

セルファイン™による *Streptococcus pneumoniae* 血清型 19F の莢膜多糖類の精製

肺炎連鎖球菌は、世界中で特に子供や高齢者に高レベルの罹患率と死亡率を引き起こしている肺炎の主要な病原体の 1 つです。最も重要な毒性因子の 1 つである細菌表面の莢膜多糖（CPS）に基づく肺炎球菌ワクチンは、これらの感染症を予防するために使用されています。従来のエタノール沈殿は、ほとんどの血清型に適した CPS を精製するための一般的なプロセスです。ただし、それらは複雑で時間がかかります。その結果、肺炎球菌ワクチンは非常に高価となります[1]。これらの欠点を克服するために、多くの改善されたプロセスが提案されています。これらのプロセスのいくつかには、クロマトグラフィープロセスが含まれます。ここでは、エタノール沈殿のない CPS の単純化された 2 段階クロマトグラフィー精製プロセスを提案します（図 1）。このプロセスには、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）

および陰イオン交換クロマトグラフィー（AEX）が用いられています。このプロセスに最適化された 2 つのクロマトグラフィー担体セルファイン MAX ブチル HS とセルファイン MAX Q-hv を紹介します。



図 1 CPS 精製プロセスの提案

方法と材料

粗精製多糖サンプル調製

脱線維羊血を 5 % 含んだトリプティックソイ寒天培地を用いて、*Streptococcus pneumoniae* 19F (ATCC 49619) を 37℃ で 24 時間培養した。ブレインハートインフュージョン培地 2000 mL にコロニーを接種し、37℃、24 時間培養した。

その後、10% (w/v) のデオキシコール酸ナトリウムを加え、37℃ で 24 時間培養し、細胞を溶解させた。遠心分離（12,000rpm、15 分）およびろ過（酢酸セルロース 0.45 μm）で上清を回収し、MilliQ 水を用いたクロスフロー限外ろ過（PES、10 万 MWCO）により濃縮した。この濃縮液に 50% 飽和硫酸アンモニウムを加え、4℃ で 24 時間インキュベートした。遠心分離（12,000rpm、15 分）及びろ過（酢酸セルロース 0.45 μm）により上清を回収した。この上清は次の HIC 工程に使用した。

クロマトグラフィー工程

今回使用したクロマトグラフィー担体は、Super Edge Empty Mini Columns (6.7 mmID×30 mmH, 1.06 mL = 1 column volume (CV)) に充填した。クロマトグラフィーには AKTA avant25 システムを用い、後述の条件で精製試験を実施した。

HIC 工程は、流速 0.212 mL/min (滞留時間 5.0 min)、フロースルーモードで実施した。2.0M 硫酸アンモニウム含有 50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH6.8) でカラムを平衡化した。多糖類 726 μ g/mL、タンパク質 73.4 μ g/mL、核酸 772 μ g/mL を含む粗製多糖サンプル液を 40CV 添加し、10CV の平衡化バッファーで洗浄した。非吸着画分をフロースルーおよび洗浄画分として回収した。この回収液を、MilliQ 水を用いたクロスフロー限外ろ過装置 (PES、100,000 MWC0) で透析し、サンプルを濃縮した。

AEX 工程は、流速 0.424 mL/min (滞留時間 2.5 分) の吸着&溶出モードで実施した。カラムは 50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH6.0) で平衡化した。HIC 工程後のサンプルをバッファー交換した後、10%ブレイクスルーまでロードし、15CV の平衡化バッファーで洗浄した。吸着したサンプルは、1.0 M NaCl 含有 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) を用いてステップワイズで溶出した (32%, 20CV→100%, 20CV)。最初のステップで溶出した画分は最終 CPS サンプルとして回収した。

精製後の評価

多糖類 (Ps) の量はアンスロン硫酸法で測定し、不純物 (タンパク質および核酸) の量は、WHO Technical Report Series に従って測定した。タンパク質 (Pr) は、プロテインアッセイキット (Bio-Rad Laboratories) を用いてブラッドフォード法で測定した。核酸 (NA) は 260nm の吸光光度法で測定し、1AU=50 μ g/mL とし、核酸量を算出した。

