

新規非多孔性イオン交換カラム TSK・GEL STAT シリーズの特性とその応用

バイオサイエンス事業部 セパレーションメディア製造部 セパレーションセンター 村中 和昭
岩枝 俊直
東研 バイオサイエンス事業部 技術部 遺伝子G 中西 睦
バイオサイエンス事業部 セパレーションメディア製造部 セパレーションセンター 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いる。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あるが、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る。

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、および充填カラムの開発を行ってきたが、近年ハイスループット分析、高分離能分析に対する要求が高まり、高い試料吸着容量、および高分離能を有するカラム充填剤の開発に着手し、アニオン、およびカチオン交換型のイオン交換カラムであるSTATシリーズを上市した。本報告ではSTATシリーズの特性とその応用について紹介する。

2. TSK・GEL STATシリーズの特徴

STATシリーズには、表1に示すように高速分析用カラム、高分離分析用カラム、およびDNA等の核酸分析に適したカラムを揃え、分析時間1分以内の高速

分析から、分析時間に数十分を要するタンパク質の電荷異性体の分離まで、幅広く対応可能なカラムシリーズとなっている。また充填剤基材の改良を行うことで、当社従来非多孔性型充填剤では分析困難であった低分子量試料の分析にも対応可能なカラムである。またカラムサイズ、および充填剤粒子径は、生体試料分析に用いられる装置の耐圧性を考慮し、さらに低温で使用される可能性も合わせ、一般的な測定流速において10MPaを越えない様に設計されている。核酸分析用カラムについては、タンパク質分析とは用いられる装置や測定条件（温度）が異なることから、分離を優先したカラム設計となっている。

当社はすでに高分離分析に適した非多孔性充填剤カラムとしてTSK・GEL NPRシリーズを有している。NPRシリーズは発売当時、飛躍的に高い分離性能を短時間で得られるカラムであったが、粒子径が小さい（2.5 μ m）ため操作圧が高くなりやすく、また低分子量試料溶出パターンが広がりやすい欠点を有していた。STATシリーズでは充填剤基材製法を見直し、また新規表面修飾法を採用することにより、充填剤粒子径がNPRシリーズより大きいにもかかわらず、高い分離性能を維持し、かつ、NPRシリーズでは困難であった低分子量試料分析にも対応するカラムとなっている。

一般的に非多孔性充填剤は、多孔性粒子の様に粒子細孔が実質的に存在しないため、試料の粒子内拡散が

表1 TSK・GEL STATシリーズ仕様

| | TSKgel Q-STAT | | TSKgel DNA-STAT | |
|--------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| カラムサイズ | 3.0mmI.D. × 3.5cm | 4.6mmI.D. × 10cm | 4.6mmI.D. × 10cm | |
| 充填剤基材 | 親水性ビニルポリマー | | 親水性ビニルポリマー | |
| 粒子径 | 10 μ m | 7 μ m | 5 μ m | |
| イオン交換基 | 四級アミン | | 四級アミン | |
| | TSKgel SP-STAT | | TSKgel CM-STAT | |
| カラムサイズ | 3.0mmI.D. × 3.5cm | 4.6mmI.D. × 10cm | 3.0mmI.D. × 3.5cm | 4.6mmI.D. × 10cm |
| 充填剤基材 | 親水性ビニルポリマー | | 親水性ビニルポリマー | |
| 粒子径 | 10 μ m | 7 μ m | 10 μ m | 7 μ m |
| イオン交換基 | スルフォプロピル | | カルボキシメチル | |

