

セルロース担体 MLP1000 DexS

セルロース担体 MLP1000 DexS は、次世代セルロース担体 MLP1000 をベースに、硫酸化多糖をリガンドとして固定化してあります。本開発品はワクチン製造のための不活化ウイルスの分離・精製用に設計されています。

今回開発されたセルロース担体 MLP1000 は、高度に架橋されたセルロース粒子であり、大孔径の連通孔構造を有しています。サイズの大きなウイルスおよびウイルス様粒子の精製において、担体内部を吸着サイトとして利用できるため、高い吸着、精製能力を発揮します。

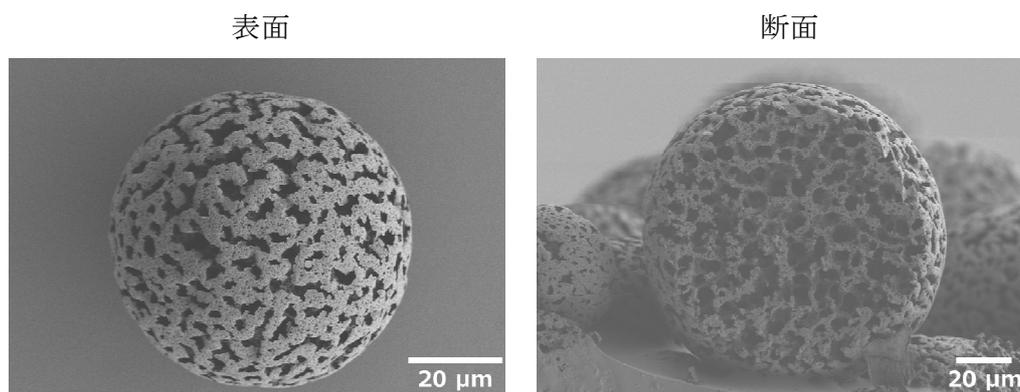


図1 セルロース担体 MLP1000

開発品の取扱い方について

セルロース担体 MLP1000 DexS は開発品となります。クロマトグラフィー充填剤セルファインは ISO 9001 により品質が保証されていますが、本品は開発中につき、品質が変更される可能性があります。

本品は製品として販売はしておりません。開発品として少量のサンプル提供を行っております。本品を製造用途で検討してみたい企業様（医薬品製造、診断薬、その他製造等）、研究者様に置かれましては、その旨ご同意頂き、用途を勘案の上、サンプルをご提供させていただきます。

サンプルに関するお問い合わせは下記までご連絡下さい。

JNC 株式会社

ライフケミカル事業部

東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号

TEL : 03-3243-6150 Fax : 03-3243-6219

e-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>

■セルロース担体 MLP1000 の特徴

セルロース担体 MLP1000 は、高度に架橋されたセルロース粒子で、大孔径の連通孔構造を有しています。サイズの大きなウイルスおよびウイルス様粒子の精製において、担体内部を吸着サイトとして利用できるため、高い吸着量、精製能力を發揮します。

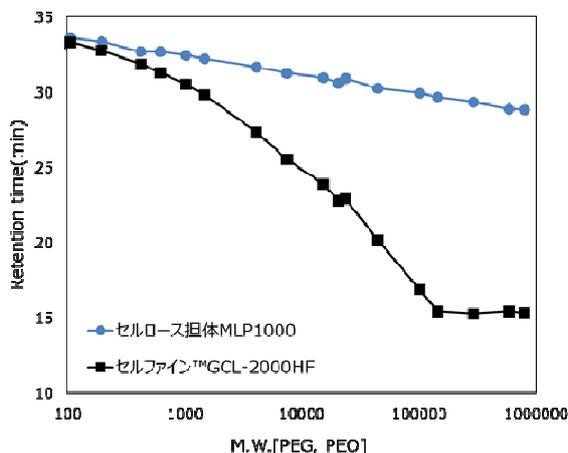


図2 MLP1000 の PEG、PEO の保持時間

7.8 mm ID x 300 mm に担体を充填後、指標となる分子量が異なったポリエチレングリコール (PEG) またはポリエチレンオキサイド (PEO) を流速 0.4 mL/min で通液して保持時間を確認した。

