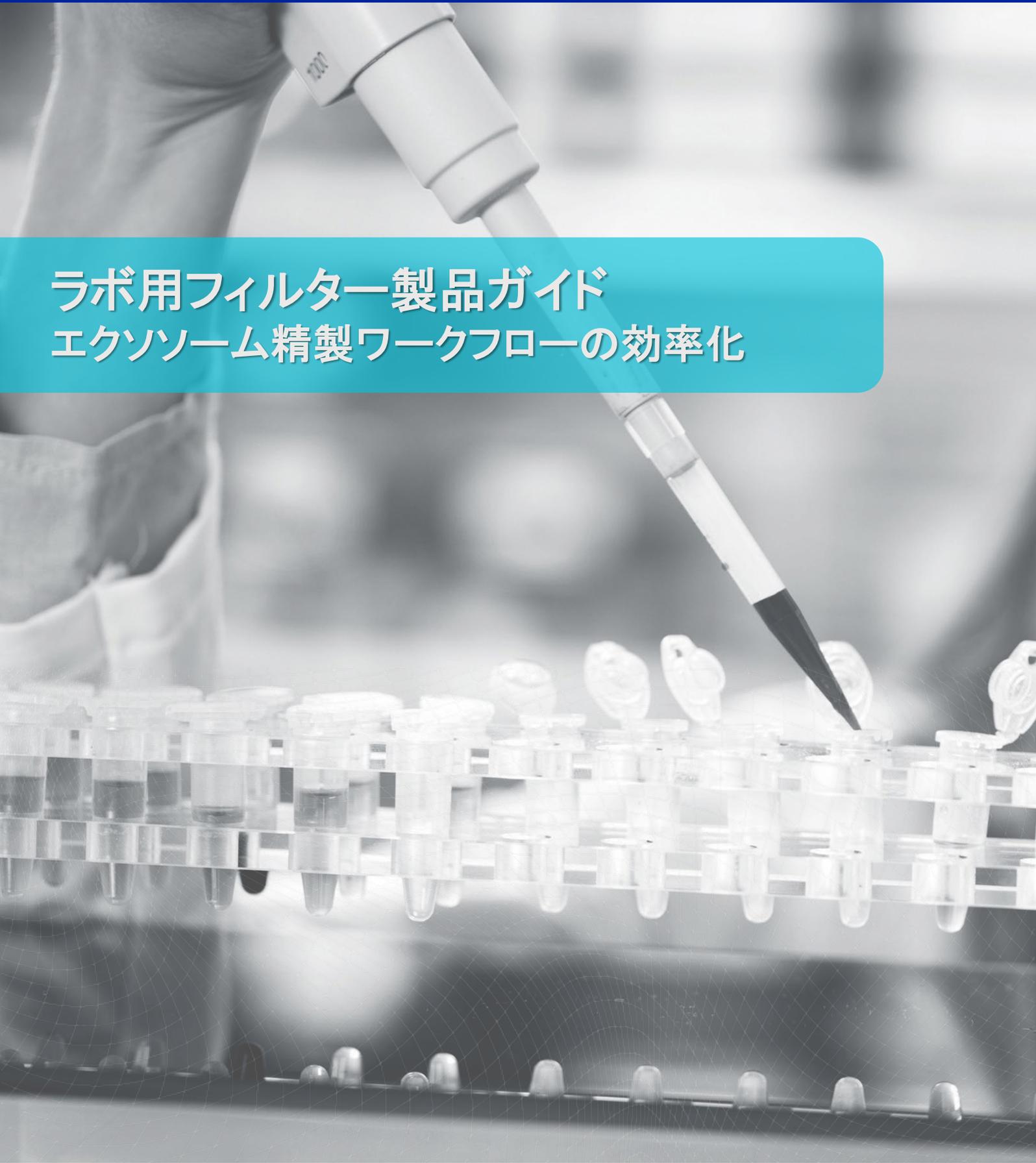




PALL CORPORATION

ラボ用フィルター製品ガイド エクソソーム精製ワークフローの効率化



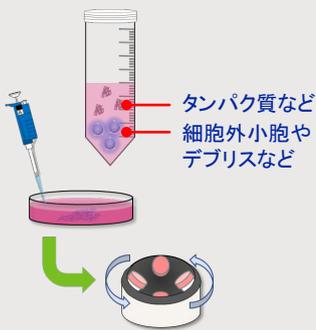
エクソソーム精製

エクソソームはナノメートルサイズの細胞小胞であり、様々な細胞から放出されます。放出されたエクソソームは受容細胞へ取り込まれ、情報伝達や生理活性の調節に寄与していると考えられています。そのため、エクソソームそのものを回収し、その機能を調査したり、DDSなどの再生医療や診断に利用する研究が盛んに行われています。エクソソームの回収には、培養細胞や血清、菌体、母乳などが利用されています。培養細胞の場合、その上清にエクソソームが滞留しているため、細胞やデブリス、マイクロベシクルを除去する操作が必要になります。

