

抗体のアフィニティクロマトグラフィーと技術進展

田中 亨

1. はじめに

アフィニティクロマトグラフィーは分離対象への特異的な親和性を有する捕捉基（リガンドと呼ばれる）を利用したクロマト分離技術である。アフィニティクロマトグラフィーの原点は不溶性デンプンに α -アミラーゼを吸着させた1910年のStarkensteinの報告とされており^{1,2)}、分離技術としては100年以上の歴史がある。今日では、Hisタグ（6個程度の連続したヒスチジンを含む構造）を導入したリコンビナントタンパク質をNiキレート樹脂でアフィニティ分離する方法が遺伝子工学分野で汎用されるなど、バイオ研究に欠かせないツールとなっている。また、産業利用の点から見ると、2000年頃から加速度的に実用化が進む抗体医薬品の精製に、プロテインAなどをリガンドとしたゲルが広く利用されている。

本稿では、近年技術的に大きく進展した抗体のアフィニティクロマトグラフィーを中心に紹介する。

2. 抗体のアフィニティクロマトグラフィー

2.1 基本原理

抗体は脊椎動物の血中に存在し、抗原抗体反応による外敵排除など免疫系において重要な役割を担っている。重鎖の違いによりIgG、IgM、IgA、IgD、IgEの5種類のアイソタイプが存在するが、本稿では診断薬や医薬品用途で最も実用化が進んでいるIgGに着目し、そのアフィニティ分離について解説する。

IgGは軽鎖2本と重鎖2本からなるY字型のタンパク質



Technological Advances of Affinity Chromatography in Antibody Manufacturing and Analysis
Toru TANAKA
2003年 東京農工大学大学院工学府生命工学専攻修士課程修了
現在 東ソー(株)ライフサイエンス研究所グループリーダー
連絡先: 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1
E-mail tooru-tanaka-pb@tosoh.co.jp

2023年8月30日受理

であり、抗原認識に関わるFab領域2ヶ所とエフェクター機能に関わるFc領域1ヶ所を有する(図1)。IgGを捕捉するためのリガンドとしては、*Staphylococcus aureus*由来のプロテインA、*group G streptococci*由来のプロテインG、*Finnegoldia magna* (旧名*Peptostreptococcus magnus*)由来のプロテインLなどが利用されている。また、ヒトの受容体であるFc γ RIIIaを利用したアフィニティクロマトグラフィーも開発されている。このうち、プロテインAとGは抗体のFc領域を認識して結合するが、抗体の動物種やサブクラスによって親和性が変化する。一般的に、プロテインGは多様な抗体種に結合するため、マウスやラット、ウサギの抗体を主に用いる診断薬用抗体の精製に使用される。また、プロテインAは相対的に安価で物理化学的な安定性がプロテインGよりも高いため^{3,4)}、ヒト抗体を用いる抗体医薬品の精製に使用されている。一方、プロテインLはFabの可変領域を認識して結合する特性を有しているため、FabやscFvなどの低分子化抗体の精製に利用できる。Fc γ RIIIaは抗体Fc領域のヒンジ部分近傍に結合することが知られており、糖鎖構造も含めた広い範囲を認識することができる。そのため、抗体の糖鎖構造を含めた精密分析技術に応用利用されている。

2.2 抗体医薬品のアフィニティ精製

抗体医薬品はガンや自己免疫疾患の治療薬として広く利用されている。患者自身の免疫機能を利用したメカニズムで作用し、従来型の低分子医薬品と比べると高い治療効果と副作用の軽減が特長である。世界的に需要が拡大する一方で、高純度な抗体を大量に、また安価に生産するための