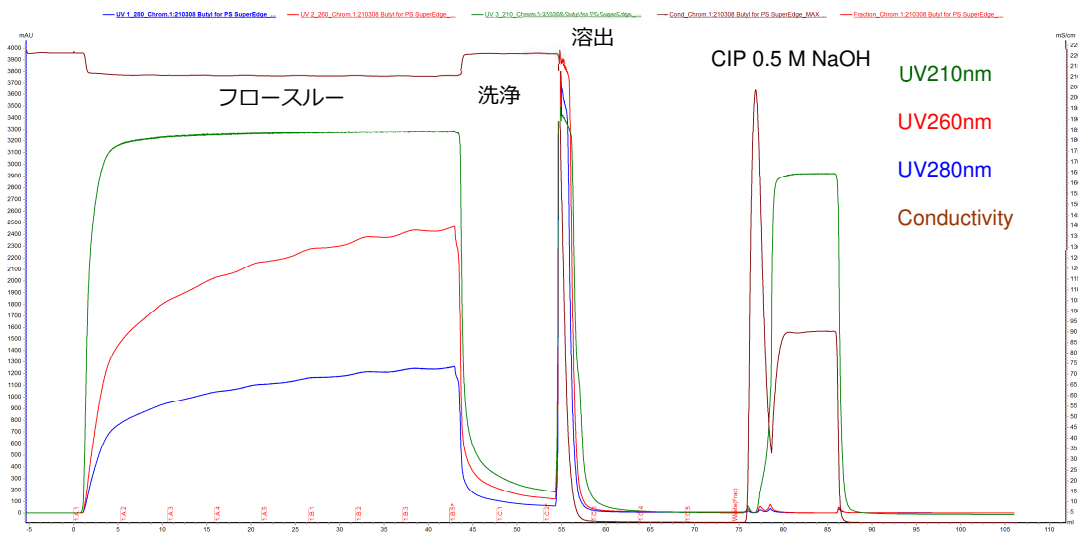
結果及び考察

セルファイン MAX ブチル HS を用いた HIC 工程のクロマトグラム及びフラクション分析の結果を図 2 に示す。また他の HIC 担体との比較を表 1 に示す。この工程では、多糖類のほとんどがフロースルーと洗浄画分に回収され、不純物の一部がフロースルー画分から除去された (図 2)。CPS 精製に最適なりガンド密度を持つセルファイン MAX ブチル HS は、他の樹脂と比較して、多糖類の回収率や不純物の除去が良好であった (表 1)。

	Ps μ g/mL	Ps Recovery%	Ps Purity%	Pr μ g/mL	NA μ g/mL	Pr/Ps %	NA/Ps%
要求規格	—	—	—	—	—	3	2
ロードサンプル	726	—	46.2	73.4	772	10	106
セルファイン MAX ブチル HS	518	89	54.3	N. D.	436	0	84
セルファイン MAX ブチル	500	86	52.6	7.91	444	2	89
他社品 A	510	88	51.9	7.24	466	1	91
他社品 B	450	77	48.5	3.97	474	1	105

表 1 異なる HIC 担体との精製比較

(a)



(b)

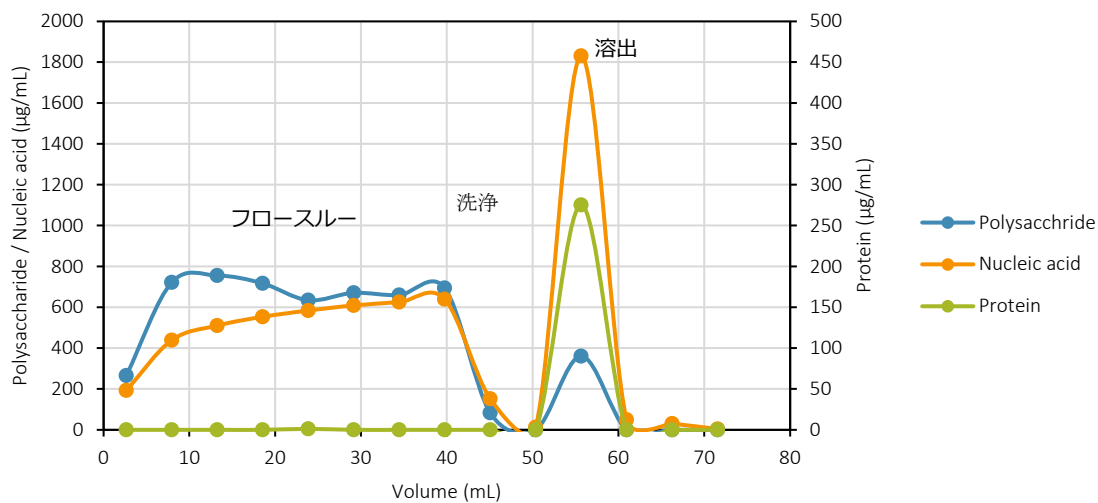


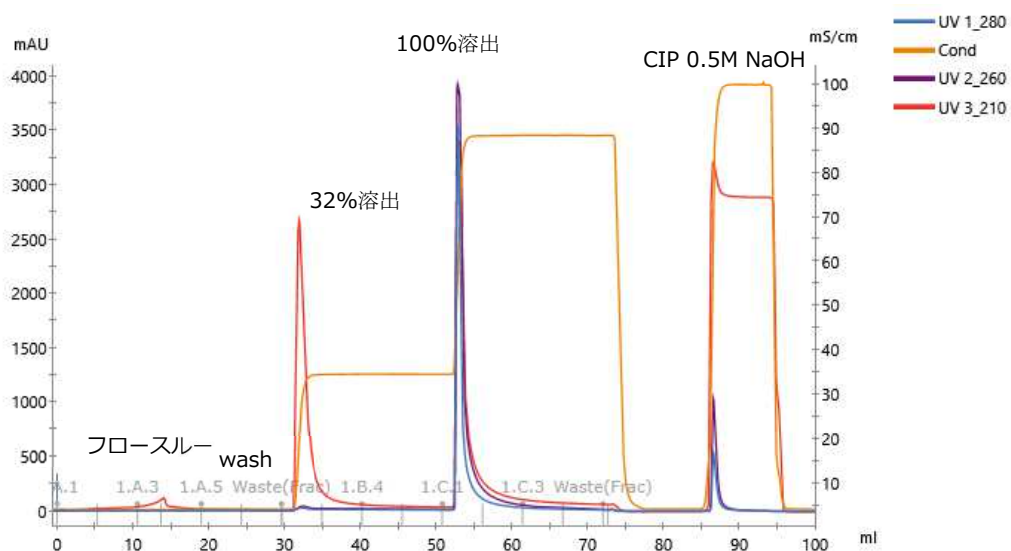
図2 セルファイン MAX ブチル HS を用いたクロマトグラム (a) およびフラクション分析結果 (b)

