

大容量サンプルの 密度勾配分離用ゾーナルローター P32ZT

Shuichi Kani^{1), 2)}

¹⁾Eppendorf Himac Technologies, Tokyo, Japan, ²⁾Eppendorf SE, Hamburg, Germany

容量が 1,690 mL のゾーナルローター P32ZT は、インフルエンザウイルスやアデノ随伴ウイルス (AAV) などを大量精製するための、遠心分離プロセスを大幅に改善することができます。



はじめに

目次

- ・ローターの構成
- ・原理と使用方法
- ・分離事例

ケース 1：ポリスチレンラテックス (PSL) 粒子を使用した分離条件のシュミレーション。

ケース 2：インフルエンザワクチンの製造。

ケース 3：遺伝子治療薬の製造のためのアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの大量精製。

ゾーナルローターは、約 60 年前に、大量のサンプルを 1 回の遠心で処理することが出来る画期的なロータシステムとして Anderson らから紹介されています [1]。インフルエンザワクチン等のワクチン製剤の製造プロセスにおいて、抗原物質を効率良く精製し濃縮するためには欠かせないロータとして、使われています [2]。

ゾーナルローター P32ZT は超遠心機専用のローターです。最高回転速度 32,000 rpm の時に 102,000 xg の強い遠心力を発揮するため、沈降係数が 20S 以上の粒子 (小さなウイルスやタ

ンパク質等) を含むサンプル溶液を、効率的に分離し濃縮することができます。

分画遠心法 (最も一般的に行われる、沈殿と上清に分離する方法) や沈降速度法 (沈降速度の差で分離する方法)、沈降平衡法 (密度の差で分離する方法) など様々な分離の用途に使うことができます。遠心チューブは使用せずに、ローター本体の中に直接密度勾配溶液やサンプルなどの溶液を入れて使用します。溶液の注入・排出の仕方がユニークです。回転中のローターに送液ポンプを用いて溶液を充填し、遠心分離後も送液ポンプを用いて、回転中のローターから溶液を排出します。ローターが回転中に行うことで、密度勾配が維持された状態のまま、バンド状に分離されたサンプルを、画分として排出することができます。この一連の操作は、ローターに接続されたチューブを通じて行うため、ラインの中で完結します。

ゾーナルローターを使用すると、従来のアングルローターやスイングバケットローターの処理量をスケールアップすることができます。これによって、時間が節約されるだけでなく、多くの遠心用容器を繰り返し遠心処理する必要がなくなります。

大量のサンプルを処理する必要がある研究用途や医薬品製造に役立ちます。

例えば、スイングバケットローター P32ST (40 mL x 6) で 300 mL のサンプル溶液を密度勾配遠心分離で 5 時間分離する場合、サンプルをチューブに充填、遠心分離し、バンド化されたサンプルを抽出するのに約 6 時間かかります。通常、40 mL チューブあたり容積の約 20% 以下 (8 mL 以下) が一般

的な使い方です。300 mL のサンプルすべてを処理するには、6 ~ 7 回遠心分離を繰り返す必要があり、合計約 42 時間要しますが、ゾーナルローター P32ZT は 1 回の遠心分離に約 8 時間を要しますが、一度に 300 mL のサンプルを処理する事ができます (図 1)。分離できるサンプルの量は、遠心分離条件と密度勾配溶液の範囲によって異なり、ケース 3 では、1 L のサンプルを充填して分離した事例を紹介します。