表1 セルロース担体 MLP1000 DexS の特徴

粒子径	平均 90 μm(40 - 150 μm)
リガンド	デキストラン硫酸基
ベース基材	架橋セルロース
操作圧	< 0.3 MPa

■優れた流速特性

セルロース担体 MLP1000 DexS は、高度に架橋されたセルロース粒子です。ウイルス粒子が入る極めて大きな連通孔を有するにもかかわらず、バイオ医薬品の生産で使用されている大型カラムにおいても使用可能な耐圧性、流速特性を備えています (図3)。

CA_MLP_DexS_N1_V6_J

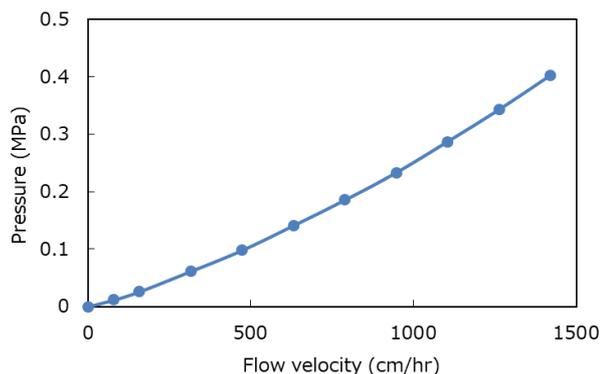


図3 MLP1000 DexS の流速特性

2.2 cm ID x 20 cm のカラムに担体を充填後、24°C±1°C の純水を移動相として流速と圧力の関係の評価した。

■不活化インフルエンザウイルスの精製事例

インフルエンザウイルス H1N1 型を培養した鶏卵由来の尿膜液を用いてクロマトグラフィー精製を行いました。

セルロース担体 MLP1000 DexS をカラムに充填し、尿膜液を直接ロードしました。このときウイルスがカラムから漏れ出てくる破過量を評価しました (図4)。市販品担体 A (デキストラン硫酸付加担体) と比較して、セルロース担体 MLP1000 DexS ではより多い量のウイルスが担体に吸着されることが判りました。一般的なクロマトグラフィー担体である市販品担体 A は 4 mL 程度通液した時点で 10%破過されましたが、セルロース担体 MLP1000 DexS では、20 mL 通液した時点においても 10%破過しませんでした。

一般的なクロマトグラフィー担体の場合、細孔径が小さくウイルス粒子は細孔内部に入りません。このためウイルスはクロマトグラフィー担体の表面で吸着することになり、吸着サイトは担体表面に限定されることとなります。一方でセルロース担体 MLP1000 DexS は極めて大きな細孔を有しています。このためウイルス粒子は細孔内部に入ることができます。このため、今回のインフルエンザウイルス吸着実験では一般的なクロマトグラフィー担体の 5 倍以上の吸着量となる 20 mL を超えても破過しませんでした。

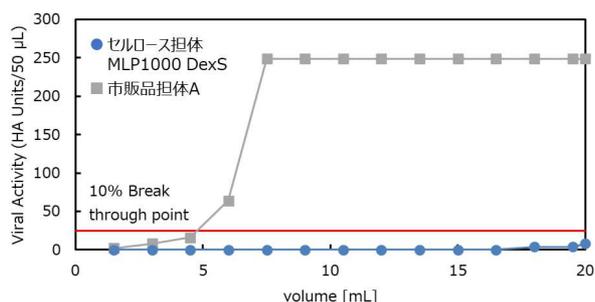


図 4 不活化インフルエンザウイルスの動的吸着量条件

担体：セルロース担体 MLP1000 DexS、市販品担体 A

カラム：I.D. 5.0 x 15 mm (0.3 mL)

ロードサンプル：鶏卵由来の尿膜液

不活化インフルエンザウイルスを含む

ウイルス株：A/Hyogo/YS/2011(H1N1)

