NanoGel-50Q HCイオン交換クロマトグラフィー媒体

製品紹介

大規模生物製薬の生産効率を向上させ、コストを削減するため、特に単クローン抗体（mAb）、ウイルス/ワクチン、および高分子量の再組換えタンパク質などの生物大分子の分離・精製ニーズに対応するために、前世代のNanoGel-50Qを基に、微粒子の精密製造技術により新世代の高性能イオン交換クロマトグラフィー媒体であるNanoGel-50Q HCを開発されました。優れた機械的強度、良好な化学的安定性、均一な粒径、およびオープンな超大孔構造を持つポリスチレン/ジビニルベンゼン（PS-DVB）微粒子を基材としており、表面の親水改質により非特異的吸着を低減し、独自の表面機能化技術を採用することで、高い結合容量、優れた耐アルカリ性、高流速、高分解能、低逆圧のクロマトグラフィー特性を備えています。NanoGel-50Q HCの技術仕様は表1に示されています。

表 1. NanoGel-50Q HC 技術仕様

項目	値
製品型式	NanoGel-50Q HC
分離原理	強陽離子交換
基材	ポリスチレン/ジビニルベンゼン
粒径	50 μm
孔径	1500 Å
配基	-CH2N+(CH3)3
配基密度	~0.25 meq/mL
動態結合容量	~120 mg/mL (BSA)
最大耐圧	2.0 MPa
CIP 在位清洗	1 M NaOH
推奨流速	50-300 cm/h
pH 安定性	1~14
化学安定性	すべての一般的な緩衝液、1 M 酢酸、1 M 塩酸、1 M 塩酸、70% エタノール、30% イソプロパノール、30% エタノール、1% SDS、6 M 塩酸グアニジン、8 M 尿素などの有機溶剤に対応。強酸化剤の接触は避けてください。強酸化剤（例：次亜塩素酸塩）、酸化酸（例：硝酸）、強還元剤（例：亜硫酸塩）との接触を避けてください。また、アセトンやメタノール中に曝露しないでください。
使用温度	4~30 ℃

単分散基質でより高いカラム効率

粒径測定データ（図1.a）によると、NanoGel50Q HCイオン交換クロマトグラフィー媒体の99.8%の微粒子が45.6μmから66.9μmの範囲に集中しており、かつ規則的な球形をしています（図1.b）。単分散クロマトグラフィー媒体は、より高いカラム効率をもたらし、生体分子の分離および精製能力が向上します。

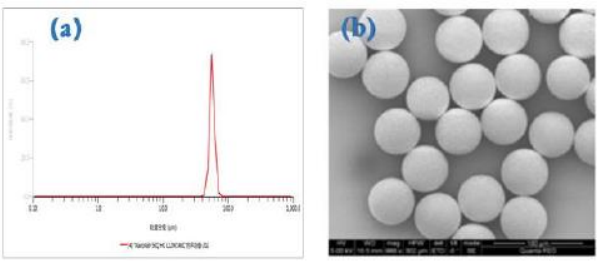

図1. NanoGel-50Q HC コールターカウンターによる粒径測量(a)及び走査電子顕微鏡(b)。

高い結合容量、優れた耐アルカリ性

NanoGel-50Q HCは基材と配位子密度を最適化しており、高い動的結合容量と耐アルカリ性を備えています。室温下でNanoGel-50Q HCを1 M NaOH溶液に1週間浸漬した後、結合容量は146 mg/mLから143 mg/mLにわずかに減少し、ほとんど変化がありません（図2参照）。

