

## 高性能 SEC カラム TSKgel<sup>®</sup> UP-SW3000 について

### —— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel UP-SW3000 の基本特性	1
2 - 1. 充填剤の特性	1
2 - 2. 較正曲線と分離特性	1
2 - 3. 溶離液塩濃度のたんぱく質溶出挙動への影響	3
2 - 4. 測定流速の影響	5
2 - 5. 試料負荷量及び試料注入量の影響	7
2 - 6. カラム外（配管）での拡がりの影響	8
2 - 7. カラムの耐久性	10
2 - 8. 充填剤のロット間差	11
2 - 9. TSKgel G3000SWxL との比較	12
2 - 10. 市販 UHPLC 用 SEC カラムとの比較	13
3. 応用例	15
3 - 1. 抗体医薬品の精密分析	15
3 - 2. 抗体パパイソ消化物の分離例	16
4. おわりに	16

## 1. はじめに

抗体医薬品に用いられるモノクローナル抗体は、製造・保存、或いは輸送時に生じる二量体を含めた凝集体が副作用を引き起こす場合があることから、品質管理において、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)での分離分析が行われています。既存カラムのTSKgel G3000SW<sub>XL</sub>は本目的に多用されておりますが、より高い分離能と短時間SEC分析が求められています。今回、粒子径2 μmの高性能SECカラムTSKgel UP-SW3000を商品化いたしました。本稿では、TSKgel UP-SW3000の基本特性と分離例を紹介いたします。

## 2. TSKgel UP-SW3000の基本特性

### 2-1. 充填剤の特性

表1にTSKgel UP-SW3000の充填剤の特性・カラム仕様及び抗体の分離に用いられている既存SWタイプのカラムとの比較を示します。TSKgel UP-SW3000は、細孔径25 nmのシリカゲル表面にジオール基を導入した粒子径2 μmの充填剤を充填したカラムです。既存のSWタイプのカラムに比べ高い分離性能を示し、抗体の二量体と単量体の分離に適しています。

表1：充填剤の特性・カラムの仕様

	本カラム		既存カラム		
	TSKgel UP-SW3000		TSKgel UltraSW Aggregate	TSKgel SuperSW mAb HR	TSKgel G3000SW <sub>XL</sub>
カラムサイズ	4.6 mm I.D. × 30 cm	4.6 mm I.D. × 15 cm	7.8 mm I.D. × 30 cm	7.8 mm I.D. × 30 cm	7.8 mm I.D. × 30 cm
基材	シリカゲル		シリカゲル	シリカゲル	シリカゲル
官能基	ジオール		ジオール	ジオール	ジオール
粒子径	2 μm		3 μm	4 μm	5 μm
細孔径	25 nm		30 nm	25 nm	25 nm
排除限界分子量	800 kDa		2,500 kDa (推定)	800 kDa	800 kDa
分子量測定範囲	10 ~ 500 kDa		10 ~ 2,000 kDa	10 ~ 500 kDa	10 - 500 kDa
用途	抗体（二量体/単量体/フラグメント）の高分離分析	抗体（二量体/単量体）の高速分析	抗体（凝集体）の高分離分析	抗体（二量体/単量体）の高分離分析	一般的なたんぱく質、抗体（二量体/単量体）の高分離分析

### 2-2. 較正曲線と分離特性

TSKgel UP-SW3000、TSKgel SuperSW3000 (4 μm) 及び TSKgel G3000SW<sub>XL</sub> (5 μm) の標準たんぱく質を測定したクロマトグラムの比較を図1に、標準たんぱく質による較正曲線の比較を図2に示します。同じ細孔特性を有するTSKgel UP-SW3000、TSKgel SuperSW3000 及び TSKgel G3000SW<sub>XL</sub> は、チログロブリンの二量体以上が細孔内に浸透できずに排除されV<sub>0</sub>に溶出し(図1)、較正曲線は同等の傾きを有していません(図2)。また、表2にリボヌクレアーゼAを試料と

した理論段数を示します。粒子径の小さいTSKgel UP-SW3000は、他のカラムに比べ理論段数が高いことがわかります。

図3にTSKgel UP-SW3000、TSKgel SuperSW3000、及び TSKgel G3000SW<sub>XL</sub> で分離したモノクローナル抗体のクロマトグラムの比較を、表3に各溶出ピークの分離度(R)の比較を示します。粒子径の小さいTSKgel UP-SW3000は他のカラムに比べ分離度が向上していることがわかります。

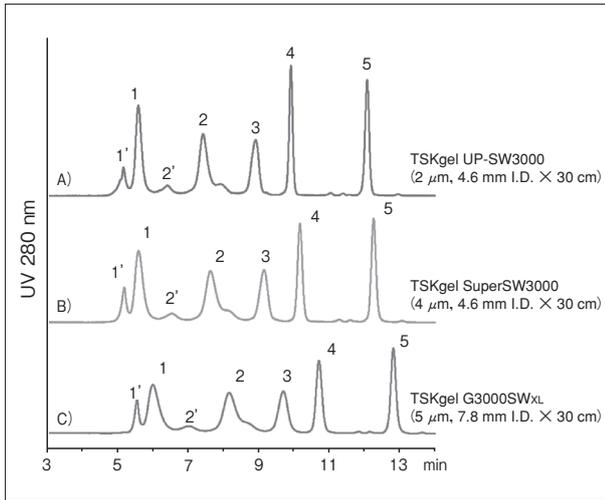


図1 標準たんぱく質のクロマトグラムの比較

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW3000  
(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

B) TSKgel SuperSW3000  
(4 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

C) TSKgel G3000SWXL,  
(5 μm, 7.8 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)  
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム  
+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：A, B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min

検出：UV 280 nm

A, B) マイクロセル, C) 標準セル

温度：25 °C

注入量：10 μL

試料：1. チログロブリン, 640,000 Da  
(1' チログロブリン 二量体)

2. γ - グロブリン, 155,000 Da  
(2' γ - グロブリン 二量体)

3. オブアルブミン, 47,000 Da

4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da

5. p- アミノ安息香酸, 137 Da

表2 カラム性能の比較 (理論段数)

カラム	粒子径	理論段数 (リボヌクレアーゼ A)
A) TSKgel UP-SW3000	2 μm	45,625
B) TSKgel SuperSW3000	4 μm	24,419
C) TSKgel G3000SWXL	5 μm	18,325

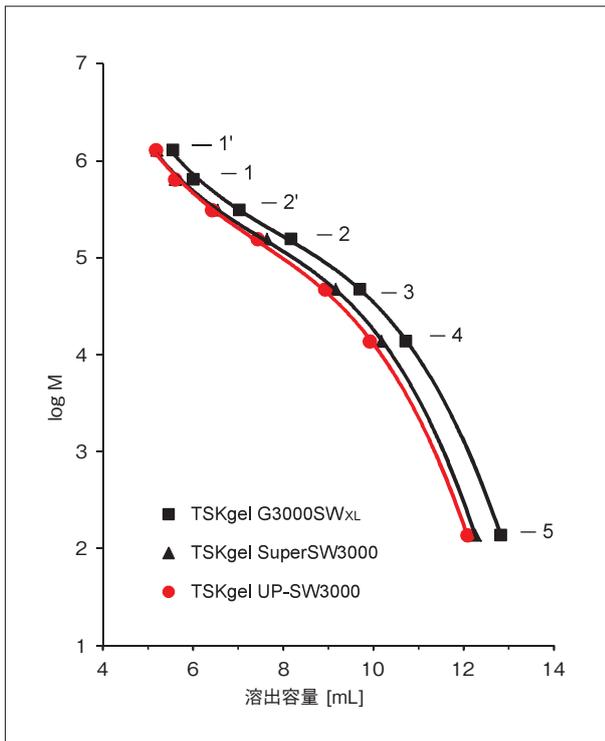


図2 標準タンパク質による較正曲線の比較

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000  
(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

TSKgel SuperSW3000  
(4 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

TSKgel G3000SWXL,  
(5 μm, 7.8 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)  
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム  
+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：A, B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min

温度：25 °C

検出：UV 280 nm

A, B) マイクロセル, C) 標準セル

注入量：10 μL

試料：1. チログロブリン, 640,000 Da  
(1' チログロブリン 二量体)

2. γ - グロブリン, 155,000 Da  
(2' γ - グロブリン 二量体)

3. オブアルブミン, 47,000 Da

4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da

5. p- アミノ安息香酸, 137 Da

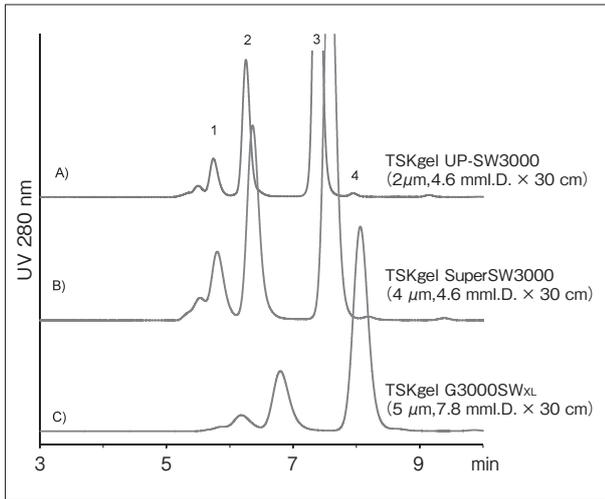


図3 モノクローナル抗体のクロマトグラムの比較

〈測定条件〉

- カラム：A) TSKgel UP-SW3000  
(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)  
B) TSKgel SuperSW3000  
(4 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)  
C) TSKgel G3000SWXL  
(5 μm, 7.8 mm I.D. × 30 cm)  
溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)  
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム  
+ 0.05 % アジ化ナトリウム  
流速：A, B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min  
温度：25 °C  
検出：UV 280 nm  
A, B) マイクロセル, C) 標準セル  
注入量：10 μL  
試料：マウス-ヒトキメラモノクローナルIgG  
1. 三量体, 2. 二量体, 3. 単量体,  
4. フラグメント

