



TOSOH

SEPARATION REPORT

TSK-GELを用いたモノクローナル抗体の分離

—— 目次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 分離モードと精製法	1
3. 実施例	3
4. 応用例	10
5. おわりに	13

1. はじめに

近年のバイオテクノロジーの発達により、モノクローナル抗体 (Mab) の利用が進み、診断薬や治療薬への応用が始まっています。このような背景からMabを迅速簡便に精製することが重要なポイントになります。高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたMabの分離精製については、既に多数報告されており、各分離モードにより、それぞれ特長が示されています。本報では、TSK-GELを用いたHPLCによるMabの分離について実施例をまじえて報告します。また、最近注目されている疎水クロマトグラフィーやヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを用いたMabの精製に関する応用例についても説明します。

抗体の分離に関しては、セパレーションレポートNo. 43、62、67にも詳しい報告がありますのでご参照下さい。

表-1 モノクローナル抗体精製用HPLC分離モードの特長

分離モード	分離機構	TSK-GEL	特長
ゲル濾過 (サイズ排除) クロマトグラフィー (GFC,SEC)	分子の大きさ	TSKgel G2000SWxl TSKgel G3000SWxl TSKgel G4000SWxl	分離能、試料負荷量は他の分離モードに劣るが、Mabの抗原性が問題となる二重体や疑集体を簡単に除去できる。最終精製や、純度チェックに使用できる。FabやIgM (TSK gel G4000SWxl) の分離も可能。
イオン交換 クロマトグラフィー (IEC)	イオン性	TSKgel DEAE-5PW TSKgel SP,CM-5PW TSKgel DEAE-NPR TSKgel SP-NPR	分離能が高く、試料負荷量も大きい。陰イオン交換体は、Mabのサブクラスや不純物との分離が良好。陽イオン交換体は、不純物の多くを、カラムに保持させず、ステップ溶出で簡単な精製が可能。 NPRカラムは、微量Mab ($\mu\text{g}\sim\text{ng}$) の迅速分析分取に利用でき、また、Mab画分の電気泳動に代わる純度チェックが可能。
疎水クロマトグラフィー (HIC)	疎水性	TSKgel Ether-5PW TSKgel Phenyl-5PW TSKgel Butyl-NPR	分離能が高く、試料負荷量も大きい。特にTSKgel Ether-5PWは、吸着力の強いMabの分離回収率が良い。HICでは、ステップ溶出による簡便精製が可能。TSKgel Butyl-NPRは微量分析分取用。
ヒドロキシアパタイト クロマトグラフィー (HAC)	分配吸着 イオン性	TSKgel HA-1000	分離能が高く、試料負荷量も大きい (IEC, HICとほぼ同程度)。Mabの吸着が強く ステップ溶出による簡便精製が可能。
アフィニティ クロマトグラフィー (AFC)	生物特異的 相互作用	TSKgel Protein A-5PW (特注品) TSKgel Chelate-5PW TSKgel Tresyl-5PW	1段階で高純度のMabの精製が可能。吸着容量も大きい。 Mab分離への新しい応用例の開発。 活性化型担体。抗原などリガンドを固定化してMabを吸着精製する。

2. 分離モードと精製法

表-1にMabの分離精製に用いられるHPLC分離モードとその特長を示します。IEC、HIC、HAC、AFC (特にプロテイン-A-担体) は、試料の負荷量が大きく、また分離能が高いため、Mabの精製によく使用されます。特にIECはMab試料の硫酸分画に続く精製手段として、Mab精製法のうち約75%を占めると言われています (低速クロマトグラフィーを含む)。GFC (SEC) は分離能、試料負荷量は、上記の分離モードに劣るものの、抗原性のある高分子量Mabを簡単に除去できることから、最終精製手段として、またMab標品の純度チェックとして使用されます。

Mabの分離精製法に関しては、一般に汎用HPLC分離モードを1つ用いれば(ただしGFCは除く)、純度約95%のMab標品が得られるとされており、診断用Mabとして高純度な標品が得られます。しかし、治療用Mabに関しては、さらに高純度(約99%以上)が要求され、汎用分離モードでは不可能です。単独の分離モードでこの純度が得られるのは、プロテインAや、抗体・抗原反応を使用した特殊なAFCですが、汎用HPLC分離モードで、この純度のMab標品を得るためには、2種類の異なる分離モードを用いる必要があります(例えばIEC-HIC、HAC-HIC、IEC-GFCなど)。また、最近ではさらに高純度のMab

標品(純度約99.9%以上)が要求される場合もあり、そのためには、3種類の異なる分離モードでの精製が必要となります(例えばHIC-IEC-GFC、AFC-IEC-GFCなど)。また分離様式もリニアグラジエント溶出法やステップグラジエント溶出法など、Mab標品に要求される純度、精製にかかる時間、全工程から計算されるMab標品のコストなどを考慮して適切に選択する必要があります。

表-2に、種々のTSK-GELを用いてMabを分離精製した文献とその概要を示します。やはりHPLCではIECやGFCを用いたものが多数を占めますが、HIC、HAC、AFCを用いたものも報告され始めています。

表-2 TSK-GELを用いたモノクローナル抗体の分離に関する主な文献

文献No.	カラム	試料	抗体種	概要
1	TSKgel G3000SW	腹水、培養上清	IgG ₁ 、F _{(ab)₂}	クラスI、MHC抗原に対するMabに関する総説
2	TSKgel G3000SW	腹水	IgG ₁ 、F _{(ab)₂}	IgG ₁ とF _{(ab)₂} の分離
3	TSKgel G3000SW	腹水	IgG ₁ 、IgG _{2b} 、IgG ₃	IECで精製されたMabの最終精製 回収率85%以上
4	TSKgel DEAE-5PW TSKgel G3000SW	腹水、培養上清	IgG ₁ 、IgG _{2a} 計8種	溶離液を工夫しIEC1段階でMabを精製 活性回収率95%
5	TSKgel G3000SW	腹水	IgG ₁ 、IgG _{2a} 、IgG _{2b}	IECで精製されたMabの純度チェック
6	TSKgel DEAE-5PW	腹水	IgG ₁ 、IgG _{2a} 、IgG _{2b}	溶離液を工夫してMabをIEC1段階で精製 活性回収率92%以上
7	TSKgel Phenyl-5PW	腹水、培養上清	IgG	IEC、HIC、HACでの分離を検討 IECとHICが良好
8	TSKgel DEAE-トヨパール TSKgel CM-トヨパール	培養上清	IgG _{2b}	試料の迅速分離、指示薬フェノールレッドの除去容易 活性回収率90%以上
9	TSKgel SP-5PW TSKgel G4000SW	腹水	IgG ₁ 、IgM	IECによる簡便精製、IEC-GFC接続による自動制御 活性回収率80%以上
10	TSKgel SP-5PW	培養上清	IgG	前処理された試料(100ml)のステップグラジエント溶出 純度99%
11	TSKgel Chelate-5PW	腹水	IgG	IMACの応用例、1段階で純度10倍に上昇
12	TSKgel DEAE-5PW TSKgel G3000SW	腹水	IgG ₁ 、IgG _{2a} 、IgG _{2b} 、 IgM	溶離液を工夫し分取カラムでMabを精製 回収率89%以上
13	TSKgel DEAE-5PW TSKgel G3000SW	腹水	IgG ₁	分取カラム使用、IEC、HAC、AFCの比較検討 純度99.2%活性回収率72%
14	TSKgel DEAE-5PW	腹水	IgM(2種)	塩とpHの同時グラジエントを用い、IgMを1段階で高純度に精製
15	TSKgel HA-1000 TSKgel Ether-5PW TSKgel G3000SW _{XL} TSKgel DEAE-NPR	腹水	IgG ₁	HAC、HICでMabの分離の条件検討、ステップ溶出で簡便精製

