

# タンパク質重合体の効率的分離方法

(Study on efficient separation methods for protein aggregates)

平成 30 年 3 月

山口大学大学院 医学系研究科 応用分子生命科学系専攻

バイオプロセス工学研究室

伊藤 大祐

## 目次

<b>第 1 章 緒論</b>	<b>1</b>
<b>第 2 章 PEG 沈殿による重合体分離</b>	<b>3</b>
2-1. 緒言	
2-2. 実験	4
2-2-1. 試薬	
2-2-2. 装置	5
2-2-3. 使用したクロマトグラフィーカラム及び緩衝液とその調製法	6
2-2-4. 96-well マイクロプレートにおける PEG 沈殿の濁度測定(濁度法)	8
2-2-5. プレートリーダーにおける PEG 沈殿(濁度法)の解析	9
2-2-6. 試験管での PEG 沈殿後の上澄み測定(上澄み法)	10
2-2-7. 重合体分離実験（上澄み法）における SEC 測定	11
2-2-8. 重合体分離実験（上澄み法）における monomerの回収率、純度の予測計算	
2-2-9. 上澄み法での monomer と dimer, aggregates の回収率と純度の算出	
2-3. 結果および考察	12
2-3-1. 濁度法におけるA7511とA1900の溶解度曲線	
2-3-2. 各分子量のPEGにおけるA7511, A1900の溶解度曲線（濁度法）	13
2-3-3. 上澄み法における A7511 と A1900 の溶解度曲線	14
2-3-4. SEC分析におけるPEG沈殿後の上澄みのクロマト挙動	15
2-3-5. PEG 沈殿後の上澄み中の monomer, dimer, aggregates の回収率と純度	17
2-4. 結言	19
<b>第 3 章 クロマトグラフィーによる重合体分離</b>	<b>20</b>
3-1. 緒言	
3-2. 実験	23
3-2-1. 試薬	
3-2-2. 装置	24
3-2-3. 使用したクロマトグラフィーカラム及び緩衝液とその調整法	25
3-2-4. イオン交換クロマトグラフィー(IEC)	28

3-2-4-1. IEC におけるイオン交換反応	29
3-2-4-2. 塩濃度直線勾配溶出法 (LGE : Linear Gradient Elution)	31
3-2-4-3. IEC における移動相への PEG 添加効果	34
3-2-5. ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー(HAC)における P サイト、C サイト遮蔽	35
3-2-6. Taylor法による分子拡散係数の算出	36
3-2-6-1. 理論段数	
3-2-6-2. コイル内径 (遠心力による混合効果)	37
3-2-6-3. 死容積での分散	38
3-3. 結果および考察	39
3-3-1. PEG 添加静電的相互作用クロマトグラフィー	
3-3-1-1. $GH-I_R$ 曲線に及ぼす影響	
3-3-1-2. 吸着サイト数 $B$ 及び $A$ と pH の関係	42
3-3-1-3. $K-I$ 曲線に及ぼす影響	44
3-3-1-4. $\Delta I_R'$ の算出	46
3-3-1-5. $\Delta I_R''$ の算出	48
3-3-1-6. $\sigma_v$ の算出	50
3-3-1-7. $\sigma_v$ と $\eta$ の関係	51
3-3-1-8. $R_s$ の算出	52
3-3-1-9. $\Delta I_R'$ と $M_w$ の関係	53
3-3-2. ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー	54
3-3-2-1. 標準移動相におけるタンパク質の等電点(pI)と溶出塩濃度の関係	55
3-3-2-2. 各移動相におけるタンパク質の等電点(pI)と吸着サイト数 $B$ の関係	56
3-3-3. 塩耐性クロマトグラフィー	57
3-3-3-1. Q sepharose HP(QHP)と Salt-tolerant 75F(STC)における BSA(A7511)の溶出曲線の比較	
3-3-3-2. QHP と STC における A7511 の溶出塩濃度と移動相の pH の関係	58
3-3-3-3. QHP と STC における A7511 の吸着サイト数 $B$ と 移動相の pH の関係	
3-3-4. Taylor 法による拡散係数の算出	60
3-3-4-1. Taylor 法による拡散係数の測定における制約因子の検証	
3-3-4-2. 分子拡散係数の測定値と計算値の比較	

3-4. 結言	63
第4章 結論	65
使用記号	68
略字	69
参考文献	
本研究に関連する著者の発表論文	74
謝辞	75

## 第1章 緒論

タンパク質医薬品、中でも組み換えタンパク質による抗体医薬品や血漿分画製剤のような人体への投与量が多いものは製剤中の不純物が重篤な副作用につながる可能性がある。ここでの不純物とはもちろん、目的物質以外を意味しているが、目的物質の重合体 (aggregates) も免疫原性の増強や血圧低下の促進など副作用の原因となる重要な不純物であると報告されている[1-3]。したがって、このような製剤は重合体の含有量を確認することが重要である。例えば、血漿分画製剤において静注用人免疫グロブリン製剤は二量体より大きい重合体が 1%未満であることが義務付けられている[4]。抗体医薬品においても同等レベルの規格が求められる。現状、製造プロセスにおいては上流 (Upstream) にて発生する重合体、および下流 (Down-stream) のキャプチャークロマト (プロテイン A カラム) 工程における低 pH 溶出で発生する重合体を下流のポリッシングクロマト (イオン交換や疎水性相互作用クロマト等) 工程で分離、除去するプロセスを組み込む必要がある[5]。

重合体を除去する工程において従来から利用されている方法をメリットとデメリットを付随して示す (Table 1-1)。また、これらの方法とは異なる重合体を除去する方法としてイオン交換クロマトグラフィー (IEC) 移動相にポリエチレングリコール (PEG) を添加する方法やミックスドモードクロマトグラフィー (MMC)、塩耐性クロマトグラフィー (STC) などが提案されており、有効性が示されている[10 - 12]。これらの重合体分離の方法の中でも、主としてクロマトグラフィーが用いられており、重合体は非常に低濃度まで低減化される。しかし、このような重合体分離プロセスにおいて高い選択性と高い単量体 (monomer) 回収率を達成するには、現状では生産性を犠牲にしていることが多い[11 - 14]。これは、単量体と重合体の物理的・化学的性質が類似しているため精密に分離することは容易ではないからだと考えられる。生産性を犠牲にすることなく、重合体の完全除去を実現するためには、単量体と重合体のそれぞれの分離挙動を調査し、理論的に解析する必要がある。その結果からどういった条件であれば最も分離できるかを、予測することで、効率的に分離条件を設定することが可能となる。

本研究では PEG 沈殿とクロマトグラフィーによる重合体分離方法について単量体と重合体の分離挙動を調査し、解析した。PEG 沈殿においては単量体と重合体の溶解度を算出し、その溶解度差から単量体の回収率と純度を予測し、実証することで PEG 沈殿での重合体分離方法について評価した。クロマトグラフィーにおいては PEG 添加静電的相互作用クロマトとミックスドモードクロマトグラフィー、塩耐性クロマトグラフィーにおいて単量体と重合体の溶出塩濃度を算出し、理論式を用いて解析した。加えてクロマトグラフィーの分離性能を左右する、タンパクや PEG 化タンパク、DNA の分子拡散係数の測定法及び推算式を提案している。

**Table 1-1 従来から利用されている重合体分離方法**

名称	原理	メリット	デメリット	文献
PEG（ポリエチレングリコール）沈殿	溶解度差	<ul style="list-style-type: none"> <li>・免疫グロブリンのような分子量の大きいタンパク質の重合体分離に適している</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・選択性は高くない</li> <li>・沈殿物の回収及び脱PEG工程が必須</li> </ul>	[7]
イオン交換クロマトグラフィー（IEC）	分配（電気的性質）	<ul style="list-style-type: none"> <li>・選択性が高い</li> <li>・工程操作が比較的単純</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・カラム条件の最適化が難しい</li> <li>・製造条件管理範囲が狭い（pH、導電率等）</li> </ul>	[5,6]
疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）	分配（疎水的性質）	<ul style="list-style-type: none"> <li>・選択性が高い</li> <li>・工程操作が比較的単純</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・カラム条件の最適化が難しい</li> <li>・製造条件管理範囲が狭い（pH、導電率等）</li> <li>・硫安などの高濃度塩の廃棄処理が必要</li> </ul>	[5]
サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）	分配（大きさ）	<ul style="list-style-type: none"> <li>・分離性能は高い</li> <li>・温和な条件での分離が可能</li> <li>・分離条件の設定が容易</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・処理量が限られる</li> <li>・製造用カラムが巨大になる</li> </ul>	[8]
限外濾過（UF）	さえぎり（大きさ）	<ul style="list-style-type: none"> <li>・比較的工程操作が単純</li> <li>・大量処理が可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・選択性は高くない</li> </ul>	[9]

## 第2章 PEG 沈殿による重合体分離

### 2-1. 緒言

タンパク質の重合体分離技術の一つとして PEG 沈殿が知られている。しかし、実際のタンパク質医薬品の製造工程での実用例は少なく、実際に利用されている PEG 沈殿重合体分離工程において単量体の回収率は約 85%と報告されており、選択性が高いとは言い難い。なおかつ、その条件設定は理論式を利用し、効率よく設定された条件ではない。

PEG をタンパク質溶液中に第 3 成分として添加するとタンパク質同士の凝集、沈殿が促進される。これは、PEG の持つ排除体積効果に起因していると考えられる[15, 16]。この PEG の持つ沈殿機構について説明する。Fig.2-1 はタンパク質溶液中に PEG が存在する場合の模式図を示す[P.Gagnon, 2007]。小さい楕円形のものが PEG を表し、大きな球状のものがタンパク質である。タンパク質溶液中に PEG を添加した場合、PEG は水分子よりも大きな分子半径を持つために、矢印で示されるようにタンパク質周辺から排除され、タンパク質の周りには多くの水分子が存在する選択的水和を引き起こす。よって、タンパク質濃度または PEG 濃度が上昇すると、この水分子の濃度差を解消するためにタンパク質同士の会合凝集が進み沈殿が生じる。

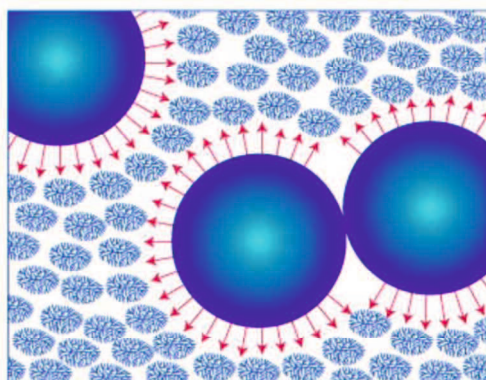


Fig.2-1 PEG 沈殿の模式図

一般的に PEG の沈殿効果は溶媒中のタンパク質の分子量および濃度や添加する PEG の分子量に依存する。この特性によって、目的物質と不純物を分離する[17 - 19]。本論文では、目的物質は単量体 (monomer)、不純物は二量体 (dimer) や重合体 (aggregates) として扱っている。

重合体分離性能を決定する重要なパラメータは monomer と dimer, aggregates の溶解度差であり、これは溶媒および溶質の条件に左右される。本章では、PEG 沈殿において単量体と重合体の溶解度を算出し、その溶解度差から monomer の回収率と純度を予測し、実証することで PEG 沈殿での重合体分離方法について評価した。

## 2-2. 実験

### 2-2-1. 試薬

Table 2-1 PEG 沈殿実験に使用したタンパク質と PEG

Sample	$M_w$ [g/g-moL]	pI	Supplier	Cat No.
Bovine serum albumin(BSA) , monomer	68000	4.7~4.9	SIGMA	A1900
Bovine serum albumin	68000, 136000	4.7~4.9	SIGMA	A7511
Polyethylene Glycol 6000	8300	-	Wako	169-09125
Polyethylene Glycol 2000	2000	-	Wako	165-09105
Polyethylene Glycol 400	400	-	Wako	161-09065

$M_w$  : 分子量、pI : 等電点

A7511 は dimer, aggregates を多く含む試料である。monomer : 75.37%, dimer : 18.01%, aggregates : 6.62%[Fig.2-2]。

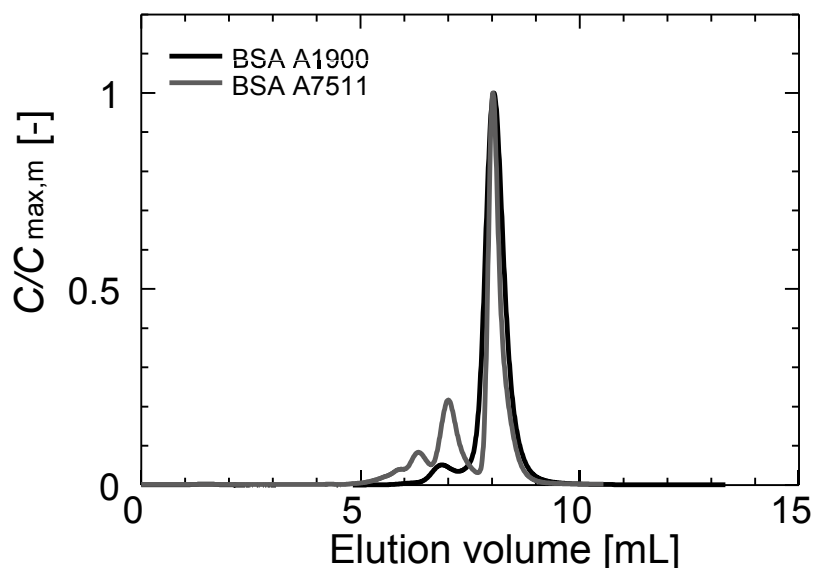


Fig.2-2 BSA A1900 と A7511 の SEC 分析結果

Column : TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub> ( $d_c = 0.78$  cm,  $Z = 30$  cm),  $F = 0.5$  min/mL, Sample : 1 mg/mL, 0.1 mL, mobile phase : 0.05 M Sodium phosphate + 0.1 M NaCl pH 7.0 , The y-axis is a normalized concentration with respect to the peak height of BSA monomer,  $C_{max,m}$



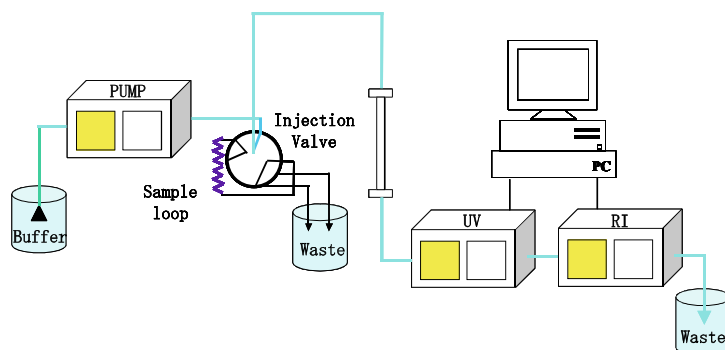
**Table 2-2 PEG 沈殿実験に使用した試薬**

Substance	Supplier	Cat No.
Tris [hydroxymetyly] aminomethane, $C_4H_{11}NO_3$	SIGMA	T1378
塩化ナトリウム, NaCl	Wako	191-01665
Acetic Acid(酢酸), $CH_3COOH$	Wako	017-00256
リン酸二水素ナトリウム 2 水和物, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	Wako	192-02815
リン酸水素ニナトリウム 12 水和物, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	Wako	196-02835
酢酸ナトリウム 3 水和物, $CH_3COONa \cdot 3H_2O$	Wako	198-01055
1 M Hydrochloric Acid, HCl	Wako	083-01095
1 M Sodium Hydroxide Solution, NaOH	Wako	192-02175

### 2-2-2. 装置

本研究には SEC 分析用として高速液体クロマトグラフ装置(SHIMADZU)を用いた。以下に装置の型式と模式図を示す[Fig.2-3]。

- ・ 送液ポンプ : LC-10ADvp
- ・ 紫外分光光度計 : SPD-10A
- ・ 示差屈折率検出器 : RID-10A 3.1.1



**Fig.2-3 サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)の実験装置模式図**

また、本研究には自動液体クロマトグラフィー実験装置 ÄKTA explorer, ÄKTA purifier (GE healthcare) を使用した。以下に実験装置の模式図を示す[Fig.2-4]。

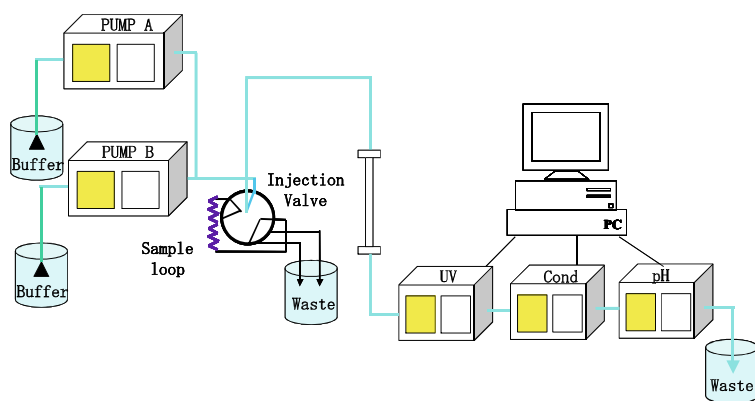


Fig.2-4 イオン交換クロマトグラフィー(IEC)の実験装置模式図

### 2-2-3. 使用したクロマトグラフィーカラム及び緩衝液とその調製法

本章における実験で使用したカラム及び緩衝液を以下に示す。

Table2-3 PEG 沈殿実験に使用したカラム

Column	Z [cm]	$d_c$ [cm]	$d_p$ [ $\mu$ m]	$\epsilon$ [-]	Supplier
CIM QA Monolith	0.3	1.2	-	0.62	BIA Separation
TSKgel G3000SW <sub>XL</sub>	30	7.8	5	0.35	TOSOH

Z: カラム長さ、 $d_c$ : カラムの内径、 $d_p$ : 粒子径、 $\epsilon$ : カラム空隙率

Table2-4 PEG 沈殿実験に使用した緩衝液(PEG 添加緩衝液)

Substance	Substance concentration [M]	pH	NaCl concentration [M]	PEG concentration [%w/v]
Sodium acetate	0.01	5.0	0.03	0 - 0.50
Tris-HCl	0.01	6.0	0.03	0 - 0.50
Tris-HCl	0.01	7.0	0.03	0 - 0.50
Tris-HCl	0.01	8.0	0.03	0 - 0.50

**Table2-5 イオン交換とサイズ排除クロマトに使用した緩衝液**

Substance	Substance concentration [M]	pH	NaCl concentration [M]
Tris-HCl	0.01	7.0	0.03 - 1.0
Sodium phosphate	0.05	7.0	0.1

0.03 - 1 M NaCl + 0.01 M Tris-HCl 緩衝液(pH 6.0、7.0、8.0) 1 L の調製

- 1) Tris、NaCl を所定のモル濃度になるように量り取り、それぞれ 1000 mL Buffer 瓶に加えた。そして、瓶の中に攪拌子を入れ、MilliQ 水を約 900 mL 加え、試薬が溶解するまで攪拌した。
- 2) 1.0 M HCl を添加し、目的の pH になるように調整した。
- 3) Buffer 瓶から 1000 mL メスフラスコに混合液を移し、1000 mL になるように MilliQ 水を加えメスアップした。

0.1 M NaCl + 0.05 M Sodium phosphate 緩衝液(pH 7.0) 1 L の調製

- 1)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  を所定のモル濃度になるように量り取り、それぞれ 1000 mL Buffer 瓶に加えた。そして、瓶の中に攪拌子を入れ MilliQ 水を約 900 mL 加え、試薬が溶解するまで攪拌した。
- 2) 1.0 M NaOH を添加し、目的の pH になるように調整した。
- 3) Buffer 瓶から 1000 mL メスフラスコに混合液を移し、1000 mL になるように MilliQ 水を加えメスアップした。

0.03 - 1 M NaCl + 0.01 M Sodium acetate 緩衝液(pH 5.0) 1 L の調製

- 1)  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  を所定のモル濃度になるように量り取り、それぞれ 1000 mL Buffer 瓶に加えた。そして、瓶の中に攪拌子を入れ MilliQ 水を約 900 mL 加え、試薬が溶解するまで攪拌した。
- 2) 1.0 M NaOH を添加し、目的の pH になるように調整した。
- 3) Buffer 瓶から 1000 mL メスフラスコに混合液を移し、1000 mL になるように MilliQ 水を加えメスアップした。

PEG 緩衝液の作成例) 0.03 M NaCl + 30%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.0 100 mL の調製

- 1) 初めに PEG を添加した低塩濃度緩衝液(0.03 M NaCl)を作成した。まず 100 mL ビーカーに所定の濃度になるように PEG を量り取り、そこに MilliQ 水を加えた。その後、ビーカーを水の入った鍋の中に静置し加熱することで溶かした。PEG 溶液に攪拌子を入れ、均一になる(溶液中の霧がなくなる)まで攪拌した。pH を調整しつつ所定の試薬を加えてビーカーで 100 mL にメスアップした。ただし、事前に 100 mL メスフラスコに MilliQ 水を入れ、それを 100 mL ビーカーに移し、ビーカーでの正確な 100 mL の水面の位置を測っていた。
- 2) 作製した PEG 緩衝液を PEG が添加されていない同組成の緩衝液で希釈し、様々な濃度の PEG 緩衝液を作製した。

なお、全ての緩衝液はメスアップ後、Millipore 製メンブレンフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) での濾過を実施し、脱気を行った。

#### 2-2-4. 96-well マイクロプレートにおける PEG 沈殿の濁度測定(濁度法)

まず、96-well マイクロプレートに各タンパク濃度  $C_{\text{prot}}$  の溶液 (BSA を緩衝液に溶かしたもの) を 50  $\mu\text{L}$  入れた。その後、各 PEG 濃度  $C_{\text{PEG}}$  の緩衝液 (緩衝液に PEG を溶かしたもの) を 200  $\mu\text{L}$  入れ、690 rpm で 5 分間、プレートシェイカーを用いて攪拌させた。その後、プレートリーダー (Power Wave XS, Bio-Tek, VT, USA) を用いて 30 分毎に 12 時間、吸光度 (波長 400 nm)  $A_{400}$  を測定した (デュプリケート測定)。Fig.2-5 に測定系の一例を示す。

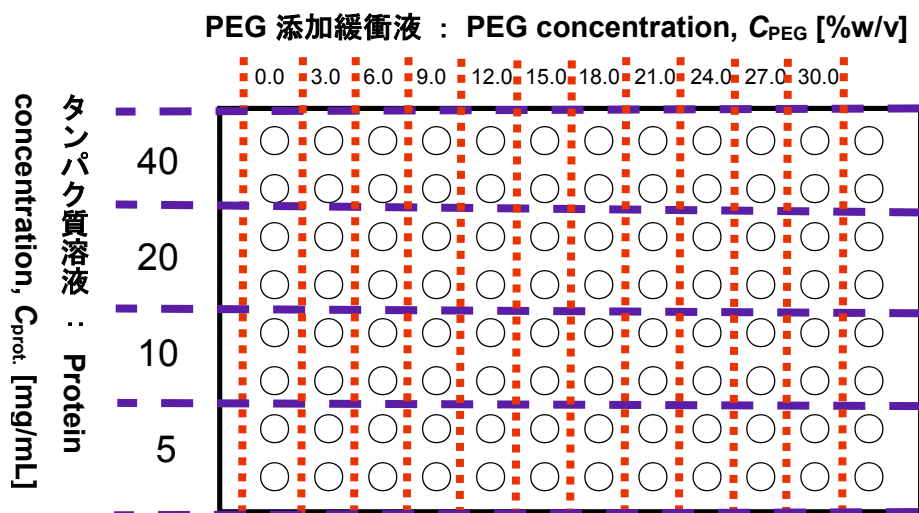


Fig.2-5 96-well マイクロプレートにおける PEG 沈殿の濁度測定時の模式図

PEG 添加緩衝液の PEG 濃度とタンパク質溶液のタンパク濃度は、添加時の濃度を示した。すなわち、終濃度としては希釈される。例えば PEG 添加緩衝液 : 24%w/v、タンパク質溶液 : 20 mg/mL の条件では、それぞれ終濃度は 19.2%w/v、4 mg/mL となる。

### 2-2-5. プレートリーダーにおける PEG 沈殿(濁度法)の解析

PEG 沈殿濁度測定開始後、6 時間後の吸光度を縦軸に PEG 濃度を横軸にして以下のような図(Fig.2-6)を作成した。これより PEG 沈殿の解析を行う為に吸光度が 0.1 となったときの PEG 濃度をそのタンパク質濃度で PEG 沈殿が開始した濃度とした。