無いことから、高い分離能を示すことが知られている。しかし、多孔質充填剤と比較して充填剤表面積が極端に小さくなるために、試料吸着容量が大きく低下することが知られている。試料吸着容量が低いと、大過剰の主成分中の微量不純物の分析などにおいて、微量成分の検出感度不足や、分離性能の低下などの問題も引き起こす可能性がある。STATシリーズでは、充填剤の表面修飾法の改良により、NPRシリーズと比較して、粒子径が大きく表面積がさらに小さくなるにもかかわらず、飛躍的に高い試料吸着容量を示す充填剤とした(図1)。STATシリーズの吸着容量は、7 μm の高分離分析用カラムにおいて多孔質基材の1/3程度の吸着容量(体積当たり)を有していることから、マイクロ分取にも十分に使用することが可能である。

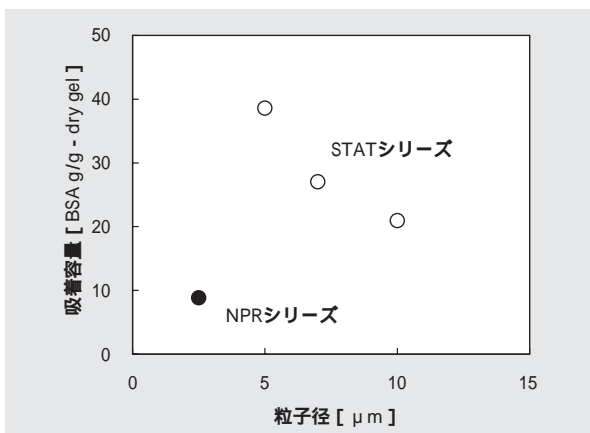


図1 アンイオン交換型充填剤STATシリーズとNPRシリーズのタンパク質吸着容量

3. TSK-GEL STATシリーズの基本特性

3.1 操作圧

TSK-GEL STATシリーズ粒子径7 μm 、カラムサイズ内径4.6mm × 長さ10cmの分析カラムにおける、カラム温度と操作圧の関係を図2に示した。

STATシリーズは使用上限操作圧を10MPaとしており、室温においては1.5mL/min程度の流速で使用可能である。また熱によるタンパク質の変性を回避するため、低温で測定されるケースもあるが、STATシリーズでは低温においても1.0mL/minでの使用が可能であり、低温での分析でも、スループットの低下を極力抑えたカラム仕様となっている。

3.2 流速依存性

TSK-GEL STATシリーズは非多孔質充填剤であるため、多孔質粒子で観測される粒子内部での試料拡散

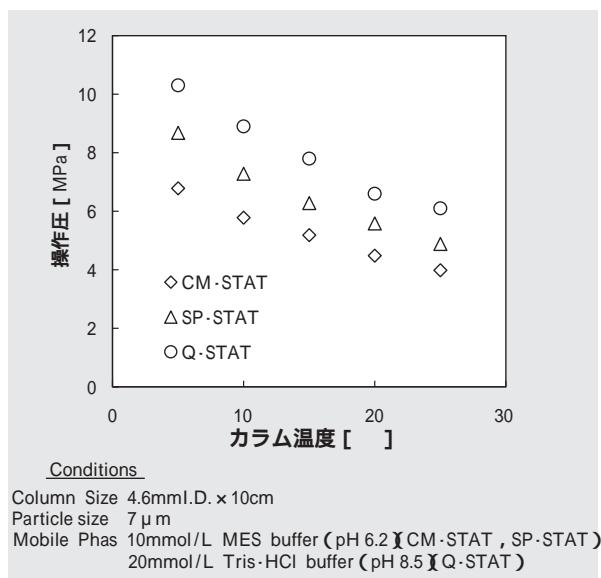


図2 TSK-GEL STATシリーズのカラム温度と操作圧

速度の影響が存在しないことから、測定流速に対するカラム性能の変化が小さいことが特徴である。図3ではTSKgel Q-STATを用い、カラム効率と測定流速の影響を多孔質充填剤と比較した図であり、測定流速を早くしても、カラム性能の低下が小さいことがわかる。