3. 実施例

1) ゲル濾過 (サイズ排除) クロマトグラフィー (GFC、SEC)

GFCは、他の分離モードに比べ、分離能、試料負荷量に関して劣ります。またマウス腹水等は試料中に不純物としてアルブミンを大量に含んでいるため、Mab (IgG) とアルブミンの分離が難しい場合があり、GFCは、粗試料からの直接のMab精製よりも、部分精製された試料の分離に使用されます。図-1は、マウス腹水からMab (IgG₁) を分離した例ですが、溶離液のpHや塩の種類を変え (pH5.0、0.1MNa₂SO₄)、いくぶん、IgGとアルブミンの分離を改善できます (詳しい検討はセパレーションレポートNo. 62参照)。またIgMの分離には、分画分子量が大きい、TSKgel G4000SW_{XL}が有用となります。

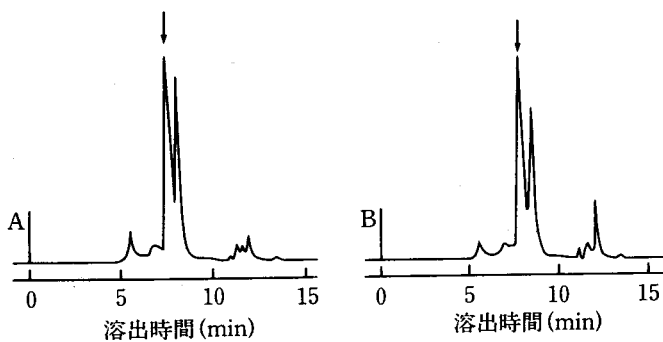


図-1 GFCによるモノクローナル抗体の分離

カラム ; TSKgel G3000SW_{XL} 7.8mmID×30cm

溶離液 ; A : 50mM リン酸ナトリウム (pH6.7)
+0.3M NaCl

B : 50mM リン酸ナトリウム (pH5.0)
+0.1M Na₂SO₄

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 25°C

検出 ; UV (280nm)

試料 ; 抗ヒトプロリン水酸化酵素 (IgG₁), マウス
腹水希釈液 (50μl)

2) イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

IECには官能基にDEAE基を持つ陰イオン交換型と、SP、CM基を持つ陽イオン交換型の充填剤があります。一般にリニアグラジエント溶出法によるMabの精密な分離やサブクラス間の分離にはDEAE基を持つ陰イオン交換体を使用されています。溶離液には、pH8以上のやや高めのpHの溶離液を用いると分離が良いようです。図-2、3にTSKgel DEAE-5PWを用いたマウス腹水及び培養上清からのMab (IgG₁) の分離をそれぞれ示します。図-2のマウス腹水の分離では、約15分にIgG₁が溶出していますが、そのピークの前後に溶出するトランスフェリン (約11分) やアルブミン (約22分) などの不純物から、良好に分離されています。なお、図-3の培養上清を用いた場合は、含まれるMab量が少ないため、ピークとしては検出されていません。

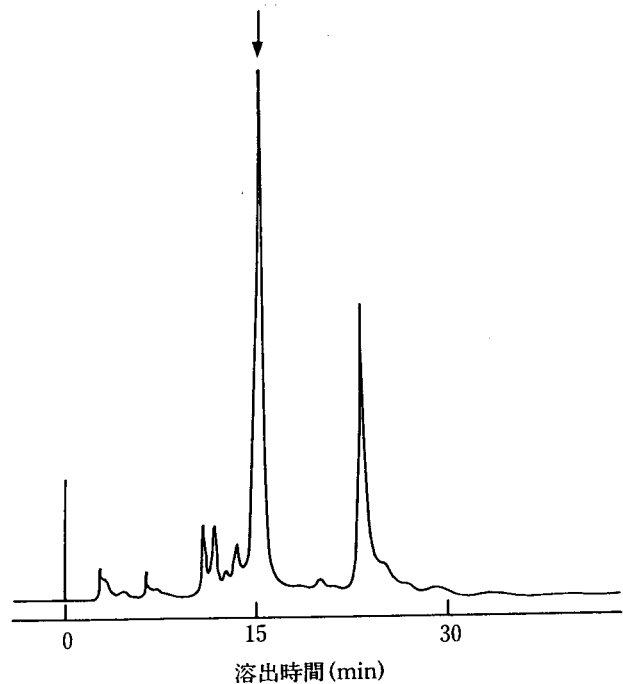


図-2 IECによるモノクローナル抗体の分離

カラム ; TSKgel DEAE-5PW 7.5mmID×7.5cm

溶離液 ; A : 20mM トリス-HCl (pH8.5)

B : A+0.5M NaCl

A→Bリニアグラジエント (60分)

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 25°C

検出 ; UV (280nm)

試料 ; 抗ヒトアルブミン (IgG₁)
マウス腹水希釈液 (168μg in 40μl)

一方、SPやCM基を持つ陽イオン交換体では、通常の使用溶離液pHでは、試料中に大量に含まれるアルブミン等は、カラムに吸着されず、カラムを素通りするため、大量の試料を一度に処理することができます。また、ステップグラジエント溶出法で簡便なMabの分離精製を行うことも可能となります。図-4に、TSKgel SP-5PWを用いて、培養上清中からMab (IgG₁) を分離したクロマトグラムを示します。この場合、溶離液に用いたクエン酸緩衝液と酢酸緩衝液では、溶出パターンが異なり、溶離液の種類により分離の選択性が違うことがわかります。

