

博士論文

巨大バイオ分子のクロマトグラフィー分離挙動の解析と

効率的な精製プロセスの開発

〔 Analysis of Chromatographic Separation Behavior and Development of
Efficient Purification Process for Large Biomolecules 〕

平成 29 年 9 月

濱地 正嵩

山口大学大学院医学系研究科

目次

第1章 緒論	1
1.1 はじめに	1
1.2 巨大バイオ分子とは—血漿分画製剤を例に—	1
1.3 血漿分画製剤の製造方法	2
1.4 巨大バイオ分子のクロマトグラフィープロセスの現状と課題	4
1.5 巨大バイオ分子の効率的なクロマトグラフィープロセス構築のために	6
第2章 クロマトグラフィーにおける巨大バイオ分子の保持と拡散挙動の解析	7
2.1 緒言	7
2.2 理論	8
2.2.1 Taylor 法による分子拡散係数 D_m の算出	8
2.2.2 動的光散乱法による分子拡散係数 D_m および流体力学的半径 R_h の算出	10
2.2.3 等組成溶出法による細孔内拡散係数 D_s の算出	12
2.2.4 直線勾配溶出法による吸着サイト数 B の算出	13
2.3 実験	19
2.3.1 試薬	19
2.3.2 緩衝液	20
2.3.3 装置	21
2.3.4 カラム	22
2.3.5 Taylor 法による分子拡散係数 D_m の測定	22
2.3.6 動的光散乱法による分子拡散係数 D_m および流体力学的半径 R_h の測定	23
2.3.7 直線勾配溶出と等組成溶出によると細孔内拡散係数 D_s の測定	23
2.4 結果および考察	24
2.4.1 PEG 化タンパク質の拡散係数	24
2.4.2 Taylor 法と動的光散乱法のそれぞれの特徴と問題点	24
2.4.3 PolyT の流体力学的半径	25
2.4.4 陰イオン交換クロマトグラフィーにおける PolyT の保持挙動	26
2.4.5 陰イオン交換クロマトグラフィーにおける PolyT の拡散係数	27
2.5 結言	29
第3章 巨大バイオ分子のモノリスクロマトグラフィーにおけるポアサイズの 分離特性への影響	30
3.1 緒言	30
3.2 理論	31
3.2.1 多重細管流れモデル	31
3.2.2 動的吸着容量の算出	33

3.3 モノリスカラムとは	35
3.4 実験	37
3.4.1 カラム	37
3.4.2 試薬	37
3.4.3 クロマトグラフィー装置	37
3.4.4 圧力損失の測定	38
3.4.5 pH transient の測定	38
3.4.6 直線勾配溶出実験による吸着サイト数およびピーク幅の決定	38
3.4.7 動的吸着容量の決定	38
3.5 結果	39
3.5.1 圧力損失	39
3.5.2 pH transient curve	41
3.5.3 吸着サイト数	42
3.5.4 動的吸着量	43
3.5.5 ピーク幅の解析	45
3.6 考察	47
3.7 結言	47
第4章 モノリスクロマトグラフィーのタンパク質吸着時における圧力上昇の解析	48
4.1 緒言	48
4.2 実験	49
4.2.1 材料	49
4.2.2 Dynamic binding capacity の測定	49
4.2.3 圧力損失の測定とタンパク質吸着層厚さの算出	49
4.3 結果と考察	49
4.3.1 圧力損失の測定とタンパク質吸着層厚さ	49
4.4 結言	50
第5章 結論	51
使用記号	53
参考文献	54
謝辞	58

第1章 緒論

1.1 はじめに

医薬品分野において、抗体医薬品や血液凝固因子といったバイオ医薬品の売上高は増加し続けており、バイオ医薬品の市場規模は、2015年には16兆円に達している。2020年にはさらに30兆円にまで拡大すると予想されており、世界の医薬品市場全体の中でバイオ医薬品が占める割合も年々高まっている。これらバイオ医薬品は体内への大量投与が必要なため、分離・精製プロセスでは各種クロマトグラフィーを組み合わせ、不純物を安全なレベルまで除去・低減されるのが一般的である。クロマトグラフィー以外の分離方法では、目的物質と物理化学的性質が類似している不純物の分離が難しいことが理由の一つである。一方で、バイオ医薬品は複雑な構造を持つ糖タンパク質であり、一般的な低分子合成医薬品と比べて分子量が大きく、分子量が10万を超える巨大バイオ分子も存在する。巨大分子ほど拡散係数が小さく、クロマトグラフィー分離において不利に働くことが多い。

1.2 巨大バイオ分子とは—血漿分画製剤を例に—

血液は、赤血球、白血球、血小板の細胞成分と、血漿と呼ばれる液体部分の混合物である。血漿中には100種類を超えるタンパク質が存在し、生体内の浸透圧保持や免疫作用、血液凝固作用など重要な生理作用をつかさどる。その中で、医薬品として有用なタンパク質を抽出・精製して造られたものが血漿分画製剤と呼ばれるものである (Fig.1-1)^[1-3]。これらは、日本赤十字社で献血された血液を原料として製造されている。

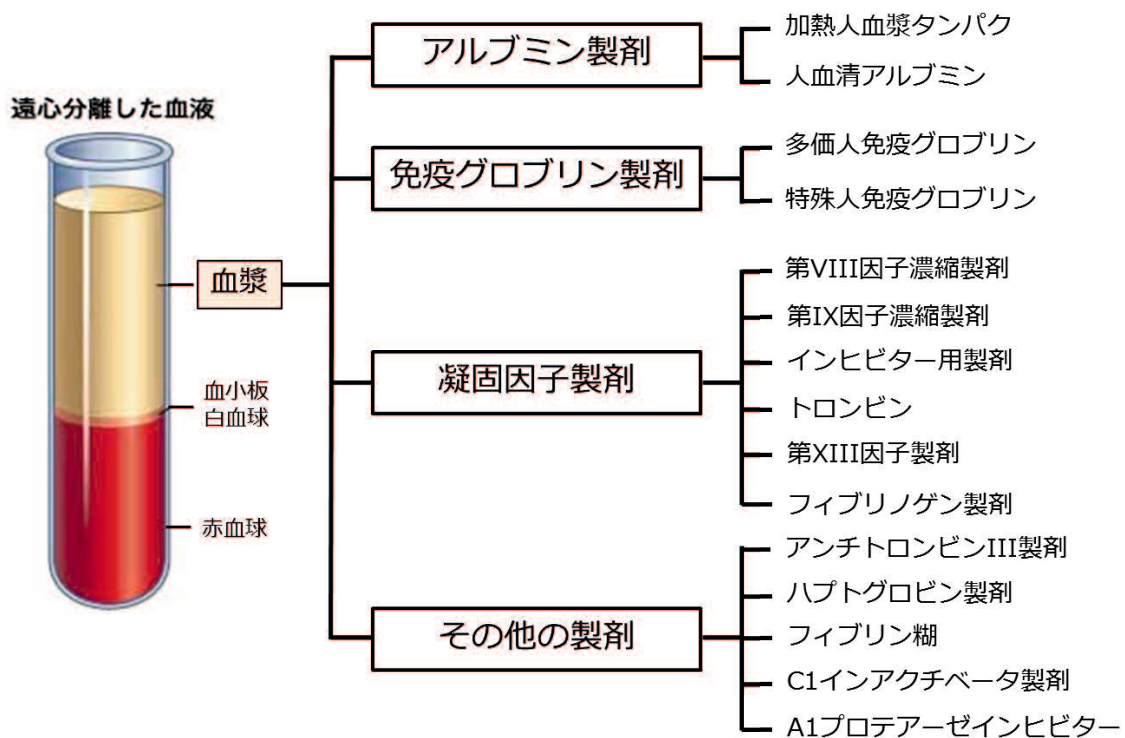
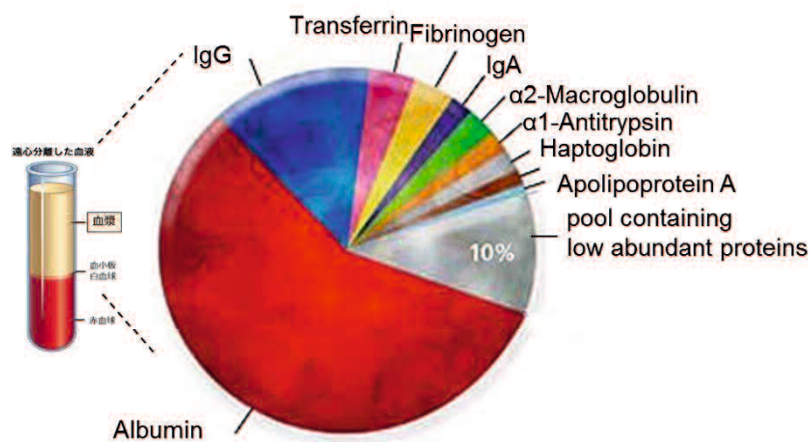


Fig.1-1 血液の組成と血漿分画製剤



Protein	MW	Concentration [g/L-Plasma]
Albumin	66,500	40
IgG	150,000	10
Transferrin	76,000	3
Fibrinogen	340,000	3
Factor VIII	330,000	0.0001
VWFmultimers	~20,000,000	0.007

Fig.1-2 血漿中のタンパク質

原料となる血漿中には、約 60 g/L の濃度でタンパク質が含まれており、Albumin や IgG など高濃度に存在するものもあれば、Factor VIII のように濃度が非常に低いものもある。分子量も多種多様であり、Fibrinogen や Factor VIII などの分子量が 10 万を超えるような巨大バイオ分子も存在する(Fig.1-2)。このような複雑なタンパク質の混合物から有用なタンパク質を高純度に、しかも安定な形で分離するために、種々な分離法が検討されてきた。

1.3 血漿分画製剤の 製造方法

2000～10000 L の血漿を出発原料とする工業規模の血漿分画法としては 1940 年代に米国の E. J. Cohn 博士らが開発した Cohn のエタノール分画法が基本となっている。この方法はコントロールファクターである以下の 5 変数 pH、イオン強度、エタノール濃度、温度、蛋白濃度を巧みに変化させてタンパク質の溶解度を変え、沈殿画分と上清画分に分け、様々なタンパク質を分画する優れた分別沈殿法である(Fig.1-3)。Cohn 法は設定条件を正確に実現すれば、比較的簡単な無菌操作で、ヒト血漿から多種類のタンパク質を大規模に分離できる。このため、現在も世界のほとんどの血漿分画メーカーに採用されている。それぞれの沈殿には目的タンパク質が高濃度に濃縮されているが、副作用の原因となる夾雑タンパク質の低減やウイルス安全性を高めることを目的とし、さらに各種クロマトグラフィーによって精製される場合が多い。

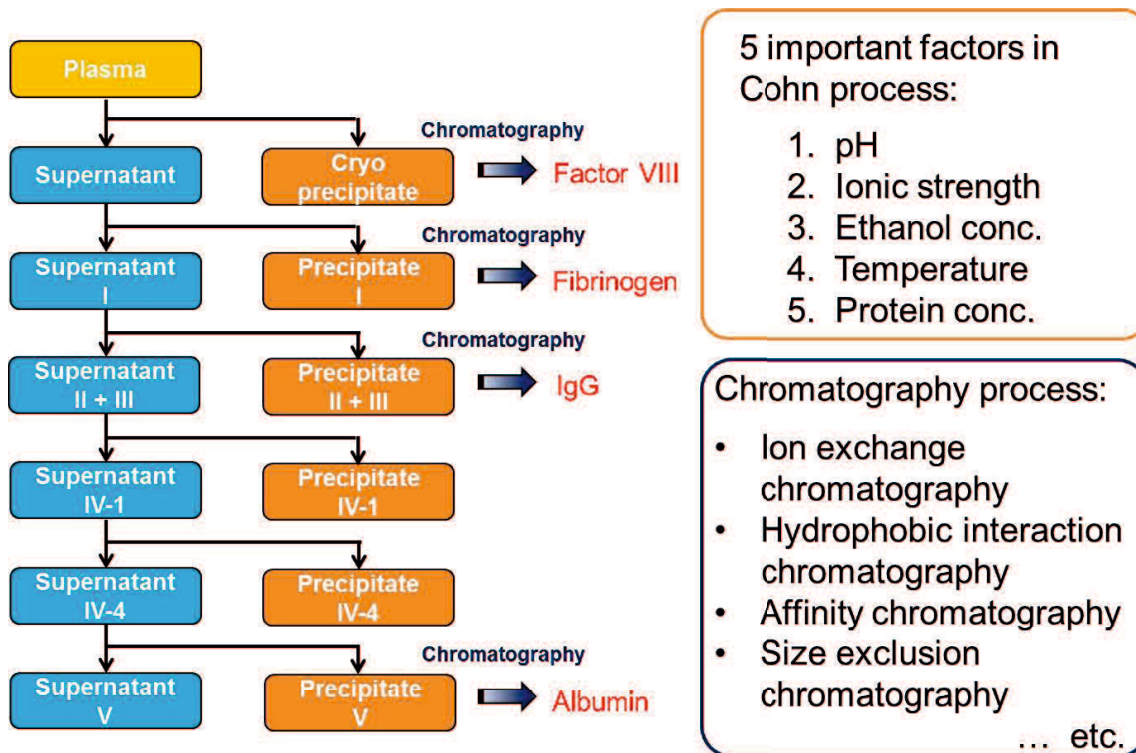


Fig.1-3 Cohn のエタノール分画

1.4 巨大バイオ分子のクロマトグラフィープロセスの現状と課題

巨大タンパク質のクロマトグラフィー精製について、血液凝固因子である Factor VIII を例に挙げて考えてみる。

Factor VIII は血液凝固反応において要となる血漿タンパク質の一つである。この Factor VIII が欠損、もしくは活性低下による遺伝性血液凝固異常症である血友病の治療薬として Factor VIII 濃縮製剤が使用されている。Factor VIII は血漿中の濃度が凝固因子中で最も低く、精製・濃縮操作が必須である。また、Factor VIII は分子量が約 330,000 と非常に大きく、さらに血漿中では分子量が 500,000~20,000,000 の von Willebrand Factor (以下、VWF) と結合して、巨大分子構造を形成している^[4]。

血漿由来 Factor VIII 濃縮製剤は通常、Cryoprecipitate (Cryo ppt.)を原料として製造される(Fig.1-3)。Cryo ppt.には Factor VIII が血漿の数倍含まれており、過去にはこの沈殿溶解液が血友病の治療に使われてきた。しかし、不純物も多く、大多数の重篤な出血の治療には不向きであったため、イオン交換クロマトグラフィーによって精製・濃縮された Factor VIII / VWF 製剤や、Factor VIII に対するモノクローナル抗体カラムを使用して夾雑タンパク質(VWF を含む)を可能な限り除去した高純度 Factor VIII 濃縮製剤が開発され、血友病治療を大きく変化させた(Fig.1-4)。

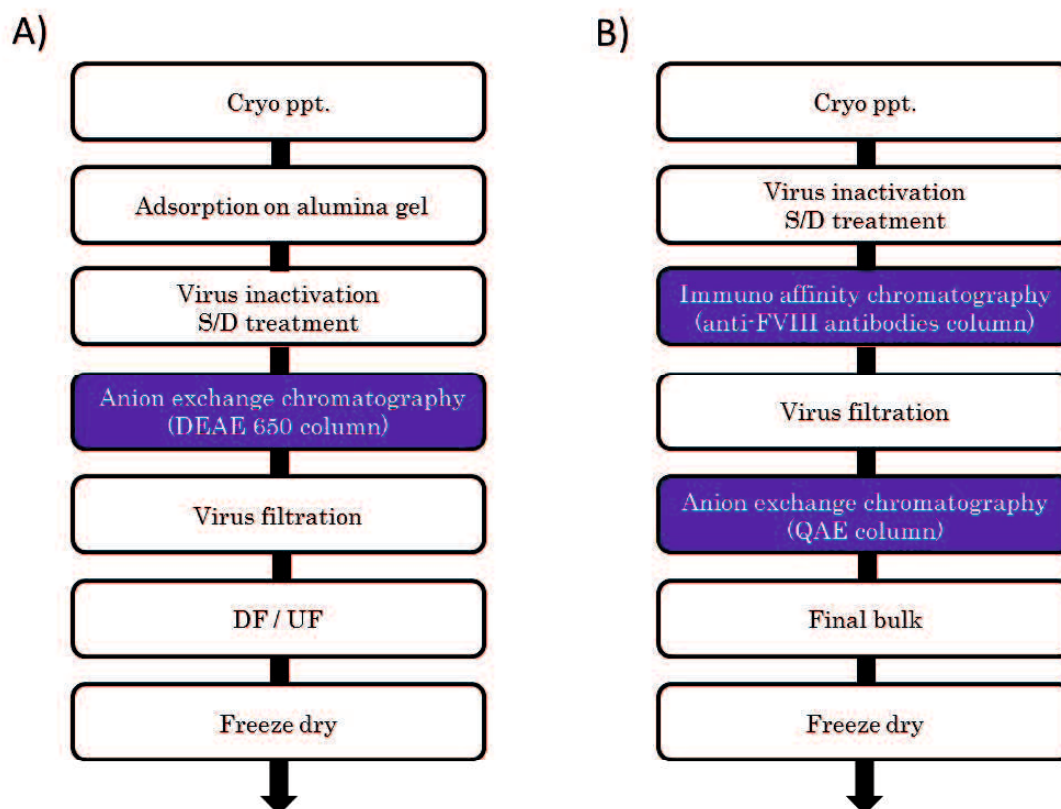


Fig.1-4 血漿由来 Factor VIII 製剤の精製工程の例

A) Factor VIII / VWF 製剤^[1]、 B) 高純度 Factor VIII 製剤^[5]

どちらの濃縮製剤も多孔性微粒子充填剤を使用したカラムクロマトグラフィーによって精製されるが、処理液量が多く、分子の細孔内への拡散・吸着に時間が必要なため、1回のクロマトグラフィー工程に要する時間は、数時間から数十時間というのが現状である。加えて、Factor VIII は非常に不安定なタンパク質であるため、精製工程中にも分解や失活を引き起こす。このため、大量の溶液を短時間で処理する方法が望まれている。

また、世界的に開発が盛んに行なわれている遺伝子組換え Factor VIII 製剤についても同様に考えてみる。遺伝子組換え製剤においては、製造工程由来不純物（宿主細胞由来タンパク質、DNA 等）や目的物質由来不純物（重合体、Charged variants 等）の除去が必要であり、クロマトグラフィーは必須の工程となっている。遺伝子組換え製剤における不純物は、血漿由来とは異なり、本来体内に存在しない物質であるため、更に高純度の精製が要求される。このため、Fig.1-5 に示すように多くのクロマトグラフィー工程を必要とする場合がある。また、通常、遺伝子組換え Factor VIII の培養上清中には、Factor VIII の安定化因子である VWF が存在しないため、培養上清や中間体における安定性は非常に低い事が予想される。このような Factor VIII の失活や分解は、製造工程の回収率の低下や最終製品の抗原性の発生リスクを生じる。遺伝子組換え Factor VIII のクロマトグラフィー精製において高い品質と回収率を得るためには、血漿由来 Factor VIII 製剤と同様に、大量の溶液を短時間で処理する方法が解決方法の1つとなる。

