

高性能 SEC カラム TSKgel[®] UP-SW Aggregate について

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel UP-SW Aggregate の基本特性	1
2 - 1. 充填剤の特性	1
2 - 2. 較正曲線と分離性能	1
2 - 3. 溶離液の塩濃度の影響	3
2 - 4. 測定流速の影響	4
2 - 5. カラムの耐久性	5
3. 分析例	6
3 - 1. 抗体の熱処理生成凝集体の分析	6
3 - 2. IgM の分析	7
3 - 3. 核酸の分析	8
4. おわりに	8

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、輸送時に生じる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）での分析が行われています。二量体以上の凝集体は免疫反応を惹起する可能性が示唆されていることから、抗体医薬品の品質管理では高分子量不純物として定量評価することが定められています。

更に凝集体の四量体、六量体などの多量体を定量分析することにより凝集体の生成機序を明らかにすることも重要となってきています。

今回、凝集体の分離を主目的とする高性能SECカラム TSKgel UP-SW Aggregate を商品化いたしました。本稿では TSKgel UP-SW Aggregate の基本特性と分離例を紹介いたします。

表 1 充填剤、カラムの特性

製品名	TSKgel UP-SW Aggregate	TSKgel UP-SW3000	TSKgel UP-SW2000
カラムサイズ	4.6 mm I.D. × 30 cm, 15 cm	4.6 mm I.D. × 30 cm, 15 cm	4.6 mm I.D. × 30 cm, 15 cm
基材	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
粒子径	3 μm	2 μm	2 μm
細孔径	30 nm	25 nm	12.5 nm
分子量測定範囲	10 ~ 2,000 kDa	10 ~ 500 kDa	5 ~ 100 kDa
用途	抗体（凝集体）の高分離分析	抗体（二量体 / 単量体 / フラグメント）の高分離分析	抗体（フラグメント）、ペプチド、オリゴ核酸の高分離分析

2-2. 較正曲線と分離性能

TSKgel UP-SW Aggregate、TSKgel UP-SW3000 及び TSKgel UP-SW2000 を用いて測定した標準たんぱく質混合試料のクロマトグラムを **図 1** に示します。また、各ピークの分離度 (R) を **表 2** に示します。TSKgel UP-SW Aggregate はチログロブリン二量体（ピーク 1'）と単量体（ピーク 1）、及びチログロブリン単量体（ピーク 1）と γ -グロブリン二量体（ピーク 2）の分離度が他のカラムに比べ高く、高分子量たんぱく質の分離に適していることが分かります。同一カラム、同一条件でチログロブリン試料を測定したクロマトグラムを **図 2** に

2. TSKgel UP-SW Aggregate の基本特性

2-1. 充填剤の特性

表 1 に TSKgel UP-SW Aggregate 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 UP-SW シリーズのカラムとの比較を示します。TSKgel UP-SW Aggregate は、細孔径 30 nm シリカゲル表面にジオール基を導入した粒子径 3 μm の充填剤を充填したカラムです。既存の UP-SW シリーズのカラムに比べ大きい細孔を有し、抗体の凝集体の分離に適しています。

示します。TSKgel UP-SW3000 及び TSKgel UP-SW 2000 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_0 に溶出されています。一方、細孔径の大きい TSKgel UP-SW Aggregate は二量体も細孔内に浸透し三量体以上（凝集体）と分離されています。

標準たんぱく質による較正曲線の比較を **図 3** に示します。分子量 300,000 以上の範囲では、TSKgel UP-SW Aggregate が他のカラムに比べ較正曲線の傾きが緩やかであり、より良好な分離が得られることが示唆されます。