非多孔性充填剤は、大量のMab精製には適用できませんがその迅速微量分離分取の特長を生かして、精製Mab標品の迅速な純度チェックが可能です。図-5には、TSKgel

HA-1000を用いたMabの分離において得られたMab画分(図-11)の純度チェックをTSKgel DEAE-NPRを用いて行った結果を示します。Mab (IgG₁) は約3.5分に溶出され、分離は約6分で完了しています。マウス腹水試料の分離に関しては、TSKgel DEAE-5PWとほぼ同等の分離能が得られています(図-2参照)。また、部分精製されたMabも不純物が非常に少ないことがわかります。このように非多孔性充填剤TSKgel DEAE-NPRを用いれば、試料の純度チェックや、モニタリングが数分で行なえ、非常に有用であることがわかります。また非多孔性充填剤を用いれば、Mabのナノグラムレベルの試料の微量分取も可能です(詳細は、セパレーションレポートNo. 65参照)。

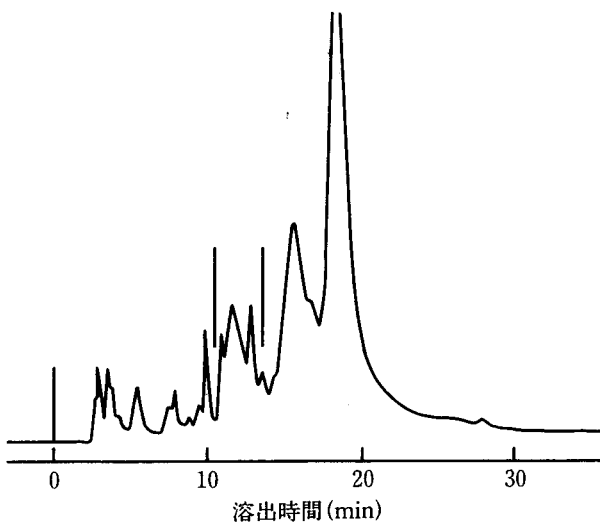


図-3 IECによるモノクローナル抗体の分離
 カラム ; TSKgel DEAE-5PW 7.5mmID×7.5cm
 溶離液 ; A : 20mM トリス-HCl (pH8.8)
 B : A+0.5M NaCl
 A→Bリアグラジエント (30分)
 流速 ; 1.0ml/min
 温度 ; 25°C
 検出 ; UV (280nm)
 試料 ; 抗HLA-A, B, C (IgG₁),
 NS-1培養上清

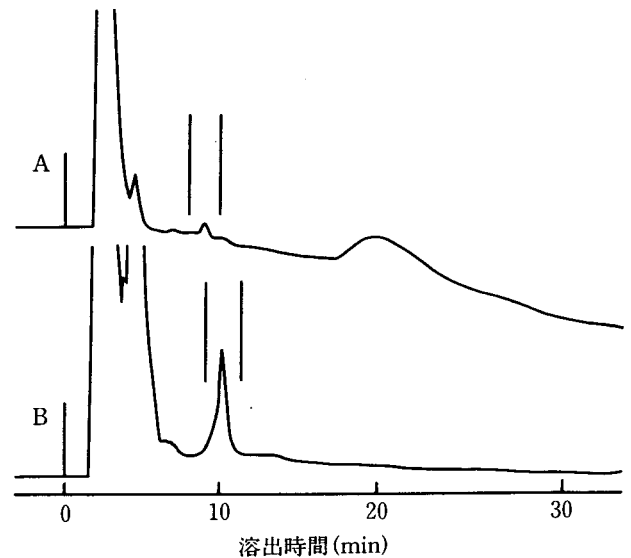


図-4 IECによるモノクローナル抗体の分離
 カラム ; TSKgel SP-5PW 7.5mmID×7.5cm
 溶離液 ; A : a : 20mMクエン酸緩衝液 (pH5.7)
 b : a+0.5M NaCl
 a→b リニアグラジエント (30分)
 B : c : 20mM酢酸緩衝液 (pH5.7)
 d : c+0.5M NaCl
 c→d リニアグラジエント (30分)
 流速 ; 1.0ml/min
 温度 ; 25°C
 検出 ; UV (280nm)
 試料 ; 抗HLA-A, B, C (IgG₁),
 NS-1培養上清 (500μg in 500μl)

3) 疎水クロマトグラフィー (HIC)

HICは、IECと同様、タンパク質の分離精製手段として多用されており、Mabの分離精製にも応用され始めています。従来、水溶性タンパク質のHICによる分離には、TSKgel Phenyl-5PWが多用されていますが、疎水性の強いタンパク質（膜タンパク質や分子量10万以上のタンパク質）の分離や回収率については、充填剤の疎水性をやや弱めたTSKgel Ether-5PWを用いて良好な結果が得られています（詳細はセパレーションレポートNo.43を参

照）。図-6にTSKgel Phenyl-5PW及びTSKgel Ether-5PWを用いたマウス腹水の分離を示します。TSKgel Phenyl-5PWでは、アルブミンピーク（約47分）が、Mab（IgG₁）ピークに重なり分離がうまく行なわれていませんが、TSKgel Ether-5PWでは、Mabはアルブミンピーク（約13分）から良好に分離されています。また同一分離条件では、充填剤の疎水性の違いから、MabはTSKgel Ether-5PWで早く溶出（硫酸濃度約0.5M）されています。このようにHICによりMabの分離では、TSKgel Ether-5PWの方が優れていることがわかります。

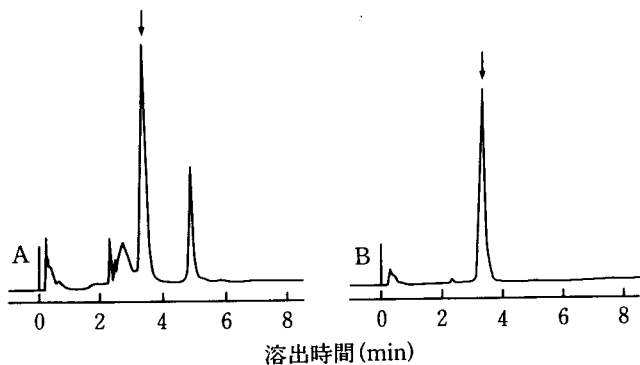


図-5 IECによるモノクローナル抗体画分の純度チェック

カラム；TSKgel DEAE-NPR 4.6mmID×3.5cm

溶離液； a：50mM トリス-HCl(pH8.5)

b：a+0.5M NaCl

a→b リニアグラジエント (10分)

流速；1.5ml/min

温度；25°C

検出；UV (280nm)

試料；抗ニワトリ14Kレクチン (IgG₁)

A：マウス腹水 (×4, 5μl)

