

# タンジェンシャルフローろ過 (TFF) の紹介

タンジェンシャルフローろ過について

限外ろ過の基礎知識

アプリケーション

TFFシステムを選択する際の留意点

カプセル・カセット・システム

FAQ



## はじめに

タンジェンシャルフローろ過 (TFF) は、クロスフローろ過としても知られ、生体分子の分離・精製のための迅速かつ効率的な方法です。サンプル溶液はフィルターメンブレン表面に対して平行方向に通過し、メンブレンに差圧が発生すると、メンブレンの孔径を通過できるサンプル中の小さな微粒子や低分子はろ液側に移行します。メンブレンより孔径が大きい粒子や分子は、メンブレン上を滞留し、システムの流路を再循環します。

TFFは、免疫学、タンパク質化学、分子生物学、生化学、微生物学など、幅広い生物学的分野に適用することが可能です。ラボスケールのTFFは、50 mLから100 L程度までのサンプル溶液の濃縮と脱塩に使用することができます。また、低分子から高分子の分画、細胞懸濁液の採取、微生物培地や細胞ライセートの清澄化に使用することができます。

### ■ タンジェンシャルフローろ過とは？

### ■ TFFの典型的なシステム構成

### ■ 限外ろ過の基礎知識

### ■ アプリケーション

- 濃縮
- 透析ろ過
- サイズ分画

### ■ TFFシステムを選択する際の留意点

### ■ TFFカプセル・カセット・システム

### ■ FAQ

### ■ 用語集





## タンジェンシャルフローろ過とは？

メンブレンを利用するろ過は、ライフサイエンス研究室で広く利用されている分離技術です。メンブレンの孔径により、精密ろ過または限外ろ過などに分類されます。孔径0.1  $\mu\text{m}$ から10  $\mu\text{m}$ の精密ろ過は、一般的にサンプルの清澄化やろ過滅菌、微粒子の除去、細胞の採取時に使用されます。一方、限外ろ過は、孔径が0.001  $\mu\text{m}$ から0.1  $\mu\text{m}$ と非常に小さく、タンパク質や核酸、ペプチドや糖質、その他生体分子や生体粒子の濃縮と脱塩、サイズ分画やバッファー交換に利用されます。限外ろ過は、一般的に孔径表示ではなく、分画分子量(MWCO)で分類されます。

メンブレンを利用するろ過には、2種類のろ過方法が存在し、上述した精密ろ過と限外ろ過の両方を使用することができます。

### 直接フローろ過 (DFF):

DFFは、デッドエンドろ過として知られており、メンブレンに対して垂直方向にサンプル溶液を100%通液させようとする方法です。得られたろ液は回収されます。

### タンジェンシャルフローろ過 (TFF):

TFFは、クロスフローろ過としても知られ、生体分子の分離・精製のための迅速かつ効率的な方法です。サンプル溶液はフィルターメンブレン表面に対して平行方向に通過し、メンブレンに差圧が発生すると、メンブレンの孔径を通過できるサンプル中の小さな微粒子や低分子は透過側に移行します。これをろ液と呼びます。一方、メンブレンより孔径が大きい粒子や分子は、メンブレン上を滞留し、システムの流路を再循環します。これを保持液と呼びます。アプリケーションによっては、ろ液と保持液を両方を回収する場合があります。

このTFFの理論を理解するために、メッシュのふるいを利用して、小さな粒子と大きな粒子を分離する方法で説明ができます。この場合、ふるいの孔は、メンブレンの孔に相当します。

DFFでは、小さい粒子と大きな粒子の混合物はメッシュの孔に向かって押し出されます。小さい粒子は、ふるいの孔を通過しますが、大きな粒子はふるいの表面に堆積し層を形成します。そのため、層が形成されると、ふるいの孔より小さい粒子といえども、孔を通過できなくなります (Fig. 1A)。

DFFでは、さらに圧力を加えても分離度は向上することなく、内部の圧力が上昇するだけです。一方、TFFでは、混合液を再循環させることで、メンブレンの表面に層が形成されることを防ぎます。この過程では、ふるいを振るような働きをしています。フローによって乱流が発生すると、ふるいの孔を塞ぐ大きな粒子は除去され、通過できなかった小さい粒子が孔を通過できるようになります。

Figure 1A  
圧力

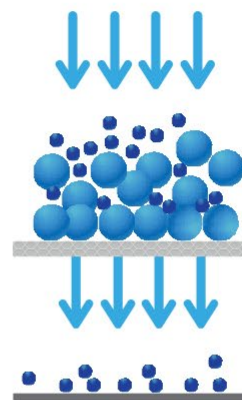
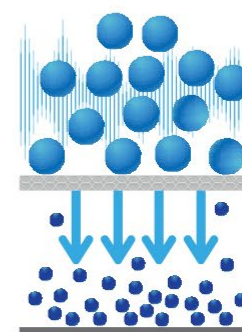


Figure 1B  
乱流

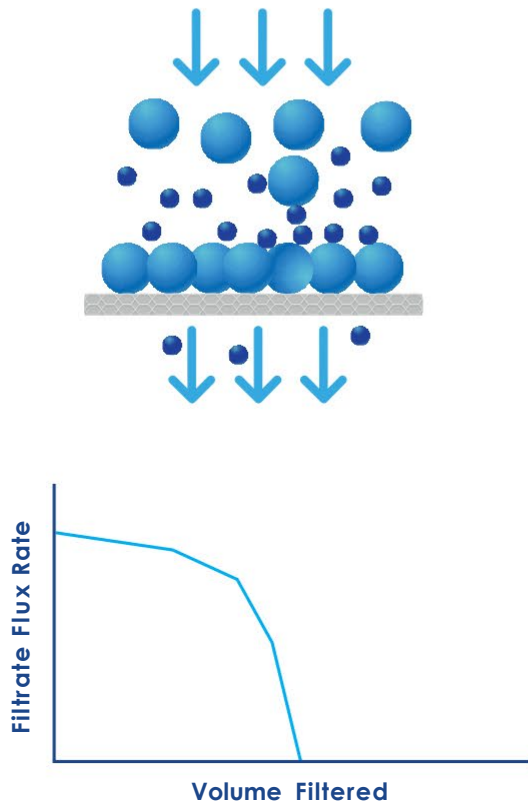


(A) 混合物に直接圧力を加えると、小さい粒子がメッシュのふるいの孔を通過します。しかし、すぐに大きい粒子が孔を塞ぎ、層を形成するため、小さい粒子の通過を妨げます。

(B) ふるいに対して乱流を加えると、大きい粒子が除去され、小さい粒子が孔を通過できるようになります。TFFの流体におけるキネティクスは、この乱流と同じ原理です。

溶液を処理する際に、DFFとTFFの違いは、溶質流出速度を溶質量に対してプロットすることで視覚化できます。Fig. 2, 3に各プロット結果を示しました。

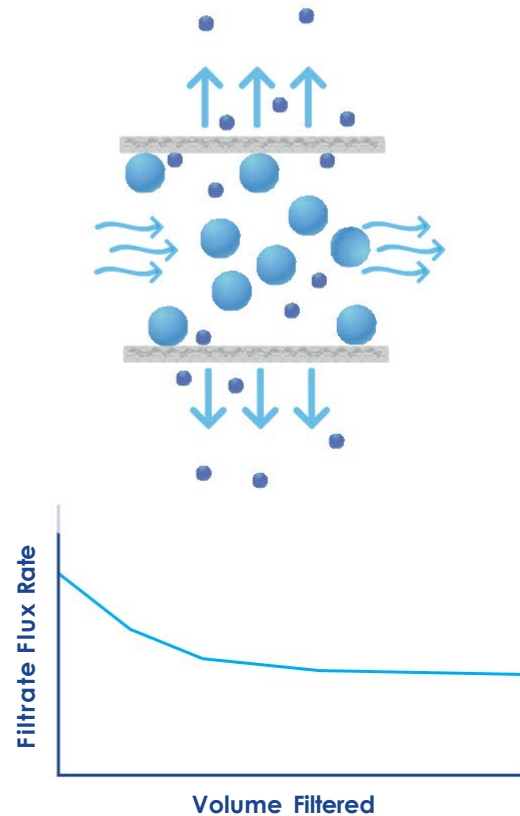
Figure 2  
直接フローろ過の工程



サンプル液はメンブレンの上部からアクセスします。メンブレン表面の孔径より大きな分子が蓄積すると、液体と孔径より小さい分子や粒子の通過を妨げます。メンブレン表面に形成した大きな分子の層を「ゲル層」と呼びます。

ろ過するサンプル量が多くなると、メンブレンの目詰まりが増加し、ろ過処理量が急激に低下します。結果的に、それ以上のろ過ができなくなります。

Figure 3  
TFFの工程



サンプル液は、メンブレンの表面に沿って平行方向に流れます。このクロスフローにより、メンブレン表面に分子の蓄積を防ぐことができます。ゲル層の形成を抑制することにより、孔径より小さい分子は、メンブレンを通過することができます。