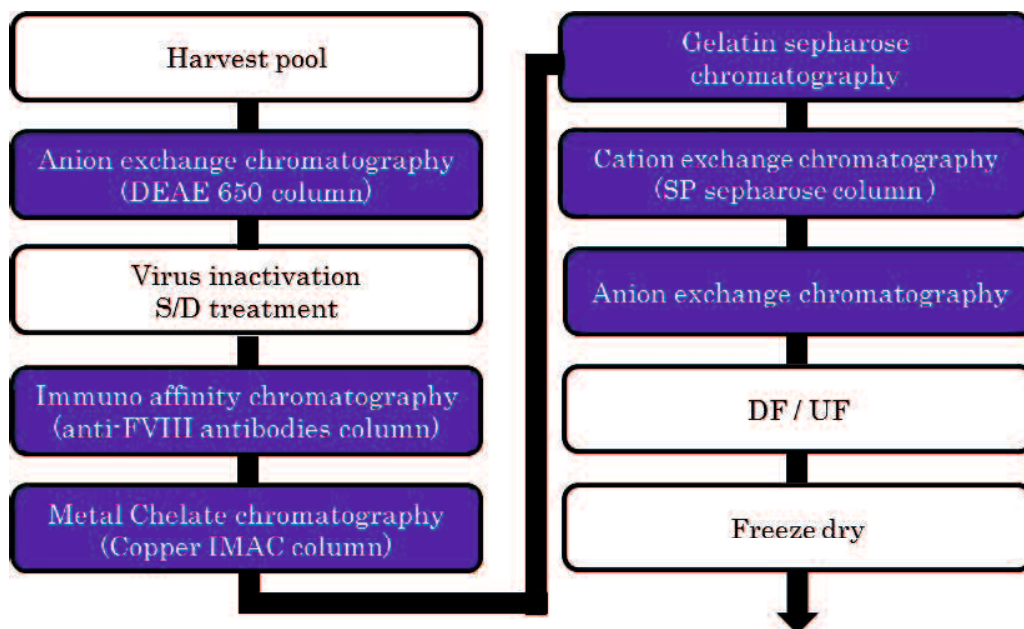


Fig.1-5 遺伝子組換え Factor VIII 製剤の精製工程の例 ^[6]

1.5 巨大バイオ分子の効率的なクロマトグラフィープロセス構築のために

1.4 項に記載したように巨大バイオ分子のクロマトグラフィープロセスは、工程時間が長時間に及ぶことが1つのボトルネックとなっている。

このような生産性を犠牲にしたプロセス設計となっている原因の1つとして、巨大バイオ分子のクロマトグラフィーにおける保持と拡散挙動に関する報告が少ないことが挙げられる。分子拡散係数やクロマト担体の細孔内拡散係数といった値は、クロマトグラフィー分離性能を決定する重要な情報である。従来型の多孔性微粒子充填剤カラムにおいて、巨大バイオ分子がどのような拡散挙動をとるのか理解されておらず、効率的なプロセス開発や工程改良などが進まないといった現状がある。また、巨大バイオ分子の分離には膜型クロマトグラフィーあるいはモノリスの利用が有効であると報告されており^[7]、プロセスに導入できれば、大幅な生産性の改善が期待できる。一方、目的とする巨大バイオ分子を分離精製するための最適な膜/モノリスのポアサイズの設定や、タンパク吸着時の圧力上昇、スケールアップ時の形状といった課題も多く存在する。このため、工程に導入するには多くの検討が必要となる。

そこで、本研究では効率的な巨大バイオ分子のクロマトグラフィー精製プロセスを構築することを目的とし、第2章では巨大バイオ分子の分子拡散係数および細孔内拡散係数について、信頼できる値を精度よく測定するための、それぞれの方法の特徴と問題点あるいは留意点について考察し、測定値からクロマトグラフィー分離における巨大バイオ分子の保持、分離挙動について考察した。また、第3章では巨大バイオ分子の分離精製に有利であると報告されているモノリスカラムにおいて、ポアサイズが巨大分子の分離挙動に与える影響を、圧力損失、動的吸着量、吸着サイト数、ピーク幅等のデータに基づいて考察した。最後に、第4章ではモノリスカラムにおいて巨大バイオ分子吸着時に生じる圧力上昇といった課題について、モノリスのポアサイズとタンパク質サイズに基づき解析を行い、ポアサイズの最適化について考察した。

第2章 クロマトグラフィーにおける巨大バイオ分子の保持と拡散挙動の解析

2.1 緒言

拡散係数（分子拡散係数あるいは相互拡散係数） D_m は、拡散物質移動速度を記述する移動物性値であり、吸着、乾燥（脱着）、抽出、クロマトグラフィーなどさまざまな分離操作・装置の設計に必要である^[8-11]。また、拡散係数から計算される物質の大きさも物質のキャラクタリゼーションに重要な情報である。多くの分子の拡散係数 D_m の値は便覧あるいは相関式により求めることができるが^[12,13]、必要とする条件での値がみつからないことも多い。それゆえ、 D_m の実測は依然として重要である。また、とくに分子量の大きいタンパク質やDNA、さらにはバイオナノ粒子の D_m は、ほとんど報告されていない。拡散係数の測定のために、さまざまな方法が開発され使用されている。それらの原理はmacroscopicな移動量の測定（濃度分布測定、拡散移動量測定）とmicroscopicな分子の移動の測定の2種類に大別される^[14]。

本研究では、タンパク質および修飾タンパク質（PEG化タンパク質）の D_m を比較的単純な測定操作と装置が簡便である細管内層流速分布を利用したTaylor法^[15-19]と動的光散乱法^[14]で測定した。信頼できる値を精度よく測定するための、それぞれの方法の特徴と問題点あるいは留意点について考察した。

また、実際のクロマトグラフィー分離では、樹脂の細孔内において拡散係数がどれだけ低下するかといった情報も、クロマトグラフィーの分離、吸着性能をコントロールするためには重要である。クロマトグラフィー樹脂の細孔は、30~100 nm程度の大きさで、高度に分岐、湾曲したものである^[20]。物質移動は濃度勾配および拡散係数により制御され、拡散係数はピーク幅によって決定される。分離能力はそれゆえピーク幅と吸着容量で計算される。このため、クロマト樹脂の細孔内部における拡散をあらゆる細孔内拡散係数 D_s の測定が重要となる。一方、細孔内拡散係数 D_s の決定は、充填剤粒子径、細孔径、細孔構造、分子サイズ、分配係数といった充填剤と分子のいくつかのパラメータが存在するため、依然として難しいのが現状である。

本研究では、一本鎖DNAの9~95-mer polyTをモデル分子として得られた分子拡散係数 D_m 、van Deemter plotより得られた陰イオン交換クロマト担体における細孔内拡散係数 D_s 、吸着サイト数などのデータに基づき、巨大バイオ分子の拡散係数がクロマトグラフィー分離吸着性能に与える影響について考察した。

2.2 理論

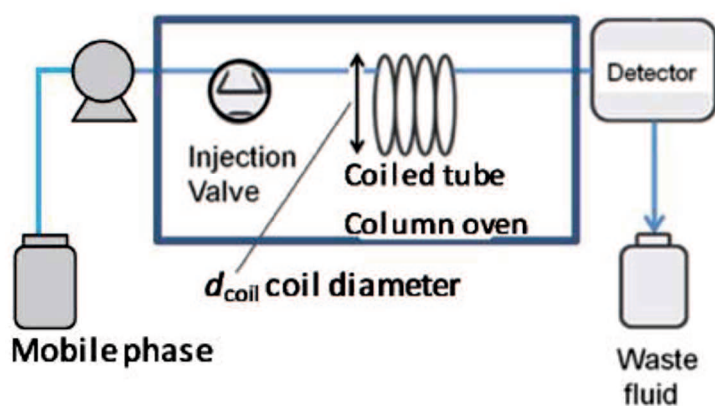
2.2.1 Taylor 分散法による分子拡散係数 D_m の算出^[15-19]

Taylor 法は、細管内層流速度分布を利用して拡散係数を測定する方法である^[15-19]。

Fig.2-1 A)に示すような比較的単純な装置で測定できる方法として知られており、さまざまな物質の拡散係数 D_m が決定されている^[15-19]。また、分子の会合の解析などにも使用されている。

一般的に線速 u の層流条件下で、十分な長さのある配管に試料が注入された場合、Fig.2-1 B)のようにガウス分布形状のパルス応答曲線が観察される。

A)



B)

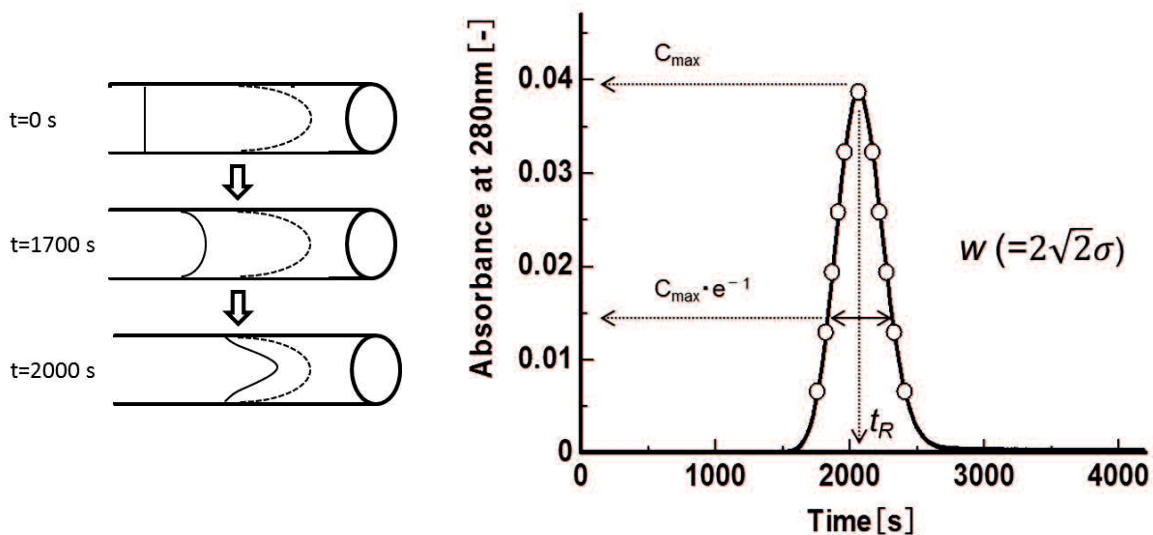


Fig.2-1 A) Taylor 分散法の実験装置 B) 一般的な Taylor 法におけるパルス応答曲線

パルス応答曲線のピーク幅は、拡散係数の低下とともに増加するため、ピークの標準偏差 σ が決定すれば、(2-1)式の Taylor 式から分子拡散係数 D_m を求めることができる。

$$D_m = \frac{d_c^2 t_R}{96\sigma^2} \quad (2-1)$$

ここで d_c は細管の内径、 t_R はピーク溶出時間である。

σ および t_R はパルス応答曲線を式(2-2)のガウス近似式で fitting することで求める。

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

実験で得られた溶出曲線のピークトップにおける吸光度の値 C_{max} を読み取り、その値に $\exp(-1)$ を掛けた高さでのピーク幅 w を読み取る。溶出ピークの標準偏差 σ は(2-3)式によって求められる。またベースラインでのピーク幅は、(2-4)式によって求められる。

$$\sigma = \frac{w}{2\sqrt{2}} \quad (2-3)$$

$$W = 4\sigma \quad (2-4)$$

得られた値が信頼できるかどうかについては、以下の条件を検討する必要がある。

条件1 遠心力による混合効果による影響

Taylor 法では数メートルの長い配管を用いられるので、配管はコイル状に巻かれ測定を行われる。遠心力による混合効果の影響を無視するため、(2-5)式が成り立つ条件下で実験を行う必要がある。

$$D_e \cdot S_c^{0.5} < 10 \quad (2-5)$$

ここで D_e は Dean 数、 S_c は Schmidt 数で、それぞれ次のように定義される。

$$De = \frac{\rho u d_c}{\mu} \left(\frac{d_c}{d_{coil}}\right)^{1/2} \quad (2-6)$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho D_m} \quad (2-7)$$

ρ は溶媒の密度、 u は線速度、 μ は溶媒の粘度、 d_c は細管内径、 d_{coil} はコイル径である。

本研究で用いた細管 ($d_c = 0.05$ cm, $L = 246.5$ cm, $d_{coil} = 7.0$ cm) に対して、牛血清アルブミン (Bovineserum albumin, BSA) の $D_m = 0.67 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ [20°Cの文献値を 25°Cへ Stokes-Einstein (2-10)式から換算] を測定するときに(2-5)式を満たす条件を求めると、 $u < 10.98$ cm/min でなければならない。体積流量では $F_v < 0.0216$ mL/min という非常に低流量となり、精密低流量ポンプが必要であることがわかる。より小さい値、例えば $D_m = 0.30 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ の測定のためには $u < 7.35$ cm/min、 $F_v < 0.0144$ mL/min となり、

さらなる低流量が必要となり、測定時間も 1 時間程度が必要となる。

条件 2 理論段数 $N > 30$

Taylor 法により得られた溶出曲線が対称になるには、理論段数 N が少なくとも 30 以上が必要である。

$$N = (V_t / \sigma_v)^2 = (t_R / \sigma)^2 \quad (2-8)$$

ここで、 V_t はチューブ体積、 σ_v は応答曲線の体積基準標準偏差、 t_R は応答曲線のピーク保持時間、 σ は応答曲線の時間基準の標準偏差である。 N を増加させるには、細管を長くするか流速を遅くさせる必要がある。移動相線速度 u は(2-1)式および(2-8)式より理論段数 N と以下のように関係づけられる。

$$u = \frac{96 D_m}{d_c^2} \frac{L}{N} \quad (2-9)$$

条件 1 と同様に $D_m = 0.67 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ および $D_m = 0.30 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ を測定するための $N > 30$ となる u を(2-9)式で求めると、それぞれ、 $u < 13.61 \text{ cm/min}$ ($F_v < 0.0267 \text{ mL/min}$)、 $u < 6.09 \text{ cm/s}$ ($F_v < 0.0120 \text{ mL/min}$) となる。 D_m の値が小さくなると測定流速（流量）の上限は条件 2 によって決まることになる。その他には、管壁と試料の相互作用、死容積での分散の影響を検討しておく必要がある。比較のためにステンレス配管を用いて測定したが、PEEK チューブと同じ D_m 値が得られた。また、 t_R は、チューブ体積 / 体積流量と数% 以内で一致し、吸着の影響は観察されなかった。ピーク形状も対称であり、吸着によるテイリングなども確認されなかった。チューブ体積を大きくすれば死容積での分散は無視できるが、試料および溶媒の使用量が多くなる。今回用いたチューブ体積は約 0.5 mL であったが、さらにマイクロ化した場合には、拡散係数が大きい場合、ピーク幅も狭くなるので死容積の影響については精密に検討する必要がある。逆に小さな拡散係数の測定するときには、0.01 mL/min 以下の流量が必要となる。

2.2.2 動的光散乱法による分子拡散係数 D_m の測定^[14]

動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering, DLS) は、溶液中でブラウン運動している粒子の拡散係数を測定する方法である。

溶液中に分散した粒子にレーザー光を照射すると、粒子からの散乱光には拡散係数に応じたゆらぎが生じる。大きな粒子は動きが遅いので散乱光強度のゆらぎは緩やかであり、一方、小さな粒子は動きが速いので散乱光強度のゆらぎは急激に変化する。

一定の温度で所定の粘度を持つ溶液において、粒子の拡散係数は(2-10)式のアインシュタイン・ストークスの式に示すように粒子径と反比例する。このため、拡散係数を測定することで粒子径を求めることができる。

$$r_h = \frac{k_B T}{6\pi\mu D_m} \quad (2-10)$$

ここで、 D_m は分子拡散係数 [m^2/s]、 k_B はボルツマン定数 1.38×10^{-23} [J/K]、 T は絶対温度[K]、 μ は溶媒粘度[mPa・s]、 r_h は流体力学的半径[nm]である。

DLSは粒子径測定方法として知られているが、実際には D_m をレーザーの散乱光のゆらぎから計算する。(2-11)式のように散乱強度 I を単位時間 τ 当たりの相関性でプロットした二次の自己相関関数 $g_2(\tau)$ は(2-12)式で相関され、拡散係数 D_m が求まる。

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2-11)$$

$$g_2(\tau) = 1 + \beta \exp(-2D_m q^2 \tau) \quad (2-12)$$

$\langle \rangle$ は平均を示す。また β と q は装置性能に由来する定数で、 β は最小検出時間、 q は散乱光の検出角度で決まる。実際の測定では、(2-12)式による計算は装置に組み込まれたソフトで行われるので β と q の値を意識する必要はなく、得られた D_m を使って上述のように(2-10)式を使って水和半径 r_h を計算する。

操作は、試料溶液を装置にセットするのみで非常に簡単であるが、信頼できる値を得るためには、いくつかの条件を検討しておく必要がある。試料濃度の範囲は、段階的に希釈し、測定結果に変化が認められないことを確認する必要がある。また、あまりにも高濃度の場合、装置の測定保証限界を超えた散乱になる可能性もあるので注意する必要がある。

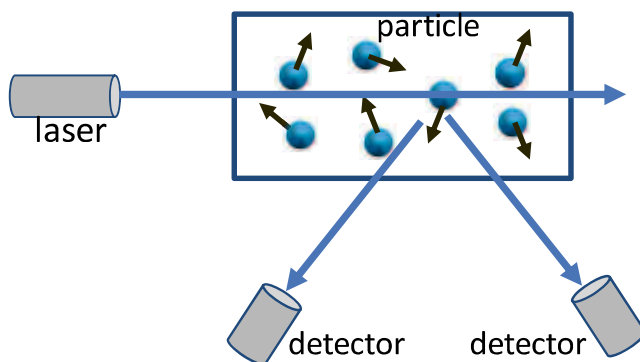


Fig.2-2 Dynamic Light Scattering (DLS) equipment principle

2.2.3 等組成溶出法による細孔内拡散係数 D_s の算出

等組成溶出法は、一定組成の移動相で溶出分離を行う方法で、一般的にはサイズ排除クロマトグラフィー(Size Exclusion Chromatography ; SEC)に用いられる。多孔性充填剤を充填したカラムにサンプルを導入し、分子サイズによって細孔内拡散が異なるため分離が可能となる。サイズの大きな分子は細孔に入らずカラム出口に向かうが、サイズの小さな分子は細孔内に入るため溶出が遅れる。この移動速度差を利用した分離方法がSECである。等組成溶出の場合、溶出曲線のピーク保持体積 V_R および保持時間 t_R は、分配係数 K と次式の関係が成り立つ。

$$V_R = F \cdot t_R = V_0 + (V_t - V_0) \cdot K \quad (2-13)$$

ここで、 F : 体積流量[mL/s]、 V_t : カラム体積[mL]、 $V_0 = \varepsilon V_t$: カラム空隙体積[mL]である。 K は 2 相間の平衡関係を表し、サイズ排除クロマトグラフィーでは固定相との相互作用が無い場合、 $K < 1$ となり、 $V_R < V_t$ となる。サンプルが固定相に強く保持される場合は、移動速度が事実上 0 となり、逆に相互作用が非常に弱い場合は、移動相速度と等しくなる。カラム内での混合や充填剤の粒子細孔内拡散などにより、溶出ピークは広がる。溶出曲線の広がりにはカラム性能に影響し、理論段相当高さ(HETP)で評価される。HETP はカラム内を N 段の連続混合槽とみなすことによって導かれた。HETP が小さくなれば(あるいは N が大きくなれば) 幅の狭い曲線になり、分離は向上する。等組成溶出曲線は、Taylor 法で得られる溶出曲線(Fig.2-1)と同様にガウス分布で近似でき、カラム長さ Z 、ピーク標準偏差 σ 、保持時間 t_R から次式により、HETP は算出できる。

$$\text{HETP} = Z / N = Z(\sigma / t_R)^2 \quad (2-14)$$

HETP を線速 u に対してプロットし直線関係を得て(Van Deemter plot)、この直線の傾き C^0 より(2-15)式から細孔内拡散係数 D_s を算出することができる。

$$\text{HETP} = A^0 + C^0 u = A^0 + \frac{d_p^2}{30D_s} \frac{HK}{(1+HK)^2} u \quad (2-15)$$