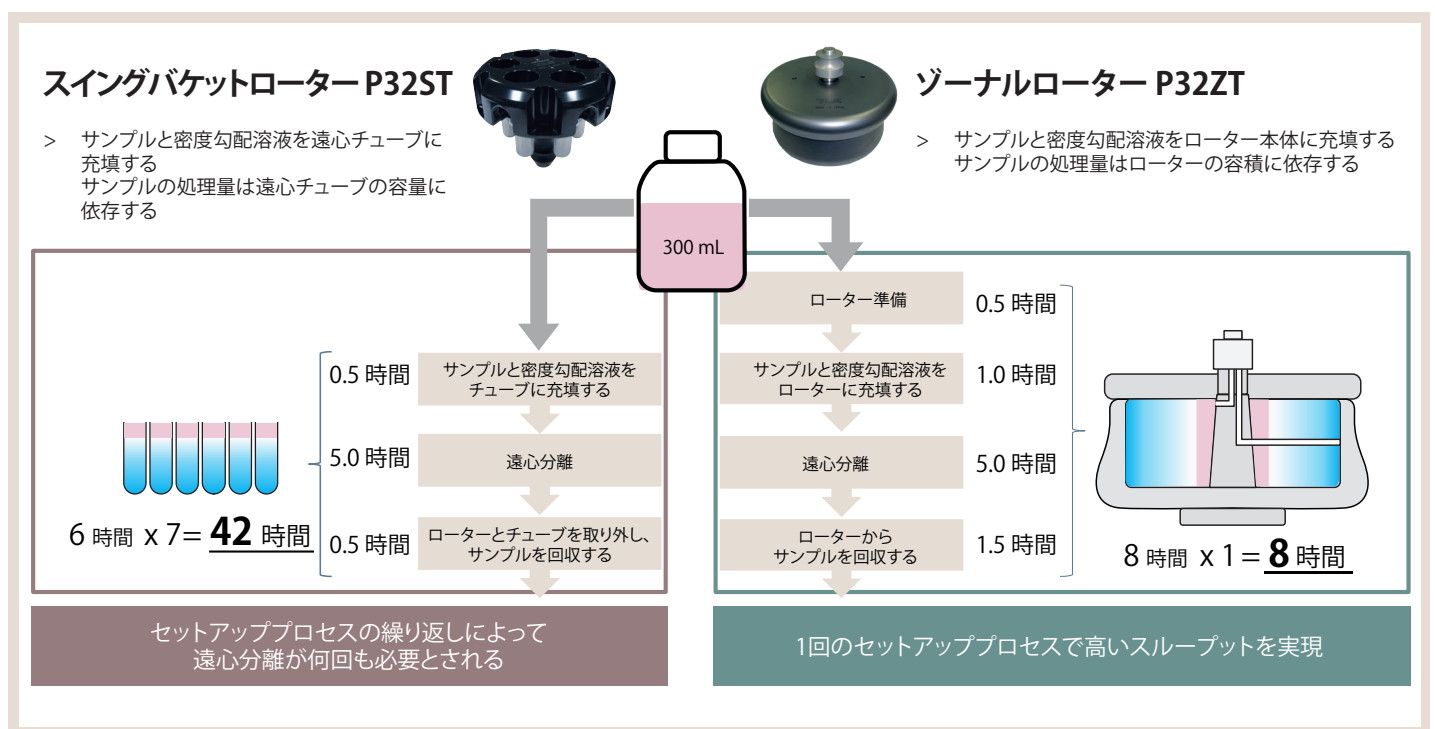


図 1 : スイングバケットローター P32ST とゾーナルローター P32ZT の作業時間の比較。

ローターの構成

ゾーナルローター P32ZT システムは、ローターとシールアタッチメントで構成されています。ローターにはシャフトとセプタが搭載されており、ローターカバーで覆われています (図 2 a)。溶液をポンプで送るときはシールアセンブリをローターに取り付け、遠心分離のときはシールアセンブリをキャップアセンブリに交換します。シールアタッチメントクミ RPZ-S は遠心分離チャンバー内に設置されており、シールアセンブリを固定することで、ローターと接続します。 (図 2b)。

セプタは中心から放射状に伸びる 4 つの垂直隔壁で構成され、ローター内部を 4 つの扇形のセクターに分割しています。セプタの内側には流路があります。溶液がローターに注入されると、溶液は垂直隔壁の流路 A を通過します。溶液はローター壁近くの穴 A からローターに入ります。ローターに溶液が満たされると、溶液は流路 B を経由して穴 B からローターの外に排出されます (図 2c)。

