

高吸着容量型イオン交換カラムTSK・GEL BioAssistシリーズの開発

科学計測事業部 ゲル製造部 セパレーションセンター

村中 和昭
津田 輝彦
企画開発室 森山 弘之

1. はじめに

近年、バイオテクノロジーの発展に伴い、タンパク質、核酸など生体構成物質の分析、分取には種々の方法が提案されております。その中でも液体クロマトグラフィーを用いた分析、分取手法は古くから行われている手法ではありますが、対象化合物の広さ、自動化の容易さ、操作の容易さ、そして実用的な感度と迅速性などの面において、液体クロマトグラフィーに変わる分析、分取手法は提案されておらず、今後も発展していくものと考えられます。

当社ではバイオテクノロジーに用いられる液体クロマトグラフィー装置及び充填カラムの開発を行ってきました。近年ハイスループット、高分離能に対する要求が高まり、高い試料吸着容量及び高分離能を有するカラム充填剤の発展に着手し、昨年度アニオン及びカチオン交換型のイオン交換カラムTSKgel BioAssist Q及びTSKgel BioAssist Sを上市いたしました。本報告では充填剤の基本構造及び特性について紹介します。

2. TSK・GEL BioAssistシリーズの概要

2.1 基材合成技術

BioAssistカラム充填剤は、親水性多孔質ポリマー微粒子を基材として用いております。当社は同種の充填剤を懸濁重合法によりPWシリーズやトヨパールと

して生産しております。これまでの製造法では、粒子径の小さい微粒子を製造する際に、粒子径分布をシャープなものとするため分級工程を必要とし、最終的な収率が20～30%程度となってしまう問題点を有しておりました。

BioAssistシリーズでは、用いる基材の製造方法として粒子径のそろった微粒子が作成可能であるシード重合法を採用しました。これによりFig. 1に示したように、収率ほぼ100%で目的粒子径の微粒子を製造可能となり、また従来ロット間差を引き起こす原因であった、粒子径分布が非常に狭い粒子を作成可能となりました。

2.2 イオン交換基構造

カラム充填剤性能を示す指標として、保持力及び吸着容量を上げることができます。これらの指標は充填剤が有するリガンド構造に依存している項目であります。BioAssistシリーズの開発においては高い吸着容量を目標としました。充填剤の粒子径が同一であり且つ充填剤が有する細孔径が測定試料に対し十分に大きい場合、吸着容量は充填剤の表面積に比例します。充填剤の表面積を増やすためには、充填剤が有する細孔容積を大きくすること及び細孔径を小さくすることが有効であります。しかし細孔容積を大きくすると充填剤の機械的強度が減少し、また細孔径を小さくすると、測定試料が細孔内部に侵入できなくなることにより、逆に吸着容量が低下します。この様なことから、吸着

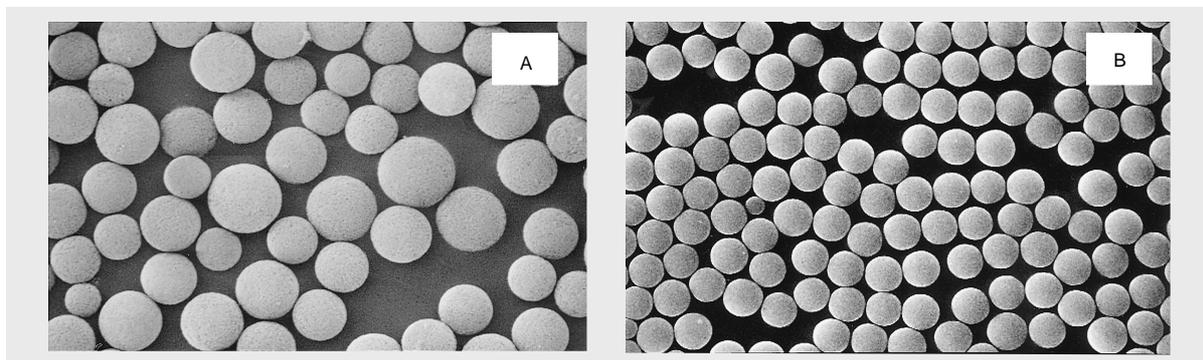


Fig. 1 SEM picture of TSKgel G5000PWXL (A) and TSKgel BioAssist (B)