表3 モノクローナル抗体ピークの間隔度 (R) の比較

カラム	粒子径	R (ピーク 1/2)	R (ピーク 2/3)	R (ピーク 3/4)
A) TSKgel UP-SW3000	2 μm	5.02	3.50	2.70
B) TSKgel SuperSW3000	4 μm	2.16	1.53	1.19
C) TSKgel G3000SWXL	5 μm	2.56	1.73	-

2-3. 溶離液塩濃度のたんぱく質溶出挙動への影響

適正な SEC 測定を行うために、充填剤と測定物質との間で生じる相互作用（静電的、疎水的相互作用など）を抑制する必要があります。シリカゲルを基材とする TSKgel UP-SW3000 は、充填剤の表面に残存するシラノール基とたんぱく質との間に生じる静電的相互作用（イオン排除、イオン吸着）を、適切な塩濃度の溶離液を用い抑制することが重要となります。図4にリン酸緩衝液 (pH 6.7) の濃度を変化させた場合の標準たんぱく質の溶出挙動を示します。溶離液の pH よりも等電点 (pI) の低い、チログロブリン (pI 4.5)、γ-グロブリン (pI 5.1) 及びオブアルブミン (pI 4.6) は、溶離液中で負に荷電しているために低い塩濃度では、残存シラノール基とのイオン排除効果により、早く溶出します。一般に、イオン排除効果は、塩濃度が高いほど抑制されることから、リン酸緩衝液の濃度が高くなるにしたがい、溶出が遅れ、100 mmol/L 以上でほぼ一定の溶出時間となります。また、DNP-L-アラニンのように疎水部を有する化合物は、リン酸緩衝液の濃度が高くなるにしたがい、疎水的

な吸着により溶出が遅くなります。一方、溶離液の pH よりも等電点 (pI) の高いチトクロム C (pI 10.1) 及びリゾチーム (pI 11.2) は、溶離液中で正に荷電しているため、残存シラノール基との静電的相互作用により、充填剤への吸着現象を引き起こします。図5にリン酸緩衝液の濃度と塩基性たんぱく質のピーク面積の関係を示します。塩基性たんぱく質であるチトクロム C やリゾチームは、リン酸緩衝液の濃度が低い場合、充填剤への吸着によりピーク面積の低下が認められます。リン酸緩衝液濃度が高くなるにしたがいピーク面積は上昇し、リン酸緩衝液濃度が 150 mmol/L 以上でほぼ一定のピーク面積を示しました。ピーク形状は、リン酸緩衝液濃度が高くなり、静電的な吸着が抑制されるため、テーリングのピーク形状が改善され良好なピーク形状を示すようになります。このように、塩基性たんぱく質を測定するには、一定以上のイオン強度の溶離液を用いる必要があります。図6に示すように、リン酸緩衝液、リン酸緩衝液に硫酸ナトリウムを添加した溶離液を用いた場合、前述したように一定以上のイオン強度となるように溶離液の塩濃度を調整することにより、静電的な吸着を抑えて一定の

ピーク面積を得ることができます。りん酸緩衝液の場合、200 mmol/L、りん酸緩衝液に硫酸ナトリウムを添加した溶離液では、りん酸緩衝液の濃度により異なりますが、100 mmol/L ~ 150 mmol/L の硫酸ナトリウムの添加で

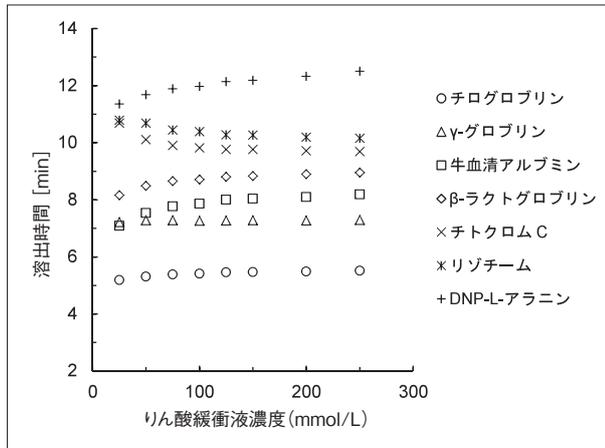


図4 りん酸緩衝液濃度の溶出時間への影響

一定のピーク面積を得ることができます。りん酸緩衝液濃度が高いほど、硫酸ナトリウムの濃度が低い溶離液で一定のピーク面積を得ることができます。

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000  
(4.6 mm I.D. × 30 cm)  
溶離液：X mmol/L りん酸緩衝液 (pH 6.7)  
+ 0.05 % アジ化ナトリウム  
流速：0.35 mL/min  
検出：UV 280 nm (マイクロセル)  
温度：25 °C  
注入量：10 μL (レオダイン 8125)  
試料：表中に記載

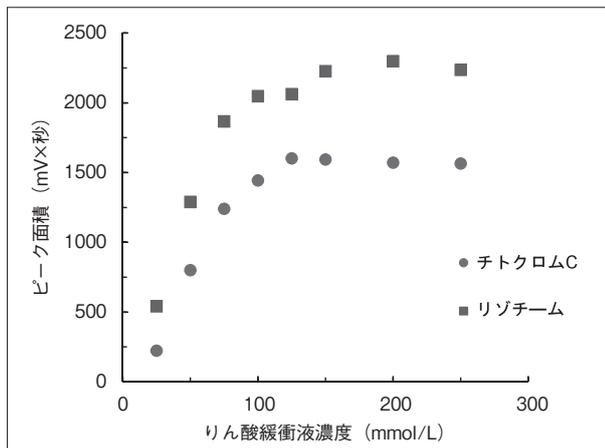


図5 りん酸緩衝液濃度のピーク面積への影響

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000  
(4.6 mm I.D. × 30 cm)  
溶離液：X mmol/L りん酸緩衝液 (pH 6.7)  
+ 0.05 % アジ化ナトリウム  
流速：0.35 mL/min  
検出：UV 280 nm (マイクロセル)  
温度：25 °C  
注入量：10 μL (レオダイン 8125)  
試料：表中に記載

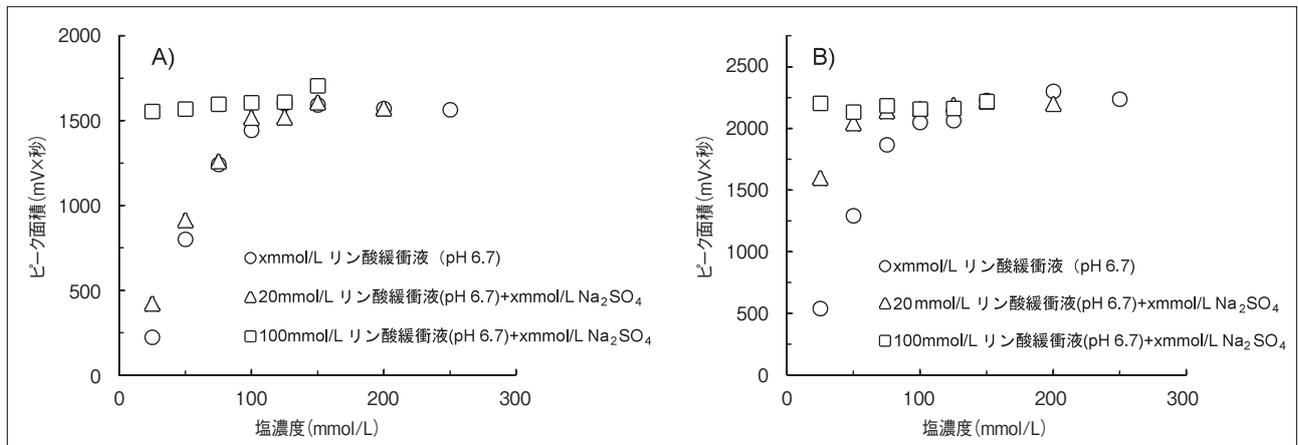


図6 溶離液塩濃度のピーク面積への影響

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000  
(4.6 mm I.D. × 30 cm)  
溶離液：X mmol/L りん酸緩衝液 (pH 6.7)  
+ X mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

流速：0.35 mL/min  
検出：UV 280 nm (マイクロセル)  
温度：25 °C  
注入量：10 μL (レオダイン 8125)  
試料：A) チトクロムC、B) リゾチーム