B：TSKgel HA-1000, Mab画分 (100μl)

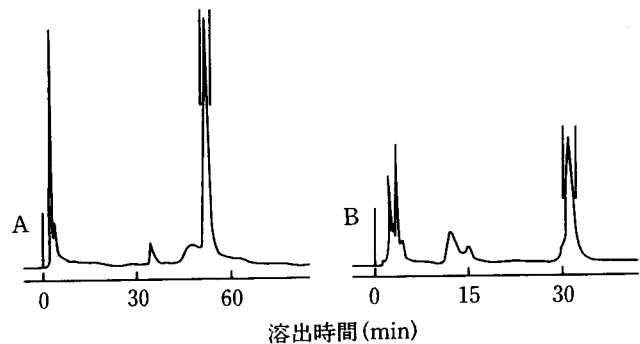


図-6 HICによるモノクローナル抗体の分離

カラム；A：TSKgel Phenyl-5PW

7.5mmID×7.5cm

B：TSKgel Ether-5PW

7.5mmID×7.5cm

溶離液； a：0.1Mリン酸ナトリウム (pH7.0)

+1.5M硫酸

b：0.1Mリン酸ナトリウム (pH7.0)

a→b リニアグラジエント (60分)

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；UV (280nm)

試料；抗ニワトリ14Kレクチン (IgG₁)

マウス腹水 (1.5mg in100μl)

図-7にTSKgel Ether-5PWを用いて大量の試料を分離した例を示します。マウス腹水3ml(2倍希釈、硫酸濃度1.0M)を直接注入し、リニアグラジエント及びステップグラジエント溶出法で溶出しました。リニアグラジエント溶出法では、図-6とほぼ同様のクロマトグラムが得られています。またステップグラジエント溶出法では、初期硫酸濃度を1.0Mとすることで、Mabよりも吸着の弱いほとんど全ての不純物をカラムに素通りさせ、Mabだけを吸着させることができました。吸着したMabは0.5M硫酸溶液で溶出することができました。このように、ステップグラジエント溶出法では大量の試料を簡単に分離することができます。またさらに大量のMabを調整した

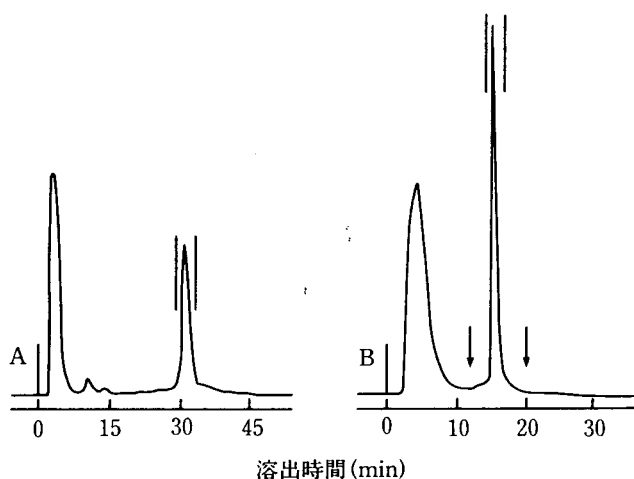


図-7 HICによるモノクローナル抗体の大量分離

カラム；TSKgel Ether-5PW 7.5mmID×7.5cm

溶離液；A：図-6に同じ

B：a：0.1Mリン酸ナトリウム (pH7.0)

+1.0M硫酸

b：0.1Mリン酸ナトリウム (pH7.0)

a→a/b (50/50) (12分)→b

(20分) ステップグラジエント

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；UV (280nm)

試料；抗ニワトリ14Kレクチン (IgG₁)

マウス腹水 (90mg in 3.0ml)

い場合は、HPLC用充填剤の代わりに中速用充填剤(トヨパール)を用いることもできます。TSKgel Ether-5PWと吸着特性がほぼ同じであるTSKgel Ether-トヨパール650Mは充填剤の粒子径が大きいため、TSKgel Ether-5PWに比べ分離能は劣りますが、同様な選択性を持っています。なお、HPLCとトヨパールの関係は、セパレーションレポートNo.52を参照下さい。

HICにも非多孔充填剤があり、Mabを迅速に分離することができます。図-8にTSKgel Butyl-NPRを用いたマウス腹水の分離を示します。分離は、約3分で終了し、不純物との分離も良好であることがわかります。

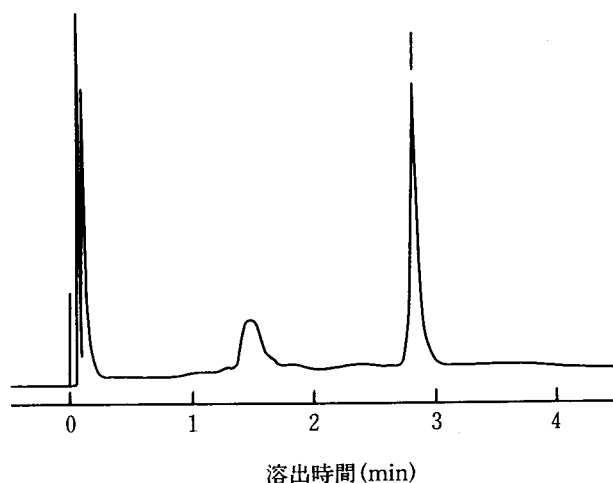


図-8 HICによるモノクローナル抗体の分離

カラム；TSKgel Butyl-NPR 4.6mmID×3.5cm

溶離液；A：0.1Mリン酸ナトリウム (pH7.0)

+1.5M硫酸

B：0.1Mリン酸ナトリウム (pH7.0)

A→Bリニアグラジエント (10分)

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；UV (280nm)

試料；抗ニワトリ14Kレクチン (IgG₁)

マウス腹水 (38μg in 2.5μl)

4) ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー (HAC)

ヒドロキシアパタイトは、分子内のリン酸基による陽イオン交換体としての作用と、カルシウムイオンを含めた結晶骨格への試料の結合適性を吸着原理とし、IECとやや異なった分離を示します。また歯や骨などの生体成分と充填剤成分が同一であることも特長の1つです。図-9にTSKgel HA-1000を用いたマウス腹水の分離を示します。溶離液のpHを検討した結果、pHが従来のHACの条件よりも低いpH5.8で不純物とMab(IgG₁)が良好に分離できることがわかりました。Mabは、リン酸濃度約120mMに溶出されています。このようにHACでも、陽イオン交換体やHICと同様、Mabの吸着が不純物よりも強いいため、ステップグラジエント溶出法による簡便な分離法が可能になります。