ここで、 A^0 は移動相における混合拡散により決まる定数であり、粒子径 d_p の 2~5 倍程度の値である。 C^0 は細孔内拡散の寄与を表し、 d_p の二乗に比例し、細孔内拡散 D_s に反比例する。 $H = (1-\varepsilon)/\varepsilon = (V_t - V_0)/V_0$ で固定相-移動相体積比である。

D_s が小さいと Fig.2-3 に示すように HETP- u の曲線の傾きが大きくなり、流速を速くするとピークが広がり分離が悪くなる。

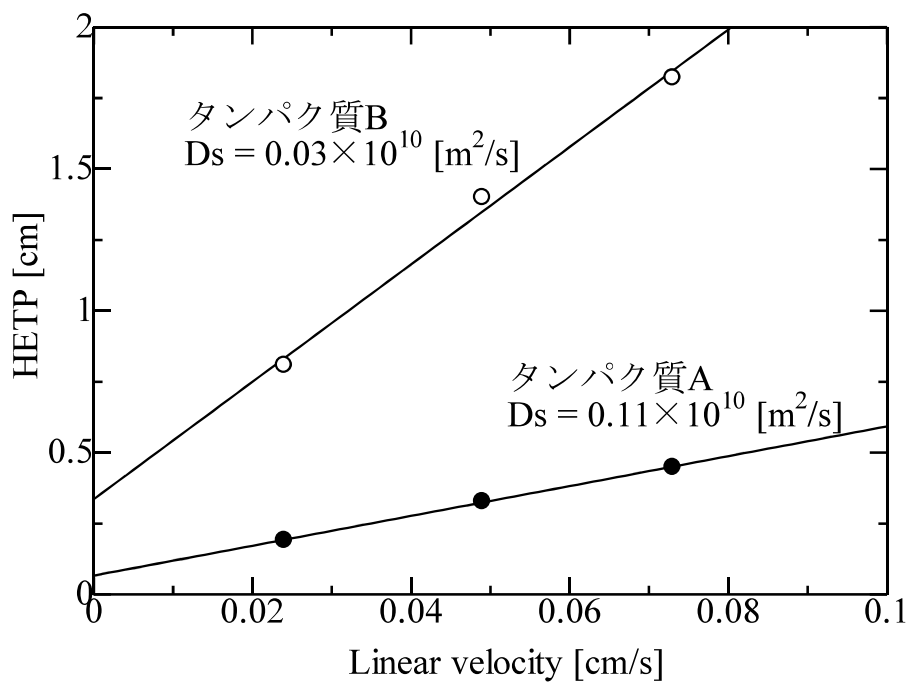


Fig.2-3 HETP-u (Van Deemter plot)

2.2.4 直線勾配溶出法による吸着サイト数 B の算出

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移動相中のイオン強度が高くなり、そのためサンプルは移動相中に競合するイオンが多くなるので、溶出される。また、イオン交換基との相互作用はサンプルごとに異なるので移動速度差もサンプル固有のものとなるので分離される。

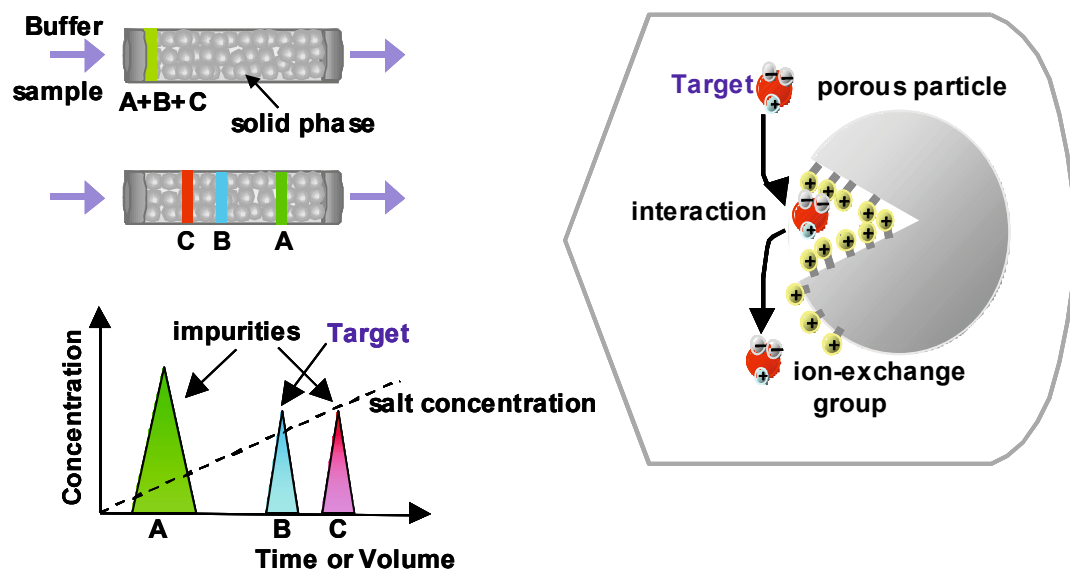


Fig.2-4 直線勾配溶出法

試料のイオン交換体への吸着はイオン強度に強く依存する。直線的に塩濃度を増加させて溶出を行うイオン交換体の直線濃度勾配における試料ゾーンのカラム内の移動を考える。初期段階にはカラムは低塩濃度で平衡化されており、この状態で試料は強くイオン交換体に吸着されているため、溶出開始直後にはゾーンはほとんど移動しないが、塩濃度が増加するに従って徐々に吸着が弱められ、移動速度は急激に増加する。その後、移動速度が緩衝液の移動速度と等しくなるとすべてのゾーンは同じ速度で移動する。この溶出方法は初めに試料が吸着しやすい低塩濃度で平衡化されたカラムに試料を添加すると、試料がカラムの上部から吸着していき、その後、直線的に塩濃度を増加させることによって吸着した試料は吸着力が弱まり徐々にカラムから溶出される。

本研究の実験は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^[21]で解析し、結合サイト数 B を決定した。

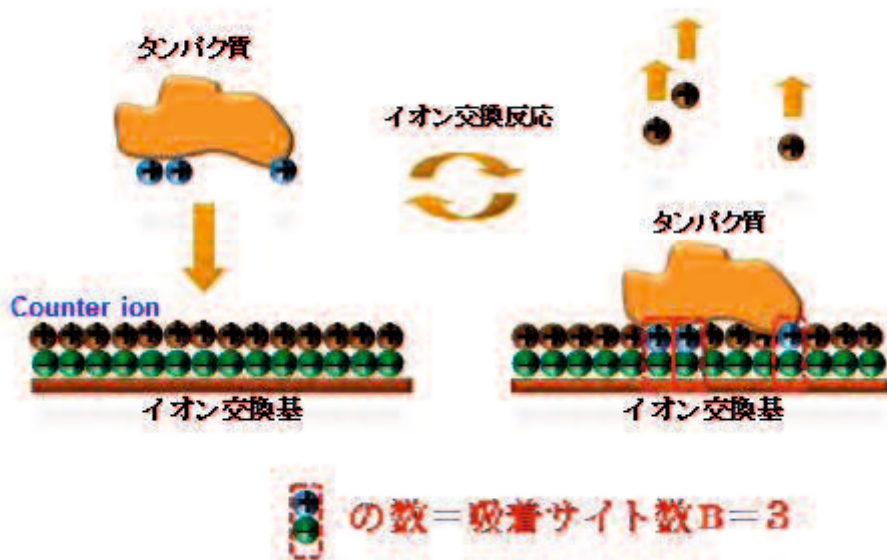


Fig.2-5 吸着サイト数 B の概念

典型的な勾配溶出曲線を Fig.2-6 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（換算には塩濃度と電気伝導度との検量線を作成して求めた）。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。

$$g = \frac{I_F - I_0}{V_g} = \frac{I_F - I_0}{F \cdot t_g} \quad [\text{M/mL}] \quad (2-16)$$

$$GH = g(V_t - V_0) = g(V_t - \varepsilon V_t) \quad [\text{M}] \quad (2-17)$$

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]、 ε : カラム空隙率[-] である。

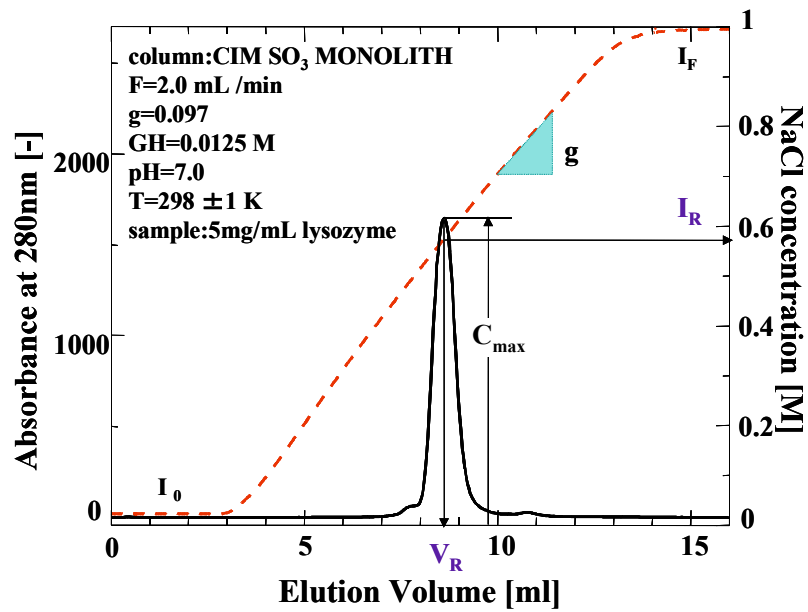


Fig.2-6 典型的な直線勾配溶出曲線

これより、 GH と I_R の関係を両対数プロットすると、Fig.2-6のような直線関係が得られ、これから(2-18) 式中の定数 A, B が決定される。定数 A, B はカラムサイズや流量に依存しない平衡関係を表し、与えられた試料、充填剤、緩衝液に対して特有な値である。

$$\ln GH = (B + 1) \ln I_R - \ln[A(B + 1)] \quad (2-18)$$

$$\text{傾き} = B + 1$$

$$\text{切片} = - \ln[A(B + 1)]$$

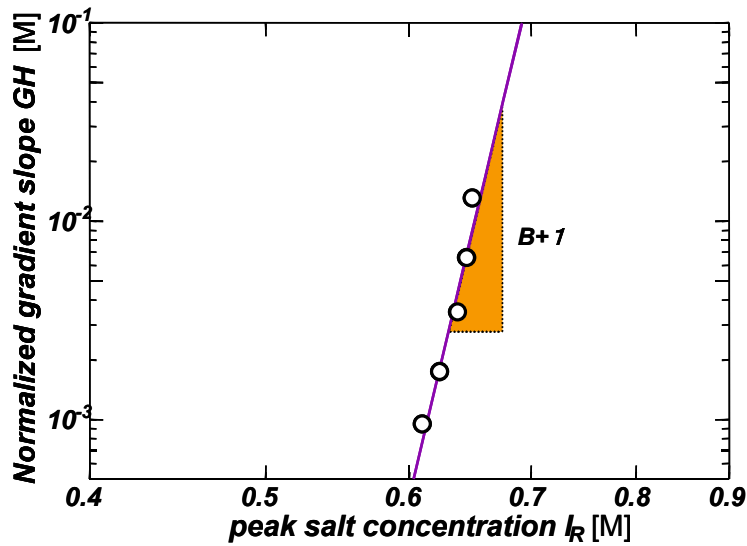


Fig.2-7 典型的な GH- I_R 曲線

*Fig.2-7 の近似直線について、 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フィッティングすることにより近似した。

勾配溶出法における HETP の算出には、等組成溶出法で用いた(2-14)式は初期塩濃度、試料負荷量が異なると流速が同じでも t_R (または V_R)が大きく変化するので適用できない。一方、溶出位置での塩濃度は勾配が同じであれば常に一定であると考えられるので、溶出塩濃度 I_R における分配係数 K_R により HETP を定義する。溶出塩濃度 I_R における分配係数 K を K_R とすると、(2-19)式によって求められる。

$$K_R - K' = A \cdot I_R^{-B} \quad (2-19)$$

この K_R における溶出体積 V_R' を(2-20)式とすると、(2-21)式が成り立つ。

$$V_R' = V_0(1 + HK_R) \quad (2-20)$$

$$N = \left(\frac{V_R'}{\sigma_v} \right)^2 = \left[\frac{V_0(1 + HK_R)}{\sigma_v} \right]^2 \quad (2-21)$$

この(2-21)式を(2-14)式に代入し、(2-22)式が得られる。

$$HETP = \frac{Z}{L^2} \cdot \left[\frac{\sigma_v}{V_0(1+HK_R)} \right]^2 = \frac{Z}{L^2} \cdot \left(\frac{\sigma_v}{V_R'} \right)^2 \quad (2-22)$$

$$M = \frac{1}{2} \cdot \frac{1+HK_R}{1+HK'} \cdot \frac{B+1}{B} \quad (2-23)$$

$$L = \begin{cases} \sqrt{M} & (M < 0.25) \\ \frac{3.22M}{1+3.13M} & (0.25 < M < 12) \\ 0.95 & (M > 12) \end{cases} \quad (2-24)$$

ここで、 L : ゾーン圧縮係数[－]、 M : L 算出のための変数[－]、 $H=(1-\varepsilon)/\varepsilon$: 相率[－]、 V_R' : $K=K_R$ における溶出体積[mL]である。

2.3 実験

2.3.1 試薬

Table 2-1 使用したタンパク質

sample	MW [g/g-mol]	p.I	Supplier	Cat No
Bovine Serum Albumin (BSA) monomer	66000	4.9	SIGMA	A1900

Table 2-2 使用した合成オリゴヌクレオチド

sample	M_w [g/mol]	T_m [°C]	Supplier
9T	2757	18.0	Tsukuba Oligo Service
20T	6022	47.8	Tsukuba Oligo Service
50T	15148	68.0	Tsukuba Oligo Service
95T	28837	74.4	Tsukuba Oligo Service

M_w : 分子量、 T_m : 融点 T = チミン

[合成オリゴヌクレオチド試料の調整と前処理]

- 1) 粉末の DNA サンプル(マイクロチューブ)に超純水を 1 mL 入れて希釈した。
- 2) 1)の超純水で希釈した DNA を 150 μ L とり他のマイクロチューブに入れた。
- 3) 2)の 150 μ L の DNA が入ったマイクロチューブに使用する緩衝液を 600 μ L 取り入れた。
(緩衝液で 5 倍希釈したことになる)
- 4) 3)で作成した DNA サンプルのマイクロチューブのフタが加熱で開かないようにパラフィルムで巻いた。
- 5) 熱湯と氷水を準備した。
- 6) 4)で作成した試料を熱湯に 5 分間浸し、その後すぐに氷水に 5 分間浸して冷却した。
(完全な一本鎖状態になる。) 測定は、常温に戻ってから使用した。

Table 2-3 使用した PEG 化 BSA

sample	M_w [g/mol]	Supplier (cat#)
PEGylated BSA 12000 Linear	-	-
PEGylated BSA 20000 Linear	-	-
PEGylated BSA 20000 Branched	-	-
PEGylated BSA 30000 Linear	-	-

[PEG 化 BSA の調製] ^[20]

BSA には 35 個のシステイン残基が存在しているが、遊離の SH 基が 1 つ存在しており、その SH 基を選択的に修飾するマレイミド基をもつ活性化 PEG により monoPEG 化 BSA を調製した。

活性化 PEG は NOF(Tokyo, Japan)の以下の異なる分子量の製品を用いた。ME-120MA($M_w = 12000$)、ME-200MA0B($M_w = 20000$)、GL2-200MA($M_w = 20000$)、ME-300MA($M_w = 30000$)。PEG 化反応は 30 mM NaCl を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)に溶解した BSA 溶液(5 mg/mL) と活性化 PEG 溶液を混合し 277K で 24 時間攪拌混合することにより実施した。PEG-BSA モル比は 1 とした。

2.3.2 緩衝液

Table 2-4 使用した試薬

sample	Supplier	Cat No
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Wako	011-20095
NaCl	Wako	191-01665
1 mol/L-HCl	Wako	083-01095

10 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl, pH7.0

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 1.21 g、NaCl 1.75 g を 900 mL の水で溶かし、1 mol/L HCl で pH7.0 に調整後、1L にメスアップした。

10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH7.0

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 1.21 g、NaCl 58.44 g を 900 mL の水で溶かし、1 mol/L HCl で pH7.0 に調整後、1L にメスアップした。

2.3.3 装置

Taylor dispersion method

本研究で用いた実験装置の概略図を Fig.2-8 に示す。装置は、HPLC ポンプ (JASCO, PU-2085)、Injection valve (IDEX, V-450)、UV-detector (JASCO, UV-2075) からなる。UV 検出器にはマイクロフローセル(JASCO,セル容量: 1 μ L)を装着して使用した。恒温槽にインジェクションバルブ、PEEK チューブを入れ、298 \pm 1K となるように温度制御を行った。サンプルループは 5 μ L を使用した。

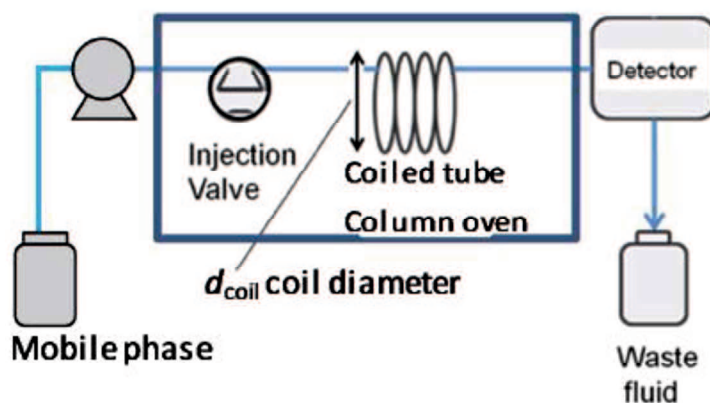


Fig.2-8 実験装置の概略図

Table 2-5 使用したチューブ

内径 d_c [cm]	長さ L [cm]	体積 V_i [μ L]	コイル径 d [cm]	材質
0.05	246.5	0.486	7	Polyetheretherketone (PEEK)

