

高性能 SEC カラム TSKgel[®] UP-SW3000-LS について

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel UP-SW3000-LS の基本特性	1
2 - 1. 充填剤、カラムの仕様	1
2 - 2. カラムの分離特性	2
2 - 3. たんぱく質のカラムへの吸着特性	3
2 - 4. 光散乱検出器での分析	4
2 - 5. 測定流速の影響	5
2 - 6. カラムの耐久性	6
2 - 7. 充填剤のロット間差	8
3. 応用例	8
4. 光散乱検出器での使用上の注意点	9
5. おわりに	9

1. はじめに

抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品は、たんぱく質、核酸、多糖などの高分子を利用した医薬品で、通常の医薬品と比較して分子サイズが大きいことから高分子医薬品とも呼ばれます。高分子を利用しているために変性や分解を受けやすい特性をもち、製造工程や保管・輸送において凝集体やフラグメントなどのサイズバリエーションが生じ、これらが免疫原性を示す可能性があることも指摘されています。そのため、サイズバリエーションの含量は重要品質特性（CQA；Critical Quality Attribute、医薬品の品質を保証するために必要な特性または性質）の1つに挙げられており、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）が広く用いられています。さらに近年では紫外可視吸光度検出器（UV 検出器）に加え、絶対分子量や分子サイズが直接評価可能な光散乱検出器を用いることも推奨されています。

今回たんぱく質などの初期吸着を低減し、かつ光散乱検出器への適用が可能な高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW3000-LS を商品化いたしました。本稿では、TSKgel UP-SW3000-LS の基本特性と分離例を紹介いたします。

2. TSKgel UP-SW3000-LS の基本特性

2-1. 充填剤、カラムの仕様

表 1 に TSKgel UP-SW3000-LS の充填剤の特性、カラム仕様及び既存の TSKgel UP-SW3000 との比較を示します。TSKgel UP-SW3000-LS 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 TSKgel UP-SW3000 と同様に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ることに加えて、たんぱく質試料の初期吸着が低減され、かつカラムシェディングが少なく光散乱検出器へ容易に適用できます。

カラムサイズは、4.6 mm I.D. \times 30 cm の高分離分析用と 4.6 mm I.D. \times 15 cm の高速分析用があります。

表 1 充填剤、カラムの仕様

	本カラム		既存カラム	
品名	TSKgel UP-SW3000-LS		TSKgel UP-SW3000	
カラムサイズ	4.6 mm I.D. \times 30 cm	4.6 mm I.D. \times 15 cm	4.6 mm I.D. \times 30 cm	4.6 mm I.D. \times 15 cm
基材	シリカゲル		シリカゲル	
官能基	ジオール		ジオール	
粒子径	2 μm		2 μm	
細孔径	25 nm		25 nm	
排除限界分子量 (たんぱく質)	800 kDa		800 kDa	
分子量測定範囲 (たんぱく質)	10 ~ 500 kDa		10 ~ 500 kDa	
保管溶媒	20 % エタノール水溶液		0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 + 0.1 mol/L 硫酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム (pH 6.7) 又は 0.05 % アジ化ナトリウムを含む緩衝液	
用途	抗体（二量体 / 単量体 / フラグメント）の高速分離分析	抗体（二量体 / 単量体）の高速分析	抗体（二量体 / 単量体 / フラグメント）の高速分離分析	抗体（二量体 / 単量体）の高速分析
	光散乱検出器での分析			

2-2. カラムの分離特性

TSKgel UP-SW3000-LS 及び TSKgel UP-SW3000 について、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。TSKgel UP-SW3000-LS は既存の TSKgel UP-SW3000 と同様の分離選択性を有しており、

同等の較正曲線を有していることがわかります。

また、図 1 における各ピークの見分け度 (R) を表 2 に、カラムの理論段数を表 3 に示します。TSKgel UP-SW3000-LS は、既存の TSKgel UP-SW3000 と比べてたんぱく質の見分け度が同等であり、理論段数が同等以上であることがわかります。