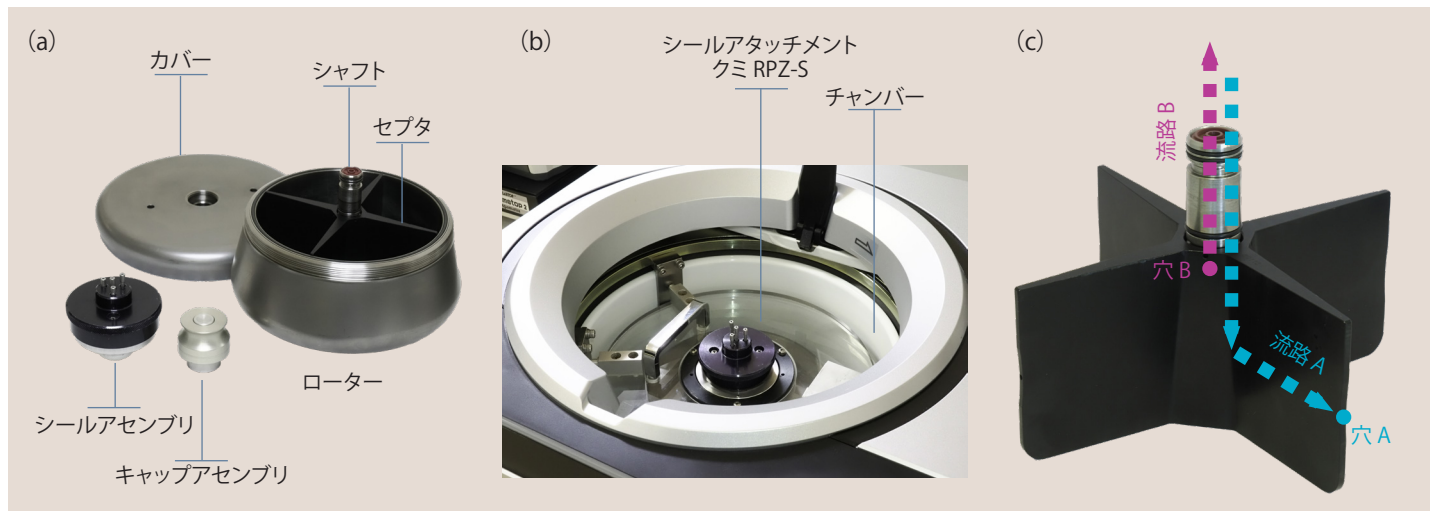


図 2：ゾーナルローター P32ZT の構成。(a) ザーナルローター P32ZT のコンポーネント。(b) シールアタッチメント クミ RPZ-S はチャンバー内に設置されています。(c) セプタ内部のフローパス (矢印 → はサンプルの流れの方向を示しています)。

原理と使用方法

ゾーナルローターを用いた分離原理と独自のサンプル回収法について、密度勾配遠心分離法を例に挙げて以下に説明します (図 3)。

まず、空のローターを 3,000 rpm まで加速します。次に、ローターの外壁側から密度の小さい液から順に密度勾配液が注入されます。最後に密度の大きい密度勾配液が注入されます。ローターが密度勾配液で満たされるにつれて、最初に注入された密度の小さい密度溶液がローターの中心に向かって押し出されます。この手順で密度液を注入することで、密度勾配をローターの中に作ることができます。(図 3 a)。

低密度のバッファーにサンプルが懸濁されている場合には、ローターの中心に注入します。(図 3 b)。ローターを所定の回転速度まで上昇させ、所定の時間遠心分離を行い、サンプルを成分が等しい密度で安定するまで遠心分離させます (図 3 c)。

サンプルを回収するにはローターの回転を 3,000rpm まで減速し、密度勾配を安定した状態に保ちます。次に高密度溶液をローターの外壁側から注入することで、サンプルをローターの中央に向かって押し出して抽出します。(図 3 d)。

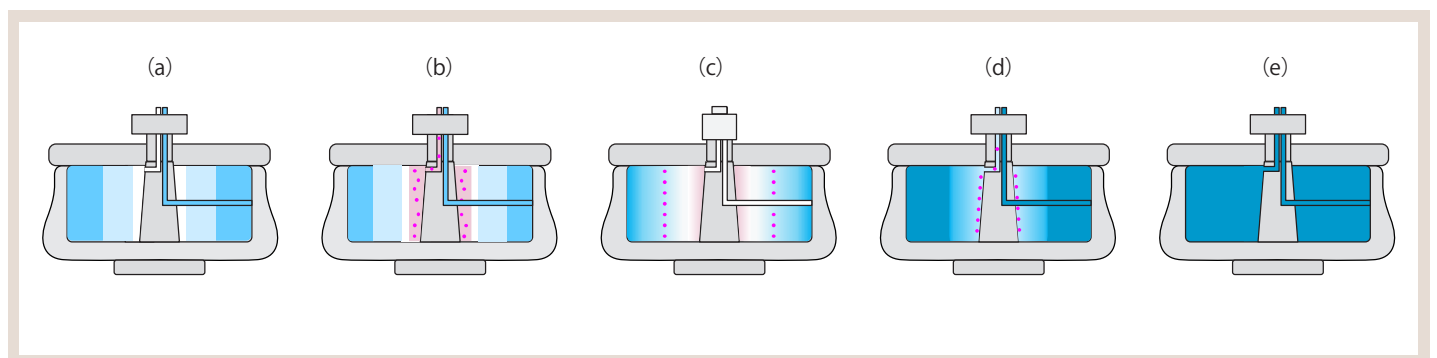


図 3：ゾーナルローター P32ZT の各分離ステップの断面図。
(a) 空のローターに、ローターの中心から端に向かって密度の小さい方から大きい順に密度溶液を注入します。(b) ローターの中心にサンプルを注入します。(c) 遠心分離します。(d) ローターの端から高密度溶液を注入し、ローターの中心から、密度の小さい液が順に排出されます。(e) 分離したサンプルは全て排出され、ローター内は高密度液で満たされます。

溶液を分画する際に、屈折率計または分光光度計を通過するようにシステム化した場合は、密度勾配の形状と物質の成分の位置が記録されます。医薬品の基礎研究や製造施設などでは、実験結果を記録する必要があるため、以下のようなシステムを用いています。

図 4 に、分析装置とフラクションコレクターを組み合わせた、インラインシステムの例を示します。屈折率計で密度勾配の状態を確認し、分光光度計でウイルスやタンパク質などの局在を検出し記録します。フラクションコレクターと連動すれば、目的の成分を分画することが出来ます（図 4）。