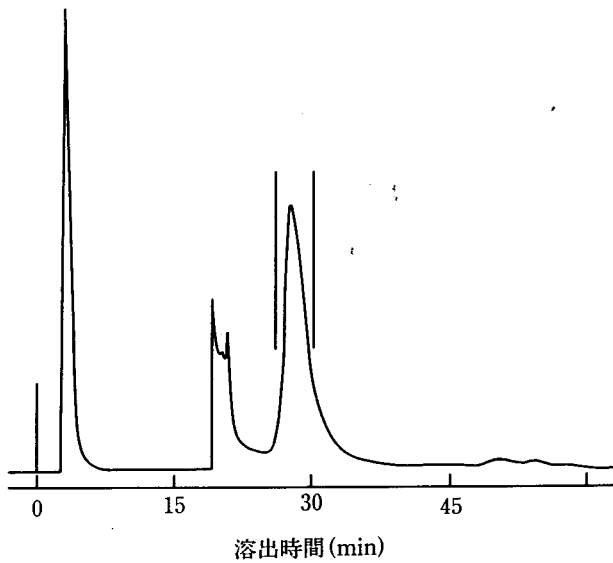


図-9 HACによるモノクローナル抗体の分離

カラム ; TSKgel HA-1000 7.5mmID×7.5cm
 溶離液 ; A : 10mMリン酸ナトリウム (pH5.8)
 +0.1mM CaCl₂
 B : 300mMリン酸ナトリウム (pH5.8)
 +0.1mM CaCl₂
 A→Bリニアグラジエント (60分)

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 25°C

検出 ; UV (280nm)

試料 ; 抗ニワトリ14Kレクチン (IgG₁)
 マウス腹水 (5.15mg in 0.38ml)

図-10にステップグラジエント溶出法によりMabを分離した例を示します。初期溶離液のリン酸濃度を60mMにすることにより、不純物をカラムから素通りさせ、溶出することができます。その後Mabはリン酸濃度150mMで溶出されます。このMab画分の純度は、TSKgel DEAE-NPRによる迅速チェックにより、非常に不純物が少ないことがわかりました (図-5参照)。

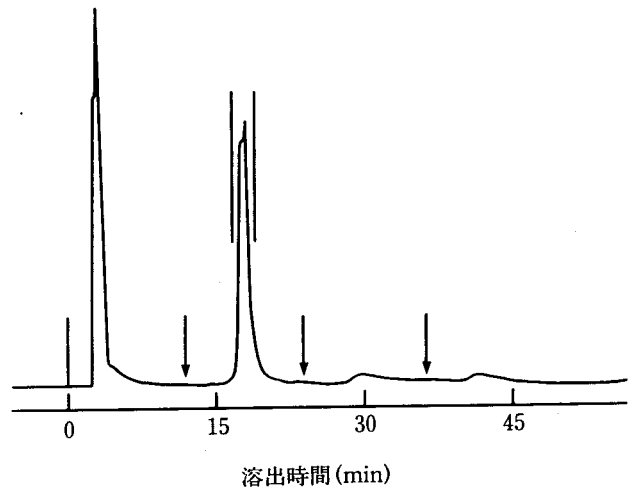


図-10 HACによるモノクローナル抗体の分離

カラム ; TSKgel HA-1000 7.5mmID×7.5cm

溶離液 ; A : 10mMリン酸ナトリウム (pH5.8)

+0.1mM CaCl₂

B : 500mMリン酸ナトリウム (pH5.8)

+0.1mM CaCl₂

A/B (88/12) → A/B (70/30) (12分)

→ A/B (40/60) (24分) → B (36分)

ステップグラジエント

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 25°C

検出 ; UV (280nm)

試料 ; 抗ニワトリ14Kレクチン (IgG₁)
 マウス腹水 (1.52mg in 100μl)

図-11にTSKgel HA-1000を用いたMabサブクラス分離を示します。IgG_{2a}及びIgMは、ピーク幅がやや広いものの、それぞれ良好に分離できることがわかります。

5) アフィニティクロマトグラフィー (AFC)

AFCではProteinAをリガンドとして用いたものがMabの精製に最もよく使用されています。図-12にTSKgel Protein A-5PW(特注品)を用いたマウス腹水からのMab (IgG₁) の分離を示します。Mabの吸着溶液には、Mabの吸着を強めるため、高濃度溶液 (1.5Mグリシン) を使用しています。ProteinAを用いたAFCでは、不純物はほとんどカラムに吸着されず、素通りします。その後溶離液のpHを5.0に下げることによりIgG₁を溶出できます(その他IgGサブクラスを溶出させるためには、pH2ないし3の溶離液が必要)。得られたMab画分は、GFCやSDS-PAGEでも不純物は見られず、ProteinAによるAFCを用いて1段階でMabを高純度(約99%)に精製できることがわかります。

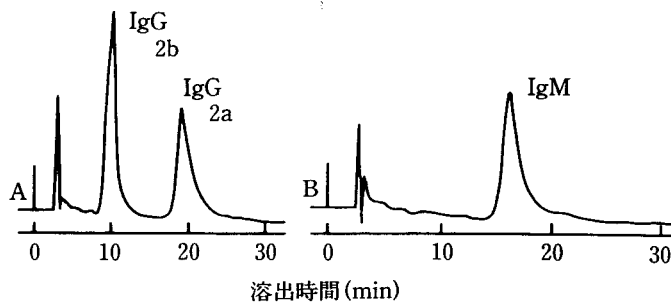


図-11 HACによるモノクローナル抗体の分離

カラム ; TSKgel HA-1000 7.5mmID×7.5cm

溶離液 ; a : 10mMリン酸ナトリウム (pH6.8)

+0.1mM CaCl₂

b : 500mMリン酸ナトリウム (pH6.8)

+0.1mM CaCl₂

a→bリニアグラジエント (30分)

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 25°C

検出 ; UV (280nm)

試料 ; A, IgG_{2a} (145μg), IgG_{2b} (55μg)

B, IgM (100μg in 100μl)

AFCでは、特にリガンドの漏出が問題となりますが、TSKgel Protein A-5PW (特注品)での充填剤からのProtein Aの漏出は、溶離液中数ng/ml程度です。