## 2-4. 測定流速の影響

分子量の異なる2種類のたんぱく質（牛血清アルブミン：BSA：Mw 66,500、リボヌクレアーゼA：Mw 13,700）及び低分子化合物 p-アミノ安息香酸（Mw 137）を用いて測定流速の理論段数への影響を確認しました（図7）。p-アミノ安息香酸は、測定流速が高くなるほど理論段数が高くなっています。p-アミノ安息香酸は拡散係数が大きく、測定流速が低くなると拡散による拡がりにより理論段数が低下します。一方、分子量の大きいたんぱく質では、測定流速が低くなるほど理論段数が高くなる傾向を示し、分子量が大きいほど、より低流速で高い理論段数が得られています。このように、たんぱく質を分離する場合、測定流速を低くすることによりカラム効率が向上し、より高い分離を得ることができます。図8に示すように $\gamma$ -グロブリンの二量体と単量体の分離も低流速になるほど向上しています。図9にTSKgel UP-SW3000（粒子径2  $\mu\text{m}$ ）とTSKgel SuperSW3000（粒子径4  $\mu\text{m}$ ）の流速とHETP（Height equivalent to a

theoretical plate：理論段高さ）の関係を示します。p-アミノ安息香酸は、何れの粒子径においても測定流速が高くなるにしたがいHETPが小さくなり、カラム効率が向上しています。一方、たんぱく質では、測定流速が高くなるとHETPが大きくなる傾向を示し、分子量が大きい（分子サイズが大きい）たんぱく質ほど顕著なカラム効率の低下が認められます。充填剤の粒子径が小さいTSKgel UP-SW3000では、測定流速のHETPへの影響が小さく、測定流速を高くした場合のカラム効率の低下を抑えることができ、粒子径の大きい充填剤が充填されたカラムに比べ、高速分析に有利であると言えます。図10に測定流速を高くして標準たんぱく質を測定したクロマトグラムを示します。測定流速を0.50 mL/minにすることにより5 minの分析時間で良好な分離を得ることが可能となります。また、図11に測定流速と圧力の関係を示します。TSKgel UP-SW3000（30 cm カラム）は、標準流速（0.35 mL/min）では35 MPa以下の低い操作圧で使用することができます。

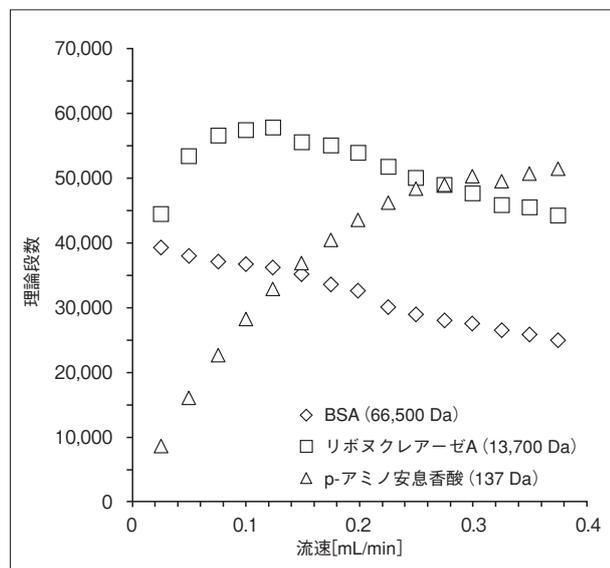


図7 流速が理論段数に及ぼす影響

### 〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000  
(4.6 mm I.D. × 30 cm)  
溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)  
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム  
+ 0.05 % アジ化ナトリウム  
流速：0.02 ~ 0.38 mL/min  
検出：UV 280 nm (マイクロセル)  
温度：25 °C  
注入量：10  $\mu\text{L}$  (レオダイン 8125)  
試料：BSA, 66,500 Da  
リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da  
p-アミノ安息香酸, 137 Da

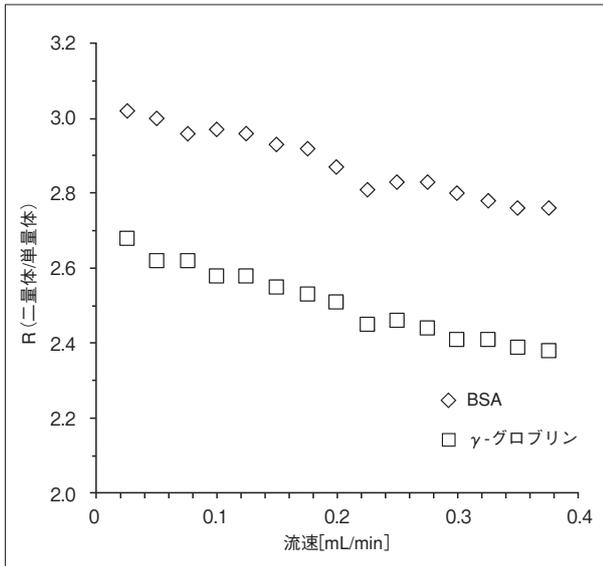


図8 流速と分離度 R (二量体 / 単量体) の関係

〈測定条件〉

カラム : TSKgel UP-SW3000  
 (2  $\mu$ m, 4.6 mm I.D.  $\times$  30 cm)  
 溶離液 : 100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)  
 + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム  
 + 0.05 % アジ化ナトリウム  
 流速 : 0.02 ~ 0.38 mL/min  
 検出 : UV 280 nm (マイクロセル)  
 温度 : 25  $^{\circ}$ C  
 注入量 : 10  $\mu$ L (レオダイン 8125)  
 試料 : BSA,  
 ヒト  $\gamma$ -グロブリン (ポリクローナル)

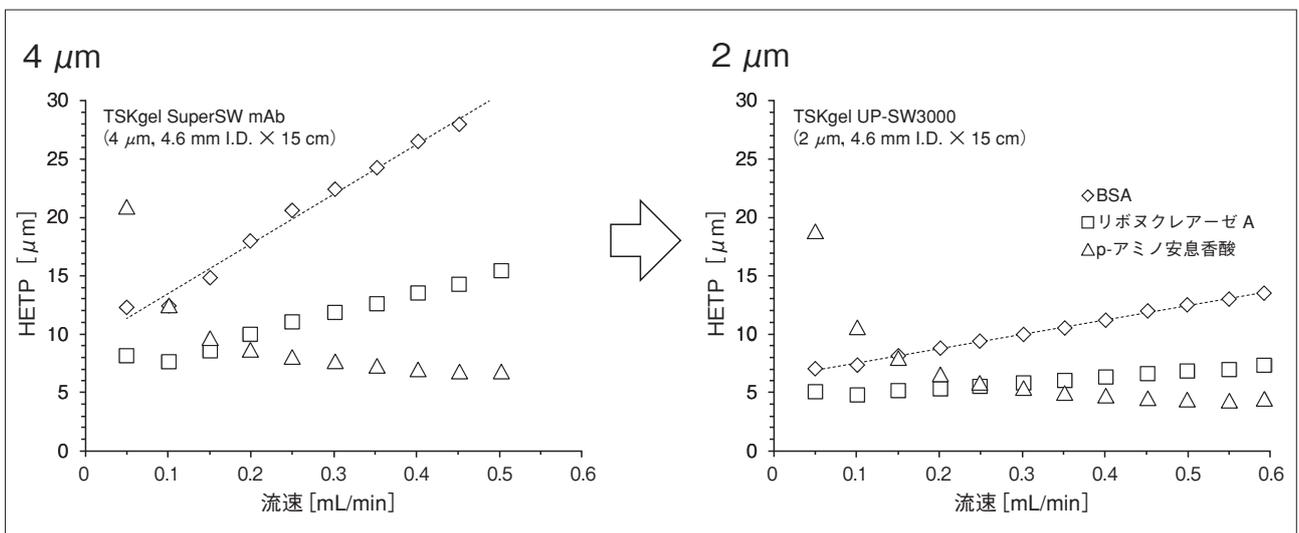


図9 粒子径が異なる SEC カラムの流速と HETP の関係

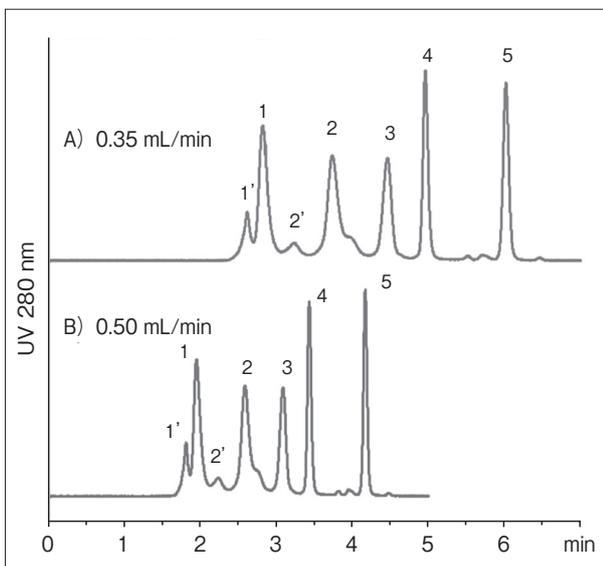


図10 高流速条件での標準たんぱく質の分離

〈測定条件〉

カラム : TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D.  $\times$  15 cm)  
 溶離液 : 100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)  
 + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム  
 + 0.05 % アジ化ナトリウム  
 流速 : A) 0.35 mL/min, B) 0.50 mL/min  
 検出 : UV 280 nm (マイクロセル)  
 温度 : 25  $^{\circ}$ C  
 注入量 : 5  $\mu$ L (レオダイン 8125)  
 試料 : 1. チログロブリン, 640,000 Da  
 (1' チログロブリン 二量体)  
 2.  $\gamma$ -グロブリン, 155,000 Da  
 (2'  $\gamma$ -グロブリン 二量体)  
 3. オブアルブミン, 47,000 Da  
 4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da  
 5. p-アミノ安息香酸, 137 Da