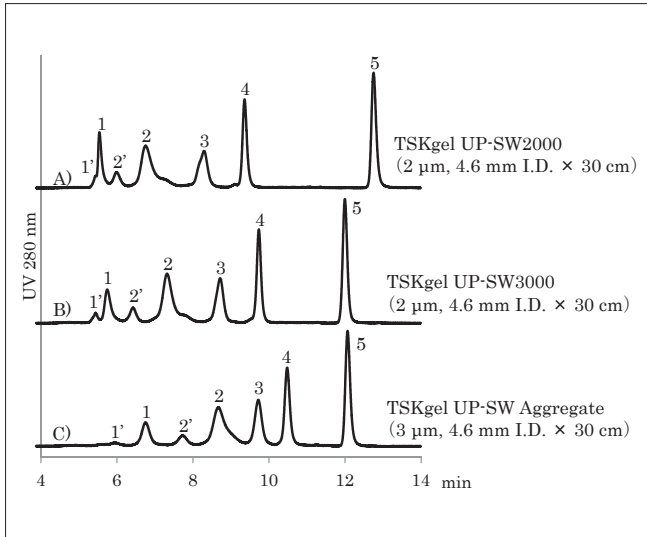


図1 標準たんぱく質のクロマトグラム

〈測定条件〉

- カラム：A) TSKgel UP-SW2000
(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
B) TSKgel UP-SW3000
(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
C) TSKgel UP-SW Aggregate
(3 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (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 °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 標準たんぱく質ピークの見離度(R)の比較

カラム	R(ピーク 1'/1)	R(ピーク 1'/2')	R(ピーク 2'/2)	R(ピーク 2'/3)	R(ピーク 3/4)	R(ピーク 4/5)
TSKgel UP-SW Aggregate	1.58	2.23	1.73	2.17	2.48	6.48
TSKgel UP-SW3000	1.08	2.11	2.21	3.33	3.48	10.34
TSKgel UP-SW2000	—	1.68	1.71	3.08	3.15	15.13

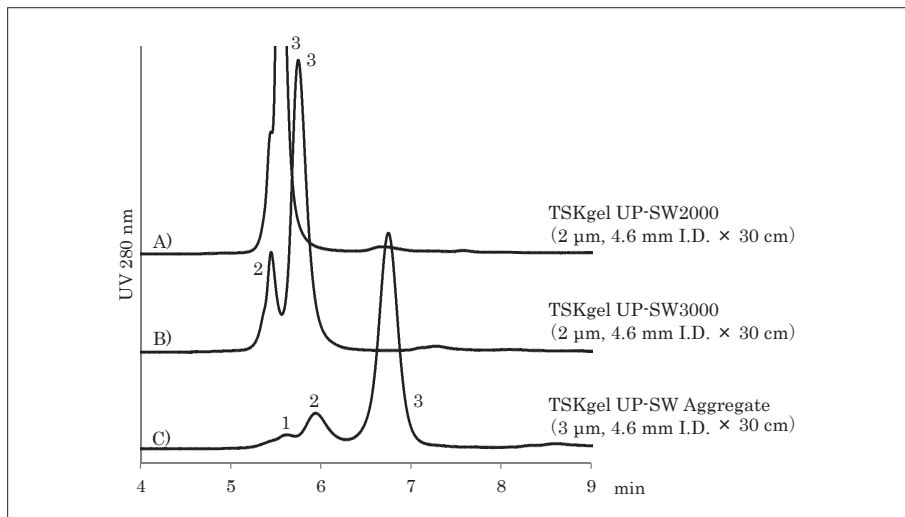


図2 チログロブリンのクロマトグラム

〈測定条件〉

- カラム：A) TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
B) TSKgel UP-SW3000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)
C) TSKgel UP-SW Aggregate (3 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (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 °C

注入量：10 μL

試料：チログロブリン

ピーク 1. 凝集体, 2. 二量体, 3. 単量体

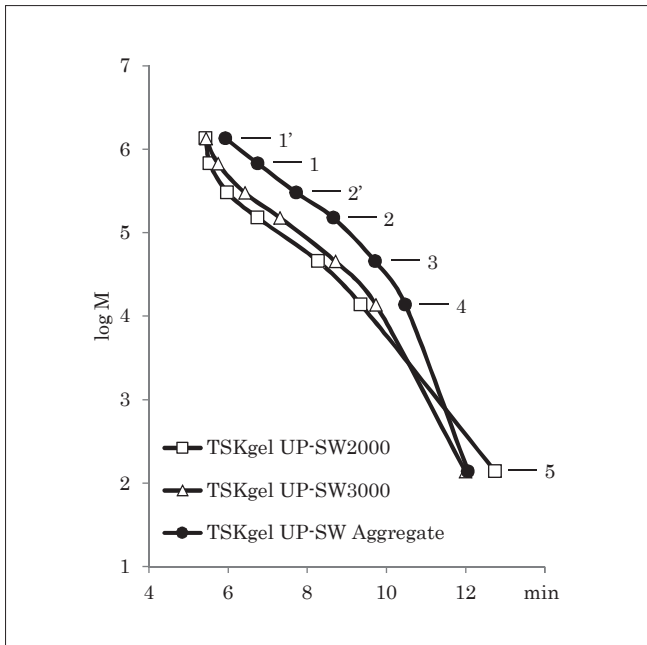


図3 標準たんぱく質による較正曲線

2-3. 溶離液の塩濃度の影響

SECで適切な測定を行うためには、充填剤と測定物質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-SW Aggregateを用いる分析では、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ることで、抑制することが重要となります。