TFFの工程では、DFF工程で見られる急激な単位面積当たりのメンブレン処理量の低下を防ぎ、いわゆる透過流束を維持させることが期待できます。





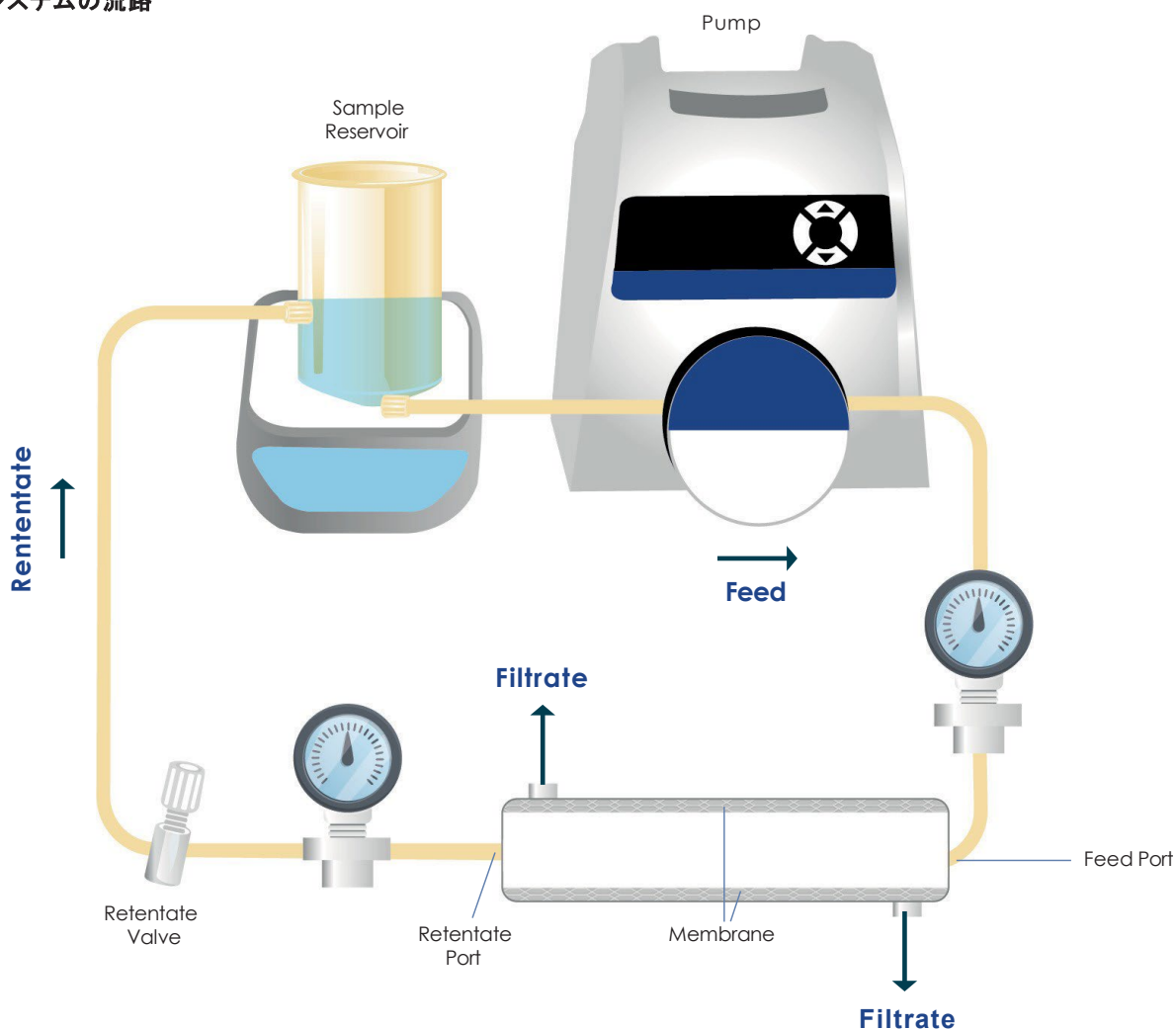
## TFFシステムの構成

TFFシステムには通常、TFF用メンブレン（カプセルまたはカセット、ホルダー）、ペリスタリックポンプ、チューブ、バルブまたはクランプ、1つ以上の圧力ゲージ及びサンプルリザーバーが必要です。圧力計は、TFFシステムの供給ライン（Feed）、保持液ライン（Retentate）、ろ液ポート（Filtrate ports）に設置されます。

圧力計を使用しないTFFシステムの構築も可能ですが、少なくとも供給側（ポンプとTFFカプセルの間）に圧力計を使用することを強くお勧めします。TFF工程において、この圧力値は重要な変数です。圧力を常時モニターして、フローを制御することができれば、より安定した結果を得ることができ、システムの問題時のトラブルシューティングにも非常に有効です。

Figure 4

TFFシステムの流路



全てのTFFシステムに関わる重要な変数として、膜差圧 (TMP) とクロスフロー速度 (CV) があります。

1. TMPは、液体がメンブレンを通過する際に、透過する分子を移動させる力を示します。
2. CVは、液体が流路を通り、メンブレンを横切って流れていく速度を示します。この速度は、メンブレン表面に蓄積し、溶液のフローを制限する分子を除去する力を意味しています。

## TFFシステムの操作

TFFシステムを操作する場合は、液体はサンプルリザーバーから供給ポートにポンプで送られ、メンブレン表面を平行方向に流れ、保持液ポートから再びサンプルリザーバーへ戻ります (Fig. 4)。

クロスフローは、メンブレン表面に滞留する大きな分子や凝集体を取り除き、ゲル層の形成 (メンブレン表面に濃縮された生体分子や微粒子の層によって、メンブレンを詰まらせる) を抑制します。

供給ラインを通過する液体は、供給ポートと保持液ポートの間に圧力差を発生させます。この圧力差は、メンブレンに対して加圧され、クロスフローの速度を上げるか、逆流防止弁を締めて、液体の通過を抑制することで、さらに上昇します。この結果、TMPが液体中に含まれる小分子や微粒子をメンブレンに通過させる力になります。

メンブレンを通過した液体 (透過液またはろ液) は、メンブレンの孔径よりも小さい分子や粒子が含まれます。メンブレンの孔径よりも大きな分子や粒子は、保持され、流路内を循環し続けます。

TMPとCVを効果的に調製することで、膜の目詰まりを抑制し、より多くのサンプルを短時間で処理でき、TFFシステムの操作効率を向上させることができます。

TFFシステムの操作は、以下のステップから構成されます：

1. 使用前にTFFシステムを洗浄し、保存剤を除去します。
2. メンブレンの標準化透水率 (NWP) を測定し、システム性能のベースラインを確立します。(※この操作は必須ではありませんが、システムを洗浄して再使用する場合は推奨します。)
3. サンプルバッファーでシステムのコンディショニングを行いません。(システムから空気を除去し、システム温度を調整し、洗浄用の液体の残渣により生体分子の沈殿や変性の可能性を防止します。)
4. サンプルの処理を行いません。(濃縮、透析、分画)
5. システム及びTFFメンブレンを洗浄し、洗浄効果を確認します。
6. TFFデバイスを保存します。

カプセルとカセットのコンディショニング、NWPプロトコル、推奨流束、洗浄、保存を含む包括的なシステム操作は、ポールのTFF使用説明書 (英語版) に記載されています。



## 限外ろ過の基礎知識

限外ろ過は、液体中の極めて小さな粒子や分子を分離するために利用されるメンブレンろ過技術です。分離の基本は分子の大きさですが、分子の形状や電荷など、サイズ以外の要因も関係します。メンブレンの孔径より大きな分子は、メンブレン表面に保持され、限外ろ過の過程で濃縮されます。

### 限外ろ過とメンブレンを利用しない分離技術(クロマトグラフィー、溶媒抽出、遠心分離)の比較:

- サンプル負荷が少ない
- タンパク質変性を生じさせる可能性のある有機溶媒を必要としない
- イオン環境やpHは維持される
- 高速で比較的安価
- 低温による処理も可能
- 分子の濃縮と精製を一度に実施可能

限外ろ過のメンブレンの保持特性は、分画分子量 (MWCO) で表されます。MWCOは、一般的なタンパク質がメンブレンによって90%以上保持されるおおよその分子量を指します。しかし、分子の形状によっては、メンブレンの保持に直接的な影響を与えることがあります。例えば、DNAのような直鎖状の分子は、同じ分子量の球状分子を保持する孔を通過することができます。

ポールのオメガメンブレンは、高い選択性を持ちます。Fig. 5の曲線は、オメガメンブレンの選択性を示しています。細孔径分布が狭いため、分子量がメンブレンのMWCO以下の分子は、ほとんど保持されないことを示しています。

限外ろ過には3つの一般的な用途があります:

#### 濃縮:

限外ろ過は、希薄なタンパク質やDNA、RNAサンプルの濃縮に非常に便利な方法です。100 kb程度のDNAをせん断したり、酵素を失活させることができなく、非常に効率的です。

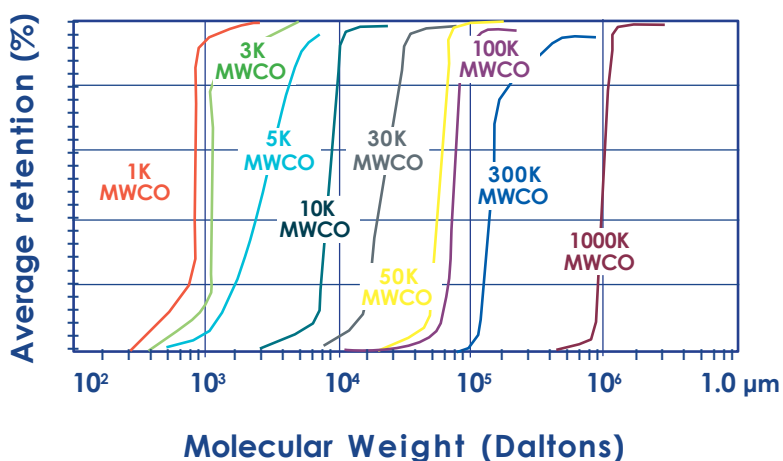
**脱塩とバッファー交換:** 限外ろ過は、塩の除去やバッファー交換、洗浄剤の除去、結合分子と遊離分子の分離、低分子化合物の除去、イオンやpH環境の変化など、目的分子を取り巻く環境の変化を効率的に実施できる方法です。

#### 分画:

限外ろ過は、分子量が同程度の2つの分子を分離することはできません。しかし、限外ろ過は、大小の分子の分画に使用することができます。

分離される分子は少なくとも10倍以上大きさに違いがあれば効果的な分画が可能です。限外ろ過による分画は、タンパク質を含まない液の調製や、未結合タンパク質や夾雑物の分離に有効です。

Figure 5  
限外ろ過メンブレンの選択性



## MWCOの選択

Table 1は、様々な溶質に対する異なるMWCOにおけるメンブレンの保持特性を示しています。

タンパク質の場合、濃縮（メンブレン上に保持）を行なう際は、目的タンパク質の分子量の1/3～1/6のMWCOを選択します。一方、ろ液を使用する際は、目的タンパク質の分子量の3～6倍のMWCOを選択します。

限外ろ過メンブレンによる分子の保持は、分子量など様々な要因によって決定されます。したがって、MWCOの選定の際は、分子形状や電荷、サンプル濃度、組成、操作条件なども考慮する必要があります。

### 分子の移動性を向上させるパラメーター：

- サンプル濃度
- 直鎖状の分子形状
- 高い膜差圧
- 分子の分解に有利なバッファー組成
- 分子自体を変化させる（例：立体構造変化など）pHやイオン環境

### 分子の移動性を低下させるパラメーター：

- サンプル濃度
- 分子の凝集を引き起こすバッファー条件
- サンプル全濃度を上げる夾雑物の存在
- 低膜差圧
- メンブレンやデバイスへの吸着
- 低温（4℃）

メンブレンのMWCOの定義はメーカーによって異なるため、予備実験を行ない、メンブレンの性能を確認することが重要です。オメガメンブレンを使用するポールの限外ろ過遠心フィルターは、TFFシステムにスケールアップする前のメンブレン性能の指標となる製品です。遠心デバイスは少量のサンプルの試験が可能であり、非常に使いやすく費用対効果も高いです。