動的光散乱測定 (Dynamic Light Scattering, DLS)

リアルタイムゼータ電位・ナノ粒子径測定装置 DelsaMax Pro (BECKMAN COULTER) を使用した。サンプルキュベットは Semi micro disposable cuvettes, 1.5mL, polystyrene (Sigma, cat no:Z692298)を使用した。

クロマトグラフィー装置

本研究には自動液体クロマトグラフィー実験装置 ÄKTA explorer (GE Healthcare、Uppsala, Sweden) 又は AKTA pure (GE Healthcare、Uppsala, Sweden)を使用した。試料の供給を含め測定用 PC のプログラムに従って全自動で実験を行った。

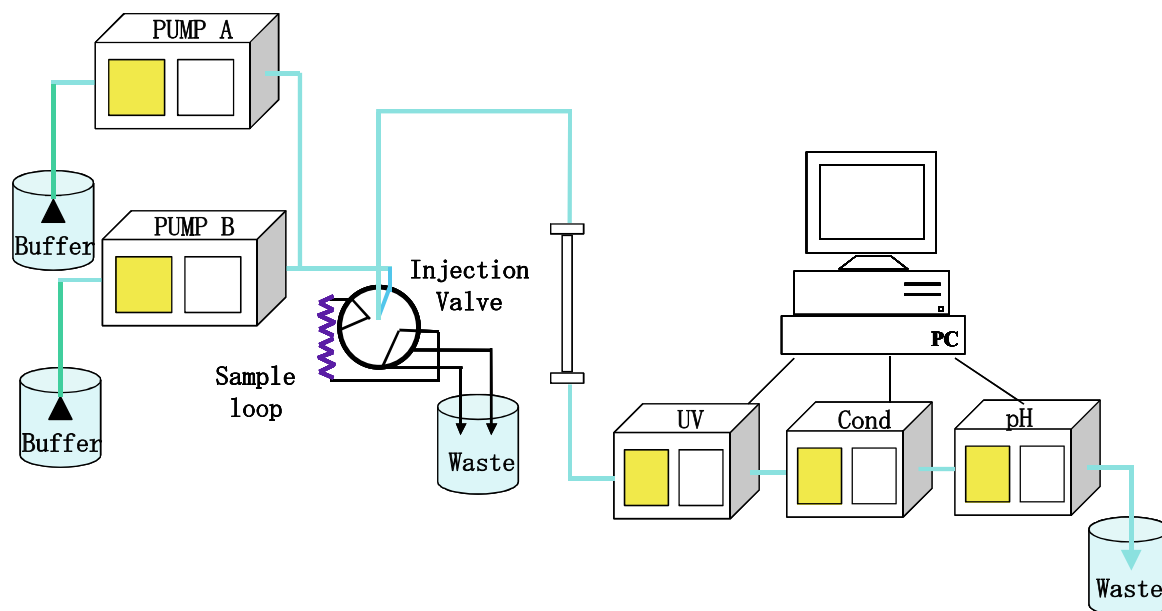


Fig.2-9 クロマトグラフィー実験装置

2.3.4 カラム

Table.2-6 使用充填剤(カラム)

column	Z [cm]	d_c [cm]	d_p [μm]	ϵ [-]	V_t [mL]	Supplier
Q sepharose HP	15.0	0.9	34	0.32	9.5	GE Healthcare
SP sepharose FF	14.2	1.1	90	0.34	13.5	GE Healthcare
TSKgel G3000PW _{XL}	30	0.75	10	0.4	14.3	Tosoh

Z:カラム長さ, d_c :カラムの直径, d_p :粒子径, ϵ :カラム空隙率, V_t :カラム体積

2.3.5 Taylor 法による分子拡散係数 D_m の測定

十分に脱気を行った 14 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.7 で流路を平衡化し、前処理を行った PolyT もしくは 5mg/mL に調製したタンパク質溶液を 5 uL インジェクションした。流速は 0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025 mL/min で行い、検出は DNA(260nm)、タンパク質(280nm)で行った。

2.3.6 動的光散乱法による分子拡散係数 D_m および流体力学的半径 R_h の測定

測定範囲は粒子径として 1 nm~15 μm 、測定時間 1 秒、サンプル容量は 45 μL 、測定塩濃度範囲は 0~50 mS/cm で行った。測定感度はリゾチームで 1 mg/mL であった。

2.3.7 直線勾配溶出と等組成溶出による細孔内拡散係数 D_s の測定

直線勾配溶出実験(LGE)は Table.2-6 に示したイオン交換カラム Q sepharose HP ($V_t=9.5$ mL)を使用した。10 mM Tris-HCl+30 mM NaCl,pH7.0 (bufferA)と 10 mM Tris-HCl+1 M NaCl,pH7.0 (bufferB)を混合することで塩濃度勾配をかけた。非吸着条件における等組成溶出では、bufferB を移動相とし流速 0.1 – 2.0 mL/min における溶出曲線から σ と t_R を決定した。

2.4 結果および考察

2.4.1 PEG 化タンパク質の拡散係数

Table 2-7 に TDA と DLS により求めた 25°C の拡散係数 D_m の値をまとめた。どちらの方法でも、ほぼ同じ値が得られた。PEG 化していない native の BSA の値は文献値 $0.67 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ とほぼ一致した。PEG 化することにより D_m が著しく低下していることがわかる。これは PEG 化による水和半径の増加のためであり^[20,22,23,24,25]、この効果により PEG 化タンパク質医薬品は体内持続時間が延長する。TDA の精度は 2 回繰り返し実験の誤差が 2% 以内であった。ピーク保持時間 t_R の変動は数秒であり、また流速をさらに遅くしても D_m 値に顕著な変化はなかった。DLS については、BSA 濃度 5 g/L、NaCl 濃度 0.03 -0.42 mol/L の平均値を Table 2-7 に示す。BSA 濃度範囲 (1.10 g/L)、塩濃度範囲 (0.03, 0.22, 0.42 mol/L) で測定したところ、 $(0.67 \pm 0.03) \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ の値が得られた。

Table 2-7 D_m values of PEGylated BSA determined by TDA and DLS at 25°C

Sample	$D_m \times 10^{10} \text{ [m}^2/\text{s]}$	
	Taylor dispersion method(TDA)	Dynamic light scattering (DLS)
BSA (native, non-PEGylated)	0.67	0.67
PEGylated BSA 12000 Linear	0.49	0.51
PEGylated BSA 20000 Linear	0.44	0.44
PEGylated BSA 20000 Branched	0.44	0.43
PEGylated BSA 30000 Linear	0.36	0.38

2.4.2 Taylor 法と動的光散乱法のそれぞれの特徴と問題点

ここで使用した 2 種類の方法は、操作は簡単であり、複雑な計算も必要としない。しかしながら、それぞれの方法に固有の問題点がある。DLS の測定精度は装置の性能に大きく依存する。10 年前では、10 nm 以下の粒子の測定は困難であったが、現在は 1 nm 程度までは測定が可能であり、最新の機種では 0.3 nm まで測定可能という仕様もある。この結果、分子量 1 万程度のタンパク質でも測定できる。この理由は、レーザー出力を含めての光学系の改良や、複数の検出器による多角での測定などによる。タンパク質濃度が 1 g/L 以下の測定は精度が低いこと、電導度の上限があるなどの制約もある。

TDA は、溶液の電導度には制約を受けない。また、検出器の工夫により低濃度から高濃度まで測定が可能なので、 D_m の濃度依存性についてもある範囲では測定可能である。

どちらの方法でも拡散係数 D_m を精度よく求まることが明らかとなったが、異なる原理による相補的な測定値を得ることは重要である。とくに DLS のようにセルに試料を

入れてセットするのみで測定する場合、得られた値が信頼できるかどうかの確認は必要である。DLS と異なり、TDA は、hand-made の装置により測定されているが、最近市販品 (Malvern ViscosizerTD) も入手できるようになった。

低分子あるいは比較的分子量が小さなタンパク質の D_m の値は文献値として多く報告されており、信頼できる相関式もある。例えば、低分子ならば Wilke-Chang 式^[12]、タンパク質ならば Young らの相関式^[13] がよく知られている。一方、ここで報告した PEG 化タンパク質のような修飾巨大タンパク質、DNA、バイオナノ粒子などについては文献値も乏しく、信頼できる相関式も存在していない。今後は精度よいデータを収集し、実用的な相関式の確立が望まれる。

DLS は拡散係数の測定に加えて、粒子径すなわち物質の大きさについての情報を得るために使用されるが、さらにタンパク質のコンフォメーションや安定性、タンパク質間の相互作用 (凝集) などの研究にも利用されている^[25]。しかしながら、2.2.2 項でも述べたように装置に組み込まれたソフトで計算をしているので、得られた値をよく吟味する必要があると指摘されている^[25]。

2.4.3 PolyT の流体力学的半径

SEC で求めた PolyT の流体力学的半径 R_h は、分子量 M_w との相関が PEG と同様であり、タンパク質よりも大きい値となった (Fig.2-10)。これはバルク溶液中の PolyT がタンパク質のような折り畳まれた 3 次構造ではないことを意味する。PolyT は PEG と同様に広がったランダムコイル状の構造であると推定された。

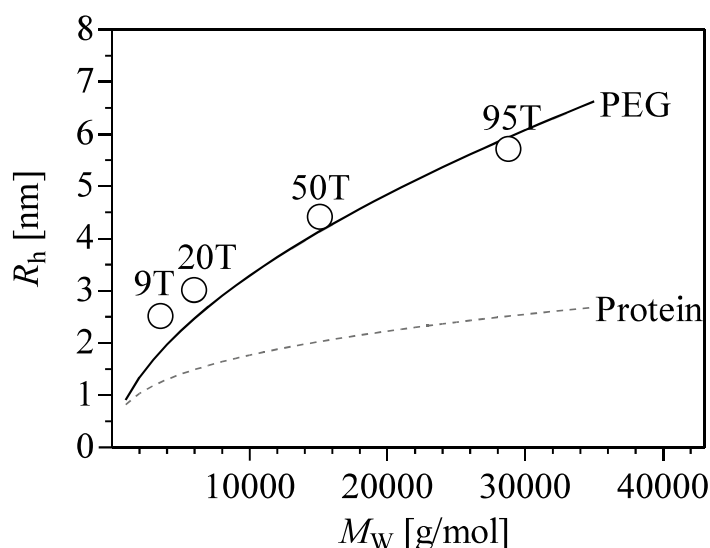


Fig. 2-10 Hydrodynamic radius of PolyT (○), PEG(—) and Protein (---)

2.4.4 陰イオン交換クロマトグラフィーにおける PolyT の保持挙動

陰イオン交換クロマトグラフィーにおける PolyT の保持挙動を直線勾配溶出実験 (LGE) で評価した。Fig.2-11 に示すように PolyT の塩基が多いほど溶出塩濃度 I_R が高くなった。9T の $GH-I_R$ プロット (Fig.2-12) が示すように、規格化した勾配 GH が小さくなるとともに溶出塩濃度 I_R も低くなる。この $GH-I_R$ プロットから PolyT の吸着サイト数 B を決定した (Table 2-8)。大きな PolyT である 50T はこの多孔性樹脂では 3 番目の値であったが、モノリスカラムでは塩基数が 50 未満の場合、吸着サイト数は同じであった^[26]。多孔性微粒子のポアサイズ (30-100nm) とモノリスディスクのポアサイズ (1 μm) は大きく異なる。したがって、この多孔性微粒子における吸着サイト数の著しい減少は、大きな PolyT が細孔内に入れず、多孔性樹脂の全ての吸着サイトを使用できていないことを示唆している。

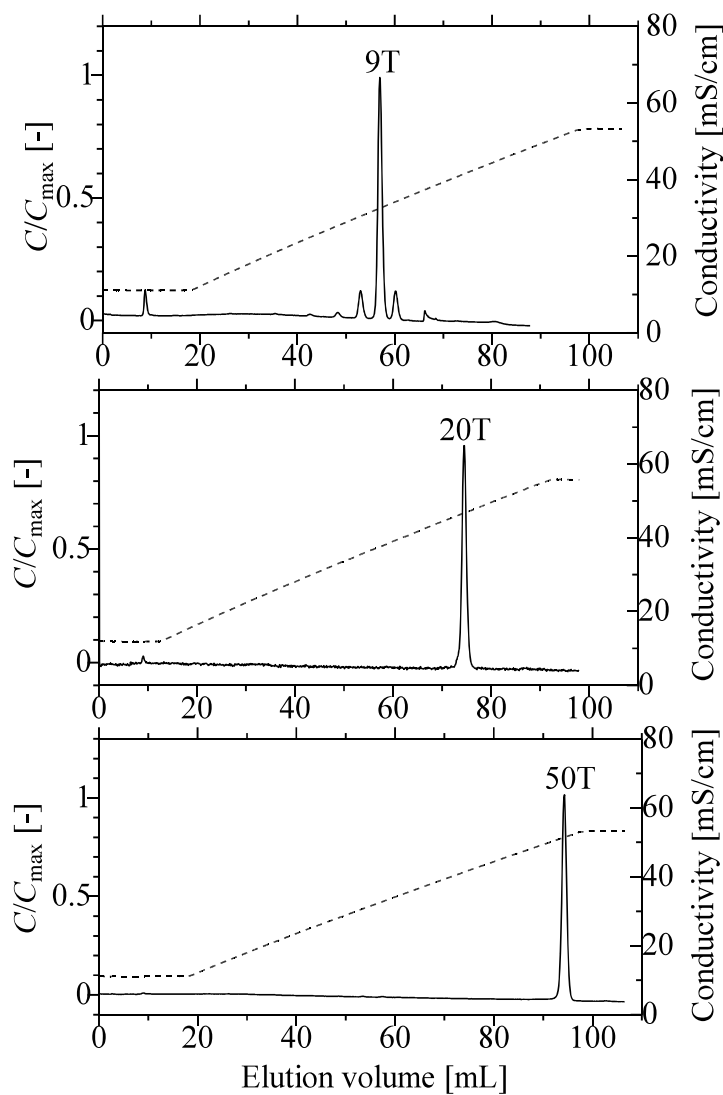


Fig.2-11 Elution curves of PolyT on Q sepharose HP.
(Gradient volume, $V_g=80$ mL, $F=0.4$ mL/min)

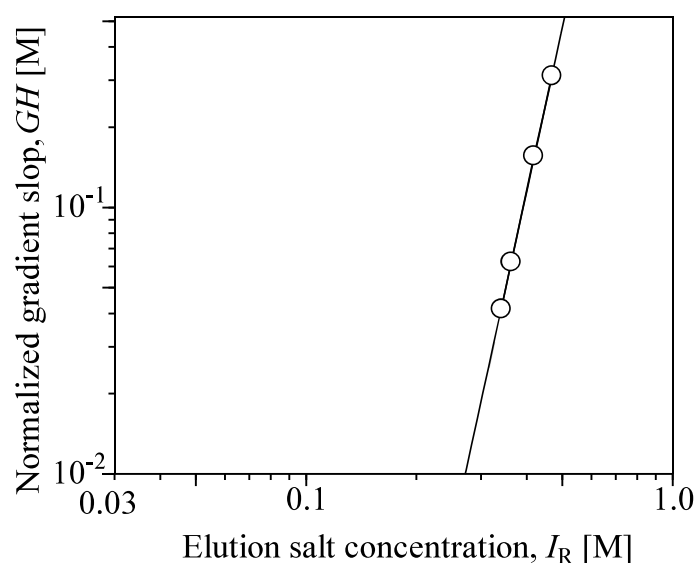


Fig.2-12 $GH-I_R$ plot of 9T on Q sepharose HP

Table 2-8 Number of binding site

	M_w [g/mol]	B [-]
9T	2676	5.3
20T	6022	10.1
50T	15148	15.9

2.4.5 陰イオン交換クロマトグラフィーにおける PolyT の拡散係数

HETP は非吸着条件における等組成溶出では(2-15)式、直線勾配溶出では(2-22)式で決定し、線流速 u に対してプロットした(van Deemter plot, Fig.2-13)。直線勾配溶出における HETP は、非吸着条件の値と比べて小さくなった。これは吸着サイトがカラム内の移動時間、移動距離を短くコントロールしたためだと考えられる。Table 2-9 に示すように非吸着条件における細孔内拡散係数 D_s および分配係数 K は塩基数の増加とともに減少した。しかし、50T ($R_h = 6$ nm)の値は比較的大きなものとなり、BSA($R_h = 3$ nm)とほぼ同じであった。これは細孔内への PolyT の拡散が減少していることを示唆している。直線勾配溶出では、 K_R は非吸着条件と比べて大きく、 D_s はさらに低下した。PolyT は勾配溶出実験において、イオン交換リガンドとの静電的相互作用によってポア内に深く入ることができる。モノリスカラムでは、それらは脱着後に拡散せずにシャープなピークを維持できるが、多孔性微粒子充填剤の場合、ポアサイズが大きいほどピークは広がる。

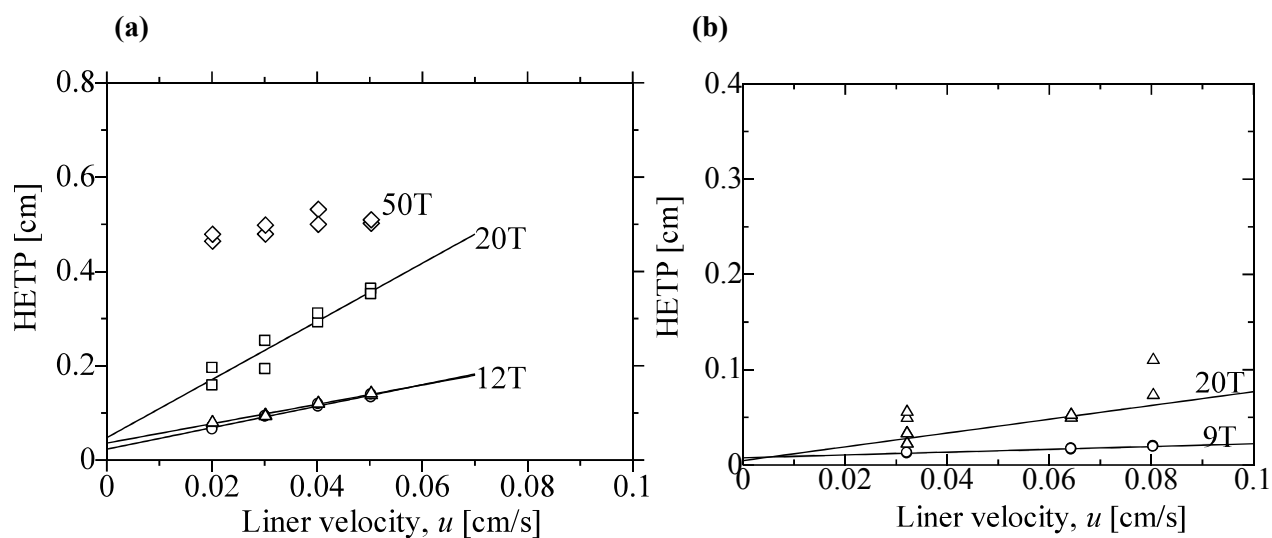


Fig.2-13 Elution peak deviation as a function of flowrate

(a) Elution peaks were obtained by isocratic elution under non-binding condition at 1M NaCl.