3.3 試料負荷量依存性

非多孔質充填剤は多孔質粒子と比較し、著しく表面積が小さいため、試料吸着容量が小さくなる欠点を有している。当社従来型非多孔質充填剤であるNPRシリーズは粒子径2.5 μm と小さいため、多孔質充填剤で一般的である10 μm 充填剤より、粒子径効果により粒

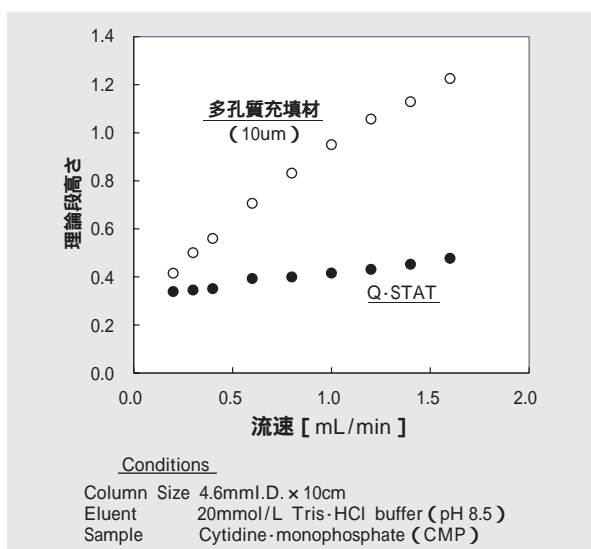


図3 多孔質充填剤とSTATシリーズにおける流速と理論段高さの関係

子外表面積が16倍大きい、細孔が実質的に存在しないため、吸着容量は一般的な10 μ m多孔性粒子と比較し1/10程度となっている。TSK-GEL STATシリーズは充填剤粒子径としてNPRシリーズより大きい粒子設定となっており、NPRよりも粒子外表面積が小さくなるため吸着容量ではより不利となるが、充填剤の表面修飾法を改良することにより、高い試料吸着容量を示す充填剤とした。図4は、同一サイズカラムに充てんしたTSK-GEL STATシリーズ各粒子径充てん剤とNPRシリーズの試料負荷量依存性を比較した。NPRカラムに比べ試料負荷依存性に優れることがわかる。

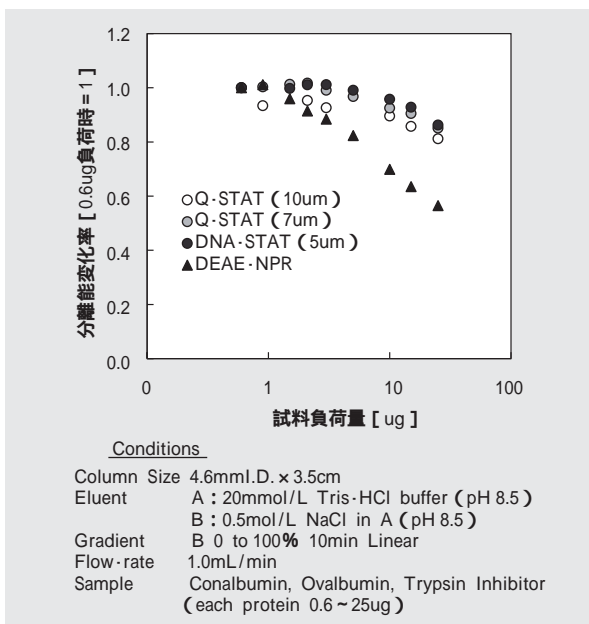


図4 分離能の試料負荷量依存性 (Conalbumin-Ovalbumin)

3.4 分離性能

分離性能は、一般的に充填剤の粒子径と関連し、粒子径が小さいほど分離性能は高くなることが知られている。STATシリーズは、NPRシリーズの有する操作圧が高くなる点、また試料中の微細不溶物などにより詰まり易いなどの欠点を解決するため、粒子径設定を2~4倍に大きくした。このため一般的には粒子径2.5 μ mの非多孔性充填剤を用いたNPRシリーズと比較すると分離性能が1.5~2倍悪化する。同じサイズのカラムを用いてタンパク質の分離を比較した図5では充てん剤の製法、および表面修飾法を見直して開発されたSTATカラムは分離性能の低下がほとんど見られていないことがわかる。