図4に20 mmol/Lりん酸ナトリウム緩衝液（pH 6.7）を用い、硫酸ナトリウムの塩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）、ウシ血清アルブミン（pI 4.9）及び β -ラクトグロブリン（pI 5.2）は、溶離液中で負に荷電してい

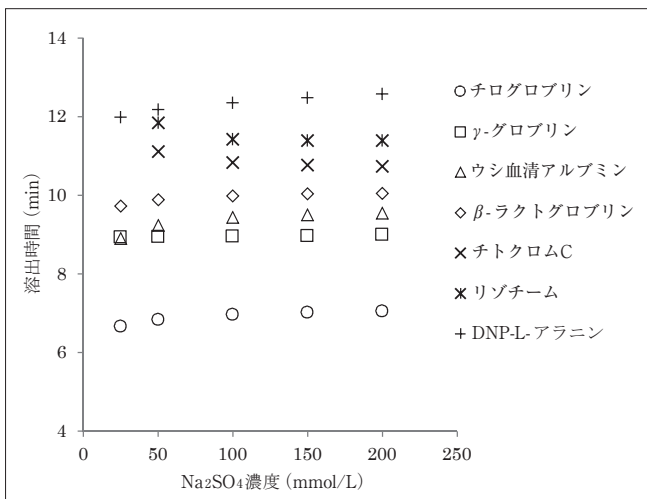


図4 硫酸ナトリウム濃度のたんぱく質の溶出時間への影響

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000（4.6 mm I.D. × 30 cm）
 TSKgel UP-SW3000（4.6 mm I.D. × 30 cm）
 TSKgel UP-SW Aggregate
 （4.6 mm I.D. × 30 cm）

溶離液：100 mmol/Lりん酸ナトリウム緩衝液（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 °C

注入量：10 μ 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. 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

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、静電的相互作用は塩濃度が高いほど抑制されることから、溶離液中の硫酸ナトリウム濃度が高くなるにしたがい、溶出が遅くなり、100 mmol/L以上ではほぼ一定の溶出時間となります。

一方、溶離液のpHよりも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す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。溶離液中の硫酸ナトリウム濃度が高くなるにしたがい、溶出が早くなり、150 mmol/L以上ではほぼ一定の溶出時間となります。

また、ジニトロフェニル（DNP）-L-アラニンのように疎水部を有する化合物は、溶離液中の塩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。

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW Aggregate
 （4.6 mm I.D. × 30 cm）

溶離液：20 mmol/Lりん酸ナトリウム緩衝液（pH 6.7）
 + X 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 °C

注入量：10 μ L

2-4. 測定流速の影響

測定流速による理論段数への影響は、充填剤の粒子径や測定物質の分子サイズ等に依存することが知られています。分子量の異なる2種類のたんぱく質（ウシ血清アルブミン：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影響を確認しました（**図5**）。

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、より高い分離能を得ることができます。

図6にTSKgel UP-SW Aggregateによるモノクローナル抗体二量体と単量体の分離能の流速依存性を示します。測定流速を遅くすることにより、カラム効率が向上し、モノクローナル抗体二量体と単量体の分離能が高くなっています。

また、**図7**に測定流速と圧力損失の関係を示します。TSKgel UP-SW Aggregate（30 cm カラム）は、標準流速（0.35 mL/min）では10 MPa以下の低い操作圧で使用することができます。