エクソソーム精製のワークフロー (小スケール ~50 mL)

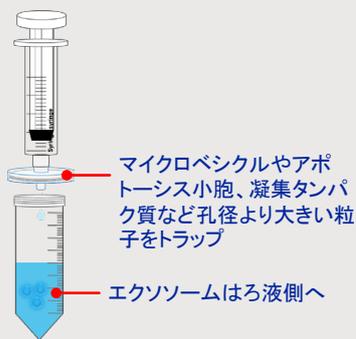
① 細胞とデブリスの除去

- 培養上清を回収
- 遠心して細胞とデブリスの除去



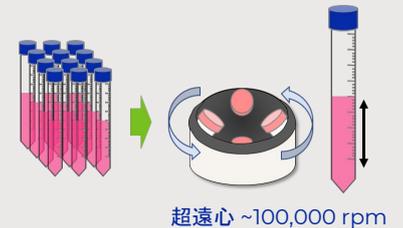
② マイクロベシクルの除去

- 上清をシリンジフィルターでろ過
- 0.1 or 0.2 μm径を使用



③ エクソソームの精製

- ろ液を回収し、超遠心で精製



※エクソソームの精製度を上げるには、抗体アフィニティーを利用する回収方法が必要なケースがあります。

ポールが提案する小スケールプロセスに適したフィルター製品

① 細胞とデブリスの除去

アクロプレップ24ウェルフィルタープレート

- ✓ Seitzデプスメディア/スーポアEKV
- ✓ プレフィルター内蔵で粗ろ過と清澄化を同時に！
- ✓ 多検体かつ7 mL*の培養上清の清澄化



ポール・ラボラトリーは、小スケールのエクソソーム精製のプロセスに適した製品ラインナップを取り扱っています。

*7 mLは吸引ろ過をする際の最大容量です。遠心ろ過の場合は、6 mLが最大容量となります。

② マイクロベシクルの除去

アクロディスクシリンジフィルター

- ✓ スーポア (PES) メンブレン
- ✓ 低吸着性のメンブレンでサンプルロスを最小限
- ✓ 0.1, 0.2 μm孔径のシリンジフィルター



③ エクソソームの精製

限外ろ過用遠心ろ過デバイス

- ナノセップ (<0.5 mL)
- マイクロセップ (0.5 - 5 mL)
- マクロセップ (5 - 20 mL)
- ジャンボセップ (20 - 60 mL)

- ✓ 限外ろ過によるエクソソーム精製の提案
- ✓ エクソソームに論文実績あり
- ✓ オメガ (改変PES) メンブレン採用



大容量 (100 mL以上) のエクソソーム精製の課題

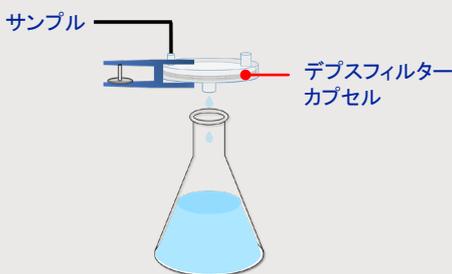
エクソソーム精製には、その実績から超遠心法を活用している研究者が多いです¹。一方、超遠心法の性質上、処理できるサンプル量を増やすことが難しいという課題があります²。ポールは、大容量の限外ろ過として最適なタンジェンシャルフローろ過 (TFF) システムを取り扱っており、この課題を解決できる一つの提案として紹介しております。

1. Koh, YQ, et al., Exosome enrichment by ultracentrifugation and size exclusion chromatography. *Front Biosci* 23 865-874 (2018)
2. Busatto, S, et al., Tangential flow filtration for highly efficient concentration of extracellular vesicles from large volumes of fluid. *Cells*. 7 273 (2018)