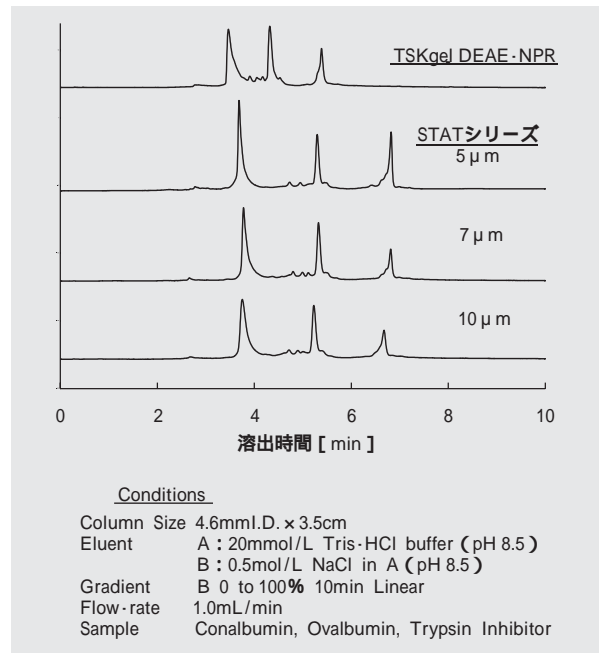


図5 アニオン交換カラムによる各粒子径充てん剤の分離比較

4. TSK-GEL STATシリーズの応用例

4.1 Q-STAT

Q-STATカラムによるヌクレオチド分離クロマトグラムを図6に示す。アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T) およびウラシル (U) の各リン酸エステルがすべて分離している。またデオキシ体を分離することも可能である (図7)。