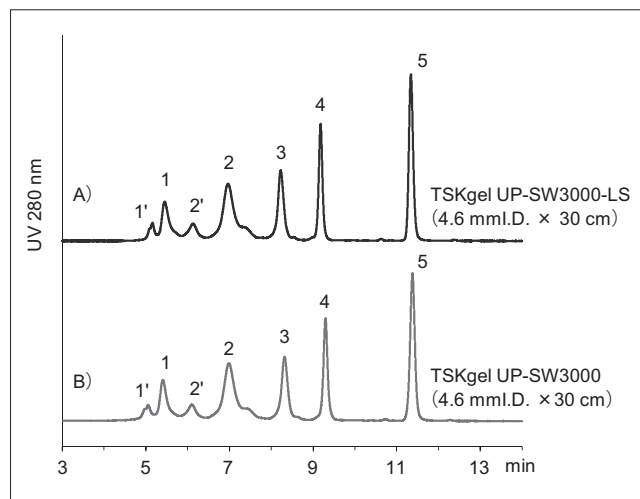


図 1 標準たんぱく質のクロマトグラム

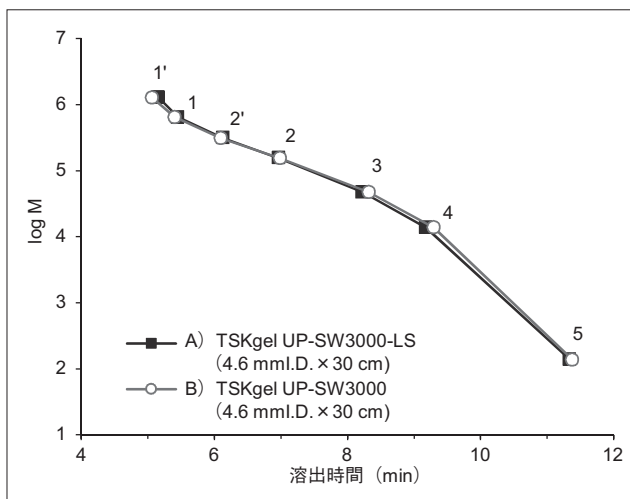


図 2 標準たんぱく質の較正曲線

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW3000-LS

B) TSKgel UP-SW3000

カラムサイズ：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 (MW 640,000) (1'. チログロブリン二量体)

2. γ-グロブリン (MW 155,000) (2'. γ-グロブリン二量体)

3. オブアルブミン (MW 47,000)

4. リボヌクレアーゼ A (MW 13,700)

5. p-アミノ安息香酸 (MW 137)

表 2 カラム性能の比較 (分離度 R)

カラム	分離度 R			
	ピーク 1/2	ピーク 2/3	ピーク 3/4	ピーク 4/5
A) TSKgel UP-SW3000-LS	4.05	3.70	4.43	12.60
B) TSKgel UP-SW3000	4.01	3.46	4.07	10.29

表3 カラム性能の比較 (理論段数)

カラム	理論段数	
	リボヌクレアーゼ A (ピーク 4)	p-アミノ安息香酸 (ピーク 5)
A) TSKgel UP-SW3000-LS	51,595	58,233
B) TSKgel UP-SW3000	43,340	48,455

2-3. たんぱく質のカラムへの吸着特性

TSKgel UP-SW3000-LS の保管溶媒には、既存の TSKgel SW カラムとは異なり、20 % エタノール水溶液を推奨しています (表 1)。20 % エタノール水溶液で保管するメリットとしては、カラム保管安定性の向上やカラム内への移動相由来の塩結晶の蓄積防止 (カラムシェディングの増加防止)、アジ化ナトリウム不使用などが挙げられます。しかし、20 % エタノール水溶液で保管する場合、試料の初期吸着が発生する可能性が考えられたことから、低濃度のたんぱく質 (チログロブリン: Mw 640,000、 γ -グロブリン: Mw 155,000、オブアル