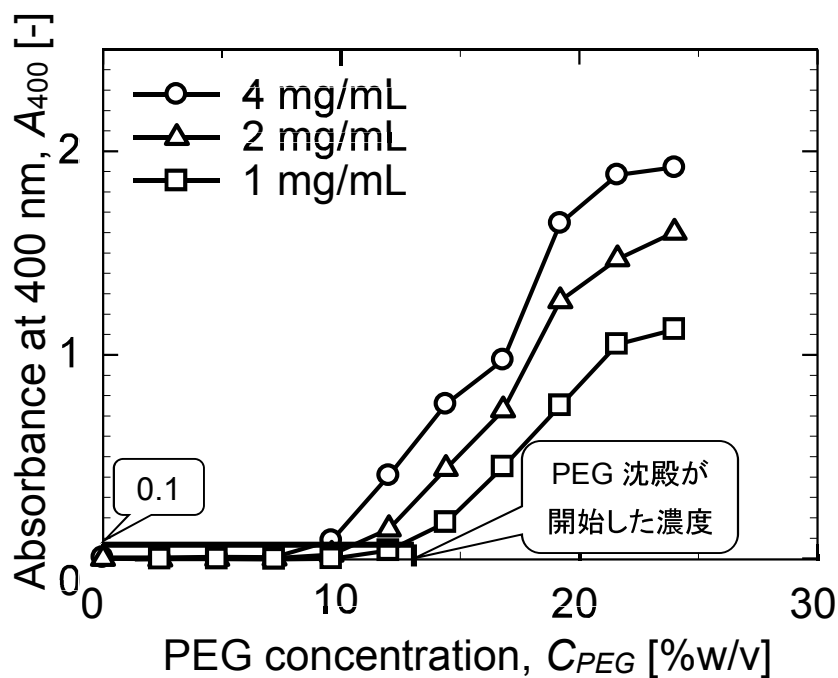


Fig.2-6 PEG 沈殿における吸光度 (濁度) と PEG 濃度の関係

PEG 沈殿が開始した PEG 濃度を横軸にその条件におけるタンパク濃度を縦軸にプロットし、溶解度曲線を作成した (Fig.2-7)。ただし、重合体を含むサンプル (BSA-A7511) の場合、溶解度に重合体濃度を掛けた。例) A7511 の重合体タンパク質濃度  $8 \text{ mg/mL} \times 0.2463$  (dimer, aggregates の含量比の合計, Fig.1) =  $1.97 \text{ mg/mL}$

一般的に PEG 存在下でのタンパク質の溶解度は片対数でプロットし、直線近似すると式 (1) で表される[16]。

$$\log S = \log S_0 - \beta C_{\text{PEG}} \quad (1)$$

S は PEG 濃度,  $C_{\text{PEG}}$  % w/v におけるタンパク質の溶解度である。S<sub>0</sub> は、 $C_{\text{PEG}} = 0$  の時の見かけの溶解度である。β は、直線の傾き [ $\log(\text{mg/mL})/(\% \text{ w/v})$ ] を表す。

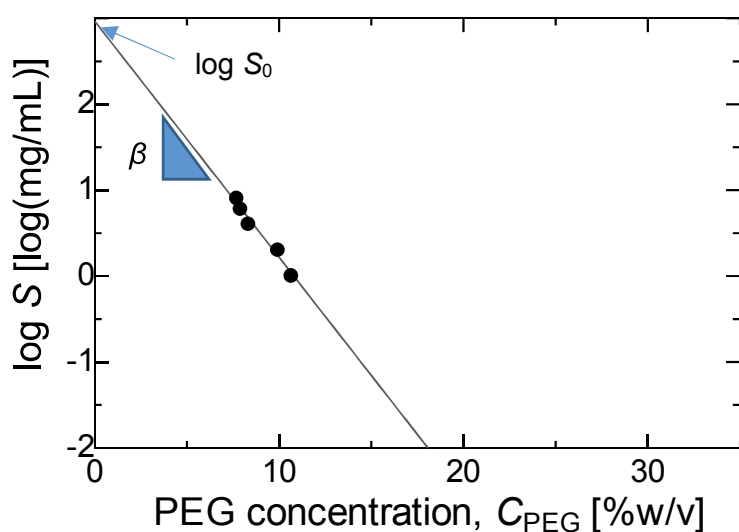


Fig.2-7 濁度法から算出した溶解度曲線

#### 2-2-6. 試験管での PEG 沈殿後の上澄み測定(上澄み法)

- 1) 96-well マイクロプレートにおける PEG 沈殿実験と同様の条件で PEG を添加した低塩濃度緩衝液を作製した。作製した PEG 緩衝液を希釈していき、様々な濃度の PEG 添加緩衝液を作製した。
- 2) 蓋付き試験管に各タンパク濃度  $C_{\text{prot}}$  の溶液を 1 mL 入れ、さらに各 PEG 濃度  $C_{\text{PEG}}$  の緩衝液を 4 mL 入れた。その後、穏やかに 20 分間転倒攪拌し、6 時間以上静置した ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ )。
- 3) 混合溶液を 96-well マイクロプレートに 250  $\mu\text{L}$  入れ、吸光度 (波長 400 nm) を測定した。その後、混合溶液を Durapore Membrane Filter, Millex-GV (0.22  $\mu\text{m}$ ) に通し、沈殿を取り除いた上澄みを 96-well マイクロプレートに 250  $\mu\text{L}$  入れ吸光度 (波長 280、400 nm) を測定した。
- 4) 各濃度のタンパク溶液と吸光度 (波長 280 nm) の検量線から上澄みのタンパク濃度を算出した。ただし、検量線は A1900 のものを使用し、サンプルが A7511 である場合、単量体含量比 0.754 (75.4%) で割ることで補正した。この結果を Fig.2-7 と同様にプロットし、溶解度曲線を作成した。

### 2-2-7. 重合体分離実験（上澄み法）における SEC 測定

重合体分離実験を上澄み法で実施した。サンプルは A7511 を用いた。A7511 のタンパク濃度は、1 mg/mL で実施した。上澄みを脱 PEG 処理し、SEC 分析を実施した。

- 1) CIM QA Monolith disk (BIA Separations, Villach, Austria) をホルダーに入れてカラムを作製した。これを全自動液体クロマトシステムである ÄKTA に接続し、緩衝液 0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl pH 7.0 を 10 mL 送液し、平衡化した。その後、上澄みを注入した (load volume: 0.5 mL)。引き続き、同様の緩衝液で 5 mL 送液し、洗浄した。その後、0.01 M Tris-HCl + 1 M NaCl pH 7.0 を送液し、ステップワイズ溶出を行った。この際、溶出開始から 1 mL 分取した。この時の流速は 1 mL/min で実施した。
- 2) TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub> (Tosoh, Tokyo, Japan) を高速液体クロマトグラフ装置 LC-10ADvp, SPD-10A, RID-10A 3.1.1 (Shimadzu, Kyoto, Japan) に接続し、緩衝液 0.05 M + 0.1 M NaCl pH 7.0 を送液し、平衡化した。その後、分取したサンプルを注入し (load volume: 0.1 mL)、クロマトピークを検出した (N = 2)。この時の流速は 0.5 mL/min で実施した。なお、実験は  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  の条件で実施した。

### 2-2-8. 重合体分離実験（上澄み法）における monomer の回収率、純度の予測計算

2-2-6. において単量体と重合体がどの程度分離できるかを計算し、予測した。ここでは単量体の回収率、純度を計算した。濁度法で得た溶解度曲線から各条件の  $\log S_0$ ,  $\beta$  を算出し、式 (1) を用いて計算した。サンプルは A7511, 1 mg/mL, pH 5.0, 7.0 の条件で PEG 沈殿を実施した。重合体の溶解度  $S_{\text{di,agg}}$  は A7511 の溶解度曲線から算出した値、単量体の溶解度  $S_{\text{mo}}$  は A1900 の曲線から算出した値を用いた。 $C_{\text{PEG}}$  の時の上澄み中の monomer 回収率の予測計算値  $\text{Cal. } Y_{\text{mo}}$  (%) とその純度の予測計算値  $\text{Cal. } P_{\text{mo}}$  (%) をそれぞれ式 (2)、(3) で表す。

$$\text{Cal. } Y_{\text{mo}} = 100 S_{\text{mo}} / C_{0,\text{mo}} \quad (2)$$

$$\text{Cal. } P_{\text{mo}} = 100 S_{\text{mo}} / (S_{\text{di,agg}} + S_{\text{mo}}) \quad (3)$$

$C_{0,\text{mo}}$  は、サンプル中の初期単量体濃度を表す。 $S_{\text{mo}} > C_{0,\text{mo}}$  の場合は、 $S_{\text{mo}} = C_{0,\text{mo}}$  として計算し、 $S_{\text{di,agg}} > C_{0,\text{di,agg}}$  の場合は、 $S_{\text{di,agg}} = C_{0,\text{di,agg}}$  として計算した。 $C_{0,\text{di,agg}}$  は、サンプル中の初期重合体濃度を表す。

### 2-2-9. 上澄み法での monomer と dimer, aggregates の回収率と純度の算出

SEC 測定の結果から、 $C_{\text{PEG}}$  の時の上澄み中の monomer 回収率  $Y_{\text{mo}}$  (%) と dimer 回収率  $Y_{\text{di}}$  (%) と aggregates 回収率  $Y_{\text{agg}}$  (%) の式を (4)、(5)、(6) で表す。

$$Y_{mo} = 100 A_{mo}/A_{mo,0} \quad (4)$$

$$Y_{di} = 100 A_{di}/A_{di,0} \quad (5)$$

$$Y_{agg} = 100 A_{agg}/A_{agg,0} \quad (6)$$

$A_{mo}$ は、 $C_{PEG}$ におけるmonomerの面積、 $A_{di}$ は $C_{PEG}$ におけるdimerの面積、 $A_{agg}$ は、 $C_{PEG}$ におけるaggregatesの面積を表す。また、 $A_{mo,0}$ は、 $C_{PEG} = 0$ におけるmonomerの面積、 $A_{di,0}$ は、 $C_{PEG} = 0$ におけるdimerの面積、 $A_{agg,0}$ は、 $C_{PEG} = 0$ におけるaggregatesの面積を表す。さらに、 $C_{PEG}$ の時の上澄み中のmonomer純度 $P_{mo}$  (%)とdimer純度 $P_{di}$  (%)とaggregates純度 $P_{agg}$  (%)の式を(7)、(8)、(9)で表す。

$$P_{mo} = 100 A_{mo}/(A_{mo} + A_{di} + A_{agg}) \quad (7)$$

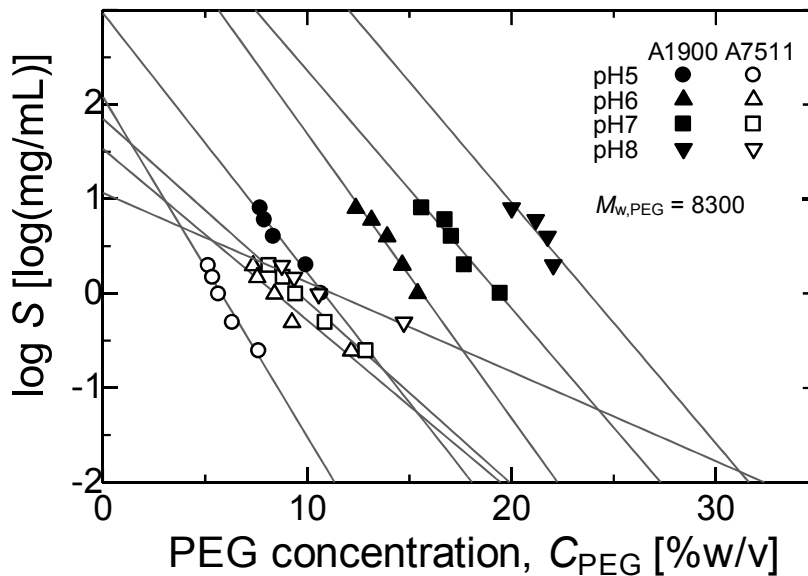
$$P_{di} = 100 A_{di}/(A_{mo} + A_{di} + A_{agg}) \quad (8)$$

$$P_{agg} = 100 A_{agg}/(A_{mo} + A_{di} + A_{agg}) \quad (9)$$

## 2-3. 結果および考察

### 2-3-1. 濁度法におけるA7511とA1900の溶解度曲線

濁度法によって重合体を多く含むA7511とA1900のPEG沈殿実験を行い、その結果から算出した溶解度曲線を示す (Fig.2-8)。



**Fig.2-8 A7511とA1900の溶解度曲線 (濁度法)**

Sample : 1 - 8 mg/mL BSA -A7511, A1900

Buffer : 0 - 24%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 M NaCl pH 5.0,

0 - 24%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl pH 6.0, 7.0, 8.0



A7511とA1900の溶解度曲線を比較すると、A1900の溶解度よりも重合体を多く含むA7511の溶解度の方が小さいことが分かった。これは、A7511に含まれている単量体よりも重合体の方がPEG濃度の低い領域において沈殿しやすいからだと考えられる。

また、pHが増加するほど、A7511, A1900の溶解度が大きくなる傾向を示した。これは、BSAの等電点からpHが離れるほどタンパク質の持つ電荷反発が大きくなるためであると考えられる。

### 2-3-2. 各分子量のPEGにおけるA7511, A1900の溶解度曲線（濁度法）

濁度法によって各分子量のPEGを用いてA7511とA1900のPEG沈殿実験を行い、その結果から算出した溶解度曲線を示す（Fig.2-9）。

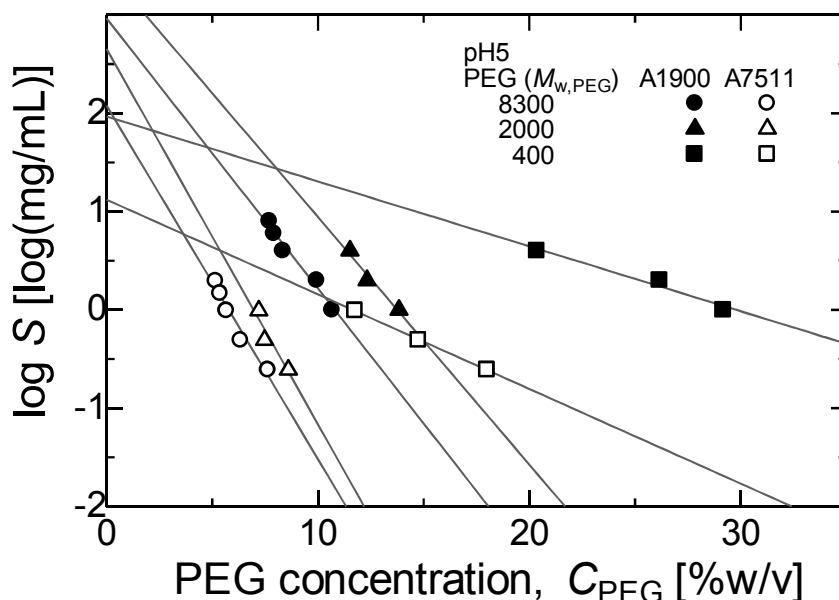


Fig.2-9 各分子量のPEGにおけるA7511, A1900の溶解度曲線（濁度法）

Sample : 1 - 8 mg/mL BSA -A7511, A1900

Buffer : 0 - 30%w/v PEG( $M_w = 8300, 2000, 400$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 M NaCl pH 5.0

A7511, A1900のいずれにおいてもPEGの分子量が大きいほど、溶解度が小さくなる傾向を示した。これはPEGの分子量が小さいとPEGの持つ排除体積効果が弱くなるためだと考えられる。このように溶媒のpHやPEG分子量の違いによって溶解度が変化する。そのため、溶解度差が最も大きい条件を設定すれば分離性能はそれに応じて向上する。しかしながら、注意点も存在する。PEGは分子量によって物性（形状や粘度等）が異なるため導入を予定している工程での取り扱いを考慮する必要がある。例えばPEG400の場合、沈殿する条件は高濃度のPEG溶液が必要であり、高粘度溶液用の設備を導入しなければならない。

### 2-3-3. 上澄み法におけるA7511とA1900の溶解度曲線

上澄み法によってA7511とA1900のPEG沈殿実験を行い、その結果から算出した溶解度曲線を示す (Fig.2-10)。

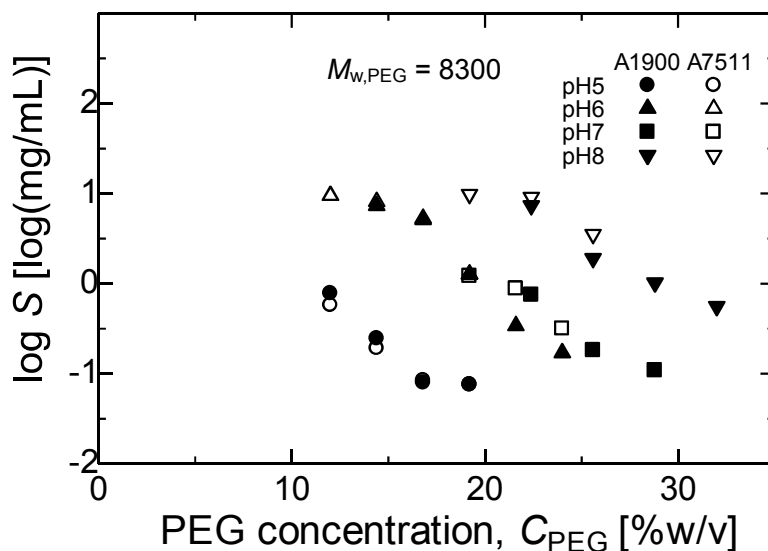


Fig.2-10 A7511とA1900の溶解度曲線 (上澄み法)

Sample : 1 - 8 mg/mL BSA -A7511, A1900

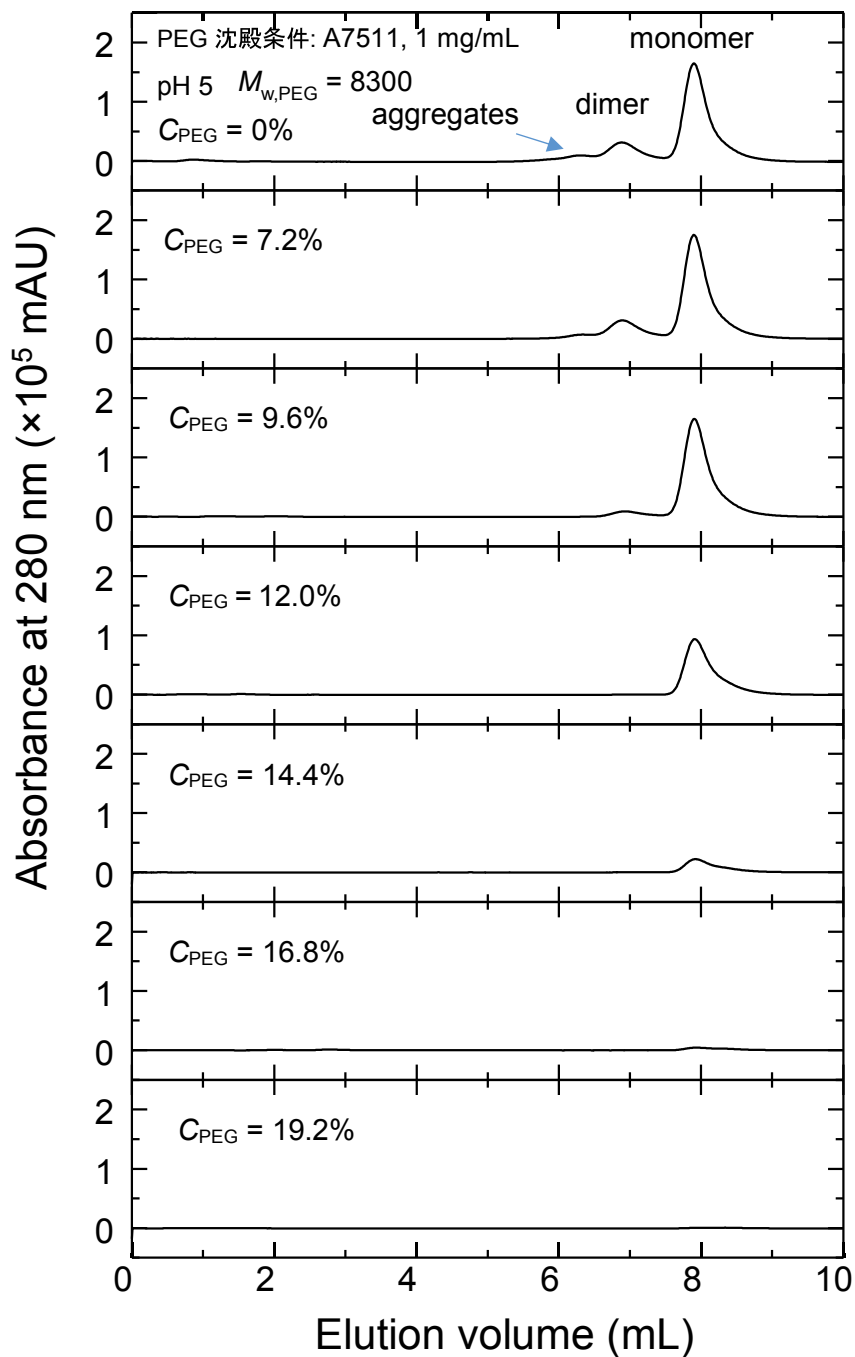
Buffer : 0 - 32%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 M NaCl pH 5.0,

0 - 32%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl pH 6.0, 7.0, 8.0

タンパク濃度が低い範囲においてA7511とA1900の溶解度が一致している。これは、沈殿が除去された上澄みには単量体が多く存在することを意味する。よって、沈殿には重合体が多く含まれ、重合体が選択的に沈殿可能であることが想定された。

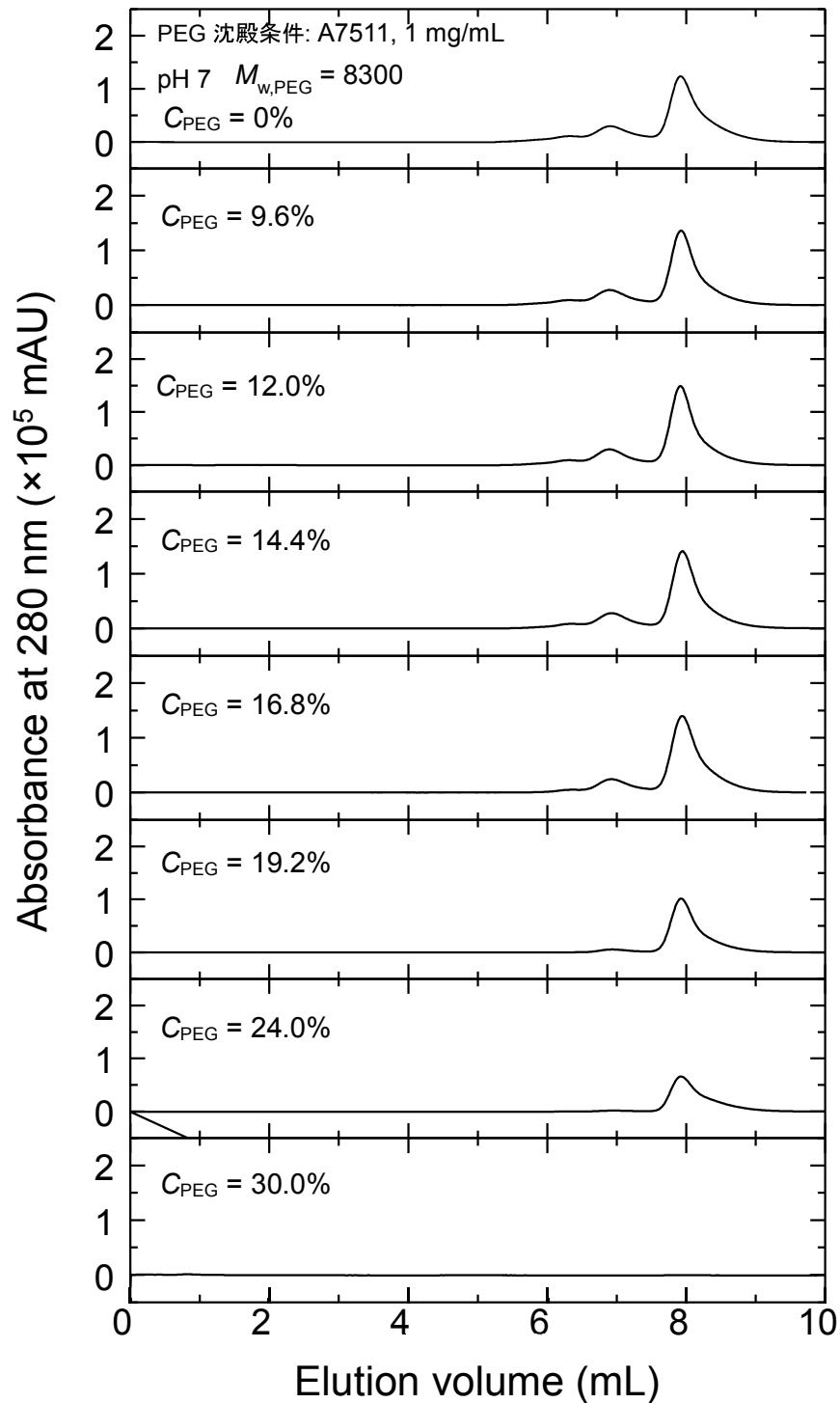
#### 2-3-4. SEC分析におけるPEG沈殿後の上澄みのクロマト挙動

上澄み法において各条件で得られた沈殿溶液を脱PEG処理後、SECで分析した。



**Fig.2-11 PEG沈殿後の上澄み(A7511, pH 5.0)のSEC分析結果**

Column: TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub> ( $d_c = 0.78$  cm,  $Z = 30$  cm),  $F = 0.5$  min/mL, sample: PEG沈殿上澄み (sample: A7511, 5 mg/mL, 1 mLと0.01 M Sodium acetate + 0.03 M NaCl + 0-40%w/v PEG pH 5.0, 4 mLを混合し、6時間後に0.22  $\mu$ mフィルターでろ過したものをQA Monolithで脱PEG処理したもの), 0.05 mL, mobile phase: 0.05 M Sodium phosphate + 0.1 M NaCl pH 7.0