図8には、タンパク質消化物の標準品として市販されているBSA Digestの分離比較を示す。STATシリー

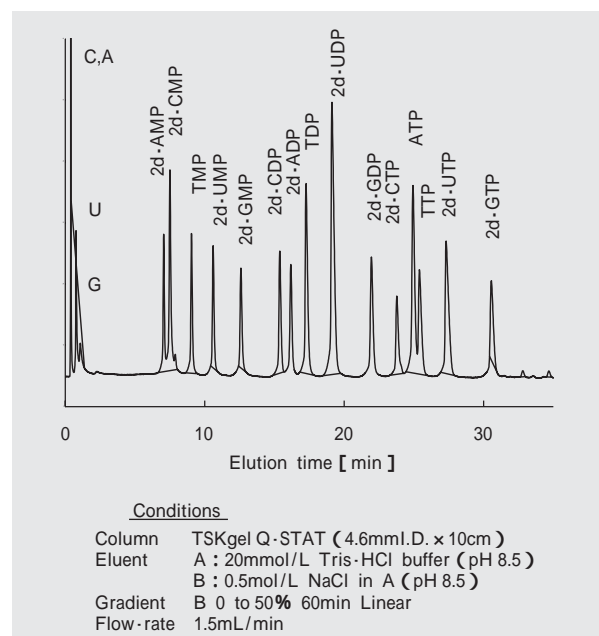


図6 TSKgel Q-STATカラムによるヌクレオチドの一斉分析

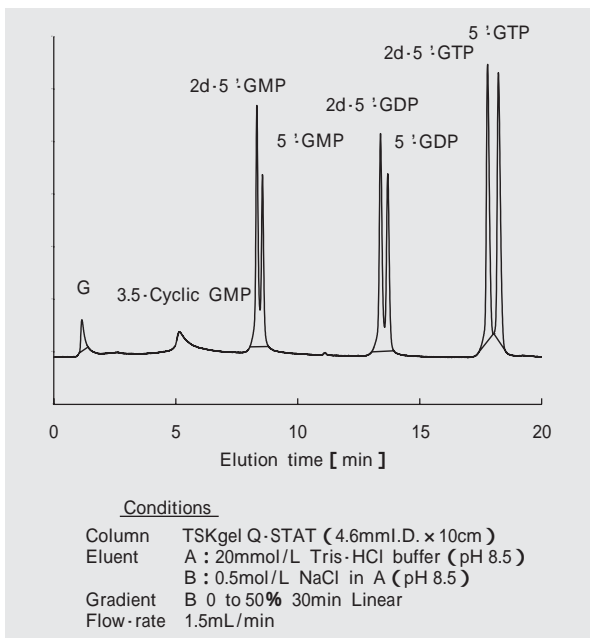


図7 TSKgel Q-STATカラムによるグアニジンヌクレオチド類の一斉分析

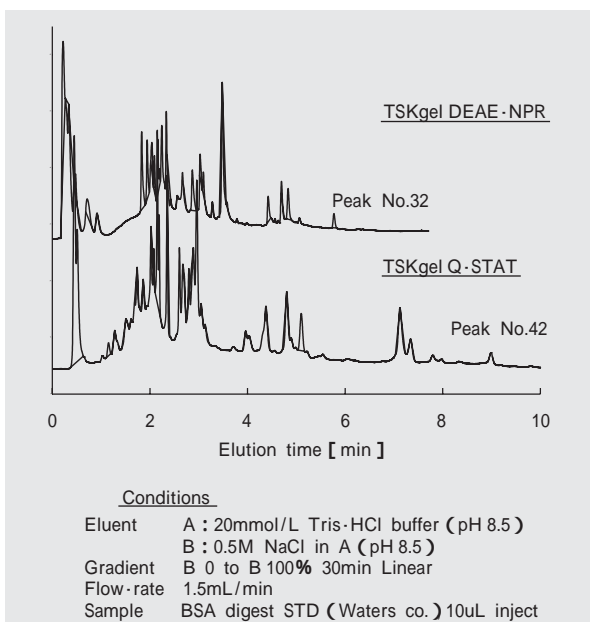


図8 BSA消化物によるアニオン交換カラムの分離比較

ズは、NPRシリーズより保持力が強いいため素通り成分が少なく、確認できるピーク数が大幅に増加している。

4.2 DNA-STAT

核酸は一般的に分子量差を利用した電気泳動法により分離、分析されている。この際用いられる分子量マーカー（ここでは1kb DNA Ladder）をアニオン交換クロマトグラフィーにより分離を行った（図9）。アニオン交換クロマトグラフィーにおいても、基本的に

は分子量が多いほど（リン酸基が多いほど）保持力が強くなり、遅く溶出されるが、核酸の配列の影響も大きく影響する。STATシリーズでは、NPRシリーズで困難であった、後半に溶出される高分子量域での分離が改善されており、電気泳動法により確認されるバンドのすべてが分離されている。

STATシリーズは、ヌクレオシドの溶出パターンが良好であり、吸着容量も大きいことからPCR産物の分取にも有効なカラムである。PCRには原材料として数種のヌクレオシドが用いられるが、これら原材料と生成物の分離を短時間に行うことが可能である（図10）。

4.3 SP-STAT/CM-STAT

抗体は近年医薬品に用いられる様になっており、その品質管理法の一つとして当社SW系カラムを用いたゲルろ過分析と共に、電荷異性体の管理も行われている。電荷異性体の分離分析には、カチオン交換カラムを用いたクロマトグラフィーによる分析用いられている。図11に抗体の電荷異性体を分離したクロマトグラムを示す。STATシリーズでは、試料の有するわずかな電荷の違いにより分離することが可能である。

