0に変え、一次冷却を32.0まで0.3/hrで行った以外は実施例1と同様の方法でForm II型の還元型補酵素Q10結晶を得た。

【0074】

晶析中は、晶析混合液のホルマジン濁度(FTU)を濁度計にて測定し、前記ホルマジン濁度(FTU)が1,000から10,000になるまでの期間の全期間における、FTU変化率の最大が20.3FTU/min、最小が0.6FTU/minであること、FTUが1,000から10,000になるまでの期間の70%以上の時間において、FTU変化率が5.3~20.3FTU/minに維持されていることを確認した。

30

【0075】

得られた還元型補酵素Q10結晶におけるForm II型結晶比率は100%であり、Form I型の還元型補酵素Q10結晶は含まれていなかった。また、得られたForm II型の還元型補酵素Q10結晶の25 RH60%1ヶ月における相対QH比は93.6%であり、25 RH60%2ヶ月における相対QH比は90.9%であり、40 RH75%1ヶ月における相対QH比は90.6%であった。

【0076】

[実施例5]

実施例1と同様の方法でQH溶液を調製し、35.0まで冷却したQH溶液(FTU74)を得た。種晶添加温度を35.0に変え、添加後の保持をせず、一次冷却を30.5まで0.3/hrで行った以外は実施例1と同様の方法でForm II型の還元型補酵素Q10結晶を得た。

40

【0077】

晶析中は、晶析混合液のホルマジン濁度(FTU)を濁度計にて測定し、前記ホルマジン濁度(FTU)が1,000から10,000になるまでの期間の全期間における、FTU変化率の最大が31.5FTU/min、最小が2.2FTU/minであること、FTUが1,000から10,000になるまでの期間の70%以上の時間において、F

50

TU変化率が5.3~31.5 FTU/minに維持されていること、FTUが1,000から10,000になるまでの期間の80%以上の時間において、FTU変化率が2.2~28.7 FTU/minに維持されていることを確認した。

【0078】

得られた還元型補酵素Q10結晶におけるForm II型結晶比率は100%であり、Form I型の還元型補酵素Q10結晶は含まれていなかった。また、得られたForm II型の還元型補酵素Q10結晶の25 RH60%1ヶ月における相対QH比は93.4%であり、25 RH60%2ヶ月における相対QH比は90.2%であり、40 RH75%1ヶ月における相対QH比は86.2%であった。

【0079】

[実施例6]

実施例1と同様の方法でQH溶液を調製し、36.0まで冷却した。36.0まで冷却したQH溶液(FTU187)に、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を種晶として添加(QH溶液中の還元型補酵素Q10を100wt%とした際に2.0wt%)し、還元型補酵素Q10結晶の析出(晶析)を開始した。

【0080】

種晶添加後の晶析混合液のホルマジン濁度(FTU)が1,000から10,000になるまでの期間のFTU変化率を20.8 FTU/minに維持することを目標とし、設定温度を制御した。晶析混合液のホルマジン濁度が10,000 FTUに達した後は、25まで1/hで冷却し、25から1まで10/hで冷却した。前記ホルマジン濁度(FTU)が1,000から10,000になるまでの期間の全期間における、FTU変化率の最大が41.2 FTU/min、最小が0.7 FTU/minであること、FTUが1,000から10,000になるまでの期間の70%以上の時間において、FTU変化率が7.2~33.4 FTU/minに維持されていること、FTUが1,000から10,000になるまでの期間の80%以上の時間において、FTU変化率が0.7~30 FTU/minに維持されていることを確認した。

【0081】

1まで冷却後、ろ過によって固液分離を行い、得られた結晶を40で24時間減圧乾燥し、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を得た。

【0082】

得られた還元型補酵素Q10結晶におけるForm II型結晶比率は100%であり、Form I型の還元型補酵素Q10結晶は含まれていなかった。また、得られたForm II型の還元型補酵素Q10結晶の25 RH60%1ヶ月における相対QH比は89.6%であり、40 RH75%1ヶ月における相対QH比は86.5%であった。

【0083】

[実施例7]