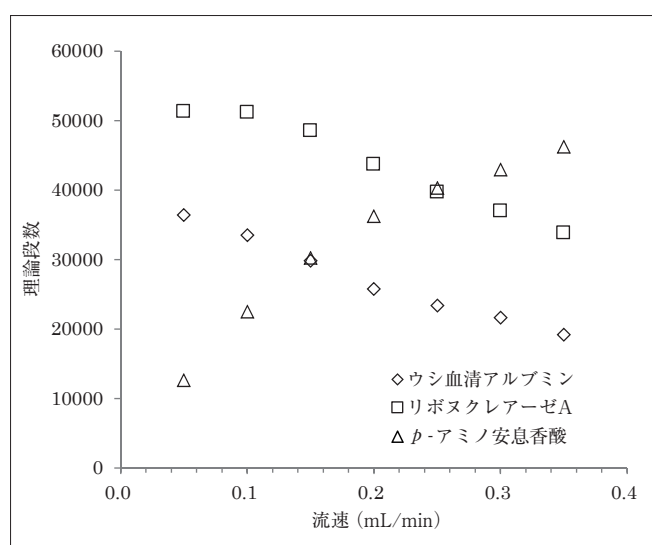


図5 流速の理論段数への影響

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW Aggregate
 (4.6 mm I.D. × 30 cm)
 溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (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：0.05 ~ 0.35 mL/min
 検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 注入量：10 μL
 試料：ウシ血清アルブミン, 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

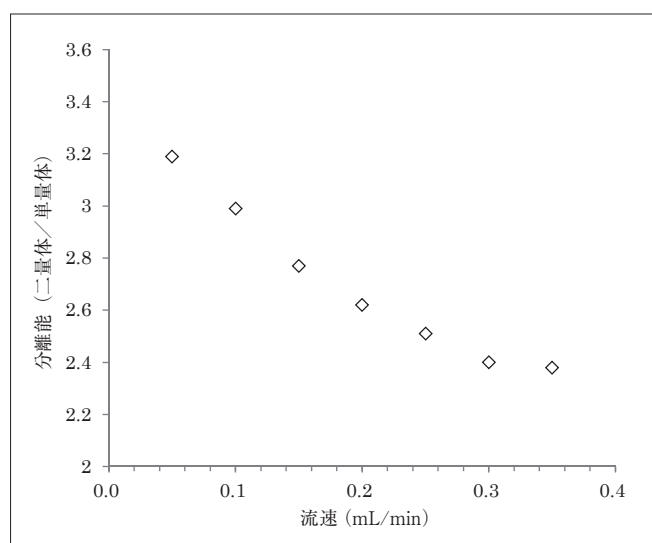


図6 流速の分離能への影響

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW Aggregate
 (4.6 mm I.D. × 30 cm)
 溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (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：0.05 ~ 0.35 mL/min
 検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 注入量：10 μL
 試料：モノクローナル抗体（ヒト）

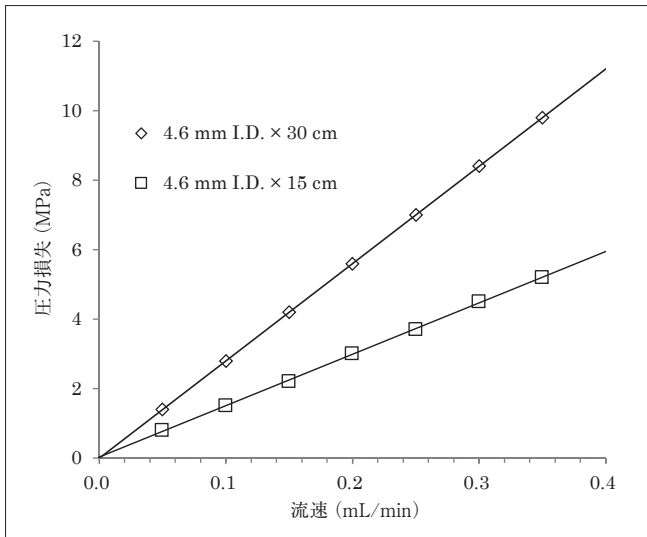


図7 流速と圧力損失の関係

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW Aggregate

(4.6 mm I.D. × 30 cm, 15 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (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：0.05 ~ 0.35 mL/min

温 度：25 °C

2-5. カラムの耐久性

TSKgel UP-SW Aggregate (4.6 mm I.D. × 30 cm、4.6 mm I.D. × 15 cm) で試料を最大使用流速下 (30 cm カラムは 0.35 mL/min、15 cm カラムは 0.50 mL/min) で連続注入した場合のカラムの耐久性について、低分子

化合物の *p*-アミノ安息香酸の溶出挙動により確認しました。各カラムサイズで充填剤 3 ロットについて確認した結果を図 8、9 に示します。両カラムとも 500 回注入した後もカラム性能に顕著な変化は見られず、良好な耐久性を示しています。