## オメガメンブレン

ポールのオメガメンブレン（PES）は、高流量特性と選択性を提供します。オメガメンブレンは、メンブレン表面と内部の間質構造へのタンパク質の非特異的吸着を最小限にするために特別に改良されています。この高分子膜は、PESのユニークな化学的特性により、生物学的及び物理的な分解に対して安定です。

オメガメンブレンは、ポリオレフィン製の多孔質不織布の上にキャストされています。異方性構造により、薄膜の表層と多孔質の下層の支持体から構成されています。

皮膚のような構造は、メンブレンの空隙と透過性能を決定し、一般的に均一でサブミクロンの深さの構造を持つメンブレンよりも迅速かつ容易に洗浄することができます。

このメンブレンは、酸、塩基、その他さまざまな溶媒に適合します。オメガメンブレンは、広範なMWCOをカバーします。



**Table 1 オメガメンブレンの保持特性**

**MWCO選定ガイド (タンパク質アプリケーション)**

MWCO	メンブレンの公称孔径	生体分子のサイズ	生体分子の分子量
1K	-	-	3K - 10K
3K	-	-	10K - 20K
5K	-	-	15K - 30K
10K	-	-	30K - 90K
30K	-	-	90K - 180K
50K	5 nm	15 - 30 nm	150K - 300K
70K	-	-	210K - 420K
100K	10 nm	30 - 90 nm	300K - 900K
300K	35 nm	90 - 200 nm	900K - 1800K
500K	-	-	1500K - 3000K
1000K	100 nm	300 - 600 nm	> 3000K

**MWCO選定ガイド (核酸アプリケーション)**

MWCO	塩基対 (二本鎖)	塩基数 (一本鎖)
1K	5 - 16 Bp	9 - 32 Bs
3K	16 - 32 Bp	32 - 65 Bs
5K	25 - 50 Bp	50 - 95 Bs
10K	50 - 145 Bp	90 - 285 Bs
30K	145 - 285 Bp	285 - 570 Bs
50K	240 - 475 Bp	475 - 950 Bs
100K	475 - 1450 Bp	950 - 2900 Bs
300K	1450 - 2900 Bp	2900 - 5700 Bs
1000K	4800 - 9500 Bp	> 9500 Bs

**MWCO選定ガイド (ウイルスアプリケーション)**

MWCO	メンブレンの公称孔径*	ウイルスまたは粒子の直径
100K	10 nm	30 - 90 nm
300K	35 nm	90 - 200 nm

\*公称孔径は電子顕微鏡で測定しました。

## アプリケーション

TFFの主な用途は、濃縮、脱塩、バッファー交換、低分子と高分子の分画です。また、TFFは発酵や細胞培養液から細胞自体、細胞のデブリスを除去するために使用することができます。

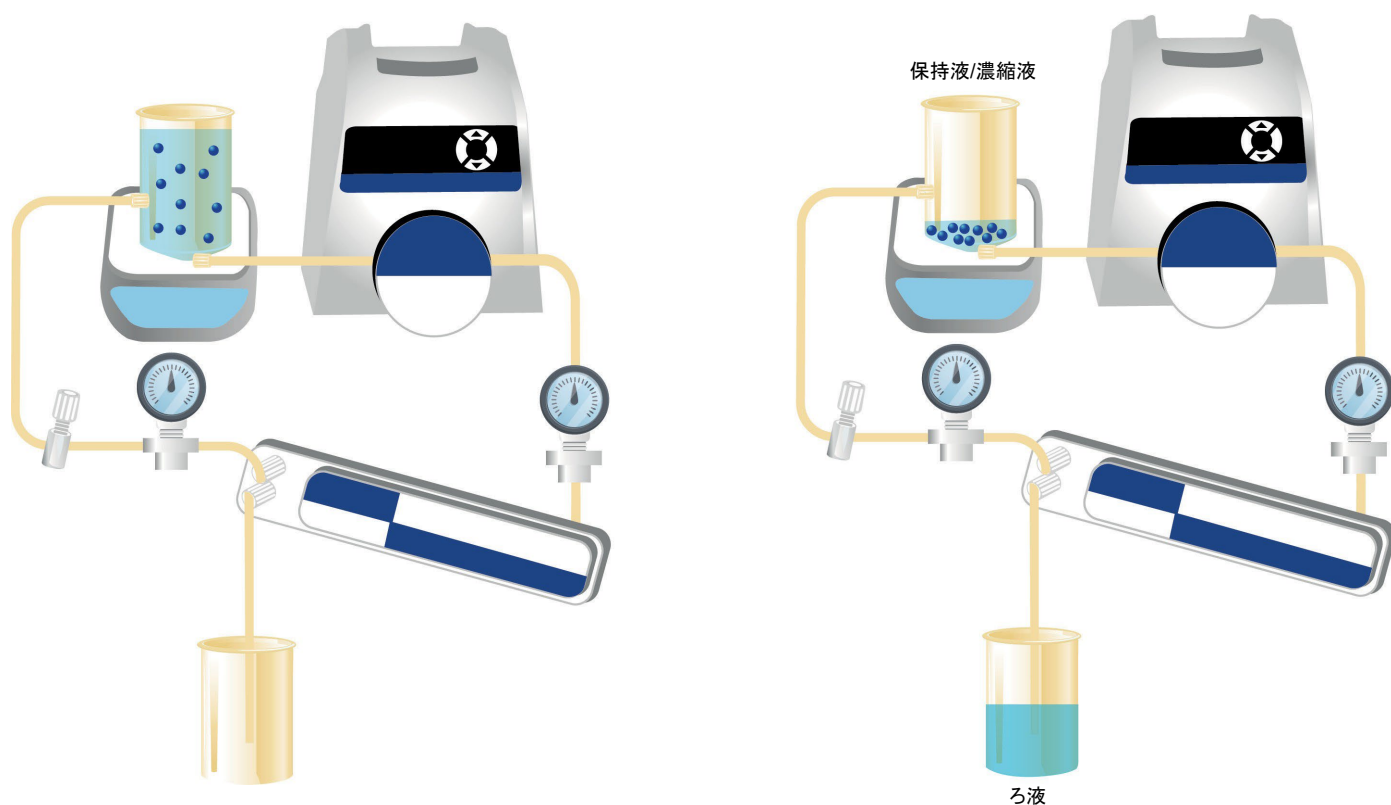
### 濃縮

濃縮は、溶質分子を保持したまま液体を除去するシンプルな工程です。溶質濃度は、液量の減少に反比例して増加します。つまり、容積を半分すると濃度は実質的に2倍になります。

サンプルを濃縮するためには、保持する目的分子の分子量より大幅に小さいMWCOの限外ろ過膜を選択します。このことは、目的分子を完全に保持し、高い回収率を得るために重要です。ポールでは、濃縮を行なう場合、目的分子の分子量に対して、MWCOが1/3 ~ 1/6の膜を選択することを推奨します。

TFF用膜を設置し、TFFを初期化します。次にサンプルを加え、システム流路内にフローします。供給側と保持側の圧力を設定し、溶媒を回収します。目的濃度に対したら、フローを停止し、サンプルを回収します。

Figure 6  
TFFによる濃縮操作



濃縮液を回収する際は、濃縮液の大部分がゲル層を形成し膜上に保持されている可能性があることに留意してください。ポールは、TFFの使用説明書に、濃縮液の回収率を最大化するための詳細な手順を提供しております。



## 透析ろ過

透析ろ過は、タンパク質やペプチド、核酸などの生体分子を含む溶液から、限外ろ過メンブレンを用いて塩類や溶媒を完全に除去、置換、低濃度化する技術です。

### 透析のメリット

透析膜やカラムを用いるゲルろ過など、脱塩やバッファー交換に利用される従来の技術は非常に効果的です。しかし、透析は処理に数日を要することもあり、平衡化のために大量の水を必要とします。また、透析バッグの手作業による製品損失のリスクもあります。ゲルろ過は、サンプルを希釈することになり、濃縮するために追加のゲルろ過ステップが必要になることが多いです。工程を追加することは、サンプルのロスやコンタミネーションの可能性が懸念されます。

塩や溶媒の除去、バッファー交換を迅速かつ簡便に行なうことができるのが透析ろ過の特長です。また、同一システム内でサンプルを濃縮するため、サンプルのロスやコンタミネーションリスクを最小限に抑えることができるのも大きな利点です。

透析ろ過にはいくつかの方法があります。最終的な結果が同じでも、処理時間や処理量が大きく異なる場合があります。そのため、それぞれの方法の違いを理解し、実験条件に合わせて選択できることが重要です。

### 連続透析ろ過

連続透析ろ過は、水または新しい緩衝液を透析液と同じ速度で透析液に添加することで、保持液（サンプル）中の緩衝液の塩または低分子を除去する技術です。Fig. 7は、ミニメイトEVO TFFシステムを使用する典型的な連続透析ろ過のセットアップを示しています。保持液とサンプル濃度は、連続透析ろ過中では変化しません。しかし、透析ろ過の工程で水を使用した場合、塩類が除去され、サンプルの導電率が低下します。緩衝液を使用した場合、新しいバッファー中に含まれる塩類は増加し、それ以外の塩類は除去されます。

除去された塩の量は、保持液量に対する生成されたる液量に関係します。生成されたる液量は、通常「透析液量」と呼びます。1回の透析液量（DV）は、透析ろ過を開始したときの保持液の体積を指します。連続透析ろ過では、ろ液の生成と同じ速度で液体（水や緩衝液）が追加されます。回収された透析液量が開始時の保持液量と等しい場合、1 DVを処理したことになります。

連続透析ろ過を使用すると、バッファーで6回（6 DV）洗浄することで、100%透過する溶質を99.5%以上除去することができます。

塩や溶媒よりも大きい分子でも、メンブレンの孔径より小さければ、メンブレンを通過し洗浄することができます。しかし、こういった分子の透過性は必ずしも100%にならない場合があります。このような場合、完全に除去するためには、より多くの液体、すなわちより多くのDVが必要になります。一般的に分子が大きくなればなるほど透過性は低下し、必要な透析液量が多くなります。

特定のメンブレンを通過する分子の透過性は、特定の条件下で、保持液中の分子濃度とろ液中の分子濃度を比較することで決定されます。

$$\text{透過率 (\%)} = (\text{分子濃度}_{\text{ろ液}} / \text{分子濃度}_{\text{保持液}}) \times 100$$

透過性は、メンブレンの阻止係数（rejection coefficient）として示されることがあります。すなわち、ある分子が通過するのを阻止または拒絶するメンブレンの性能を説明する言葉として表現されます。

$$\text{阻止係数} = 1 - (\text{分子濃度}_{\text{ろ液}} / \text{分子濃度}_{\text{保持液}})$$

阻止係数が1の時、透過率0%を意味します。

阻止係数が0の時、透過率100%を意味します。

透過性は、膜差圧（TMP）、クロスフロー速度、保持液の濃度、pH、イオン強度、ゲル層形成などの影響を受けます。そのため、ろ過工程中に透過性が変化することがあります。