流速：0.5 ml/min(150 cm/h、R.T. 0.6 min)

平衡化液：10 mM リン酸 Na、120 mM NaCl、pH 7.4

洗浄液：10 mM リン酸 Na、120 mM NaCl、pH 7.4

溶出液：10 mM リン酸 Na、2 M NaCl、pH 7.4

クロマトグラフィーによるインフルエンザウイルスの精製後に溶出液を回収して、回収率、精製度の評価を行いました（表 2）。セルロース担体 MLP1000 DexS のクロマトグラフィー後、液量は 20 mL から 1.5 mL になり、13 倍まで濃縮することができました。不純物となるタンパク質量は 10,100 µg から 975 µg になり、9.7%まで減少させることができました。また、dsDNA 量も同様に 22%まで減少させることができました。

クロマトグラフィーによって最終的なウイルスの回収率は 93%と良好な回収率でした。高吸着性能はセルロース担体 MLP1000 DexS の大きな特徴ですが、回収率も良好であることが示されました。

表 2 不活化インフルエンザウイルスの精製結果

1) セルロース担体 MLP1000 DexS

工程	液量 ml	ウイルス活性 HA 価	タンパク質量 µg	dsDNA 量 µg	回収率 %
尿膜液	20	99,600	10,100	6.4	100
フローズルー	20	400	9,220	3.6	1
洗浄液	6	1,560	786	0.3	2
溶出液	1.5	92,880	975	1.4	93

2) 市販品担体 A

工程	液量 ml	ウイルス活性 HA 価	タンパク質量 µg	dsDNA 量 µg	回収率 %
尿膜液	20	99,600	10,100	6.4	100
フローズルー	20	73,600	7,520	4.6	74
洗浄液	6	6,720	780	0.18	7
溶出液	1.5	12,900	330	0.7	13

■不活化ヒトコロナウイルスの精製事例

ヒトコロナウイルス OC43 (hCoV OC43) は、COVID-19 感染症を引き起こす SARS-Cov-2 とおなじベータコロナウイルス種に属する、およそ 100nm のサイズの一般的な風邪の原因ウイルスです。インフルエンザウイルスの精製事例に続き、ペロ細胞で培養したヒトコロナウイルス OC43 のクロマトグラフィーによる精製事例を紹介します。

セルロース担体 MLP1000 DexS をカラムに充填し、培養上清液を直接ロードしました。このときウイルスがカラムから漏れ出てくる破過量を評価しました (図 5)。一般的なクロマトグラフィー担体である市販品担体 A (デキストラン硫酸付加担体) と比較して、セルロース担体 MLP1000 DexS ではより多い量のウイルスが担体に吸着されることが判りました。市販品担体 A では 18 mL 程度通液した時点で 10%破過されたのに対し、一方、セルロース担体 MLP1000 DexS では、34.5 mL 通液した時点においても 10%破過せずに吸着し続けました。

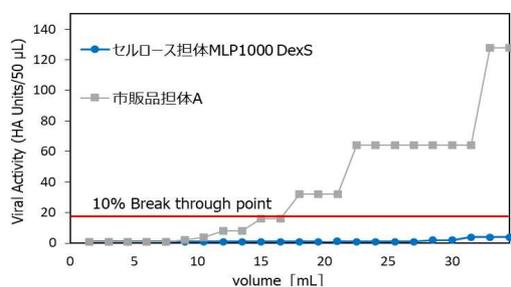


図 5 不活化ヒトコロナウイルスの動的吸着量

表 3 不活化ヒトコロナウイルス OC43 の精製結果

3) セルロース担体 MLP1000 DexS

工程	液量 ml	ウイルス活性 HA 価	タンパク質量 µg	dsDNA 量 µg	回収率 %
培養上清液	34.5	120186	6394	52.79	100
フロースルー	34.5	1020	4376	55.53	0.8
洗浄液	4.5	90	57	2.25	0.1
溶出液 (gradient, isocratic)	10.5	108990	170	4.95	91

条件

担体：セルロース担体 MLP1000 DexS、市販品担体 A

カラム：I.D. 5.0 x 15 mm (0.3 mL)

