



SEPARATION REPORT

TSKgel G3000SW_{XL}を用いた
高性能ゲルろ過クロマトグラフィによる
IgGとアルブミンの分離
(静注用IgG製剤分離への応用)

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 実験条件	1
3. 結果と考察	2
4. おわりに	4

1. はじめに

ヒトガンマ免疫グロブリン(IgG、ポリクローナル)は、静注用血液製剤として、低および無ガンマグロブリン血症や重症感染症における抗生物質との併用、そして特発性血小板減少性紫斑病に対し有効であり、広く臨床分野で応用されています。これらIgG製剤のなかには、安定剤としてアルブミンが添加されているものがあります。⁽¹⁾⁻⁽⁴⁾これらの製剤の品質管理には、製剤中のIgGおよびアルブミンの迅速定量が重要であり、高性能液体クロマトグラフィ(HPLC)が応用されています。

HPLCによるIgGとアルブミンの分離には、数多くの報告があり、イオン交換クロマトグラフィ(IEC)⁽⁵⁾⁻⁽¹¹⁾、ヒドロキシパタイトクロマトグラフィ(HAC)⁽¹²⁾⁽¹³⁾、疎水クロマトグラフィ(HIC)⁽⁹⁾、アフィニティクロマトグラフィ(AFC)⁽¹⁴⁾⁻⁽¹⁷⁾の分離モードが使用されています。しかしいずれの分離モードにおいても分離時間が長く、グラジエント溶出法を使用しているため、簡便で迅速定量が要求される品質管理には適しません。一方、ゲルろ過クロマトグラフィ(GFC)は、分離能は劣るものの操作法が簡単で、IgGの分離も報告されており⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽¹⁸⁾⁻⁽²⁰⁾、品質管理にも広く利用されています。GFCを用いたタンパク質の溶離条件を検討した報告はありますが⁽²¹⁾⁻⁽²⁷⁾、IgGとアルブミンの分離条件の詳細な検討は、未だなされていません。ごく最近Leeら⁽¹⁸⁾はアルブミンを含む静注用IgG製剤の分離について検討していますが、分離にはIECとGFCの2段階クロマトグラフィを使用し、分析に2時間を要しています。

今回、当社ではゲルろ過法だけを用い、短時間で高分離能を得ることを目的として、高性能GFCカラムTSKgel G3000SWXL⁽²⁹⁾を用いてIgGとアルブミンの分離における溶離条件の検討を行い、IgG製剤の分離に良好な結果を得ましたので報告いたします。

2. 実験条件

HPLCシステムには、コンピュータコントロールエクセレントポンプCCPE、紫外可視検出器UV-8010を用い、検出は280nmで行ないました。カラムはTSKgel G3000SWXL(300×7.8mmI.D.)を用いました。溶離液には、リン酸バッファー、酢酸バッファー、クエン酸バッファーを用い、塩にはNa₂SO₄、NaCl、NaClO₄を用い、pH5.0からpH7.0のバッファーを使用して溶離条件を検討しました。全ての測定は、流速1.0ml/min、25℃で行ないました。

溶離条件の検討は、それぞれ100μgのIgGおよびアルブミンで行ないました。IgG製剤のカラムからの回収率は、クロマトグラムのピーク面積から計算しました。

IgGとアルブミンの分離能(Rs)は、以下の式より求めました。

$$R_s = \frac{2(V_2 - V_1)}{W_1 + W_2} \cdot \frac{1}{\log[MW_1] - \log[MW_2]}$$

V₁ : IgGモノマーの溶出容量(ml)

V₂ : アルブミンモノマーの溶出容量 (ml)

W₁ : IgGモノマーのピーク幅(ml)

W₂ : アルブミンモノマーのピーク幅 (ml)

MW₁ : IgGモノマーの分子量

MW₂ : アルブミンモノマーの分子量

精製ヒトIgGはマイルズ社、精製ヒトアルブミンはシグマ社より市販されているものを用いました。

IgG製剤であるヴェノグロブリン-Iはミドリ十字、ヴェニロンは藤沢薬品、ガンマガードはバクスター社より市販されているものを用いました。IgG製剤中のIgGとアルブミンの比は、それぞれ5:1、20:1、50:1と表示されていました。