ブミン: Mw 47,000) を試料とした場合の初期吸着を検証しました。20 % エタノール水溶液で 4 CV (カラム容量) 通液したカラムを溶離液に置換した後に試料を連続 10 回注入し、注入 10 回目 (プラトー) と注入 1 回目のピーク面積値を比較することで、カラムへの吸着率を確認しました。TSKgel UP-SW3000-LS、TSKgel UP-SW3000 及び市販の UHPLC 用 SEC カラムを用い、検証した結果を図 3 に示します。TSKgel UP-SW3000-LS は、TSKgel UP-SW3000 や市販の UHPLC 用 SEC カラムと比べて、たんぱく質の初期吸着が低減されていることがわかります。

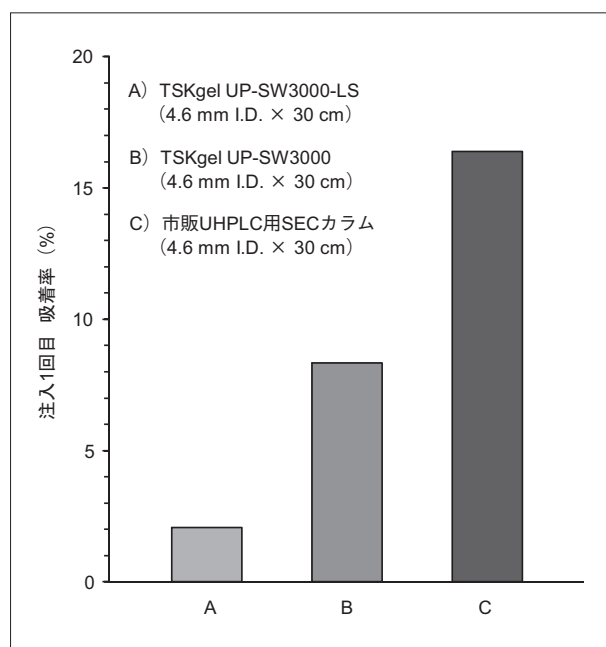


図3 たんぱく質のカラムへの吸着率

〈測定条件〉

カラム: A) TSKgel UP-SW3000-LS

B) TSKgel UP-SW3000

C) 市販 UHPLC 用 SEC カラム

カラムサイズ: 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 μ L

試料: 1. チログロブリン (MW 640,000)、0.05 g/L

2. γ -グロブリン (MW 155,000)、0.1 g/L

3. オブアルブミン (MW 47,000)、0.1 g/L

2-4. 光散乱検出器での分析

TSKgel UP-SW3000-LS 及び市販のUHPLC用SECカラムについて、ウシ血清アルブミンを測定したクロマトグラムを図4に示します。TSKgel UP-SW3000-LSは、市販のUHPLC用SECカラムに比べてベースラインノイズが少なく、また、インジェクションピークが観察されないことから光散乱検出器を用いた測定にも適してい

ることがわかります。

また、異なるロットの充填剤を充填したTSKgel UP-SW3000-LSについて、ウシ血清アルブミンを測定したクロマトグラムの比較を図5に示します。いずれのカラムもベースラインノイズが少なく、ロット間差も小さいことがわかります。