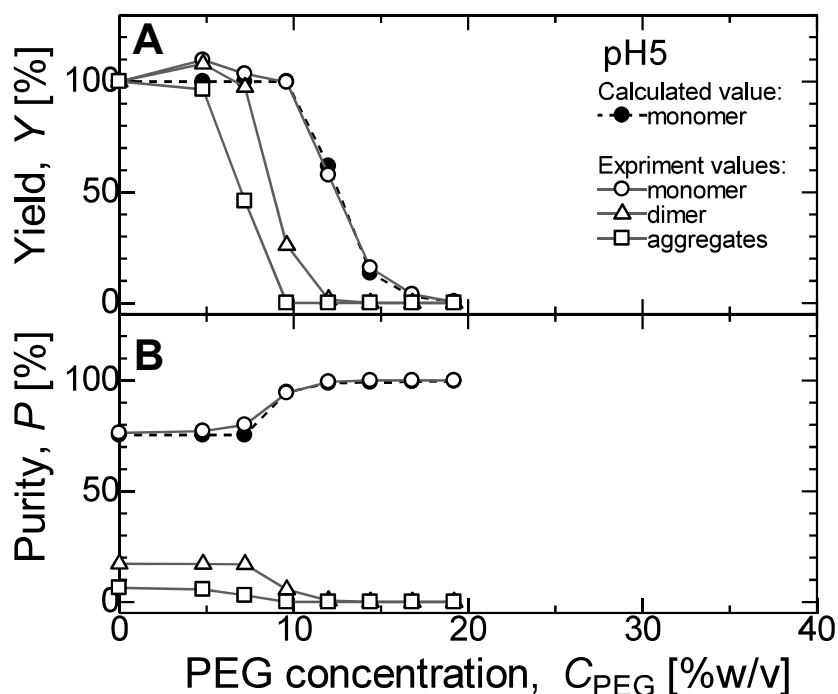
**Fig.2-12 PEG沈殿後の上澄み(A7511, pH 7.0)のSEC分析結果**

Column: TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub> ( $d_c = 0.78$  cm,  $Z = 30$  cm),  $F = 0.5$  min/mL, sample: PEG沈殿上澄み (sample: A7511, 5 mg/mL, 1 mLと0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl + 0 - 40%w/v PEG pH 7.0, 4 mLを混合し、6時間後に0.22  $\mu$ mフィルターでろ過したものをQA Monolithで脱PEG処理したもの), 0.05 mL, mobile phase: 0.05 M Sodium phosphate + 0.1 M NaCl pH 7.0

試料に重合体が含まれる場合、PEG濃度の上昇とともにaggregates, dimer, monomerの順でピークが消失していった (Fig.2-11, 12)。これは、Fig.2-8から分かるように重合物の溶解度は小さいので、重合体から順番に沈殿が生じていく傾向にあることを裏付ける。したがって、選択的沈殿が可能であることが示唆された。

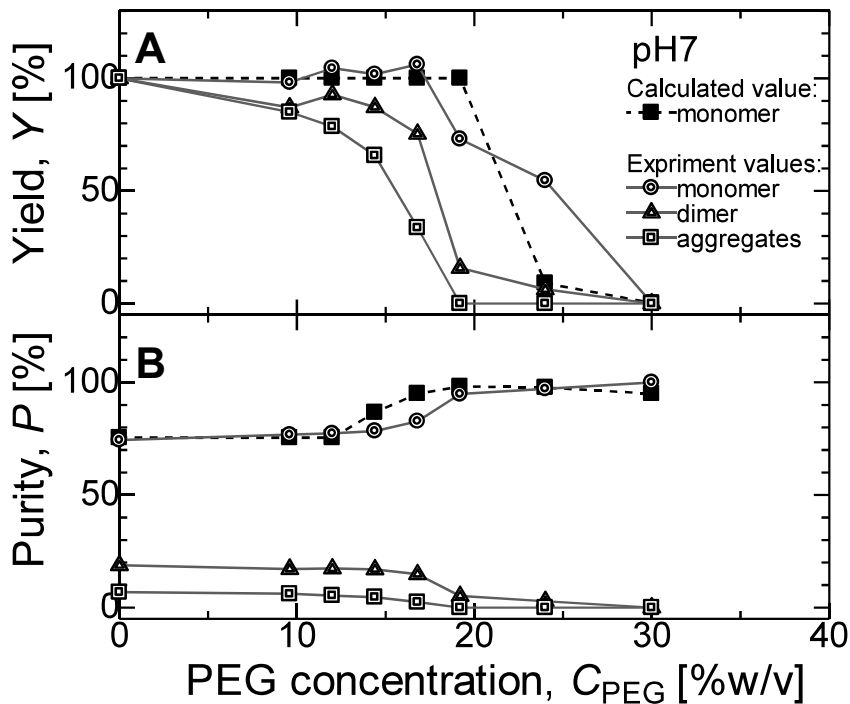
### 2-3-5. PEG沈殿後の上澄み中のmonomer, dimer, aggregatesの回収率と純度

式 (1) ~ (3) を用いて、monomerの回収率、純度を予測した (Fig.2-13, 14 Calculated Value)。実験で得られた上澄みのSEC分析結果から式 (4) ~ (9) を用いて、monomer, dimer, aggregatesの面積比を算出しそれぞれの回収率と純度を求めた (Fig. 2-13, 14 Experiment Values)。



**Fig.2-13 PEG沈殿後の上澄み(A7511, pH 5.0)中のmonomer, dimer, aggregatesの回収率と純度の計算値と実測値の比較**

PEG沈殿実験条件は、sample: A7511, 5 mg/mL, 1 mLと0.01 M Sodium acetate + 0.03 M NaCl + 0-40% PEG (w/v) pH 5, 4 mLを混合した6時間後の溶液である。これを0.22  $\mu$ mフィルターでろ過したものをQA Monolithで脱PEG処理し、SEC分析した。Column: TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub> ( $d_c$  = 0.78 cm, Z = 30 cm).  $F$  = 0.5 mL/min, 0.05 mL, mobile phase: 0.05 M Sodium phosphate + 0.1 M NaCl pH 7.0



**Fig.2-14 PEG沈殿後の上澄み(A7511, pH 7.0)中のmonomer, dimer, aggregatesの回収率と純度の計算値と実測値の比較**

PEG沈殿実験条件は、sample: A7511, 5 mg/mL, 1 mLと0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl + 0-40% PEG (w/v) pH 7, 4 mLを混合した6時間後の溶液である。これを0.22  $\mu$ mフィルターでろ過したものをQA Monolithで脱PEG処理し、SEC分析した。Column: TSK-gel G3000SW<sub>XL</sub> ( $d_c$  = 0.78 cm, Z = 30 cm).  $F$  = 0.5 mL/min, 0.05 mL, mobile phase: 0.05 M Sodium phosphate + 0.1 M NaCl pH 7.0

pH 5においてmonomerの回収率、純度の予測値と実測値はほぼ一致した (Fig.2-13 A, B)。monomerの回収率を維持しつつ、純度を高い条件はC<sub>PEG</sub> = 10%付近であるが、回収率がこの付近で急激に低下することを予測していた。実際にC<sub>PEG</sub> = 12%では回収率が急激に低下した。

pH 7において予測したmonomer回収率と純度は実測値と傾向は同じであったが、一部ずれが生じた (Fig.2-14)。ここでは単量体と重合体の溶解度差が十分大きい、すなわちmonomerの回収率が高く、dimer, aggregatesの回収率が低い条件はpH 7, C<sub>PEG</sub> = 19.2%であると予測 (Fig.2-14 A) された。しかし、実際は予測されたmonomer回収率よりも低い結果となった (Fig.2-14 B)。このずれの原因としては、A7511に含まれる単量体の溶解度が正確にはA1900の溶解度とは一致していない可能性が考えられる。これはpH 5以上の条件ではA7511の $\beta$ がA1900のものより小さい値となったことから想定される (Fig.2-8)。

pH 5, 7 両条件において dimer の回収率が下がり始める PEG 濃度から少し PEG 濃度が上昇すると monomer の回収率も下がり始める傾向があることが分かった (Fig.2-13, 14)。したがって、pH および PEG 濃度を変動パラメータとして条件設定をした場合、重合体を含む BSA の monomer 回収率を維持しつつ純度 100% を達成する沈殿条件の設定は難しいと言える。これを改善する方法としては、monomer と dimer の溶解度差をより大きくする条件設定をする必要がある。具体的には、塩濃度や塩の種類を変更する方法や有機溶媒などを添加する方法、温度を変更する方法などあげられる[Cohn ら;1943]。または、PEG 沈殿での重合体分離工程で monomer 純度 100% を必須とするのではなく、回収率を維持しつつある程度まで純度を高めておいて、次の工程で完全に重合体を除去するという方法も考えられる。例えば、イオン交換クロマトグラフィー (吸着溶出モード) を利用すれば、脱 PEG 工程も兼ねることができる。

#### 2-4. 結言

PEG 沈殿において単量体 (monomer) と重合体 (dimer, aggregates) の溶解度は溶媒の pH, PEG 分子量によって左右され、いずれの条件でも単量体より重合体の溶解度の方が低かった。試料に重合体を含む場合、aggregates, dimer, monomer の順で選択的に沈殿が進んでいくことが分かった。濁度法における溶解度曲線から重合体分離実験での monomer 回収率と純度を予測した結果、pH 5 では実測値を一致したが、pH 7 では一部ずれが確認された。

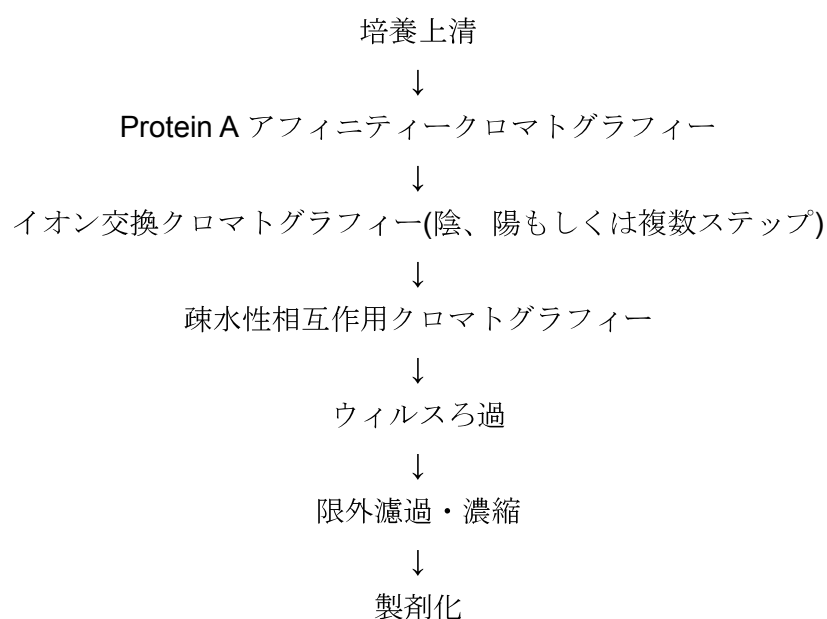
pH 5, 7 両条件において dimer, aggregates の回収率が下がり始める PEG 濃度から少し PEG 濃度が上昇すると monomer の回収率も下がり始める傾向があることが分かった。したがって、pH および PEG 濃度を変動パラメータとして条件設定をした場合、重合体を含む試料 (A7511) の monomer 回収率を維持しつつ純度 100% を達成する沈殿条件の設定は難しいと言える。

この問題を解決する方法としては単量体と重合体の溶解度差をさらに大きくする必要があり、塩濃度や塩の種類を変更するなど、さらなる変動パラメータの追加検討をする必要がある。

### 第3章 クロマトグラフィーによる重合体分離

#### 3-1. 緒言

**Fig.3-1** に示しているのは抗体医薬品の精製プロセスにおけるクロマトグラフィープロセスの例である。まず、**Protein A** アフィニティークロマトグラフィー (**PAC**) で目的物質と不純物を分離する。この操作は低い酸性下で行われるので、変性体や重合体を生じてしまう。なおかつ、この工程では重合体を完全に分離することは困難であるため、この工程以降に重合体分離の工程が必要である。一般的には、イオン交換クロマトグラフィー (**IEC**) や疎水性相互作用クロマトグラフィー (**HIC**) によって重合体は分離除去される。しかし、単量体と重合体を完全に分離する条件の最適化は難しく、重合体の除去率を高くすると、単量体の収率も落ちてしまう傾向がある。このように、重合体分離工程は往々にして、生産性へ影響を与える。上記の方法とは異なる重合体を除去する方法として **IEC** 移動相に **PEG** を添加する方法やミックスドモードクロマトグラフィー (**MMC**)、塩耐性クロマトグラフィー (**STC**) などが提案されており、有効性が示されている[10]。



**Fig.3-1** 一般的な抗体医薬品クロマトグラフィープロセス

本章では重合体分離方法として **PEG** 添加静電的相互作用クロマトグラフィー(**PEG** 添加 **IEC**)、ミックスドモードであるヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー(**HAC**)及び塩耐性クロマトグラフィー(**STC**)を利用し、この分離機構について調査した。

まず、**PEG** 添加 **IEC** における重合体分離について説明する。**PEG** は非イオン性ポリマーであり、タンパク質の修飾(**PEG** 化)や沈殿剤、生体材料の親水化に利用されている。



ここで、現在考えられているクロマトグラフィーカラムにおける PEG の遅延効果の機構を説明する。Fig.3-2 はクロマトグラフィーカラム内に第 3 成分として PEG が存在するときの模式図である[P.Gagnon, 2007]。小さい楕円形のものが PEG で大きな青い球状のものがタンパク質を表す。タンパク質溶液中に PEG を添加した場合、PEG は水分子よりも大きな分子半径を持つために、赤い矢印で示されるようにタンパク質周辺から排除され、タンパク質表面には多くの水分子が存在する選択的水和を引き起こす。また、PEG はリガンド近傍からも排除されると考えられている。この水の濃度差を解消しようとするため、タンパク質のリガンドへの結合が促進される。

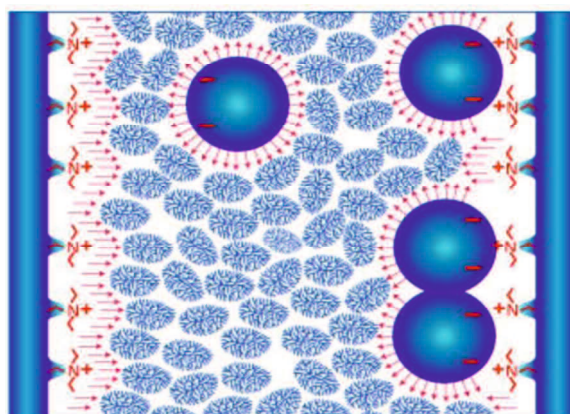


Fig.3-2 カラム内に PEG が存在するときの模式図

IEC において、分離を改善させるためには移動相条件である pH、カラム操作条件である流速・勾配・カラム形状を変化させる必要がある。しかし、移動相への PEG 添加は一般的ではないが、流速や勾配を変化させる以上に単純な手法であり、魅力的な手法である。既に PEG 添加により溶出が遅れるのみならず、タンパク質とその重合体の分離性能が向上することが報告されている[10]が、その機構は解明されていない。そこで、PEG 添加による溶出位置のシフト、溶出曲線の幅や結合様式(吸着サイト数)について解析をした。

次に、MMCについて説明する。MMCは一般的なIECに疎水性相互作用などの別の分離モードを併せ持つクロマトグラフィーである。近年、このMMCの開発が進められており、不純物除去の検討も行われている[13, 20, 21]。MMCは従来のIECよりも選択性が高く、分離性能を向上させる可能性を期待されている。しかし、その保持機構は複雑であり、プロセスの最適化条件設定時はトライ&エラーの検討になってしまい、その現象を理論的に把握することは難しい。そこで、本章ではMMCの中でもHAC、STCについて解析を行った。

ヒドロキシアパタイト(HA)は、組成式  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  の無機性結晶を焼結し、多孔質球状に造粒したものである。リン酸イオンに起因する P サイトとカルシウムイオンに起因す

る C サイトの 2 つのサイトをもつ両性イオン交換体である。この 2 つのサイトの相互作用によりタンパク質、DNA に対して特徴的な分離挙動を示すことが知られている[22, 23]。

塩耐性(ST)は、電氣的相互作用に加えてポリアミンの炭素鎖による疎水性相互作用を合わせもつと考えられている。この相互作用により高塩濃度条件下でも高い結合力をもつとされるが、保持機構は未だに解明されていない[24 - 27]。

このようなMMCの保持機構を解明することで、分離性能の向上及び分離条件の迅速な最適化が可能であると考えられる。そこで、複数の移動相とタンパク質を使用して溶出実験を行い、MMCの保持機構について調査し、解析した。

クロマトグラフィーの分離性能は細孔内拡散に支配される[29]。よって、分子量の大きな分子、例えばPEG化タンパクやDNAのようなものの分離にとっては特に重要なパラメータである。細孔内拡散係数を算出するためには、溶液中の分子拡散係数を求める必要がある。現状では比較的小さな球形のタンパク (分子量が10000~100000) は分子拡散係数を計算で見積もることはできるが、PEG化タンパクやDNAのような大きな分子は分子拡散係数を計算することは難しい。よって、このような大きな分子量のものの分子拡散係数を計算できるように従来の相関式を改編する必要がある。ここでは、この分子拡散係数を測定する方法としてTaylor法を用いた[33 - 35]。重合体においてもこのTaylor法を用いて分子拡散係数を算出することができれば、重合体分離性能を予測する上で有用であると考えられる。

## 3-2. 実験

### 3-2-1. 試薬

**Table 3-1** 使用したタンパク質とその他の試料

Sample	$M_w$ [g/g-mol]	pI	Supplier	Cat No.
$\alpha$ -Lactoalbumin (LA)	14000	4.2 - 4.5	SIGMA	L-6010
Ovalbumin(OA)	44000	4.7	SIGMA	A-5378
Bovine serum albumin(BSA) ,monomer	68000	4.7 - 4.9	SIGMA	A-1900
Bovine serum albumin	68000, 136000	4.7 - 4.9	SIGMA	A-7511
$\beta$ -lactoglobulin(LG)	35000	5.1 - 5.3	SIGMA	L-0130
Myoglobin(Mb)	17800	7.2	SIGMA	M-0630
Immunoglobulin G(IgG) polyclonal	150000	5 - 8	Octapharma	-
Immunoglobulin G(IgG) monoclonal	150000	-	Mab 組合	M-L001
Latoferrin(LF)	83000	8.7	雪印	-
Ribonuclease A(RNase)	13700	9.5 - 9.6	SIGMA	R-4875
Cytochrome C(Cyt C)	12400	10	SIGMA	C-2506
Lysozyme(Lys)	14300	11.0 - 11.4	Seikagaku co.	100940
3T	851	-	TOS	-
6T	1763	-	TOS	-
9T	2757	-	TOS	-
12T	3588	-	TOS	-
20T	6022	-	TOS	-
50T	15148	-	TOS	-
Caffein	194.19	-	Wako	LDG1707

$M_w$  : 分子量、pI : 等電点、TOS : つくばオリゴサービス

本章で使用した試薬は**Table2-2**のものに加えて**Table3-2**に示すものを使用した。

**Table 3-2** クロマト分離実験における使用試薬

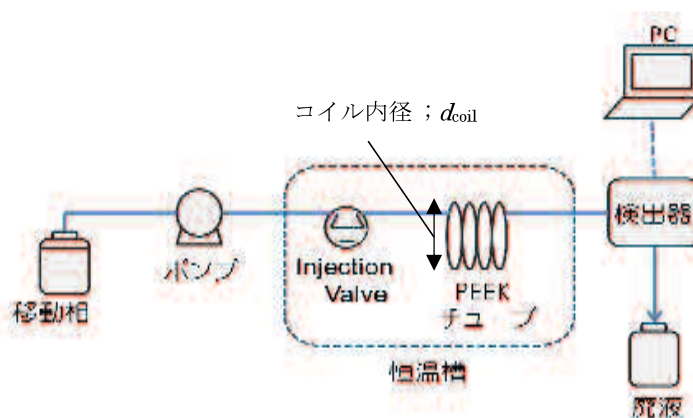
Substance	Supplier	Cat No.
塩化カルシウム(二水塩) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	半井化学	067-30
硫酸ナトリウム 10 水和物 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	Wako	196-03315
ほう酸 $\text{H}_3\text{BO}_3$	Wako	10043-35-3
HEPES $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	Wako	7365-45-9
L-アルギニン塩酸塩 $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$	AJINOMOTO	1192-34-2
尿素 $\text{NH}_2\text{CONH}_2$	Wako	219-00175

### 3-2-2. 装置

本章の IEC、HAC、STC 実験で用いた装置は、第 2 章 2-2-2. 装置と同様のものである(**Fig.2-4**)。また、Taylor 法による分子拡散係数算出実験では以下の装置を用いた(**Fig.3-3**)。

- ・ポンプ：インテリジェント HPLC ポンプ (PU-2085 型、日本分光)
- ・インジェクションバルブ：V-450 (IDEX)
- ・UV 検出器：インテリジェント UV 検出器 (UV-2075 型、日本分光)
- ・フローセル：マイクロフローセル(セル容量:  $1 \mu\text{L}$ 、日本分光)
- ・UV モニター：Monitor UV-900 (amersham pharmacia biotech)
- ・RI 検出器：RI-Ditector (L-2490、日立製作所)

恒温槽にインジェクションバルブ、PEEK チューブを入れ、温度制御を行った。



**Fig.3-3** Taylor 法の実験で用いた装置模式図

### 3-2-3. 使用したクロマトグラフィーカラム及び緩衝液とその調整法

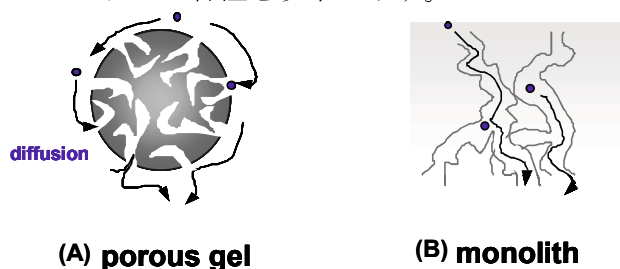
本章で使用したカラムと緩衝液およびその調整方法を示す。

**Table3-2** クロマト実験に使用したカラム

Column	Z [cm]	$d_c$ [cm]	$d_p$ [ $\mu\text{m}$ ]	$\epsilon$ [-]	Supplier
SP Sepharose HP	5	0.9	34	0.39	GE Health Care
Q Sepharose HP	5	0.9	34	0.36	GE Health Care
CIM QA Monolith	0.3	1.2	-	0.62	BIA Separation
CIM DEAE Monolith	0.3	1.2	-	0.62	BIA Separation
CIM SO <sub>3</sub> Monolith	0.3	1.2	-	0.62	BIA Separation
CHT-Type I	10	0.4	40	0.33	BioRad
Toyopearl NH <sub>2</sub> 750F (Salt-tolerant 75F NH <sub>2</sub> )	5.7	0.5	45	0.36	TOSOH
TSKgel G3000SW <sub>XL</sub>	30	7.8	5	0.35	TOSOH
Polyetheretherketone (PEEK)	246.5	-	-	-	GE Health Care

Z: カラム長さ、 $d_c$ : カラムの内径、 $d_p$ : 粒子径、 $\epsilon$ : カラム空隙率

それぞれの充填剤およびカラムの特性を以下に示す。



**Fig.3-4** 充填剤構造式

クロマトグラフィー用の充填剤には以下のような官能基が導入されている。

#### SP Sepharose HP

陽イオン交換樹脂 (porous gel タイプ)

骨格材質: 6%高度架橋 Agarose

官能基: SP sulfopropyl group [-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-SO<sub>3</sub>]

#### Q Sepharose HP

陰イオン交換樹脂 (porous gel タイプ)

骨格材質: 6%高度架橋 Agarose

官能基: Q quaternary ammonium group (第4級アンモニウム)

[-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>H(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]

### CIM SO<sub>3</sub> Monolith

陽イオン交換カラム

骨格機質：poly(glycidyl methacrylate -co-ethylene glycol-dimethacrylate)

官能基：SP sulfopropyl group [-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>]

### CIM QA Monolith

陰イオン交換カラム

骨格材質：poly(glycidyl methacrylate -co-ethylene glycol-dimethacrylate)

官能基：Q quaternary ammonium group (第4級アンモニウム)

[-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>H(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>]

### CHT-Type I

ヒドロキシアパタイトカラム (陽イオン交換+金属アフィニティー、porous gel タイプ)

ヒドロキシアパタイトは Ca<sup>2+</sup>と PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>イオンからなる白色の針状結晶であり、カルシウムとリン酸の化合物であるため、生理学的に不活性で化学的にも非常に安定な物質である。薬品への耐性が高く、膨張縮小せず、アルカリに対して高い安定性を有するという特徴を持つが pH 5.5 以下の酸性条件ではカルシウムが溶出し分子の崩壊を招くため使用できない。結合様式はリン酸イオン(P サイト)における陽イオン交換と Ca イオン(C サイト)における金属アフィニティーであると考えられている(Fig.3-5)。