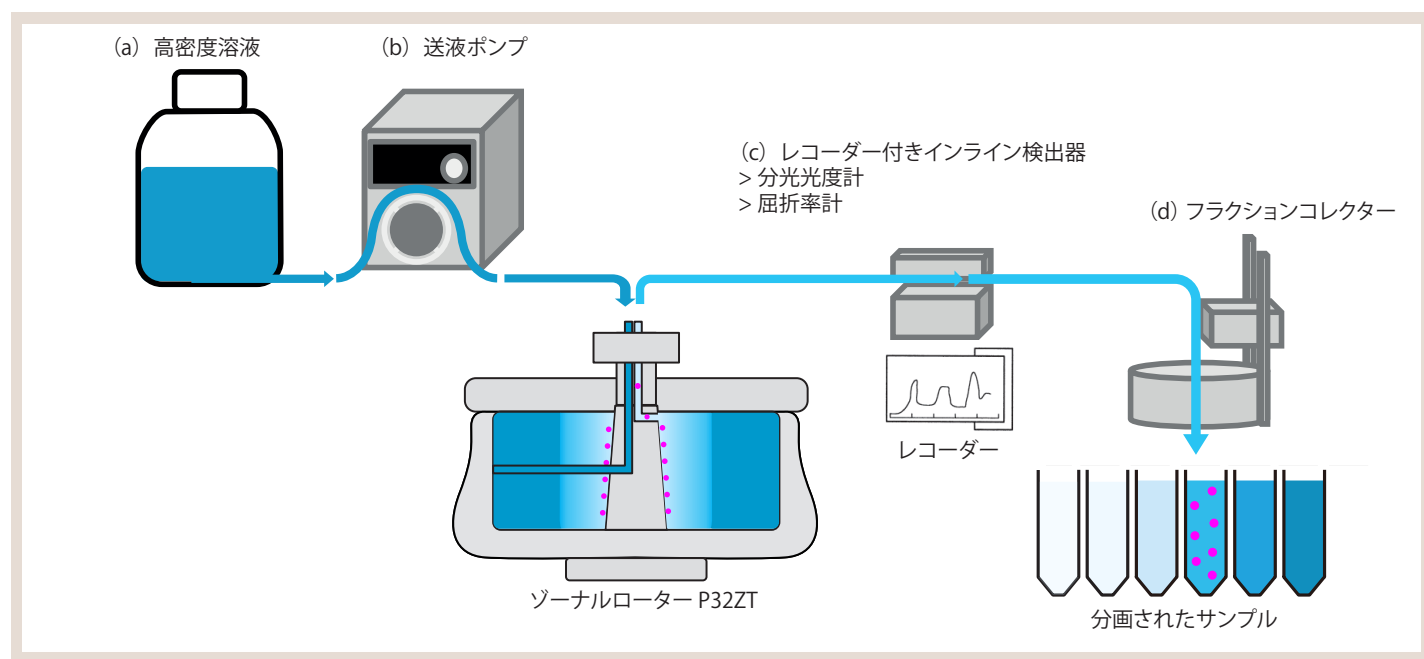


図 4：インラインサンプル分取システムの例。密度溶液 (a) は送液ポンプ (b) によってローター内に注入されます。排出された溶液は、分光光度計や屈折率計などのインライン検出器 (c) によって測定され、フラクションコレクター (d) によって分取されます。

分離事例

ケース 1：ポリスチレンラテックス（PSL）粒子を使用した分離条件のシミュレーション

ケース 2：インフルエンザワクチンの製造

ケース 3：遺伝子治療薬の製造のためのアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの大量精製

ケース 1：ポリスチレンラテックス（PSL）粒子を使用した分離条件のシミュレーション

ゾーナルローター P32ZT では、実際のサンプルを使って実験条件を検討するのは難しい場合があります。ケース 1 では、代表的なサンプルとしてポリスチレンラテックス（PSL）粒子とショ糖密度勾配液を用いた、典型的な実験例を紹介します。最も汎用性の高い密度溶液であるショ糖密度勾配溶液を使用しました。ショ糖は、幅広い密度に対応でき、生物学的サンプルを損傷する可能性が低く、安価に入手できるため、密度溶液として一般的に使用されています。分離の指標として有用な PSL 標準粒子をサンプルとして使用しました。正確なサイズと密度がわ

かっているため、実験結果を客観的に評価することができます：PSL 粒子（直径 150 nm、密度 1.05 g/cm³、Thermo Cat. no. 3150A）。

Brix データは、0 ～ 60% w/w の範囲のショ糖溶液の連続的な密度勾配を示しています。吸光度（A600）データは、PSL が画分 16 に集中していることを示しています（図 5c および d）。画分 16 は白く濁っているため、PSL 粒子がこの画分に濃縮されていることが分かります（図 5d）。