Figure 7  
ミニメイトEVO TFFシステムを利用するTFF透析ろ過のセットアップ例



サンプルリザーバーのフタはしっかりと密閉され、透析液は直接サンプルリザーバーへ送り込むことができます。そのため、透析液を送り込むポンプ等はありません。専用のポンプを利用して、TFF用メンブレンにサンプルのフロー開始すると、差圧が生まれ、連続透析ろ過を行なうことができます。

Table 2は、メンブレンの透過性と特定の分子の除去に必要な透析液の容量の関係を示しています。100%の透過率を持たない分子は、サンプル中から除去するためにより多くの透析液量 (DV) が必要になります。例えば、透過率75%の分子を99.9%除去するためには、9 DV必要になります。一方、透過率100%の分子は、7 DVあれば十分に除去できます。

Table 2  
連続透析ろ過

透析液量 (DV)	透過率 100% 阻止係数 = 0	透過率 75% 阻止係数 = 0.25
1	63%	53%
2	86%	77%
3	95%	89%
4	98.2%	95%
5	99.3%	97.6%
6	99.7%	98.9%
7	99.9%	99.4%
8		99.7%
9		99.9%

0% - 塩、溶媒、緩衝液など

25% - 塩などの低分子化合物より大きい、メンブレンのMWCOより小さい分子

## 非連続透析ろ過 (順次希釈法)

順次希釈法による非連続透析ろ過では、最初にサンプルを水またはバッファーで所定の容量に希釈します。希釈されたサンプルは、次に限外ろ過によって元の容量に濃縮されます。このプロセスでは、不要な塩類や溶媒、より小さな分子が除去されるまで繰り返します。希釈を重ねることでより多くの低分子が除去できます。

Fig. 8に示すように、一般的にサンプルは等倍のバッファー (1 DV) で希釈されます。また、処理容器が全量を保存できる大きさであれば、一度に複数を添加することも可能です。通常、サンプルを希釈すると粘度が低下するため、溶媒のろ過流量が速くなる可能性があります。

Figure 8  
非連続透析ろ過 (順次希釈)

- 大分子 - メンブレン孔径より大きい
- 小分子 - 塩類または溶媒

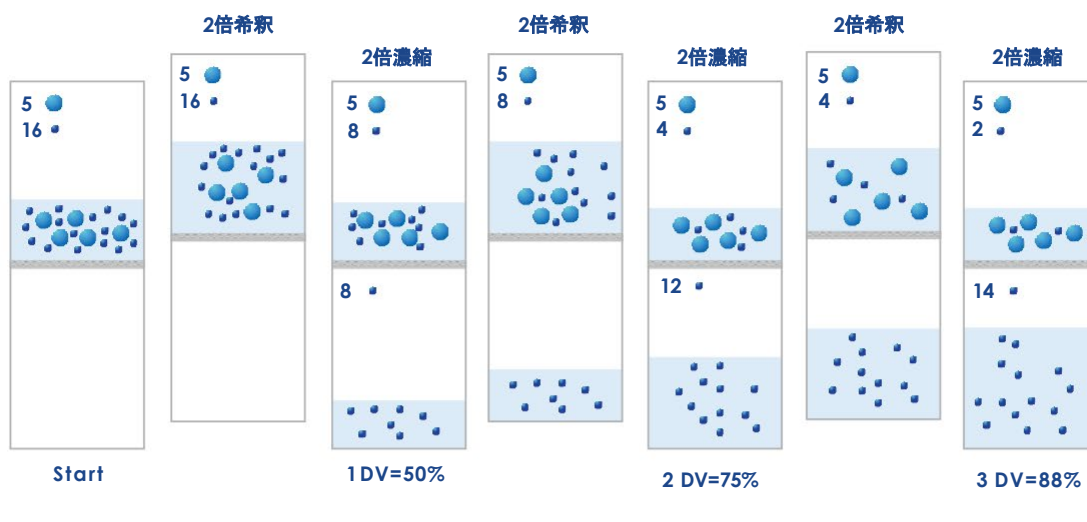
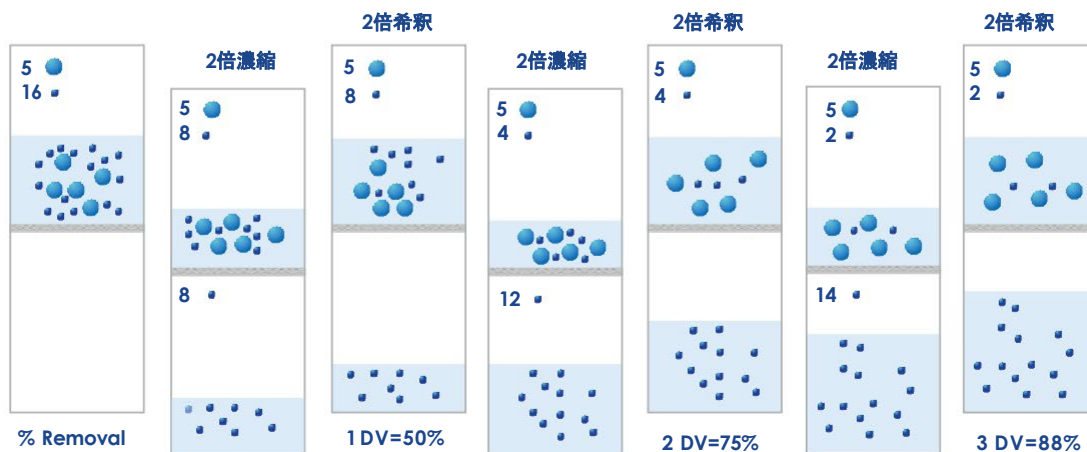


Figure 9  
非連続透析ろ過 (減容法)

- 大分子 - メンブレン孔径より大きい
- 小分子 - 塩類または溶媒





## 非連続透析ろ過 (減容法)

減容法による非連続透析ろ過は、順次希釈の手順を逆転させた方法です。最初にサンプルを所定の容量に濃縮し、次に水またはバッファーで元の容量に希釈します。このプロセスでは、不要な塩類や溶媒、より小さな分子が除去されるまで繰り返します。希釈を重ねることでより多くの低分子が除去できます (Fig. 9)。

透析ろ過後は、サンプルを濃縮したり、次の精製工程に進むことができます。

順次希釈法または減容法のどちらの方法においても、最終的なサンプル濃度と体積は同じになります。塩濃度も同様に減少しています。しかし、減容法は、順次希釈法と比べ、透析バッファーの量は半分になります。このことは、最初の濃縮工程で体積が半分になっているためです。このことは、最初の濃縮工程でサンプルの体積が半分になっているためです。

このことから、非連続透析ろ過または連続透析ろ過で濃縮すれば、必要な透析バッファーの容量を減らし、処理時間を短縮できると考えられます。しかし、サンプルが濃縮されると粘度が上昇し、溶媒のろ過処理量が低下します。透過流束は、濃縮倍率の対数に反比例して変化します。

$$J = k \ln(C_g / C_b)$$

パラメーター:

J = 透過流束

k = 定数

$C_g$  = ゲル層の濃度

$C_b$  = 保持液の濃度

これは、サンプル濃度 ( $C_B$ ) が数%以上増加すると非常に顕著になり、サンプル中に含まれる分子の特性に依存します。そのため、濃縮したサンプルの透析ろ過は、濃縮されていないサンプルと比較して、透析バッファーの量が少量でも大幅に時間を要する可能性があります。生産性を最大化するために、最適な条件を見つけるための簡単なプロトコルが用意されています。

## 連続透析ろ過と非連続透析ろ過

### - どちらのろ過方法を使用すべきか？

どちらの技術をどの工程で使用するかは、以下の要因をご確認ください:

- 初期サンプル量、濃度、粘度
- 必要な最終サンプル濃度
- 各濃度での試料の安定性
- 透析ろ過に必要なバッファーの量
- 総処理時間
- 使用可能なリザーバーサイズ
- 経済的

どちらの方法を利用するかは、様々な基準に基づいて選択する必要があります。例えば、サンプル容量は重要なパラメーターの一つです。特に工程が自動化されている場合、ラボスケールと製造スケールでは大きく異なります。ラボスケールでは、簡便さのため、非連続透析ろ過がよく利用されています。連続透析ろ過は、透析液を一定速度で添加するポンプや装置が必要になります。どちらの技術もプロセス開発用途に自動化することが可能です。

機器の問題を排除し、工程に着目すれば、その違いを比較することができます。

**Table 3**  
減容法による非連続透析ろ過と連続透析ろ過による塩濃度の減少

透析液量	非連続透析ろ過 (2倍濃縮)		連続透析ろ過	
	100% 透過率 0% 保持率*	75% 透過率 25% 保持率*	100% 透過率 0% 保持率*	75% 透過率 25% 保持率*
1	50%	41%	63%	53%
2	75%	65%	86%	77%
3	88%	79%	95%	89%
4	94%	88%	98.2%	95%
5	96.9%	93%	99.3%	97.6%
6	98.4%	95.6%	99.7%	98.9%
7	99.2%	97.4%	99.9%	99.4%
8	99.6%	98.4%		99.7%
9	99.8%	99.0%		99.9%
10	99.9%	99.4%		

\*低分子の保持

0% - 塩や溶媒、バッファーなど

25% - 分子量がMWCOより小さいが、塩類などの低分子化合物より大きい分子

イオン強度、バッファー組成、安定剤濃度は、試料の安定性に影響を与えます。透析ろ過により、塩や安定化分子が除去されることで、タンパク質が変性・凝集する可能性があります。タンパク質溶液の濃縮や希釈の過程でも、分子間の相互作用に影響を与え、変性や凝集だけでなく、沈殿やサンプルのロスを引き起こす可能性もあります。濃縮の影響を評価し、どのような透析ろ過方法を行なうのが最適かを決定する必要があります。

連続透析ろ過は不連続透析ろ過に比べ、保持液の濃度が一定であるという利点があります。また、サンプルの安定性に関しても、より穏やかな工程であると考えられています。

#### いつ透析ろ過を実施するか？ - 濃縮の前か後か

サンプルを濃縮することで、必要な透析液の量を大幅に減らすことができます。また、連続透析ろ過は、順次希釈による不連続透析ろ過より少ない容量で実施できます。したがって、まずサンプルを必要な濃度に濃縮し、その後連続透析ろ過を行えば、良好な結果が得られると推察できます。