容積500 mLの四つ口フラスコを窒素置換した後、還元型補酵素Q10を28gと純度99.5重量%以上エタノール250gを入れ(還元型補酵素Q10濃度:10wt%)、攪拌翼により攪拌(攪拌所要動力0.007 kW/m<sup>3</sup>)しながら50まで加温し均一なQH溶液(278g、347ml)とした。

【0084】

50のQH溶液を、攪拌翼により攪拌(攪拌所要動力0.007 kW/m<sup>3</sup>)しながら36.8まで冷却した。36.8まで冷却したQH溶液に、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を種晶として0.6g(2.0wt%)添加し、還元型補酵素Q10結晶の析出(晶析)を開始した。

【0085】

種晶添加後の晶析混合液のホルマジン濁度(FTU)が1,000から10,000になるまでの期間のFTU変化率を6.9 FTU/min付近に維持することを目標とし設定温度を制御した。前記ホルマジン濁度が10,000 FTUに達した後は、25まで1/hで冷却し、25から1まで10/hで冷却した。前記ホルマジン濁度

10

20

30

40

50

(FTU)が1,000から10,000になるまでの期間の70%以上の時間において、FTU変化率が5~21FTU/minに維持されていること、FTUが1,000から10,000になるまでの期間の80%以上の時間において、FTU変化率が0.6~21FTU/minに維持されていることを確認した。

【0086】

1 まで冷却後、ろ過によって固液分離を行い、得られた結晶を40 まで24時間減圧乾燥し、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を得た。

【0087】

得られた還元型補酵素Q10結晶におけるForm II型結晶比率は100%であり、Form I型の還元型補酵素Q10結晶は含まれていなかった。また、得られたForm II型の還元型補酵素Q10結晶の25 RH60%1ヶ月における相対QH比は92.2%であり、40 RH75%1ヶ月における相対QH比は90.1%であった。

10

【0088】

[実施例8]

容積500mLの四つ口フラスコを窒素置換した後、還元型補酵素Q10を33gと99.5重量%以上エタノール295gを入れ(還元型補酵素Q10濃度:10wt%)、攪拌翼により攪拌(攪拌所要動力0.007kw/m<sup>3</sup>)しながら50 まで加温し均一なQH溶液(328g、410ml)とした。

【0089】

50 のQH溶液を、攪拌翼により攪拌(攪拌所要動力0.007kw/m<sup>3</sup>)しながら34.5 まで冷却した。34.5 まで冷却したQH溶液に、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を種晶として0.66g(2.0wt%)添加し、還元型補酵素Q10結晶の析出(晶析)を開始した。

20

【0090】

種晶添加後の晶析混合液のホルマジン濁度(FTU)が1,000から10,000になるまでの期間のFTU変化率を33.3FTU/min付近に維持することを目標とし、設定温度を制御した。前記ホルマジン濁度が10,000FTUに達した後は、25 まで1 /hrで冷却し、25 から1 まで10 /hrで冷却した。前記ホルマジン濁度(FTU)が1,000から10,000になるまでの期間の全期間における、FTU変化率の最大が43.3FTU/min、最小が15.0FTU/minであること、FTUが1,000から10,000になるまでの期間の70%以上の時間において、FTU変化率が15.0~39.9FTU/minに維持されていることを確認した。

30

【0091】

1 まで冷却後、ろ過によって固液分離を行い、得られた結晶を40 まで24時間減圧乾燥し、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を得た。

【0092】

得られた還元型補酵素Q10結晶におけるForm II型結晶比率は100%であり、Form I型の還元型補酵素Q10結晶は含まれていなかった。また、得られたForm II型の還元型補酵素Q10結晶の25 RH60%1ヶ月における相対QH比は89.4%であり、40 RH75%1ヶ月における相対QH比は87.3%であった。

40

【0093】

[比較例1]

容積500mLの四つ口フラスコを窒素置換した後、還元型補酵素Q10を33gと99.5重量%以上エタノール295gを入れ(還元型補酵素Q10濃度:10wt%)、攪拌翼により攪拌(攪拌所要動力0.007kw/m<sup>3</sup>)しながら50 まで加温し均一なQH溶液(328g、410ml)とした。

