

セルファインサルフェイトのカラムパッキング

セルファインサルフェイトはアフィニティークロマトグラフィー充填剤です。ウイルスの濃縮・精製、ウイルスからのパイロジェンの除去、ウイルス用粒子（VLP）の精製、細菌由来抗原や血清由来タンパク質などのアフィニティー活性のあるタンパク質の精製に使用できます。セルファインサルフェイトは真球状のセルロース粒子に硫酸エステル基を付加したクロマトグラフィー充填剤です。このためヘパリン固定化充填剤と同様のアフィニティー活性をもちますが、動物由来原料を使用していないため安全性の高いアフィニティークロマトグラフィー充填剤です。安定した物理強度の高いセルロース粒子を使用していますので、直径2メートルの大型カラムでの使用実績もあり、製造スケールでの使用が可能です。

フローパッキング手順

- 1) **カラム体積 < 1 L の場合**：必要量の充填剤スラリーをガラスフィルターでろ過して、5倍容量の純水で3回洗浄する。この操作で保存液を除去する。洗浄は必要に応じてバッファーを用いても良い。
- 2) **カラム体積 > 1 L の場合**：製品ボトルを静置することで充填剤を十分に沈降させた後、保存液をデカンテーションで取り除く。その後、純水を加えてスラリー状に懸濁させる。再び静置させて充填剤を十分に沈降させた後、上清を取り除く。この操作を2～3回繰り返して保存液を置換する。
- 3) 最後の洗浄が完了したら、50～60%のスラリーになるように充填バッファーを加えて懸濁する。
- 4) スラリーの1部を50mLメスシリンダーに入れて、4時間以上または終夜で静置する。この操作によって自然沈降体積を測定して正確なスラリー濃度を確認する。
スラリー濃度% = 自然沈降ベッド体積 / 全体積
- 5) スラリー濃度が50%になるように充填バッファー量を調節する。
- 6) カラムに充填するスラリー量は以下の計算式で算出できる。

$$50\% \text{スラリー量} = (\text{目標カラム体積} \times 2) \times (\text{Cf})$$

Cf はコンプレッションファクターで、以下の式で導かれる。

$$\text{Cf} = \text{自然落下沈降体積} / \text{充填体積}$$

例えば、100mL のカラム体積に充填する場合、Cf が 1.15 で最適な充填結果が得られる場合、必要なスラリー量は以下の通り計算できる。

$$(100 \times 2) \times 1.15 = 230 \text{ mL}$$

- 7) カラムを組み立てる。カラム出口を開けた後、バッファーをカラムに加えながら、下部フィルターに残存している空気を除く。空気が入らないようにバッファーはカラム底部から1cm程度は残しておく。
- 8) カラム出口を閉める。
- 9) 空気が充填剤間に入り込まないように注意しながらスラリーを一気にカラム内に注ぎ込む。
- 10) カラム出口を開けて充填剤を沈降させる。ゲルが沈降すると、充填剤の方が早く沈降するため液面が透明になる。2～3cm までバッフ

ァーが透明になったら流出口を閉じる。

12) 注意深くバッファをカラム上部まで満たす。このとき沈降しているゲルが浮き上がらないようにする。

13) 上部アダプターを準備する。

14) 上部アダプターとカラム液面の間に空気が入らないように上部アダプターをカラムに設置する。

15) 上部アダプターを固定した後、最初に 200cm/h の流速で 30~60 分通液してゲルを沈降させる。

注意：カラム内の圧力は 0.15~0.25 MPa になるように流速を調節すること。安定的な充填をするためには、充填後の操作圧よりも早い流速でゲルを沈降させること。

16) 充填剤の高さが安定した後、通液を止める。次いでカラム出口を閉じる。その後カラム上部の流入口の配管を外す。ゆっくりと上部アダプターを下げていく。このときカラム内のバッファはカラム入口から逆流して流れ出る。この操作によって上部アダプター内の空気はカラム外へ押し出される。上部アダプターを充填剤の表面まで下げていく。

17) 空気が入らないように上部アダプターに配管を接続したあと、下部アダプターのカラム出口を開いて 200cm/h の流速で通液する。この操作で充填剤が圧縮されて上部アダプターの間で隙間ができるようなら上部アダプターを下げて充填剤に密着するよう調節する。

18) 最終的なカラム高さからカラム体積を計算する。計画していたカラム体積より多い場合、上部アダプターを下げて調節していく。一方で計画していたカラム体積よりも低い場合、カラムに投入する前のスラリー濃度が低いか、ゲルが圧縮されすぎている可能性がある。ゲルが圧縮されすぎている場合、Cf 値は 1.15 よりも高くなる。

19) カラム充填後の評価はカラム体積の 1%

液量の 2%アセトン（純水に溶解）または 2M 塩化ナトリウムを 150cm/h の流速でカラムに通液することで、HETP とアシンメトリー (As) を算出して評価する。