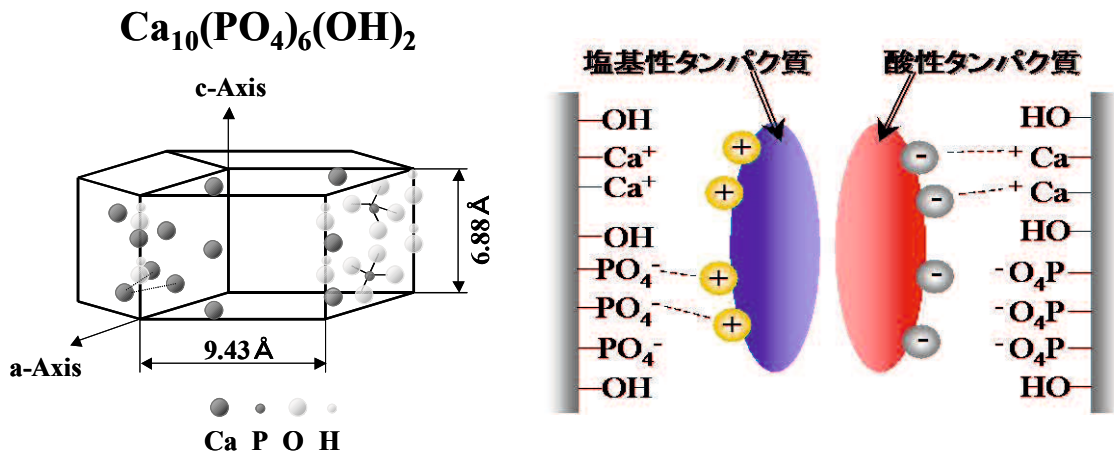


Fig.3-5 HA の結晶構造と吸着模式図

### Toyopearl NH<sub>2</sub> 750F(Salt-tolerant 75F NH<sub>2</sub>)

Toyopearl NH<sub>2</sub> 750F は官能基に第 1 級アミノ基(-NH<sub>2</sub>)をもつ充填剤である(Fig.3-6)。高塩濃度条件下でも高い結合力を有する[28]。

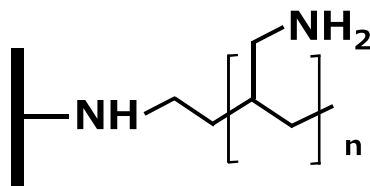


Fig.3-6 グラフト化ポリアミンの模式図

Table3-3 IEC と SEC に用いた緩衝液

Substance	Substance concentration [M]	pH	NaCl concentration [M]	PEG concentration [%w/v]
Sodium acetate	0.01	5.0	0.03–1.0	0–5
Tris-HCl	0.01	6.0	0.03–1.0	0–5
Tris-HCl	0.01	7.0	0.03–1.0	0–5
Tris-HCl	0.01	8.0	0.03–1.0	0–5
Sodium phosphate	0.01	7.0	0.03–1.0	0–5
Sodium phosphate	0.05	7.0	0.1	0

緩衝液の調整方法については、基本的には第2章2-2-3.で示したものと同様である。ただし、PEG緩衝液は異なるので以下に示す。

#### PEG 添加クロマト用緩衝液

例) 5%w/v PEG + 0.03 M NaCl + 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.0 1 L

- 1) Tris、NaCl を所定のモル濃度になるように量り取り、それぞれ 1000 mL Buffer 瓶に加えた。そして、瓶の中に攪拌子を入れ、MilliQ 水を約 500 mL 加え、試薬が溶解するまで攪拌した。
- 2) 100 mL ビーカーに PEG を 50 g 量り取り、MilliQ 水を約 70 mL 加えた。このビーカーを沸騰したお湯に浸し、粉末状の PEG を溶かす。溶けたら、PEG 溶液を 1000 mL Buffer 瓶に加えた。このとき、ビーカーに MilliQ 水を加え、壁面についた PEG がなくなるまで洗い流した。その後、Buffer 瓶中の溶液を攪拌した。
- 3) 1.0 M HCl を添加し、目的の pH になるよう調整した。
- 4) 1000 mL Buffer 瓶から 1000 mL メスフラスコに混合液を移し、1000 mL になるようにメスアップした。

**Table3-4 HAC に用いた緩衝液**

*	Buffer	Gradient
A	10 mM Sodium phosphate + 0.1 mM CaCl <sub>2</sub> (pH 6.0, 6.8, 8.0, 9.0)	Sodium phosphate gradient from 0.01 - 0.4 M
B	10 mM Sodium phosphate + 0.1 mM CaCl <sub>2</sub> (pH 6.8)	NaCl gradient from 0.03 - 1.0 M
C	10 mM HEPES + 3 mM CaCl <sub>2</sub> (pH 6.8)	Sodium sulfate gradient 0.01 - 0.6 M
D	10 mM Sodium phosphate + 0.1 mM CaCl <sub>2</sub> (pH 6.8) + 1.0 M boric acid	Sodium phosphate gradient 0.01 - 0.4 M

\*A: HAC 標準緩衝液、B: NaCl 勾配用緩衝液、C: P サイト遮蔽用緩衝液、

D: C サイト遮蔽用緩衝液

**Table3-5 STC に用いた緩衝液**

*	Buffer	Gradient
E	10 mM Sodium Acetate (pH 4.4, 4.6, 5.0, 5.5)	NaCl gradient 0.03 - 2.0 M
F	10 mM Tris-HCl (pH 7.0)	NaCl gradient 0.03 - 2.0 M
G	10 mM Tris-HCl (pH 7.0)	Arginine gradient 0 - 1.0 M
H	10 mM Tris-HCl + 1 M Urea (pH 7.0)	NaCl gradient 0.03 - 2.0 M

\*E、F: イオン交換用緩衝液、G、H: 疎水性相互作用確認用の緩衝液

ただし、全ての緩衝液はメスアップ後、Millipore 製フィルター (0.45 μm) での吸引濾過を実施した。その後、脱気を行った。吸引濾過の際に緩衝液の塩濃度が変わらないように初めに低塩濃度緩衝液を、最後に高塩濃度緩衝液の順で行った。

### 3-2-4. イオン交換クロマトグラフィー(IEC)

本章では pH を一定として、移動相塩濃度(NaCl による)を直線的に増加させる直線勾配溶出法(Linear Gradient Elution)を使用し実験を行った。実験方法は以下に示す。

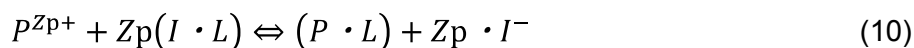
- 1) 充填剤 Q 及び SP Sepharose HP は供給メーカーのパッキングプロトコルに従い plastic column ( $d_c = 0.9$  cm,  $Z = 3.0$  cm,  $V_t = 1.91$  mL or  $d_c = 0.9$  cm,  $Z = 5.0$  cm,  $V_t = 3.18$  mL)に充填した。CIM QA 及び SO3 Monolith disk ( $d_c = 1.2$  cm,  $Z = 0.3$  cm,  $V_t = 0.34$  mL) は専用のホルダーに装着し使用した。
- 2) ÄKTA にカラムを取り付け、まず高塩濃度緩衝液で伝導度をあげていきそのあと低塩濃度緩衝液で電気伝導度を下げていき伝導度が一定になるまで平衡化を行った。(カラム体積の 5 倍以上送液)



- 3) 低塩濃度緩衝液でカラムが平衡化されたらサンプルループ(0.1~1 mL)にシリンジを用いて試料を満たし、インジェクションバルブで試料を移動相にのせて試料パルスとして注入した。
- 4) 時間(送液量)とともに移動相の塩濃度を直線的に増加させて目的物質を溶出させた(再現性を含め2回)。実験は部屋温度 25±1°Cにおいて実施した。

### 3-2-4-1. IECにおけるイオン交換反応

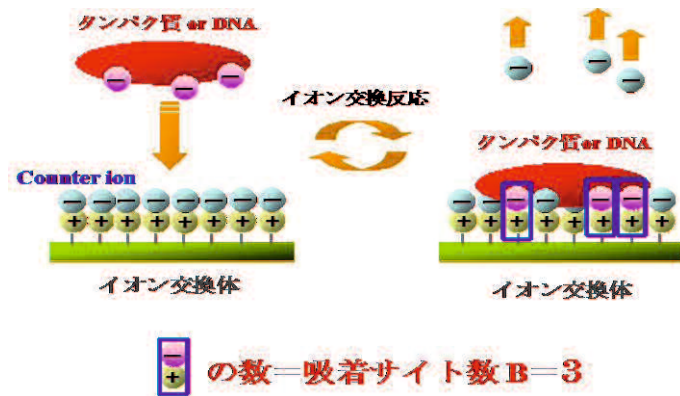
タンパク質のイオン交換体への吸着は、対イオンすなわちイオン強度によって大きく変化する。固定相における対イオン濃度がタンパク質の吸着によりほとんど変化せず ( $[I \cdot L] = \text{一定}$ )、イオン交換体  $L$  から放出された対イオンの量は移動相におけるイオンの強度に比例する、と仮定すると分配係数  $K$  は次式で表される。



$$K_e = \frac{[P \cdot L][I^-]^{Zp}}{[P^{Zp+}][I \cdot L]^{Zp}} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} K &= \frac{C_S}{C_l} = \frac{[P \cdot L]}{[P^{Zp+}]} = \frac{[P \cdot L][I^-]^{Zp}}{[P^{Zp+}][I \cdot L]^{Zp}} \cdot \frac{[I^-]^{-Zp}}{[I \cdot L]^{-Zp}} \\ &= K_e \cdot \frac{[I^-]^{-Zp}}{[I \cdot L]^{-Zp}} = A \cdot [I^-]^{-Zp} \end{aligned} \quad (12)$$

ここで  $I$  は対イオン、 $Zp$  はタンパク質 1 分子が吸着されることにより交換される対イオンの数、すなわちタンパク質の正味の電荷を意味する(Fig.3-7)。分配係数  $K$  はイオン強度  $I$  の  $Zp$  乗に依存することが分かる。タンパク質は多価高分子電解質であり、 $Zp$  の値は 2 桁となることも多い。したがって、わずかな  $I$  の変化により  $K$  が大きく変化すると予想される。これらの要因に加え、イオン交換体の持つ緩衝能のため pH を変化させるのが容易ではないといった理由により、pH による勾配溶出よりも一定 pH で塩濃度による勾配溶出を用いる方法が一般的である。



**Fig.3-7** 吸着サイト数  $B$  のモデル図

イオン交換基にそれとは逆の電荷を持った物質が接近すると、イオン交換基と相互作用していた対イオンとの間でイオン交換反応が生じ、代わりにイオン交換基と逆の電荷を持った物質がイオン交換基と相互作用する。このようにイオン交換基と逆の電荷を持った物質がイオン交換基と相互作用する。イオン交換基と相互作用している荷電数の数が吸着サイト数  $B$  となる。

### 3-2-4-2. 塩濃度直線勾配溶出法 (LGE : Linear Gradient Elution)

塩濃度直線勾配溶出法とは、一定 pH のもとで直線的に移動相塩濃度を増加させていく方法である。低塩濃度で平衡化したカラムにサンプルを保持させ、直線的に塩濃度を増加させることにより溶出される。

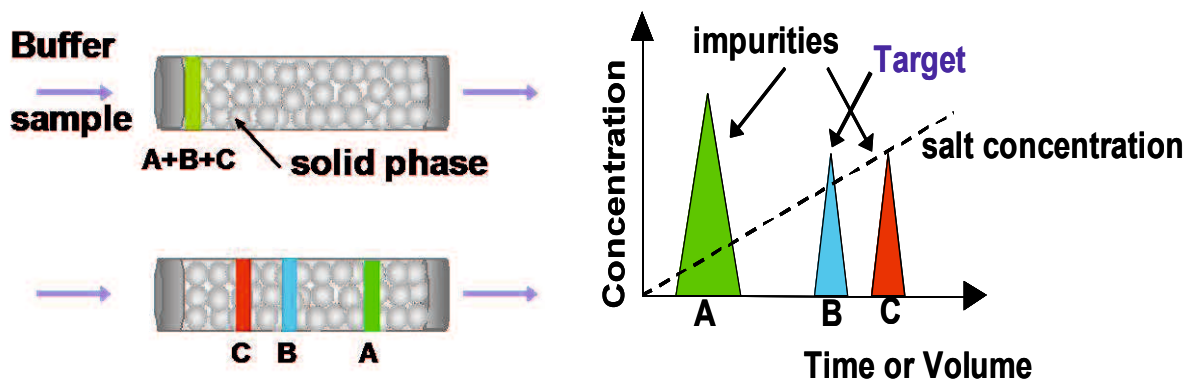


Fig.3-8 塩濃度直線勾配溶出法

この塩濃度勾配溶出法を使用し、実験結果は既にタンパク質分離機構の解析のために開発したモデルで解析し、吸着サイト数  $B$  を決定した。この決定方法について説明する。典型的な勾配溶出曲線を Fig.3-9 に示す。各充填剤に対して、勾配の傾き ( $g$ ) を変えて勾配溶出を行い、それぞれにおけるピーク保持体積  $V_R$  とそのときの溶出塩濃度  $I_R$  を測定する。溶出塩濃度  $I_R$  は実験より得られたピークトップにおける電気伝導度から換算する。換算方法は塩濃度と電気伝導度との検量線を作成して求める (Fig.3-10)。また、次式を用いて塩濃度勾配  $g$  からカラムゲル体積で規格化した勾配  $GH$  を求める。

$$g = \frac{I_F - I_0}{V_g} = \frac{I_F - I_0}{F \cdot t_g} \quad [\text{M/mL}] \quad (13)$$

$$GH = g(V_t - V_0) = g(V_t - V_0) \quad [\text{M}] \quad (14)$$

ここで、 $g$ : 塩濃度勾配 [M/mL]、 $I_0$ : 初期塩濃度 [M]、 $I_F$ : 最終塩濃度 [M]、 $V_g$ : 勾配に必要な溶液量 [mL]、 $F$ : 流速 [mL/min]、 $t_g$ : 勾配時間 [min]、 $V_t$ : カラム体積 [mL]、 $V_0$ : カラム空隙体積 [mL]、 $\varepsilon$ : カラム空隙率 [-] である。

これより、 $GH$  と  $I_R$  の関係を両対数プロットすると、Fig.3-11 のような直線関係が得られ、これから (15) 式中の定数  $A$ 、吸着サイト数  $B$  が決定される [29]。定数  $A$ 、 $B$  はカラムサイズや流量に依存せず、与えられた試料、充填剤、緩衝液に対して特有な値である。

$$\ln GH = (B + 1)\ln I_R - \ln[A(B + 1)]$$

$$GH = I_R^{B+1} / [A(B + 1)] \quad (15)$$

傾き =  $B + 1$   
 切片 =  $-\ln[A(B + 1)]$

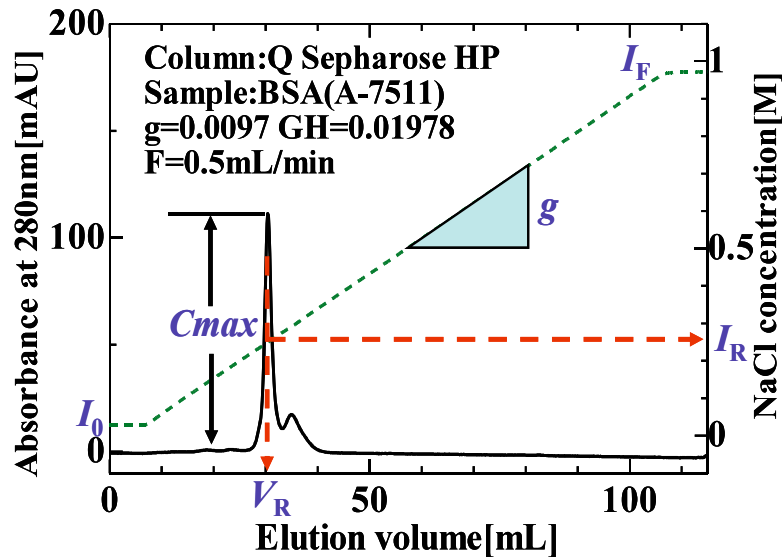


Fig.3-9 典型的な直線勾配溶出曲線

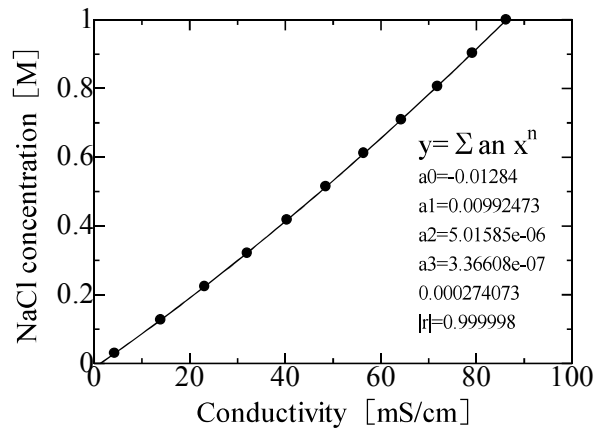


Fig.3-10 典型的な検量線

高塩濃度緩衝液の割合を 0、10、20・・・100%と 10 mL ずつ流し、そのときのそれぞれの電気伝導度を測定する(再現性を含め 2 回)。これより、縦軸に塩濃度  $I_R$  と横軸に電気伝導度を取り検量線を作成した(Fig.3-10)。実験ではこれを用いてピークトップの電気伝導度を測定し、検量線から溶出塩濃度  $I_R$  を求める ( $I_R$  は測定 2 回の平均値)。

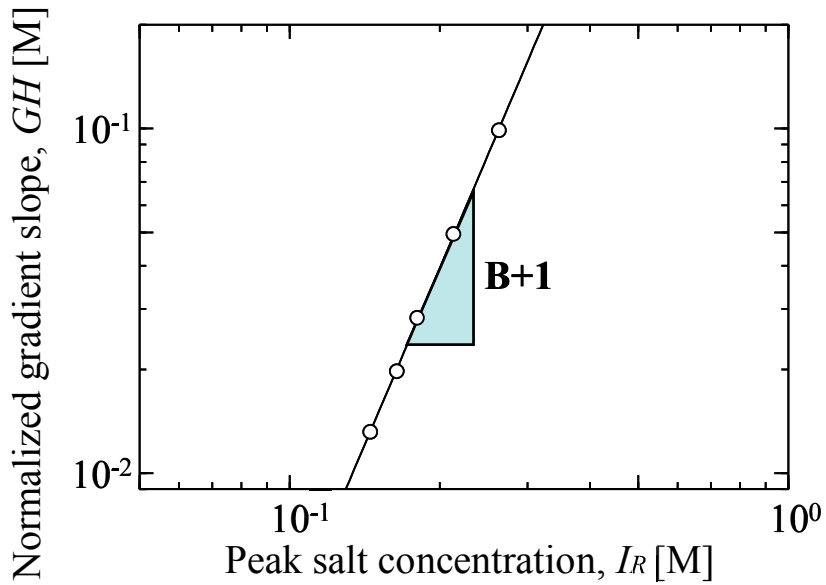


Fig.3-11 典型的な  $GH-I_R$  曲線

$GH$  と  $I_R$  の関係を両対数プロットし、それらを最小二乗で Fitting することにより近似した。吸着サイト数  $B$  は、式(12)の  $Z_p$  と対応しているので、 $GH-I_R$  曲線より得られた  $A, B$  から  $K-I$  曲線を作成することができる(Fig.3-12)。

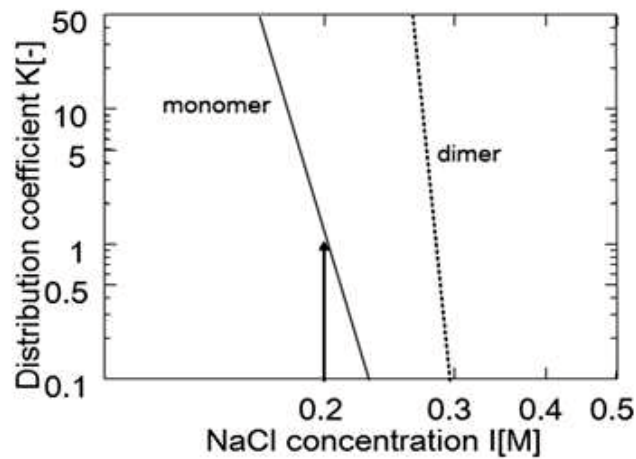


Fig.3-12  $GH-I_R$  から求めた  $K - I$  曲線

### 3-2-4-3. IECにおける移動相へのPEG添加効果

本実験では、IEC移動相へのPEG添加効果を比較するためにPEGを添加した場合の溶出塩濃度からPEGを添加しない場合の溶出塩濃度を引いた溶出塩濃度差を $\Delta I_R'$ とした。さらにdimerの溶出塩濃度からmonomerの溶出塩濃度を引いた溶出塩濃度差を $\Delta I_R''$ とし、この値を元に評価した。

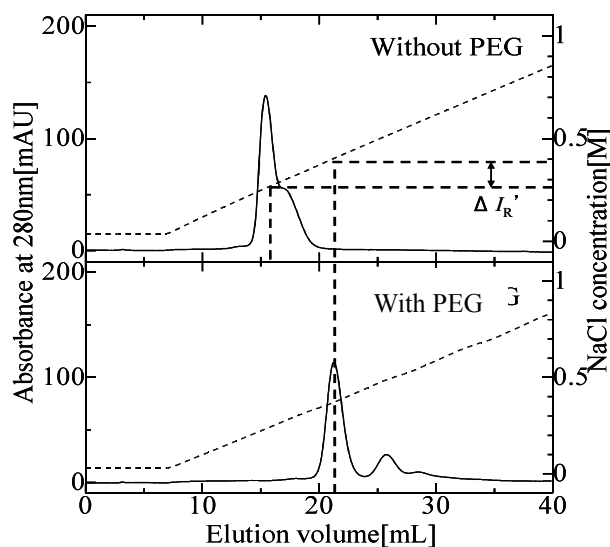


Fig.3-13 典型的なPEG添加によるピークシフト

$\Delta I_R'$ の算出法

$$\Delta I_R' = \text{PEGを添加した場合の} I_R - \text{PEGを添加しない場合の} I_R \quad (16)$$

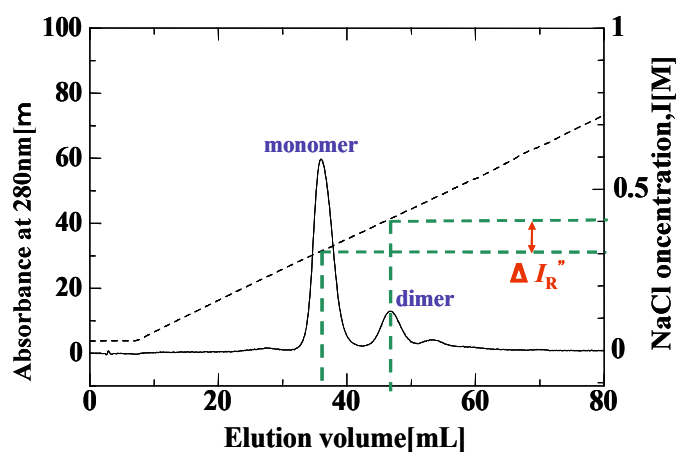


Fig.3-14 溶出塩濃度差

$\Delta I_R''$ の算出法

$$\Delta I_R'' = \text{dimerの} I_R - \text{monomerの} I_R \quad (17)$$

### 3-2-5. HACにおけるPサイト、Cサイト遮蔽

HAとタンパク質が相互作用する際、酸性タンパク質の負電荷とPサイトが電荷反発を起こしタンパク質の吸着を抑制していると考えられている(Fig. 3-15)。そこで、Pサイトを遮蔽するために移動相の $\text{CaCl}_2$ 濃度を高くし、 $\text{Ca}^{2+}$ でPサイトを遮蔽した。

一方、塩基性タンパク質の正電荷とCサイトが電荷反発を起こしタンパク質の吸着を抑制していると考えられている(Fig. 3-16)。そこで、Cサイトを遮蔽するために移動相の $\text{BO}_3^{3-}$ 濃度を高くし、Cサイトを遮蔽した。

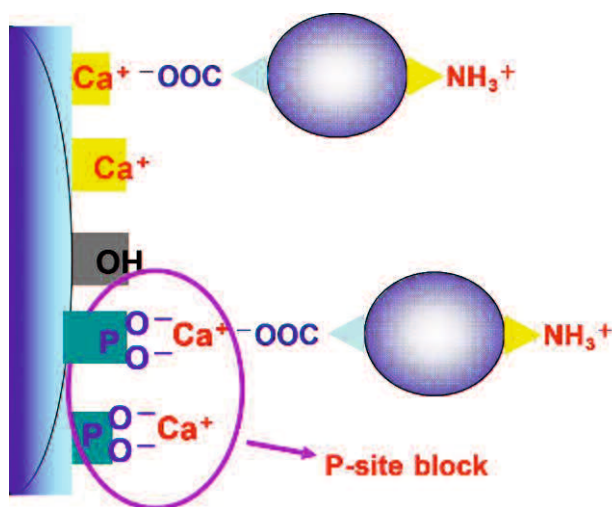


Fig. 3-15 Pサイト遮蔽効果の模式図

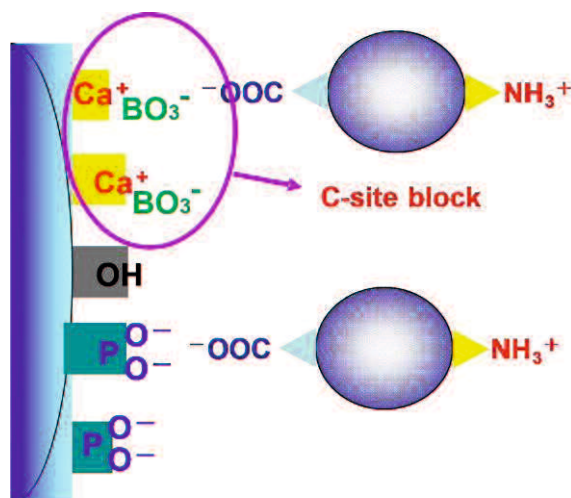


Fig. 3-16 Cサイト遮蔽効果の模式図

### 3-2-6. Taylor法による分子拡散係数の算出

層流下の細管の入り口にパルス状に注入された試料は、出口においてガウス分布形状の曲線として観察される。この曲線のピーク保持時間  $t_R$  と時間基準の標準偏差  $\sigma^2$  から Taylor が導いた式(18)により分子拡散係数  $D_m$  が決定できる。

$$D_m = \frac{d_c^2 t_R}{96 \sigma^2} \quad (18)$$

ここで、 $d_c$  は細管の内径である。

Taylor 法における溶出曲線は一般的なガウス分布で近似することができる。ガウスの近似式(19)を最小 2 乗法によりフィッティングし、ピーク保持時間  $t_R$ 、時間基準のピーク標準偏差  $\sigma$  を求める。

$$C(t) = C_{max} \exp \left[ -\frac{t_R}{2\sigma^2 t} (t - t_R)^2 \right] \quad (19)$$

