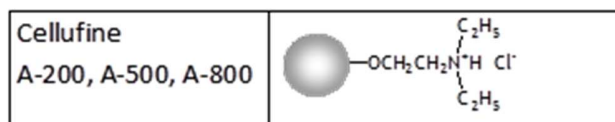


Cellufine™ A-500

イオン交換クロマトグラフィー充填剤セルファイン A-500 のカラム充填方法

セルファインA-500は簡便で汎用性の高い弱陰イオン交換クロマトグラフィー充填剤です。リガンドの化学式を図1に示します。ベース担体は真球状の多孔質架橋セルロース粒子（排除限界分子量500 kDa）を使用しています。セルロースは分子内の水酸基で結晶構造を取ります。この構造が化学薬品に極めて安定で、物理的強度が高い特徴を示します。このためセルファインA-500はカラム充填後も低圧力で高流速を流すことができる優れた物理強度を保持しています。内径2メートルの大型カラムでの使用においても十分に使用することができる汎用性を兼ね備えた担体がセルファインA-500の大きな特徴と言えます。

図 1 セルファイン陰イオン交換体のリガンド構造



今回のカラム充填事例では小スケールカラムから内径30cmカラムまでの充填事例を紹介します。

フローパッキング - 少なくともカラム操作で設定した最大流速の 150 %の流速で充填する。ただし流入口の圧力は 0.3MPa を超えないこと。スラリー流入口を備えた大型カラムの場合、充填するスラリー体積に応じた高さに上部アダプターを設置して

おく。カラム内を適切なパッキングバッファーで満たした後、スラリーを上部アダプターのスラリー流入口よりカラム内に移送する。充填用バッファーによりポンプと流路にあるスラリーを移送する。空気が配管内に入らないように注意すること。スラリーの移送後、充填用バッファーでカラム操作時の最大圧力をかけてカラムを圧縮していく。その後、上部アダプターを充填剤の表面に接着するまで下げていく。

Note: 上部アダプターはカラムケーキ表面から 0.5cm 程度まで押し込むこと。

フローパッキング後のアキシャルコンプレッション - 上述したフローパッキングの後、アキシャルコンプレッションで充填剤を圧縮する。操作流速の 150%程度の流速で移動相を 2CV 流した後、上部アダプターを上述したように充填剤表面に接着するように下げていく。その後、下部フィルターを上げて、適切なカラム体積になるようにカラムを圧縮していく（アキシャルコンプレッション）。このとき操作圧力は 0.3MPa を超えないこと。

アキシャルコンプレッション - カラム上部の圧力は 0.3MPa を超えないこと。アキシャルコンプレッションによって最大流速で圧縮された充填剤の表面の高さになるまで上部アダプターを下げていく。

フローパッキングの詳細手順

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。同時にカラムの流路も洗浄しておく。

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パッキング用のバッファを加えて懸濁する。

4) 自然沈降体積を測定するために、スラリーの一部を 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。自然沈降体積を測定して正確なスラリー濃度を計算する。計算式は以下の通り。

スラリー濃度% = 自然沈降カラム体積 / 全体積

5) スラリー濃度が 50% になるようにパッキング用バッファ量を調節する。

6) カラムに充填する 50%スラリー量は以下の計算式で算出できる。

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

$Cf = \text{自然落下沈降体積} / \text{パッキング体積}$

例えば、100mL のカラム体積に充填する場合、Cf が 1.15 で最適なパッキング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) **手動カラムへのパッキング**：下部アダプターを所定の位置に取り付ける。カラム底部を開けた後、バッファ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シリンジやポンプで除く。空気が入らないようにバッファはカラム底部から 1cm 程度は残して置くが良い。

8) 必要に応じて、リザーバーをカラムの上部に設置した後、スラリーの全量をカラムに加える。

Note：手動でのパッキングの場合、均一な充填を達成するために、スラリーは一気にカラムに加えること。

9) カラム底部のエンドフィッティングを閉める。

10) 空気がゲル内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。

Note：カラムに注ぎ込む際には空気が入らないようにカラムの壁を伝わせたり、ガラスピペットなどを伝わせると良い。

11) カラム底部のエンドフィッティングを開けてゲルを沈降させる。ゲルが沈降すると、充填用バッファよりもゲルの方が早く沈降するため液面が透明になる。2～3 cm までバッファが透明になったらカラム底部のエンドフィッティングを閉じる。

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) 上部アダプターの準備をする。シリンジなどを利用して上部アダプターの流路に存在するすべての空気を除去して充填用バッファで満たしておく。

