

セルファイン サルフェイトを用いた ヒトコロナウイルス OC43 の精製事例

β コロナウイルス属の濃縮・精製を可能とするアフィニティークロマトグラフィー担体

ワクチンと臨床診断の進歩により、高度に精製され濃縮された大量のウイルス粒子に対する需要が高まっています。セルファイン サルフェイトはクロマトグラフィー担体です。このため面倒な時間がかかり、潜在的に危険な従来の超遠心分離および密度勾配法を回避することができます。また、ウイルス濃度と純度を大幅に向上させることもできます。カラムに吸着した物質は、イオン強度を増加させることで簡単に溶出できます。

セルファイン サルフェイトは、表面が硫酸基で修飾された低多孔性セルロース粒子をベース担体としています（図1）。この粒子構造は、卵または細胞培養由来のサンプルに含まれる非特異的なタンパク質吸着を最小限に抑えます。一方で分子サイズの大きな (> 100 nm) ウイルス粒子は表面吸着しますので、ウイルス粒子の精製に最適化された構造です。粒子表面のSEM分析（図2）から、ウイルス粒子がセルロース粒子表面をコーティングするように覆っていることが判ります。

ヒトコロナウイルス OC43 (hCoV OC43) は、一般的な風邪の原因ウイルスです。hCoV OC43 は、ゲノム配列に基づく分類によれば、SARS-CoV、SARS-CoV-2、MERS-CoV を含むβ コロナウイルス属に分類されています。このレポートでは、ウイルス精製の経験が豊富なセルファイン サルフェイトによる hCoV OC43 の精製例を紹介します。COVID-19 の原因ウイルスを含むβ コロナウイルス hCoV OC43 は、セルファイン サルフェイトで高純度に精製されました。セルファイン サルフェイトは、β コロナウイルス属の精製に有効なクロマトグラフィー担体です。

図1 セルファイン サルフェイトのリガンド構造

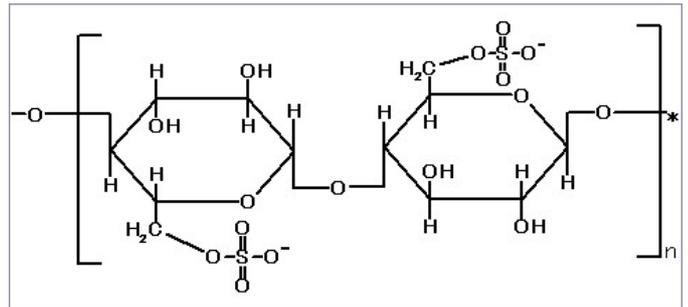
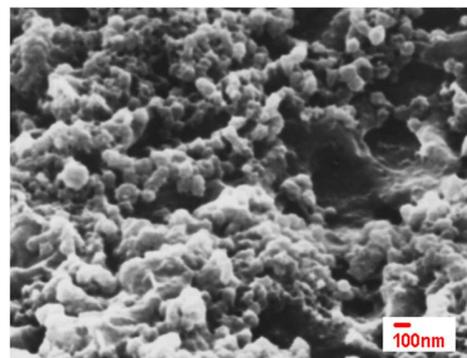


図2 インフルエンザウイルス粒子が吸着したセルファイン サルフェイトの表面構造（SEM分析）



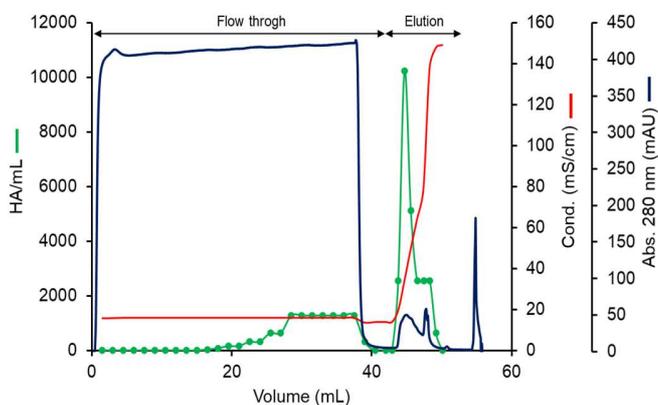
ウイルス株： A/duck/Hokkaido /Vac-2/04 (H7N7)

1. hCoV OC43 ウイルス粒子の精製

ペロ細胞で培養されたヒトコロナウイルス OC43 (hCoV OC43) は、セルファイン サルフェイトでの精製の前に、 β -プロピオラクトンで不活化した。

カラム (ID 0.5 mm x H 1.5 cm) に 0.3 mL のセルファイン サルフェイトを充填した。0.3 mL / min の流速で平衡化バッファー (10 mM リン酸バッファー、150 mM NaCl pH 7.4) で平衡化した。125 CV の清澄化したウイルス培養上清 (0.45 μ M PVDF フィルター) をカラムにロードして、hCoV OC43 ウイルス粒子を吸着させた。サンプルロード後、カラムを 10 CV の平衡化バッファーで洗浄し、弱く結合した不純物を洗浄した。次にカラムに吸着した hCoV OC43 を、溶出バッファー (10 mM リン酸バッファー、2.0 M 塩化ナトリウム、pH7.4) で溶出した。溶出サンプルを回収して、ウイルス粒子、宿主細胞由来 DNA、およびタンパク質の回収率を調べた。セルファイン サルフェイトによる hCoV OC43 精製時のクロマトグラムを示す (図 3)。

図 3 セルファインサルフェイトによる hCoV OC43 の精製



カラム条件

ロードサンプル: hCoV OC43 (ペロ細胞由来)