3. 結果と考察

図-1にIgGとアルブミンのカラムからの溶出容量の差に対する、リン酸バッファー溶離液のpHおよび塩の影響を示します。

溶離液の塩濃度は、イオン強度がほぼ等しくなるように調整されています。0.3MNaClおよび0.3MNaClO₄を塩に用いた場合、IgGとアルブミンの溶出容量の差はほぼ同じであり、溶離液のpHの影響もあまり認められませんでした。一方、0.1MNa₂SO₄を塩に用いた場合は、溶出容量の差が大きく、pHが低くなるにつれて差は大きくなりました。これはIgGの溶出位置があまり移動しないのに比べ、アルブミンの溶出位置が遅れていくことに起因しています。しかしpH4.0の溶離液を用いた場合、アルブミンのピークが広がり、IgGとアルブミンの分離は不十分になりました。したがってIgGとアルブミンの分離には、Na₂SO₄を塩に含むpH5.0の溶離液が適していると言えます。バッファーの種類について、リン酸バッファー、酢酸バッファー、クエン酸バッファーを用いて分離を検討したところ、ごくわずかながらリン酸バッファー溶液が良いという結果が得られました。

図-2にリン酸バッファー溶液(pH5.0および6.0)を用いた場合におけるIgGとアルブミンの分離能のNa₂SO₄濃度依存性を示します。

pH6.8の溶離液での検討も行ないましたが、分離能は低く、Rsは計算できませんでした。分離は明らかにpH5.0の溶離液を用いた方が高いことがわかります。分離能の塩濃度依存性はpH6.0の場合の方が大きく、いずれのpHでもNa₂SO₄が0.1Mの場合、最も分離能が高くなりました。塩濃度が0.1M以上では分離能は下がり、0.2M以上ではRsはもはや計算できなくなりました。0.5M以上では、充てん剤と試料の間の疎水的相互作用が顕著になり、ピークは広がり、溶出も遅れました。また、塩濃度が0.1M以下の場合もイオンの相互作用の影響で分離能は下がりました。

以上の結果からIgGとアルブミンの分離は、50mMリン酸バッファー溶液(pH5.0)に0.1MNa₂SO₄を含む溶離液が最も分離が良いことがわかりました。

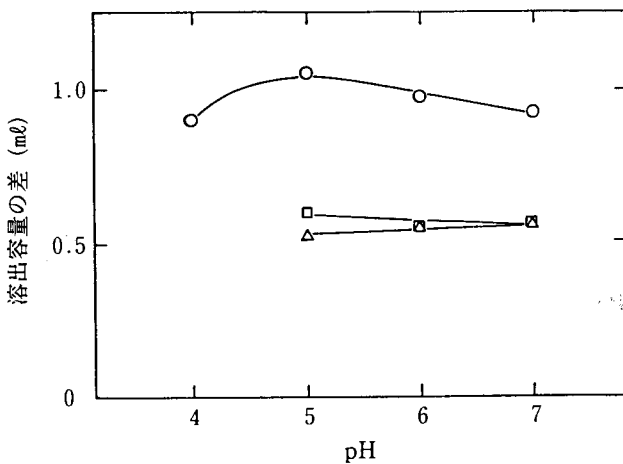


図-1 IgGとアルブミンの分離に対する溶離液の塩とpHの影響

IgGおよびアルブミンは0.1MNa₂SO₄(○)、0.3MNaCl(□)または0.3MNaClO₄(△)を塩に含む種々のpHの50mMリン酸バッファーで溶出した。