密度が既知の PSL を使用することで、実際のサンプルを使用する前に分離条件をシミュレーションすることができます。

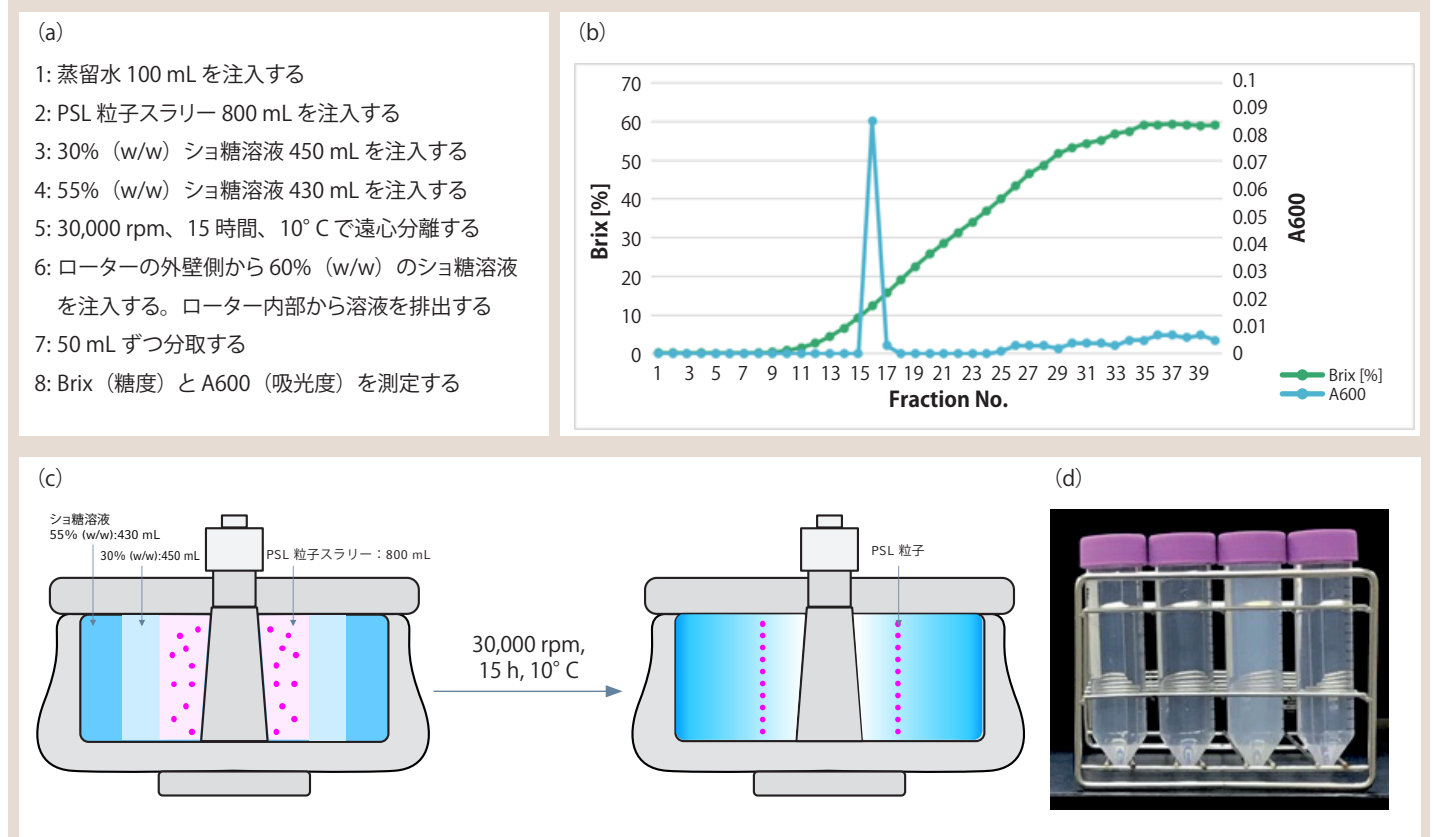


図 5：ショ糖勾配による PSL 粒子の分離。(a) ゾーナルローター P32ZT を用いた遠心分離のプロセス。(b) 遠心分離後の Brix (%) および吸光度 (A600)。(c) PSL 粒子の分離の様子。(d) 左から右に、No. 14、No. 15、No. 16、No. 17 の画分。

ケース 2：インフルエンザワクチンの製造

ゾーナルローターは、主にウイルス感染症（インフルエンザ、日本脳炎、B 型肝炎、狂犬病など）を予防するためのワクチン製造工程において、大量に培養された病原ウイルスや抗原物質を分離・濃縮するために使用されます。病原ウイルスは 18 ～ 300 nm 程度の非常に小さな粒子であり、これを分離し、精製・濃縮するためには、超遠心機を用いた密度勾配遠心法は有効な手段です。ゾーナルローターはこのプロセスをスケールアップするのに、重要な設備です。ワクチン製造方法は、鶏卵を使用する方法と培養細胞を使用する方法の、主に 2 種類の方法で行われています。図 6 には、培養細胞を用いたインフルエンザワクチン製造の典型的なワークフローを示します。