ロードサンプル：ペロ細胞由来の培養上清

不活化ヒトコロナウイルス OC43 を含む

流速：0.3 ml/min(90 cm/h、R.T. 1.0 min)

平衡化液：10 mM リン酸 Na、150 mM NaCl、pH 7.4

洗浄液：10 mM リン酸 Na、150 mM NaCl、pH 7.4

溶出液：10 mM リン酸 Na、2 M NaCl、pH 7.4

溶出 1：gradient (0→25%)、25 CV

溶出 2：isocratic (100%)、10 CV

今回のヒトコロナウイルス吸着実験では、一般的なクロマトグラフィー担体において 10 %破過された時点でセルロース担体 MLP1000 DexS では 3%未満の破過量にとどまり、非常に高い吸着容量であることが示されました。

クロマトグラフィーによるヒトコロナウイルスの精製後に溶出液を回収して、回収率、精製度の評価を行いました(表 3)。セルロース担体 MLP1000 DexS のクロマトグラフィー後には、不純物となるタンパク質量は 6394 µg から 170 µg になり、2.7%まで減少させることができました。また、dsDNA 量も同様に 9%まで減少させることができました。また、回収率は 91%と良好な回収率でした。

MLP1000 DexS を用いることでインフルエンザウイルス同様に、ベータコロナウイルス属のヒトコロナウイルス OC43 においてもより効率的な精製が可能になることが示されました。

4) 市販品担体 A

工程	液量 ml	ウイルス活性 HA 価	タンパク質量 µg	dsDNA 量 µg	回収率 %
培養上清液	34.5	120186	6960	45.48	100
フロースルー	34.5	25770	5479	50.3	21
洗浄液	4.5	600	59	2.4	0.5
溶出液 (gradient, isocratic)	10.5	83550	164	8.94	70

■まとめ

セルロース担体 MLP1000 DexS はこれまでのクロマトグラフィー担体の常識を覆す大きな細孔径を有する、次世代のクロマトグラフィー担体です。その大きな細孔はウイルス粒子など大粒子を細孔内に拡散させます。従来のクロマトグラフィー担体はウイルス粒子が入るような大きな細孔の場合、耐圧性が悪化するため、大型カラムで使用することが困難になります。しかしセルロース担体 MLP1000 DexS の耐圧性は極めて高く、大型カラムでの使用が可能です。

近年のバイオ医薬品のモダリティには大粒子を医薬品とする傾向が強まっています。例えば遺伝子治療ではアデノ随伴ウイルス (AAV) が、抗腫瘍ウイルス療法では単純ヘルペスウイルス (HSV) が用いられています。また近年、再生医療分野で精力的な研究が進んでいるエクソソームが 100 nm 程度の粒子となります。ワクチンで有名になった mRNA 薬は配列にもよりますが、数 10 nm となります。いずれも数 nm と言われているタンパク質より大きな数 10 nm から数 100 nm の粒子となります。このような粒子は従来のクロマトグラフィー担体の細孔内部には入ることができませんので、吸着性能が課題となります。

セルロース担体 MLP1000 DexS はウイルス粒子を細孔内に拡散させることができる極めて大きな細孔径を有しています。このためウイルス粒子の吸着場は細孔内部まで拡張されるので、吸着量が極めて高くなり、従来のクロマトグラフィー担体のボトルネックを解消することができます。

JNC 株式会社は次世代のモダリティ精製の要望に応えて、この新しいクロマトグラフィー担体の開発に取り組んでまいります。これまでにない新しい体験をバイオ医薬品の精製工程に提供することで、これからも JNC 株式会社は医療の発展に貢献していきます。

■技術文献

K. Kadoi, E. Iwamoto, T. Nakama, Fabrication and characterization of a cellulose monolith-like particle for virus purification, *Biochem Eng J.* 192 (2023) 108849.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.108849>.

JNC 株式会社

ライフケミカル事業部

東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号

TEL : 03-3243-6150 Fax : 03-3243-6219

e-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>

JNC CORPORATION