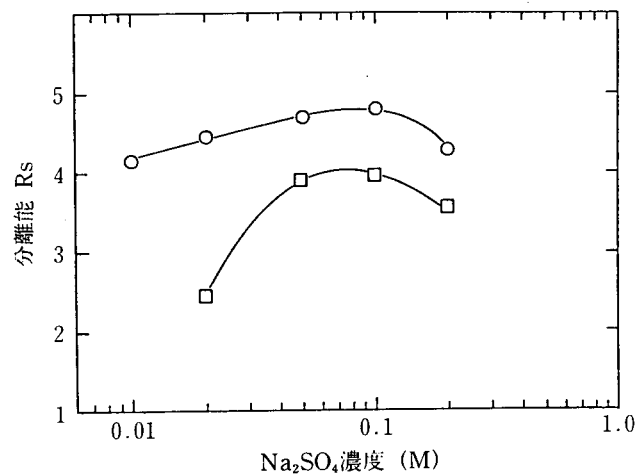


図-2 IgGとアルブミンの分離に対する溶離液中のNa₂SO₄濃度の影響

IgGおよびアルブミンは種々の濃度のNa₂SO₄を含む50mMリン酸バッファー、pH5.0(○)またはpH6.0(□)で溶出した。

図-3、4、5に今回得られた最適溶離条件でのIgG製剤の分離を、これまでのGFCの一般的溶離条件である、0.3MNaClを含む50mMリン酸バッファー(pH6.8)の溶離液での分離と比較して示します。図-3には、IgG-アルブミン比が50:1の試料の分離を示します。従来の一時的溶離条件ではアルブミンのピークはIgGピークに隠れてわずかにショルダーとしてしか認められませんが今回得られた条件では、アルブミンがピークとして検出できるようになっています。図-4、5では、従来の一時的溶離条件でもアルブミンのピークは認められますが、

今回得られた最適溶離条件では、より明確になっています。IgG-アルブミンの量比に比べクロマトグラムのピーク面積比が大きいのは、IgGの280nmの吸光係数がアルブミンのそれよりも約3倍高いためと考えられます。またIgGダイマーとモノマーも良好に分離されていることがわかります。分析時間は15分以内であり、回収率もすべて92%以上でした。

カラムの耐久性については、200回の試料注入でも分離に影響はありませんでした。

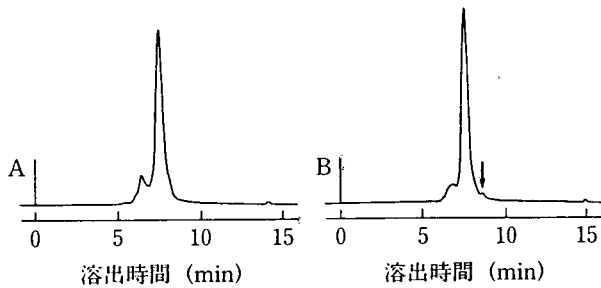


図-3 アルブミン含有静注用IgG製剤の分離

カラム：TSKgel G3000SWXL(7.8mmID×30cm)

試料：ガンマガード(50mg/ml、5μl)

溶離液：A；50mMリン酸バッファー(pH6.8)
+0.3MNaCl

B；50mMリン酸バッファー(pH5.0)
+0.1MNa₂SO₄

流速：1.0ml/min

温度：25°C

検出：UV(280nm)

回収率：A；102%、B；96%

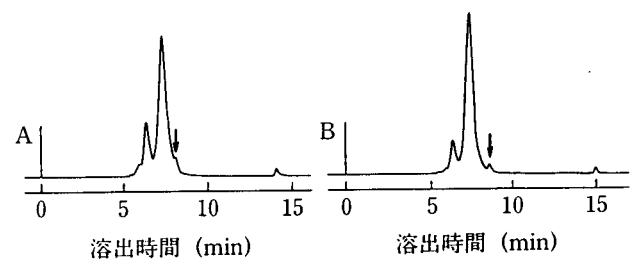


図-4 アルブミン含有静注用IgG製剤の分離

カラム：TSKgel G3000SWXL(7.8mmID×30cm)

試料：ヴェニロン(50mg/ml、5μl)

溶離条件：図-3に同じ

回収率：A；94%、B；92%

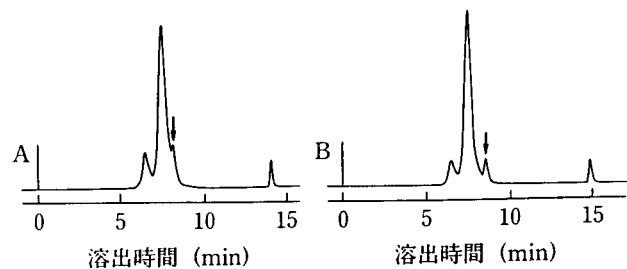


図-5 アルブミン含有静注用IgG製剤の分離

カラム：TSKgel G3000SWXL(7.8mmID×30cm)

試料：ヴェノグロブリン-I(50mg/ml、5μl)