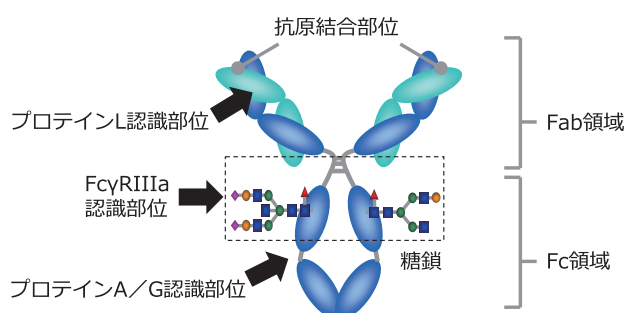


図1 IgG抗体の構造と各種リガンドの認識部位

技術革新が進められてきた。

抗体医薬品はCHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞)などの動物細胞で培養生産され、多段階のクロマト精製による高純度化、酸処理やフィルター過などによるウイルス不活化、限外ろ過による濃縮と緩衝液交換がおこなわれて製造される。アフィニティークロマトグラフィーはクロマト精製の1段階目に使用される。培養生産後の抗体医薬品は培地成分や宿主細胞由来のタンパク質など多量の夾雑物を含むが、アフィニティ精製により95%以上の純度まで精製される(図2)。また、培養液中の抗体濃度は比較的低濃度(1~5 g/L)であるが、アフィニティ精製をおこなうことで濃縮効果も期待できるため、後工程でハンドリングする液量の低減を図ることが可能である。

抗体医薬品のアフィニティ精製には、価格面や耐久性の観点からプロテインAゲルが使用される。近年、医薬品の製造コスト低減や安全性向上を目的にプロテインAゲルの抗体吸着量や耐久性などの性能が大きく改良されてきた。水酸化ナトリウム水溶液によるアルカリ洗浄はゲルに付着した汚れや細菌、ウイルスの除去に効果的であり、性能や清浄度を維持するのに不可欠な技術となっている。2010年より前に使用されていたプロテインAゲルはアルカリ耐久性のない製品が主流であったが、2013年頃より0.1 M NaOHで洗浄可能な製品が製品化され、今日では0.5 M NaOH溶液による洗浄に100回以上の耐久性を有する製品も開発されている。

2.3 抗体医薬品のアフィニティ分析

抗体医薬品の作用機序として、抗体のFc領域を介して免疫細胞などを活性化し、標的を除去するメカニズムが知られている。特に抗体医薬品によるガン治療の領域ではナチュラルキラー細胞(NK細胞)上に存在するFcγRIIIaと抗体のFc領域の結合により惹起されるADCC活性が薬効に深く関わる⁵⁾。近年の研究でFc領域に付加した糖鎖の構造が

薬効に大きく影響することが判明している^{6,7)}。一方で、抗体の糖鎖は多様な構造を取りロット間差もあるため、医薬品の品質を担保する上でFc受容体と抗体の親和性評価が重要である。

FcγRIIIaと抗体医薬品の親和性評価をおこなうことが可能な製品として、FcγRIIIaがゲル上に固定されたアフィニティ分析カラムが市販されている(図3, TSKgel FcR-IIIa-NPR(東ソー(株)製))。本カラムに抗体を添加し、溶離液のpHを中性から酸性に徐々に変化させることで親和性の低い成分から溶出させることができる。CHO細胞で生産した典型的な抗体医薬品の場合は3本のピークが観察されることが多く、各ピークの面積比などを比較することで医薬品の品質評価が可能である(図4)。実際に抗体医薬品に見られる3つのピーク成分を分取して構造解析や活性の比較した結果、ピーク毎に特徴的な糖鎖構造が確認されると共に、カラム保持時間と活性の相関が観察されている⁸⁾。

一般にタンパク質同士の相互作用を分析するためには、表面プラズモン共鳴法(SPR)や等温滴定型熱量測定(ITC)、ELISA法などが用いられるが、様々な糖鎖構造を有する抗体バリエーションについて、各々の親和性を分析するのは困難である。一方でアフィニティークロマトを測定原理とする分析手法は親和性に基づく成分の分離と定量ができるため、より厳密な品質管理が可能となる。