しかし、濃度が一定以上高くなると、溶媒の透過流束が極端に遅くなる場合があります。濃縮されたサンプルの透析ろ過に必要な時間は、濃度を下げるために最初にサンプルを希釈した場合よりも長くなる場合があります。この場合、希釈したサンプルを連続的に透析ろ過するためには、より多くの透析液量が必要となりますが、透析液の透過流束が速くなるため、トータルの処理時間は短くなります。(処理時間=ろ過流量×ろ過容量)

一般的に、連続透析ろ過に最適な保持液濃度は以下の通りです。

$$(C_G/C_R) = 1 \text{ or } C_{R(\text{optimum})} = C_G/e = 0.37C_G$$

#### パラメーター:

$C_G$  = ゲル層の濃度

$C_R$  = 保持液の濃度

$C_{R(\text{optimum})}$  = 透析ろ過を行なうべき最大の保持液濃度

サンプルの $C_G$ 値は、メンブレン上でサンプルを濃縮し、透過流束 vs 対数濃度 (または濃度係数) のデータを記録し、プロットすることで決定できます。このプロットは、透過流束 = 0 に外挿することができます。このサンプルはでは、開始濃度やろ過速度に関わらず、 $C_G$ 値は同じになります。

Figure 10  
サンプルの $C_G$ 値の決定

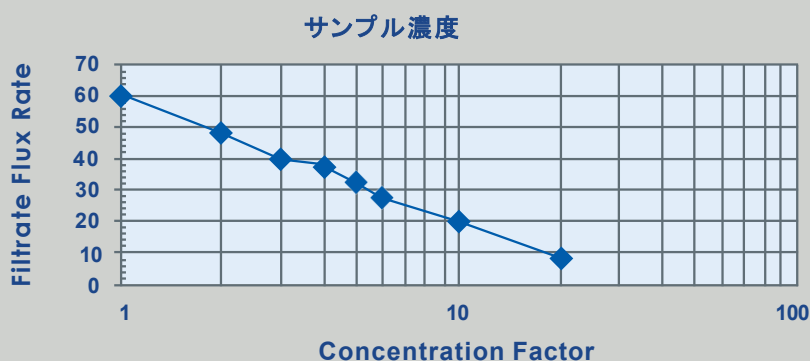


Fig. 10では $C_G$ 値は約33倍の濃縮倍率となります。したがって、透析ろ過を行なう最適な濃度は、 $0.37 C_G = 12.2 X$ となります。サンプル濃度が5 mg/mLであれば、61 mg/mLになった時点で透析ろ過を実施するのが良いと考えられます。最終濃度が61 mg/mL未満であれば、濃縮前に特定の分子を除去する必要がない限り、濃縮後に透析ろ過を実施すれば良いと考えられます。

選択された限外ろ過デバイスによって、連続または非連続の透析ろ過の選択に悩まされるケースがあります。攪拌セルと遠心分離機は、その操作方法から非連続の透析ろ過に最も適しています。TFFデバイスは、どちらの透析ろ過技術にも有効であるのが利点です。

### 透析ろ過のまとめ

透析ろ過は、溶液の脱塩やバッファー交換のための高速で効果的な技術です。連続または非連続に行なうことができます。連続透析ろ過は、濃縮・希釈を繰り返す順次希釈法による非連続透析ろ過と比較して、より少ない透析液量で同程度の脱塩処理を行なうことができ、より簡単に実行することができます。

また、連続透析ろ過は、活性生体分子に対してより優しく、穏やかな工程であると認識されています。一方、減容法による不連続透析ろ過は、連続透析ろ過に比べ、より少ない透析液量で行なうことができます。

通常、透析前にサンプルを濃縮することで、必要な透析液量を減らし、時間を短縮することができます。しかし、サンプルの粘度が高くなりすぎると、溶媒の透過流速が低下し、処理時間が大幅に増加することがあります。サンプルの $C_G$ を決定することで、どれくらいの濃度で透析ろ過を行なうべきかが分かります。



## 分画

限外ろ過は、分子の大きさによって分離することができます。分離される分子は、効果的な分離のために少なくとも10倍以上の分子量の大きさの違いが必要です。

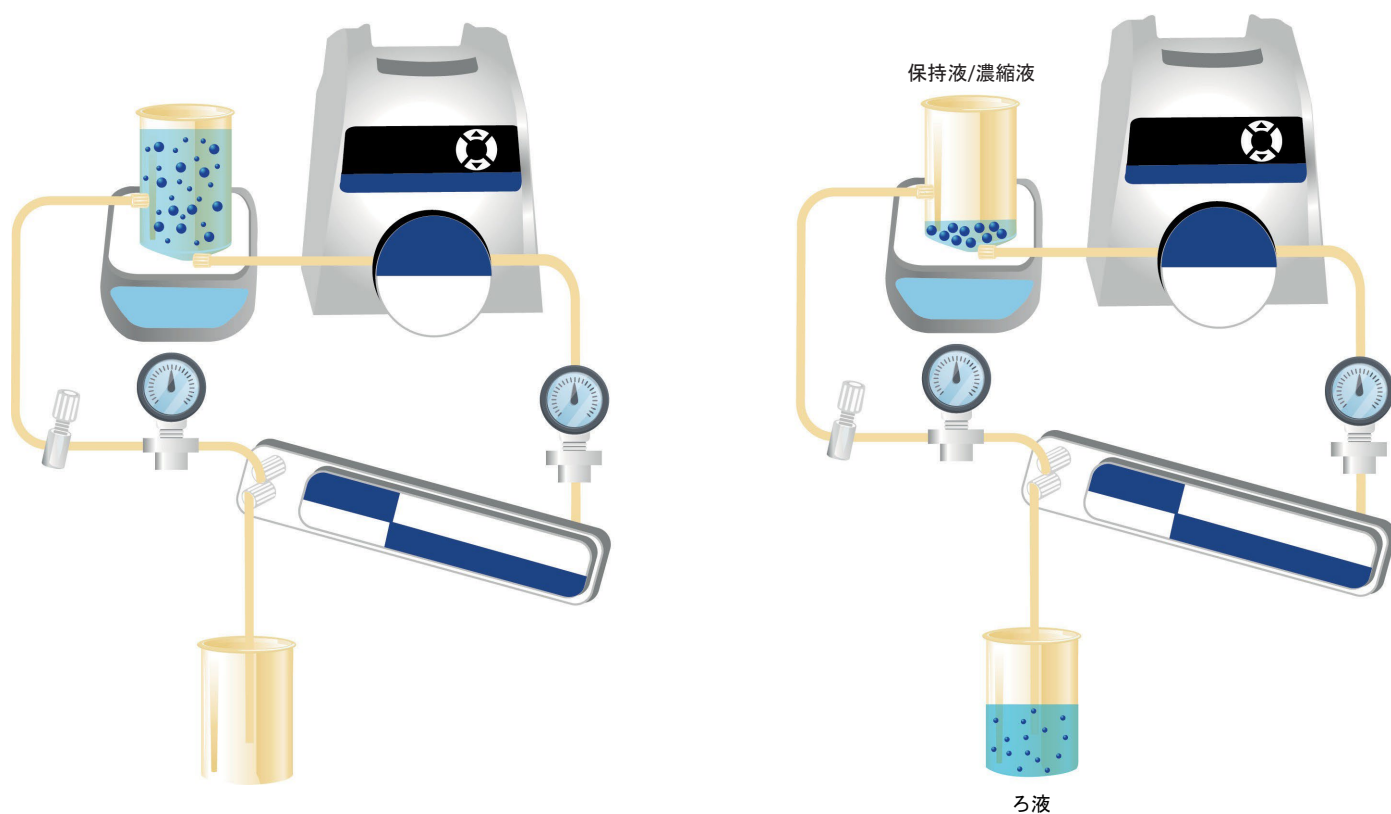
分画を行なう場合、大きな分子は保持液側に残り、システムの流路を循環します。小さな分子はメンブレンフィルターを通り、ろ液側に移動します。

分子量の大きい画分は、バッファー成分がろ液側に移動するにつれて、徐々に濃縮されていきます。大きな分子画分の濃縮を避けるために、ろ液が生成されるのと同じ速度で新しいバッファーをサンプルリザーバーに追加することが可能です。

限外ろ過を用いた分画は、タンパク質を含まない溶質の調製や、ラベル化された分子と未結合分子の分離などの用途に有効です。

分子量が非常に近い2つの分子を限外ろ過で分離することはできません。その場合は、クロマトグラフィーの技術を利用し精製することをご検討ください。

**Figure 11**  
TFFによる分画



ろ液を回収する際は、システムのベントポートやチューブに溶液が残っている場合があります。ポールは、TFF使用説明書において、濃縮液とろ液の両方の回収率を最大化する方法について、詳細な手順を記載しています。

## TFFシステム選択時の留意点

お客様のご要望に応じた最適なTFFシステムを選択するために、以下のステップを確認・検討してください。

### ステップ1: TFFプロセスの目的の明確化

分離は、低分子量の分子や微粒子をメンブレンへ通過させ、目的分子を保持するメンブレンの選定を最初に行ないます（濃縮）。または、サンプル中の目的分子より大きい分子をメンブレン上に保持し、目的分子を通過させるメンブレンの選定も可能です（透過、ろ液）。2段階の工程で両方の分離を組み合わせ、高分子量と低分子量の成分から目的分子を分画することも可能です。第一段階では、目的分子を通過させ、高分子量の成分から分離を行ない、ろ液を回収します。第二段階ではそのろ液を使用し、目的分子をメンブレン上に濃縮し、低分子量成分を除去します。

濃縮・透析・分画など、分離の目的を明確にする必要があります。また、ろ過容量や将来のスケールアップの必要性も考慮する必要があります。ろ過工程に最適なメンブレンとシステムを選択するために、濃縮倍率や脱塩のレベルを知ることが重要です。

### ステップ2: メンブレンの分画分子量 (MWCO) の選択

メンブレンの分画分子量(MWCO)は、溶液中の分子を所定の割合で保持する能力によって定義されます（通常は90%以上保持が目安）。目的タンパク質を濃縮するためには、目的タンパク質の分子量より1/3～1/6倍のMWCOを持つメンブレンを選択する必要があります。

分画の場合は、保持しようとする分子の分子量より低く、通過させようとする分子の分子量より高いMWCOのメンブレンを選択します。

オメガメンブレンの保持能については、p9をご参照ください。

### ステップ3: アプリケーションに必要な膜面積を決定

適切な装置、カプセル、カセットの選択は、総サンプル量と必要な処理時間、目的とする最終サンプル量によって、決まります。

TFFデバイスによって、メンブレンの表面積は異なります。

以下の式を用いて、指定された時間内にサンプルを処理するために必要な膜面積を計算します。

$$A = \frac{V}{J \times T}$$

パラメーター:

A = 膜面積 (m<sup>2</sup>)

V = ろ液の容量 (L)

J = 透過流束 [L/m<sup>2</sup>/hour (LMH)]

T = 処理時間 (hours)

### 実用例

例1: 10 Lを2.5時間で200 mLに濃縮するためには、どのようなTFF装置を使用すれば良いか？

平均的な透過流束を50 L/m<sup>2</sup>/hour (L/m<sup>2</sup>/h, LMH) と仮定すると、

容積処理量 (ろ液の容量) = 10 L - 0.2 L = 9.8 L

$$A = \frac{9.8}{50 \text{ L/m}^2/\text{h} \times 2.5 \text{ h}} = \frac{9.8}{125} = 0.08 \text{ m}^2$$

推奨システム: メンブレンカセット1個付きセントラメイトホルダー (面積0.093 m<sup>2</sup>)

例2: ムスタングQメンブレンクロマトグラフィーモジュールから採取した50 mLのサンプル (Mw = 54kD)をバッファー溶液 (0.05 M Tris, 0.5 M NaCl) で溶出させました。

塩濃度を0.05 M以下に下げた後、10 mLに濃縮する必要があります。

ミニメイト EVO TFFシステムに10KDメンブレンを搭載したミニメイト TFFカプセルを使用し、平均ろ液流速が40LMH、塩濃度を0.05M以下にするために3回の透析(定容量透析)を必要とする場合の処理時間はどのようになりますか？

ミニメイト 面積 = 50 cm<sup>2</sup> = 0.005 m<sup>2</sup>

サンプル容量 = 50 mL

透析ろ過容量 (1DV) = 50 mL

平均透過流束 = 40 LMH

$$\text{総ろ液量 } (V_T) = V_D + V_C$$

パラメーター：

$V_D$  = 透析ろ過工程からのろ液容量

$V_C$  = 濃縮工程からのろ液容量

$$V_T = V_D + V_C = (3 \text{ DV} \times 50 \text{ mL}) + (50 \text{ mL} - 10 \text{ mL})$$

$$V_T = V_D + V_C = 150 \text{ mL} + 40 \text{ mL} = 190 \text{ mL} = 0.19 \text{ L}$$

$$A = V / (J \times T)$$

処理時間 T を解くために式を書き直すと

$$T = V / (J \times A)$$

$$T = 0.19 \text{ L} / (40 \text{ L/m}^2/\text{h} \times 0.005 \text{ m}^2)$$

$$T = 0.19 / 0.2 = 1 \text{ h}$$

透析ろ過を行なう際に、透析液の総容量は、サンプルの容量に透析液の容量を掛けたものになります。

バッファの容量や処理時間を節約するために、サンプルを濃縮した後に透析ろ過を行なうことがあります。

**例3：1 Lのサンプル (0.1 mg/mL) を10倍に濃縮し、透析ろ過で少なくとも99%の塩を除去する必要があります。セントラメイトカセットホルダーのカセット0.093 m<sup>2</sup>を使用した場合、サンプルの処理に必要な時間はどれくらいですか？**

最初に濃縮を行ない、次に透析ろ過を行なう場合の平均透過流束は40 LMHです。もし、透析ろ過、濃縮の順に行なう場合、平均透過流束は50 LMHです。

**シナリオA：サンプルをまず10倍に濃縮 (1.0 Lから0.1 L) し、その後6 DVの連続透析ろ過を行ない、塩を除去します。**

$$\text{総ろ液容量 } (V_T) = V_C + V_D$$

パラメーター：

$V_C$  = 濃縮工程のろ液容量

$V_D$  = 総透析ろ過容量 (1 DV = 0.1 L)

$$V_T = (1.0 - 0.1) + (6 \times 0.1) = 0.9 + 0.6 = 1.5 \text{ L}$$

平均透過流束 = 40 LMH

$$\text{膜面積 (A)} = \frac{\text{ろ液容量(V)}}{\text{平均ろ過速度 (J) x 処理時間 (T)}}$$

処理時間 T を解くために式を書き直すと

$$T = \frac{V}{J \times A}$$

$$T = \frac{1.5 \text{ L}}{40 \text{ L/m}^2/\text{h} \times 0.093 \text{ m}^2} = 0.4 \text{ h}$$

**シナリオB：塩除去のため6 DVの連続透析ろ過を行ない、10倍濃縮 (1.0 Lから0.1 L) を行ないます。**

$$\text{総ろ液容量}(V_T) = V_D + V_C$$

パラメーター：

$V_D$  = 総ろ過容量 (1 DV = 1L)

$V_C$  = 濃縮工程のろ過容量

$$V_T = (6 \times 1.0) + (1.0 - 0.1) = 6 + 0.9 = 6.9 \text{ L}$$

平均透過流束 = 50 LMH

$$T = \frac{6.9 \text{ L}}{50 \text{ L/m}^2/\text{h} \times 0.093 \text{ m}^2} = 1.48 \text{ h}$$

この例では、サンプルの濃縮を先に行ない、透析ろ過をすると0.4時間必要です。一方、透析ろ過を先に行なうと、1.5時間必要です。したがって、最初に濃縮することで、約1時間の処理時間の短縮が可能です。すでに濃縮されているサンプルを使用した場合は、処理時間の結果は大きく変わる可能性もあります。

ろ過工程を設計する際は、工程全体を見渡し、溶質の透過流束の変化がろ過工程のパラメーターにどのように影響するか評価することが重要です。



Table 4 は、ラボスケール及びプロセス開発用のTFF製品の一覧です。この表では、開始サンプル量に基づいて製品を選択することができるようになっています。また、推奨される還流側流量と、標準的な透過側流量の目安が記載されています。ポールは、より大規模なTFF用途に対応する製品 (この電子ブックには明示していません) も提供しています。

**Table 4**  
開始サンプル用に応じたTFF製品の選択ガイド

TFFカプセルまたは カセット <sup>1</sup>	膜面積	標準的な透過側流量 <sup>2</sup> 50 LMH (20 °C)	推奨される還流側流量 (スクリーンチャンネル)	開始サンプル量範囲	最小濃縮量 <sup>3</sup>
<b>ラボスケール / スケールアップ製品</b>					
ミニメイト	50 cm <sup>2</sup>	4 mL/min	30 -40 mL/min	25 - 500 mL	< 10 mL
LV セントラメイト	0.01 m <sup>2</sup> (0.1 ft <sup>2</sup> )	8 mL/min	60 - 80 mL/min	40 - 2000 mL	10 mL
LV セントラメイト	0.02 m <sup>2</sup> (0.2 ft <sup>2</sup> )	15 mL/min	120 -160 mL/min	60 - 4000 mL	15 mL
<b>プロセス開発と小スケール生産</b>					
セントラメイト	0.093 m <sup>2</sup> (1.0 ft <sup>2</sup> )	4.6 L/hr	600 - 800 mL/min	0.2 - 20 L	100 mL

1) データは、1台または1カセット当たりのものです。セントラメイトホルダーはカセット5本収納可能です。その他の列データは、表の数値にホルダーに装着されたカセットの数を掛けることで算出できます。

2) ろ液流速は、平均ろ液流速50LMH、処理時間約4時間を想定しています。実際の値は、メンブレンのMWCO、サンプルの組成や粘度、フロー条件(TMP、クロスフロー速度、温度等)によって上下する場合があります。

3) 最小濃縮量は、システムの保持液量、リザーバーの設計、ポンプのタイプおよび速度に依存します。チューブの長さを最短にし、適切なサイズの部品、チューブ、フィッティングなどを使用することで、より少ない容量で達成することができます。

# カプセル・カセット・システム

適切なカセットや装置のサイズは、総サンプル量、必要な処理時間、必要な最終サンプル量によって決定します。

ポールの装置は、研究室向けのプラグアンドプレイの装置から、プロセス開発や小規模生産向けのスケラブルシステムまで、TFFホルダーとカセットの幅広いラインナップを提供しています。

## ミニメイト

### タンジェンシャルフローろ過 (TFF)カプセル

- ポールのオメガメンブレン (改変PES) は、高流量特性と低タンパク質吸着性を併せ持ちます。このメンブレンは、PESのユニークな化学的特性により、生物学的及び物理的劣化に対して安定性を有します。さらにオメガメンブレンは、広範なMWCOをカバーしています。
- ミニメイトTFFカプセルは、コストパフォーマンスに優れたプラスチック製で、オメガメンブレン限外ろ過膜は、化学薬品耐性が高いため、洗浄・再利用が可能です。
- ミニメイトの各カプセルは、製造時に100%の完全性試験を実施し、信頼性の高い性能を確保しています。重要なアプリケーションでは、最初に使用後、再度完全性試験を行なうことができます。品質保証書は、各ロットに含まれています。
- 有効ろ過面積 (EFA) は、50 cm<sup>2</sup>です。



ミニメイトTFFカプセル

### ミニメイトEVO TFFシステム

最大1 Lまでのサンプルの濃縮・バッファー交換を高い信頼性で実施するために設計されたプラグアンドプレイのペンチトップTFFシステムです。

- ミニメイトTFFカプセルが利用可能です。
- 円錐底リザーバーの使用と全体的にコンパクトな設計により、限られた作業スペースでTFF工程を実施でき、最大1Lのサンプルの濃縮を高倍率で実施できます。
- ローラーヘッド型のペリスタリックポンプは、穏やかな処理を実行でき、不安定な生体分子などの条件に最適です。
- 全ての接液部では、低タンパク質吸着性で化学薬品耐性が高く、生物学的に安定な材料で製造されています。
- リザーバー設計により、サンプルを移し替える必要がなく、同一システム内で連続または非連続の透析ろ過を行なうことができます。
- 保持液側 (メンブレン後ろに設置した流路) に圧力計を追加することで、正確な膜差圧 (TMP) の計算が可能になり、ユーザー制御と最適化が容易になりました。



ミニメイトEVO TFFシステム

## セントラメイト Tシリーズ TFFカセット (オメガメンブレン)

0.02 m<sup>2</sup>または0.1 m<sup>2</sup>の有効ろ過面積を持ち、オメガメンブレン(改変PES)が採用されています。

- 耐久性と安定性に優れた構造で、溶出物が非常に少なく、高い化学薬品耐性を有しています。このカセットは、ろ過工程の経済性を向上するために最適な物質移動を提供するように設計されています。
- オメガメンブレンは、優れた性能を持ち、生物学的・物理的劣化に安定であり、高流量・高選択性・低タンパク質吸着性を有します。さらに広範なMWCOが用意されています。
- セントラメイトカセットは、安定した精製工程のスケールアップが容易で、プロセス開発から小規模の生産工程まで同一の材質で実施できます。
- Tシリーズカセットの構成材料は、米国薬局方 (USP) の Biological Reactivity Test (In Vivo, 70°C) の条件に適合するように試験されています。