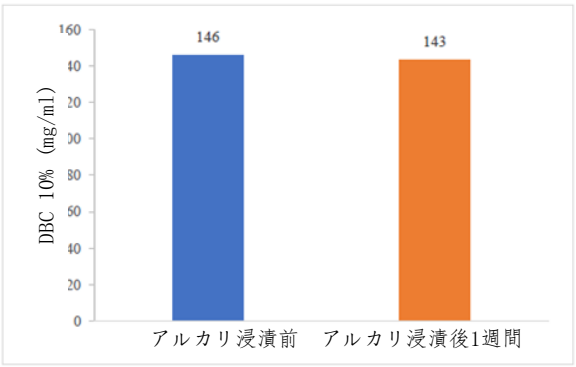

図2. NanoGel-50Q HC アルカリ浸漬前後の動的結合容量（BSA）の比較。

高流速、低逆圧

高流速クロマトグラフィーは、クロマトグラフィー純化サイクルを短縮し、生産効率を向上させます。NanoGel-50Q HCは、従来のPS-DVB「硬ゲル」の高い機械的強度を持ち、さらに単分散球状媒体の優れた物理的特性を兼ね備えているため、低逆圧および高流速の特長を有しています。以下の図は、NanoGel-50Q HCイオン交換クロマトグラフィー媒体が、脱イオン水および0.1M NaClを移動相とした場合に、それぞれ高流速範囲内で良好な圧力-流速線形関係を示す様子を示しています（図3）。

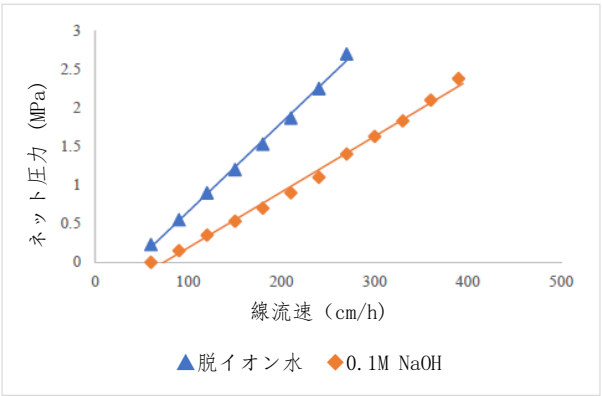

図3. NanoGel-50Q HCの圧力-流速曲線。クロマトグラフィーカラムの直径（内径）200mm、高さ（H）230mm。

高効率な物質移動で高流速下でも高い動的結合容量を実現

NanoGel-50Q HCは、独自の表面機能化技術を採用しており、高い動的結合容量と高速な物質移動を特徴としています。これにより、高流速（短い保留時間）でも安定した高い動的結合容量を維持することができます（図4参照）。

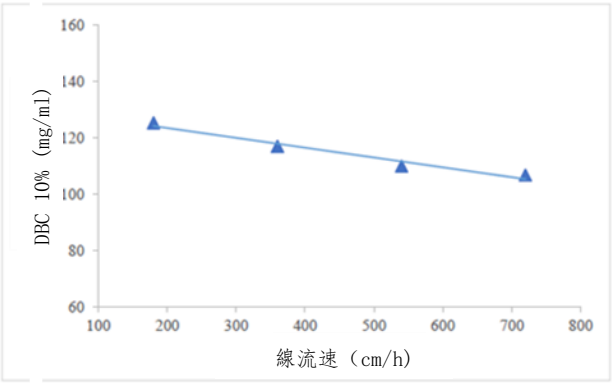

図4. NanoGel-50Q HCの異なる流速における動的結合容量（サンプル：5 mg/mL 牛血清アルブミン BSA）。

製品の応用

NanoGel-50Q HCは、迅速かつ高効率なクロマトグラフィー媒体として、生物大分子（単クローン抗体、ウイルス/ワクチン、高分子量の再組換えタンパク質など）のクロマトグラフィー純化において、特に優れた性能を発揮します。単クローン抗体の純化においては、フロースルーモードを採用することで、96%以上の回収率および99%以上の純度を達成しています。

表2. NanoGel-50Q HC の異なるサンプル量でのHCP除去効果

サンプル量	回収率	純度
100 mg	96.90%	99.00%
200 mg	96.50%	99.00%

HCP除去効率において、NanoGel-50Q HCは優れた性能を発揮しています。100mgおよび200 mgのサンプル量での実験において、NanoGel-50Q HCのホストセルタンパク質（HCP）はいずれも100 ppm以下に抑えられ、特に200 mgのサンプル量ではHCPの除去効果がより顕著に現れています（図5参照）。