【0094】

50 のQH溶液を、攪拌翼により攪拌(攪拌所要動力0.007kw/m<sup>3</sup>)しながら36.8 まで冷却した。36.8 まで冷却したQH溶液に、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を種晶として0.66g(2.0wt%)添加し、還元型補酵素Q1

50

0 結晶の析出（晶析）を開始した。

【 0 0 9 5 】

種晶添加後の晶析混合液のホルマジン濁度（FTU）が1,000から10,000になるまでの期間のFTU変化率を55.6FTU/min付近に維持することを目標とし、設定温度を制御した。前記ホルマジン濁度が10,000FTUに達した後は、25まで1/hrで冷却し、25から1まで10/hrで冷却した。前記ホルマジン濁度（FTU）が1,000から10,000になるまでの期間の全期間における、FTU変化率の最大が108.7FTU/min、最小が30.6FTU/minであること、前記ホルマジン濁度（FTU）が1,000から10,000になるまでの期間の70%以上の時間、FTU変化率を45FTU/min以下に維持することができていなかったことを確認した。

10

【 0 0 9 6 】

1 まで冷却後、ろ過によって固液分離を行い、得られた結晶を40で24時間減圧乾燥し、Form II型の還元型補酵素Q10結晶を得た。

【 0 0 9 7 】

得られた還元型補酵素Q10結晶におけるForm II型結晶比率は100%未満であった。また、得られたForm II型の還元型補酵素Q10結晶の25RH60%1ヶ月における相対QH比は85.1%であり、40RH75%1ヶ月における相対QH比は81.4%であった。

20

【 0 0 9 8 】

実施例、比較例の結果を表1に示す。

【 0 0 9 9 】

【表1】

	相対QH比 (40°C, 1M) (%)	相対QH比 (25°C, 1M) (%)	相対QH比 (25°C, 2M) (%)	10,000FTU時の温度 (°C)
実施例 1	88.0	94.5	91.5	32.9
実施例 2	90.4	95.4	92.3	32.3
実施例 3	91.0	95.0	92.1	34.0
実施例 4	90.6	93.6	90.9	31.1
実施例 5	86.2	93.4	90.2	32.2
実施例 6	86.5	89.6		33.6
実施例 7	90.1	92.2		36.3
実施例 8	87.3	89.4		33.1
比較例 1	81.4	85.1		32.8

30

【 0 1 0 0 】

実施例で得られたForm II型の還元型補酵素Q10結晶の酸化安定性は、比較例の結果と比べて、非常に高いことが明らかとなった。このことから種晶の添加後の前記晶析混合液中でForm II型の還元型補酵素Q10結晶を析出させる際に、ホルマジン濁度（FTU）が1,000から10,000になるまでの期間の70%以上の時間、FTU変化率を特定の範囲に維持すると酸化安定性に優れたForm II型の還元型補酵素Q10結晶を取得することができることが分かる。また、Form I型の還元型補酵素Q10結晶は含まれていないことから、実施例の方法は、安定型の結晶形であるForm II型の還元型補酵素Q10結晶又はその結晶性固体を得るための効率的な製造方法であるといえる。

40

【 0 1 0 1 】

50

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

【0102】

本明細書中に記載した数値範囲の上限値及び/又は下限値は、それぞれ任意に組み合わせて好ましい範囲を規定することができる。例えば、数値範囲の上限値及び下限値を任意に組み合わせて好ましい範囲を規定することができ、数値範囲の上限値同士を任意に組み合わせて好ましい範囲を規定することができ、また、数値範囲の下限値同士を任意に組み合わせて好ましい範囲を規定することができる。

【0103】

本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。したがって、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」等）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。

10

【0104】

以上、本実施形態を詳述したが、具体的な構成はこの実施形態に限定されるものではなく、本開示の要旨を逸脱しない範囲における設計変更があっても、それらは本開示に含まれるものである。

20

30

40

50

---

フロントページの続き

審査官 宮崎 大輔

- (56)参考文献 国際公開第2020/045571(WO, A1)  
国際公開第2020/067275(WO, A1)  
国際公開第2012/176842(WO, A1)  
国際公開第2021/161807(WO, A1)  
Chemical Engineering Science, 2000年, 55, p.3759-3770, 10.1016/S0009-2509(00)0045-2
- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)  
C 0 7 C