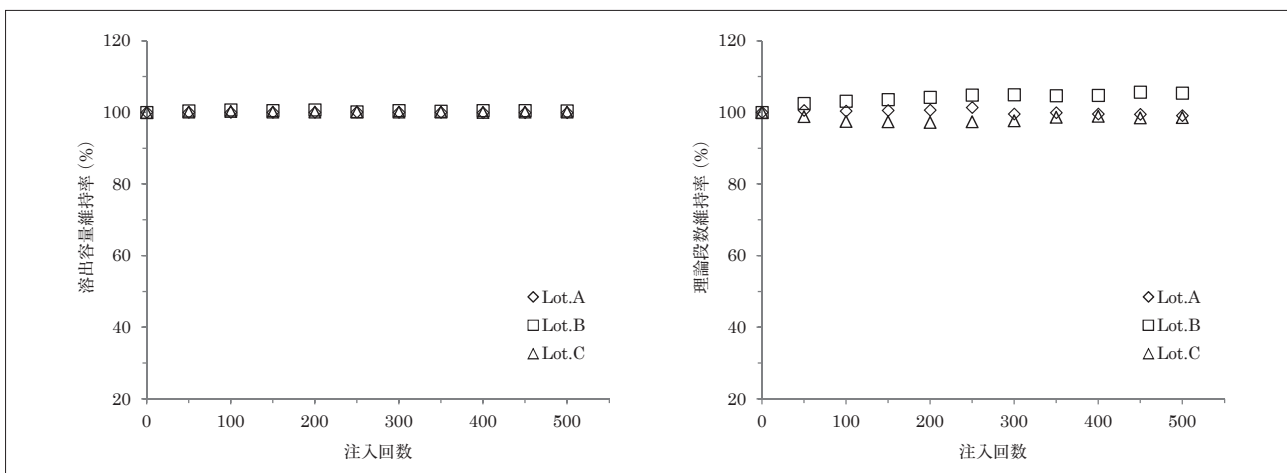


図8 カラムの安定性 (連続注入：30 cm カラム)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW Aggregate (4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (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 °C

注入量：10 μL

試 料：チログロブリン, γ-グロブリン, オブアルブミン, リボヌクレアーゼ A, *p*-アミノ安息香酸

*カラム性能の確認は *p*-アミノ安息香酸で行った。

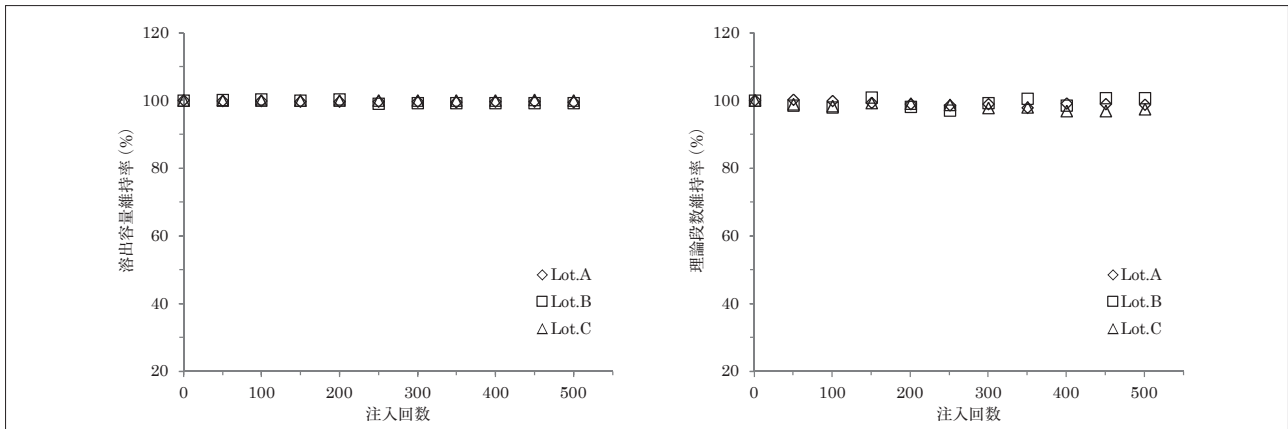


図9 カラムの安定性 (連続注入: 15 cm カラム)