Note：上部アダプターに三方バルブを設置すると、空気の除去が簡便になり、カラムへの空気の流入を防ぐことができる。

14) カラムに上部アダプターを設置する。カラム内への空気の混入を避けるため、三方バルブから空気を除去していく。

15) パッキングバッファを 200 cm/h で 30～60 分通液して充填剤を圧縮していく。

Note：この段階ではカラムの背圧*が 0.15～0.25 MPa になるように流速を調節すること。この流速は安定的なカラムパッキングを保証するために、充填後の操作流速よりも高流速である必要がある。

*この圧力は充填剤を含むカラムシステム全体の

圧力である。充填剤にかかる圧力を確認するには、事前に充填剤を加えない条件でカラムを組み立てて背圧を確認しておくが良い。圧力損失はカラム入口側の圧力計で測定すること。

16) ゲルの高さが安定した後、通液を止める。次いで流入口を閉じる。その後カラム上部アダプターの三方バルブから充填用バッファが流れるように流路を変更する（上部アダプターは外さないこと）。ゆっくりと上部アダプターを下げていく。三方バルブから空気と充填用バッファがあふれてくるようになる。上部アダプターを充填剤の表面の位置まで下げていく。

17) 三方バルブを変更して充填用バッファがカラムに通液できるようにした後、カラム底部のエンドフィッティングを開けて流速 200cm/h で通液する。上部アダプターよりもベッドが縮む場合、上部アダプターを下げて調節する。

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。カラム体積は目標とするカラム体積に近づけるべきである。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に調製したスラリー濃度が薄い場合、ゲルが圧縮されすぎてコンプレッションファクターが計算よりも高くなっている可能性がある（ステップ 6 を参照のこと）。

19) 自動充填カラムまたは大型カラムの充填:

上部アダプターと下部アダプターを所定の位置に設置してカラムを組み立てる。下部アダプターを含む流路から空気を除くためポンプでパッキングバッファを送液する。

20) 上部アダプターを、充填モードに従っての目的のカラム高さまで下げる（上記を参照）。

21) カラム底部アダプターより充填用バッファを通液してカラムを満たしながら、上部アダプタ

ーから空気を完全に除去する。

22) 底部アダプターの流入口を閉じる。

23) 充填剤のスラリーを準備し（ステップ 6 を参照）、スラリータンクに用意する。

24) スラリー移送ポンプとカラムアダプターのパッキングノズルまでの流路をスラリーで満たす。

Note: 必要なスラリー量の計算にはこの前準備分のスラリーを確保しておくこと。

25) パッキングノズルをカラムに接続する。カラム充填バルブを開放して、スラリーの移送を開始する。

26) 充填用バッファをカラムの上限の速度（または圧力）で流す。

27) カラム内の充填剤の表面まで上部アダプターを下げていく。; A) フローパッキングの場合、ステップ 15 に記載の様に、パッキングバッファを通液してゲルを圧縮させた後、一定圧力で安定した位置までアダプターを下げていく。

B) アキシシャルコンプレッションの場合、ステップ 6 で計算した目標カラム高さまでアダプターを油圧で自動調節していく。C) 固定長カラムパッキングの場合、上部アダプターは目的の位置にある。高背圧に達し、スラリーポンプが停止するまで、充填剤をカラムに注入していく。

28) カラム底部の流出口を開き、上部アダプターから充填用バッファの送液を再開する。ベッドの高さが安定するまで送液を続ける（カラム高さが目的の高さにならない場合、ステップ 18 を参照すること）。

29) カラムパッキングを評価するために、カラム体積の 1% 液量の 2% アセトン（純水に溶解）または 1M 塩化ナトリウムを 30cm/h の流速でカラムに通液する。ピーク形状から HETP とアシンメトリー (As) を算出して評価する。

セルファインイオン交換クロマトグラフィーの特長

セルファイン陰イオン交換クロマトグラフィー充填剤の基本的な特徴を表1に示す。すべての製品は架橋セルロース粒子で、平均粒径は90 μ mである、図2は陰イオン交換クロマトグラフィー充填剤セルファインA-500の典型的な粒度分布を示している。

表 1 セルファインイオン交換クロマトグラフィー充填剤の特長

特性	A-200	A-500	A-800
ベース基材	架橋セルロース		
粒子サイズ (μ m)	40-130		
イオン交換リガンド	弱陰イオン - DEAE (ジエチルアミノエチル基)		
排除限界分子量 (kDa)	> 30	> 500	>1000
操作圧力	< 0.3 MPa		
イオン交換容量 (meq/mL resin)	0.13 - 0.18	0.13 - 0.17	0.05-0.08
BSA*吸着量 (mg/mL resin)	45	58	82
IgG**吸着量 (mg/mL resin)	38	40	68