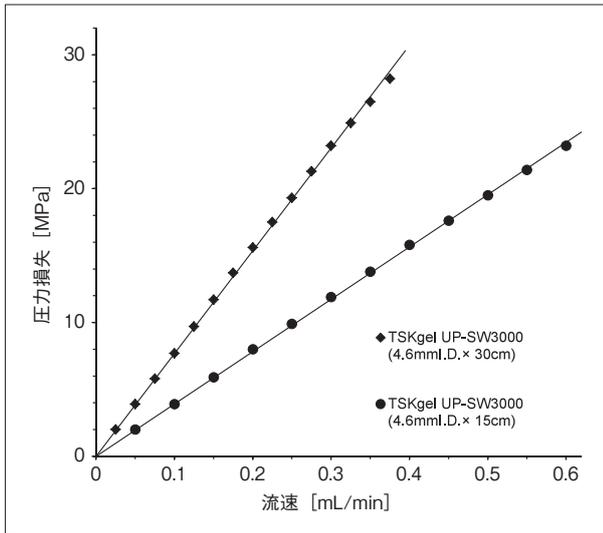


図 11 流速と圧力の関係

## 2-5. 試料負荷量及び試料注入量の影響

牛血清アルブミン (BSA)、リボヌクレアーゼ A 及び p-アミノ安息香酸を用いて、4.6 mm I.D. × 15 cm カラム及び 4.6 mm I.D. × 30 cm カラムの試料負荷量について確認しました。試料注入量は、15 cm カラムで 5  $\mu$ L、30 cm カラムで 10  $\mu$ L として測定しました。図 12 に各カラムでの試料負荷量と理論段数の関係を示します。15 cm カラムの場合、BSA で負荷量 50  $\mu$ g 以上、リボヌクレアーゼ A で負荷量 37.5  $\mu$ g 以上で理論段数の低下が認められました。30 cm カラムでは、BSA で負荷量 100  $\mu$ g 以上、リボヌクレアーゼ A で負荷量 70  $\mu$ g 以上で極端な理論段数の低下が認められました。このことから、標準タンパク質の負荷量は、カラム長さ 15 cm 当り 35 ~ 50  $\mu$ g 程度と考えられます (30

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000

(4.6 mm I.D. × 30 cm, 4.6 mm I.D. × 15 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)

+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム

+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.025 ~ 0.59 mL/min

温度：25  $^{\circ}$ C

cm カラムの場合は 70 ~ 100  $\mu$ g)。

BSA、リボヌクレアーゼ A 及び p-アミノ安息香酸の負荷量が、それぞれ 2  $\mu$ g、15  $\mu$ g 及び 0.01  $\mu$ g となるように各試料を調製し注入容量の理論段数への影響について確認しました。図 13 に各カラムでの注入容量と理論段数の関係を示します。15 cm カラム、30 cm カラムとも試料注入量 2  $\mu$ L まで殆ど理論段数の低下は認められませんでした。2  $\mu$ L 以上では注入量の増加とともに理論段数が低下し、15 cm カラムでは、注入量 5  $\mu$ L、30 cm カラムでは、注入量 10  $\mu$ L で 10 ~ 15 % 程度の理論段数低下が認められました。TSKgel UP-SW3000 では、15 cm カラムで注入量 5  $\mu$ L 以下、30 cm カラムで注入量 10  $\mu$ L 以下での使用をお勧めします。

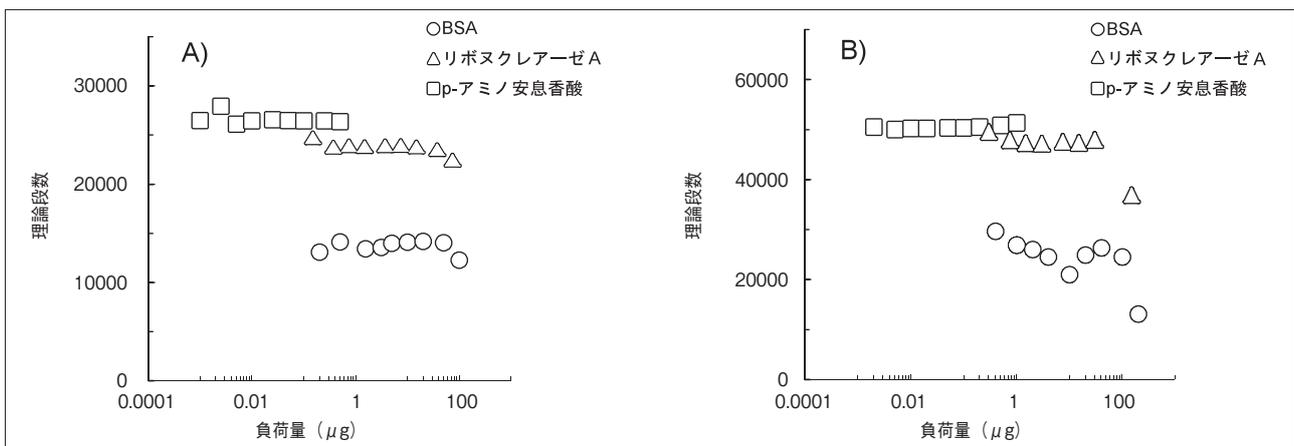


図 12 試料負荷量と理論段数の関係

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 15 cm)

B) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min 検出：UV 280 nm (マイクロセル) 温度：25  $^{\circ}$ C

注入量：A) 5  $\mu$ L, B) 10  $\mu$ L (レオダイン 8125)

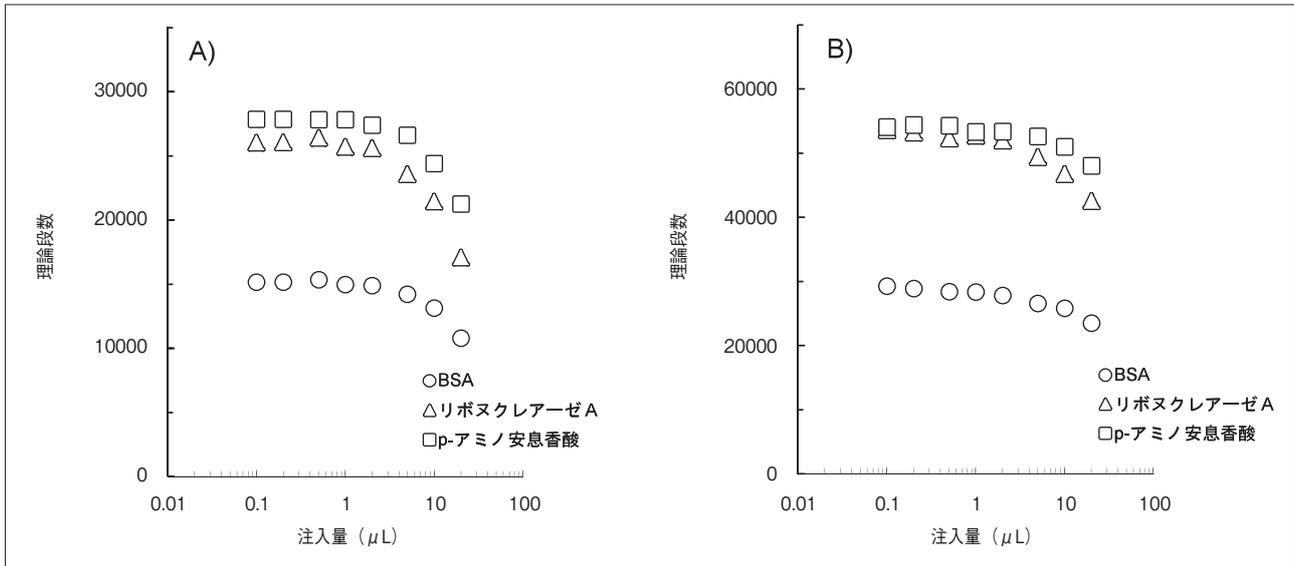


図 13 試料負荷量の影響 (注入容量)

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 15 cm)

B) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min

検出：UV 280 nm (マイクロセル)

温度：25 °C

## 2-6. カラム外 (配管) での拡がりの影響

TSKgel UP-SW3000 は、粒子径が小さく配管等のカラム外での拡がりにより、カラム本来の性能が得られない場合があります。インジェクションバルブ-カラム間、及びカラム-UV セル間の配管での拡がりの理論段数への影響について確認しました。インジェクションバルブ-カラム間、若しくはカラム-UV セル間の配管について、それぞれ内径 0.13 mm, 及び内径 0.25 mm の PEEK 配管の長さを変えて、たんぱく質、低分子化合物の理論段数を測定しました。図 14 にインジェクションバルブ-カラム間の配管長さの理論段数への影響を示します。また、図 15 にカラム-UV セル間の配管長さの理論段数への影響を示します。インジェクションバルブ-カラム間に内径 0.13 mm の配管を用いた場合(図 14,15 の●, ▲, ■)、配管の長さが長くなるにしたがい徐々に理論段数の低下が認められましたが、長さ 25 cm (約 3.32 μL) の配管を使用した場合の理論段数の低下は、約 10% 程度とな

りました。カラム-UV セル間の配管の長さを変更した場合も配管の長さが長くなるにしたがい徐々に理論段数の低下が認められ、長さ 40 cm (約 5.31 μL) の配管を使用した場合、理論段数が約 10% 程度低下しました。一方、内径 0.25 mm の配管を使用した場合(図 14、15 の○, △, □)、配管の長さが長くなるにしたがい内径 0.13 mm の配管と同様に理論段数が低下する傾向を示しますが、内径 0.13 mm の配管を使用した場合に比べ、インジェクションバルブ-カラム間の配管径の差異により 5 ~ 10% 程度、カラム-UV セル間の配管径の差異で 15 ~ 20% 程度の理論段数低下が認められました。このように、TSKgel UP-SW3000 のカラム性能を得るためには、装置の配管径を 0.13 mm 以下とし、インジェクションバルブ-カラム間の配管の長さを 20 cm 以下、カラム-UV セル間の配管の配管長さを 30 cm 以下で使用することをお勧めします。