Protein Aを用いたAFCのほかに、金属キレートクロマトグラフィー (IMAC) により、Mabを分離することもできます。

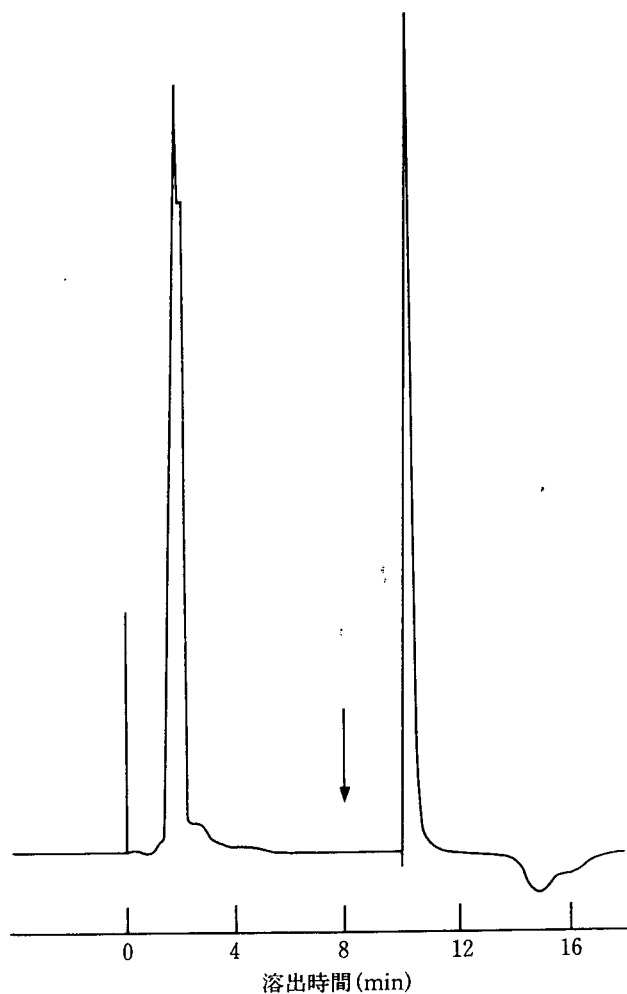


図-12 AFCによるモノクローナル抗体の分離

カラム ; TSKgel Protein A-5 PW Glass
(特注品) 8mmID×4cm
溶離液 ; A : 1.5Mグリシン-NaOH (pH8.9)
B : 0.1Mクエン酸-NaOH (pH5.0)
A→Bステップグラジエント (8分)
流速 ; 0.8ml/min
温度 ; 25°C
検出 ; UV (280nm)
試料 ; 抗ヒトプロリン水酸化酸素 (IgG₁)
マウス腹水 (210μg in 100μl)

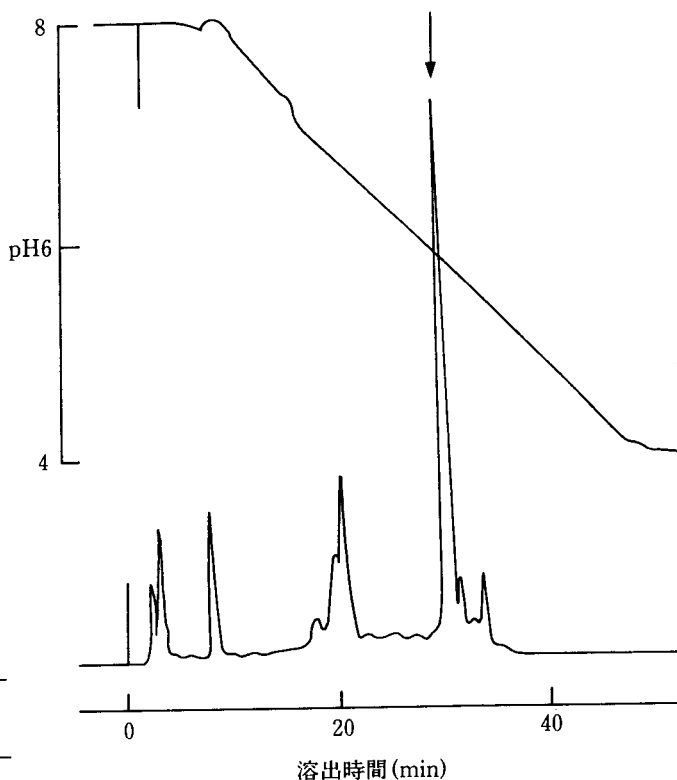


図-13 AFCによるモノクローナル抗体の分離

カラム ; TSKgel Chelate-5 PW Glass (Zn²⁺)
8 mmID×7.5cm
溶離液 ; A : 20mM HEPES-MES-酢酸緩衝液
(pH8.0) + 0.5M NaCl
B : 20mM HEPES-MES-酢酸緩衝液
(pH4.0) + 0.5M NaCl
A→Bリニアグラジエント (40分)
流速 ; 1.0ml/min
温度 ; 25°C
検出 ; UV (280nm)
試料 ; 抗ニワトリ14K-レクチン (IgG₁)
マウス腹水 (50μl)

TSKgel Chelate-5PWを用い、金属イオンにZn²⁺を使用してMabをマウス腹水及び培養上清から分離した例を図-13及び図-14に示します。図-13のマウス腹水ではMab (IgG₁)は、pHグラジエント溶出法により、約32分に溶出され、他の不純物から良好に分離されています。このようにIMACは、Mabの分離に新しい応用ができると考えられます。なお、TSKgel Chelate-5PWの詳細な使用方法については、セパレーションレポートNo.45、No.70をご参照下さい。

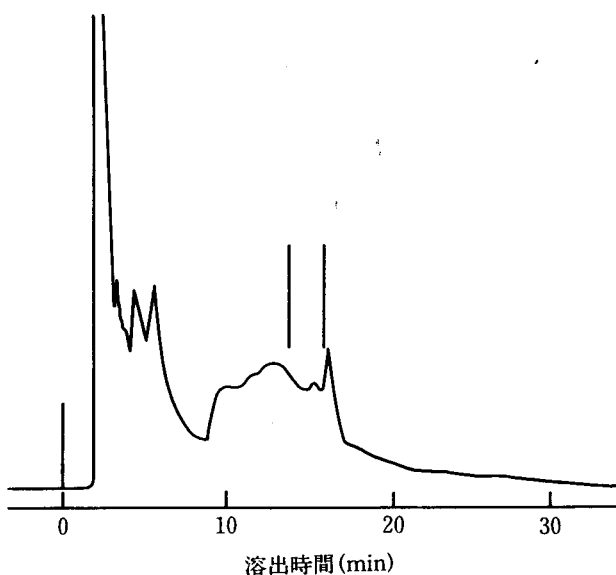


図-14 AFCによるモノクローナル抗体の分離

カラム ; TSKgel Chelate- 5 PW (Zn²⁺)
7.5mmID×7.5cm
溶離液 ; A : 20mM トリス-HCl (pH8.0)
+0.5M NaCl
B : A+200mM グリシン
A→B リニアグラジエント (30分)
流速 ; 1.0ml/min
温度 ; 25°C
試料 ; 抗HLA-A, B, C (IgG₁)
NS-1 培養上清