吸着量測定条件

カラム : 5 mmID x 5 mL column

流速 150cm/h

* 吸着バッファの組成 : 1 mg/mL BSA in 50 mM Tris HCl, 50 mM NaCl pH 8.5

**吸着バッファの組成 : 1 mg/mL IgG in Tris HCL, 50 mM NaCl pH 9.5.

吸着量は動的吸着量 (DBC) の測定を示している。10%ブレイクスルー時の吸着量を測定。

図 2. セルファイン A-500 の粒度分布

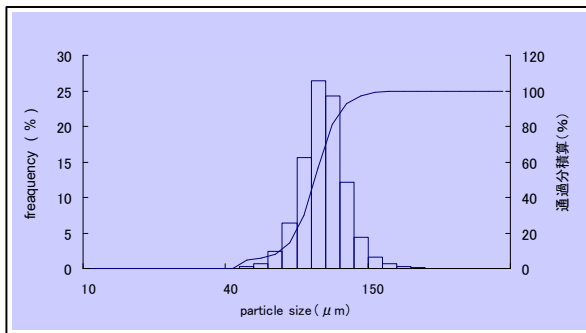
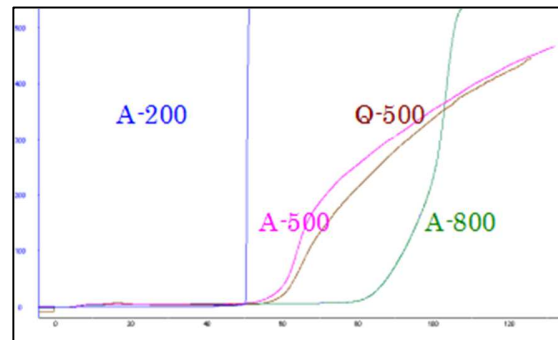


図 3 陰イオン交換体のブレイクスルーカーブ



カラム: 5 mmID × 5 cmL

流速: 150 cm/h

サンプル: 1 mg/ ml BSA

バッファー:

A-200, A-500, A-800: 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)

Q-500: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 50 mM NaCl

セルファイン A-200 はセルファイン陰イオン交換クロマトグラフィー充填剤の中で最も細孔サイズが小さい。このため標的物質の吸着・脱着は粒子の表面で行われる。このため図 2 で示されるようにブレイクスルーカーブは極めてシャープに立ち上がる。セルファイン A-200 はフロースルーモード（標的物質を素通りさせて不純物を吸着させる方法）で使用することができる。**セルファイン A-500** は流速特性が高く製造ケールで優れた性能を発揮する。大きな細孔を有するため抗体のような大きな分子（分子量 150 kDa）が細孔内に入って吸着するため優れた吸着量を示す。**セルファイン A-800** はさらに大きな細孔サイズを有している。チログロブリン（分子量 660kDa）のような極めて大きなタンパク質への吸着量に優れた性能を発揮する。

内径 3.2 cm カラムのフローパッキング事例

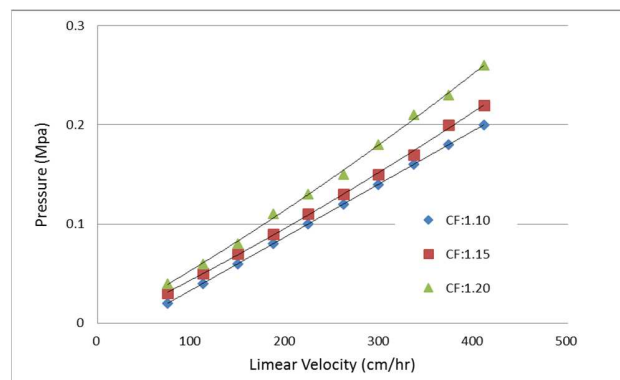
- カラム: 3.2 cm ID x 25 cm L (Millipore Vantage Column)
- 充填用バッファー: 純水 (25°C)
- 充填条件: 50 % (v/v) スラリーを流速 54 ml/min (403 cm/hr) でカラム高さが安定になるまで通液
- アキシャルコンプレッション: カラム高さが 20cm (カラム体積 = 161 mL) になるまで手動で圧縮

内径 3.2cm カラムに充填されたセルファイン A-500 の充填状態および流速特性を異なる Cf 評価した (表 2、図 3)。カラム充填状態は 2%アセトン を 4ml/min でインジェクションすることで評価した。

表 2 各 Cf 値におけるピーク特性

Cf	N (m ⁻¹)	A _s
1.10	2,600	1.27
1.15	3,200	1.17
1.20	2,900	1.29

図 3 内径 3.2 cm カラムの流速特性



このカラムではコンプレッションファクター (Cf) 1.10~1.20 の範囲で良好な充填をすることができた。また操作圧 0.3MPa 以内で操作することが可能であった。