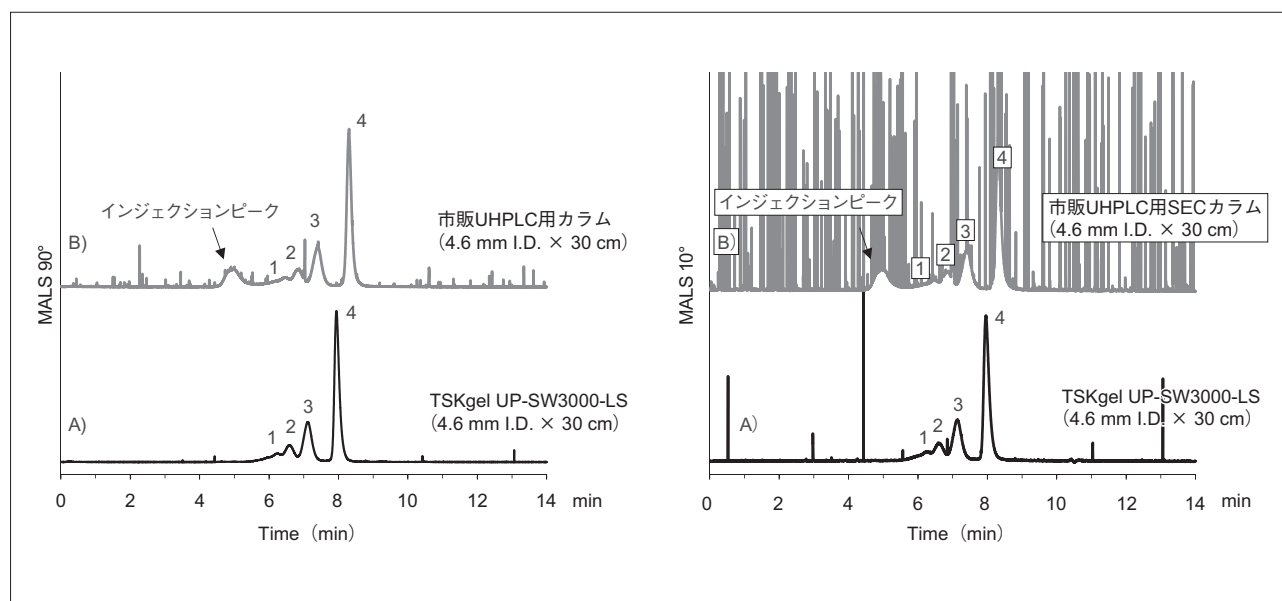


図4 ウシ血清アルブミンのクロマトグラム（光散乱分析，製品比較）

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW3000-LS

B) 市販UHPLC用SECカラム

カラムサイズ：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：MALS 10°, 90°

温度：25 °C

注入量：10 μL

試料：ウシ血清アルブミン (MW 66,500)

1. 凝集体, 2. 三量体, 3. 二量体, 4. 単量体

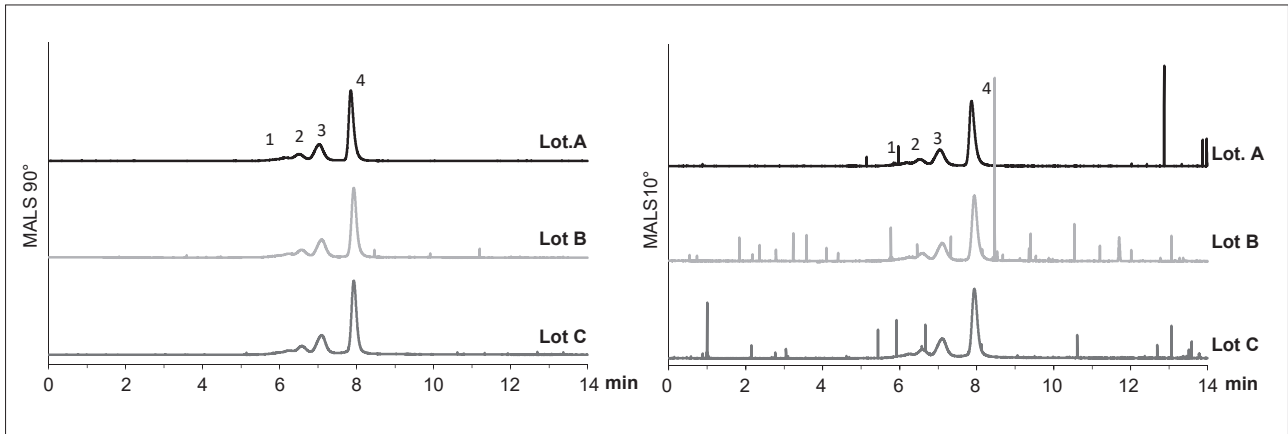


図5 ウシ血清アルブミンのクロマトグラム (光散乱分析, 充填剤ロット間差)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000-LS

カラムサイズ：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：MALS 10°, 90°

温度：25 °C

注入量：10 μL

試料：ウシ血清アルブミン (MW 66,500)