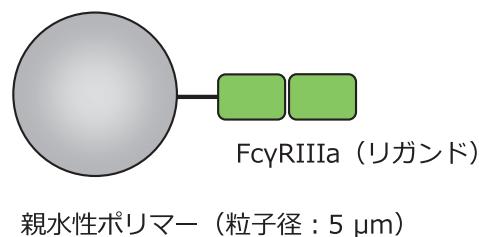


図3 FcγRIIIa固定化ゲルの構造

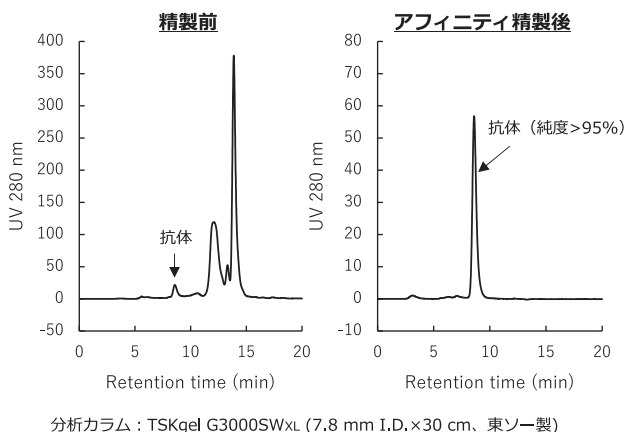


図2 アフィニティークロマトによる抗体精製例(ゲルろ過クロマトグラフィーによる純度分析)

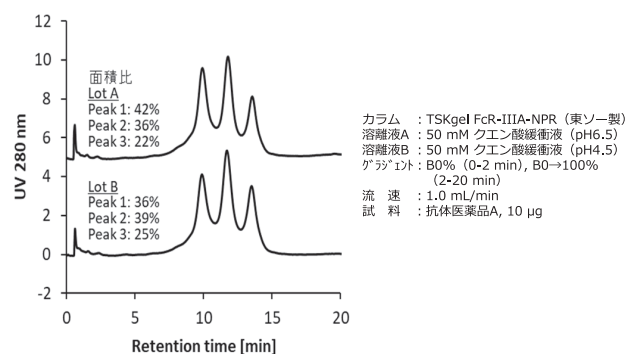
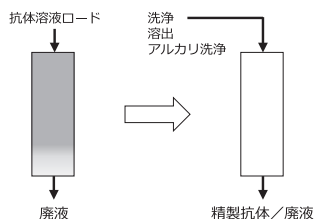


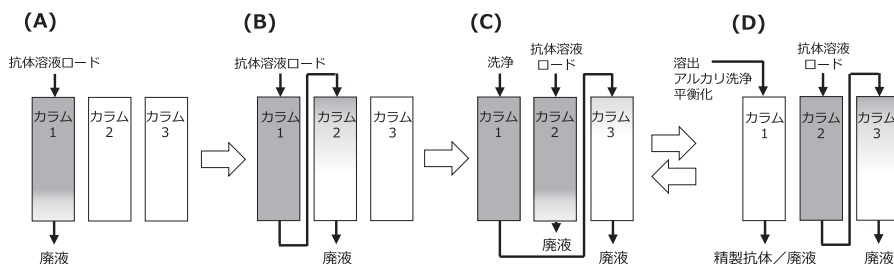
図4 FcγRIIIaアフィニティークロマトによる抗体分析例

一般的なクロマト精製



図中、グレーの濃淡は抗体の捕捉量を示す

連続クロマト精製



(A) 抗体溶液をカラム1にロード (B) カラムを連結し、カラム1から漏れた抗体をカラム2に吸着 (C) カラム1とカラム3を連結して洗浄、カラム2には抗体溶液をロード (D) カラム1は溶出、アルカリ洗浄、平衡化を順次実施、カラム2はカラム3と連結して抗体を吸着
※以降、カラムを順次切換えながら(C)と(D)を繰り返す