上流工程では、まず凍結保存された細胞をインキュベーター内において 37℃ で少量培養するところから始まります。培養をスケールアップし、細胞が一定の密度に達したら、バイオリアクター内にシードウイルスを添加し、ウイルスを細胞に感染させ、増殖させます。その後、培養上清を回収し、細胞由来の夾雑物を除いていきます。高速冷却遠心機 CR22N とアングルローター R9A と R9A2 は、十分な容量と必要なスピードを備えているため、この用途における最適な装置です。

次に、上清を精製するステップには、超遠心機を使用したショ糖密度勾配溶遠心法が用いられます。インフルエンザウイルスと細胞由来の夾雑物の密度の差を利用して分離します。このステップでは、超遠心機 CP-NX シリーズとゾーナルローター P32ZT を使用します。

精製されたインフルエンザウイルスは、化学的方法で不活化し、さらに界面活性剤等を用いウイルス膜を可溶化します。余分な膜成分を除去することで、ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼのサブユニットタンパク質を単離します。このステップでも、超遠心機 CP-NX シリーズとゾーナルローター P32ZT が使われます。このようにワクチン製造工程では、遠心分離のステップが複数回繰り返し行われます。



図 6：培養細胞インフルエンザワクチンの製造プロセスの一般的なワークフロー。

ケース 3：遺伝子治療薬の製造のための アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの大量精製

超遠心機による密度勾配遠心法は、遺伝子治療用の AAV ベクターの精製プロセスで使用されます。AAV ベクターを使用した遺伝子治療の効率と安全性を向上させるには、機能的な完全粒子 AAV ベクターを精製することが望まれます。AAV ベクターの密度はパッケージ化されたゲノムのサイズによって異なるため、AAV ベクターは密度勾配遠心法によってバンドとして分離できます。密度勾配遠心法は AAV ベクターの精製に適していると考えられます。しかし、スイングバケットローター P32ST (40 mL x 6) を使用してヒト投与量の AAV ベクターを精製するには、遠心分離ステップを複数回繰り返す必要があります。これには多数の遠心チューブと多大な労力と時間が必要になります。そのため、治療に十分な量の AAV ベクターを 1 回のステップで精製する技術を開発することが不可欠でした。東京大学医科学研究所の和田先生らは、遺伝子治療に用いられる AAV ベクターの大量精製技術の開発をすすめており、機能的な完全粒子 AAV ベクターの大規模かつ短期間の精製法を報告しています [7]。スイングバケットローターを用いた密度勾配遠心法は、クロマトグラフィーよりも効率的に完全粒子 AAV ベクターと中空粒子 AAV ベクターを分離できることが報告されています。[3、4、5]。しかし、このシステムの規模が小さいため、治療に十分な量の AAV ベクターを得ることはできませんでした。さらに、

AAV ベクターの導入効率は CsCl への長時間曝露により低下することが報告されています [6]。和田先生らは AAV ベクターの処理量増やすためにゾーナルローターを検討しました。2 段階の CsCl 密度液を用いて、1 回の遠心操作で最大で 1000 mL のウイルス液を分離することに成功しました。また、遠心時間を 4 時間という短い時間で分離する方法も開発しました [7] (図 7、8、9)。

完全粒子の AAV ベクターの大規模な精製方法の開発は、大きな技術的課題であったため、ゾーナルローター P32ZT を用いた大規模 AAV 精製システムは、非常に期待されています。