セントラメイトTシリーズTFFカセット

## LVセントラメイトラボ用TFFホルダー

ラボスケールまたは、最大4 Lまでのスケールアップ工程に対応し、最大限の製品回収ができるよう設計されています。

- 0.02 m<sup>2</sup>のセントラメイトカセットが利用できるステンレス製のTFFホルダーです。
- 保持液量が少なく、少量の開始サンプル量から高濃縮倍率を達成できるように設計されています。
- 生産スケールのホルダーとして、同等の互換性を確保する316Lステンレス製のルーアロックフィッティングポートによる容易な接続が特長です。
- ミニメイトEVO TFFシステムと組み合わせて使用することが可能です。



LVセントラメイトラボ用TFFホルダー





## セントラメイト及びセントラメイトPEラボ用TFFホルダーとシステム

1 ~ 125 Lのプロセス開発や小規模生産に適しています。

- セントラメイトカセット用に設計されたホルダーです。
- ホルダーは、316Lステンレス製のセントラメイトホルダーと、経済的な価格で高耐久な超高分子量ポリエチレン製のセントラメイトPEホルダーが用意されています。
- メンブレンカセットを追加することで、簡単にろ過面積を拡張することができます。
- 同一の流路で、より大規模なプロセスに対し、リニアなスケールアップが可能です。
- クランプ、チューブ、ゲージを含むフィッティングキットは、単品購入可能です。



セントラメイト SS システム



セントラメイト PE システム

## ウルトララボ™システムとウルトラリザーバー™容器

5 Lまでの容量の処理を簡素化します。

- ウルトラリザーバーには、2 Lと5 Lの容量があり、内臓のサイフォンユニットにより、連続的な透析ろ過が可能です。
- 透明なアクリル製で容量目盛が付いています。接続口はベースプレートにあり、サンプルの滞留を最小限に抑えます。
- ウルトララボシステムは、DNAのせん断や不安定な分子の変性を最小限に抑え、システム内の空気を排除し、バブルの発生を抑制するペリスタリックポンプを備えています。可変速コントローラーにより、サンプル処理中のクロスフロー速度を正確に調製することができます。



ウルトラリザーバー容器とウルトララボシステム



## FAQ

ポールのグローバルプロダクトマネージャーのDan Raynerから、TFFとTFFシステムの活用について、FAQに関する回答を以下に示しました。

### 遠心ろ過デバイスは、研究において限外ろ過の用途としてよく利用されていますが、TFFの使用に移行するきっかけは何でしょうか？

限外ろ過膜を搭載した遠心ろ過デバイスは、少量のサンプル処理に適していますが、遠心ろ過デバイスは、直接フローろ過の原理を利用しており、メンブレンが目詰まりし、最終的にはサンプルがろ過されなくなります。

TFFでは、サンプル溶液がメンブレン面に対して平行方向に流れるため、メンブレンの目詰まりが起きにくく、より効率的な処理が可能になります。また、TFFは研究からパイロット、そしてプロセス開発へとスケールアップすることができ、10,000 Lを超える容量を処理することが可能です。

TFFシステムは、遠心ろ過デバイスよりも汎用性が高いと考えられています。例えば、タンパク質は溶液の状態では、非常に敏感であり、高濃度では凝集する傾向があります。TFFではろ過工程におけるパラメーターをより細かく制御できるため、タンパク質が溶液から漏出することなく、目的の濃度に正確に濃縮させることができます。

TFFの汎用性により、1つのシステムで複数の処理工程を行なうことができ、過剰なサンプルハンドリングやサンプルロスの可能性を防ぐことができます。例えば、連続透析ろ過と濃縮の工程をすべて同一のTFFシステムで行なうことができます。

### TFFは従来の攪拌式セルによる限外ろ過と比較して、どのようなメリットがありますか？

攪拌式セルは、シンプルに限外ろ過を行なうためのシステムです。遠心ろ過デバイスと同様に直接フローろ過の原理を利用するため、メンブレンの目詰まりが問題となる場合があります。

ゲル層の形成を抑えるために、攪拌式セルではメンブレン上部にあるスターラーバーを利用して乱流を発生させますが、ろ過流量と攪拌レベルがスターラーバーの回転や長さに依存し、回転半径に沿って変化するため性能に限界があります。これに対してTFFは、メンブレン面全体でサンプルを均一かつ穏やかに循環させることができるため、流速が向上し、処理時間の大幅な短縮と生産性の向上を実現します。

攪拌式セルとTFFの操作には、いくつか大きな違いがあります。まず、市販されている多くの攪拌式セルでは、研究者が自らユニットを組み立て、限外ろ過メンブレンディスクをセル内部に操作してねじ止める必要があります。この手作業は、液漏れや液体を通過するバイパス形成を引き起こし、メンブレン構造にダメージを与える可能性もあります。特にバイパス形成は、見かけ上通常通り動作しているように見えますが、分子の損失を引き起こし、工程が終了するまで気づかないケースがあります。

ポールは、ラボスケールの攪拌式セルとミニマイトTFFカプセルの処理時間とシステムの完全性を比較する研究を行ないデータを作成しました (Fig. 12A, 12B)

最後に、攪拌式セルとTFFシステムの主な違いは、攪拌セルの動作に必要な圧力を発生させる圧力容器または窒素タンクが必要なことです。そのため、攪拌式セルはより専門的な取り扱いが必要となり、実験室の安全性に関わる懸念が生じます。



ポールのTFFシステムと連動させたい場合に、遠心ろ過デバイスは非常に有用です。

ポールは様々な遠心ろ過デバイスを提供しており、これらのデバイスにはTFFシステムで使用されているオメガメンブレン(改変PES)が使用されています。したがって、最適なMWCOを持つメンブレンを選択しようとする場合、当社の遠心ろ過デバイスは、TFFシステムと同一メンブレンを使用しているため、メンブレンの性能を確認する必要なく、タンパク質の濃縮やバッファー交換工程を実行できます。しかし、タンパク質は、サンプル量、pH条件、濃度条件によって、ろ過における流量などの挙動が変化することにご留意ください

Figure 12A

ミニメイトTFFカプセルの使用で処理時間を大幅短縮

2 mg/mL BSA溶液を10倍に濃縮 (1000→100 mL) し、350 mLの攪拌式セルまたはミニメイトTFFカプセルのいずれかを使用した。ミニメイトには、10Kのオメガメンブレンが含まれています。クロスフローは、50 mL/minに設定し、リテンションループの背圧をかけ、約15 mL/minのろ過速度を形成しました。攪拌式セルにはポリエーテルスルホン (PES) または再生セルロース (RC) ディスクを使用し、55 psiの空気で加圧し、約6 mL/minの初期ろ過速度を形成しました。エラーバーは5回のろ過工程の標準偏差を示しています。

ろ液と保持液の両フラクションについて、260 nmの吸光度を測定することで、タンパク質の濃縮工程を検証しました。攪拌式セルを使用すると、処理中にBSAが10K PESメンブレンから漏出することが観察され、完全性が損なわれていることが示された。その後、各システム間の統計的な有意差を確認するため、合計5回の攪拌式セルの動作が完了するまで追加実験を行ないました。

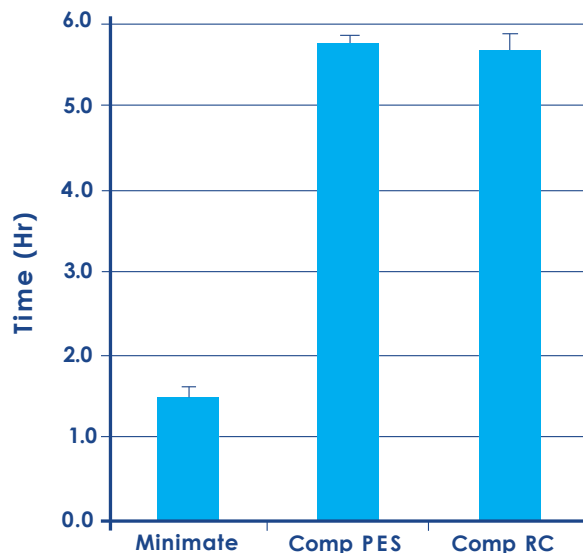
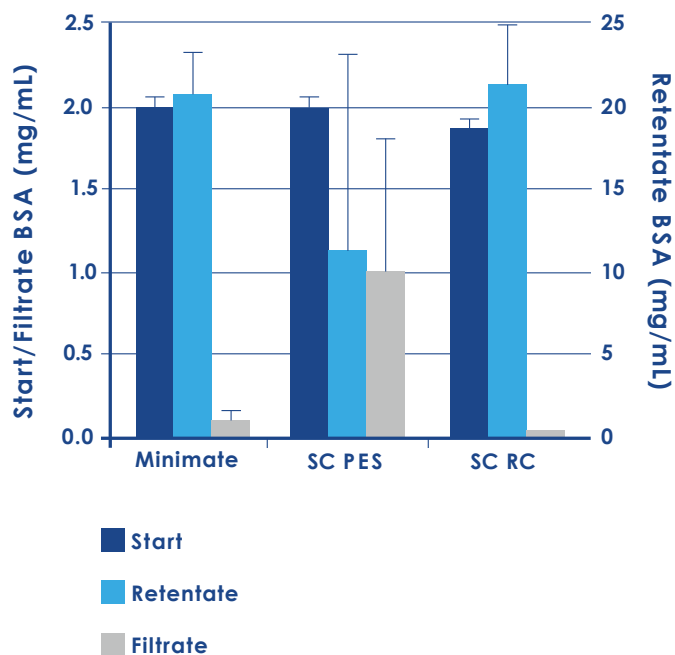


Figure 12B

組み立て済みのミニメイトシステムで完全性を保証

サンプルの濃縮は、Fig. 12aと同様の方法で行ないました。開始サンプル、最終保持液、および最終ろ液の回収物を、280 nmでタンパク質濃度について分析しました。平均濃度は、(5 - Minimate)、(10 - SC PES)、および (5 - SC RC) でろ過工程を実行した結果をプロットし、標準偏差をエラーバーで示しました。グラフ内には、10倍濃縮を示すY2軸を表示しました。

攪拌式セルとPESメンブレンを使用してろ過を行なった場合、液漏れによるタンパク質の損失が確認されました。一方、ミニメイトTFFシステムと再生セルロースメンブレンを利用する攪拌式セルでは、正常に動作しました。PESメンブレンを利用する攪拌式セルでは、10回中5回、液漏れが確認されました。