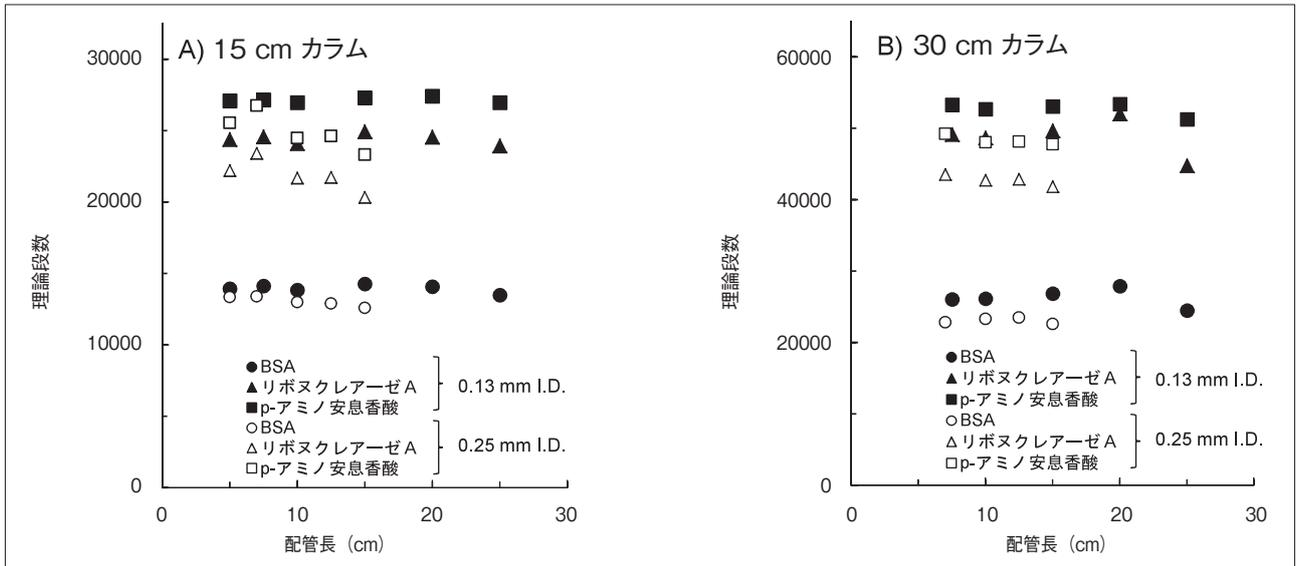


図 14 カラム外容量の影響 (カラム入口側配管)

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 15 cm)、B) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流 速：0.35 mL/min

検 出：UV 280 nm (マイクロセル)

温 度：25 °C

注入量：A) 5 μL、B) 10 μL

\*カラム出口側配管：0.13 mm I.D. × 30 cm

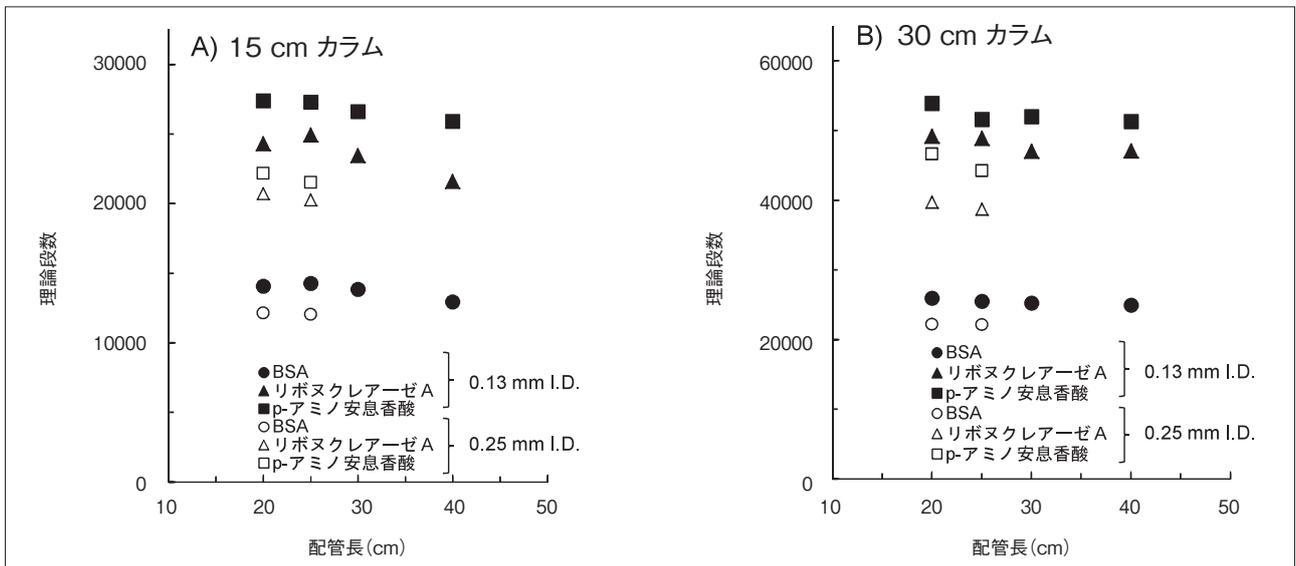


図 15 カラム外容量の影響 (カラム出口側配管)

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 15 cm)、B) TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流 速：0.35 mL/min

検 出：UV 280 nm (マイクロセル)

温 度：25 °C

注入量：A) 5 μL、B) 10 μL

\*カラム入口側配管：0.13 mm I.D. × 15 cm

## 2-7. カラムの耐久性

TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 15 cm, 4.6 mm I.D. × 30 cm) について試料を連続注入した場合のカラムの耐久性試験を行いました。

標準たんぱく質混合試料を 100 回連続注入した後、6 時間以上送液を停止する実験を 5 回繰り返し、p-アミノ安息香酸を用いてカラム性能（溶出時間、理論段数）を確認しました。各カラムの最大使用流速（15 cm カラムは 0.50 mL/min、30 cm カラムは 0.35 mL/min）で実施しました。結果を図 16、17 に示します。それぞれの

カラムサイズで 3 ロットの充填剤について確認しましたが、いずれの場合も 500 回注入した後もカラム性能に顕著な変化は見られませんでした。

TSKgel UP-SW3000 は従来のカラムと比べて充填剤の粒子径が小さいため、溶離液に含まれる不溶性物質や試料中の夾雑物がカラムの入口に蓄積しやすく、性能の低下を引き起こす場合があります。分析カラムの入口側にガードカラムを取り付け、適宜交換することにより、分析カラムの劣化を防いで長期間安定した測定を行うことができます。

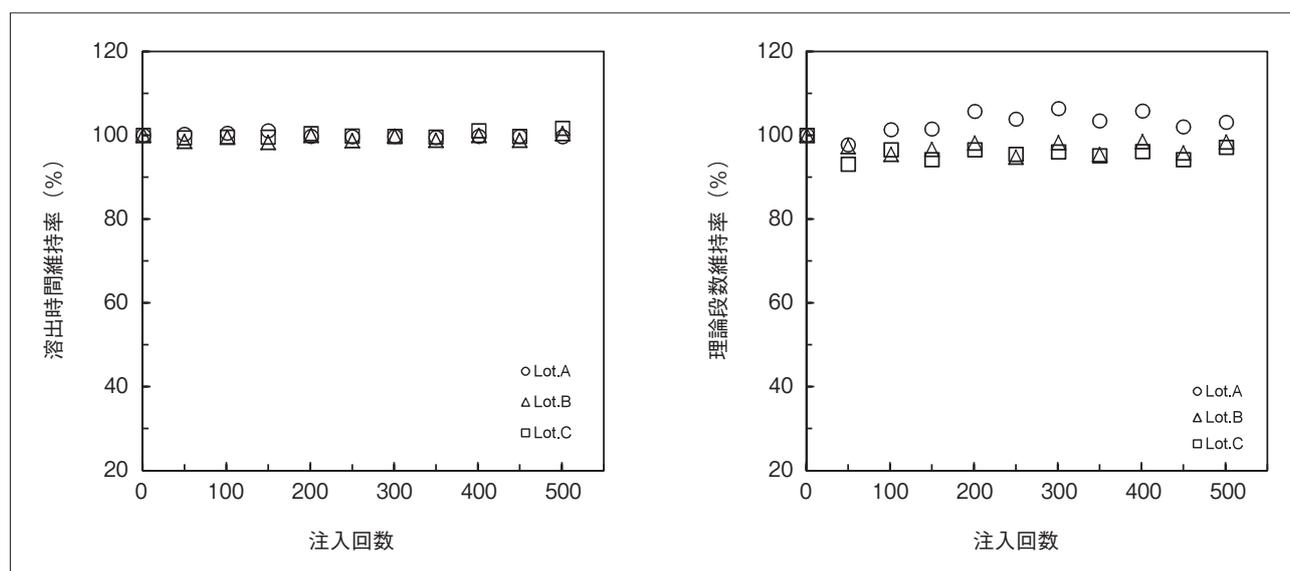


図 16 カラムの連続注入試験 (15 cm カラム)