1. 凝集体, 2. 三量体, 3. 二量体, 4. 単量体

2-5. 測定流速の影響

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) における、測定流速と理論段数の関係を図6に示します。拡散係数が大きい低分子の *p*-アミノ安息香酸では、測定流速が高くなるほど理論段数が高くなることがわかりま

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カラム効率が向上し、理論段数が高くなることがわかります

また、図7に測定流速と圧力損失の関係に示します。TSKgel UP-SW3000-LS (4.6 mm I.D. × 30 cm) 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可能です。

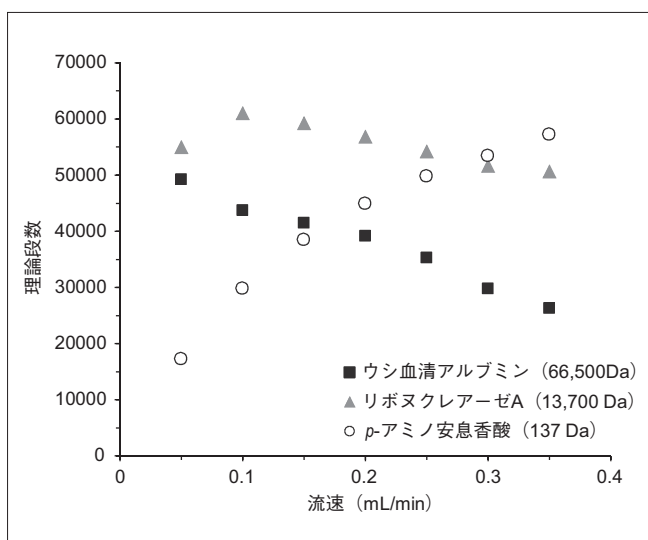


図6 測定流速と理論段数の関係

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000-LS

カラムサイズ：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. ウシ血清アルブミン (MW 66,500)

2. リボヌクレアーゼ A (MW 13,700)

3. *p*-アミノ安息香酸 (MW 137)

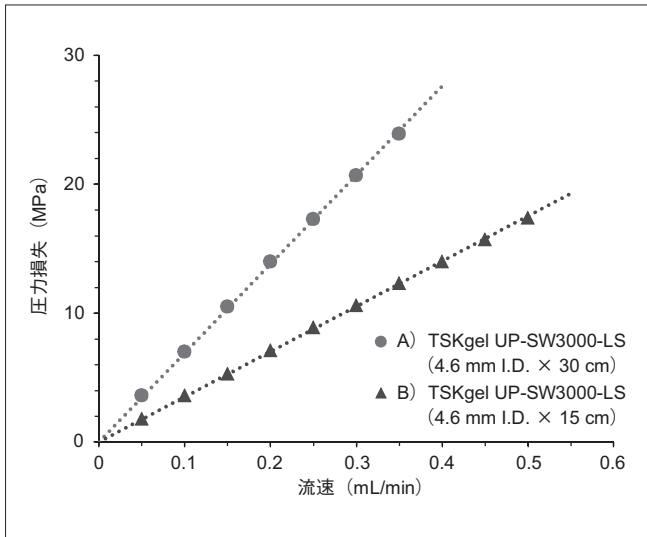


図7 測定流速と圧力損失の関係

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000-LS

カラムサイズ：A) 4.6 mm I.D. × 30 cm

B) 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：0.05 ~ 0.50 mL/min

温度：25 °C

2-6. カラムの耐久性

カラムサイズ 4.6 mm I.D. × 30 cm 及び 4.6 mm I.D. × 15 cm について、最大使用流速（30 cm カラム：0.35 mL/min、15 cm カラム：0.50 mL/min）にて *p*-アミノ安息香酸を連続測定した場合の試料測定回数と理論段数

の関係を図8、9に示します。また、30 cm カラムにて γ -グロブリンを連続注入した場合の100回毎のクロマトグラムを図10に示します。500回測定後のカラム性能やクロマトグラムにおいても顕著な変化は認められず、良好な耐久性を有することがわかります。