ここで、 $t$  は時間、 $C_{max}$  は最大ピーク濃度である。求めたピーク保持時間  $t_R$ 、時間基準のピーク標準偏差  $\sigma$  を式(18)に代入することで分子拡散係数  $D_m$  を算出することができる。しかしながら、この方法にはいくつかの制約因子が存在する。以下に示す。

- [1] 理論段数
- [2] コイル内径（遠心力による混合効果）
- [3] 死容積での分散

#### 3-2-6-1. 理論段数

Taylor 法により得られた溶出曲線が対称になる条件として式 (20) において理論段数  $N$  が少なくとも 30 以上である必要があると報告されている。

$$N = \left( \frac{t_R}{\sigma} \right)^2 > 30 \quad (20)$$

本研究においては、理論段数  $N$ 、移動相線速度  $u$  は式 (18)、(20)より



$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = \left(\frac{L/u}{\sigma}\right)^2 = \left(\frac{L}{u}\right)^2 \frac{96D_m}{d_c^2(L/u)} = \frac{96D_m L}{d_c^2 u} \quad (21)$$

したがって

$$u = \frac{96D_m L}{d_c^2 N} \quad (22)$$

移動相線速度  $u$  の制約条件は

$$u < \frac{96D_m L}{d_c^2 30} = \frac{3.2D_m L}{d_c^2} \quad (23)$$

と表される。ここで、 $L$  はチューブ長さである。

### 3-2-6-2. コイル内径（遠心力による混合効果）

Taylor 法では数メートルの長い配管を用いるので、配管はコイル状に巻かれた状態で測定を行う。遠心力による混合効果の影響を避けるため、適切な配管コイル内径を選択する必要がある。遠心力による混合効果の影響を無視できるとされる条件では、式(24)が成り立つ。

$$DeSc^{0.5} < 10 \quad (24)$$

ここで、 $De$  と  $Sc$  は Deen 数と Schmidt 数で、それぞれ次のように定義される。

$$De = \frac{\rho u d_c}{\eta} \left(\frac{d_c}{d_{coil}}\right)^{1/2} \quad (25)$$

$$Sc = \frac{\eta}{\rho D_m} \quad (26)$$

移動相線速度  $u$  の制約条件は

$$u < 10 \left(\frac{\eta D_m d_{coil}}{\rho}\right)^{0.5} d_c^{-1.5} \quad (27)$$

ここで、 $\rho$  は溶媒の密度、 $\eta$  は溶媒の粘度、 $d_{coil}$  は配管コイル内径である。

### 3-2-6-3. 死容積での分散

従来 Taylor 法で用いられる配管は 10 m 以上のものが使用されており、死容積の影響はあまり影響がなかった。しかし、マイクロ化した配管における Taylor 法で得られる応答曲線の体積基準の標準偏差  $\sigma_V$  は非常に小さい。このため、マイクロ化したときには死容積での分散の影響を考慮する必要がある。

死容積による分散を  $\sigma_{V,dead}^2$ 、実験により得られた応答曲線から読み取った分散を  $\sigma_{V,obs}^2$ 、真の分散  $\sigma_V^2$  には次の関係が成り立つ。

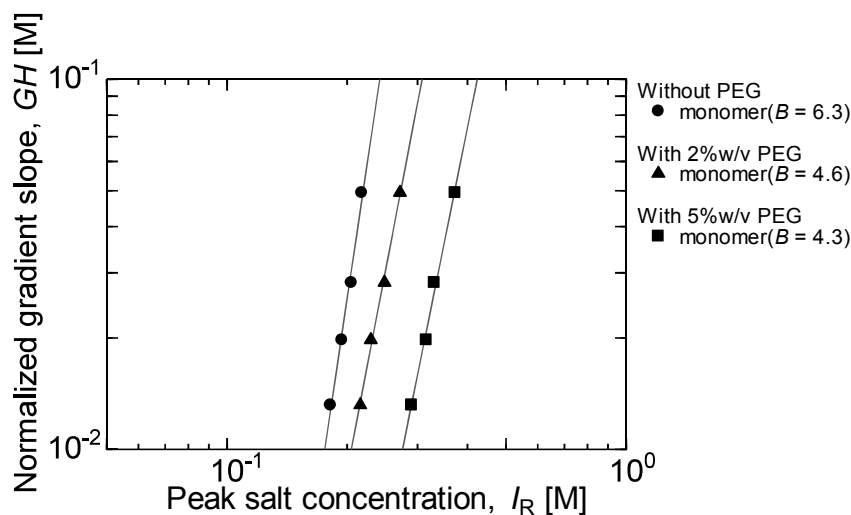
$$\sigma_V^2 = \sigma_{V,obs}^2 - \sigma_{V,dead}^2 \quad (28)$$

### 3-3. 結果および考察

#### 3-3-1. PEG添加静電的相互作用クロマトグラフィー

##### 3-3-1-1. GH-IR曲線に及ぼす影響

イオン交換クロマトにおいて移動相にPEGを添加することでGH-IR曲線にどのような影響がでるのかを調査した。



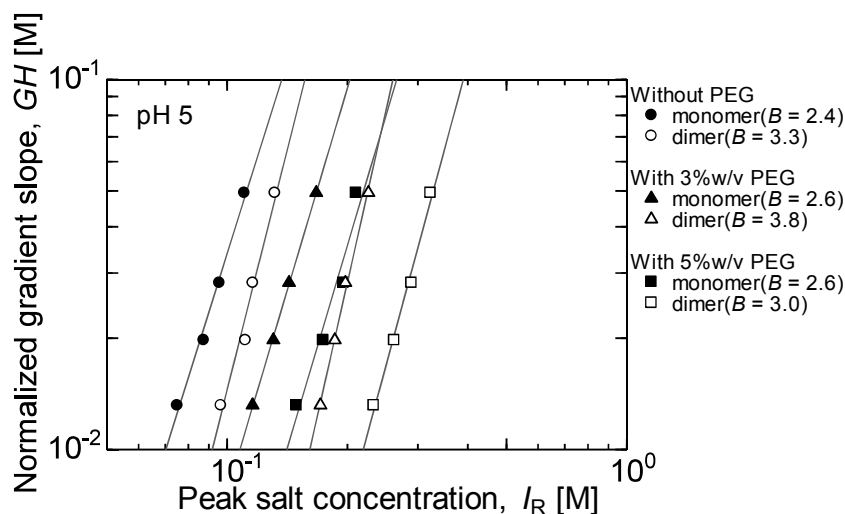
**Fig.3-17 PEG添加クロマトにおけるA1900のGH-IR曲線(pH 7.0)**

Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl pH 7.0

Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 1 M NaCl pH 7.0

Sample : BSA(A1900) 5 mg/mL, Injection volume : 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40, 70, 100, 150$  mL,  $GH = 0.0495, 0.0283, 0.0198, 0.0132$  M,  $F = 0.5$  mL/min

サンプルとして A1900(monomer, rich)を使用した場合、IEC 移動相に PEG を添加すると PEG 濃度が高いほど、 $I_R$ は高くなり溶出が遅れることが確認された(Fig.3-17)。吸着サイト数  $B$  の値は若干の減少が見られた。これより、静電的相互作用が強まり  $I_R$ が高くなったわけではなく、PEG の排除体積効果で保持力が強くなったと考えられる。

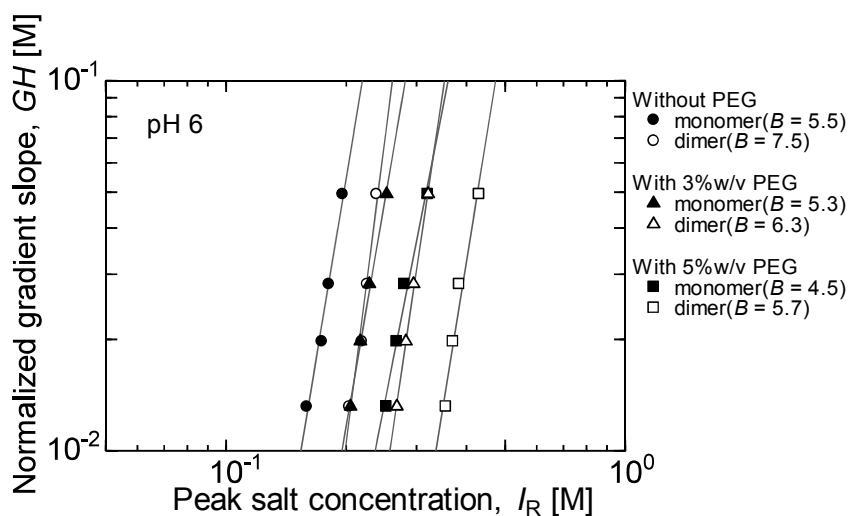


**Fig.3-18 PEG添加クロマトにおけるA7511のGH- $I_R$ 曲線(pH 5.0)**

Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 M NaCl pH 5.0

Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 1 M NaCl pH 5.0

Sample : BSA(A7511) 5 mg/mL, Injection volume : 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40, 70, 100, 150$  mL,  $GH = 0.0495, 0.0283, 0.0198, 0.0132$  M,  $F = 0.5$  mL/min

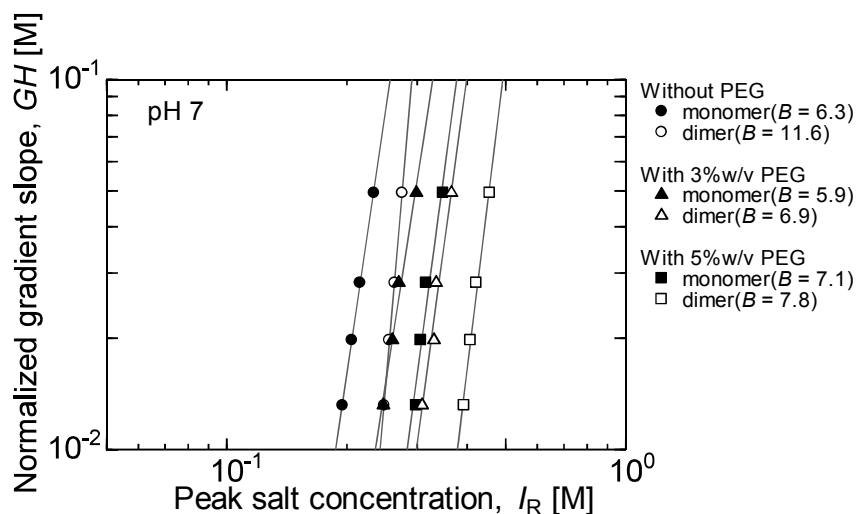


**Fig.3-19 PEG添加クロマトにおけるA7511のGH- $I_R$ 曲線(pH 6.0)**

Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl pH 6.0

Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 1 M NaCl pH 6.0

Sample : BSA(A7511) 5 mg/mL, Injection volume : 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40, 70, 100, 150$  mL,  $GH = 0.0495, 0.0283, 0.0198, 0.0132$  M,  $F = 0.5$  mL/min

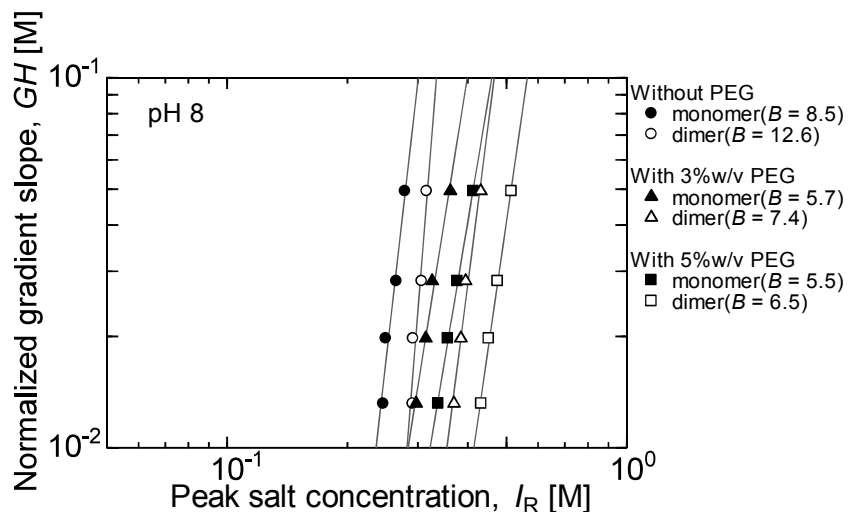


**Fig.3-20 PEG添加クロマトにおけるA7511のGH- $I_R$ 曲線(pH 7.0)**

Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl pH 7.0

Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 1 M NaCl pH 7.0

Sample : BSA(A7511) 5 mg/mL, Injection volume : 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40, 70, 100, 150$  mL,  $GH = 0.0495, 0.0283, 0.0198, 0.0132$  M,  $F = 0.5$  mL/min



**Fig.3-21 PEG添加クロマトにおけるA7511のGH- $I_R$ 曲線(pH 8.0)**

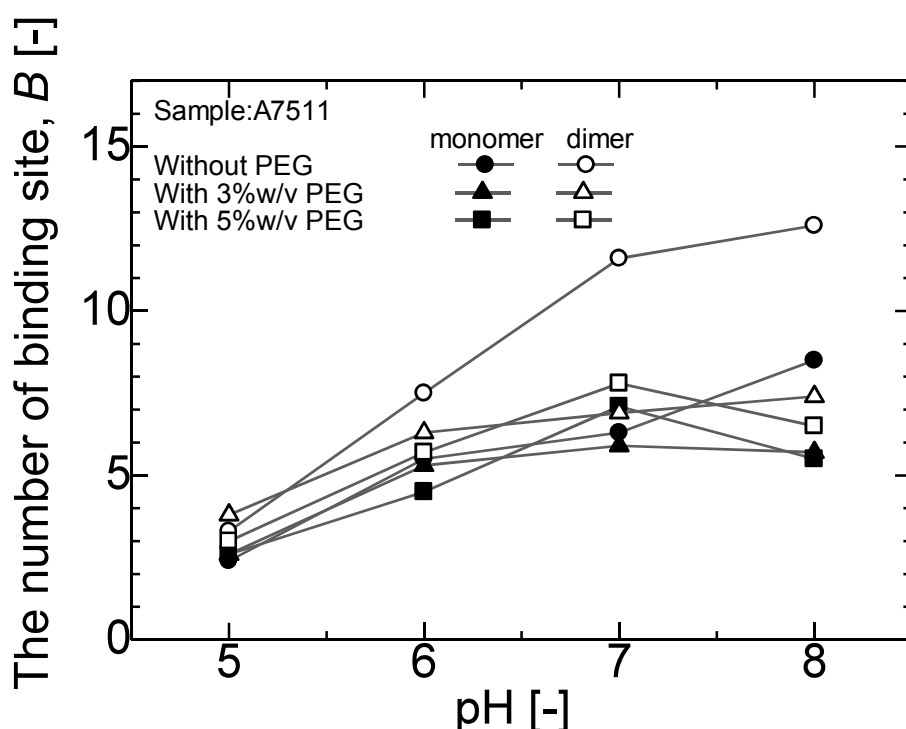
Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl pH 8.0

Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 1 M NaCl pH 8.0

Sample : BSA(A7511) 5 mg/mL, Injection volume : 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40, 70, 100, 150$  mL,  $GH = 0.0495, 0.0283, 0.0198, 0.0132$  M,  $F = 0.5$  mL/min

サンプルとしてA7511(dimer, aggregatesを含む)を使用した場合もFig.3-17の結果と同様にIEC移動相にPEGを添加するとPEG濃度が高いほど、 $I_R$ は高くなり溶出が遅れることが確認された(Fig.3-18~21)。monomerとdimerのいずれも $I_R$ は高くなっているため、PEGによってmonomerとdimerの保持力を増加させていることが分かった。しかし、この結果だけでは分離性能が向上しているかどうかは不明である。

### 3-3-1-2. 吸着サイト数 $B$ 及び $A$ と pH の関係



**Fig.3-22** 各pHにおけるA7511のmonomerとdimerの吸着サイト数 $B$ へのPEG添加効果

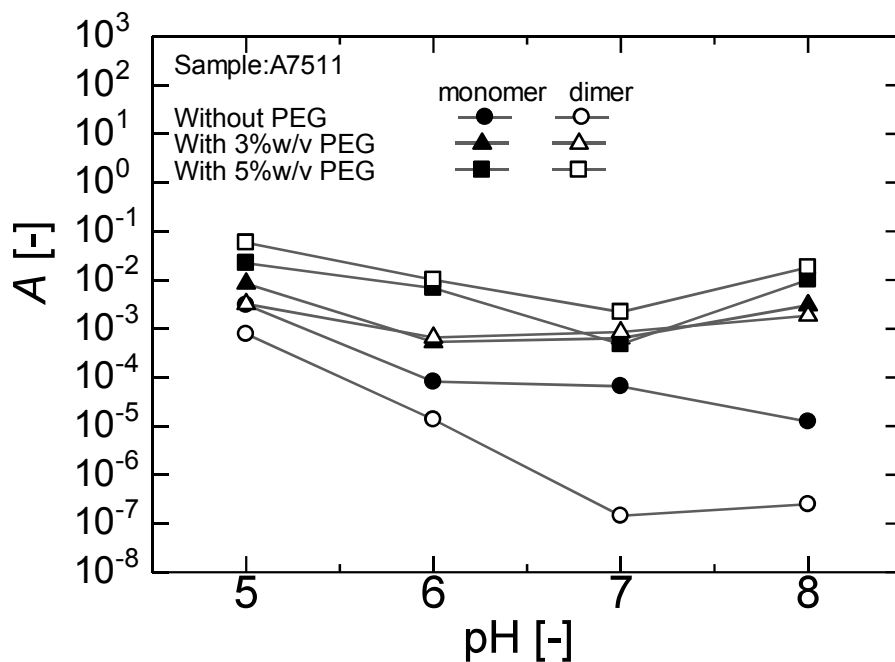
Buffer A : 0 - 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 - 1 M NaCl pH 5.0

Buffer B : 0 - 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 -1 M NaCl pH 6.0, 7.0, 8.0

Sample : BSA(A7511) 0.5, 5 mg/mL, Injection volume : 1.0, 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),

$V_g = 40, 70, 100, 150$  mL,  $GH = 0.0495, 0.0283, 0.0198, 0.0132$  M,  $F = 0.5$  mL/min

pHが等電点から離れるほどmonomer, dimerの吸着サイト数 $B$ が増加していくことが分かった。また、PEGを添加することで、 $B$ が減少する傾向があるということが確認された(Fig.3-22)。この傾向は、monomerよりもdimerに強く確認され、PEG濃度が高いほど減少しやすいことが分かった。この結果から、PEGはタンパク表面とリガンドの静電的相互作用を阻害している可能性が示唆された。



**Fig.3-23** 各 pH における A7511 の monomer と dimer の A への PEG 添加効果

Buffer A : 0 - 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 - 1 M NaCl pH 5.0

Buffer B : 0 - 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 -1 M NaCl pH 6.0, 7.0, 8.0

Sample : BSA(A7511) 0.5, 5 mg/mL, Injection volume : 1.0, 0.1 mL,

Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40, 70, 100, 150$  mL,  $GH = 0.0495, 0.0283, 0.0198, 0.0132$  M,

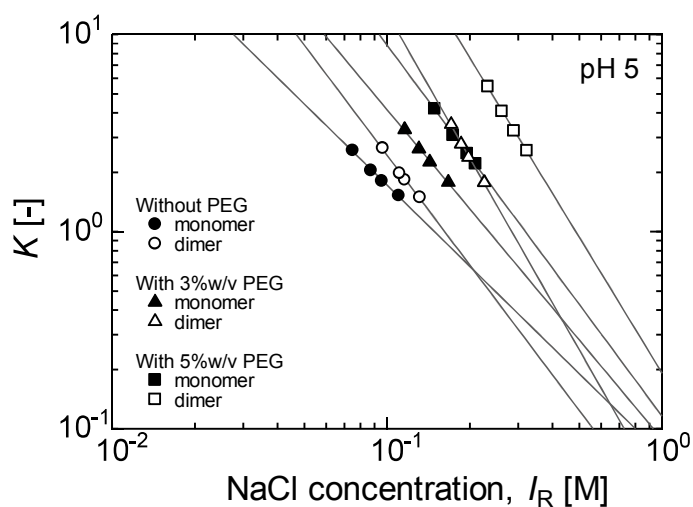
$F = 0.5$  mL/min

pH が等電点から離れるほど monomer, dimer の A が減少していくことが分かった。また、PEG を添加することで、A が増加する傾向があるということが確認された

(Fig.3-23)。この傾向は、monomer よりも dimer に強く確認され、PEG 濃度が高いほど増加しやすいことが分かった。この傾向は吸着サイト数 B とは逆の挙動を示した。A 値はイオン交換容量に関する定数である[29]。よって、ここでも PEG はタンパク表面とリガンドの静電気相互作用に影響を与えていることが示唆された。

pH 5 では等電点付近であるため、静電的相互作用が比較的小さいと考えられる。この場合、PEG の A、B へ与える影響は pH 8 の場合に比べると小さいことが分かる。したがって、PEG の排除体積効果がより支配的になる条件はタンパクの等電点付近であることが推察される。

### 3-3-1-3. $K-I$ 曲線に及ぼす影響

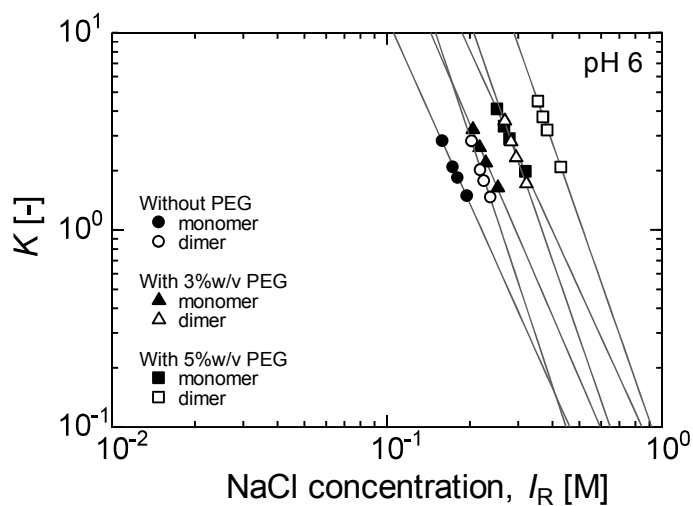


**Fig.3-24 PEG 添加クロマトにおける A7511 の  $K-I$  曲線(pH 5.0)**

Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 M NaCl pH 5.0

Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 1 M NaCl pH 5.0

Sample : BSA(A7511) 5 mg/mL, Injection volume : 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40, 70, 100, 150$  mL,  $GH = 0.0495, 0.0283, 0.0198, 0.0132$  M,  $F = 0.5$  mL/min



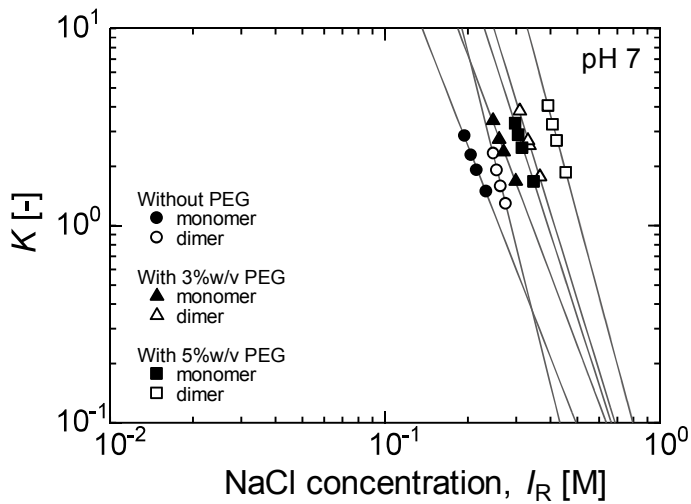
**Fig.3-25 PEG 添加クロマトにおける A7511 の  $K-I$  曲線(pH 6.0)**

Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl pH 6.0

Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 1 M NaCl pH 6.0

Sample : BSA(A7511) 5 mg/mL, Injection volume : 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40, 70, 100, 150$  mL,  $GH = 0.0495, 0.0283, 0.0198, 0.0132$  M,  $F = 0.5$  mL/min