Table 1 Characteristics of TSK-GEL BioAssist series

	TSKgel BioAssist Q	TSKgel BioAssist S
Base matrix	Polyacrylate	Polyacrylate
Diameter (μm)	10	7
Pore size (\AA)	4000	1300
Ion Exchange capacity (eq/L-gel)	0.1	0.1
Ion site	Polyamine	Sulfopropyl
Column Size	4.6mm I.D. x 5cm	4.6mm I.D. x 5cm

容量には実質的な上限が存在しました。この問題を解決する方法として、充填剤表面にリガンドを有するポリマーをグラフトし、試料を充填剤表面に多層的に保持させる手法が提案されています。しかしこの手法では充填剤表面のグラフトポリマー鎖が送液抵抗を発生させるため、充填剤機械的強度の制約から充填剤を小さくすることができず、高性能化の要件の一つである高分離能を両立できませんでした。BioAssistシリーズでは充填剤表面のグラフトポリマー鎖を緩く架橋させることにより、高吸着容量、低操作圧および高分離能を両立させました。

また、アニオン交換型で対象となるタンパク質はカチオン交換型で対象となるタンパク質よりも種類が多く、また分子量が500kDa以上の大きなタンパク質が対象となる場合も多々あります。このためアニオン交換型であるBioAssist Qに用いた充填剤は、従来当社が有していたアニオン交換型充填剤よりも、細孔径を大きく設定し、幅広い分子量のタンパク質に対して高い吸着容量を維持するように設計を行いました。Table 1にカチオン交換型カラム充填剤BioAssist S及びアニオン交換型BioAssist Qの基本的物性を示します。

2.3 動的吸着容量比較

カラム充填剤の吸着容量をカラムに直接タンパク質溶液を送液し、漏れだした時点から充填剤が吸着した吸着容量を算出する“動的吸着容量”により、当社従来カラム及び競合他社品との比較を行いました。測定は低分子量から高分子量の種々のタンパク質を用い、試料分子量が与える影響も比較いたしました。結果をFig. 2に示します。一般的な構造のイオン交換カラムである他社競合品よりもBioAssist Qは広い分子量範囲にわたって2倍程度の吸着容量を示します。また当社従来品の高吸着容量型イオン交換カラムSuperQ-5PWと比較しても低分子量側でほぼ同一、高分子量側においてSuperQ-5PWは吸着容量が極端に低下しますが、BioAssist Qはその低下がほとんど見られません。

2.4 選択性、保持力比較

同一測定条件下で当社従来カラム及び競合品との分離比較を行った図がFig. 3です。BioAssist Qは従来型イオン交換体と比較し1.5~2.0倍の保持力を有し、BioAssist Sも従来品の1.2~1.5倍の保持力を示しています。また従来品以上のピーク形状を有しており、測定条件を変更し同一分析時間で比較した場合でも従来品以上の分離能を示します。

2.5 回収率

カラムにタンパク質溶液を注入し、溶出した試料のUV吸収によるピーク面積から回収率を算出する方法により種々のタンパク質に対する回収率を算出しました。その結果BioAssistシリーズは低注入量域での回収率に優れたカラムであることがわかりました。代表的な例として、 α -グロブリンを試料として、微量注入域での回収率を競合品と比較した結果をFig. 4に示します。BioAssistシリーズは、タンパク質に対して特異的吸着の少ない充填剤であることがわかります。

2.6 応用

マウス腹水中のモノクローナル抗体の精製にBioAssist Qカラムを用い検討を行いました。競合他社品との比較クロマトをFig. 5に示します。競合品ではモノクローナル抗体とマウス腹水中に大量に存在するアルブミンの分離が不十分であります。