また、タンパク質医薬品の生体内での残存期間を長くするために、タンパク質にポリエチレングリコール（PEG）を結合した医薬品が近年実際に市販されるようになってきている。タンパク質にPEGを導入する反応では、タンパク質にはPEG化試薬が結合できるサイトが多く存在するために、PEG化導入量や結合サイトの異なる種々の異性体が同時に出来てしまう。図12、

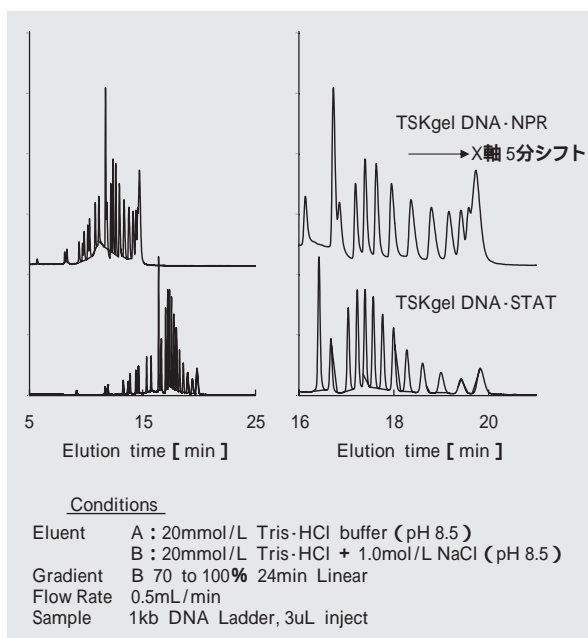


図9 DNA Ladderによるアニオン交換カラムの分離比較

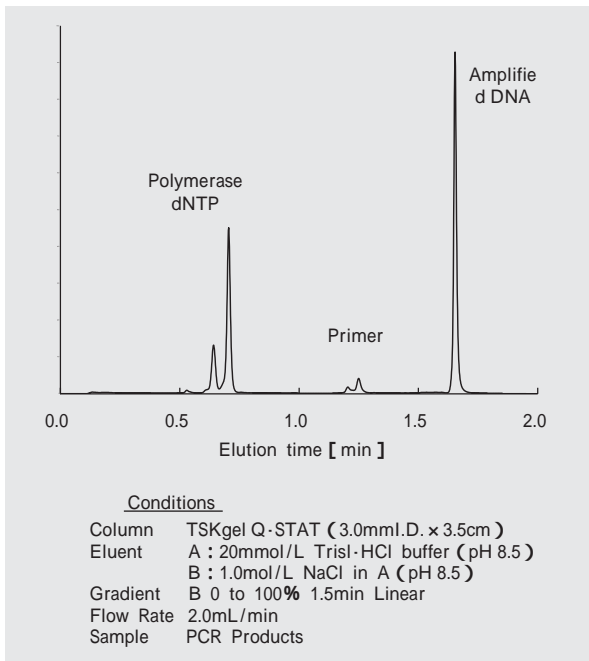


図10 Q-STATハイムループットカラムによるPCR生成物の迅速分離

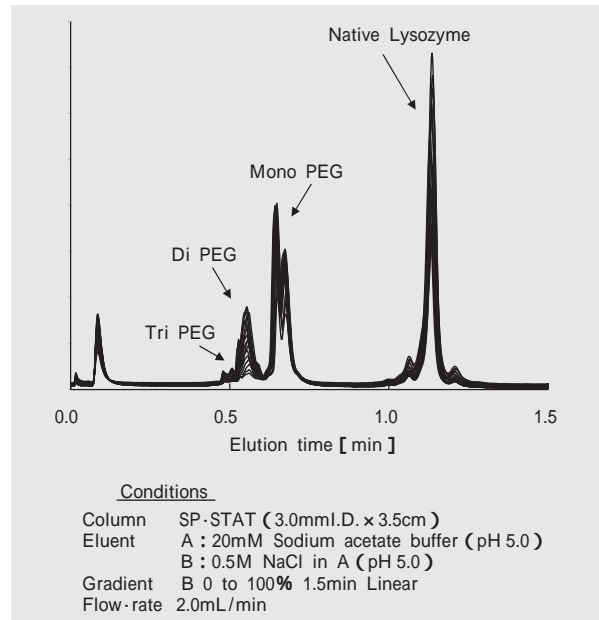


図12 ハイムループットカチオン交換STATシリーズカラムによる、タンパク質PEG化反応の追跡クロマトグラム

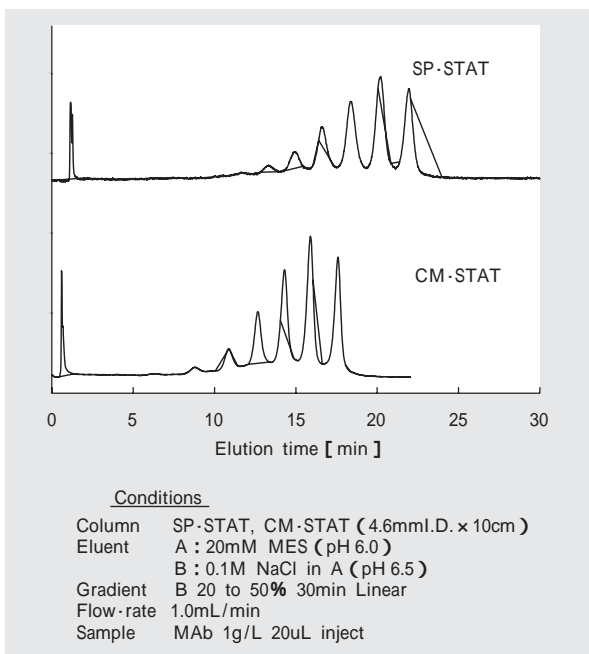