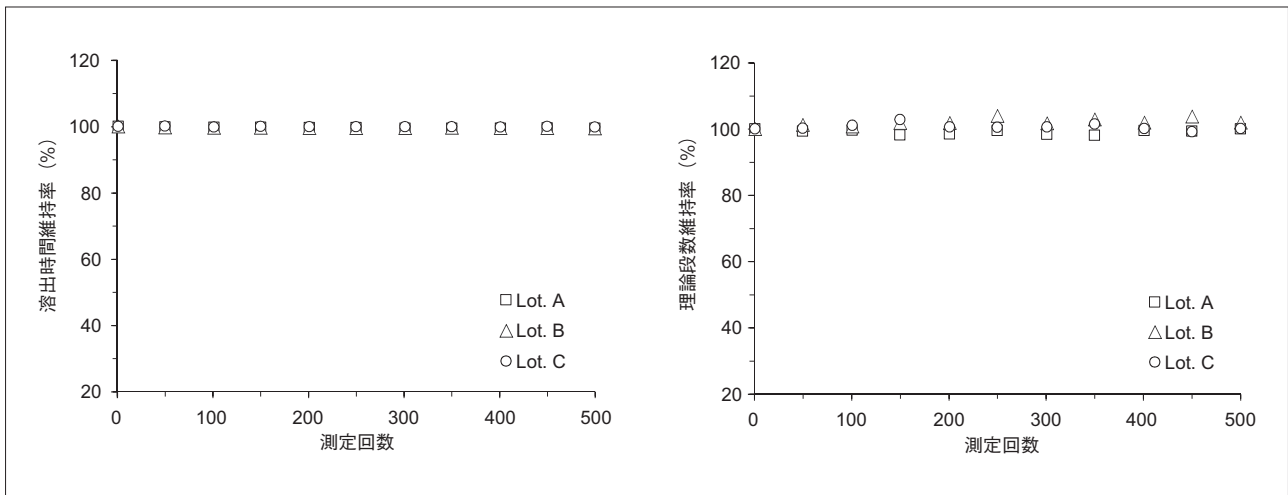


図8 測定回数と維持率の関係 (4.6 mm I.D. × 30 cm)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000-LS

カラムサイズ：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 μ L

試料：*p*-アミノ安息香酸 (MW 137)

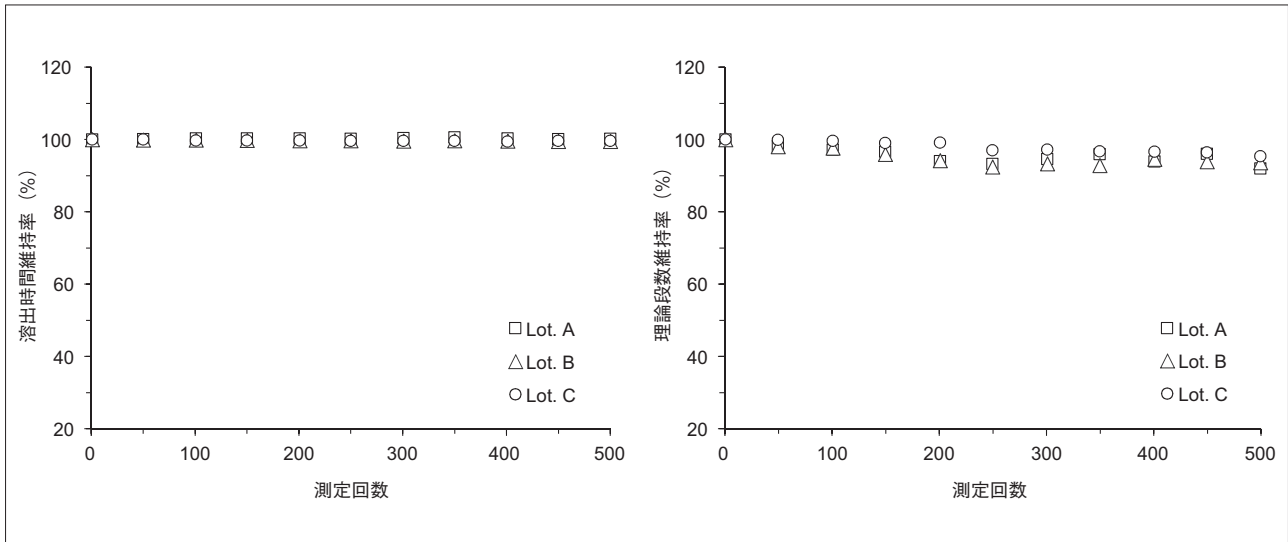


図9 測定回数と維持率の関係 (4.6 mm I.D. × 15 cm)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000-LS