〈測定条件〉

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

溶離液: 100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (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: 0.50 mL/min

検出: UV 280 nm

温度: 25 °C

注入量: 5 μL

試料: チログロブリン, γ-グロブリン, オブアルブミン, リボヌクレアーゼ A, p-アミノ安息香酸

*カラム性能の検査はp-アミノ安息香酸で行った。

3. 分析例

3-1. 抗体の熱処理生成凝集体の分析

TSKgel UP-SW Aggregate および TSKgel UP-SW 3000 を用いて、モノクローナル抗体を熱変性して生じる凝集体の測定を行いました。クロマトグラムを図10に示します。TSKgel UP-SW3000 では、熱変性により生成した凝集体が細孔内に浸透せず、V₀に溶出するた

め、生成した凝集体の分子サイズに関する情報を得ることができません。しかしながら、細孔径の大きい TSKgel UP-SW Aggregate では、生成した凝集体が細孔内に浸透して溶出します。TSKgel UP-SW Aggregate では、クロマトグラムに示されるように、熱処理時間が長くなるとともに、分子サイズの大きい凝集体が増加していることがわかります。

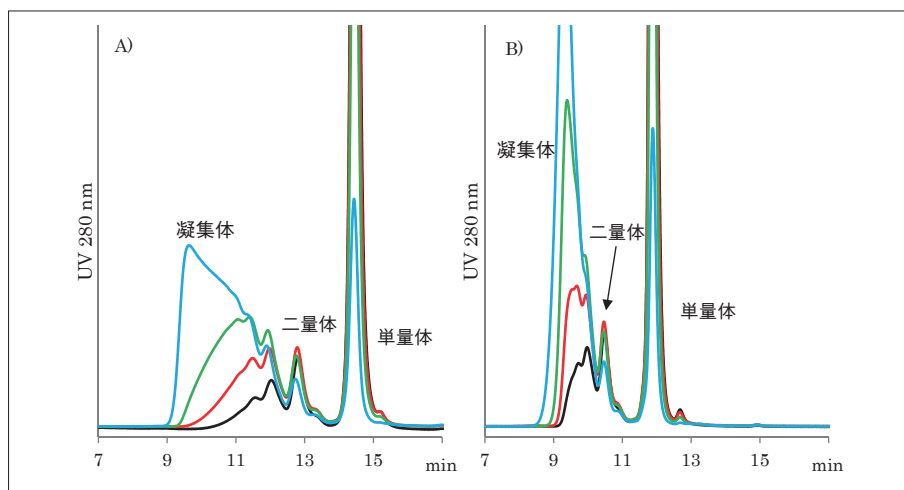


図10 抗体凝集体の経時変化

〈測定条件〉

カラム: A) TSKgel UP-SW Aggregate (3 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

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

溶離液: 40 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7) + 400 mmol/L 過塩素酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流速: 0.20 mL/min

検出: UV 280 nm

温度: 25 °C

注入量: 10 μL

試料: モノクローナル抗体

*反応条件: 70 °C (2時間), 73 °C (2時間), 77 °C (2時間), 80 °C (2時間)

3-2. IgM の分析

TSKgel UP-SW Aggregate、TSKgel UP-SW3000 及び TSKgel UP-SW2000 にて IgM（分子量 900 kDa の 5 量体免疫グロブリン）を測定したクロマトグラムの比較を 図 11 に示します。TSKgel UP-SW3000 及び TSKgel UP-SW2000 では、IgM の凝集体が単量体ピークの前端

に重なって溶出しています。一方で、TSKgel UP-SW Aggregate では、IgM の凝集体と単量体の分離が向上しています。このように、測定対象物の分子サイズに対して適切な細孔径のカラムを選択することで、より精密な分析を行うことが可能です。