(b) Elution peaks were obtained by LGE at $v_g = 80\text{mL}$.

Table 2-9 D_s and K

	Non-binding		LGE	
	$D_s \times 10^{10}$ [m ² /s]	K [-]	$D_s \times 10^{10}$ [m ² /s]	K_R [-]
9T	0.69	0.65	0.59	2.5
20T	0.37	0.62	0.16	1.8
50T	0.19	0.53	N.D.	N.D.

2.5 結言

拡散係数（分子拡散係数あるいは相互拡散係数） D_m は、クロマトグラフィーや乾燥などさまざまな分離操作・装置の設計に必要な重要な物性値である。また、物質の大きさを知るための重要な情報でもある。拡散係数の測定のために、さまざまな方法が開発され使用されているが、とくに分子量の大きいタンパク質やDNA、さらにはバイオナノ粒子の D_m は、ほとんど報告されていない。本研究では、タンパク質および修飾タンパク質（PEG化タンパク質）の D_m を比較的簡単な測定操作と装置が簡便である細管内層流速度分布を利用したTaylor法と動的光散乱法で測定した。どちらの方法でもほぼ同じ D_m 値を得ることができた。ただし、それぞれの方法には特徴と問題点があるので、よく理解して相補的な方法として使用することが望ましい。

また、一本鎖DNAの9~95-mer polyTをモデル分子として得られた分子拡散係数 D_m 、陰イオン交換クロマト担体における細孔内拡散係数 D_s 、吸着サイト数などのデータに基づき、巨大バイオ分子の拡散係数がクロマトグラフィー分離吸着性能に与える影響について考察した。球状タンパク質の拡散係数 D_m は、Youngらの式で示されるように分子量の0.33乗に反比例して減少するが、polyTの分子拡散係数 D_m は球状タンパク質と比べて小さく、polyethylene glycol (PEG)と同様に分子量の0.6乗に反比例して減少した。

バルク溶液中のpolyTはタンパク質のような折り畳まれた3次構造ではなく、PEGと同様に広がったランダムコイル状の構造であると推定された。アガロースベースのクロマト担体であるSepharoseにおける細孔内拡散係数 D_s の値は、分子拡散係数 D_m よりさらに低下し、吸着サイト数が大きなpolyTほど溶出ピーク幅が広がったため、細孔内への拡散が著しく阻害されていることが示唆された。以上の結果から、拡散係数が小さい巨大バイオ分子のクロマトグラフィー分離は、ポアが小さな多孔性微粒子充填カラムでは困難であり、比較的大きな貫通孔をもつモノリスカラムが有効であると考えられた。

第3章 巨大バイオ分子のモノリスクロマトグラフィーにおけるポアサイズの分離特性への影響

3.1 緒言

クロマトグラフィーにおけるモノリスカラムは、分離科学の広い分野で最適な基材である^[7, 27-32]。一体構造で、貫通孔が無数のネットワークを形成しており、使用する用途に合わせて空隙率やポアサイズを調整することも可能である。ほとんどのモノリス基材は、様々な形状や体積で作製できるため、分析分離だけでなく、プラスミド DNA やウイルスなどの巨大バイオ分子の製造にも使用できる^[33-36]。モノリスの多孔質構造は、移動相が細孔内全体に流れるように分岐した貫通孔からなる。巨大バイオ分子やナノ分子の会合体によって流れが閉塞されないようにモノリスカラムの貫通孔（ポアサイズ）は適切な大きさである必要がある^[37]。

このため、特定の用途に適切なポアサイズのモノリス基材を使用することが重要である。大きなポアサイズのモノリスはクロマトグラフィーにおいて低い圧力損失をもたらす、製造では特に重要である。一方、ポアサイズが大きいと、表面積が減少するため、動的結合量(Dynamic Binding Capacity : DBC)が低下する^[38]。多孔性微粒子充填剤の場合、巨大バイオ分子の DBC は、細孔内拡散が低下するため分子量が増加すると急激に低下するが、モノリスディスクでは分子量（サイズ）とともに増加することがすでに報告されている^[39]。

クロマトグラフィー用のモノリス基材においてもう1つの重要で興味深い特徴としては、その形状である。処理量、動的結合量、圧力損失に高い柔軟性をもたせるため、ほとんどの大容量モノリス基材はラジアルフローチューブ型の形状をとる。対流に基づく輸送メカニズムのため、流速依存のない分離と結合量が保たれる。

本研究では、ポアサイズの異なるイオン交換モノリスチューブの分離特性について調査した。異なるポアサイズ(1.5、2、6 μm)のチューブについて、圧力損失、吸着サイト数、ピーク幅、動的吸着量を測定した。イオン交換基としては陰イオン(QA および DEAE)、陽イオン(SO₃)を使用した。モデルバイオ分子としては、オリゴヌクレオチド(PolyT)、3つの塩基性タンパク質(Lysozyme、Ribonuclease、Cytochrome C)および2つの酸性タンパク質(BSA、Thyroglobulin)を用いた。

3.2 理論

3.2.1 多重細管流れモデル

粒子層内の流れは、Fig.3-1 に示すように管内の流れとは異なって非常に複雑であり、粒子の間を曲がりくねりながら進む。Kozeny はこのような流れを取り扱うのに、粒子層が毛細管の束からなると考えて管内流動の式を適用した。

毛細管直径 D_e 、長さ Z_e 、管内流速を u_{0e} とすると以下の(3-1)式が成り立つ。

$$P_0 - P_L = \Delta P = \frac{8\mu Z \langle u \rangle}{r_0^2} = \frac{32\mu Z \langle u \rangle}{D^2} \quad (3-1)$$

$$u_{0e} = \frac{D_e^2 \Delta P}{32\mu Z_e} \quad (3-2)$$

μ は粒子層を通過する流体の粘度[Pa・s]、 Z は粒子層長さ[m]、 D は粒子層内径[m]である。ここで粒子層の断面積を A 、層厚さを L とすれば、 D_e は管内流れにおける相当直径の考え方より以下の(3-3)式のようになる。

$$\begin{aligned} D_e &= 4 \frac{(\text{毛細管の断面積}) \times (\text{管長})}{(\text{毛細管のぬれ周辺長}) \times (\text{管長})} = 4 \frac{(\text{粒子層の空隙体積})}{(\text{層内粒子の全表面積})} \\ &= 4 \frac{AL \varepsilon}{AL(1-\varepsilon)S_v} = \frac{4\varepsilon}{(1-\varepsilon)S_v} \end{aligned} \quad (3-3)$$

また粒子層内の流体の滞留時間を考えると、次式が成立する。

$$\frac{L_e}{u_{0e}} = \frac{L}{u_0/\varepsilon} \quad (3-4)$$

u_0 は流体の空塔速度、 ε は空隙率(m^3 空間体積/ m^3 層体積)である。(3-3)、(3-4)式を(3-2)式に代入すると、次の Kozeny-carman 式 (3-5) が得られる。

$$u = \frac{\varepsilon^3}{kS_v^2(1-\varepsilon)^2} \frac{\Delta P}{\mu L} \quad (3-5)$$

ここで、 k を Kozeny 定数といい $k=2(L_e/L)$ である。粒子層において、 $k=5$ とおくことができる。また S_v は粒子の単位体積当たりの表面積であり、次式(3-6)で与えられる。

$$S_v = \frac{\phi}{d_p^2} \quad (3-6)$$

ϕ は粒子の形状を表す係数で、球形粒子では 6 となる。また(3-6)式中の d_p は平均径の一種であり表面積平均径である。(3-5)式に(3-6)式、 $k=5$ を代入すると、以下の(3-7)式を得られる。

$$\begin{aligned} u_0 &= \frac{dp^2 \varepsilon^3}{180\mu L(1-\varepsilon)^2} \Delta P \\ \Delta P &= \frac{180\mu L}{dp^2} \frac{(1-\varepsilon)^2}{\varepsilon^3} u_0 \end{aligned} \quad (3-7)$$

ここで相体積比 $H = \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}$ 、 $\frac{u_0}{\varepsilon} = u$ (移動相線速度) とすると、以下の(3-8)式が得られる。

$$\Delta P = \frac{180\mu LH^2}{dp^2} u \quad (3-8)$$

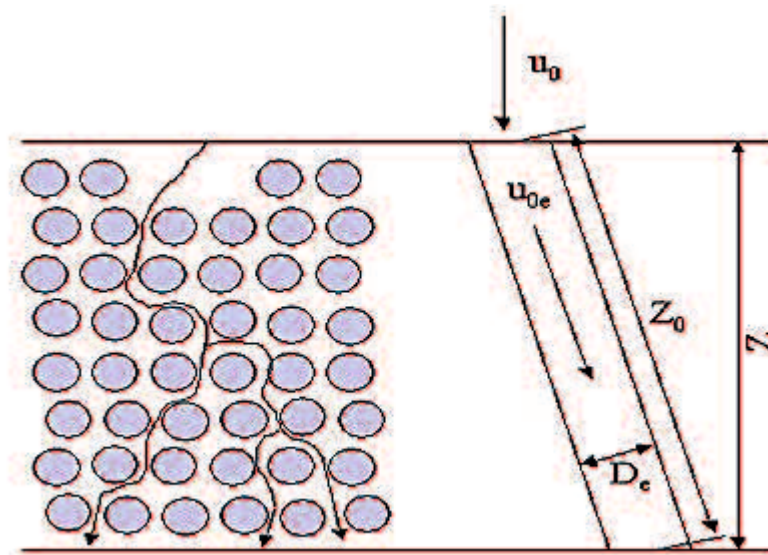


Fig.3-1 粒子層内流れモデル

3.2.2 動的吸着容量の算出

吸着剤を充填した塔(充填塔あるいは固定相)の上部から目的溶質(濃度 C_0)を含む流体を一定流速で供給し続けると、最初は目的溶質は固定層上部のごく一部の吸着剤に吸着される。この吸着量が C_0 に平衡な吸着量 C_s になると、それ以上吸着することはない。つづいて、その下部の吸着剤に溶質は吸着されていく。このように、層内部では吸着帯(圏)が形成されて移動していくとともに、吸着帯がひろがっていき、最後には層出口へ到達する(Fig.3-2)。この層出口における溶質濃度の時間あるいは液量との関係を破過曲線(Fig.3-3)という。破過曲線の形状はどのカラムにおいても無次元濃度 $X=C/C_0$ に近づくにつれて緩やかになる傾向がある。液体クロマトグラフィーの分離・精製において、カラムに試料を破過点(動的吸着量)まで供給を行い、脱着操作を行う。一般に無次元濃度 $X=0.1$ になった点を破過点とし、破過点での試料供給量を破過体積 V_B とし、動的吸着量 DBC を(3-9) 式により算出する。また、 $X=0.55\sim 0.6$ になった点を V_C とし、静的吸着量 SBC を(3-10) 式により算出する。

$$DBC = \frac{C_0 \times V_B}{V_t} \quad (3-9)$$

$$SBC = \frac{C_0 \times V_C}{V_t} \quad (3-10)$$

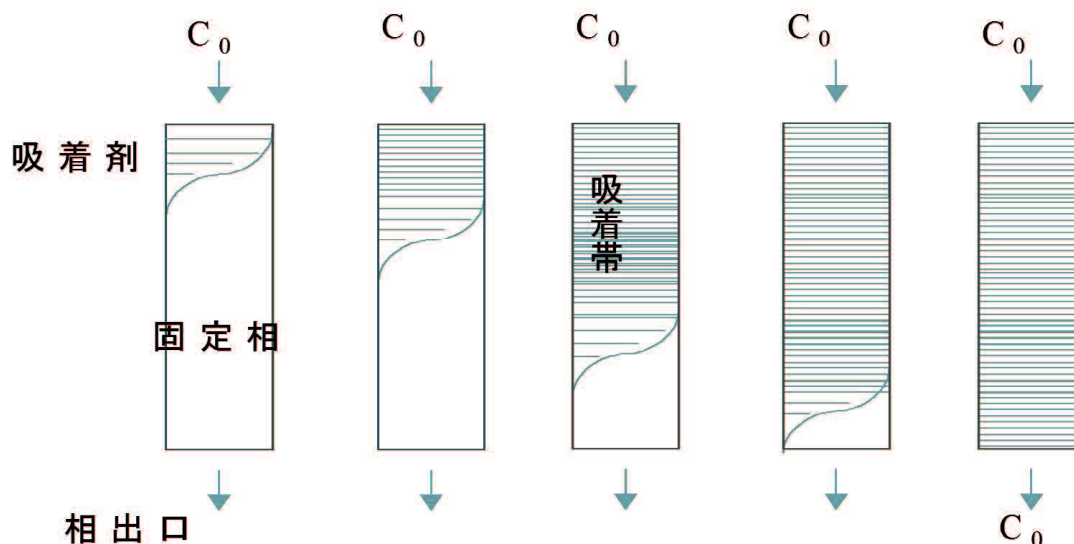


Fig.3-2 固定相内容質濃度分布

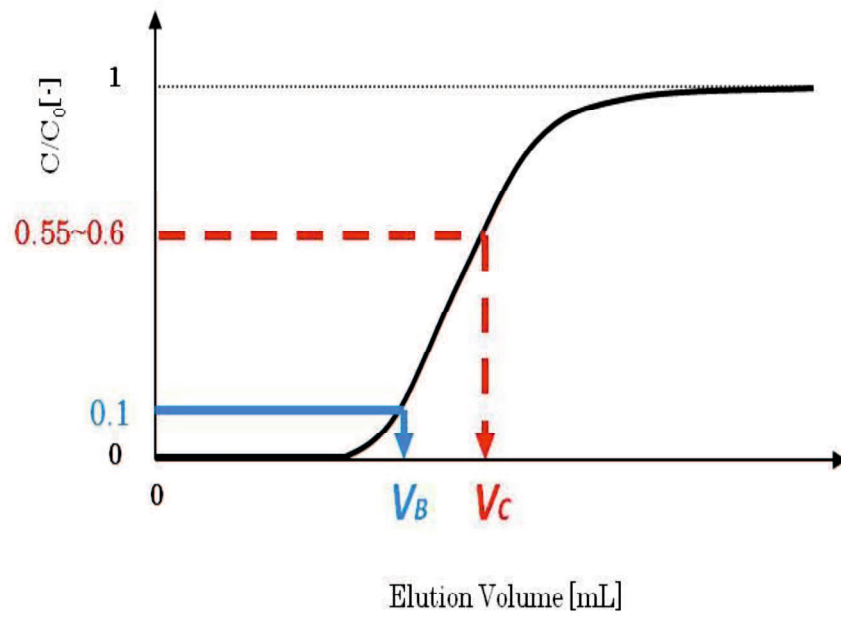


Fig.3-3 破過曲線

3.3 モノリスカラムとは

従来の多孔性微粒子充填カラム(Fig.3-4)が、樹脂に無数の細孔（100 nm 程度）が存在し、細孔内への拡散が分離性能を支配する。巨大バイオ分子は、分子拡散係数や細孔内拡散が著しく低下するため、細孔内に分子を十分拡散させるためには、流速を遅くする必要があり、このため、巨大バイオ分子のクロマト精製プロセスは長時間のプロセスとなる場合が多く、生産性が悪い。

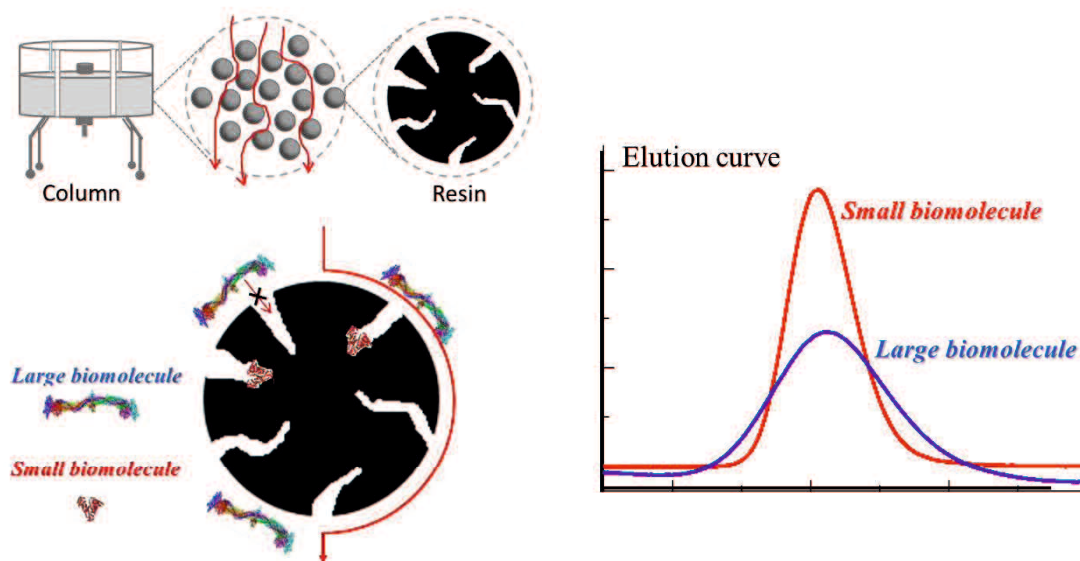


Fig.3-4 多孔性微粒子充填剤カラム

一方、モノリスカラム(Fig.3-5)は一体構造で、比較的大きな貫通孔が無数のネットワークを形成している。物質移動が速いため、分離能や吸着容量が流速による影響を受けることが無い。このため、高流速で短時間のプロセスを構築することが可能である。

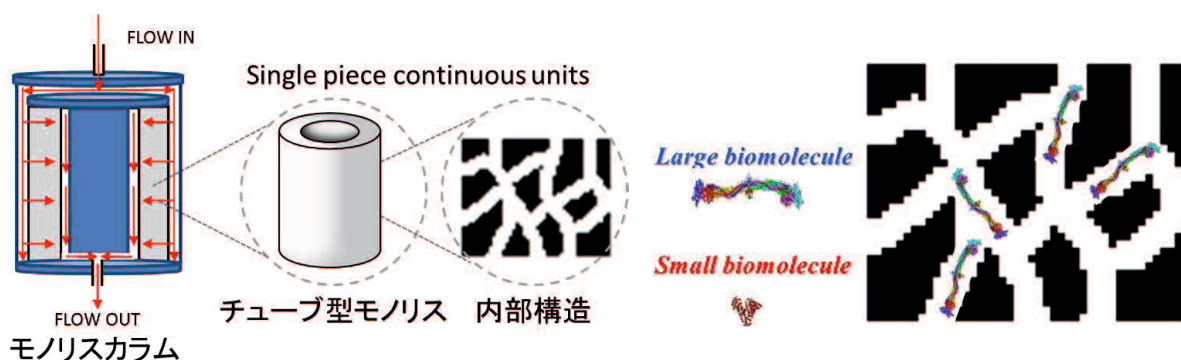


Fig.3-5 モノリスカラム

小容量のモノリスカラムは Fig.3-6(左)に示すように Disk 型の形状をしている。この形状のままスケールアップを図るとすれば、断面積を増大するしかなく、メディアはそれにともない大きく薄い円板状になる。このようなスケールアップでは、良好なクロマトグラフィーの基本である送液の均一分布が困難になるほか、精製現場における設置スペースの増加などの面からも好ましくない。