**Fig.3-26 PEG添加クロマトにおけるA7511のK-I曲線(pH 7.0)**

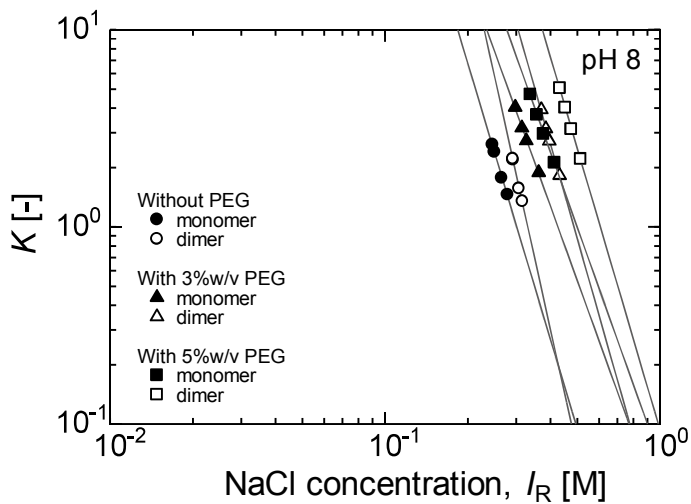
Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl pH 7.0

Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 1 M NaCl pH 7.0

Sample : BSA(A7511) 5 mg/mL, Injection volume : 0.1 mL,

Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40, 70, 100, 150$  mL,  $GH = 0.0495, 0.0283, 0.0198, 0.0132$  M,

$F = 0.5$  mL/min



**Fig.3-27 PEG添加クロマトにおけるA7511のK-I曲線(pH 8.0)**

Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl pH 8.0

Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 1 M NaCl pH 8.0

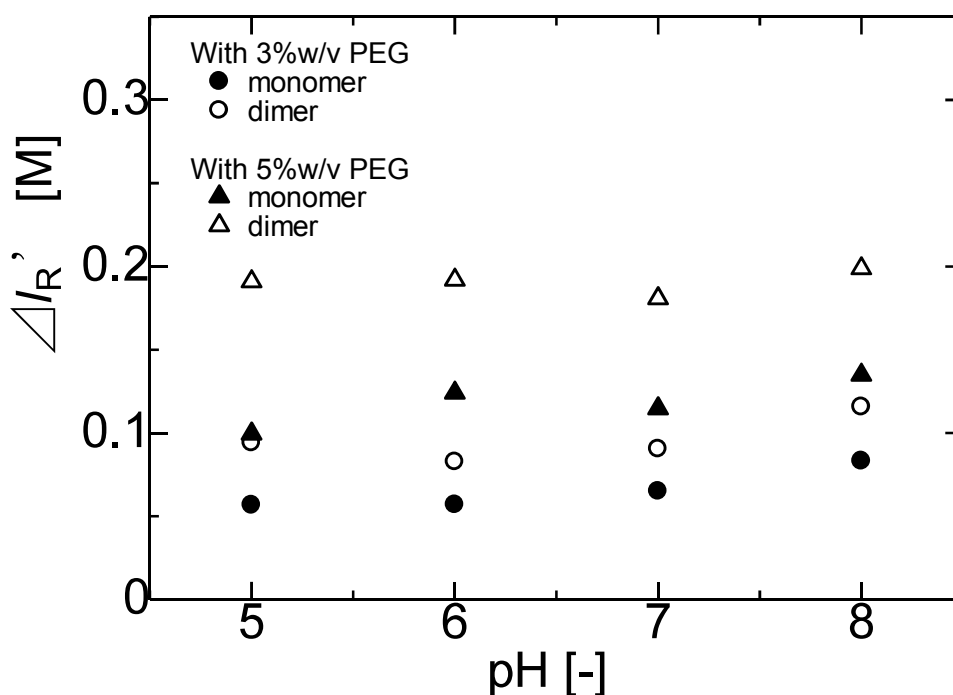
Sample : BSA(A7511) 5 mg/mL, Injection volume : 0.1 mL,

Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40, 70, 100, 150$  mL,  $GH = 0.0495, 0.0283, 0.0198, 0.0132$  M,

$F = 0.5$  mL/min

pH が等電点から離れるほど、ある  $I_R$  における monomer, dimer の  $K$  が増加していくことが分かった (Fig.3-24~27)。これは、等電点から離れるほど BSA の表面電荷が増加し、静電的相互作用が強くなったからだと考えられる。また、PEG を添加することでも  $K$  が増加していくことが確認された。これにより、PEG を添加することで BSA のリガンドへの吸着が促進されることが示唆された。

### 3-3-1-4. $\Delta I_R'$ の算出



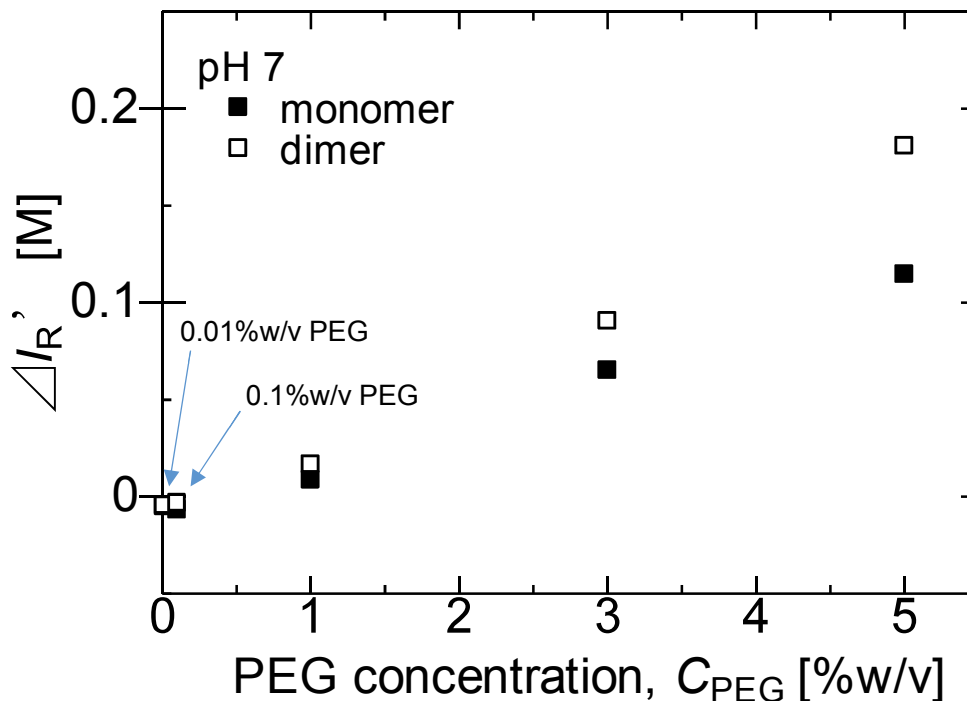
**Fig.3-28 PEG添加クロマトにおけるA7511の $\Delta I_R'$ とpHの関係 ( $GH = 0.04945$ )**

Buffer A : 0 - 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 - 1 M NaCl pH 5.0

Buffer B : 0 - 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 - 1 M NaCl pH 6.0, 7.0, 8.0

Sample : BSA(A7511) 0.5, 5 mg/mL, Injection volume : 1.0, 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),

$V_g = 40, 70, 100, 150$  mL,  $GH = 0.0495, 0.0283, 0.0198, 0.0132$  M,  $F = 0.5$  mL/min



**Fig.3-29 PEG添加クロマトにおけるA7511のmonomer, dimerの $\Delta I_R'$ とPEG濃度の関係 (pH 7.0)**

Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl pH 7.0

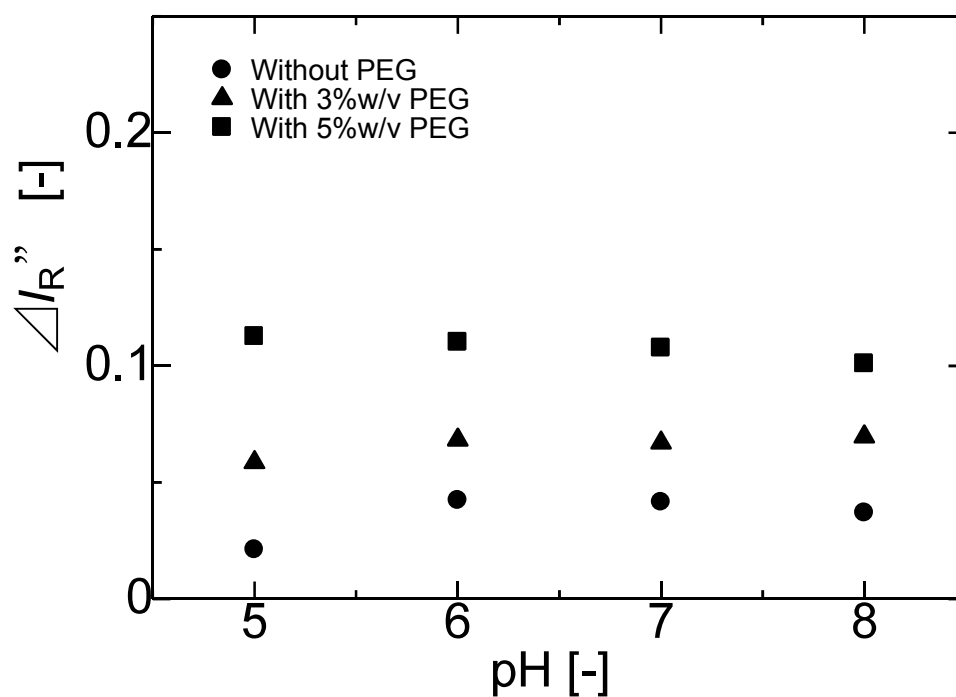
Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 1 M NaCl pH 7.0

Sample : BSA(A7511) 5 mg/mL, Injection volume : 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40$  mL,

$GH = 0.0495$  M,  $F = 0.5$  mL/min

各 pH において PEG 添加濃度が 3, 5%w/vPEG の場合、monomer, dimer の  $\Delta I_R'$  が正に増大し、PEG 添加濃度が高いほど  $\Delta I_R'$  も増大する傾向が確認された (Fig.3-28)。一方、PEG 濃度が低い領域 (0.1%w/v 以下) では、monomer, dimer の  $\Delta I_R'$  が負になることが分かった (Fig.3-29)。PEG 濃度が高い領域 (1%w/v 以上) では、monomer, dimer の  $\Delta I_R'$  は PEG 添加濃度が高いほど  $\Delta I_R'$  も増大する傾向が見られた。これらの結果から、PEG 濃度が低い領域では排除体積効果よりもタンパク質とイオン交換樹脂との相互作用を弱める効果の方が支配的であると考えられる。PEG 濃度が高い領域では、PEG 濃度が高くなるほど、分子量の大きい dimer の方がより保持力が強くなり、monomer と dimer の溶出塩濃度差  $\Delta I_R'$  が増大していくことが分かる。

### 3-3-1-5. $\Delta/R''$ の算出



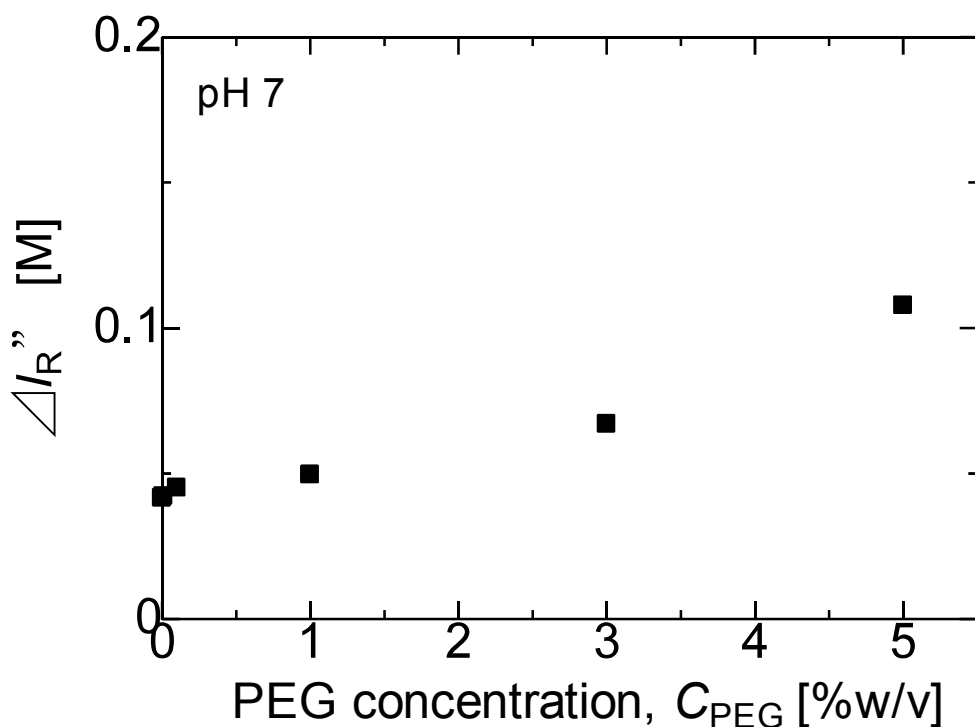
**Fig.3-30 PEG添加クロマトにおけるA7511の $\Delta/R''$ とpHの関係 ( $GH = 0.04945$ )**

Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 - 1 M NaCl pH 5.0

Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 -1 M NaCl pH 6.0, 7.0, 8.0

Sample : BSA(A7511) 0.5, 5 mg/mL, Injection volume : 1.0, 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),

$V_g = 40$  mL,  $GH = 0.0495$ ,  $F = 0.5$  mL/min



**Fig.3-31 PEG 添加クロマトにおける A7511 の monomer, dimer の  $\Delta I_R''$  と PEG 濃度の関係 (pH 7.0)**

Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 M NaCl pH 7.0

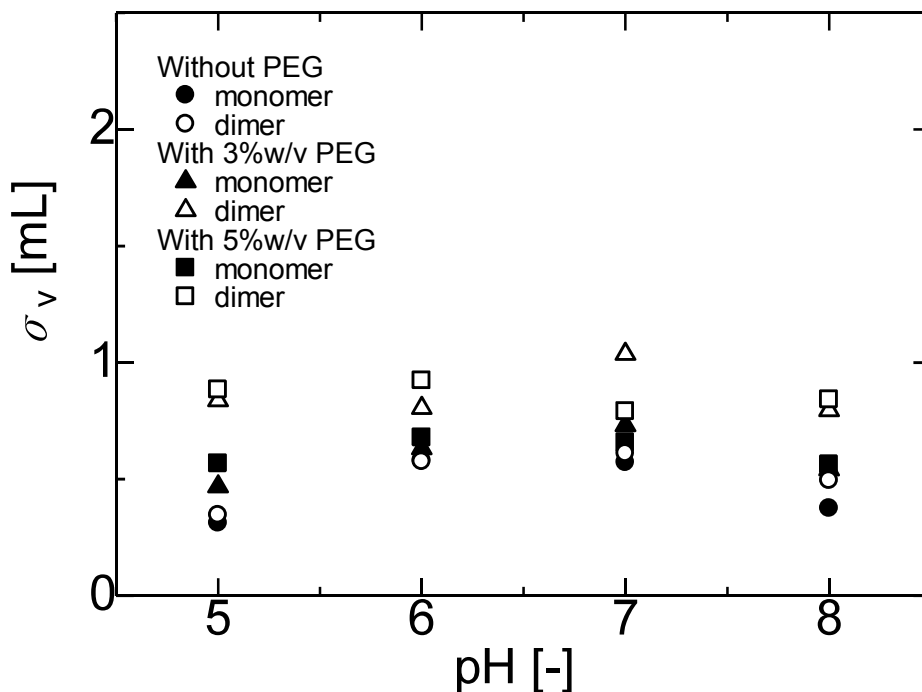
Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 1 M NaCl pH 7.0

Sample : BSA(A7511) 5 mg/mL, Injection volume : 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40$  mL,

$GH = 0.0495$  M,  $F = 0.5$  mL/min

monomer, dimer の  $\Delta I_R''$  において PEG の添加濃度が高いほど、 $\Delta I_R''$  も大きくなる傾向が確認された (Fig.3-31)。これは、PEG の添加濃度が高いほど、monomer と dimer の溶出塩濃度差が広がることを意味する。また、pH が等電点に近いほど、PEG の添加した場合の  $\Delta I_R''$  の増加率が高い傾向があった (Fig.3-30)。これは、PEG の静電的相互作用に及ぼす影響が弱いため、より排除体積効果が支配的な条件であったからだと考えられる。

### 3-3-1-6. $\sigma_v$ の算出



**Fig.3-32 PEG 添加クロマトにおける A7511 の  $\sigma_v$  と pH の関係 ( $GH = 0.04945$ )**

Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 - 1 M NaCl pH 5.0

Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 -1 M NaCl pH 6.0, 7.0, 8.0

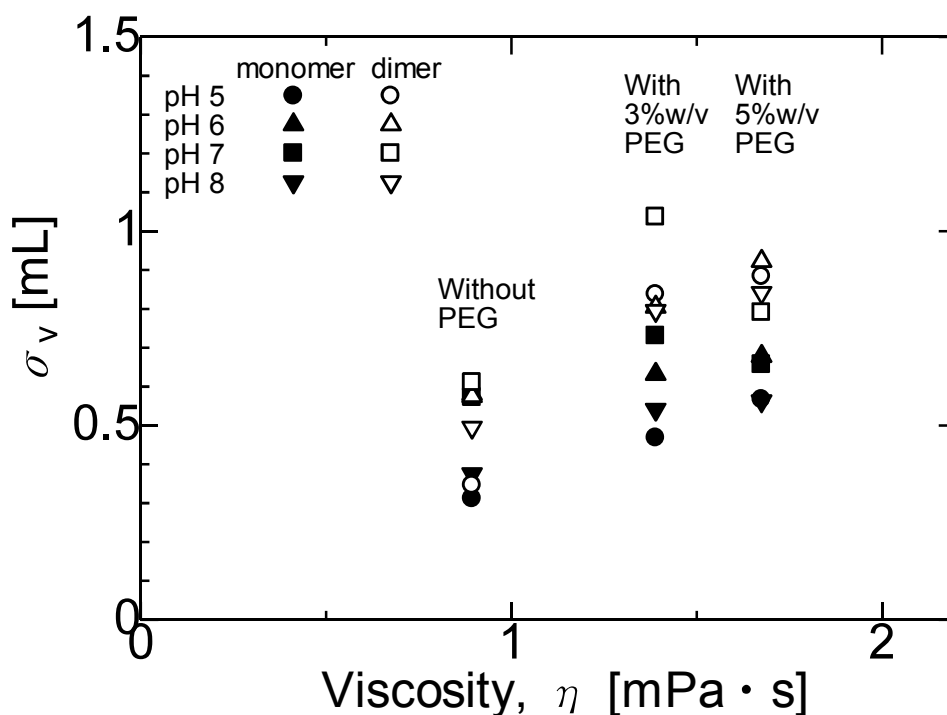
Sample : BSA(A7511) 0.5, 5 mg/mL, Injection volume : 1.0, 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),

$V_g = 40$  mL,  $GH = 0.0495$ ,  $F = 0.5$  mL/min

いずれの pH においても monomer よりも dimer の方が、 $\sigma_v$  が大きいことが分かった (Fig.3-32)。さらに、移動相に PEG を添加すると  $\sigma_v$  が大きくなる、すなわちピーク幅が広がることが分かった。これは、PEG を添加することで移動相の粘度が増大したため、タンパク質の分子拡散性が低下したからであると考えられる。

### 3-3-1-7. $\sigma_v$ と $\eta$ の関係

PEG 添加クロマトにおける移動相の粘度  $\eta$  と  $\sigma_v$  の関係を示す (Fig.3-33)。 $\eta$  は文献値を引用した[30]。ただし、この文献値は PEG 濃度については同様であるが、本章で用いた緩衝液とは組成が異なるため参考値とする。



**Fig.3-33 PEG添加クロマトにおけるA7511の $\sigma_v$ と $\eta$ の関係 ( $GH = 0.04945$ )**

Buffer A : 0 - 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 - 1 M NaCl pH 5.0

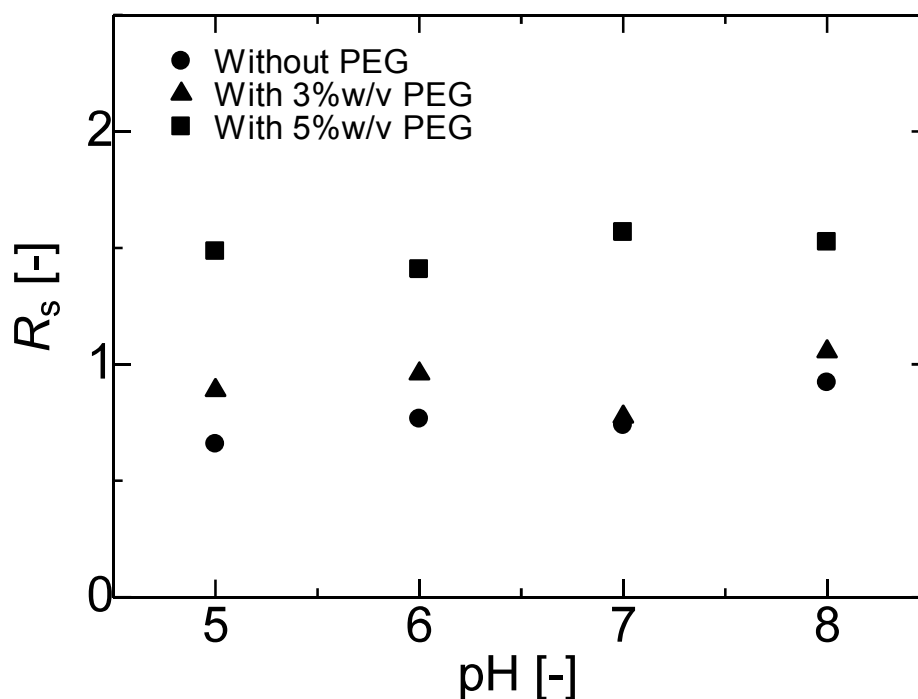
Buffer B : 0 - 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 - 1 M NaCl pH 6.0, 7.0, 8.0

Sample : BSA(A7511) 0.5, 5 mg/mL, Injection volume : 1.0, 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),

$V_g = 40$  mL,  $GH = 0.0495$ ,  $F = 0.5$  mL/min

PEG 添加クロマトにおける移動相の粘度  $\eta$  が増加するほど、 $\sigma_v$  も大きくなることが分かった (Fig.3-33)。

### 3-3-1-8. $R_s$ の算出



**Fig.3-34 PEG 添加クロマトにおける A7511 の  $R_s$  と pH の関係 ( $GH = 0.04945$ )**

Buffer A : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 - 1 M NaCl pH 5.0

Buffer B : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 -1 M NaCl pH 6.0, 7.0, 8.0

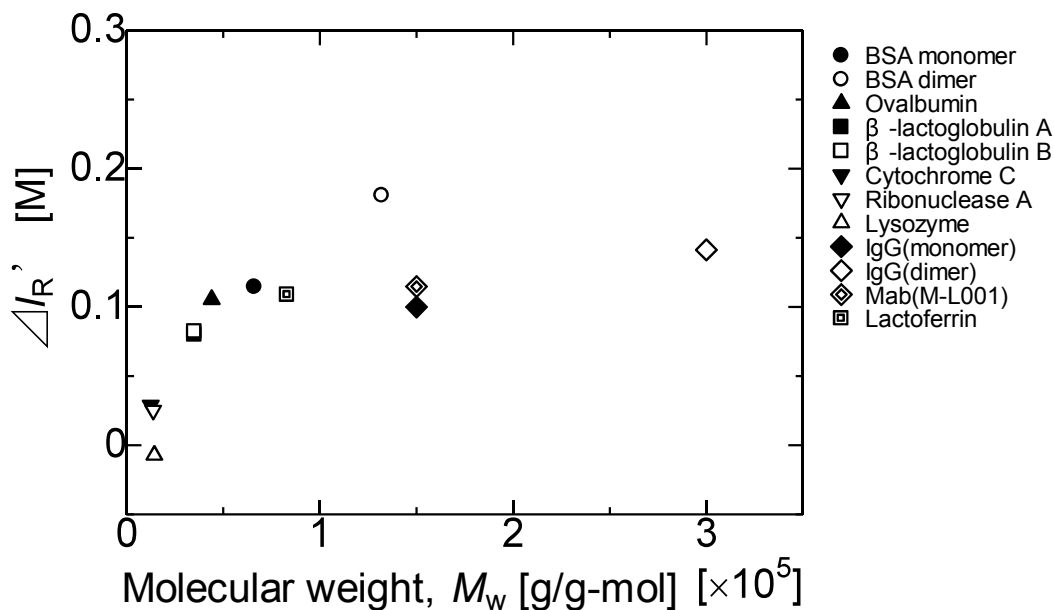
Sample : BSA(A7511) 0.5, 5 mg/mL, Injection volume : 1.0, 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),

$V_g = 40$  mL,  $GH = 0.0495$ ,  $F = 0.5$  mL/min

いずれの pH においても PEG を移動相に添加すると、分離度  $R_s$  が大きくなることが分かった (Fig.3-34)。特に pH に関係なく、 $R_s$  は完全分離と言われる値を超えた値 ( $R_s > 1.2$ ) を示した。分離性能を評価する際に重要になる値が  $R_s$  である。この  $R_s$  が増大したということは monomer と dimer の溶出ピーク位置の差が、PEG を添加したことによるピーク幅の増大という負の影響を上回っていることを意味している。



### 3-3-1-9. $\Delta I_R'$ と $M_w$ の関係



**Fig.3-35 PEG 添加クロマトにおけるの  $\Delta I_R'$  と  $M_w$  の関係 (5%w/v PEG)**

Buffer (AIEC) : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 - 1 M NaCl pH 7.0