図5 バッチ式および3カラム式連続クロマト精製の操作法比較(連続クロマト精製は参考文献13を基に作図)

3. 連続クロマト技術

現在、様々な観点から抗体医薬品をより安価に効率良く生産する技術開発が進められている。特にアフィニティクロマトグラフィーについてはゲルが比較的高価で工程に要する時間が長いという技術的な課題を抱えており、効率化の一手として連続クロマト技術の適用が検討されている⁹⁻¹⁴⁾。

抗体医薬品製造における連続クロマト技術として、2～16本の小型カラムをクロマト装置に接続し、適宜流路を切換えながら連続的に精製する手法が考案されている。一般的なアフィニティクロマトグラフィーでは一定の回収率を達成するためにカラム下層のゲルを有効利用できない。また、洗浄、溶出、アルカリ洗浄などを実施する際には抗体溶液のロードをストップする必要があるため、時間的な効率が低下する。一方で、連続クロマトにおいては抗体溶液のロードを止めることなく、洗浄、溶出、アルカリ洗浄が同時並行で実施可能となるため、生産性を大幅に向上させることが可能となる。図5には、一般的なバッチ式のアフィニティクロマト精製と3カラム式連続クロマト精製の操作方法を模式的に示した。

連続クロマト用の装置はTosoh Bioscience社、YMC社、Sartorius社、Cytiva社、Novasep社などから販売されている。各社の装置は同時接続できるカラム数や運転方法、各種構成装置の仕様が大きく異なるため、目的に合った装置の見極めが必要である。また、接続するカラムは基本的に同容

量で正しく充填されたものを使用する必要がある。そのため、ゲルの充填状態が管理されたプレパックドカラムを購入し利用するのが好ましい。

4. おわりに

本稿では抗体のアフィニティクロマトグラフィーに着目して最近の技術進展について紹介した。タンパク質や核酸などの生体分子の中には特異的な親和性を有するものも多く、抗原と抗体、酵素と基質、レクチンと糖鎖、相補的な核酸など、アイデア次第で様々なアフィニティクロマトグラフィーを実現することができる。現在では研究者が独自にリガンドをゲルに固定し、オリジナルのアフィニティゲルを調製するための活性化型アフィニティクロマト用ゲルが複数社から市販されているので、これらを活用して研究開発を進めるツールとしてご利用頂きたい。

参考文献

- 1) Starkenstein, E. : *Biochem. Z.*, **24**, 210-218 (1910)
- 2) 笠井 一ら : アフィニティクロマトグラフィー, p.3, 東京化学同人 (1991)
- 3) Guelich, S. et al. : *Protein Eng.*, **15** (10), 835-842 (2002)
- 4) Linholt, M. et al. : *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, **55**, 407-416 (2004)
- 5) Clynes, R. et al. : *Nat. Med.*, **6** (4), 443-446 (2000)
- 6) Carton, G. et al. : *Blood*, **99** (3), 754-758 (2002)
- 7) Gennari, R. et al. : *Clin. Can. Res.*, **10**, 5650-5655 (2004)
- 8) Kiyoshi, M. et al. : *Sci. Rep.*, **8**, 3955 (2018)
- 9) Mierendorf, R. et al. : Integrated Continuous Biomanufacturing III, ECI, Portugal (2017)
- 10) Angarita, M. et al. : *J. Chrom. A*, **1389**, 85-95 (2015)
- 11) Gao, Z. et al. : *Sep. Purif. Technol.*, **253**, 117554 (2020)
- 12) Oetes, O. et al. : *J. Biotech.*, **281**, 168-174 (2018)
- 13) Mahajan, E. et al. : *J. Chrom. A*, **1227**, 154-162 (2012)
- 14) Girard, V. et al. : *J. Biotech.*, **213**, 65-73 (2015)