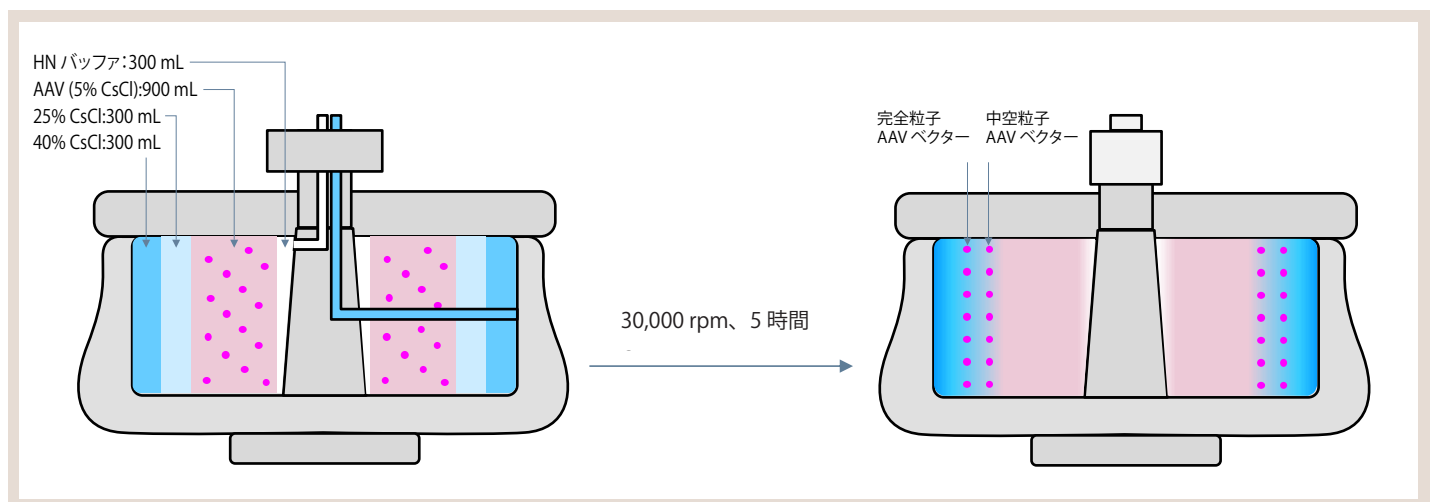


図 7：密度勾配遠心法による AAV ベクターの精製プロセス例。

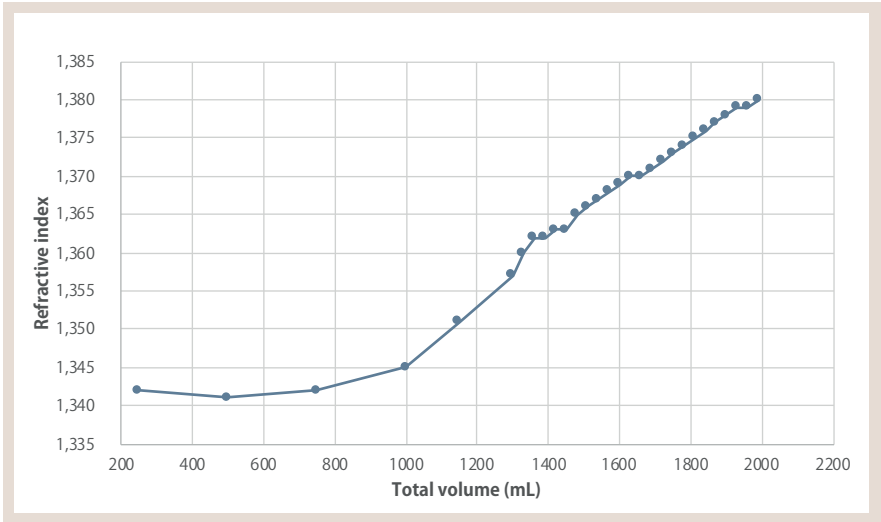


図 8：画分の RI 値の変化。Figure adapted from Wada *et. al.* [7]