セルファイン MAX Q-hv を用いた AEX 工程のクロマトグラム及びフラクション分析の結果を図3に示す。また他の AEX 樹脂との比較を表2に示す。この工程では、第1ステップ（溶出バッファー32%）で多糖類が溶出し、第2ステップ（溶出バッファー100%）で不純物が溶出した。（図3）セルファイン MAX Q-hv は、多糖類の分離回収および不純物の除去に優れていた。（表2）

	10% DBC mg/mL-resin	Ps Recovery %	Ps Purity %	Pr μ g/mL	NA μ g/mL	Pr/Ps %	NA/Ps %
要求規格	—	—	—	—	—	3	2
ロードサンプル	—	—	75.6	5.13	162	1	31
セルフライン MAX Q-hv	6.39	97.8	98.7	N. D.	4.25	0	1
セルフライン MAX Q-h	6.56	63.1	99.3	N. D.	1.48	0	1
セルフライン MAX Q-r	5.01	83.2	96.3	N. D.	8.23	0	4
他社品 C	1.87	92.2	94.2	N. D.	5.30	0	6
他社品 D	4.46	94.9	96.8	N. D.	6.95	0	3
他社品 E	5.86	91.1	98.0	1.55	4.15	1	2

表 2 異なる AEX 樹脂との精製比較

(a)



(b)

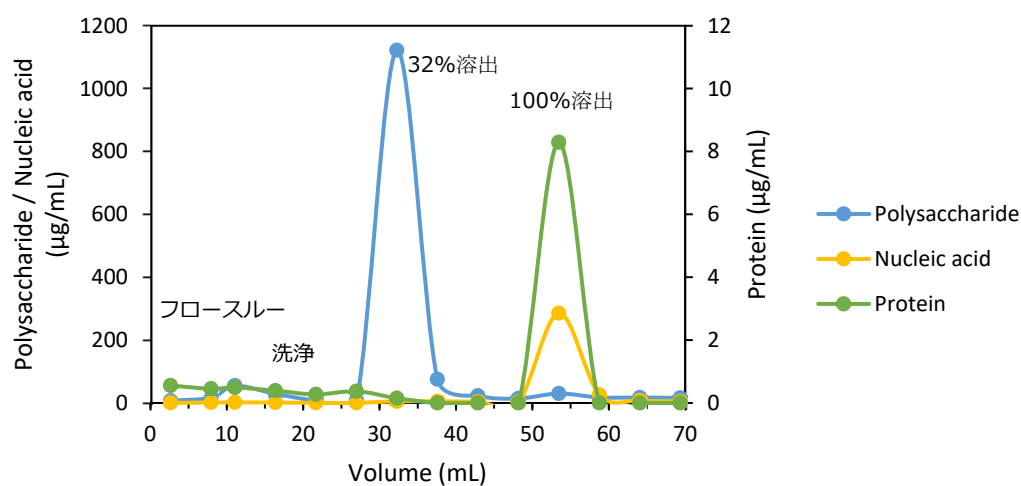


図 3 セルフライン MAX Q-hv を用いたクロマトグラム (a) およびフラクション分析結果 (b)

まとめ

2回のクロマトグラフィーで莢膜多糖を精製するという簡便なプロセスを紹介しました。このプロセスはエタノール沈殿を含まないため、より効率的です。セルファイン MAX ブチル HS およびセルファイン MAX Q-hv を用いることで、優れた分離と高い回収率を達成しました。

Reference 文献

- [1] Norma Suárez et al., Purification of Capsular Polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: Traditional and New Methods, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6 (2018), 145.
- [2] WHO (2009). Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Pneumococcal Conjugate Vaccines.

製品に関する情報案内 製品の詳細な情報はホームページを閲覧下さい。

セルファイン MAX ブチル HS

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

セルファイン MAX Q-hv

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

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/>

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 MAX ブチル HS	1ml x 5 (Mini-Column)	22200-51
	5ml x 1 (Mini-Column)	22200-55
	100ml	22200
	500ml	22201
	5 L	22202
	10 L	22203
セルファイン MAX Q-hv	1ml x 5 (Mini-Column)	22100-51
	5ml x 5 (Mini-Column)	22100-15
	100ml	22100
	500ml	22101
	5 L	22102
	10 L	22103

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