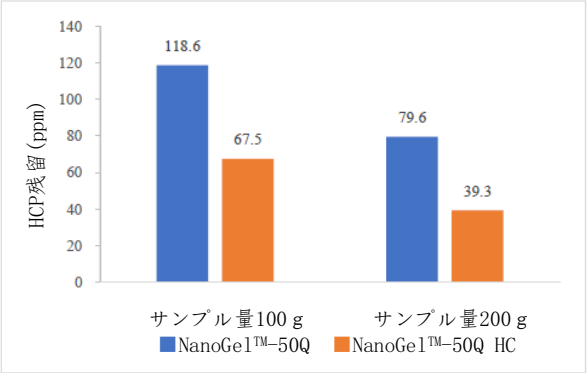

図5. NanoGel-50Q HCを使用したフロースルーモードでの単クローン抗体の精製。

クロマトグラフィーカラムの充填

NanoGelシリーズ製品は20%エタノール中で保存されており、1.5 kgのスラリーが1 Lの媒体体積に相当します。推奨される充填スラリーの移動相は0.1 M NaClまたは純水で、推奨充填係数は1.05です。NanoGelシリーズ製品は高い機械的強度を持つ「硬ゲル」であり、低圧カラムから中高圧カラムまでの充填が可能です。適切なカラムフィルタープレートのサイズは10～23 μmです。充填手順は以下の通りです。

1）必要なクロマトグラフィー媒体スラリーの質量を計算する

必要なスラリー質量（kg）＝目標カラム体積（L）×1.5 kg/L×1.05

例：内径40cm、長さ20cmの25Lのカラムを充填するには、スラリー質量は25L×1.5kg/L×1.05＝約39.375kgとなります。正確にスラリーの容積を計量するには、計量前にスラリー濃度を均一にする必要があります。（プラスチックスプーンや50rpm以下の機械で緩やかに攪拌し、攪拌後は静置時間を10分以内にしてください）。

2）スラリーの準備

充填前に、0.1M NaCl（または純水）を充填液として使用します。以下では、充填液は0.1M NaCl（または純水）のことを指します。

実験室規模の小型カラム（内径<50 mm）

計算した20%エタノールのスラリーをろうとに移し、濾過した後、カラム容量の3倍の充填液を加えます。プラスチック製のスプーンでゆっくり撹拌した後、再度ろ過します。この手順を2回繰り返して、スラリー中の20%エタノールが完全に充填液に置換された後、充填液を追加して、最終的にカラム体積の1.67～2倍にします（スラリー濃度50%～60%）。

大カラム（内径≥50 mm）：

計算した20%エタノールのスラリーを均質化タンクに移し、2時間以上静置して沈降させます。その後、上澄み液を除去し（上澄み液には若干の濁りがある場合があります）、上澄み液と同体積の充填液を追加します。ゆっくり撹拌した後、再度2時間以上静置沈降させ、上澄み液を除去します。この手順を2～3回繰り返して、スラリー中の20%エタノールが完全に充填液に置換された後、充填液を追加して、最終的にカラム体積の1.67～2倍にします（スラリー濃度50%～60%）。

注意：スラリー準備時に、媒体が圧縮や摩擦を受けないよう注意してください。磁気撹拌や圧力式の蠕動ポンプは使用しないでください。機械撹拌の場合、撹拌ブレードが容器の壁に近づきすぎないようにしてください。また、クロマトグラフィー媒体を再充填する場合は、前述のろ過、沈降の手順でスラリーを準備してください。

3）カラム充填

流動充填：

3-1）上述のスラリーを均一に分散させ、カラムに移します。

3-2）充填液を移動相として使用し、カラム充填を開始します（カラム充填開始時、流出液に多少の濁りが見られることがありますが、1～2カラム体積が流れた後、澄んできます）。