そこで、担体を円筒状に整形し、専用ハウジングに収めることで、ラジアルフローとすることにより、大流量における低い圧力損失と安定した液分布となるように設計されている Fig.3-6(右)。

現在、医薬品の GMP 製造用に使用できるモノリスカラムとしては、BIA separations 社の CIM シリーズが販売されており、80~8000 mL のものが入手可能である。

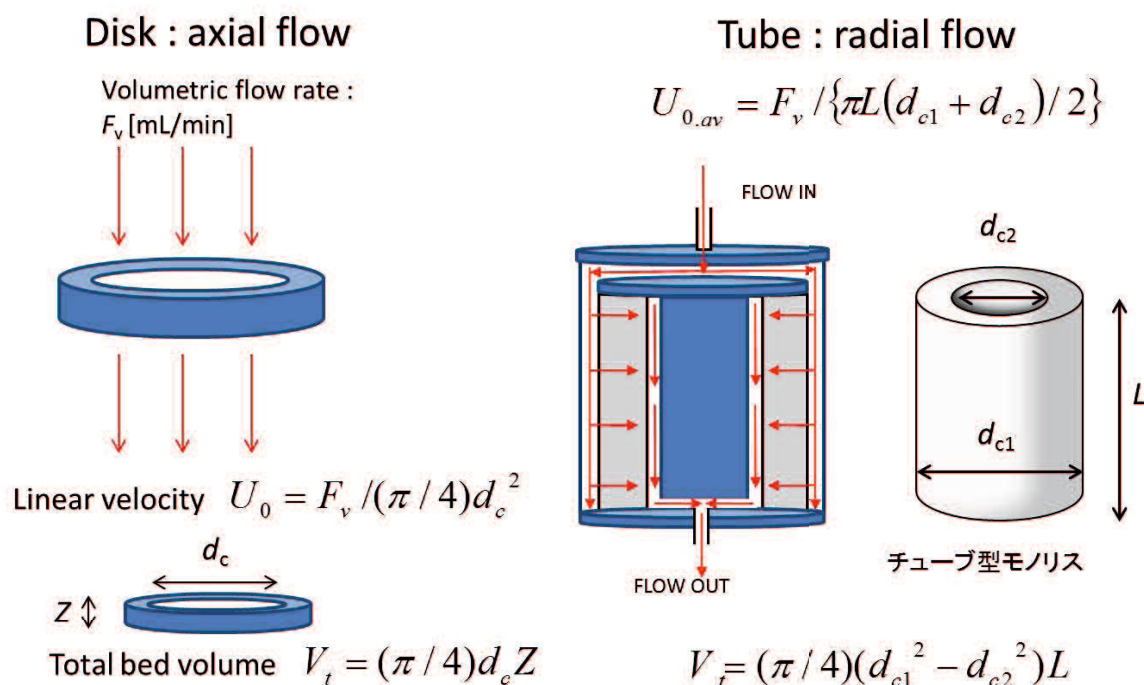


Fig.3-6 Disk 型モノリス (左) と Tube 型モノリス (右)

3.4 実験

3.4.1 カラム

Table.3-1 使用充填剤(カラム)

column	Pore size [μm]	d_{c1} [mm]	d_{c2} [mm]	Z [mm]	ε [-]	V_t [mL]	Supplier
CIMmultus QA	1.5	18.6	6.7	4.2	0.6	1.0	BIA Separations
	2						
	6						
CIMmultus DEAE	1.5	18.6	6.7	4.2	0.6	1.0	BIA Separations
	2						
	6						
CIMmultus EDA	1.5	18.6	6.7	4.2	0.6	1.0	BIA Separations
	2						
	6						
CIMmultus SO3	1.5	18.6	6.7	4.2	0.6	1.0	BIA Separations
	2						
	6						

d_{c1} : outer diameter, d_{c2} : inner diameter, Z : length ε : カラム空隙率, V_t : カラム体積

3.4.2 試薬

Table 3-2 使用した DNA、タンパク質

sample	MW [g/g-mol]	p.I	Supplier	Cat No
Oligonucleotide, 20mer polyT	6022	-	Tsukuba Oligo Service	-
Ribonuclease A	13700	9.6	SIGMA-Aldrich	R4875
Cytochrome C	12300	10.5	SIGMA-Aldrich	C2506
lysozyme	14300	10.5	SIGMA-Aldrich	R4919
Bovine Serum Albumi	66000	4.8	SIGMA-Aldrich	A7030
Thyroglobulin from Bovine thyroid	669000	4.5	SIGMA-Aldrich	T1001

3.4.3 クロマトグラフィー装置

クロマトグラフィー実験は自動液体クロマト装置 AKTA Pure 25 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)を使用した。デッドボリュームを最小限にするため、配管は可能な限り短くした。

3.4.4 圧力損失の測定

圧力損失は AKTA システムで測定した。あらかじめモノリスカラムを接続しない状態での各流速の圧力を測定し、モノリスカラムを接続した状態での各流速の圧力から差し引くことで、モノリスチューブの圧力損失(= pressure drop measured— pressure drop without the tube)を決定した。

3.4.5 pH transient の測定

pH transient 曲線は Lendero ら^[40]が開発した方法で測定した。DEAE カラムの場合、buffer A は 20 mM phosphate で buffer B は 500 mM phosphate (pH=6.4)を使用した。一方、QA カラムの場合、buffer A は 20 mM phosphate で buffer B は 20 mM phosphate + 1 M NaCl (pH6.3)を使用した。

buffer A でカラムを平衡化した後、buffer B にステップワイズで切り替えて、pH の値をオンライン pH 検出器で連続的に記録した。全ての実験において流速は 10 mL/min,で行った。

3.4.6 直線勾配溶出実験による吸着サイト数およびピーク幅の決定

吸着サイト数 B および HETP の値は Yamamoto ら^[21, 26, 41]によって開発された直線勾配溶出実験(LGE)によって決定した。詳細は第 2 章の 2.2.4 項に示した。

QA および EDA 1 mL Tube モノリスによる polyT を使用した実験では、buffer A として 14 mM Tris-HCl + 0.03 M NaCl (pH7.7)を用い、buffer B として 14 mM Tris-HCl + 2.0 M NaCl (pH7.7)を使用した。

SO3 1 mL Tube モノリスによる塩基性タンパク質(Ribonuclease A, Cytochrome C, Lysozyme)を使用した実験では、buffer A として 20 mM citrate または 20 mM phosphate を用い、buffer B として 20 mM citrate + 1 M NaCl または 20 mM phosphate + 1 M NaCl を使用し、各 pH で実験を行った。

タンパク質を buffer A に 1 mg/mL となるように溶解し、30 μ L 注入した。その後、NaCl 濃度を 10 mL/min の流速で直線的に増加させた。グラジエントボリュームは 10~130 CV の間で変化させた。吸光度 254 nm(DNA)、280 nm(protein)および導電率をモニターし、ピークの溶出塩濃度 I_R を決定した。

3.4.7 動的吸着容量の決定

BSA または Thyroglobulin の DBC をポアサイズの異なる QA 1mL Tube monolith (1.5, 2, 6 μ m)で測定した。binding buffer 10 mM Tris-HCl+30 mM NaCl, pH7.0 でカラムを平衡化し、同じ buffer で溶解した BSA または Thyroglobulin ($C_0=1$ mg/mL)を流速 3 mL/min でアプラインした。280nm の吸光度をモニターし、元の濃度の 10%のサンプルがカラムから漏れ出した点 V_B から DBC を算出した。

3.5 結果

3.5.1 圧力損失

モノリスカラムによるクロマトグラフィーを行う際、移動相はモノリス内に形成された分岐した貫通孔を通して流れる。貫通孔の壁面と移動相の間に摩擦が生じるため、圧力損失が生じ、ポアサイズに関する情報だけでなくモノリス細孔の構造といった洞察も得ることができる^[42-43]。異なるポアサイズのメタクリレートモノリスは同様の多孔性構造を持つので、圧力損失の差は、表面積および動的吸着量の変化を反映する^[38]。このような簡便な方法であるため、圧力損失の測定はモノリスカラムの特性を評価するに高速かつ信頼性の高い方法として使用できる^[44]。Fig.3-7 にポアサイズの異なる 1 mL チューブモノリスにおける圧力損失測定結果を示す。

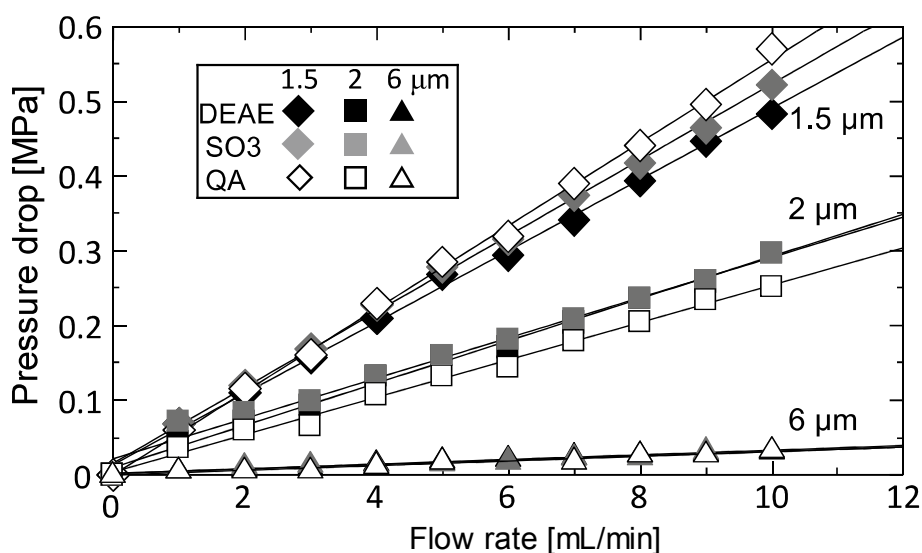


Fig 3-7 Pressure drop of monolithic tube as a function of flow rate for different pore size and functionality. The fitted curves are as follows.

DEAE: 1.5 μm ; $y = 0.056x$, $r^2 = 0.999$, 2 μm ; $y = 0.030x$, $r^2 = 0.996$, 6 μm ; $y = 0.0033x$, $r^2 = 0.992$
 SO3 : 1.5 μm ; $y = 0.053x$, $r^2 = 0.998$, 2 μm ; $y = 0.030x$, $r^2 = 0.987$, 6 μm ; $y = 0.0033x$, $r^2 = 0.975$
 QA : 1.5 μm ; $y = 0.050x$, $r^2 = 0.998$, 2 μm ; $y = 0.026x$, $r^2 = 0.997$, 6 μm ; $y = 0.0033x$, $r^2 = 0.981$

同じポアサイズを持つモノリスカラムは、リガンド依存せず同様の圧力損失勾配を形成した。これは、圧力損失がモノリス構造によって決定され、リガンドの影響を受けない事を意味する。どのポアサイズにおいても、圧力損失と流速は良い相関を示し、モノリスカラムの圧縮なども生じていないことが確認された。

メタクリレートモノリスの均一な多孔性のため、圧力損失はポアサイズの2乗に反比例する。これは pressure-flow 曲線の傾きで定義される。

多重細管流モデル^[45]に基づいてモノリスの圧力損失について考えてみる。キャピラリーチューブ(diameter d_c and length Z)における層流条件下での圧力損失 Δp は(3-11)式で与えられる。

$$\Delta p = 32\mu Z d_c^{-2} u \quad (3-11)$$

ここで、 μ は液体の粘度、 u は チューブ内の線速度である。モノリスが細管の束(細管の数= n)から成る場合、空隙体積 V_0 は平均有効管長さ L とともに(3-12)式で与えられる。

$$V_0 = n(\pi d_{\text{pore}}^2 / 4)L \quad (3-12)$$

体積あたりの有効総表面積 S_v は、

$$S_v = n(\pi d_{\text{pore}} L) / V_t \quad (3-13)$$

V_t はモノリスの総体積で、空隙率は $\varepsilon = V_0 / V_t$ で表される。よって(3-13)式は

$$S_v = n(\pi d_{\text{pore}} L) / V_t = (4/d_{\text{pore}}) / (V_0 / V_t) = 4\varepsilon / d_{\text{pore}} \quad (3-14)$$

となり、水力相当半径 $R_h = \text{volume available for flow} / \text{total wetted surface}$ で与えられる。

$$R_h = d_{\text{pore}} / 4 \quad (3-15)$$

圧力損失は(3-11)式と(3-15)式から(3-16)式で表される。

$$\Delta p = C_1 \mu Z R_h^{-2} u = C_2 \mu Z d_{\text{pore}}^{-2} (F_v / A_c \varepsilon) \quad (3-16)$$

ここで、 C_1 と C_2 は比例定数、 F_v は体積流量、 A_c は断面積である。

(3-16)式はポアサイズが異なるモノリスの空隙率 ε が同じである場合、圧力損失 Δp がポアサイズ d_{pore} の2乗に反比例することを表している。Pressure-Flow 曲線の傾きの平均値は、 $d_{\text{pore}} = 1.5 \mu\text{m}$ では 0.053、 $d_{\text{pore}} = 2 \mu\text{m}$ では 0.029、 $d_{\text{pore}} = 6 \mu\text{m}$ では 0.0033 である。

ポアサイズ 1.5 μm と 2 μm の勾配の比は 0.053/0.029=1.83 であり、理論比 $(2/1.5)^2 = 1.78$ とよく一致する。同様に 2 μm と 6 μm の勾配の比は 0.029/0.0033=8.78 であり、理論比

(6/2)²=9 とよく一致する。したがって、圧力損失データはモノリスのポアサイズと一致したと結論づけることができる。

3.5.2 pH transient curve

ポアサイズが異なるモノリスカラムの官能基やリガンド密度を評価するため、pH transient の測定を行った。この方法は、同じ pH で塩濃度が異なる 2 種類の緩衝液を使用して、モノリス細孔表面に固定化されたイオン交換基を滴定する方法である。緩衝液をステップワイズで変化させると、pH が一時的に変化し、その持続時間はモノリス表面の官能基の量に依存する（イオン交換容量）^[40, 46-49]。QA および DEAE モノリスカラムの pH transient curve を Fig3-8 に示す。

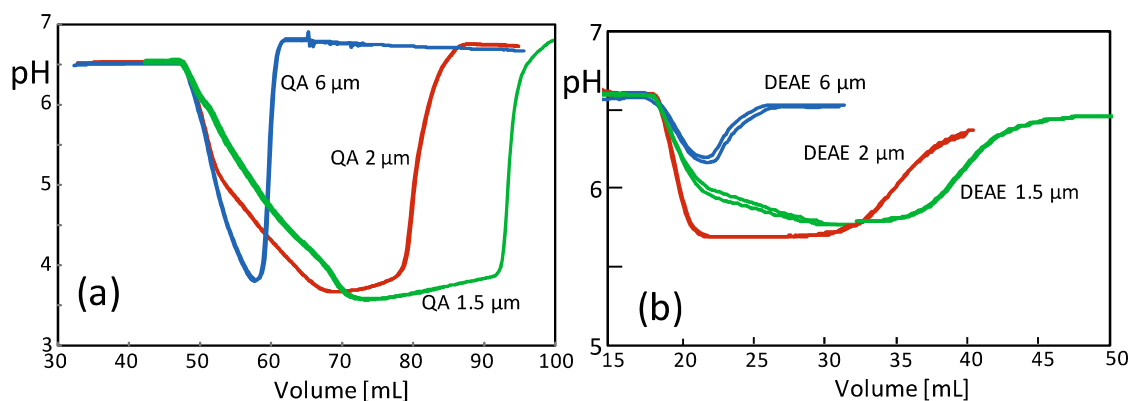


Fig 3-8 pH transient curves for 1mL (a) QA and (b) DEAE monolithic tubes of different pore size (1.5, 2, 6 μm), Duplicated measurements were carried out.

pH transient curve は QA および DEAE どちらにおいても、ポアサイズと相関した。また、非常に再現性が高かった。pH の一時的な変化が緩衝液の pH に戻るまでに必要な時間は、同じ構造のカラムの場合はリガンド密度に比例することが知られている。モノリスの表面積は、ポアサイズによって変化する。リガンドと分子の相互作用の強さは、リガンドの総量ではなく、リガンド密度によってきまる。それゆえ、pH transient curve が利用可能な表面積で規格化されれば、より正確な分析を行う事が可能となる。利用可能な表面積は、メタクリレートモノリスのポアサイズに反比例することが分かっており、6 μm のポアサイズの表面積は、2 μm および 1.5 μm のポアサイズと比較してそれぞれ 3 倍および 4 倍小さい。Fig3-6 から、QA Tube の pH 変化は、6 μm では約 12 mL、2 μm では約 33 mL、1.5 μm では約 46 mL と推定される。カラムが同じリガンド密度を有する場合、ポアサイズと pH transient duration volume の積は等しくなるはずである。実験データからの計算値は、72、66、69 であった。従って、試験した全てのモノリスのリガンド密度は類似していることが分かった。DEAE Tube についても同様に、実験データか

ら算出した値は、30 (=5×6)、34 (=17×2)、36 (=24×1.5)であった。

3.5.3 吸着サイト数

ポアサイズが異なるモノリスカラムのリガンド密度が同様であるため、荷電したバイオ分子とリガンドとの結合サイト数は類似しているはずである。これを確認するため、各ポアサイズのモノリスを使用して直線勾配溶出実験を行い、吸着サイト数を算出した^[10, 50, 51]。QA Tube における polyT 20mer の GH-IR 曲線を Fig3-9 に示す。

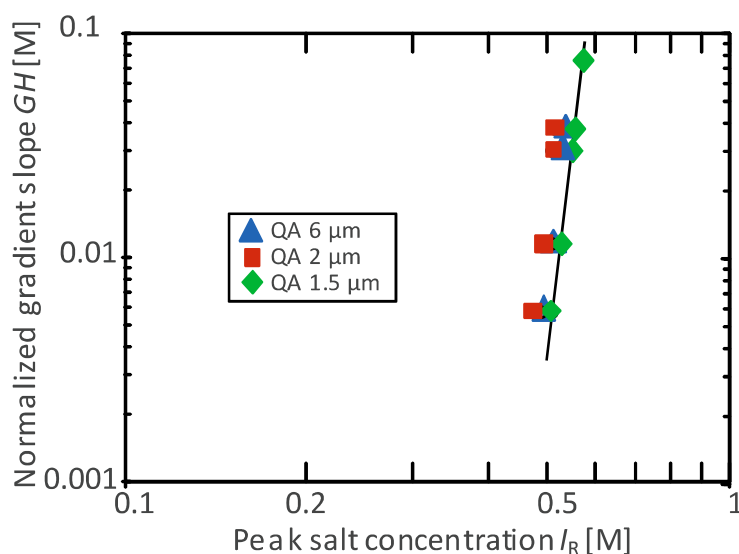


Fig 3-9 GH-IR curves of polyT (20mer) for 1 mL QA monolithic tubes with pore sizes of 1.5, 2 and 6 μm .