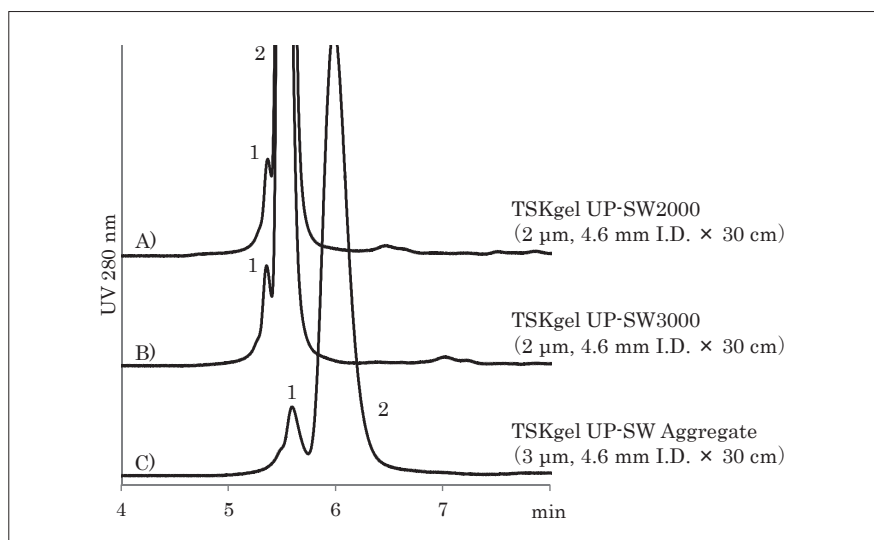


図 11 IgM のクロマトグラム

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW2000 (2 μ m, 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

B) TSKgel UP-SW3000 (2 μ m, 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

C) TSKgel UP-SW Aggregate (3 μ m, 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

溶離液：40 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7) + 400 mmol/L 過塩素酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min

検出：UV 280 nm

温度：25 $^{\circ}$ C

注入量：10 μ L

試料：IgM

1. 二量体, 2. 単量体

3-3. 核酸の分析

TSKgel UP-SW Aggregate、TSKgel UP-SW3000及びTSKgel UP-SW2000にてDNA マーカーを測定したクロマトグラムの比較を図12に示します。TSKgel UP-

SW Aggregate は100塩基対以上の分子サイズ領域において、他のUP-SW カラムに比べてピーク間隔が広く、良好な分離を示します。

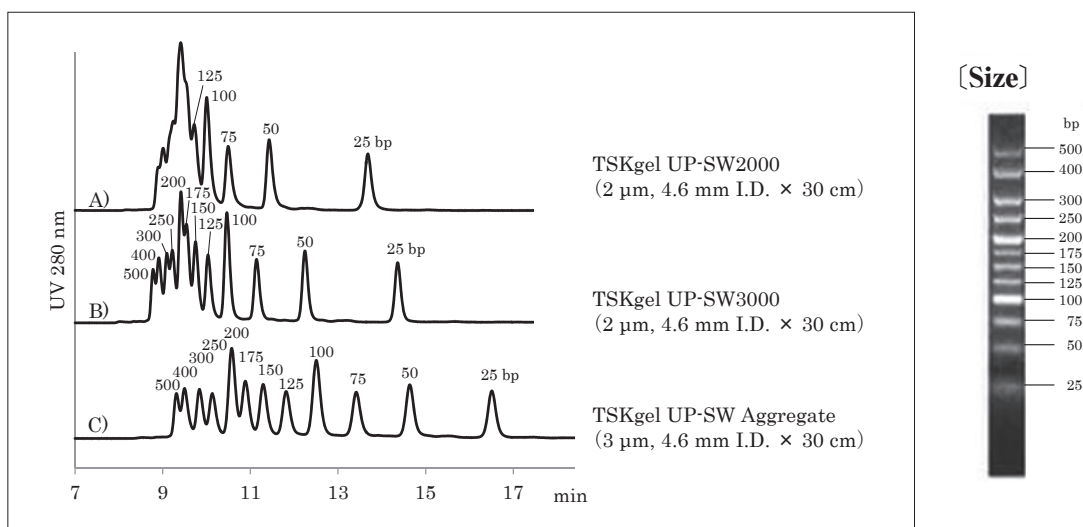


図12 DNA マーカーのクロマトグラム

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW2000 (2 μ m, 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

B) TSKgel UP-SW3000 (2 μ m, 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

C) TSKgel UP-SW Aggregate (3 μ m, 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

溶離液：20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7) + 300 mmol/L 塩化ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.2 mL/min

検出：UV 260 nm

温度：25 $^{\circ}$ C

注入量：10 μ L

試料：DNA Ladder

4. おわりに

以上、TSKgel UP-SW Aggregate について概説しました。本カラムを使用することで、抗体の凝集体の分布

のみならず、IgM や長鎖核酸等の分子サイズの大きい物質について精密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
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

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