内径 3.2cm カラムの充填事例

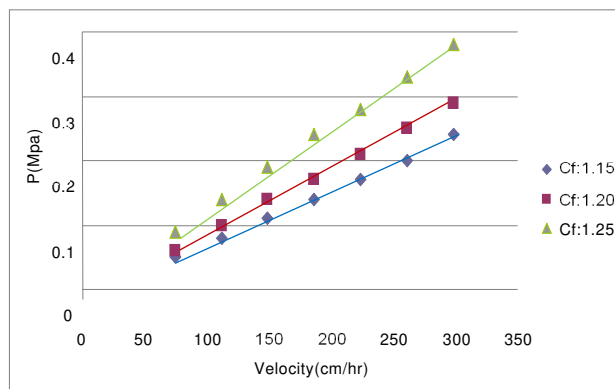
- カラム：内径 3.2 cm x 長さ 25 cm (EMD Millipore Vantage)
- 充填バッファ：純水 (25°C)
- 充填条件：50 %スラリー濃度、流速 40ml/min (298 cm/h)
- ゲル圧縮：ゲル高さ 20cm まで上部アダプターを下げる(目標カラム体積 = 160 mL)

内径 3.2cm カラムに、異なる Cf 値でセルファインサルフェイトを充填した後、パッキングの状況および圧力-流速特性を調査した。Table 1 および Fig. 1 にその結果を示す。

Table 1 充填状況の測定結果

Cf	N (m ⁻¹)	A _s
1.15	5900	1.13
1.20	6400	0.96
1.25	5600	1.04

Figure 1. 圧力/流速特性の測定結果



内径 3.2 cm x 高さ 25 cm (EMD Millipore

Vantage) のカラムを用いてセルファインサルフェイトを充填した場合、Cf 値 1.15~1.20 で良好な充填状況になった。このとき 0.3MPa で 250cm/h の流速で通液することが可能であった。

内径 30cm カラムの充填事例

- カラム：内径 30 cm x 長さ 20 cm (BPG column)
- 充填方法：
 1. カラムにバッファーを少量加えて下部流出口から空気を除去して、底部から 5cm 高さのバッファーが残存するまでバッファーを除去する。
 2. スラリーをカラムに投入後、下部流出口を開ける。
 3. 自然落下でゲルを沈降した後、カラム高さは 22.9cm になった。上部アダプターをカラムに設置して純水を 30 分通液した。このときカラム圧力は 0.15~0.25 の圧力で通液した。
- 上部フィルターを下げていき、Table 2 に記載される目的の Cf 値になるように圧縮させた。
- 充填後のカラム評価：
 1. 流速 75 cm/hr (0.83 L /min) で 1CV (カラム体積) の平衡バッファーを通液した。
 2. 純水に 2%溶解したアセトン 16 mL (CV の 1 %体積) をカラムに 30 cm/h(0.35 L/min) の流速で通液した。
 3. 平衡バッファーを 1.3 CV で通液して、アセトンを溶出させた。

カラム充填後の評価結果を Table 2 に示す。

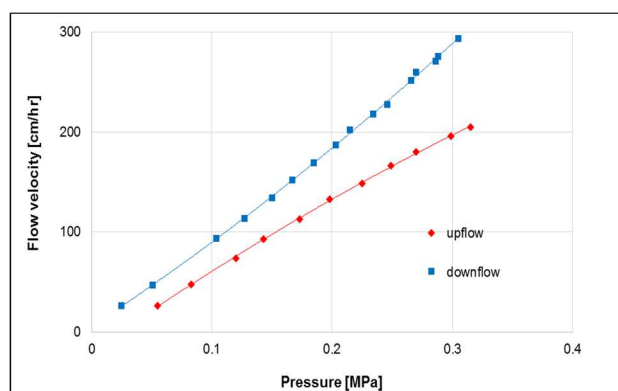
Table 2, 内径 30cm カラムの評価結果

充填圧 (MPa)	Cf	N (m ⁻¹)	A _s	RPH*
0.25	1.20	3200	1.15	4.47
0.20	1.20	3600	1.29	3.93
0.15	1.20	4000	1.16	3.57
0.15	1.18	4300	1.15	3.31
0.15	1.15	2100	1.07	6.91

* 還元理論段数

この実験の結果、Cf 値が 1.18~1.20 で理論段数が最適であった。同様に Fig. 2 で示されるように圧力-流速カーブを評価した。

Figure 2, 内径 30cm カラムの圧力-流速特性



以上の結果から Cf 値 1.2 でカラム充填した場合、理想的なカラム充填となった。またこのときのダウンフローの通液性は 0.3MPa で 275cm/h の流速で通液することができた。

内径 45cm カラムの充填事例

- カラム：45 cm ID x 23.0 cm (カラム体積 36.6 L)
- 充填濃度：50 %スラリー
- 充填方法：
 1. カラムにバッファーを少量加えて下部流出口から空気を除去。
 2. ゲルスラリーをカラムに投入後、下部