注意：カラム充填を開始する流速が高すぎないようにしてください。

3-3) カラムベッドの高さが安定したら、流速を目標の最高流速（使用流速の2倍を推奨）または目標の最高圧力（1.0 MPaを超えないことを推奨）にまで引き上げます。圧力が一定になった後、さらに20分間安定させます。
3-4) ピストンをゲル面の下2～3 mmに調整します。
軸向圧縮充填（内径>300 mm）:
(1)カラムを洗浄し、空気を排出します。
(2)スラリータンクをカラムに接続し、カラム内の余分な溶液を除去します。ピストンをカラムの底まで5cmほど降ろします。
(3)供給バルブを開き、ピストンを上昇させながら充填を開始します。充填速度は200～300cm/hです。スラリー濃度に基づいて充填量を決定し、ピストンの移動距離を換算します。注入が終わったら、供給バルブを閉じ、ピストンを下げてカラムを圧縮します。圧縮速度は60～100cm/hで、充填材が完全に沈降し、カラムベッドの高さが安定したら、ピストンの移動を停止し、カラムベッドの高さを読み取ります。この時点で、1.05の圧縮比を基に最終的なピストンの位置を計算します。
注意： 充填時に気泡が入らないように、通常は計算された媒体量に対して120%以上の量で充填を行ってください。
カラム効率評価
充填したクロマトグラフィカラムをまず2 CVの0.5M NaCl溶液で平衡化し、その後、2.0M NaCl溶液を使用し、100cm/hの流速でカラム効率を評価します。また、脱イオン水でクロマトグラフィカラムを平衡し、アセトン溶液を用いてテストを行うことも可能です。具体的な試験データについては表3を参照してください。

表 3. UniGel®シリーズ充填イオン交換クロマトグラフィーカラムのカラム効率測定方法。

項目	内容
サンプル	2M NaCl
サンプル量	カラム体積の1～5%
洗脱液	0.5M NaCl
線速度	100cm/h
検出	2M NaCl 上サンプル：電気伝導率計
合格基準	As：0.8-1.5；Plates (N/m)：>3000

使用方法

1.平衡：5CV以上の平衡緩衝液でカラムを平衡させ、流出液の導電率とpHが変わらなくなるまで（平衡液と一致する）、緩衝液としてBuffer A、たとえば20mM PBS，pH7.0を使用します。具体的な緩衝液は、ターゲットタンパク質の安定性や等電点に応じて、イオン交換媒体の種類を選択し最適化してください。
2.サンプルロード：固体サンプルは平衡液で溶解してください。低濃度サンプル溶液は濃縮し、高濃度サンプル溶液は平衡液で希釈してください。サンプルの流路閉塞を避けるため、サンプルは遠心または膜フィルター処理を行ってください。
サンプルロード量は、媒体の結合容量とサンプル中のターゲットタンパク質の含有量に基づいて計算されます。サンプルロード前に、結合容量緩衝液が可能な限り平衡液と一致していることを確認してください。
3.洗脱：サンプルロードが完了した後、平衡緩衝液でベースラインが安定するまで洗浄を続けます。必要に応じて、塩濃度や流動相のpHを変更して、クロマトグラフィー媒体に吸着されたサンプルを段階的に洗脱します。
4.再生洗浄（CIP）：定期的なCIP洗浄は、媒体ベッド内のタンパク質沈殿物や汚染物の蓄積を防止し、クロマトグラフィー媒体の結合容量、分離効果、流動特性などの性能を維持するのに役立ちます。汚染物の種類に応じて、各プロセスに特定のCIP洗浄方法を設計する必要があります。CIP洗浄の頻度は、初期原料液の性質やプロセス条件によります。以下のCIP洗浄方法を推奨します。

順次、5CVの1-2M NaCl、5CVの0.5-1M NaOH、3CVの水、次いで5CVの1M酢酸で洗浄します。

保存方法

使用後のクロマトグラフィー媒体やプリパックカラムは、再生が完全に行われた後、20%エタノールまたは10mM NaOH中で密封保存し、保存温度は4～25℃を推奨します。
未使用のクロマトグラフィー媒体やプリパックカラムについては、エタノールの揮発や微生物の繁殖を防ぐため、3か月ごとに20%エタノールを交換することを推奨します。