サンプルロード量: 125 CV

カラム: ID 5 mm x 1.5 cm (0.3 mL)

流速: 0.3 mL/min

平衡化:

10 mM リン酸バッファー, 150 mM NaCl, pH 7.4

溶出:

10 mM リン酸バッファー, 2.0 M NaCl, pH 7.4

溶出 1: グラジエント (0→50%), 15 CV

溶出 2: イソクラティック (100%), 10 CV

2. 血球凝集力価 (HA 価) によるウイルスの評価

カラム溶出後のウイルスは、血球凝集力価 (HA 力価) によって定量評価した。NaCl を用いたグラジエント溶出により、hCoV OC43 は約 30 mS / cm の導電率で溶出され、回収率は 77% だった (表 1)。10% のブレイクスルーポイントでの動的結合容量 (DBC) は、0.3 mL / min (92 cm / h、滞留時間 0.95 分) の流速で 76,200 HA / mL-カラムであった。

表 1 サルフェイトによる hCoV OC43 の回収率と吸着量

回収率 (%)	動的吸着量 (HA/mL-カラム) *
77	76,200

* 10% ブレイクスルーポイントでの動的吸着量

3. 宿主由来 DNA とタンパク質量の評価

不純物の除去を評価するために、溶出画分の宿主由来 DNA およびタンパク質の回収率は、PicoGreen®およびタンパク質アッセイによって評価した。評価結果を表 2 および表 3 に示す。

表 2 精製後の宿主由来 DNA の残存量

画分	DNA (μg)	DNA 回収率 (%)	DNA 残存量 (pg/HA)
ロードサンプル	84	100	1758
フロースルー	75	89	4433
溶出	7	9	312

宿主細胞に由来する DNA は、リン酸基に由来する負電荷を持っている。またセルファイン サルフェイトは、硫酸エステル基をリガンドとして使用しているため、負の電荷を持っている。このため DNA はセルファイン サルフェイトに吸着されることなくフロースルー画分に蓄積される。この研究では、DNA の 89%がフロースルー画分に蓄積された。

表 3 精製後の宿主由来タンパク質 (HCP) 残存量

画分	タンパク質量 (μg)	タンパク質回収量 (%)	タンパク質残存量 (pg/HA)
ロードサンプル	1.96	100	41
フロースルー	0.49	25	29
溶出	0.38	20	16

これらのタンパク質画分にはウイルス由来のタンパク質が含まれている可能性があるため、最終的な溶出画分の純度を確認するには、ウエスタンブロッティングによる評価が必要となる。この研究では、タンパク質の 80%以上がロードサンプルから除去された。

まとめ

セルファイン サルフェイトはウイルスやウイルス様粒子の精製に広く使用されているアフィニティークロマトグラフィー担体です。セルファイン サルフェイトは生理学的な pH および導電率の洗浄バッファーを使用して、多くの非特異的な汚染物質を除去することができます。さらに中性 pH の高塩濃度バッファーを使用してウイルスを溶出するため、ウイルスの不活化を抑えることができます。これらの特性により、日本脳炎、狂犬病、インフルエンザウイルスなどのエンベロープをもつウイルスの精製に好適に使用できます。このためセルファイン サルフェイトは、世界中の多くのウイルスワクチンメーカーで広く使用されてきました。

今回の検討では COVID-19 の原因ウイルス SARS-CoV-2 を含む β -コロナウイルス属のメンバーであるヒトコロナウイルス OC43 を、1つのクロマトグラフィー担体で高純度に精製することができました。この研究では、宿主細胞由来 DNA の 92% と宿主細胞由来タンパク質の 80% が、ベロ細胞培養サンプルから除去されました。また溶出画分のウイルス回収率は 77% を維持しました。これらの結果は、hCoVOC43 がセルファイン サルフェイトを用いて培養上清から容易に精製できることを示しています。

この結果はセルファイン サルフェイトを精製工程に用いることで β コロナウイルス属の迅速なワクチン開発が可能であることを示しています。JNC はセルファイン サルフェイトを通じて人類のコロナ禍の克服と全世界の健康的な生活へ貢献してまいります。

製品に関する情報案内

セルファイン サルフェイト

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/grade/grade-1-sulfate/>

取扱説明書および技術資料は以下のホームページから pdf でダウンロードできます。

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

本事例に役立つ製品のご紹介

セルファイン ET クリーン - 生理学的 pH、 $\mu = 0.02 \sim 1.0$ のイオン強度、および $0 \sim 25^\circ\text{C}$ で細胞産物溶液からエンドトキシンを除去できます。

セルファイン ET クリーン S (排除限界分子量: 2,000 Da)

セルファイン ET クリーン L (排除限界分子量: $> 2 \times 10^6$ Da)

https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/guide/pdf/affinity/TD_ET_clean_N1_V7_J.pdf

セルファイン GH-25 脱塩担体 - 多孔質、球状、高度に架橋されたセルロース粒子です。排除限界分子量は 3kD のため、タンパク質は粒子外に通過しますが、分子量の小さい塩類は内部細孔に入り分子ふるいにより脱塩することができます。

https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/guide/pdf/gel/TD_GH-25_N1_V5_J.pdf

ご注文の案内

製品名	パックサイズ	カタログ No.
セルファイン サルフェイト	5 x 1 ml ミニカラム	19845-51
	1 x 5 mL ミニカラム	19845-15
	10 mL	676943324
	50 mL	19845
	500 mL	19846
	5 L	19847
	10 L	19849

各種お問い合わせ、技術に関するご案内

(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

PicoGreen®は Thermo Fisher Scientific の登録商標です。