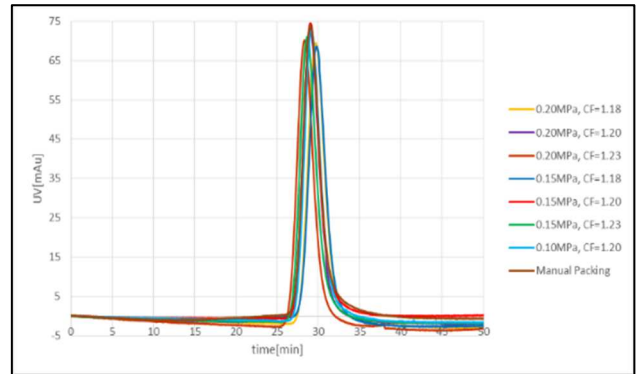
流出口を開ける。

4. 自然落下でゲル上面が安定するまで静置後(23 cm カラム高さ)、上部アダプターをカラムに設置して純水を 30 分通液した。このときカラム圧力は 0.10~0.20 の圧力で通液した。

- 上部フィルターを下げていき、Table 3 に記載される目的の Cf 値になるように圧縮させた。
 - 充填後のカラム評価：
 1. 流速 75 cm/hr (1.9 L /min) で 1CV の平衡バッファを通液した。
 2. 純水に 2%溶解したアセトン 37 mL (CV の 1 %体積) をカラムに 30 cm/h(1.03 L/min)の流速で通液した。
 3. 平衡バッファを 1.3 CV で通液して、アセトンを溶出させた。
- カラム充填後の評価結果を Table 3 および Fig. 3 に示す。

充填圧力が 0.15 MPa の条件で Cf 値が 1.2 の場合、理論段数が最も高い理想的な充填条件となった。

Figure 3, Table 3 検証時のサンプルピーク結果



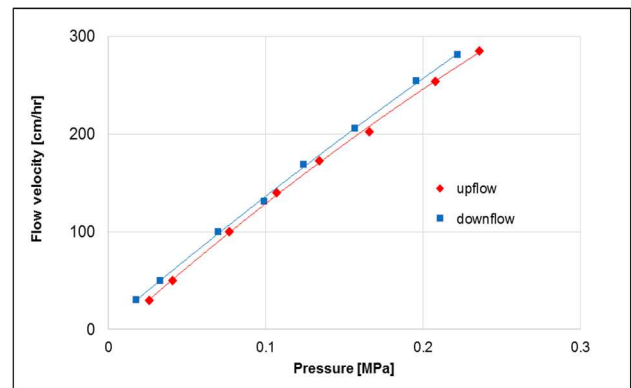
内径 45cm カラムの圧力-流速特性カーブを Fig. 4 に示す。

Figure 4, 内径 45 cm ID x カラム高さ 19.1 cm の場合の圧力-流速特性

Table 3, 内径 45cm カラムの評価結果

充填圧 (MPa)	Cf	N [m ⁻¹]	As	RPH
0.20	1.18	4900	1.19	2.91
0.20	1.20	5000	1.18	2.85
0.20	1.23	5000	1.21	2.88
0.15	1.18	5200	1.16	2.75
0.15	1.20	5300	1.25	2.67
0.15	1.23	5100	1.30	2.82
0.10	1.20	5300	1.25	2.69
Manual*	1.20	5000	1.24	2.88

* 圧縮させない条件で充填した



以上の結果から Cf 値 1.2 でカラム充填した場合、理想的なカラム充填となった。またこのときのダウンフローの通液性は 0.3MPa で 300 cm/h (7.9 L/min)の流速で通液することができた。

結果と考察

このテクニカルノートでは内径 45cm x カラム高さ 20 cm までのセルファインサルフェイトの効果的な充填方法を紹介した。今回の結果では、内径 45cm カラムにおいて、Cf 値が 1.15~1.25 の条件でアシンメトリーが 0.96~1.29 となり、ピークの理想的な対称性を示すことができた。圧力-流速特性カーブから 0.3 MPa の操作圧で 300cm/h の通液性を確保することができた。

今回の検討においては、充填用バッファーは純水を用いた。このためセルファインサルフェイトの充填は簡便に行うことができる。

セルファインサルフェイトは機械的な安定性が高く、小型カラムからプロセススケールの大型カラムに至るまで簡単に充填することができる。

このテクニカルノートに記載された方法を用いることでスケールアップにも簡単に対応することができることが証明された。セルファイン全般においてもこれらの方法を用いることで簡便に充填することができる。

ご注文の案内

Description	Quantity	Catalogue No.
Cellufine Sulfate	5 x 1 mL (mini-column)	19845-51
	1 x 5 mL (mini-column)	19845-15
	10 mL (sample)	676 943 324
	50 mL	19845
	500 mL	19846
	5 L	19847
	10 L	19849

お問い合わせ/テクニカルサポート

(北米 & ヨーロッパ)

JNC America, Inc.
555 Theodore Fremd Ave,
Rye, NY 10580

Tel: 914-921-5400
Fax: 914-921-8822
Email: cellufine@jncamericany.com

(日本、アジア、その他)

JNC 株式会社
ライフケミカル事業部
〒100-8105
東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号
新大手町ビル 9 階
Tel: 03 3243 6150
Fax: 03 3243 6219
Email: cellufine@jnc-corp.co.jp

ホームページアドレス: <http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>