溶離条件：図-3に同じ

回収率：A；100%、B；101%

4. おわりに

TSKgel G3000SWXLにおいて0.1MNa₂SO₄を含む50 mMリン酸ナトリウム(pH5.0)を溶離液に用いて、免疫グロブリン製剤中のIgGとアルブミンを迅速かつ高分離能で定量的に分離することができました。TSKgel G3000SWXLは、品質管理としての血液製剤の分離のみならず、今回得られた溶離条件を用いてマウス腹水中のモノクローナル抗体のアルブミンとの分離等に十分応用できると考えられます。

References

- (1) Y. Masuho, K. Tomibe, K. Matuzawa and A. Ohtsu, *Vox Sang*, 32(1977) 175
- (2) Y. Masuho, K. Tomibe, T. Watanabe and Y. Fukumoto, *Vox Sang*, 32(1977) 290
- (3) T. Doi, T. Nakajima, M. Nishida and T. Suyama, *Chem. Pharm. Bull.*, 26(1978) 3492
- (4) M. Kato, K. Kadota and T. Okuda, *The Japanese J. Antibiotics*, 38(1985) 2688
- (5) S. W. Burchiel, J. R. Billman and T. R. Alber, *J. Immunol. Methods*, 69(1984) 33
- (6) P. Clezardin, J. L. McGregor, M. Manach, H. Bouderche and M. Dechavanne *J. Chromatogr.*, 319(1985) 67
- (7) J. R. Deschamps, J. E. K. Hildreth, D. Derr and J. T. August, *Anal. Biochem.*, 147(1985) 451
- (8) M-J. Gemski, B. P. Doctor, M. K. Gentry, M. G. Pluskal and M. P. Strickler *Bio Techniques*, 3(1985) 378
- (9) B. Pavlu, U. Johansson, C. Nyhlen and A. Wichman, *J. Chromatogr.*, 359(1986) 449
- (10) D. R. Nau, *Bio Chromatogr.*, 1(1986) 82
- (11) P. Gallo, A. Siden and B. Tivolato, *J. Chromatogr.*, 416(1987) 53
- (12) T. L. Brooks and A. Stevens, *International Lab.*, Nov/Dec, (1985) 72
- (13) Y. Yamakawa and J. Chiba, *J. Liquid Chromatogr.*, 11(1988) 665
- (14) T. M. Phillips, N. S. More, W. D. Queen, T. V. Holohan, N. C. Kramer and A. M. Thompson, *J. Chromatogr.*, 317(1984) 173
- (15) P. Formstecher, H. Hammadi, N. Bouzerna and M. Dautrevaux, *J. Chromatogr.*, 369(1986) 379
- (16) P. Skolnick and S. M. Paul, *J. Chromatogr.*, 382(1986) 264
- (17) D. S. Hage and R. R. Walters, *J. Chromatogr.*, 386(1987) 37
- (18) P. Parham, M. J. Androlewicz, F. M. Brodsky, N. J. Holes and J. P. Ways, *J. Immunol. Methods*, 53(1982) 133
- (19) P. Parham, *J. Immunol.* 131(1983) 2895
- (20) G. San, G. Schneider, S. Loeke and H. W. Doerr, *J. Immunol. Methods*, 59(1983) 121
- (21) J. K. Lee, F. J. Deluccia, E. L. Kelly, C. Davidson and F. R. Borger *J. Chromatogr.*, 444(1988) 141
- (22) D. E. Schmidt, Jr., R. W. Giese, D. Conron and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, 52(1980) 177
- (23) E. Pfannkoch, K. C. Lu, F. E. Regnier and H. G. Barth, *J. Chromatogr.*, 18(1980) 430
- (24) H. Engelhardt and D. Mathes, *Chromatographia*, 14(1981) 325
- (25) W. Kopaciewicz and F. E. Regnier, *Anal. Biochem.*, 126(1982) 8
- (26) D. Ratge and H. Wisser, *J. Chromatogr.*, 230(1982) 47
- (27) Y. Kato and T. Hashimoto, *HRC & CC*, 6(1983) 45
- (28) Y. Kato and T. Hashimoto, *HRC & CC*, 6(1983) 325
- (29) Y. Kato, Y. Yamasaki, H. Moriyama, K. Tokunaga and T. Hashimoto *J. Chromatogr.*, 404(1987) 333