内径 4.4cm カラムの手動パッキング事例

- カラム: 4.4 cm ID x 25 cm L (Millipore Vantage Column)
- パッキングバッファー: 純水 (25°C)
- パッキング条件: 50 % (v/v) スラリーを Cf 値=1.15 (カラム高さ 24.7 cm → 21.5 cm) の条件で手動圧縮した (上部アダプターの流出口を開いた後、上部アダプターを 21.5cm のカラム高さまで下げる)
- 2%アセトン水溶液を用いて、カラムパッキング状態を評価した (流速 4 ml/min で測定)

表 3 セルフライン A-500 の内径 4.4cm カラムでのパッキング試験

Cf	N (m ⁻¹)	A _s
1.15	6100	0.86

内径 30cm カラムのフローパッキング事例

- カラム: 30 cm ID x 50 cm L (Easy Column300)
- パッキングバッファー: 純水 (25°C)
- パッキング条件: 50 % (v/v) スラリーを圧力 0.15、0.20、0.25 MPa の条件で 30 分通液する
- パッキング状態の評価:
 1. カラムを純水で流速 75 cm/hr (0.83 L /min) で 1CV 通液して平衡化する

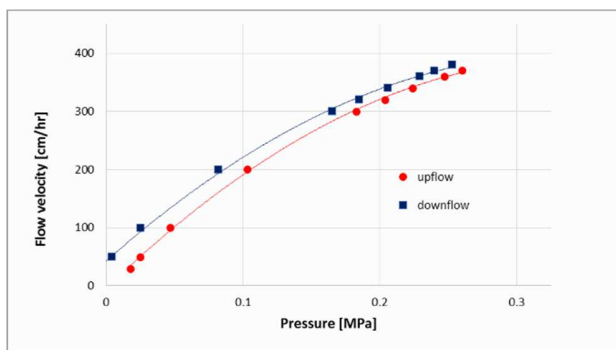
2. 150mL の 2%アセトン水溶液を流速 30 cm/h でインジェクション
3. 流速を維持したまま、純水を 1.3CV 通液する

内径 30cm カラムでのパッキング状態および流速特性を異なる圧力で充填した場合の変化を検討した (表 4、図 4)

表 4 内径 30 cm カラムのパッキング状態

図 4 内径 30cm カラムの流速特性

操作圧 (MPa)	Cf	N (m ⁻¹)	A _s	RPH*
0.15	1.125	4,600	1.25	2.41
0.20	1.150	5,300	1.20	2.12
0.25	1.175	5,500	1.37	2.03



* 還元理論段数

上記の結果からセルファイン A-500 を内径 30cm カラムでパッキングした場合、いずれの条件においても良好なパッキング状態であった。図 4 では移動相をアップフロー、ダウンフローで通液した場合の流速特性を示している。

結論

セルロースは分子構造上、結晶化する天然多糖である。そしてその構造がクロマトグラフィー充填剤としての化学薬品に対する安定性や機械的強度を生み出している。セルファインイオン交換クロマトグラフィー充填剤は様々なサイズのカラムに簡単に充填できる。またフローパッキング、アキシシャルコンプレッション、固定長カラムパッキングなど様々な充填方法でも充填可能である。セルファイン A-500 のコンプレッションファクター (Cf) は 1.125~1.200 で良好な充填状態となる。また流速 400 cm/h の条件でも操作圧力 0.3MPa の範囲内で操作することが可能である。

ご注文の案内

製品名	容量	カタログ No.
セルフライン A-200	5 x 1 ml mini-column	19611-51
	100 mL	676980327
	500 mL	19611
	5 L	19612
	10 L	676980335
セルフライン A-500	5 x 1 ml mini-column	19805-51
	1 x 5 mL mini-column	19805-15
	100 mL	675980327
	500 mL	19805
	5 L	19806
セルフライン A-800	10 L	675980335
	5 x 1 ml mini-column	19865-51
	1 x 5 mL mini-column	19865-55
	100 mL	673980327
	500 mL	19800
セルフライン Q-500	5 L	19801
	10 L	673980335
	5 x 1 ml mini-column	19907-51
	1 x 5 mL mini-column	19907-55
	100 mL	675982327
セルフライン C-500	500 mL	19907
	5 L	19908
	10 L	675982335
	5 x 1 ml mini-column	19800-51
	1 x 5 mL mini-column	19800-55
セルフライン S-500	100 mL	675983327
	500 mL	19865
	5 L	19866
	10 L	675983335
	5 x 1 ml mini-column	21200-55
セルフライン S-500	1 x 5 mL mini-column	21200-15
	100 mL	21200
	500 mL	21201
	5 L	21202
	10 L	21203

ご購入/技術サポート

(北米)

JNC America Incorporated
555 Theodore Fremd Avenue, Suite
C-206
Rye, NY 10580 USA
TEL: 914-921-5400
FAX: 914-921-8822
E-mail: 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: +81-3-3243-6150
Fax: +81-3-3243-6219
E-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

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 : 3-3243-6219

eメール: cellufine@jnc-corp.co.jp

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