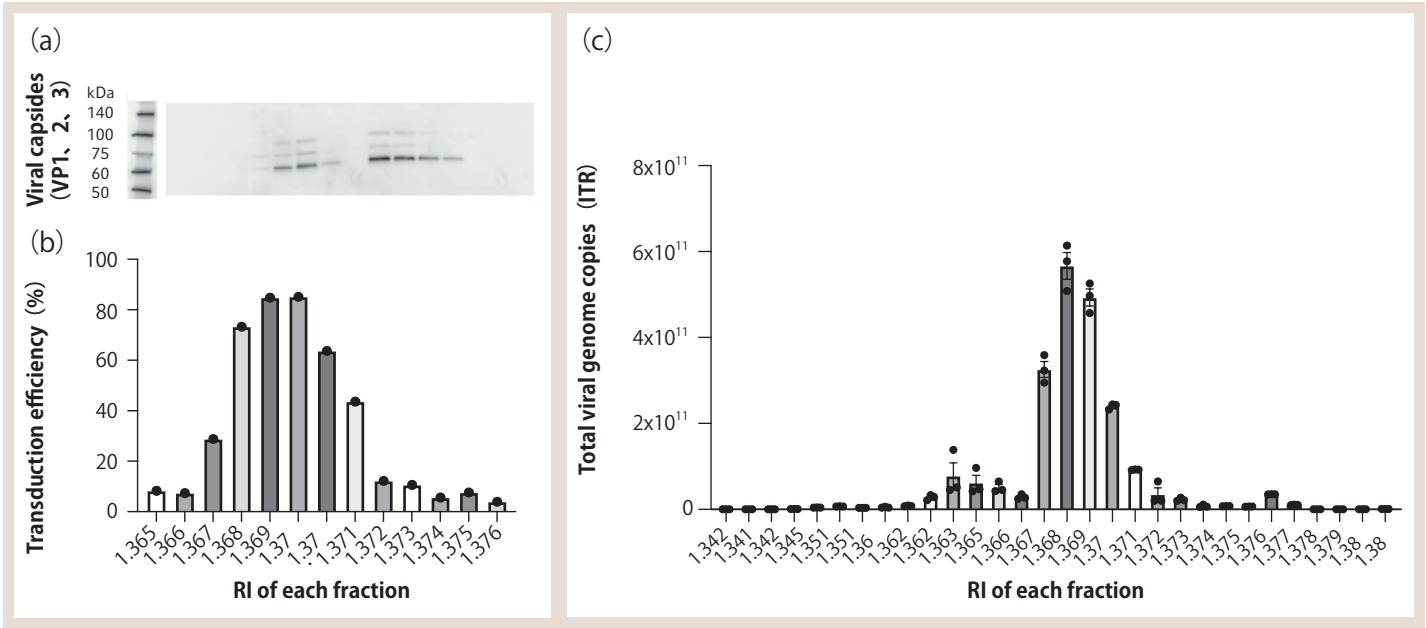


図 9：(a) AAV カプシドタンパク質は、RI 1.366–1.367 と RI 1.368–1.371 の 2 つの画分で検出された。(b) RI 1.368–1.371 において高い活性が見られた。(c) ウイルスゲノムの総コピー数は、RI 1.368–1.371 において高い値が得られた。Figure adapted from Wada *et. al.* [7]

参考文献

- [1] Norman G. Anderson. The Zonal Ultracentrifuge. A New Instrument for Fractionating Mixtures of Particles. J. Phys. Chem. 1962; 66, 10: 1984–89. doi: 10.1021/j100816a039
- [2] Norman G. Anderson. Virus Isolation in the Zonal Ultracentrifuge. Nature 1963; Sep .21.199:1166-68. doi: 10.1038/1991166a0.
- [3] Okada T, Shimazaki K, Nomoto T, Matsushita T, Mizukami H, Urabe M. Adeno-associated viral vector-mediated gene therapy of ischemia-induced neuronal death. Methods Enzymol. 2002; 346:378-93. doi: 10.1016/s0076-6879(02)46067-3.
- [4] Okada T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Kinoshita K, Hayashita-Kinoh H, Nitahara-Kasahara Y, Takeda S and Ozawa K. Scalable purification of adeno-associated virus serotype 1 (AAV1) and AAV8 vectors, using dual ion-exchange adsorptive membranes. Hum Gene Ther. 2009 Sep;20(9):1013-21. doi: 10.1089/hum.2009.006.
- [5] Mizukami H, Okada T, Matsushita T, Ozawa K. A Protocol for AAV vector production and purification. Methods in Enzymology 2002; 346:378-93.
- [6] Hermens, W. T. J. M. C., Brake, O. T., Dijkhuizen, P. A., Sonnemans, M. A. F., Grimm, D., Kleinschmidt, J. A., & Verhaagen, J. Purification of recombinant adeno - associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nervous system. Hum Gene Ther. 1999; Jul 20;10(11):1885-91. doi: 10.1089/10430349950017563.
- [7] Wada M, Uchida N, Posadas-Herrera G, Hayashita-Kinoh H, Tsunekawa Y, Hirai Y, Okada T. Large-scale purification of functional AAV particles packaging the full genome using short-term ultracentrifugation with a zonal rotor. Gene Ther. 2023; 30(7-8): 641–48. doi: 10.1038/s41434-023-00398-x.

注文情報

製品	注文番号
Centrifuge CP-NX シリーズ	お問い合わせください
ゾーナルローター P32ZT	5720215101
シールアタッチメントクミ RPZ-S	5720410109
Rotor P32ST	5720214003

エッペンドルフについて

1945 年以来、液体処理、細胞処理、サンプル処理用の実験装置や消耗品などのエッペンドルフの製品ブランドは、顧客志向のプロセスと革新的な製品の代名詞となっています。現在、エッペンドルフとその約 5,000 人の従業員は、独自の知識と経験を活かして、世界中の研究所や研究機関をサポートする専門家およびアドバイザーとして活躍しています。当社の専門的知識や技術は、お客様中心主義に基づいています。エッペンドルフとお客様とのアイデア交換によって、業界標準となる包括的なソリューションが生まれました。エッペンドルフは、人々の生活環境をサステナブルに改善するという創業者が掲げた理念に忠実に、今後もこの道を歩み続けてまいります。

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact
Eppendorf SE · 22339 Hamburg · Germany
eppendorf@eppendorf.com · www.eppendorf.com

www.eppendorf.com

Trademarks of third parties may appear in this White Paper when referring to their products or services. All trademarks are the property of their respective owners. The trademark name representations and listed owners can be found here: <https://corporate.eppendorf.com/de/marken-patente/>

Eppendorf® and the Eppendorf Brand Design are registered trademarks of Eppendorf SE, Hamburg, Germany. All rights reserved, including graphics and images. Copyright © 2024 by Eppendorf SE.