4. 応用例

HACとHICの組み合わせ

これまで、1つの分離モードのみでのMabの分離について示してきましたが、ここでは2つの分離モードを組み合わせて、より高純度のMab標品を得ることを目的として分離を検討しました。分離モードの組み合わせでは、表-2で示したようにIEC-HIC、IEC-GFC等が既に報告されていますが、ここでは、HACとHICを組み合わせた迅速簡便なMabの精製法について述べます。

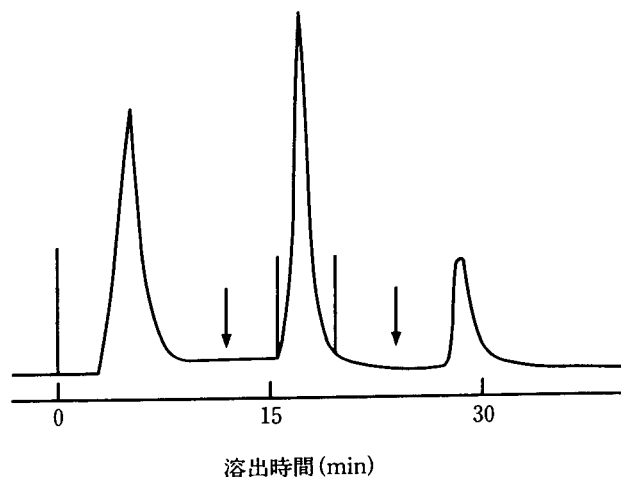


図-15 分離モード組み合わせによるモノクローナル抗体の分離(1)

—TSKgel HA-1000を用いたHACによる分離—

カラム ; TSKgel HA-1000 7.5mmID×7.5cm
溶離液 ; A : 10mMリン酸ナトリウム (pH5.8)

+0.1mM CaCl₂

B : 300mMリン酸ナトリウム (pH5.8)

+0.1mM CaCl₂

A/B (80/20) → A/B (50/50) (12分) → B (24分)

ステップグラジエント

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 25°C

検出 ; UV (280nm)

試料 ; 抗ニワトリ14Kレクチン (IgG₁)

マウス腹水 (20.8mg in 1.6ml)

HAC及びHICは、3-3)4)と同様のステップグラジエント溶出法を用いました。図-15に、まず一段階目にTSKgel HA-1000を用いたHACによるMabの溶出を示します。溶離液の初期リン酸濃度(60mM)では、大部分の不純物がカラムに吸着されず、溶出しています。その後リン酸濃度150mMで目的Mabを溶出します。さらにリン酸濃度を上げるとピークが見られますが、このピークは、GFC等の検討の結果、核酸などの高分子量物質や、異なる抗体画分であることがわかりました。次に、このMab画分をTSKgel Ether-5PWによるHICに供しました(図-16)。

試料は2M硫酸溶液で2倍に希釈(最終濃度1.0M)して、直接サンプルループ(3.0ml×2)で注入しました。HICの場合もHACと同様、不純物はカラムに吸着されず溶出しています。その後硫酸濃度0.5MでMabを溶出することができます。

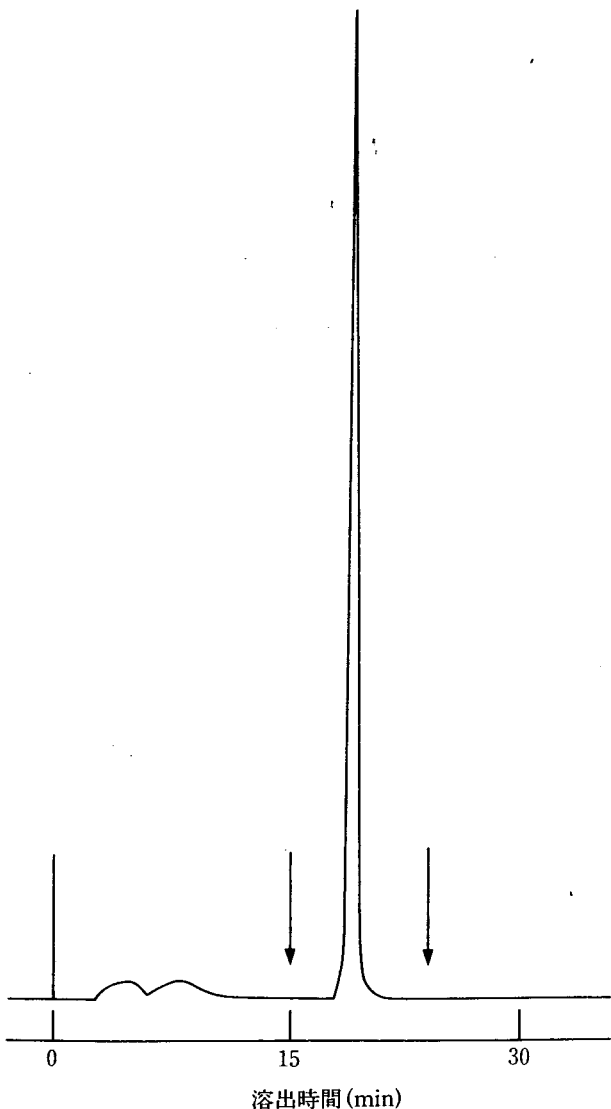


図-16 分離モード組み合わせによるモノクローナル抗体の分離(2)

—TSKgel Ether-5PWを用いたHICによる分離—

カラム ; TSKgel Ether-5PW 7.5mmID×7.5cm

溶離液 ; A : 0.1Mリン酸ナトリウム (pH7.0)

+1.0M硫酸

B : 0.1Mリン酸ナトリウム (pH7.0)

A→A/B (50/50) (15分) →B (24分)

ステップグラジエント

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 25°C

検出 ; UV (280nm)

試料 ; 図-15で得られたMab画分

(2倍希釈6.0ml)

このようにして得られたMab画分の純度チェックを行いました。

図-17に、TSKgel G3000SW_{XL}を用いたGFCによるMab画分の分離を示します。Mabは約9分に溶出していますが、HAC後のMab画分では、マウス腹水に比べ、11分に



図-17 TSKgel G3000SW_{XL}を用いたGFCによる精製モノクローナル抗体の純度チェック

カラム；TSKgel G3000SW_{XL} 7.8mmID×30cm

溶離液；50mMリン酸ナトリウム (pH6.7)

+0.3M NaCl

流速；0.8ml/min

温度；25°C

検出；UV (280nm)

試料；抗ニワトリ14Kレクチン (IgG₁)

A, マウス腹水 (×4, 2.5μl)

B, 図-15で得られたMab画分 (10μl)

C, 図-16で得られたMab画分 (10μl)