ポアサイズの異なる3種類のモノリスにおいて、 $GH-I_R$ 曲線が非常に類似していることが分かる。この結果から算出された吸着サイト数 B の値は 20.6 ± 0.7 であり、PolyT 20mer の全電荷の値に近い。ディスク型クロマトグラフィーの値もまた 20 に近かった^[21, 26, 41]。

また、異なるポアサイズの SO₃ チューブモノリスにおける塩基性タンパク質についても評価された。この場合、各 pH の緩衝液における3つの塩基性タンパク質 (Ribonuclease A, Cytochrome C, Lysozyme) の結合サイト数 B を評価した。結果を Fig3-10 に示す。 B 値が多少ばらついたが、傾向が同じであり有意差はないと考えられた。これらの結果、ポアサイズが異なる全てのモノリスカラムは同様に機能すると結論付けることができる。

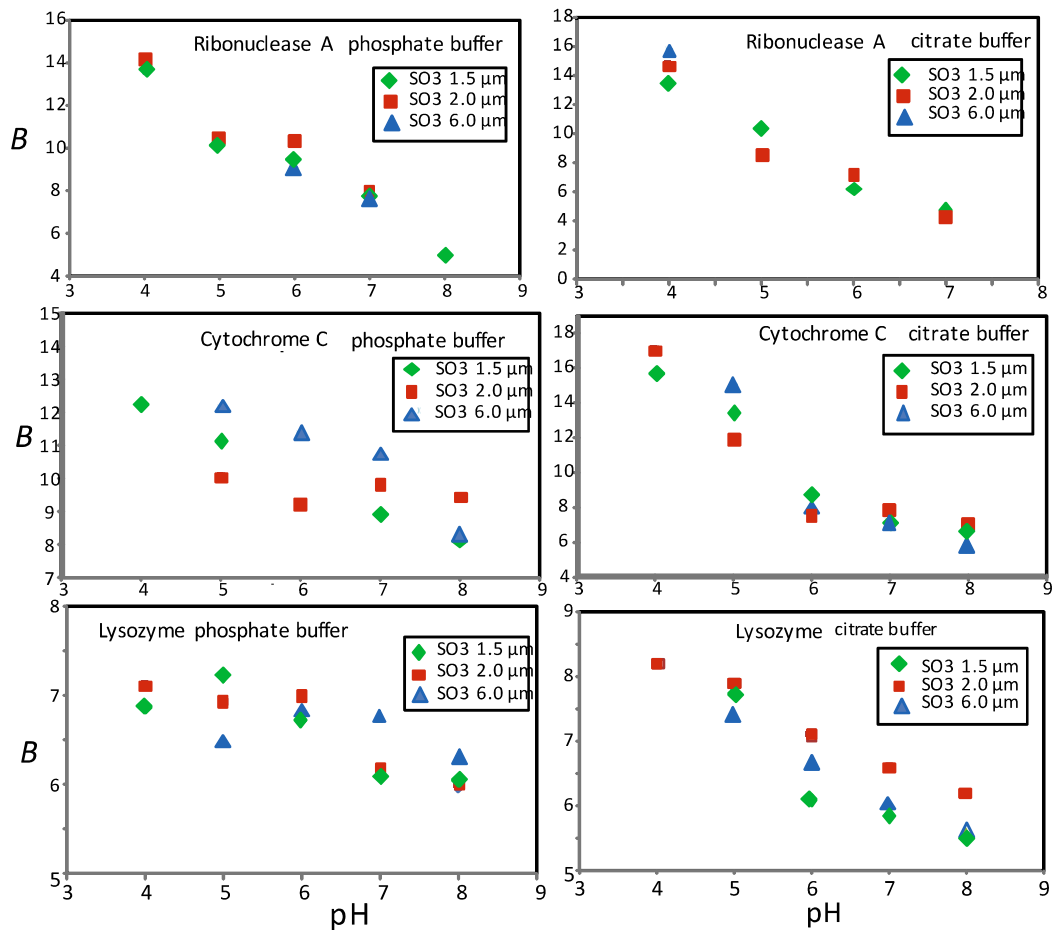


Fig 3-10 The number of binding sites B of ribonuclease A, cytochrome C and lysozyme for SO3 monolith tube of different pore sizes as a function of pH. Two different buffers (citrate or phosphate)

3.5.4 動的吸着量

動的吸着量(DBC)は、クロマトグラフィーカラムの重要な特性の1つである。多孔性微粒子クロマトグラフィーにおいて、巨大バイオ分子やDNAのDBCは流速の増加に伴って減少する。しかし、モノリスクロマトグラフィーではDBCは流速に依存しない。Fig3-11に異なるポアサイズのQA Tube monolithでのタンパク質のDBCを示す。タンパク質の密度が一定であると仮定すると、DBCは分子量の増加とともに増加した。これは表面に吸着したタンパク質の質量がタンパク質分子の R_h に比例するためである^[52]。密

度が一定であると仮定すると、より小さいタンパク質は一般的に密度が高いため^[53]、単純すぎるが、それでも DBC の推定が可能となる。そこで、次式が導かれる (D_1, D_2, D_3 は比例定数)。

$$DBC = D_1 (4\pi/3)r_h^3/\pi r_h^2 = D_2 r_h = D_3 M_w^{1/3} \quad (3-17)$$

これは、タンパク質が球状であると仮定すると、吸着量は $M_w^{1/3}$ に比例することを意味している。(DBC of Thyroglobulin / DBC of BSA)を計算してみると、6 μm では 1.7 (=8.6/5.1)、2 μm では 1.9 (=25.2/13.5)、1.5 μm では 2.1 (=34.3/16.7)であった。

DBC の正確な予測のために、既知のタンパク質の分子量 M_w および流体力学的半径 R_h とともに密度 ρ を考慮することも可能である。

$$DBC = D_4\rho (4\pi/3)r_h^3/\pi r_h^2 = D_5\rho r_h = D_6\rho^{2/3}M_w^{1/3} \quad (3-18)$$

DBC の比率のみに関心があるので、(3-19)式で計算される。

$$DBC_1/DBC_2 = (\rho_1/\rho_2)^{2/3}(M_{w1}/M_{w2})^{1/3} \quad (3-19)$$

タンパク質の密度は分子量 M_w より、約 1.22-1.44 g/cm^3 ^[53]であり、 $(\rho_1/\rho_2)^{2/3}$ の値は 1.0 - 1.11(=1.44/1.22)^{2/3})で変化する。これは、密度を一定と仮定することで最大 10%の誤差を生じることを意味する。

(3-14)式はモノリスの空隙体積が実験的に確認されたものと同じである場合、DBC は表面積 S_v ひいてはポアサイズに反比例することを示している。この比(DBC for 2 μm /DBC for 6 μm)は BSA では 2.7(=13.5/5.1)、Thyroglobulin では 2.9(=25.2/8.6)となった(理論値=6/2=3)。(DBC for 1.5 μm /DBC for 6 μm)は BSA では 3.3(=16.7/5.1)、Thyroglobulin では 4.1(=34.3/8.6)となった(理論値=6/1.5=4)。Thyroglobulin の値は、予測値と非常に近い値を示した。BSA はわずかに低かった。

以上の結果は、公称ポアサイズが圧力損失評価だけでなく、動的結合量予測にも使用できることを示している。

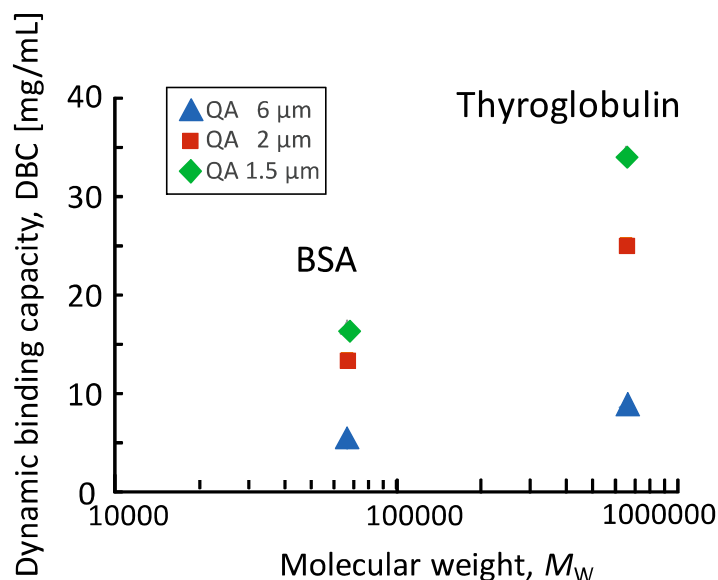


Fig. 3-11 Dynamic binding capacity of proteins

3.5.5 ピーク幅の解析

最後に直線勾配溶出実験(LGE)において、ポアサイズがピーク幅に与える影響を分析した。ポアサイズおよびイオン交換基の異なるモノリスを用い、広範囲の勾配溶出を行ってピーク幅の値を測定した。カラム体積で規格化したピーク幅(標準偏差 σ)を分配係数 K_R に対してプロットした。Fig3-12(a)の直線で示しているように、0.34 mL (3 mm disk) モノリスにおいては σ_v/V_t と K_R の間に良好な相関があることをすでに示している^[26]。

Tube monolith のデータも Fig.3-12(a)に示すようにポアサイズにかかわらず同様に良好な相関を示した。本研究で使用したモノリスは、拡散孔が存在しない対流貫通孔から形成される。したがって、ピーク幅は細孔内拡散の影響は受けず、移動相の分散(渦拡散)によって決定される。従来の多孔性充填カラムでは HETP における分散の高は、粒径の 5~10 倍でほぼ一定である。ピーク幅の値は 6 μm チューブでわずかに増加した。これは、充填剤の粒径と細孔直径との関係が起因する可能性がある。ラジアルフローにおける分散は、より少量の軸流クロマトにおける分散と同様であることに注意が必要である。我々のモデル^[51]に基づいてピーク幅から計算した HETP を K_R に対してプロットした(3-12 b)。

HETP の値は我々がこれまで研究してきたディスクの値と同様であり^[26]、他も研究に

においても同様であった^[54]。

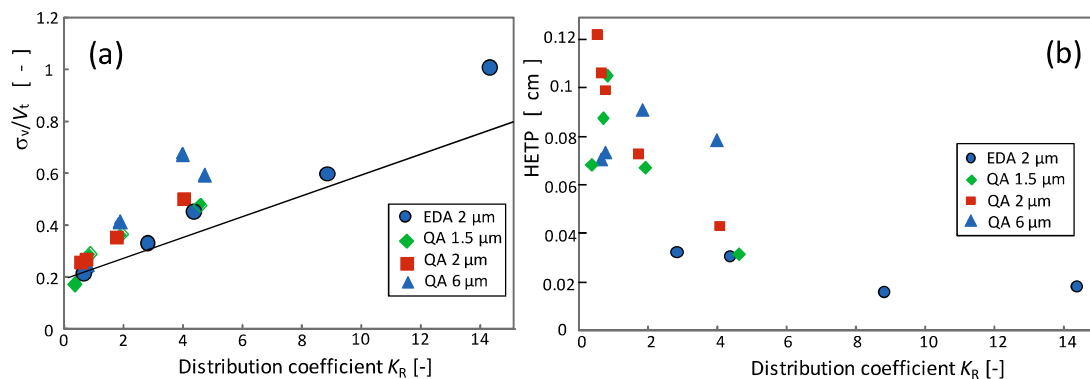


Figure 3-12: (a) Peak width normalized with the bed volume as a function of the distribution coefficient at the peak position, K_R . The curve in the figure is the correlation curve from our previous study on monolith disk chromatography (0.34 mL and 3 mm thickness)^[26] (b) HETP determined from linear gradient elution curves as a function of the distribution coefficient at the peak position, K_R . Monolithic tubes of different pore sizes and ion-exchange groups were used. Sample: poly T 20mer. σ_v = peak standard deviation in mL determined from the peak width w at $C = \exp(-1) \times \text{peak height}$ ($w^2 = 8\sigma_v^2$). K_R was calculated from I_R by $K = A I_R^B$ with A and B values determined from $GH-I_R$ curves.

3.6 考察

多孔性微粒子充填剤カラムによるクロマトグラフィー分離では、粒子径およびポアサイズは分離性能を支配する2つの重要な特性である。粒子の直径は、カラムの圧力損失を決定し、吸着容量を決定する大部分の表面積は、粒子のポア内に存在する。巨大バイオ分子の場合、ポアサイズは細孔内拡散を可能にするため、十分な大きさである必要があるが、拡散の遅さは分離のボトルネックのままとなっている。粒子径が小さな粒子は、拡散経路を短くし、圧力損失を犠牲にすることで分離性能を改善することができる。しかし、非常に大きなポアサイズを有し、かつ高压で操作が可能な安定な小粒子を製造することは容易ではない。

貫通孔を有し細孔内拡散の制限が無いモノリスは、拡散性の低い巨大バイオ分子の分離に適していると考えられる。

モノリスは貫通孔のみを有するので、それらは圧力損失と比表面積つまりは結合容量を決定する。しかし、これまで詳細な比較研究が行なわれていないため、最適な性能を達成するためにフロースルー細孔をどのように調整または最適化すべきか不明である。

本研究では、多重毛細管モデルに基づいて、公称ポアサイズから圧力損失およびDBCを推定できることを示した。また、ラジアルフロークロマトグラフィーは軸流クロマトグラフィーデータに基づいて容易に設計されることも示された。したがって、スケールアップが容易である。

プロセススケールのクロマトグラフィーでは、試料の供給は分析分離と比較してはるかに高い。サンプル供給の間、吸着層がポアサイズを減少させるにつれて圧力損失が増加することはすでに知られている。このポアサイズの減少は、理論的に分子半径と細孔径を考慮して計算することができる^[55]。場合によっては、1.5 μm のような小さなポアサイズのチューブでは圧力損失が高すぎる場合がある。DBCは低下するが、より大きなポアサイズのチューブが良い選択肢である場合もある。ポアサイズは圧力損失とDBCを考慮して注意深く調整する必要がある。

3.7 結言

ラジアルフローの1 mL チューブモノリスは、ポアサイズの違いに関わらず分散、吸着性能が類似していることが示された。ポアサイズは、圧力損失またはDBCと良く相関した。また、DBCはタンパク質の分子量およびポアサイズと相関した。

軸流流れのDisk型モノリスから、生産スケールで使用するラジアルフローチューブ型モノリスへのスケールアップは容易であり、圧力損失や動的吸着量の点から最適なポアサイズを選択することが重要であることが示された。

第4章 モノリスクロマトグラフィーのタンパク質吸着時における圧力上昇の解析

4.1 緒言

モノリスのポアサイズは、圧力損失や動的吸着量の点から最適なポアサイズを選択することが重要である。均一な多孔性を有するモノリスカラムの場合、公称のポアサイズから圧力損失や吸着容量を予測することが可能である^[56]。

一方、プロセススケールのクロマトグラフィーでは、試料の供給は分析分離と比較してはるかに多いため、分子の吸着層によってポアサイズが減少し、吸着時に圧力が増加することが知られている。使用するモノリスのポアサイズが小さすぎる場合、分子の吸着層により巨大バイオ分子の流路が閉塞し、送液が不能となる場合もある。よって、カラムに吸着させる分子サイズから圧力上昇を予測し、適切なポアサイズを選択することがさらに重要となる。

本章では、ポアサイズ $1.5\ \mu\text{m}$ の QA Tube Monolith を使用し、BSA、Thyroglobulin の吸着破過実験時の圧力上昇と分子サイズの関係について考察した。

4.2 実験

4.2.1 材料

カラムは 1 mL CIM[®] QA Tube Monolith, average pore size 1500 nm (BIA separations, Ljubljana, Slovenis)を使用した。モデルタンパク質として、Sigma-Aldrich 社(St. Louis,MO)の bovine serum albumin (BSA, cat. no. A7030)、Thyroglobulin (cat. no. T1001)を使用した。

4.2.2 Dynamic binding capacity (DBC)の測定

カラムを AKTA pure 150 (GE healthcare, Uppsala, Sweden)に接続し、10 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl, pH7.0 buffer で平衡化した。サンプルは同じ buffer に 1 mg/mL (= C_0)となるように溶解し 0.22 μ m フィルターでろ過して使用した。サンプルを Superloop 50 mL に充填し、流速 3.0 mL/min でカラムにアプライした。280 nm の吸光度をモニターして元の濃度の 10% (= $0.1 \times C_0$)が漏れ出した点を V_B 、元の濃度の 50% (= $0.5 \times C_0$)が漏れ出した点を V_C とし、10% DBC = $C_0 V_B / V_t$ 、50% DBC = $C_0 V_C / V_t$ を算出した。 V_t はカラム体積 (= 1 mL)である。

4.2.3. 圧力損失の測定とタンパク吸着層厚さの算出

モノリスカラムの圧力損失は AKTA システムで直接測定した。DBC 測定時におけるタンパク質の吸着層厚さは式(4-1)から算出した^[57]。

$$r_p = r \cdot \sqrt{\frac{\sqrt{\varepsilon^2 \cdot (\Delta P / \Delta P_p) + 4 \cdot \sqrt{(\Delta P / \Delta P_p)} \cdot (1 - \varepsilon) - \varepsilon \sqrt{(\Delta P / \Delta P_p)}}}{2 \cdot (1 - \varepsilon)}} \quad (4-1)$$

ここで、 ΔP は 10 mM Bis-Tris-HCl, 30 mM NaCl, pH7.0 buffer、F=3 mL/min の圧力損失、 ΔP_p はタンパク質吸着層形成後の圧力損失で、元の濃度の 50% (= $0.5 \times C_0$)が漏れ出した点における圧力を使用した。 ε はカラム空隙率 (= 0.6)、 r はモノリスの細孔半径、 r_p はタンパク質吸着層形成後のモノリス細孔半径である。

4.3 結果と考察

4.3.1 圧力損失とタンパク吸着層厚さ

BSA および Thyroglobulin の吸着破過実験時の圧力増加と、式(4-1)を使用して算出したタンパク質吸着層厚さを Table4-1 に示す。

BSA の吸着時における圧力増加は小さな値となり、ポアサイズに対して吸着分子サイズが小さい場合、吸着時の圧力上昇は無視できると考えられた。一方、Thyroglobulin のような巨大分子になると、圧力が大幅に増加した。この圧力増加から算出したタンパク吸着層厚さは、Thyroglobulin のストークス径とほぼ一致した。

Table 4-1 Estimated thickness of protein adsorbed layer calculated in Eq. (4-1) based the pressure drop(ΔP and ΔP_p) data measurements at flow rate 3 ml/min.