### 〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. × 15 cm)

溶離液：200 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7) + 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.50 mL/min

検出：UV 280 nm (マイクロセル)

温度：25 °C

注入量：5 μL

注入間隔：10 min (試料 ①→②→③→④) (100 回注入後送液を 6 時間以上停止)

注入回数：500 回 (100 回連続注入 5 回)

試料：①チログロブリン (1.5 g/L), γ-グロブリン (1.5 g/L), オブアルブミン (1.5 g/L),

リボスクレアーゼ A (1.5 g/L), p-アミノ安息香酸 (10 mg/L)

②チログロブリン (1.5 g/L), β-ラクトグロブリン (1.5 g/L), DNP-L-アラニン (20 mg/L)

③γ-グロブリン (1.5 g/L), チトクロム C (1.5 g/L), DNP-L-アラニン (20 mg/L)

④ウシ血清アルブミン (1.5 g/L), リゾチーム (1.5 g/L), DNP-L-アラニン (20 mg/L)

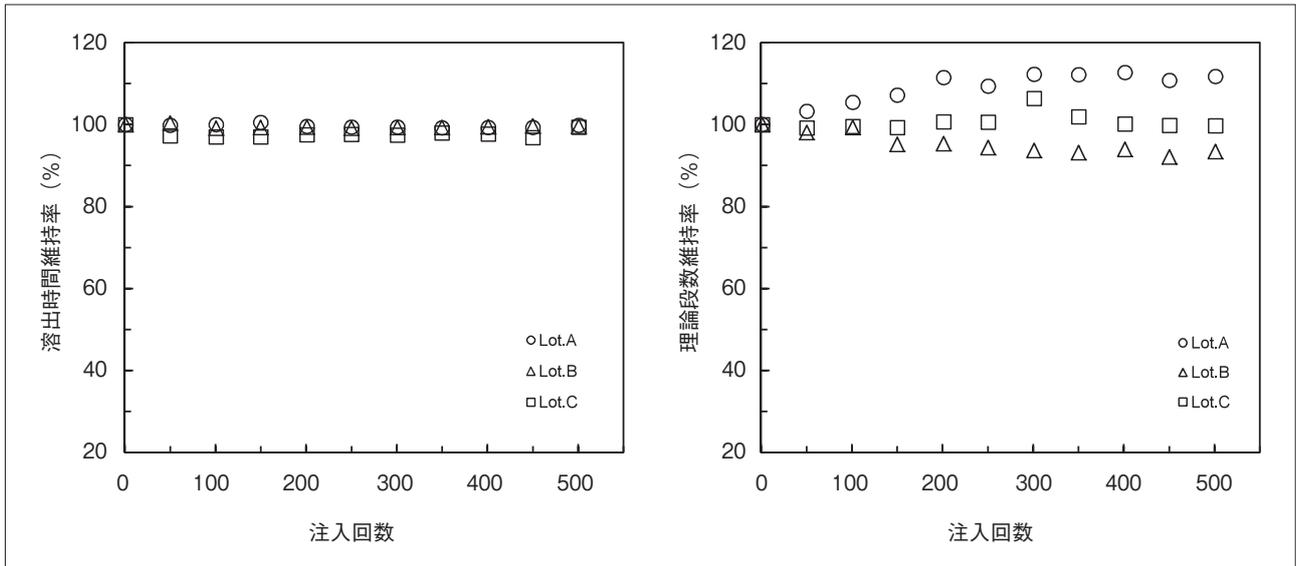


図 17 カラムの連続注入試験 (30 cm カラム)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000 (4.6 mmI.D. × 30 cm)  
 溶離液：200 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7) + 0.05% アジ化ナトリウム  
 流速：0.35 mL/min 検出：UV 280 nm (マイクロセル)  
 温度：25 °C 注入量：10 μL  
 注入間隔：15 min (試料 ①→②→③→④) (100 回注入後送液を 6 時間以上停止)  
 注入回数：500 回 (100 回連続注入 5 回)

- 試料：①チログロブリン (1.5 g/L), γ-グロブリン (1.5 g/L), オブアルブミン (1.5 g/L),  
 リボヌクレアーゼ A (1.5 g/L), p-アミノ安息香酸 (10 mg/L)  
 ②チログロブリン (1.5 g/L), β-ラクトグロブリン (1.5 g/L), DNP-L-アラニン (20 mg/L)  
 ③γ-グロブリン (1.5 g/L), チトクロム C (1.5 g/L), DNP-L-アラニン (20 mg/L)  
 ④ウシ血清アルブミン (1.5 g/L), リゾチーム (1.5 g/L), DNP-L-アラニン (20 mg/L)

2-8. 充填剤のロット間差

図 18 に異なるロットの充填剤を用いて標準たんぱく質混合試料を測定したクロマトグラムを示します。ロット間でピーク形状、溶出位置に大きな差は見られず、ロット間差が小さく製造安定性が高い充填剤であることが分かります。

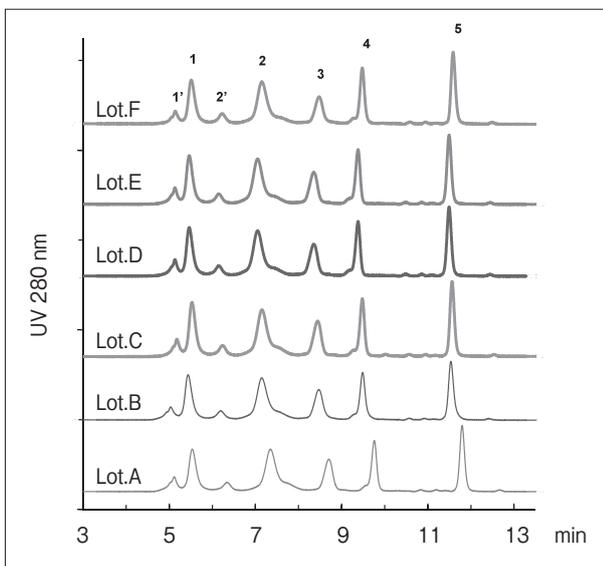


図 18 標準たんぱく質のクロマトグラム(充填剤ロット間差)

ト間でピーク形状、溶出位置に大きな差は見られず、ロット間差が小さく製造安定性が高い充填剤であることが分かります。

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000  
 (4.6 mm I.D. × 30 cm)  
 溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)  
 + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム  
 + 0.05 % アジ化ナトリウム  
 流速：0.35 mL/min  
 検出：UV 280 nm (マイクロセル)  
 温度：25 °C  
 注入量：10 μL

- 試料：1. チログロブリン, 640,000 Da  
 (1'チログロブリン 二量体)  
 2. γ-グロブリン, 155,000 Da  
 (2'γ-グロブリン 二量体)  
 3. オブアルブミン, 47,000 Da  
 4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da  
 5. p-アミノ安息香酸, 137 Da

## 2-9. TSKgel G3000SW<sub>XL</sub> との比較

抗体医薬品のSEC測定では、抗体の二量体と単量体の分離だけでなく、単量体とフラグメントの分離についてもより高い分離度が要求されています。TSKgel G3000SW<sub>XL</sub>を2本接続したカラム系とTSKgel UP-SW3000 (30 cm カラム, 1本)を用いて、ガンマグロブリン製剤、及びモノクローナル抗体の分離を比較しました。図19にガンマグロブリン製剤のクロマトグラムを示します。TSKgel UP-SW3000では、TSKgel G3000SW<sub>XL</sub>に比べ、1/2の測定時間で同等以上の分離

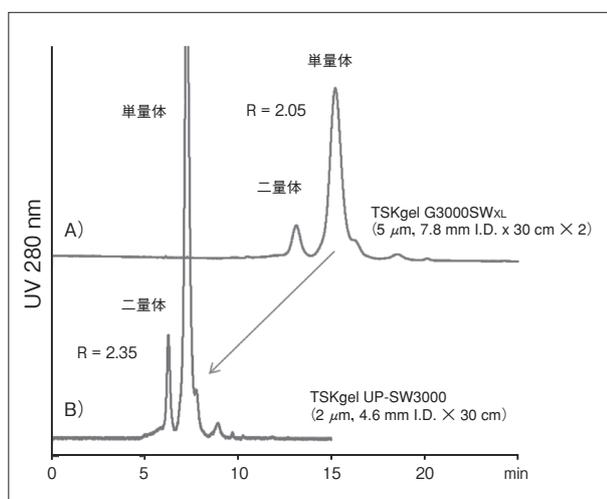


図19 ガンマグロブリン製剤の分離比較

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel G3000SW<sub>XL</sub>  
(5 μm, 7.8 mm I.D. × 30 cm × 2)

B) TSKgel UP-SW3000  
(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)  
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム  
+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：A) 1.0 mL/min, B) 0.35 mL/min

検出：UV 280 nm

温度：25 °C

注入量：10 μL

試料：ヒトγ-グロブリン、ポリクローナル

度 (R) が得られています。また、図20にモノクローナル抗体のクロマトグラムを示します。ガンマグロブリン製剤と同様に二量体と単量体で良好な分離が得られているだけでなく、単量体とフラグメントも良好な分離を示しています。表4に各ピークの見分けを示します。このように、既存カラム (TSKgel G3000SW<sub>XL</sub>) に比べ1/2の測定時間でたんぱく質の高分離分析が可能です。(TSKgel UP-SW3000本来のカラム性能を得るためには、配管やインジェクションバルブでの拡がりを小さくする必要があります。)