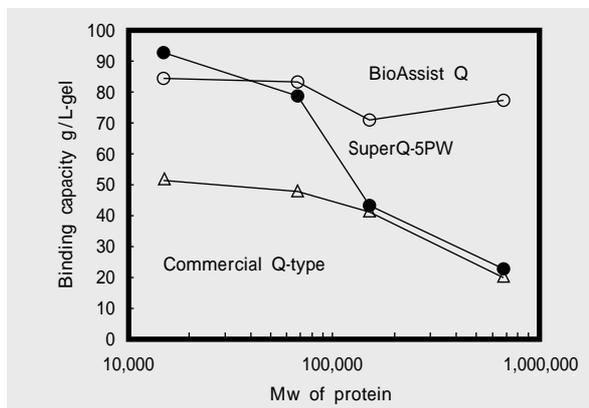


Fig. 2 Effect of molecular weight of protein on binding capacity

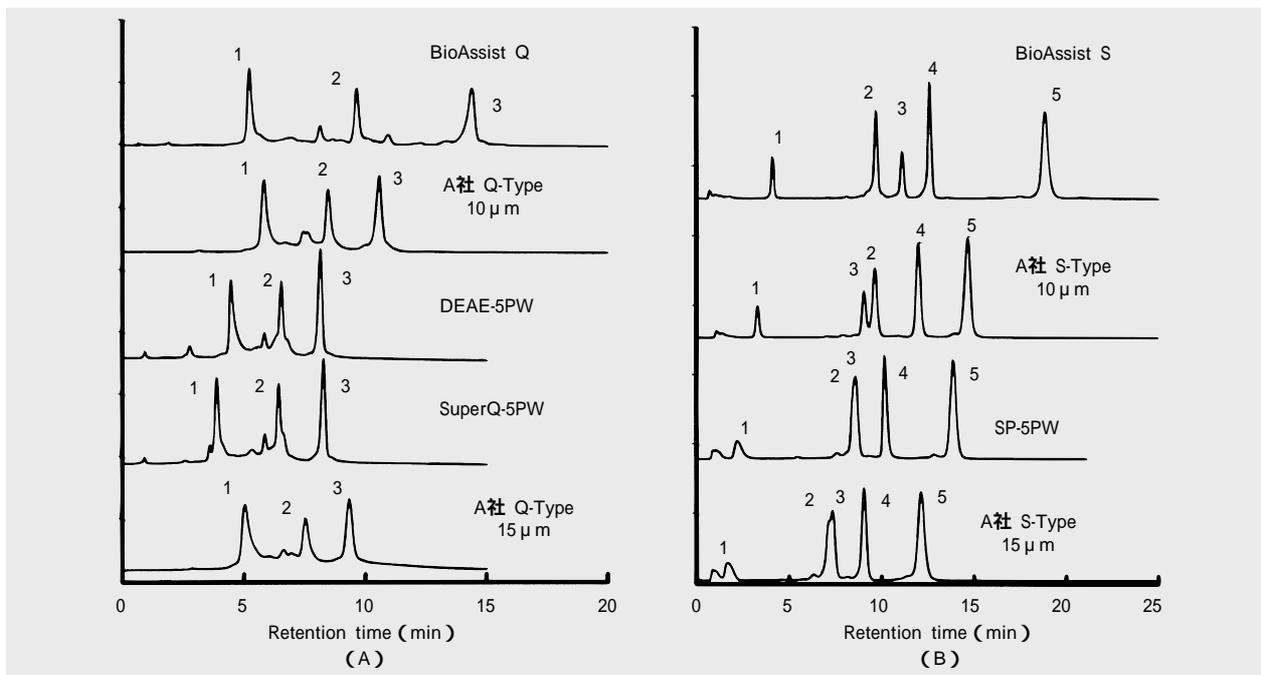


Fig. 3 Comparison Chromatograms of anion-exchange columns (A) and cation-exchange columns (B).
 Sample : anion-exchange Conalbumin (1), Ovalbumin (2), Trypsin inhibitor (3), Cation-exchange Myoglobin (1), alpha-Chymotrypsinogen A(2), RNase A(3), Cytochrome C(4), Lysozyme (5)

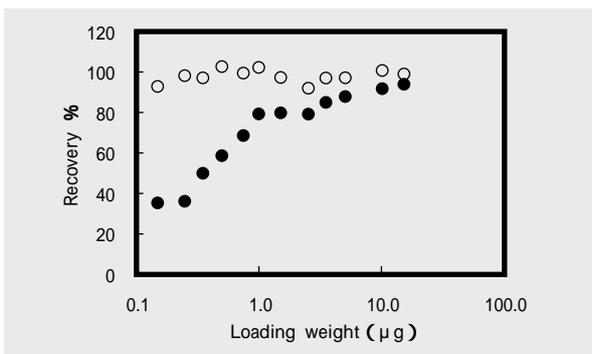


Fig. 4 Comparison of recovery rate. Sample :
 -Globulin BioAssist S, commercial column

BioAssist Qではアルブミンとの分離も良好でFig. 6のSDS-PAGEによる分析結果からも分かるように単一ステップで高度な精製が可能であることが分かります。