Buffer (CIEC) : 0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 -1 M NaCl pH 5.2,

0 – 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Sodium acetate + 0.03 -1 M NaCl pH 7.0, 8.5

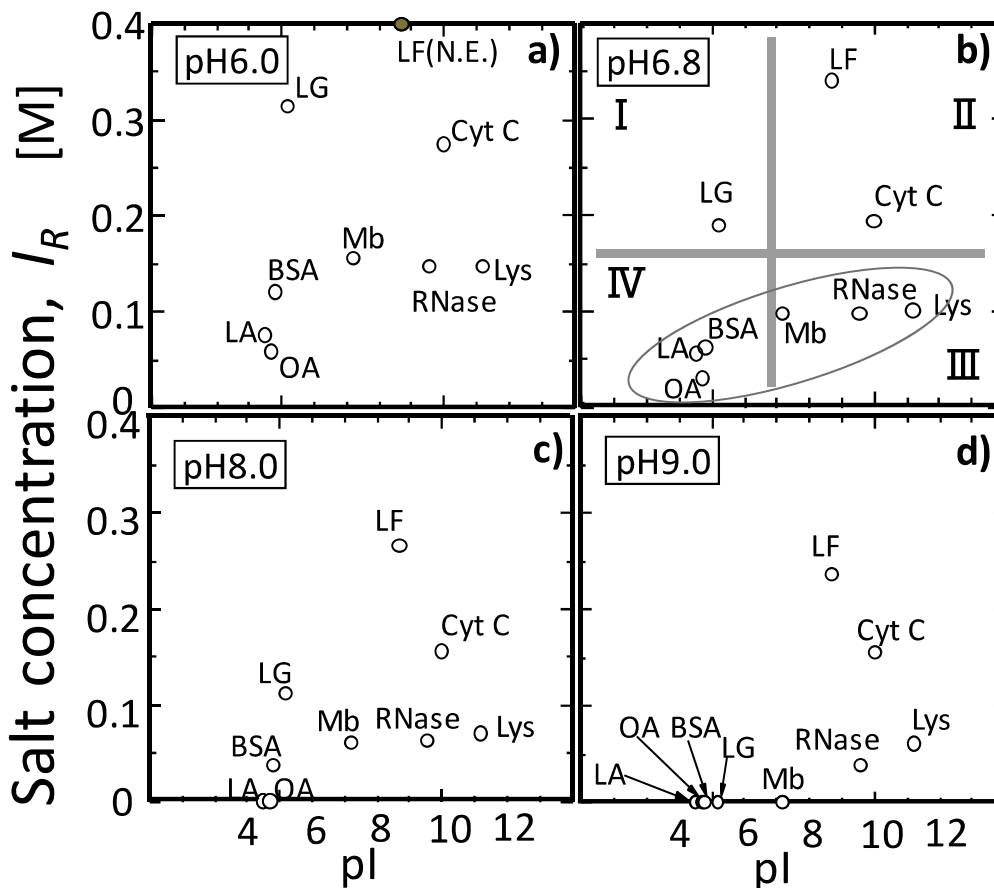
Sample : BSA(A7511) 5 mg/mL, Injection volume : 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9 $\times$ 5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $V_g = 40$  mL,

$GH = 0.0125 \sim 0.0495$ ,  $F = 0.5$  mL/min

$\Delta I_R'$  はタンパク質の分子量  $M_w$  に依存して増大する傾向が確認された(**Fig.3-35**)。これにより、PEG の添加効果が選択的排除効果であることが示唆される。しかし、Lysozyme はマイナスの値となり、排除体積効果では説明できず特異的な挙動を示した。PEG 添加濃度が低い領域では BSA の monomer, dimer の  $\Delta I_R'$  が負になることが確認された(**Fig.3-29**)ことから、Lysozyme も同様の作用機構である可能性がある。

### 3-3-2. ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー

#### 3-3-2-1. 標準移動相におけるタンパク質の等電点(pI)と溶出塩濃度の関係



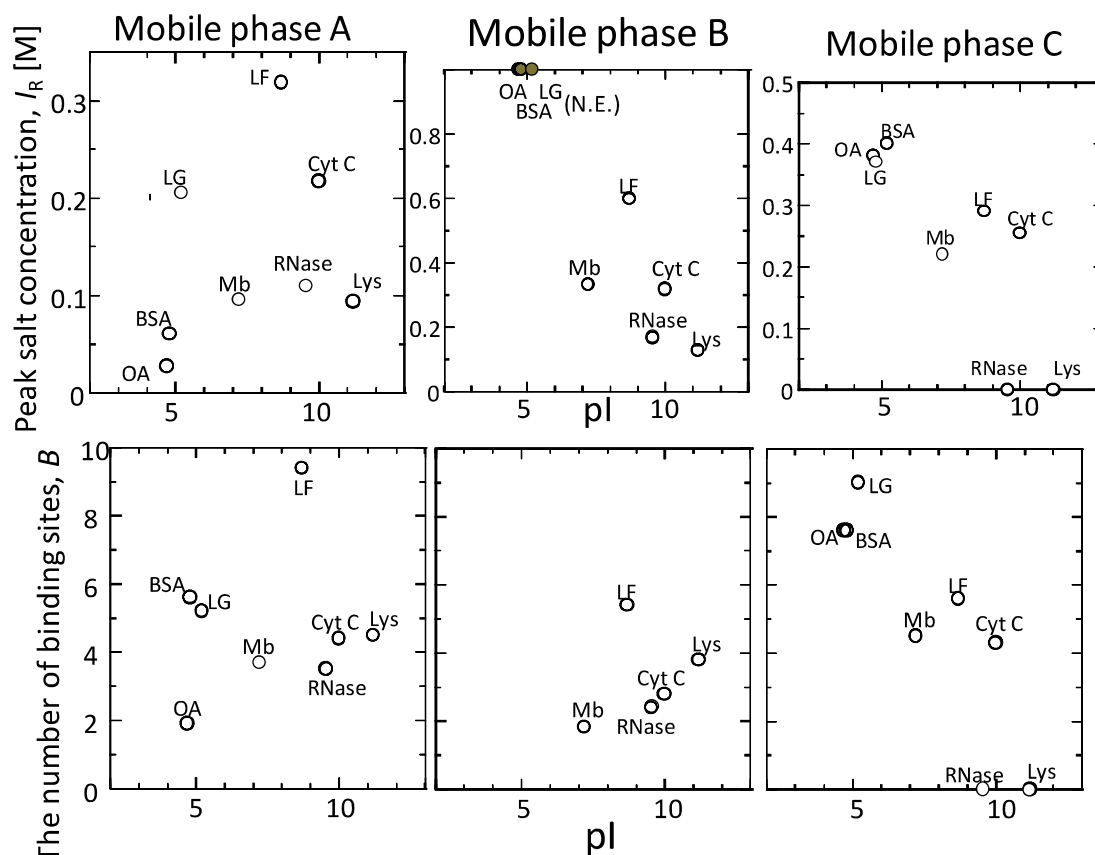
**Fig.3-36** 標準移動相における pI と溶出塩濃度の関係

Buffer(Mobile phase A) : 0.01 - 0.4 M Sodium phosphate + 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 6.0, 6.8, 8.0, 9.0)

Column : CHT-Type I , Injection volume : 0.1 mL,  $GH = 0.0082$  M,  $F = 1$  mL/min, N.E. = not eluted

各 pH の標準移動相(**Table3-4, a**)において塩濃度直線勾配溶出法(LGE)によって各タンパク質の溶出塩濃度を算出した(**Fig.3-36**)。HAC では等電点が高くなるにつれてタンパク質の保持力が強まることすでに報告されている[31]。中でも LG、LF、Cyt C は他に比べて高い保持力を示した(**Fig.3-36, b**)。しかし、移動相 pH を変化させた場合、pH が高いほどタンパク質の保持力が減少した(**Fig.3-36, a - d**)。これは pH が高くなると C サイトとの金属アフィニティーが弱まり、P サイトからの電荷反発が増加したからであると考えられる。

### 3-3-2-2. 各移動相におけるタンパク質の等電点(pI)と吸着サイト数 $B$ の関係



**Fig.3-37 各移動相におけるタンパク質の等電点(pI)と吸着サイト数  $B$  の関係 pH 6.8**

Buffer(Mobile phase A) : 0.01 - 0.4 M Sodium phosphate + 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 6.8

Buffer(Mobile phase B) : 0.03 - 1 M NaCl + 0.01 M Sodium phosphate + 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 6.8

Buffer(Mobile phase C) : 0.01 - 0.6 M Sodium Sulfate + 0.01 M HEPES + 3 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 6.8

Column : CHT-Type I , Injection volume : 0.1 mL,  $GH = \text{ca.}0.004 - 0.05 \text{ M}$ ,  $F=1\text{mL/min}$ , N.E. = not eluted

移動相 B は NaCl 勾配溶出のために使用した。この場合、タンパク質が P サイトと結合したものを溶出させる。移動相 C は高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  で P サイトを遮蔽するために使用した。この場合、タンパク質が C サイトと結合したものを溶出させる。

BSA は移動相 B において溶出しなかった。一方、移動相 C においてカラムへの保持が強くなった。これは P サイトからの電荷反発を抑制されたからであると考えられる。この結果から BSA は C サイトと結合していることが示唆された。

LG も BSA と同様の傾向を示した。

Lys は移動相 A, B においてはカラムに保持されたが、移動相 C においては P サイトを遮蔽すると保持されなくなった。この結果から Lys は主として P サイトと結合して

いると考えられる。

LFは移動相B、Cのどちらでも保持された。この結果からLFはPサイトとCサイトの両方と結合していると考えられる。

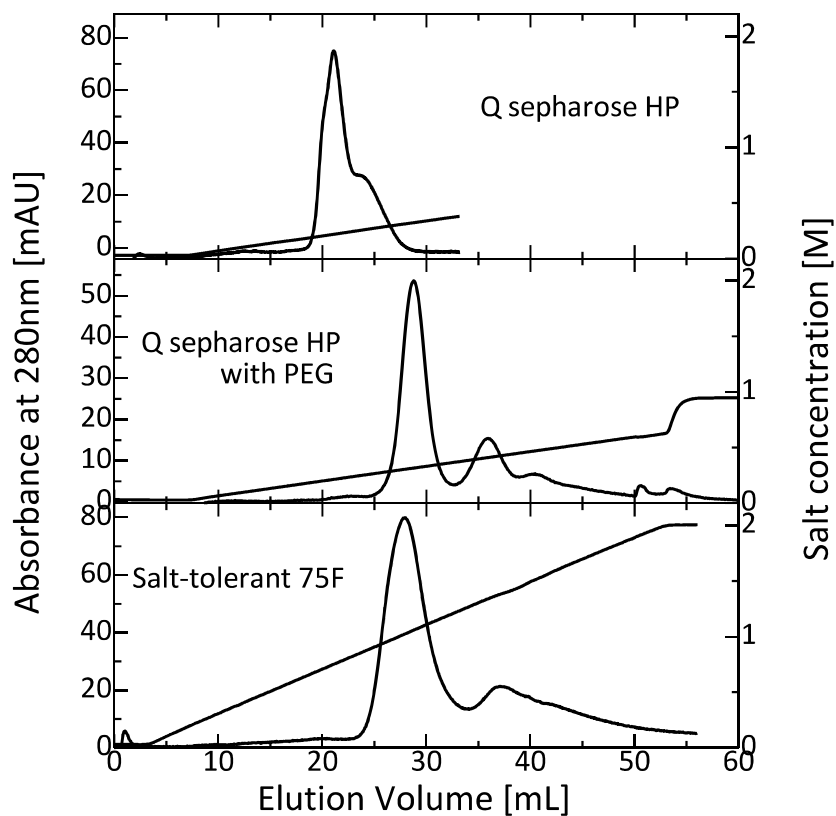
各タンパク質の吸着サイト数Bについて移動相Aと比較して、酸性タンパク質は移動相CでB値が増加し、塩基性タンパクは移動相BでRNase、Cyt C、Lysはわずかに、LFは大きくB値が減少した。

以上のように、HACではIECとタンパク質の分離挙動が違うことが確認された。IECが一般的にタンパク質の表面電荷により、その電荷と対になるイオン交換反応で溶出挙動が決定される。それに対して、HACはPサイトとCサイトの二種類の電荷及び金属アフィニティーの影響を受けるため従来の挙動とは異なる結果となったと考えられる。

重合体分離について考えると、従来のIECにおける単量体と重合体の静電的相互作用の差に加えてHACのような複数の相互作用により単量体と重合体の保持力の差を広げることで分離性能の向上が期待できる。

### 3-3-3. 塩耐性クロマトグラフィー

#### 3-3-3-1. Q sepharose HP(QHP)と Salt-tolerant 75F(STC)における BSA(A7511)の溶出曲線の比較



**Fig.3-38 Q sepharose HP と Salt-tolerant 75F における A7511 の溶出曲線の比較**

Buffer : 0.01 M Tris-HCl + 0.03 - 1 M NaCl pH 7.0

Buffer : 5%w/v PEG( $M_w = 8300$ ) + 0.01 M Tris-HCl + 0.03 - 1 M NaCl pH 7.0

Buffer : 0.01 M Tris-HCl + 0.03 - 2 M NaCl pH 7.0

Sample : BSA(A7511) 5 mg/mL Injection volume : 0.1 mL, Column : Q Sepharose HP(0.9×5 cm,  $\epsilon = 0.36$ ), Salt-tolerant 75F NH<sub>2</sub> (0.5×5.7 cm,  $\epsilon = 0.36$ ),  $GH = 0.0283$  M,  $F = 1$  mL/min

3-3-3-2. QHP と STC における A7511 の溶出塩濃度と移動相の pH の関係

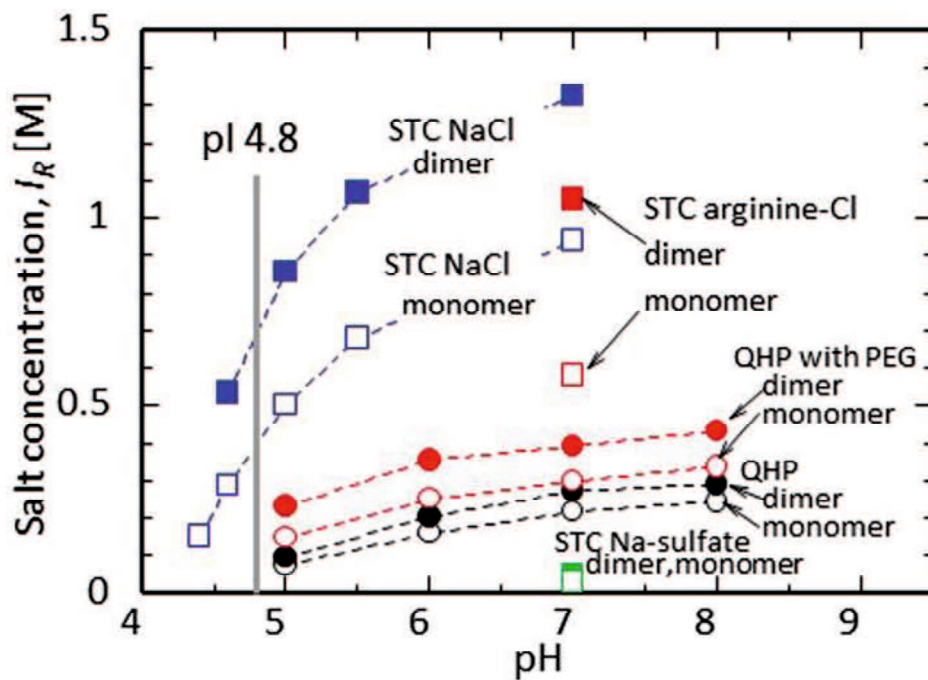


Fig.3-39 QHP と STC における A7511 の溶出塩濃度と移動相の pH の関係

3-3-3-3. QHP と STC における A7511 の吸着サイト数  $B$  と移動相の pH の関係

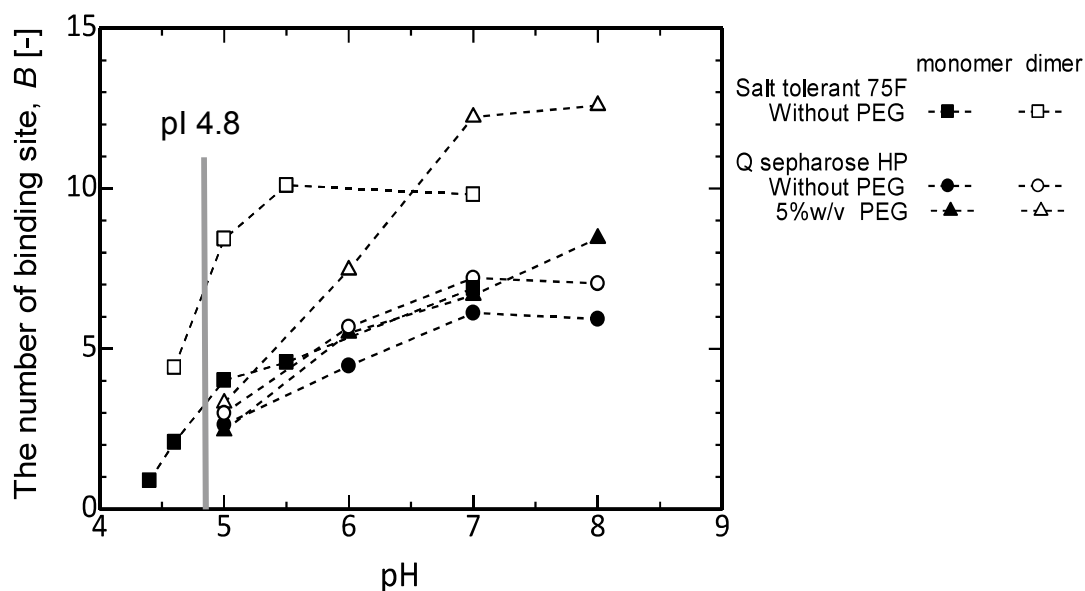


Fig.3-40 QHP と STC における A7511 の吸着サイト数  $B$  と移動相の pH の関係

BSA の monomer と dimer 溶出挙動について従来の IEC である Q sepharose HP と STC である Salt-tolerant 75F を比較した(Fig.3-38)。ここでは、PEG 添加 IEC の結果も付随した。従来の IEC に比べ、STC では BSA の溶出塩濃度が高く、保持力が強いことが分かった。さらに、monomer と dimer の分離性能も良いことが分かった。

各 pH の移動相における BSA の溶出塩濃度について調査した(Fig.3-39)。従来の IEC とは異なり、移動相の pH が BSA の等電点付近においても強く保持されることが分かった。また、移動相の pH が高くなる、つまり等電点から離れるほど IEC と同様に保持力が強くなる傾向を示した。その保持力は IEC におけるものよりも顕著に強まり、monomer よりも dimer の方がより強まるため、分離が向上したと考えられる。

STC の移動相にアルギニンを添加し、アルギニン勾配溶出を行った結果、BSA の溶出塩濃度が低下した(Fig.3-39)。アルギニンは疎水性相互作用を抑制する効果を持つと報告されている[32]。したがって、STC ではポリアミン基の炭化水素部分の疎水性相互作用によって強い保持力を示していると考えられる。

BSA の monomer の  $B$  値について IEC と STC にそれほど差は見られなかった(Fig.3-40)。しかし、BSA の dimer の  $B$  値については STC の方が IEC よりもかなり大きい値となった。これが STC の良い分離性能に影響していると考えられる。

### 3-3-4. Taylor法による拡散係数の算出

#### 3-3-4-1. Taylor法による拡散係数の測定における制約因子の検証

本研究で用いたTubeは、 $d_c = 0.05$  cm、 $L = 246.5$  cm、 $d_{coil} = 7.0$  cmである。サンプルは、カフェイン ( $D_m = 7.8 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s [33]) を用いた。

$N > 30$  を満たす条件は式 (20) から  $u < 2.46$  cm/s

式(20)を満たす条件を求めると、 $u < 0.620$  cm/s

上記の条件において実施した応答曲線を Fig.3-41 に示す。結果、 $D_m = 7.3 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s という値が得られた。文献値  $D_m = 7.8 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s よりもわずかに低い値を示した。

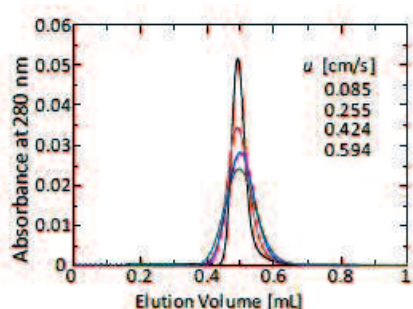


Fig.3-41 Response curves of caffeine at various flow velocities.

Sample volume = 5  $\mu$ L, sample concentration = 0.1 mg/mL, mobile phase (liquid) ; pure water.

#### 3-3-4-2. 分子拡散係数の測定値と計算値の比較

各条件における溶出曲線から求めた BSA と PEG 化 BSA、DNA の分子拡散係数とその文献値を比較した。文献値は、測定温度が異なっていたため式(18)により 25°C に換算した値を示した。

$$\frac{D_m \eta}{T} = \text{constant} \quad (18)$$

ここで、 $T$  は絶対温度[K]である。

分子拡散係数の推算式としては Wilke-Chang 式(19) が用いられている [36]。

$$\frac{D_m \eta}{T} = 7.4 \times 10^{-8} (\phi M_B)^{0.5} V_A^{-0.6} \quad (19)$$

where  $\phi$  is the association parameter,  $M_B$  is the molecular weight of the solvent, and  $V_A$  is the molar volume of the solute at the normal boiling point.



ここで、炭水化物（グルコースポリマー）へ適用するために式（19）の $V_A$ を改編したものが式（20）である[37, 38]。

$$\frac{D_m \eta}{T} = 4.98 \times 10^{-14} M_w^{-0.6} \quad (20)$$

また、Youngらはタンパク質へ適用するために式（21）を提案した[39]。

$$\frac{D_m \eta}{T} = 8.34 \times 10^{-15} M_w^{-0.333} \quad (21)$$

**Table3-7 BSAとPEG化BSAの分子拡散係数の測定値と計算値（Young式）の比較**

Protein	$M_w$ [g/g-mol]	$D_m \times 10^{10}$ [m <sup>2</sup> /s]	
		Measured	式(21)
Native BSA	68000	0.68	0.68
PEGylated-BSA	88000	0.44	0.63

Youngの式（21）においてBSAの $D_m$ はTable3-7に示すように計算され、実測値と同様の値となった。しかし、PEG化BSAの計算値は実測値よりも高い値であった。この理由は、PEG化BSAは同じ分子量の球状タンパクに比べて大きな水和半径を持つからであると考えられる。

PEG化BSAの場合、有効分子量、 $M_{w, \text{effective}}$ は式（22）から算出された $D_m$ を用いて計算すると、 $0.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ となり、実測値により近い値となった。ただし、ここでの計算では式（23）を用いてPEG化タンパク質の水和半径を算出した。

$$M_{w, \text{effective}} = (R_{h, \text{PEGprot}}/0.082)^3 \quad (22)$$

$$R_{h, \text{PEGprot}} = 0.1 \left( \frac{A}{6} + \frac{2}{3A} R_{h, \text{PEG}}^2 + \frac{2}{3A} R_{h, \text{PEG}} \right) \quad (23)$$

ここで、

$$A = (A_1 + 12A_2^{0.5})^{0.333}$$

$$A_1 = (108R_{h, \text{prot}}^3 + 8R_{h, \text{PEG}}^3)$$

$$A_2 = (81R_{h,prot}^6 + 12R_{h,prot}^3 R_{h,PEG}^3)$$

$$R_{h,prot} = 0.082M_{r,prot}^{1/3}$$

$$R_{h,PEG} = 0.01912M_{r,PEG}^{0.559}$$

$M_{r,prot}$  はタンパク質の相対分子質量、 $M_{r,PEG}$  は PEG の相対分子質量である。

次に、DNAについても同様に $D_m$ をYoungの式(21)を用いて計算し、実測値と比較を行った(Table3-8)。式(21)の計算値は、DNAの分子量が4000より小さい領域では実測値より小さい値となったが、分子量が6000より大きい領域では実測値よりも大きい値となった。この結果から、DNAの $D_m$ を計算するためにはYoungの式(21)の指数部分は、-0.333よりも小さくすべきであるということが示唆される。

**Table3-8 DNAの分子拡散係数の測定値と計算値の比較**

DNA	$M_w$ [g/g-mol]	$D_m \times 10^{10}$ [m <sup>2</sup> /s]		
		Measured	式(21)	式(24)
3T	851	3.8	2.9	4.0
6T	1763	2.6	2.3	2.7
9T	2757	2.1	2	2.1
12T	3588	1.8	1.8	1.8
20T	6022	1.3	1.5	1.3
50T	15148	0.79	1.1	0.80
95T	28837	0.55	0.91	0.56

以下に示す式(24)を用いて計算することで実測値を予測することが可能である。

$$D_m = 1.3 \times 10^{-12} M_w^{-0.56} \quad (24)$$

Youngの式(21)の指数部分は分子の形状を反映している。例えば、-0.333という値は分子が球状であることを意味する。よって、式(24)の-0.56という値はDNAが溶液中において細長い形状をしていることを示している。