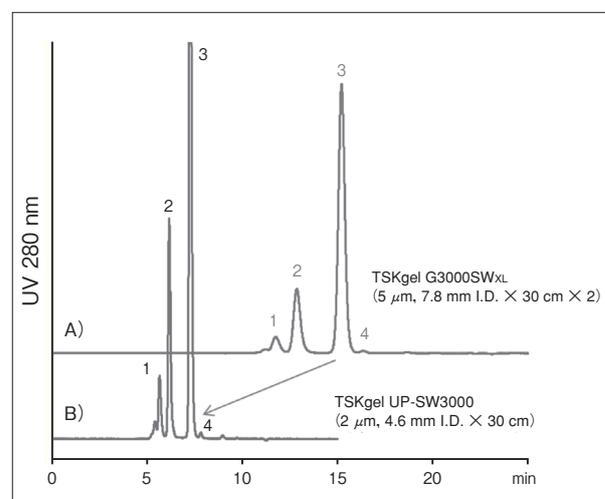


図20 モノクローナル抗体の分離比較

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel G3000SW<sub>XL</sub>  
(5 μm, 7.8 mm I.D. × 30 cm × 2)

B) TSKgel UP-SW3000  
(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)  
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム  
+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：A) 1.0 mL/min, B) 0.35 mL/min

検出：UV 280 nm

温度：25 °C

注入量：10 μL

試料：マウス-ヒト キメラ モノクローナル IgG  
ピーク 1. 三量体, 2. 二量体, 3. 単量体,  
4. フラグメント

表4 モノクローナル抗体ピークの見分け (R)

カラム	カラムサイズ (mm I.D. × cm)	R(ピーク 1/2)	R(ピーク 2/3)	R(ピーク 3/4)
A) TSKgel G3000SW <sub>XL</sub> × 2	7.8 × 30 + 7.8 × 30	1.60	3.63	1.77
B) TSKgel UP-SW3000	4.6 × 30	2.16	5.02	2.56

## 2-10. 市販 UHPLC 用 SEC カラムとの比較

SEC カラムにおいて高い分離性能を得るためには、充填剤に必要な因子が2つあります。図 21 に示す 1. 充填剤の粒子径、2. 充填剤の細孔特性です。充填剤の粒子径を小さくした場合、理論段数が高くなり分離性能が向上しますが、カラム圧力が高くなるため、高耐圧のシステムで測定する必要があります。一方、充填剤の細孔容積を大きくして較正曲線の傾きを緩やかにすることで、異なる分子量の物質の溶出時間の差が大きくなり、分離性能が向上します。しかし、一般に、充填剤の細孔容積が大きくなると充填剤の強度が低下し、操作圧が上がります。TSKgel UP-SW3000 は、充填剤の粒子径と細孔容積を最適化することにより、高いカラム性能でカラム操作圧の低減を実現しています。図 22 に TSKgel

UP-SW3000 と市販 UHPLC 用 SEC カラムの標準たんぱく質による較正曲線を示します。TSKgel UP-SW3000 は、チログロブリン (Mw 640,000) からオプアルブミン (Mw 47,000) の分子量範囲で較正曲線の傾きが緩やかになっています。標準たんぱく質のクロマトグラムでは、図 23 に示すように  $\gamma$ -グロブリン (ピーク 2) 近傍のピークの間隔が広がっており、抗体の分離に適していることがわかります。TSKgel UP-SW3000 と市販 UHPLC 用 SEC カラムを用いてモノクローナル抗体を分離したクロマトグラムを図 24 に、溶出するピークの間隔を表 5 に示します。市販 UHPLC 用 SEC カラムに比べモノクローナル抗体の三量体/二量体/単量体の分離能が高くなっています。また、単量体とフラグメント間で良好な分離を示しています。

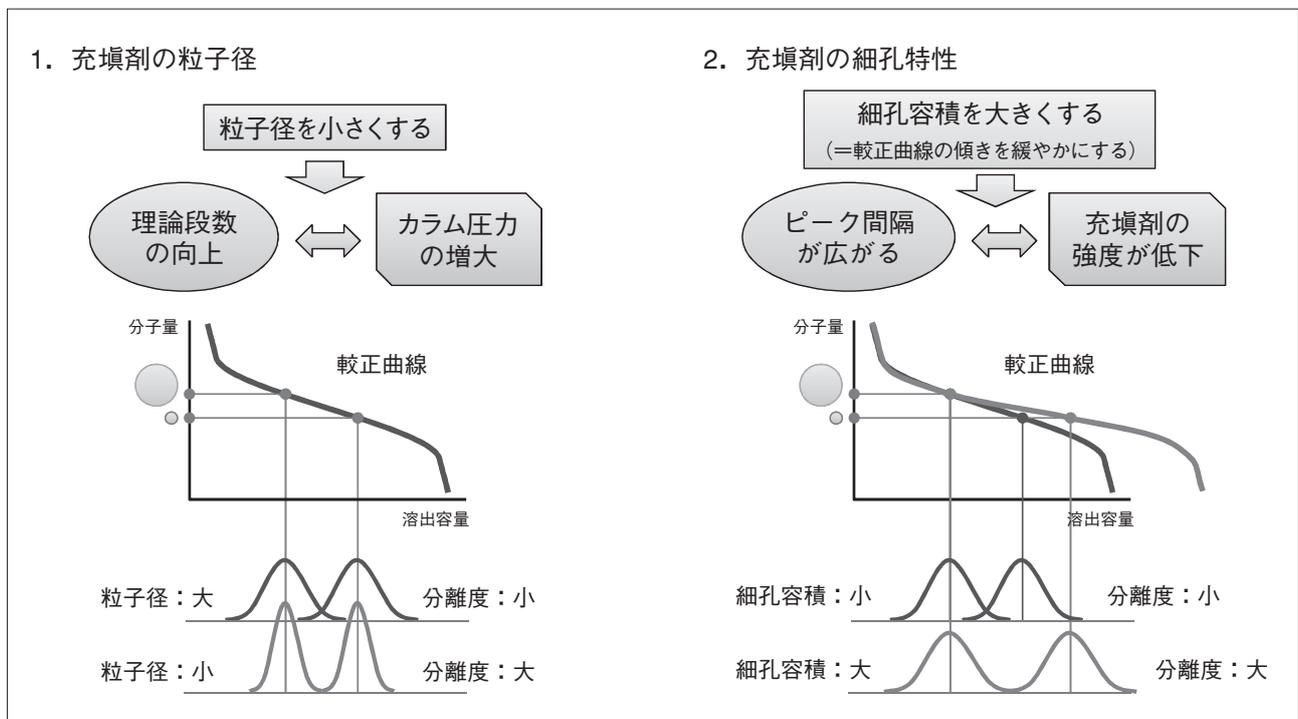


図 21 SEC カラムの分離性能を決める 2 つの因子

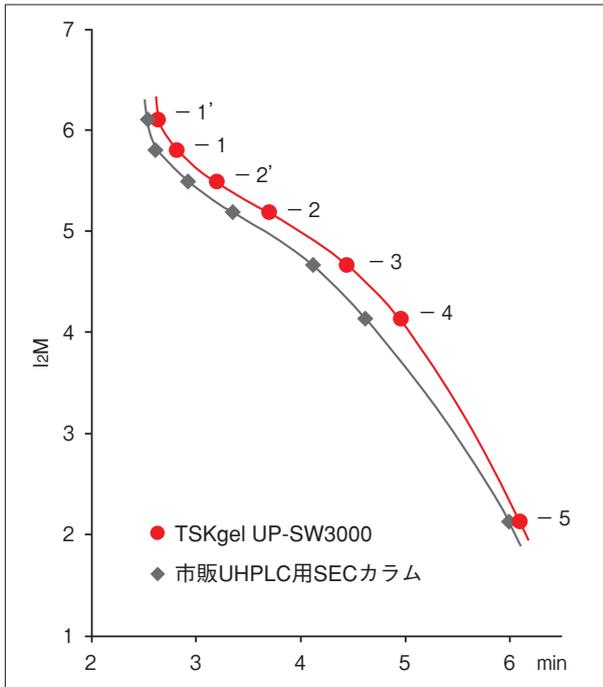


図 22 標準たんぱく質による較正曲線の比較

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000

(2  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  15 cm)

市販 UHPLC 用 SEC カラム

(1.7  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  15 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)

+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム

+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min

検出：UV 280 nm

温度：25  $^{\circ}\text{C}$

注入量：5  $\mu\text{L}$

試料：1. チログロブリン, 640,000 Da

(1' チログロブリン 二量体)

2.  $\gamma$ -グロブリン, 155,000 Da

(2'  $\gamma$ -グロブリン 二量体)