NanoGel-50Q HCイオン交換クロマトグラフィー媒体仕様書

NanoGel-50Q HC	30mL	04064-050150-2030
	50mL	04064-050150-2050
	100mL	04064-050150-2100
	300mL	04064-050150-2300
	500mL	04064-050150-2500
	1L	04064-050150-1001
	5L	04064-050150-1005
	10L	04064-050150-1010
	50L	04064-050150-1050
	100L	04064-050150-1100

日本販売三島国際貿易株式会社
〒411-0044静岡県三島市徳倉三丁目18-5
TEL（055）988-3590E-mail：jaina@jaina-msm.com

トラブルシューティング

UniGel®シリーズイオン交換製品を使用する際に問題が発生した場合は、以下の表を参考にして解決するか、ご連絡ください。

トラブル内容	原因分析	推奨対策
カラム圧力の上昇	流速が高すぎる	流速を下げる
	ポンプと収集器の間のバルブが開いていない	出口を開く
	装置のインラインフィルターが詰まっている	不純物を除去して洗浄する、または交換する。使用前にサンプルと緩衝液を0.45μmまたは0.2μmで濾過する。
	ラム前の詰まり	20BVの充填液を使用してカラムを逆流洗浄する
	サンプルがカラム上で沈殿した	定置洗浄を行い、サンプル溶液の濃度を調整する
	サンプルが膨張する、または一部の物質が強く吸着して充填材に残留している	定置洗浄を実施する（再生条件を参照）
	カラムベッドが圧縮された	カラムを再充填する
	カラムの使用時間が長い	カラムまたはカラム充填材を交換する
サンプルの吸着が不十分	サンプル溶液中のイオン強度が高すぎる	サンプル溶液中のイオン強度を低下させる（希釈や脱塩などの手段を使用）
	サンプルのpHが不適切	pHを調整し、結合強度を増加させる
サンプルが洗脱過程で洗脱されない	洗脱液のイオン強度が低すぎる	洗脱液の濃度を増加させる
	洗脱液の洗浄能力が低すぎる	洗浄能力の高い洗脱液に交換する
	洗脱液のpHが不適切	洗脱液のpHを調整する
	カラムに疎水性が強い残留不純物がある場合	定置洗浄を実施する（再生条件を参照）
分離率の低下	洗脱条件が不適切（例：勾配度が急すぎる、流速が高すぎる）	洗脱条件を変更し、より緩やかな勾配洗脱や等度洗脱を採用し、流速を下げる
	カラムが正しく充填されていない	カラムを再充填する
	カラムの上端や下端に大きな混合空間がある	充填材の上表面を増やすか、カラム後部の体積を減らす
	カラムの過負荷	カラムを洗浄し、再び平衡を取り、上サンプル量を減らす
	粒径が大きい	同じタイプでより小さい粒径の充填材に交換する
	選択性の差がある	他のタイプの充填材に交換する
サンプルのロード回数が増えるとサンプルの吸着能力が低下する	サンプル中の不純物が充填材に結合し正常な結合を妨げている	定置洗浄操作を実行する（再生条件を参照）
使用中にカラムベッドに割れ目が発生する	溶液が十分に脱気されていない	0.5MNaClで均一に混合し、充填を平衡させる
	溶液中に気泡がある	圧力を下げて気泡を除去する
	外部空気がシステムに入り込んでいる	より多くの緩衝液を追加し、システム内の気体を完全に除去する
ベースラインの漂移	カラムが十分に平衡されていない	平衡時間を増加させる
	洗脱液A、Bが同一紫外波長で吸収係数が異なる	異なる波長を使用するか、空白基準を設定する
	洗脱液が不純である	高純度のクロマトグラフィーグレード試薬を使用する
不明なノイズピークが現れる	前のサンプルが完全に洗脱されていない	カラムを再生する
	洗脱液が不純である	高純度のクロマトグラフィーグレード試薬を使用する
	微量の疎水性不純物がカラムに結合し平衡やサンプルの適用過程で濃縮され洗脱時にピークとして現れる	カラムを洗浄する
平衡時間が長すぎる	CIP後すぐに再平衡	まず2CVのBuffer B（1M NaClを含む）を使用し、その後Buffer Aで平衡を行います。