図11 カチオン交換STATシリーズカラムによる、モノクローナル抗体の精密分析

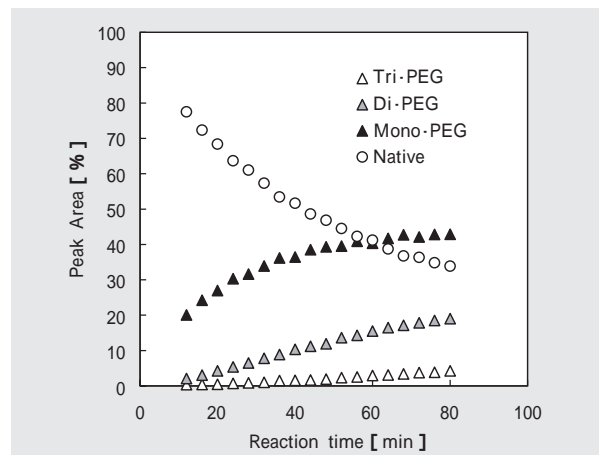


図13 ハイムループットカチオン交換STATシリーズカラムによる、タンパク質PEG化反応の追跡例

および図13に、タンパク質のPEG化反応をハイムループット分析カラムで追跡したクロマトグラムと反応割合をそれぞれ示した。最短では2分間隔での分析も可能であり、PEG化の様な速度の速い反応をクロマトグラフィーにより追跡することも可能である。

5. おわりに

今回、われわれの開発したイオン交換カラムSTATシリーズは、充てん基材および表面修飾法の改良により低分子量試料からタンパク質、核酸等の高分子量試料まで幅広く対応可能であることを確認した。STATシリーズは非多孔性充てん剤であるため、分離能に優れ且つ、表面修飾法の改良により吸着容量が改善され、マイクロ分取にも対応可能となった。さらに用途に適した粒子径設定を行ったことで、操作圧においても汎用性のあるカラムであることから、今後の応用範囲の拡大が期待される。