## ミニメイトEVO TFFシステムのようなオーダーメイドシステムは、ベーシックなシステムと比べてどのようなメリットがありますか？

ポンプ、チューブ、圧力計を使用して、カスタムでTFFシステムを構築することは可能ですが、ミニメイト EVO TFFシステムのようなオーダーメイドシステムには多くの利点があります。ミニメイト EVO TFFシステムには、セットアップに必要なすべての構成部品が同梱されています。ポールでは、研究者がシステムをセットアップするための簡単な手順書を提供しています。ミニメイトTFFシステムは、ルーアフィッティングによるプラグアンドプレイ方式で設計されており、迅速かつ簡単に設置することができます。

ミニメイト EVO TFFシステムは、最適化された流路設計を特徴とし、使用するチューブの長さをユーザーに案内しています。これにより、高い製品回収率かつ、少量のサンプルで、濃縮工程を達成でき、低保持液量を実現できます。

このシステムには、穏やかな処理を可能にする可変速ローラーヘッドのペリスタルリチクポンプ、2つの圧力計、バルブ、チューブ、マグネットスターラーバーとスターラープレート付きの500 mLリザーバーが含まれています。接液部はすべて化学薬品耐性に優れた材料で作られています。

## 一般的にTFFカセットは、何回使用できますか？

TFFカプセルやカセットの総稼働回数に関する具体的なガイドラインはありません。カプセルやカセットの寿命は、使用頻度、サンプルに含まれる粒子、保存条件、定置洗浄 (CIP) の実行に大きく依存します。

ミニメイトのカプセルとセントラメイトカセットは、使用前に標準化頭数率 (NWP) の値を測定することをお勧めします。その後、使用する毎にCIP手順に従ってNWPを再評価することができます。

通常、CIP手順の後、カプセルまたはカセットのNWPは元の値の75%以上になります。そうでない場合は、CIP手順を再度実施することをお勧めします。使用済みのカプセルまたはカセットのNWP値が元の値の50%以下になった場合は、新しいカプセルまたはカセットを使用することをお勧めします。

ポールの包括的な使用説明書には、TFFシステムの正しい取り扱い方、CIP手順とNWPを求める手順の実行方法、システムの保管方法に関する情報が記載されています。

## スケールアップとは何ですか？研究者にどのように役立ちますか？

スケラビリティとは、サンプルの処理量や処理条件に応じて、製品やシステムをスケールアップあるいはスケールダウンする能力のことです。スケラビリティには、概念実証 (PoC) の観点と、デバイスやシステムを直線的に拡張する観点があります。スケールアップは、ボトルネックを取り除き、評価時間を短縮し、プロセスの最適化に集中するためのリソースを確保するのに役立ちます。

限外ろ過工程を実行する際、PoCテストは非常に重要です。例えば、TFFカプセルやカセットを使用する前に、ポールの限外ろ過遠心デバイスを使用して、メンブレンのMWCOの性能を確認することができます。

ミニメイトTFFカプセルは、パイロット試験や小規模生産で使用できる大型のセントラメイトTFFカセット製品群と同じ流路長および構成材質を使用しています。ミニメイトは、セントラメイトTFFカセットのように直線的に拡張できませんが、超高速セットアップと簡単なプラグアンドプレイによるラボスケール処理または、概念実証のTFFテストが可能です。そのため、予測可能なメンブレン性能を提供し、プロセスのスケールアップの時間を短縮します。

また、ミニメイトTFFシステム自体をスケールアップすることも可能です。ミニメイトTFFカプセルを複数並列に接続することで、より大きな膜表面積を実現し、初期処理量の増加や処理時間の高速化を可能にします。

LV セントラメイトとセントラメイトカセットは、同一の流路長を持ち、正確かつ直線的なスケラビリティを提供します。

### ミニメイトEVO TFFシステムにLVセントラメイトホルダーとカセットを取り付けることは可能ですか？また、そのために必要なものは何ですか？

LVセントラメイトは、ミニメイト EVO TFFシステムで使用することができます。このキットには、LV セントラメイトホルダーを適切に接続するために必要な三方活栓、ホースバンプアダプター、チューブが含まれています (Fig. 13を参照)。

### タンジェンシャルフローろ過の利点は何ですか？

特に「ミニメイトEVO TFFシステム」のような専用システムを使用する場合は、セットアップも簡単で、使い勝手が良いのが利点です。

TFFは高速で効率的であり、サンプル溶液がメンブレン表面を平行方向に流れるため、メンブレンの目詰まりが減少し、効率的で穏やかなサンプル処理が可能です。

サンプル溶液を移し替える必要がなく、1つのシステムで複数の処理を行なうことができます。例えば、サンプルの脱塩と濃縮を同時に行なうことができ、時間効率が向上し、サンプルのロスを防ぐことにもつながります。

TFFは、PoCまたは、正確な直線的なスケラビリティによるLVセントラメイトとセントラメイトカセットの選択で、スケールアップまたはスケールダウンを実行できます。これにより、TFFはラボスケールからパイロット試験またはプロセス開発までカバーすることができます。

最後に、TFFはその原理上、メンブレンの目詰まりを抑制することができるため、システムとカセットまたはカプセルを洗浄し、再利用することができます。



Figure 13  
LVセントラメイトホルダーとカセットを組み込んだミニメイトEVO TFFシステム

LVセントラメイトホルダー



## 用語集

**濃度分極:**膜差圧、クロスフローレート、サンプル粘度、溶質濃度などの組み合わせにより、膜表面に保持された分子 (ゲル層) が蓄積することを指します。

**連続透析ろ過:**連続透析ろ過 (定容透析とも呼ばれる) では、ろ液が生成されるのと同じ速度で水またはバッファーを循環液に加えることにより、循環液 (サンプル) 中の元のバッファーの塩 (または他の低分子化合物) を洗浄することを指します。

**クロスフロー速度 (CF):**保持 (循環) 液の速度 (L/min) を指します。濃度分極を減少させるための「乱流」の効果を促します。圧力損失  $P (P_{FEED} - P_{RETENTATE})$  は、CFに直接関係します。

**クロスフローフラックス速度 (CFR):**単位面積当たりのクロスフローレート (L/min/ft<sup>2</sup> or L/min/m<sup>2</sup>) を指します。

**透析ろ過:**孔径よりも小さな分子をメンブレンに通過させ、孔径より大きな分子を保持液 (濃縮液) に残す分画工程を指します。脱塩やバッファー交換、エタノールの除去、界面活性剤やペプチド、核酸などの低分子の除去に使用されます。

**非連続透析ろ過 (順次希釈):**順次希釈による非連続透析ろ過では、まずサンプルを所定の容量に希釈し、次に水またはバッファーを用いてサンプルを元の容量に濃縮します。この工程を不要な塩や溶媒、低分子化合物が除去されるまで繰り返します。工程を繰り返すことでより多くの低分子が除去されます。

**非連続透析ろ過 (減容法):**減容法による非連続透析ろ過では、まずサンプルを所定の容量に濃縮し、次に水またはバッファーを用いてサンプルを元の容量に希釈します。この工程を不要な塩や溶媒、低分子化合物が除去されるまで繰り返します。工程を繰り返すことでより多くの低分子が除去されます。

**ろ液:**メンブレンを通過した溶液を指します。

**透過流束:**単位面積当たりのろ液速度 (L/m<sup>2</sup> /h (LMH)) を指します。透過流束は、クロスフロー速度、膜差圧、サンプル粘度に影響します。

**ゲル層:**メンブレン面上部に形成される非常に薄い分子層を指します。透過流束を低下させ、孔径より小さい分子の通過を妨げることがあります。

**保持液量:**サンプル回収後、フィルターやシステムチューブ内の残液量を指します。

**精密ろ過 (MF):**精密ろ過は、一般的に0.1µmから10µmのポアサイズを持つフィルターメディアを使用したろ過のことを指します。一般的にライフサイエンス分野での清澄化やろ過滅菌、微粒子除去、細胞採取に使用されます。

**最小処理量:**TFFシステムが効率的に処理できる最小の開始サンプル容量を指します。

**分画分子量 (MWCO):**サンプル溶液中の分子を一定割合で保持する能力で定義されます (通常は90%以上の保持率)。

**標準化透水率 (NWP):**メンブレンの透水係数を温度20°Cに補正した値を指します。

**メンブレンの透水率:**単位TMPあたりの水のろ液量を指します。ろ液量はメンブレンの透水抵抗に関係します。また、温度により大きく変化します。

**メンブレンリカバリー:**加工・洗浄後のメンブレンの透水性を、使用する前のメンブレンの透水性と比較して測定することを指します。

メンブレンリカバリー =  $(NWP_{CLEAN} / NWP_{ORIGINAL}) \times 100$





**サンプル回収率:** 開始サンプルとろ過処理後に回収したろ液または保持液に含まれる目的分子の量を比較し割合表示した値を指します。

**保持液:** 供給ポートを通過したサンプルを指します。濃縮液とも呼びます。

**タンジェンシャルフローろ過 (TFF) またはクロスフローろ過:** メンブレン面に対して平行方向に液体 (サンプル) を灌流し、メンブレンに一定圧を加え、孔径より小さい分子をメンブレンに通過させる方法を指します。孔径より大きな分子は保持液としてフロー系を再循環します。

**膜差圧 (TMP):** TFFによる還流によりメンブレンに対してかかる圧力を指します。限外ろ過膜を通過する液体輸送の原動力となります。メンブレンにかかる平均圧力からろ液側の圧力を差し引いた値として計算されます。

$$TMP = (P_{\text{feed}} - P_{\text{retentate}}) / 2 - P_{\text{permeate}}$$

ほとんどの場合、ろ液側での圧力はゼロに等しいです。

**限外ろ過 (UF):** 分子の分子量やサイズに基づいて溶質を分離するろ過工程を指します。限外ろ過膜の孔径は0.001~0.1 $\mu\text{m}$ で、溶存分子 (タンパク質、ペプチド、核酸、糖質、その他の生体分子) の濃縮・脱塩、バッファー交換、総分画などに使用されることが多いです。限外ろ過膜は、一般的に孔径よりもMWCOで表記されます。





ラボラトリー事業部  
〒163-1325 東京都新宿区西新宿6-5-1  
お問い合わせ: labcustomersupport-jp@pall.com

---

ポールのWebサイトはこちらから: <https://www.pall.com/jp/ja/laboratory.html>

お問い合わせは、<https://www.pall.com/jp/ja/laboratory.html>のサイトの下にある「問い合わせ」をクリックしてください。

---

© Copyright 2022, Pall Corporation. Pall, , Centramate, Minimate, Mustang, Omega, UltralabとUltrareservoirは、Pall Corporationの商標です。®は米国で登録された商標を示します。