

## AAV 精製を想定した OptiPrep™ 密度勾配遠心法

### CP-NX シリーズ超遠心機 / P32ZT 形ゾーナルロータ

アデノ随伴ウイルス(略号: AAV)は、ヘルパー依存型のエンベロープを持たない、大きさ 22nm 程度の小型ウイルスです。非病原性ウイルス由来で安全性が高く、導入遺伝子が長期にわたり発現され、非分裂細胞にも遺伝子導入できることから、遺伝子治療用のウイルスベクターとして注目を集めています。

AAV の精製にはワクチン製造時のウイルス精製同様、密度勾配遠心法が用いられます。本報告では、AAV 精製を想定した OptiPrep™ 密度勾配遠心法をご紹介します。

#### 内 容

##### 1. 実験条件

遠心機 : CP100NX 形超遠心機

ロータ : P32ZT 形ゾーナルロータ

遠心速度 : 30,500rpm

最大遠心加速度 : 92,500×g

遠心時間 : 9 時間

加速/減速 : “7”/“7”

温度 : 18°C

密度勾配液 : OptiPrep™(AXIS-SHIELD PoC AS) [60% iodixanol 溶液 (1.32g/cm<sup>3</sup>)]



蒸留水を用いて希釈し、5, 15, 25, 40, 54%溶液を作製する



蒸留水<sup>1)</sup>、そして密度の小さい溶液から順番にロータ内に注入する。

蒸留水	100ml
5% iodixanol (1.031g/cm <sup>3</sup> )	300ml
15% iodixanol (1.085g/cm <sup>3</sup> )	490ml
25% iodixanol (1.137g/cm <sup>3</sup> )	330ml
40% iodixanol (1.215g/cm <sup>3</sup> )	235ml
54% iodixanol (1.291g/cm <sup>3</sup> )	235ml
<hr/>	
Total	1690ml

流量 : 30ml/min

回収法 : 60% iodixanol を用いてアウター側から押し出し、50ml ずつ 34 本回収する

1): 実際の AAV 精製では、蒸留水の代わりに“AAV とヘルパーウイルス(アデノウイルス)を培養したセルライセート”を用いる

##### 2. 結果及び考察

・OptiPrep™ 密度勾配遠心法の結果を図 1 に示した。この図から密度勾配カーブが形成されていることを確認した。

・AAV の密度は 1.22~1.26g/cm<sup>3</sup>(40~50% iodixanol)程度<sup>2)~3)</sup>とあることから、図1に予想される回収フラクションを示した。精製 AAV はフラクション No.28~30 に回収されると考える。

2): Zolotukhin S. et al. (1999) *Gene Therapy*, 6, 973-985.

3): Benjamin S. et al. (2015) *Human gene therapy methods*, Vol.26, No.4 147-157.

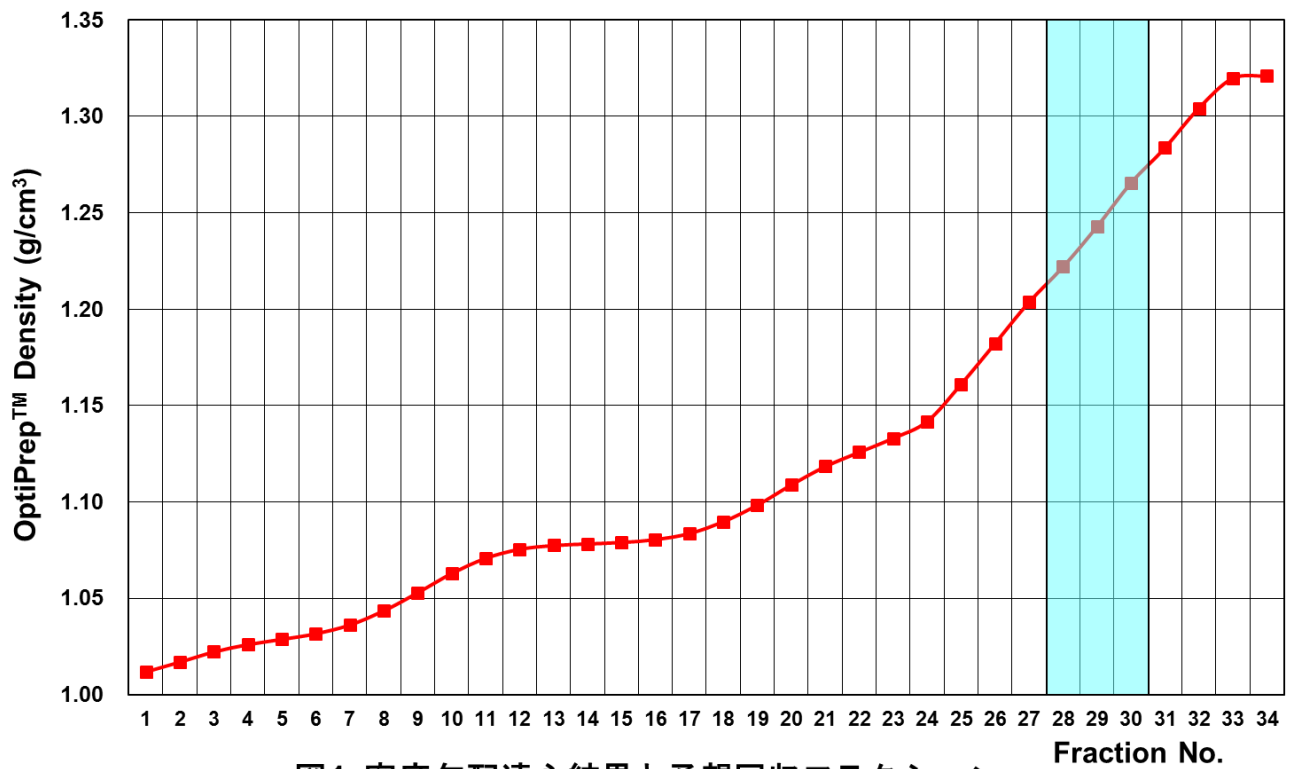


図1. 密度勾配遠心結果と予想回収フラクション

装置



CP100NX 形超遠心機



P32ZT 形ゾーナルロータ



↑  
詳細情報はここから

本資料に関するお問い合わせは日立工機(株)のホームページ  
(<http://www.hitachi-koki.co.jp/contact/>) からお願い致します。

首都圏地区 (東北、甲信越を含む)

東京都港区港南二丁目 15 番 1 号  
品川インターシティ A 棟 18F

03-6738-0860

北海道地区

北海道札幌市厚別区厚別中央 3 条一丁目 2-20

011-896-1748

中部地区

愛知県名古屋市西区則武新町 1-32-16

052-533-0522

関西地区 (鳥取・岡山・京都・四国を含む)

兵庫県西宮市津門大箇町 10-20

0798-23-4125

九州地区 (広島・鳥根・山口を含む)

福岡県福岡市東区松島四丁目 8-5

092-622-4025