3. オブアルブミン, 47,000 Da

4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da

5. p-アミノ安息香酸, 137 Da

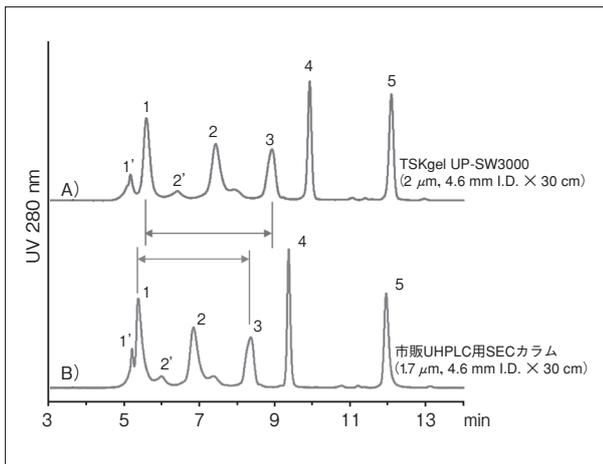


図 23 標準たんぱく質のクロマトグラムの比較

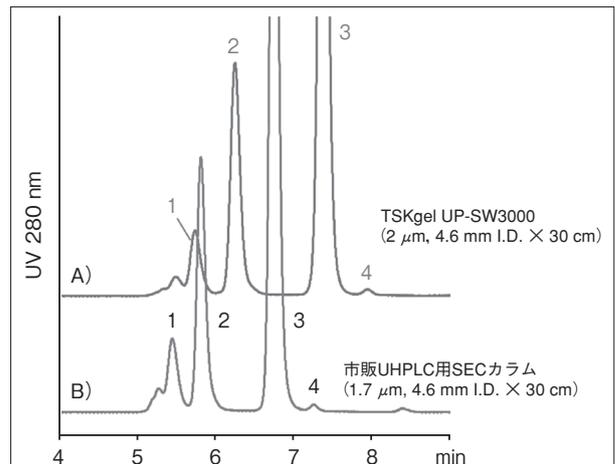


図 24 モノクローナル抗体の分離比較

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW3000

(2  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  30 cm)

B) 市販 UHPLC 用 SEC カラム

(1.7  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)

+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム

+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min

検出：UV 280 nm (マイクロセル)

温度：25  $^{\circ}\text{C}$

注入量：10  $\mu\text{L}$  (レオダイン 8125)

試料：1. チログロブリン, 640,000 Da

(1' チログロブリン 二量体)

2.  $\gamma$ -グロブリン, 155,000 Da

(2'  $\gamma$ -グロブリン 二量体)

3. オブアルブミン, 47,000 Da

4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da

5. p-アミノ安息香酸, 137 Da

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW3000

(2  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  30 cm)

B) 市販 UHPLC 用 SEC カラム

(1.7  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)

+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム

+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min

検出：UV 280 nm (マイクロセル)

温度：25  $^{\circ}\text{C}$

注入量：10  $\mu\text{L}$  (レオダイン 8125)

試料：マウス-ヒト キメラモノクローナル IgG

ピーク 1. 三量体, 2. 二量体, 3. 単量体

4. フラグメント

表5 モノクローナル抗体ピークの分離度の比較

カラム	R (ピーク 1/2)	R (ピーク 2/3)	R (ピーク 3/4)
A) TSKgel UP-SW3000	2.16	5.02	2.56
B) 市販 UHPLC 用 SEC カラム	1.64	4.66	2.57

### 3. 応用例

#### 3-1. 抗体医薬品の精密分析

長さ 30 cm のカラムを用いて測定流速を遅くしてモノクローナル抗体の精密分析を行った例を図 25 に示します。測定流速が 0.35 mL/min では二量体のピークは 1 本のみ観察されましたが、測定流速を 0.05 mL/min に

下げることにより二量体のピークの前後に溶出する不純物ピークが分離されました。また、表 6 に抗体の四量体から単量体及びフラグメントの各ピークの分離度を示します。低流速での測定により分離度が向上し、抗体の精密分析が可能である事がわかります。

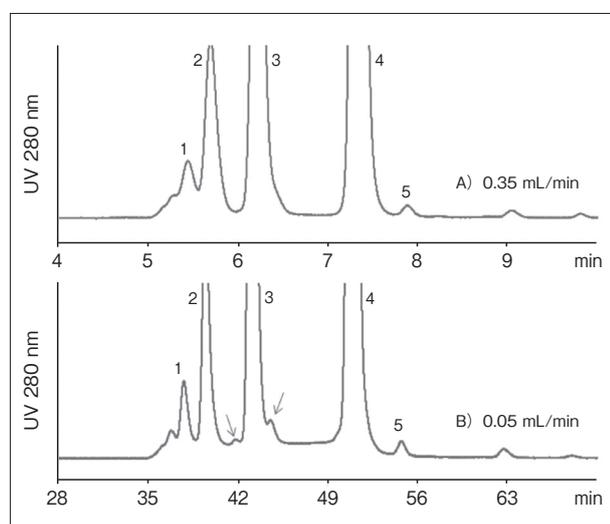


図 25 低流速条件での高分離分析

#### 〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000

(4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.7)

+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム

+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流 速：A) 0.35 mL/min, B) 0.05 mL/min

検 出：UV 280 nm (マイクロセル)

温 度：25 °C

注入量：10 μL (レオダイン 8125)

試 料：マウス-ヒト キメラモノクローナル IgG

ピーク 1. 四量体、2. 三量体、3. 二量体、

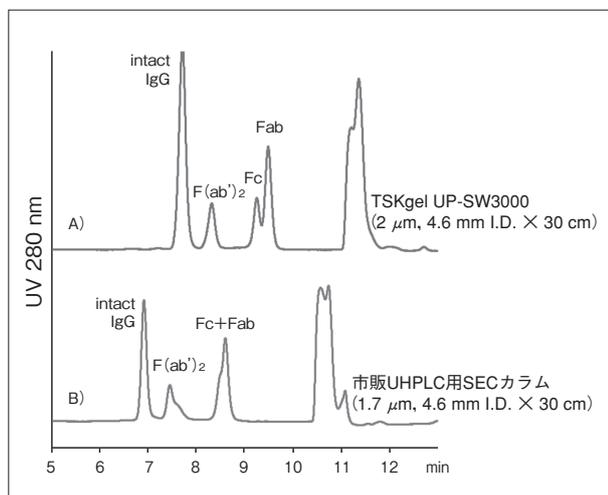
4. 単量体、5. フラグメント

表 6 モノクローナル抗体ピークの実験値

流 速	R (ピーク 1/2)	R (ピーク 2/3)	R (ピーク 3/4)	R (ピーク 4/5)
A) 0.35 mL/min	0.88	2.20	5.07	2.52
B) 0.05 mL/min	1.49	3.51	7.00	3.34

### 3-2. 抗体パパイソ消化物分離例

IgG (マウス) のパパイソ消化物での TSKgel UP-SW3000 と市販 UHPLC 用 SEC カラムのクロマトグラムの比較を **図 26** に示します。TSKgel UP-SW3000 では、分子量が近接したフラグメントの Fc や Fab が分離され



**図 26** 抗体パパイソ消化物の分離比較

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW3000

(2  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  30 cm)

B) 市販 UHPLC 用 SEC カラム

(1.7  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm I.D.  $\times$  30 cm)

溶離液：200 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.5)

流速：0.35 mL/min

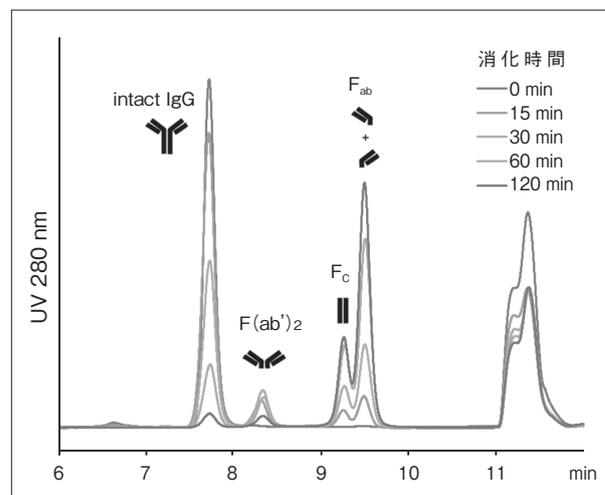
検出：UV 280 nm (マイクロセル)

温度：25  $^{\circ}\text{C}$

注入量：5  $\mu\text{L}$  (レオダイン 8125)

試料：マウスモノクローナル IgG のパパイソ消化試料 (消化時間 30 分)

ています。また、パパイソ消化の過程を TSKgel UP-SW3000 のクロマトグラムで **図 27** に示します。IgG 単量体のピークが消化時間とともに小さくなっていく一方、フラグメントの F(ab)<sub>2</sub>、Fc 及び Fab のピークが大きくなっています。



**図 27** IgG のパパイソ消化過程のクロマトグラム

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000

(4.6 mm I.D.  $\times$  30 cm)

試料：マウスモノクローナル IgG のパパイソ消化試料 (消化時間 0 ~ 120 分)

\* 他の測定条件は **図 23** と同じ

### 4. おわりに

以上、粒子径 2  $\mu\text{m}$  の高性能 SEC カラムである TSKgel UP-SW3000 について概説しました。システムのカラム外容量に留意し、TSKgel UP-SW3000 を用いることにより既存カラムに比べ、抗体の二量体 / 単量体

/ フラグメントの高分離を短時間で達成することが可能です。また、粒子径が小さく測定流速上昇による理論段数の低下が小さいことから、測定流速を高くしてハイスループット分析を行うことが可能です。

※ “TSKgel” は東ソー株式会社の登録商標です。



TOSOH

## 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部	☎ (03) 5427-5180	〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオエッセンス	☎ (06) 6209-1948	〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオエッセンス	☎ (052) 211-5730	〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店	☎ (092) 781-0481	〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店	☎ (022) 266-2341	〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
山口営業所	☎ (0834) 63-9888	〒746-0015 山口県周南市清水1-6-1
カスタマーサポートセンター	☎ (0467) 76-5384	〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1

お問い合わせ e-mail [tskgel@tosoh.co.jp](mailto:tskgel@tosoh.co.jp)

バイオサイエンス事業部ホームページ <http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>