カラムサイズ：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：*p*-アミノ安息香酸 (MW 137)

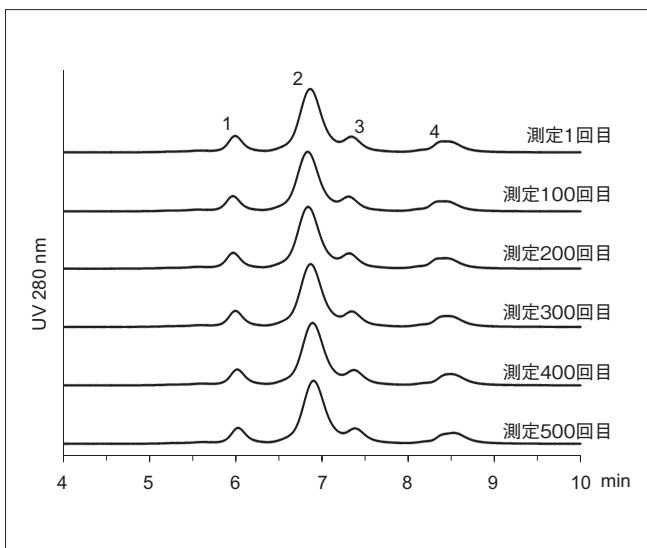


図10 連続測定時のクロマトグラム (4.6 mm I.D. × 30 cm)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000-LS

カラムサイズ：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：γ-グロブリン

1. 二量体, 2. 単量体, 3. フラグメント

2-7. 充填剤のロット間差

異なるロットの充填剤を充填したカラムについて、標準たんぱく質を測定したクロマトグラムの比較を図 11

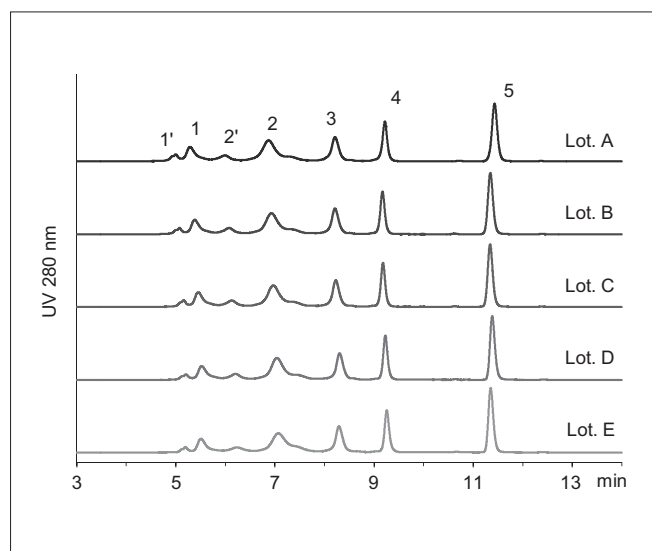


図 11 標準たんぱく質のクロマトグラム (充填剤ロット間差)

に示します。各カラムのピーク形状、溶出位置の差が小さいことから、ロット間差が小さく製造再現性が高い充填剤であることがわかります。

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000-LS

カラムサイズ：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 (MW 640,000)

(1'. チログロブリン二量体)

2. γ-グロブリン (MW 155,000)

(2'. γ-グロブリン二量体)

3. オブアルブミン (MW 47,000)

4. リボヌクレアーゼ A (MW 13,700)

5. p-アミノ安息香酸 (MW 137)