	Pressure drop [MPa]	protein adsorbed layer thickness [nm]	Stokes diameter [nm]
buffer	0.179	—	—
BSA	0.182	0.9	6.96 ^[58]
Thyroglobulin	0.255	19.21	17.16 ^[59]

この結果、使用するモノリスのポアサイズとタンパク質のストークス径から、タンパク吸着時の圧力上昇を予測できる可能性が示唆された。

また、多重細管モデルに基づいて考えると、他のポアサイズにおける圧力上昇も予測が可能となる。圧力損失の比は、ポアサイズ比の2乗に反比例すると報告されている^[56]。1.5 μm において、buffer を 3 mL/min で流した際の圧力損失は 0.179 MPa なので、2 μm および 6 μm のポアサイズにおける buffer の圧力損失はそれぞれ 0.101 MPa、0.020 MPa と予測される。この条件下で Thyroglobulin が吸着層を形成し、ポアサイズが減少した場合、式(4-1)から 2 μm では 0.139 MPa、6 μm では 0.027 MPa まで圧力が上昇すると予測ができる。ただし、吸着した分子の構造が変化する場合や、棒状のタンパク質の場合は、予測値と一致しないことも考えられるため、今後、データを収集し更なる検討が必要である。

研究の初期段階では、サンプルが大量に入手できないケースもあるため、このようなモデルによる予測を利用して、効率よくプロセス開発を行うことが望ましい。

4.4 結言

ポアサイズ 1.5 μm の QA Tube Monolith を使用し、BSA、Thyroglobulin の吸着破過実験時の圧力上昇と分子サイズの関係について考察した。BSA のように 1.5 μm のポアサイズに対して吸着分子サイズが小さい場合、吸着時の圧力上昇は無視できると考えられた。一方、Thyroglobulin のような巨大分子になると、圧力が大幅に増加した。この圧力増加から算出したタンパク吸着層厚さは、Thyroglobulin のストークス径とほぼ一致した。

更にデータを蓄積することで、モノリスのポアサイズとタンパク質の分子サイズや形状から、吸着時の圧力上昇を予測できる可能性が示唆された。

第5章 結論

医薬品分野において、抗体医薬品や血液凝固因子といったバイオ医薬品の売上高は増加し続けており、バイオ医薬品の市場規模は、2015年には16兆円に達している。2020年にはさらに30兆円にまで拡大すると予想されており、世界の医薬品市場全体の中でバイオ医薬品が占める割合も年々高まっている。これらバイオ医薬品は体内への大量投与が必要なため、分離・精製プロセスでは各種クロマトグラフィーを組み合わせ、不純物を安全なレベルまで除去・低減される必要がある。一方で、バイオ医薬品は複雑な構造を持つ糖タンパク質であり、一般的な低分子合成医薬品と比べて分子量が10万を超える巨大バイオ分子も存在する。このような巨大バイオ分子のクロマトグラフィー分離挙動を解析した報告は少なく、精製工程の最適化が十分に行われていない場合が多い。また、近年の遺伝子組換え医薬品においては、産生細胞の発現系や培養方法の改良などによって、タンパク発現量が増大してきており、クロマトグラフィープロセスの処理能力の向上やコストダウンは重要な課題である。そこで本研究では、効率的な巨大バイオ分子のクロマトグラフィー精製プロセスを構築することを目的とし、巨大バイオ分子のクロマトグラフィー分離挙動を分子拡散、吸着サイト数、動的吸着量等の分離特性のデータに基づいて考察した。以下に各章の概要を示す。

第1章では、血漿分画製剤を例に巨大バイオ分子のクロマトグラフィー精製における課題をまとめた。

第2章では、クロマトグラフィーの分離性能を理解する上で重要な物性値である拡散係数 D_m の測定方法として、Taylor法と動的光散乱法のそれぞれの特徴と問題点を考察した。また、一本鎖DNAの9~95-mer polyTをモデル分子として得られた分子拡散係数 D_m 、陰イオン交換クロマト担体における細孔内拡散係数 D_s 、吸着サイト数などのデータに基づき、巨大バイオ分子の拡散係数がクロマトグラフィー分離吸着性能に与える影響について考察した。球状タンパク質の拡散係数 D_m は、Youngらの式で示されるように分子量の0.33乗に反比例して減少するが、polyTの分子拡散係数 D_m は球状タンパク質と比べて小さく、polyethylene glycole (PEG)と同様に分子量の0.6乗に反比例して減少した。バルク溶液中のpolyTはタンパク質のような折り畳まれた3次構造ではなく、PEGと同様に広がったランダムコイル状の構造であると推定された。アガロースベースのクロマト担体であるSepharoseにおける細孔内拡散係数 D_s の値は、分子拡散係数 D_m よりさらに低下し、吸着サイト数が大きなpolyTほど溶出ピーク幅が広がったため、細孔内への拡散が著しく阻害されていることが示唆された。以上の結果から、拡散係数が小さい巨大バイオ分子のクロマトグラフィー分離は、ポアが小さな多孔性微粒子充填カラムでは困難であり、比較的大きな貫通孔をもつモノリスカラムが有効であると考えられた。

第3章では、巨大バイオ分子をモノリスカラムで分離精製する際の最適なポアサイズについて圧力損失、吸着サイト数、動的吸着量等の分離特性データに基づいて考察した。

ポアサイズが異なるモノリスカラムの吸着サイト数、リガンド密度、ピーク幅は同様の値であり、同じように機能すると考えられた。また、圧力や吸着量はポアサイズによって変化するが、その値は単純な多重細管流れモデルで解析が可能であった。Disk 型の Axial Flow モノリスと、生産スケールで使用する Tube 型の Radial Flow モノリスデータも同様であったことから、スケールアップは容易であり、圧力損失や動的吸着量の点から最適なポアサイズを選択することが重要であることが示された。

第4章では、モノリスカラムのタンパク質吸着時の圧力上昇について、ポアサイズと吸着分子サイズの関係性を考察した。プロセススケールのクロマトグラフィーでは、試料の供給が多いため、分子の吸着層によってポアサイズが減少し、吸着時に圧力が増加することが知られている。この圧力増加から算出したタンパク吸着層厚さは、分子のストークス径とほぼ一致した。この結果、カラムに吸着させる分子サイズから圧力上昇を予測できる可能性が示唆された。使用するモノリスのポアサイズが小さすぎる場合、分子の吸着層により巨大バイオ分子の流路が閉塞し、送液が不能となる場合もある。DBC は低下するが、高流速で操作が可能な、大きいポアサイズのモノリスが良い選択である場合もあるため、ポアサイズは、圧力上昇と DBC を考慮して注意深く調整することが重要であると考えられた。

最適なモノリスカラムのポアサイズや条件を設定することで、工程時間が 10 分の 1 以下に削減できる可能性もある。特に安定性が悪いタンパク質などを高流速で短時間に処理できれば、工程中の失活や分解酵素による消化といったリスクを低減でき、結果として生物活性物質の回収率向上が期待できる。

モノリスカラムは、吸着時における圧力上昇の更なる解析や洗浄による繰り返し利用といった課題も残っているが、巨大バイオ分子のクロマトグラフィー精製では回収率向上やコスト削減、シングルユースといった有用性も多いため、今後はより多くの製造工程に使用されていくものと考えられる。

以上のように、本稿では、巨大バイオ分子のクロマトグラフィー分離機構を解析することで、その特徴を生かした分離方法を明らかにした。医薬品開発の初期段階では、サンプルが大量に入手できないケースや開発を急がなければならないケースが多く存在する。

本稿で得られた知見や、モデルによる予測を利用して効率よくプロセス開発を行うことが期待される。

使用記号

A°	Intercept of Van Deemter plot	[cm]
C	Sample concentration	[mg/mL]
C°	Inclination of Van Deemter plot	[s]
C_0	Initial sample concentration	[mg/mL]
C_{\max}	Peak maximum concentration	[mg/mL]
D_c	Column diameter	[cm]
d_c	Tube diameter	[cm]
d_p	Resin particle diameter	[μm]
d_{coil}	Coil diameter	[m]
De	Dean number	[-]
D_m	Diffusion coefficient	[cm^2/s]
D_s	Diffusion coefficient inside porous particle	[cm^2/s]
F	Volumetric flow velocity	[mL/min]
H	Phase ratio(= $(1-\varepsilon)/\varepsilon$)	[-]
HETP	Height equivalent of one theoretical plate	[cm]
I_R	Elution salt concentration	[M]
K	Distribution coefficient	[-]
K_R	Distribution coefficient at an elution concentration I_R	[-]
L	Tube length	[cm]
L_{LGE}	Zone spreading factor	[-]
M_w	Molecular weight	[g/g-mol]
R_h	Hydrate radius	[nm]
R_s	Peak resolution	[-]
t	Time	[s]
t_R	Peak retention time	[s]
u	Linear velocity	[cm/s]
V_g	Gradient volume	[mL]
V_o	Column void volume	[mL]
V_R	Retention volume	[mL]
V_t	Column volume	[mL]
W	Peak width	[mL]
Z	Column height	[cm]
ε	Porosity	[-]
σ	Standard deviation	[s]
σ_V	Standard deviation	[mL]

参考文献

- [1] Bertolini, J., Goss, N., Curling, J. *Production of plasma proteins for therapeutic use*. John Wiley & Sons, 2012.
- [2] Kistler, P., Friedli, H. Ethanol precipitation. In *Methods of plasma protein fractionation*, pp. 1-15, Academic Press, London, 1980.
- [3] Burnouf, T. Modern plasma fractionation. *Transfusion medicine reviews*, 21, 101-117 (2007).
- [4] Furuya, K., Murai, K., Yokoyama, T., Maeno, H., Takeda, Y., Murozuka, T., Tomono, T., *Vox sang.* 2006, 91, 119-125.
- [5] M Griffith, M., *Ann Hematol.* 1991, 63, 131-137
- [6] Lusher, J, M., Scharrer, I., *Int J Hematol*, 2009, 90, 446-454
- [7] Podgornik, A., Yamamoto, S., Peterka, M., Krajnc, N, L., *J. Chromatogr. B*, 2013, 927, 80-89
- [8] Ladisch, M. R., *Bioseparations Engineering*, John Wiley & Sons, 2001.
- [9] Carta, G., Jungbauer, A., *Protein Chromatography: Process Development and Scale-Up*, John Wiley & Sons, 2010.
- [10] Yamamoto, S., Nakanishi, K., & Matsuno, R. *Ion-exchange chromatography of proteins*. CRC Press, 1988.
- [11] Yamamoto, S., *Japan J." Food Eng*, 2010, 11, 73-83
- [12] Sherwood, T, K., Pigford, R, L., Wilke, C, R., *Mass transfer*, McGraw-Hill, 1975, pp.25-53
- [13] Young, M, E., Carroad, P, A., Bell, R, L., *Biotech. Bioeng.*, 1980, 22, 947-955
- [14] Annunziata, O., Buzatu, D., Albright, J, G., *Langmuir*, 2005, 21, 12085-12089
- [15] Niesner, R., Andreas, H., *J. Chem. Eng. Data*, 2000, 45, 1121-1124
- [16] Liong, K, K., Wells, P, A., Foster, N, R., *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1991, 30, 1329-1335
- [17] Walters, R, R., Graham, J, F., Moore, R, M., Anderson, D, J., *Anal. Biochem.*, 1984, 140, 190-195
- [18] Lewandrowska, A., Majcher, A., Ochab-Marcinek, A., Tabaka, M., Holyst, M., *Anal. Chem.*, 2013, 85, 4051-4056
- [19] Cottet, H., Biron, J, P., Martin, M., *Anal. Chem.*, 2007, 79, 9066-9073
- [20] Yoshimoto, N., Isakari, Y., Itoh, D., Yamamoto, S. *Biotechnol. J.*, 2013, 8, 801-810
- [21] Yamamoto, S., Yoshimoto, N., Nishizumi, Y., *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 2612-2615
- [22] Fee, C, J., Van Alstine, J, M., *Chem. Eng. Sci.*, 2006, 61, 934-939
- [23] Fee, C, J., *Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications*, Springer Science & Business Media 2009, pp.113-125.
- [24] Fee, C, J., Van Alstine, J, M., *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications, Third Edition*, John Wiley & Sons 2011, pp.339-362.
- [25] Minton, A, P., *Anal. Biochem.*, 2016, 501, 4-22

- [26] Yamamoto, S., Okada, T., Abe, M., *J. Chromatogr A*, 2011, *1218*,17, 2460-2466
- [27] Svec, F., Tennikova, T. B., Deyl, Z. (Eds.), *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications*, Elsevier, New York 2003.
- [28] Mattiasson, B., Kumar, A., Galaev, I. Y. (Eds.), *Macroporous Polymers: Production Properties and Biotechnological/Biomedical Applications*, CRC Press, Florida 2009.
- [29] Wang, P. G., (Ed.), *Monolithic Chromatography and Its Modern Applications*, ILM Publications, Hertfordshire 2010.
- [30] Rajamanickam, V., Herwig, C., Spadiut, O., *Chromatography* 2015, *2*, 195–212.
- [31] Svec, F., Lv, Y., *Anal. Chem.* 2015, *87*, 250–273.
- [32] Tetala, K. K., Vijayalakshmi, M. A., *Anal. Chim. Acta* 2016, *906*, 7–21.
- [33] Podgornik, A., Barut, M., Strancar, A., Josic, D., Koloini, T., *Anal. Chem.* 2000, *72*, 5693–5699.
- [34] Podgornik, A., Jančar, J., Merhar, M., Kozamernik, S., Glover, D., Cucek, K., Barut, M., Strancar, A., *J. Biochem. Biophys. Methods* 2004, *60*, 179–189.
- [35] Urthaler, J., Schlegl, R., Podgornik, A., Strancar, A., Jungbauer, A., Necina, R., *J. Chromatogr. A* 2005, *1065*, 93–106.
- [36] Jungbauer, A., Hahn, R., *J. Chromatogr. A* 2008, *1184*, 62–79.
- [37] Bencina, K., Bencina, M., Podgornik, A., Strancar, A., *J. Chromatogr. A* 2007, *1160*, 176–183.
- [38] Podgornik, A., Smrekar, V., Krajnc, P., Strancar, A., *J. Chromatogr. A* 2013, *1272*, 50–55.
- [39] Yamamoto, S., Kita, A., *Food Bioprod. Process.* 2006, *84*, 72–77.
- [40] Lendero, N., Vidic, J., Brne, P., Frankovic, V., Strancar, A., Podgornik, A., *J. Chromatogr. A* 2008, *1185*, 59–70.
- [41] Yoshimoto, N., Yamamoto, S., in Staby, S., Rathore, A.S., Ahuja, S. (Eds.), *Preparative chromatography for separation of proteins*, Wiley, New Jersey 2017, pp, 111–157
- [42] Mihelic, I., Nemec, D., Podgornik, A., Koloini, T., *J. Chromatogr. A* 2005, *1065*, 59–67.
- [43] Jungreuthmayer, C., Steppert, P., Sekot, G., Zankel, A., Reingruber, H., Zanghellini, J., Jungbauer, A., *J. Chromatogr. A* 2015, *1425*, 62–79.
- [44] Podgornik, A., Vidic, J., Jančar, J., Lendero, N., Frankovic, V., Strancar, A., *Chem. Eng. Technol.* 2005, *28*, 1435–1441.
- [45] Bird, R. B., Stewart, W. E., Lightfoot, E. N., *Transport phenomena*. John Wiley & Sons, New York 2002, pp, 188–192.
- [46] Lendero, N., Vidic, J., Brne, P., Podgornik, A., Strancar, A., *J. Chromatogr. A* 2005, *1065*, 29–38.
- [47] Pabst, T. M., Carta, G., *J. Chromatogr. A* 2007, *1142*, 19–31.
- [48] Pabst, T. M., Antos, D., Carta, G., Ramasubramanian, N., Hunter, A. K., *J. Chromatogr. A*

2008, *1181*, 83–94.

[49] Pabst, T. M., Carta, G., *Biotechnol. Progr.* 2008, *24*, 1096–1106.

[50] Yamamoto, S., *Chem. Eng. Technol.* 2005, *28*, 1387–1393.

[51] Yamamoto, S., *Biotechnol. Bioeng* 1995, *48*, 444–451.

[52] Endres, H. N., Johnson, J. A., Ross, C. A., Welp, J. K., Etzel, M. R., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2003, *37*, 259–266.

[53] Fischer, H., Polikarpov, I., Craievich, A. F., *Protein Science* 2004, *13*, 2825–2828

[54] Hahn, R., Tscheliessnig, A., Bauerhansl, P., Jungbauer, A., *J. Biochem. Biophys. Methods* 2007, *70*, 87–94.

[55] Lendero Krajnc, N., Smrekar, F., Štrancar, A., Podgornik, A., *J. Chromatogr. A* 2011, *1218*, 2413–2424.

[56] Podgornik, A., Hamachi, M., Isakari, Y., Yoshimoto, N., Yamamoto, S., *Electrophoresis*, 2017, *38*, 2892–2899

[57] Podgornik, A., Smrekar, V., Krajnc, P., Štrancar, A., *J. Chromatogr. A* 2013, *1272*, 50–55.

[58] Axelsson, I., *J. Chromatogr. A*, 1978, *152*, 21–32.

[59] Edelhoch, H., Lippoldt, R.E., *J. Biol. Chem.*, 1960, *235*, 1326

本研究に関連する発表論文

(a)査読のある雑誌等

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

論文題目: Effect of pore size on performance of monolithic tube chromatography of biomolecules

学術雑誌名: ELECTROPHORESIS

巻、号、頁: Volume 38, Issue 22-23, p.p2892–2899

発行年月: 2017年11月

(本文との関連: 本論文の第3章と関連)

(2)著者氏名: 濱地正嵩、吉本則子、山本修一

論文題目: 巨大なタンパク質やバイオナノ粒子の拡散係数の測定方法

学術雑誌名: 日本食品工学会誌

巻、号、頁: Volume 18, Issue 4, p.p187–191

発行年月: 2017年11月

(本文との関連: 本論文の第2章と関連)

(b)査読のある国際会議の会議録等

(1)著者氏名: Masataka Hamachi, Simoes Cardoso Joao Carlos, Noriko Yoshimoto and Shuichi Yamamoto

論文題目: Retention and Diffusion Behaviours of Large Biomacromolecules in Chromatography Solid Phase

学術雑誌名: 3rd International Symposium on Multiscale Multiphase Process Engineering (MMPE2017)

巻、号、頁: Proceedings of 3rd International Symposium on Multiscale Multiphase Process Engineering (MMPE2017), pp.243-247

発行年月: 2017年5月

(本文との関連: 本論文の第2章と関連)

謝辞

本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懇切かつ丁寧にご指導下さった山口大学 山本修一教授に深く感謝申し上げます。また、研究について様々な助言やご協力を頂いた本学 吉本則子准教授、リュブリャナ大学 Ales podgornik 教授に深く感謝申し上げます。学位論文の審査にご出席頂き、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、田中一宏 准教授に厚く御礼申し上げます。

多岐に渡りお世話になりました本学技術職員 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。さらに、飯盛遊さん、伊藤大祐さんをはじめ、研究遂行にご協力いただきました山口大学工学部バイオプロセス設定工学研究室の諸氏に心より感謝いたします。

最後に、温かく見守り応援していただいた家族をはじめ、充実した研究生活を送るための心の支えとなった本講座の卒業生の皆様に深く御礼申し上げます。

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 濱地 正嵩