### 3-4. 結言

IECにおいて移動相に PEG を添加すると  $GH-I_R$  曲線を見てみると、PEG 濃度が高いほど、 $I_R$  は高くなり溶出が遅れることが確認された。pH が等電点から離れるほど monomer, dimer の吸着サイト数  $B$  が増加していくことが分かった。また、PEG を添加することで、 $B$  が減少する傾向があるということが確認された。この傾向は、monomer よりも dimer に強く確認され、PEG 濃度が高いほど減少しやすいことが分かった。また、PEG を添加することでも  $K, I_R$  が増加していくことが確認された。この結果から PEG 添加により、BSA の固相 (リガンド) への吸着が促進されることが示唆された。

monomer, dimer の  $\Delta I_R'$  において PEG の添加濃度が高いほど、 $\Delta I_R'$  も大きくなる傾向が確認された。また、monomer, dimer の  $\Delta I_R''$  において PEG の添加濃度が高いほど、 $\Delta I_R''$  も大きくなる傾向が確認された。

monomer よりも dimer の方が、 $\sigma_v$  が大きいことが分かった。さらに、移動相に PEG を添加すると  $\sigma_v$  が大きくなる、すなわちピーク幅が広がることが分かった。これは、PEG を添加することで移動相の粘度が増大したため、タンパク質の拡散性が低下したからであると考えられる。実際、PEG 添加クロマトにおける移動相の粘度  $\eta$  が増加するほど、 $\sigma_v$  も大きくなることが確認された。

PEG を移動相に添加すると、分離度  $R_s$  が大きくなることが分かった。特に pH に関係なく、 $R_s$  は完全分離と言われる値を超えた値 ( $R_s > 1.2$ ) を示した。分離性能を評価する際に重要になる値が  $R_s$  である。この  $R_s$  が増大したということは monomer と dimer の溶出ピーク位置の差が、PEG を添加したことによるピーク幅の増大という負の影響を上回っていることを意味している。

$\Delta I_R'$  はタンパク質の分子量  $M_w$  に依存して増大する傾向が確認された。これにより、PEG の添加効果が排除体積効果であることが示唆された。

以上の結果から、PEG を移動相に添加することで重合体を分離するための条件設定には移動相 PEG 濃度での monomer と dimer の溶出塩濃度およびピークシフト差、ピーク幅を求めることが必要となる。この実験値から monomer と dimer の分離挙動をシミュレーションし、予測を立てて条件の最適化を進めていくことが効率的なプロセス開発では重要であると考えられる。

HAC は、IEC とタンパク質の分離挙動が異なることが確認された。HAC は P サイトと C サイトの二種類の電荷及び金属アフィニティーの影響を受けるため従来の挙動とは異なる結果となったと考えられる。

重合体分離について考えると、従来の IEC における単量体と重合体の静電的相互作用の差に加えて HAC のような複数の相互作用により単量体と重合体の保持力の差を広げることで分離性能の向上が期待できる。

STC は、従来の IEC に比べ BSA の溶出塩濃度が高く、保持力が強いことが分かっ

た。さらに、monomer と dimer の分離性能も良いことが分かった。また、移動相の pH が高くなる、つまり等電点から離れるほど IEC と同様に保持力が強くなる傾向を示した。その保持力は IEC におけるものよりも顕著に強まり、monomer よりも dimer の方がより強まる傾向を示した。同様に  $B$  値も dimer の方がより大きい値を示した。この結果、分離が向上したと考えられる。また、STC の強い保持力はポリアミン基の炭化水素部分の疎水性相互作用による影響であると考えられる。以上より、STC は重合体の分離性能を向上させる手段として有効であると考えられる。

Taylor 法を用いて PEG 化タンパクと DNA の分子拡散係数、 $D_m$  を測定した。PEG 化タンパクの  $D_m$  は、タンパクの  $D_m$  の相関式である Young 式よりも小さい値となった。これは、PEG 鎖による水和半径の増大が寄与していると考えられる。PEG 化タンパクの水和半径を計算することで、より実測値に近い  $D_m$  を計算することができた。また、DNA の  $D_m$  は、その分子量により強く依存する。DNA の  $D_m$  は、その分子量が大きくなるほどタンパクの相関式である Young 式で計算された値よりも小さい値となった。この理由は、一本鎖の DNA はより細長い形状を持つからだと考えられる。一本鎖の DNA の  $D_m$  は、相関式 (24) で見積もることができる。

## 第4章 結論

本研究ではタンパク質重合体分離技術のうち、PEG 沈殿とクロマトグラフィーによる重合体分離方法について単量体と重合体の分離挙動を調査し、解析した。

第2章ではタンパク質の重合体分離技術の一つとして実用化されている PEG 沈殿について理論式を用いて重合体分離挙動を予測し、実証することでこの方法における重合体分離についてより効率的な開発をするための方法を提案した。以下に得られた知見を示す。

### <PEG 沈殿>

#### [濁度法、上澄み法]

- PEG 沈殿において単量体 (monomer) と重合体 (dimer, aggregates) の溶解度の溶媒の pH, PEG 分子量によって左右され、いずれの条件でも単量体より重合体の溶解度の方が低かった。
- 試料に重合体を含む場合、aggregates, dimer, monomer の順で選択的に沈殿が進んでいくことが分かった。

#### [monomer の回収率の予測]

- 溶解度曲線 (濁度法) から重合体分離実験での monomer 回収率と純度を予測した結果、pH 5 では実測値は一致したが、pH 7 では一部ずれが確認された。
- pH 5, 7 両条件において dimer, aggregates の回収率が下がり始める PEG 濃度から少し PEG 濃度が上昇すると monomer の回収率も下がり始める傾向があることが分かった。上記の知見から pH および PEG 濃度を変動パラメータとして条件設定をした場合、重合体を含む試料 (A7511) の monomer 回収率を維持しつつ純度 100% を達成する沈殿条件の設定は難しいと言える。

この問題を解決する方法としては単量体と重合体の溶解度差をさらに大きくする必要があり、塩濃度や塩の種類を変更するなど、さらなる変動パラメータの追加検討をする必要がある。

第3章ではクロマトグラフィーによる重合体分離技術のうち PEG 添加クロマト、ヒドロキシアパタイトクロマト、塩耐性クロマトについて溶出塩濃度や結合様式(吸着サイト数)について解析した。また、クロマトグラフィーの分離性能を左右する重要なパラメータである分子拡散係数の測定を実施した。ここでは Taylor 法を用いてタンパク、PEG 化タンパク、DNA の分子拡散係数の測定及び解析を実施した。以下に得られた知見を示す。

### <PEG 添加クロマト>

#### [GH- $I_R$ 曲線と吸着サイト数 $B$ ]

- 添加する PEG 濃度が高いほど、 $I_R$  は高くなり溶出が遅れることが確認された。
- pH が等電点から離れるほど monomer, dimer の吸着サイト数  $B$  が増加していくことが分かった。また、PEG を添加することで、 $B$  が減少する傾向があるということが

確認された。この傾向は、monomer よりも dimer に強く確認され、PEG 濃度が高いほど減少しやすいことが分かった。

- PEG を添加することで  $K$ ,  $I_R$  が増加していくことが確認された。
- これらの結果から PEG 添加により、BSA の固相（リガンド）への吸着が促進されることが示唆された。

#### [ $\Delta I_R'$ と $\Delta I_R''$ ]

- monomer, dimer の  $\Delta I_R'$  において PEG の添加濃度が高いほど、 $\Delta I_R'$  も大きくなる傾向が確認された。
- monomer, dimer の  $\Delta I_R''$  において PEG の添加濃度が高いほど、 $\Delta I_R''$  も大きくなる傾向が確認された。

以上の知見から PEG の添加濃度が高いほど、monomer と dimer の溶出塩濃度差が大きくなり、分離性能が向上していくことが示唆された。

#### [ $\sigma_v$ と $R_s$ ]

- monomer よりも dimer の方が、 $\sigma_v$  が大きい。
- 移動相に PEG を添加すると  $\sigma_v$  が大きくなる、すなわちピーク幅が広がる。これは、PEG を添加することで移動相の粘度が増大したため、タンパク質の拡散性が低下したからであると考えられる。実際、PEG 添加クロマトにおける移動相の粘度  $\eta$  が増加するほど、 $\sigma_v$  も大きくなることが確認された。
- PEG を移動相に添加すると、分離度  $R_s$  が大きくなることが分かった。 $R_s$  が増大したということは monomer と dimer の溶出ピーク位置の差が、PEG を添加したことによるピーク幅の増大という負の影響を上回っていることを意味している。

#### [ $\Delta I_R'$ と $M_w$ ]

- $\Delta I_R'$  はタンパク質の分子量  $M_w$  に依存して増大する傾向が確認された。これにより、PEG の添加効果が排除体積効果であることが示唆された。

以上の知見から、PEG を移動相に添加することで重合体を分離するための条件設定には移動相 PEG 濃度での monomer と dimer の溶出塩濃度およびピークシフト差、ピーク幅を求めることが必要となる。この値から monomer と dimer の分離挙動をシュミレーションし、予測を立てて条件の最適化を進めていくことが効率的なプロセス開発では重要であると考えられる。

#### [ヒドロキシアパタイトクロマト]

- HAC は、IEC とタンパク質の分離挙動が異なることが確認された。HAC は P サイトと C サイトの二種類の電荷及び金属アフィニティーの影響を受けるため従来の挙動とは異なる結果となったと考えられる。

重合体分離について考えると、従来の IEC における単量体と重合体の静電的相互作用の差に加えて HAC のような複数の相互作用により単量体と重合体の保持力の差を広げることによって分離性能の向上が期待できる。

#### [塩耐性クロマト]

- ・ **STC** は、従来の **IEC** に比べ **BSA** の溶出塩濃度が高く、保持力が強いことが分かった。さらに、**monomer** と **dimer** の分離性能も良いことが分かった。また、移動相の **pH** が高くなる、つまり等電点から離れるほど **IEC** と同様に保持力が強くなる傾向を示した。その保持力は **IEC** におけるものよりも顕著に強まり、**monomer** よりも **dimer** の方がより強まる傾向を示した。同様に **B** 値も **dimer** の方がより大きい値を示した。この結果、分離が向上したと考えられる。また、**STC** の強い保持力はポリアミン基の炭化水素部分の疎水性相互作用による影響であると考えられる。

以上より、**STC** は重合体の分離性能を向上させる手段として有効であると考えられる。

#### [Taylor 法による分子拡散係数の測定]

- ・ Taylor法を用いてPEG化タンパクとDNAの分子拡散係数、 $D_m$ を測定した結果、PEG化タンパクの $D_m$ は、タンパクの $D_m$ の相関式であるYoung式よりも小さい値となった。これは、PEG鎖による水和半径の増大が寄与していると考えられる。PEG化タンパクの水和半径を計算することで、より実測値に近い $D_m$ を計算することができた。また、DNAの $D_m$ は、その分子量が大きくなるほどタンパクの相関式であるYoung式で計算された値よりも小さい値となった。この理由は、一本鎖のDNAはより細長い形状を持つからだと考えられる。一本鎖のDNAの $D_m$ は、相関式 (24) で見積もることができる。

プロセスの開発時には、その分離方法においてどのパラメータが分離性能を支配しているかを把握することは、効率的なプロセスを実現する上で極めて重要である。そして、沈殿分離にしろクロマト分離にしろ本質的には**monomer**と**dimer, aggregates**の類似した物性の中で異なる性質を如何にして最大限利用するかということが重要である。本研究において重合体分離方法について調査し、解析した結果から静電的相互作用、疎水性相互作用やタンパクの分子拡散係数などが分離性能に与える影響を理論的に解析することができた。このような理論的な解析によって分離性能を支配するパラメータの決定や条件変更に対するパラメータの予測が可能であると考えられる。

使用記号

Symbol	Description	Unit
$A^0$	Intercept of <i>van Deemter plot</i>	cm
$A$	Parameter including the equilibrium coefficient, the binding site and the ion-exchange capacity	-
$A$	Peak area	mAU · min
$B$	number of binding sites(charges) involved in electrostatic interaction	-
$C$	Sample concentration	mg/mL
$C^0$	Inclination of <i>van Deemter plot</i>	s
$C_0$	Initial sample concentration	mg/mL
$C_{PEG}$	PEG concentration	%w/v
$d_c$	Tube or column diameter	cm
$d_{coil}$	Coil diameter	cm
$d_p$	Particle diameter	μm
$D_e$	Dean number	-
$D_m$	Diffusion coefficient	m <sup>2</sup> /s
$D_s$	Diffusion coefficient inside porous particle	m <sup>2</sup> /s
$F$	Volumetric flow velocity	mL/s
$g$	Gradient of salt concentration	M/mL
$H$	Volumetric phase ratio = $(1 - \epsilon) / \epsilon$	-
$\epsilon$	Column void fraction = $V_0 / V_t$	-
HETP	Height equivalent of one theoretical plate	cm
$K$	Distribution coefficient	-
$L$	ion exchanger	M
$L$	Tube length	cm
$L_{LGE}$	Zone spreading factor	-
$M_w$	Molecular weight	g/g·mol
$S_c$	Schmidt number	-
$R_h$	Hydrate radius	nm
$R_s$	Resolution	-
$t$	Time	s
$t_R$	Peak retention time	s
$V_F$	Injection volume	mL
$V_g$	Gradient volume	mL
$V_0$	Void volume	mL
$V_R$	Retention volume	mL
$V_t$	Total tube or column volume	mL
$W$	Peak width	mL
$Z$	Column height	cm
$\epsilon$	Porosity	-
$u$	Linear velocity	cm/s
$\eta$	Viscosity	kg/cm · s
$\rho$	Density	kg/cm <sup>3</sup>
$\sigma$	Standard deviation	s
$\sigma_V$	Volumetric Standard deviation	mL
$GH$	Slope of salt concentration gradient normalized by solid phase volume	M
$I_F$	Final salt concentration	M
$I_0$	Initial salt concentration	M
$I_R$	Elution salt concentration	M



## 略字

Abbreviations and symbols	Description
AIEC	Anion exchange chromatography
CIEC	Cation exchange chromatography
HAC	Hydroxyapatite Chromatography
HIC	Hydrophobic interaction chromatography
LGE	Linear gradient elution
MMC	Mixed mode chromatography
PAC	ProteinA affinity chromatography
PEG	Polyethylene Glycol
SEC	Size exclusion chromatography
STC	Salt tolerant chromatography

## 参考文献

- [1] Filipe, V., Jiskoot, W., Basmeleh, A. H., Halim, A., Schellekens, H., & Brinks, V. Immunogenicity of different stressed IgG monoclonal antibody formulations in immune tolerant transgenic mice. *MAbs*, **4**, 6, 740-752, Taylor & Francis, 2012.
- [2] Jenei, B., Lazar, G., Bartha, K., Mihalik, R., & Medgyesi, G. A. Hypotensive action of aggregated IgG in rats. Study of the unresponsiveness to a second dose following restoration of the blood pressure. *Agents and actions*, **42**, 1-2, 63-66, 1994
- [3] Kroeze, M., Kanzy, E. J., Gronski, P., & Dickneite, G. Hypotension with intravenous immunoglobulin therapy: importance of pH and dimer formation. *Biologicals*, **31**, 4, 277-286, 2003
- [4] Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, *Minimum Requirements for Biological Products(revised edition)*, March 28, 2016
- [5] Evans W. Removing Aggregates in Monoclonal Antibody Purification. Several chromatographic resins are available for downstream purification. *Pharmaceutical Technology*, **39**, 3, 2015
- [6] Ishan A., Rathore A., S. Removal of Aggregates of Monoclonal Antibodies by Ion Exchange Chromatography. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering*, **8**, 3, 2014

[7] Hirao Y., Hshimoto M., Kitamura T., Uemura Y. inventors; Yoshitomi Pharmaceutical Industries, assignee.

Room temperature storable immunoglobulin preparation for intravenous injection.

*European patent EP 0 911 037 B1*. 1999

[8] Berglöf J.,H., Eriksson S., Curling J.,M. Chromatographic preparation and in vitro properties of albumin from human plasma. *Journal of Applied Biochemistry*, **5**, 282-292, 1983

[9] Wan Y., Vasan S., Ghosh R., Hale G., Cui Z. Separation of Monoclonal Antibody Alemtuzumab Monomer and Dimers Using Ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, **90**, 4, 422-432, 2005

[10] N. Yoshimoto, D. Itoh, Y. Isakari, A. Podgornik and S. Yamamoto, Salt tolerant chromatography provides salt tolerance and a better selectivity for protein monomer separations. *Biotech. J.*, **10**, 12, 1929–1934, 2015

[11] Suda, E. J., Thomas, K. E., Pabst, T. M., Mensah, P., Ramasubramanian, N., Gustafson, M. E., & Hunter, A. K. Comparison of agarose and dextran-grafted agarose strong ion exchangers for the separation of protein aggregates. *Journal of Chromatography A*, **1216**, 27, 5256-5264, 2009

[12] Vázquez-Rey, María, and Dietmar A. Lang. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnology and bioengineering*, **108**, 7, 1494-1508, 2011

[13] Gronemeyer P., Ditz R., and Strube J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering 2014*, **1**, 188-212; doi:10.3390/bioengineering1040188

[14] Hui F. Liu, Junfen Ma, Charles Winter & Robert Bayer  
Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *mAbs*, **2**, 5, 480-499, 2010

[15] Arakawa T. The mechanism of increased elution volume of proteins by polyethylene glycol. *Analytical Biochemistry*, **114**, 1, 267-268, 1985

- [16] Atha, D., H., Ingham K., C. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *Journal of Biological Chemistry*, **256**, 23, 12108-12117, 1981
- [17] Juckles, I., R., M., Fractionation of proteins and viruses with polyethylene glycol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, **229**, 3, 535-546, 1971
- [18] Polson, A., et al. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **82**, 3, 463-475, 1964
- [19] Miekka, S., I., Ingham K., C. Influence of self-association of proteins on their precipitation by poly (ethylene glycol). *Archives of biochemistry and biophysics*, **191**, 2 , 525-536, 1978
- [20] Toueille, M., Uzel, A., Depoisier, J. F., & Gantier, R. Designing new monoclonal antibody purification processes using mixed-mode chromatography sorbents. *Journal of Chromatography B*, **879**, 13, 836-843, 2011
- [21] Chen, J., Tetrault, J., Zhang, Y., Wasserman, A., Conley, G., DiLeo, M., & Ley, A. The distinctive separation attributes of mixed-mode resins and their application in monoclonal antibody downstream purification process. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 2, 216-224. 2010
- [22] Cummings, L. J., Snyder, M. A., & Brisack, K. Protein chromatography on hydroxyapatite columns. *Methods in enzymology*, **463**, 387-404, 2009
- [23] Hilbrig, F., Freitag, R., Isolation and purification of recombinant proteins, antibodies and plasmid DNA with hydroxyapatite chromatograph, *Biotech.J.*, **7**, 90-102, 2012
- [24] Faber, R., Yujing, Y., Gottschalk, U., Salt tolerant interaction chromatography for large-scale polishing with convective media. *BioPharm Int. Suppl.*, **10**, 11–14, 2009
- [25] Champagne, J., Balluet, G., Gantier, R., Toueille, M., “salt tolerant” anion exchange chromatography for direct capture of an acidic protein from CHO cell culture. *Protein Expression Purif.*, **89**, 117–123, 2013

- [26] Kim, U.-J., Kuga, S., Ion-exchange separation of proteins by polyallylamine-grafted cellulose gel. *J. Chromatogr. A.*, **955**, 191–196, 2002
- [27] Kim, U.-J., Kuga, S., Polyallylamine-grafted cellulose gel as highcapacity anion-exchanger. *J. Chromatogr. A.*, **946**, 283–289, 2002
- [28]  
[http://separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit\\_JP/Leaflet/LeafNH2\\_750F.pdf](http://separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit_JP/Leaflet/LeafNH2_750F.pdf)
- [29] Yamamoto, S., Nakanishi, K., Matsuno, R., Ion-exchange chromatography of proteins, *M. Dekker, New York*, 1988.
- [30] Regupathi, I., Govindarajan, R., Pandian Amaresh, S., & Murugesan, T. Densities and viscosities of polyethylene glycol 6000 + triammonium citrate + water systems. *Journal of Chemical & Engineering Data.*, **54**, 12, 3291-3295, 2009
- [31] Gorbunoff, M. J., Protein chromatography on hydroxyapatite columns. *Methods Enzymol.*, **182**, 329-339, 1990
- [32] Arakawa, T., Tsumoto, K., Nagase, K., Ejima, D., The effects of arginine on protein binding and elution in hydrophobic interaction and ion-exchange chromatography. *Protein Expression Purif.*, **54**, 110–116, 2007
- [33] Niesner, R., and Andreas, H. H., Diffusion coefficients of aromatics in aqueous solution. *Journal of Chemical & Engineering Data.*, **45**, 1121-1124, 2000
- [34] Walters, R. R., Graham, J. F., Moore, R. M., Anderson, D. J., Protein diffusion coefficient measurements by laminar flow analysis: method and applications. *Analytical biochemistry.*, **140**, 190-195, 1984
- [35] Lewandrowska, A., Majcher, A., Ochab-Marcinek, A., Tabaka, M., Holyst, R., Taylor dispersion analysis in coiled capillaries at high flowrates. *Analytical Chemistry.*, **85**, 4051-4056, 2013
- [36] Sherwood, T. K., Pigford, R. L., Wilke, C. R., *Mass transfer. McGraw-Hill.*, 2.6 Diffusion in liquids, 25-53, 1975

- [37] Yamamoto, S., Drying of gelled sugar solutions-water diffusion behavior, in Dehydration of products of biological origin, A. S. Mujumdar, Ed., *Enfield, Science Publishers.*, Chapter 7, 165-201, 2004
- [38] Yamamoto, S., Diffusion coefficients as mass transfer properties and water ad/desorption (drying) (in Japanese), *Jpn., J, Food Eng.*, **11**, 73-83, 2010
- [39] Young, M. E., Carroad, P. A., Bell., R. L., Estimation of diffusion coefficients of proteins. *Biotech. Bioeng.*, **22**, 947-955, 1980
- [40] Fee, C. J., Van Alstine, J. M., PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. *Chem. Eng. Sci.*, **61**, 934-939, 2006.
- [41] Fee, C. J., Protein conjugates purification and characterization, in F. M. Veronese, (Ed.), *PEGylated protein drugs : basic science and clinical applications*, Birkhauser, Basel, 113-125, 2009.
- [42] Fee, C. J., Van Alstine, J. M., Purification of PEGylated proteins, in Janson, J.-C. (Ed.), *Protein Purification : Principles, High Resolution Methods, and Applications*, Third Edition, chap.14, 339-362, Hoboken, USA, John Wiley & Sons, 2011

## 本研究に関連する著者の発表論文

### (a)査読のある雑誌等

(1)著者氏名 : Noriko Yoshimoto, Daisuke Itoh, Yu Isakari, Ales Podgornik and Shuichi Yamamoto

論文題目 : Salt tolerant chromatography provides salt tolerance and a better selectivity for protein monomer separations

学術雑誌名 : Biotechnology Journal

巻、号、頁 : vol. 10, Issue 12, pp.1929-34, DOI : 10.1002/biot.201400550

発行年月 : 平成 27 年 11 月

(本文との関連 : 本論文の第 3 章と関連)

(2)著者氏名: Daisuke Itoh, Noriko Yoshimoto and Shuichi Yamamoto

論文題目 : Retention mechanism of proteins in hydroxyapatite chromatography - multimodal interaction based protein separations: A model study

学術雑誌名 : Current Protein & Peptide Science(CPPS)

巻、号、頁 : vol. 19, 2018, DOI : 10.2174/138920371866617102412206

発行年月 : 平成 30 年 3 月

(本文との関連 : 本論文の第 3 章と関連)

### (b)査読のある国際会議の会議録等

(1)著者氏名: Daisuke Itoh, Masataka Hamachi, Noriko Yoshimoto and Shuichi Yamamoto

論文題目 : Determining molecular diffusion coefficients as important physical properties for chromatography of biologics

学術雑誌名 : Proceedings of 23th Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE 2016)

巻、号、頁 : -

発行年月 : 平成 28 年 10 月発行

(本文との関連 : 本論文の第 3 章と関連)

## 謝辞

本研究は著者が山口大学大学院医学系研究科博士課程在学中に、同大学院医学系研究科 山本修一教授の指導のもと実施いたしました。研究を進めるにあたり研究方針の決定・実験結果の検討など厳しくも懇切丁寧にご指導いただいた本学 山本 修一教授に深く感謝を申し上げます。また、学位論文の予備審査・本審査・公聴会にご出席頂き、有意義なディスカッションと的確なアドバイスをしていただいた本学 赤田倫治教授、堤宏守教授、本学 田中一宏准教授に厚く御礼申し上げます。

実験などの折に協力して頂き、多岐に渡りお世話になった本学 吉本則子准教授、本学技術職員 藤井幸江さん、事務職員 木村文香さん、元事務職員 本田真澄さんに心より感謝申し上げます。

実験について、様々な助言やご協力を頂いた卒業生の矢田友一さん、水口和信さん、西藤亘さん、博士後期課程の濱地正嵩さん、杉山征輝さん、長谷川純子さんに深く御礼申し上げます。また、本講座で共に過ごした卒業生の飯盛遊君、河田卓君、原龍太君、前田亮君、その他、2013-2017 年度に在籍していた大学院生諸氏に御礼申し上げます。

最後に、温かく見守り応援していただいた両親をはじめ、山口大学管弦楽団・医工学部管弦楽団など充実した研究生生活を送る心の支えとなった皆様に深く御礼申し上げますと共に、山本修一研究室の今後の益々の御発展と皆様の今後のご活躍をお祈りして、本論文の謝辞といたします。

山口大学大学院 医学系研究科 応用分子生命科学系専攻

バイオプロセス設計工学研究室 伊藤 大祐