3. 応用例

TSKgel UP-SW3000-LS を用いて、ヒト化モノクローナル抗体を紫外吸光度検出器 (UV)、多角度光散乱検出器 (MALS) にて測定したクロマトグラムを図 12 に示します。各検出器において凝集体、二量体、単量体の各

ピークが分離されていることに加え、ノイズレベルが低いことから光散乱分析への適用が可能であることがわかります。また、より高分子量である凝集体は、光散乱検出器において高い強度で観測されるため、解析が容易であることがわかります。

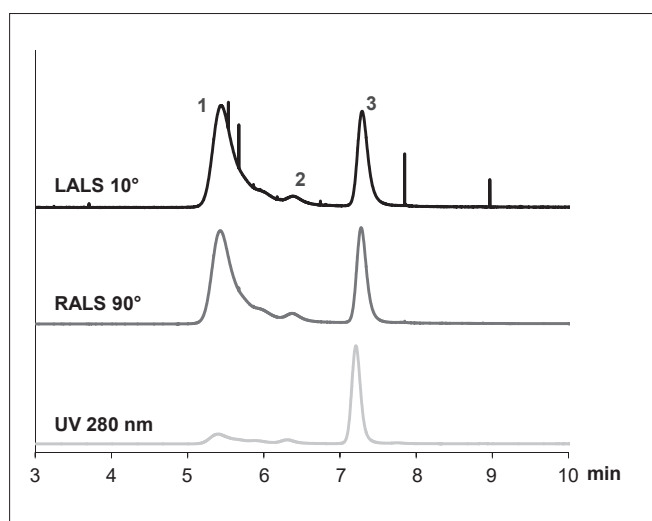


図 12 ヒト化モノクローナル抗体のクロマトグラム

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW3000-LS

カラムサイズ：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, MALS 10°, 90°

温度：25 °C

注入量：10 μL

試料：ヒト化モノクローナル抗体 (MW 150,000)

1. 凝集体, 2. 二量体, 3. 単量体

4. 光散乱検出器での使用上の注意点

表4に検出器として光散乱検出器を適用する際の注意点を示します。

表 4. 光散乱検出器での使用上の注意点

システム	<p>1. 使用前の装置洗浄（カラムを接続する前に実施） 装置洗浄に使用する溶液は、使用前に細孔径 0.2 μm 以下のフィルターでろ過をすることをお勧めします。</p> <p>1) 十分に系内洗浄がなされているシステムの場合 純水を 30 分以上送液し系内洗浄を実施。</p> <p>2) 古いシステム、系内洗浄が不十分なシステムの場合</p> <ul style="list-style-type: none">① 純水を 30 分以上送液② 10 % メタノール水溶液を一晩以上送液③ 純水を 30 分以上送液 <p>1)、2) とともに上記の洗浄を実施した後、溶離液に置換してください。 その後、カラムを接続し平衡化、測定を開始してください。</p> <p>2. ラインフィルター ポンプとインジェクターの間に細孔径 0.2 μm 以下のラインフィルターを装着することをお勧めします。</p>
溶離液	<p>塩を用いた緩衝液を溶離液に用いる場合、溶離液に微生物が発生しやすいため、使用時に調製することをお勧めします。また、溶離液は調製後に細孔径 0.2 μm 以下のフィルターでろ過をしてから使用することをお勧めします。</p>
試料溶液	<p>試料溶液は細孔径 0.2 μm 以下のフィルターでろ過をしてから使用することをお勧めします。</p>
カラムの洗浄	<p>光散乱検出器に接続する前に、溶離液を 0.17 mL/min 以下の流速でカラムボリュームの 4 倍以上送液してください。</p>
カラムの保管	<p>送液停止後 5 日以上使用しない場合は、カラム内を水に置換した後、20 % エタノール水溶液（出荷溶媒）に置換して保管してください。カラム内に移動相由来の塩結晶や細菌物質が蓄積すると、光散乱測定時のノイズの増加などにつながることがあります。</p>

5. おわりに

以上、TSKgel UP-SW3000-LS について概説しました。
本カラムを用いることにより、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あり、光散乱検出器を用いた測定に適しています。

※“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/>