3. おわりに

タンパク質、核酸類の分析、分取に用いられるイオン交換カラムとして開発しましたBioAssistシリーズは、高吸着容量、高保持力、高分離能、高回収率を有するカラムであり、生化学分野での精密分析、精密分取に有用なカラムであります。

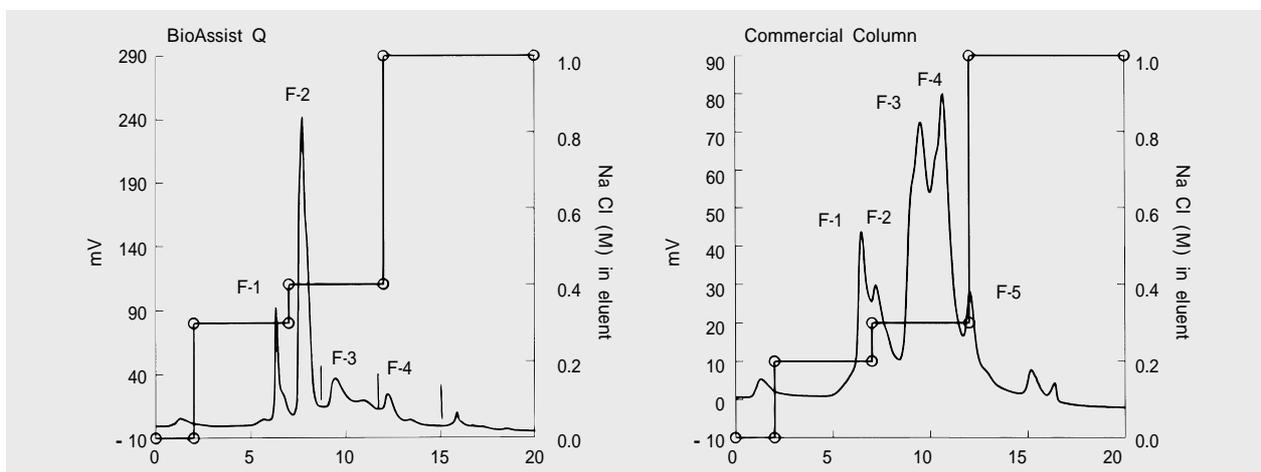


Fig. 5 Comparison chromatograms of mouse asities on BioAssist Q and Commercial column

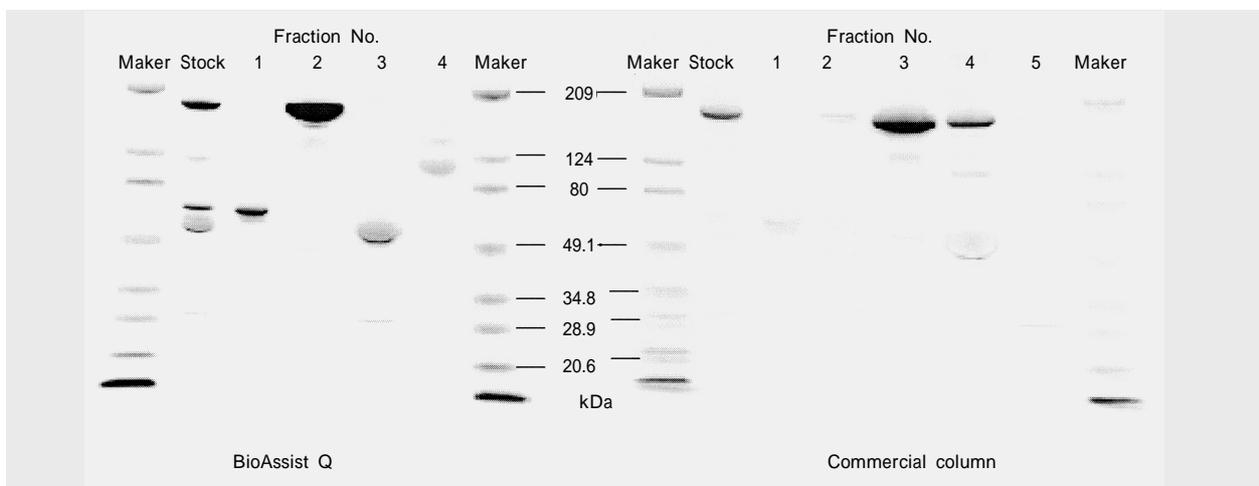


Fig. 6 SDS-PAGE