溶出するアルブミンやその他不純物がまだ若干混入しているものの、大幅に除去されています。そしてHACに続くHIC画分のGFCでは、Mab以外のピークはほとんど見られず (高分子量物質の混入が極微量だが認められた)、ピーク面積から計算して、純度約99%のMab標品が得られていることがわかりました。

図-18には、これらMab画分のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示します。HIC後のMab標品には、MabのH鎖及びL鎖以外のバンドはほとんど見られません。

このように、HAC及びHICという2つの思なる分離モードを簡便なステップグラジエント溶出法により組み合わせることによって、高純度のMab標品を得られることがわかりました。また、これ以上の高純度のMab標品を得たい場合は、図-18に示したように、HAC-HICの後にGFCを組み合わせるとMab画分を集めることも可能です。

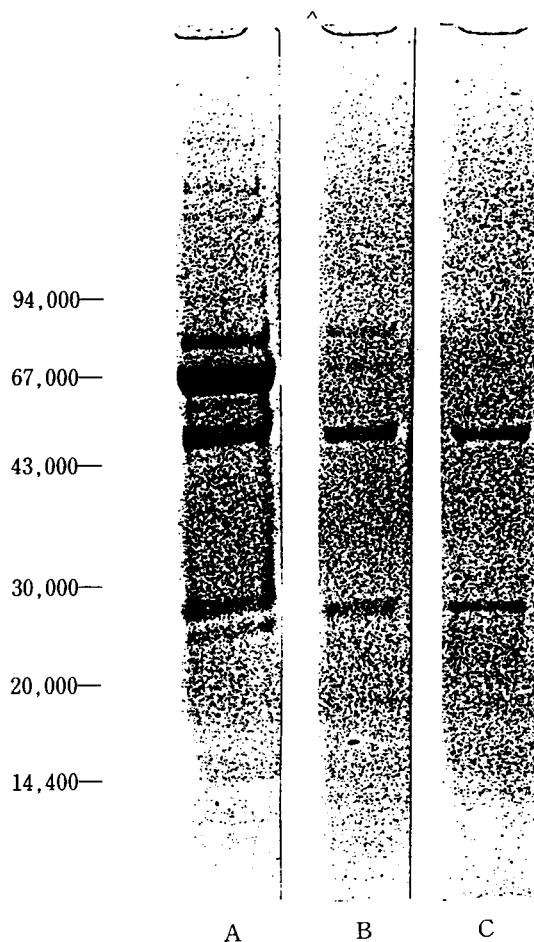


図-18 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による精製モノクローナル抗体の純度チェック

SDS-PAGE, 4-20%グラジエントゲル

試料；図-17に同じ

5. おわりに

以上示しましたように、モノクローナル抗体の分離精製に関しては、数種の分離モードがあり、また分離モードによりそれぞれ特長があります。したがって分離精製に関する種々の要因（分離能、試料負荷量、操作性、コスト、純度など）を考慮し、最も適した分離モードとカラムを選択することが、モノクローナル抗体の分離精製のポイントとなると言えるでしょう。

参考文献

- 1 Monoclonal antibodies : Purification, fragmentation and application to structural and functional studies of class I MHC antigens, P.Parham, M.J. Androlewicz, F.M.Brodsky, N.J.Holmes and J.P. Ways, *J.Immunol. Methods*, 53(1982)133
- 2 On the fragmentation of monoclonal IgG₁, IgG₂ and IgG_{2b} from BALB/c mice P.Parham, *J.Immunol.*, 131(1983)2895
- 3 Rapid and efficient purification of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid using high performance liquid chromatography S.W.Burchiel, J.R. Billman and T.R.Alber, *J.Immunol. Methods*, 69(1984)33
- 4 Single step purification of monoclonal antibody from murine ascites and tissue culture fluids by anion exchange high performance liquid chromatography M.J.Gemski, B.P. Doctor, M.K.Gentry, M.G.Pluskat and M.P.Strickler, *BioTechniques*, 3(1985)378
- 5 One-step procedure for the rapid isolation of mouse monoclonal antibodies and their antigen binding fragments by fast protein liquid chromatography on a Mono Q anion-exchange column, P.Cleazard, J.L. McGregor, M.Manach, H.Boukerche and M.De-chavanne, *J.Chromatogr.*, 319(1985)67
- 6 A High-performance liquid chromatographic procedure for the purification of mouse monoclonal antibodies, J.R.Deschamps, J.E.K.Hildreth, D.Derr and J.T.August, *Anal. Biochem.*, 147(1985)451
- 7 Rapid purification of monoclonal antibodies by high-performance liquid chromatography, B.Pavlu, U. Johansson, C.Nyhlen and A.Wichman, *J. Chromatogr.*, 359(1986)449
- 8 Use of new HPLC resins to solve old problems, D.G. Klapper, S.Osgood, R.Esch and Olson, *J. Liquid Chromatogr.*, 9(1986)1613
- 9 Purification and analysis of monoclonal antibodies from mouse ascites fluid R. Ehrnstrom and B. Gustavsson, *Internat. Lab.*, Sept/Oct(1987)26
- 10 Combination of zeta prep mass ion-exchange media and high-performance cation-exchange chromatography for the purification of high-purity monoclonal antibodies, A. Jungbauer, F.Unterluggauer, F.Steindl, F.Ruker and H.Kattinger, *J.Chromatogr.*, 397(1987)313
- 11 High-performance analytical applications of immobilized metal ion affinity chromatography, M. Belew, T.T. Yip, L.Andersson and R. Ehrnstrom, *Anal. Biochem.*, 164(1987)457
- 12 Purification of ascitic fluid-derived murine monoclonal antibodies by anion-exchange and size-exclusion high-performance liquid chromatography, H. H.Hwang, M.C.Healey and A.V.Johnston, *J. Chromatogr.*, 430(1988)329
- 13 Protein A, hydroxyapatite and diethylaminoethyl : Evaluation of three procedures for the preparative purification of monoclonal antibodies by high-performance liquid chromatography, C.Poiesi, A. Tamanini, S.Ghielmi and A.Albertini, *J. Chromatogr.*, 465(1989)101
- 14 Purification of mouse monoclonal immunoglobulin M by ion-exchange liquid chromatography, S.W.Rothman, M.K.Gentry, R.D.Gawne, A.S.Dobek, R.Ogert, M.J.Stone and M.P.Strickler, *J.Liquid Chromatogr.*, 12(1989)1935
- 15 Separation of monoclonal antibody from ascites fluid by high-performance hydroxyapatite and hydrophobic interaction chromatography, Y. Yamasaki, T.Kitamura and Y.Kato, *The 9th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*, (1989), poster #420