ポール製品を活用する大容量 (100 mL以上) エクソソーム精製のワークフロー

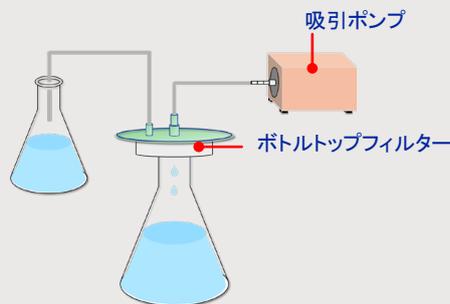
① 細胞とデブリスの除去

- 培養上清を回収
- デプスフィルターで遠心せず清澄化



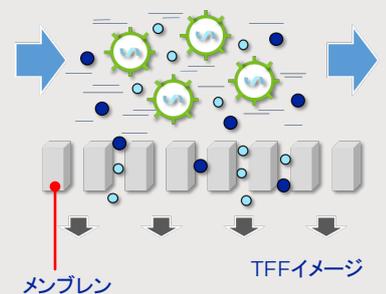
② マイクロベシクルの除去

- ボトルトップフィルターまたはカプセルフィルターでろ過
- 0.1 or 0.2 μm径を使用



③ エクソソームの精製

- TFF限外ろ過で精製



※エクソソームの精製度を上げるには、抗体アフィニティーを利用する回収方法が必要な場合があります。

ポールが提案する大容量プロセスに適したフィルター製品



① 細胞とデブリスの除去

スーパークャップ50, 100デプスフィルターカプセル

- ✓ Seitzデプスメディアで細胞やデブリス除去に最適
- ✓ 1-100 Lのサンプル容量に最適
- ✓ 遠心せずにデブリス除去と清澄化を同時に対応



① 細胞とデブリスの除去

② マイクロベシクルの除去

バキュキャップ ボトルトップフィルター

- ✓ 最大5 Lまでろ過処理可能
- ✓ 0.1, 0.2 μm孔径
- ✓ 0.8 μmのプレフィルター付きも販売 (0.8/0.2 μm)

③ エクソソームの精製

ミニメイトEVO TFFシステム

- ✓ TFFで大容量の限外ろ過に対応
- ✓ 広範な分画分子量 (MWCO) を用意
- ✓ エクソソーム精製の論文実績あり
- ✓ オメガ (改変PES) メンブレン、遠心デバイスフィルターと同じメンブレンを採用



製品情報 (小スケール (<50 mL) のエクソソーム精製)

アクロプレップ24ウェルフィルタープレート

ポールの清澄化および滅菌ろ過用アクロプレップ24ウェルフィルタープレートは、1回のろ過でサンプルの清澄化と0.2 μm 滅菌ろ過の両方を行うことができます。吸引マニホールドまたは遠心分離機を使用して、高濃度の細胞培養液 (CHOやHEKなど) を短時間で処理することができ、細胞、細胞断片、およびその他の生物学的凝集体をフィルターメディアに捕捉します。24ウェルコレクションプレートには、タンパク質やその他の0.2 μm 未満の粒子が回収されます。

特長

- 各ウェルに最大7 mL (吸引時)
- Seitzデプスメディアおよび0.65/0.2 μm スーポア EKVメンブレン
- ASTM F838に準拠した方法で*B. diminuta*の 10^7 cfu/cm² 膜に保持することを実証済み
- デプスメディアにより大きな細胞断片を捕捉してから、0.65/0.2 μm スーポアEKVメンブレンでろ過滅菌します。



ポールは、マルチウェルフィルタープレート用に吸引ろ過のため、特別に設計された吸引マニホールドを提供しています。この吸引マニホールドは、アクロプレップフィルタープレート全シリーズを含むSBS準拠のフィルタープレートに最適です。このマニホールドは、耐久性のあるアルマイト製で、必要なOリングとガスケットが付属しています。制御ブロックには、真空圧力計や真空計量バルブ、真空解除バルブそして、真空ライン取付用の1/4インチホースバンプが含まれています。

スーポア・アクロディスクシリンジフィルター

特長

- 親水性で信頼性の高いメンブレン材質を採用、低抽出物/界面活性剤フリー
- 低タンパク質吸着
- プレフィルターを搭載したデバイスも選択可能
- ルアーフィッティングで使用も簡単
- 幅広いのサンプル容量(10-150mL) に対応
- ガンマ線照射滅菌済みでEtO残留物によるコンタミネーションの発生源は排除

アプリケーション

- 細胞・組織培養液や抗生物質などのろ過
- タンパク質や酵素、生化学用のバッファーなどの清澄化
- 水溶液のろ過
- 低タンパク質吸着のろ過
- 細胞凍結保存液のろ過(化学適合性) 全血から白血球の分離



製品情報 (小スケール (<50 mL) のエクソソーム精製)

限外ろ過用遠心ろ過デバイス

遠沈管に限外ろ過膜 (オメガメンブレン, PES) を組み込んだろ過フィルター製品です。小スケールのサンプル容量の限外ろ過に最適です。

特長

- 高流量性で処理時間を短縮
- 低タンパク質吸着性のメンブレンを使用、非特異的吸着を低減
- 低DNA結合性
- 低濃度のサンプルを高回収率
- デッドストップ機構により乾燥固着を防止
- デバイスの分画分子量ごとに色分け

製品

ナノセップ (<0.5 mL)

マイクロセップ (0.5 – 5 mL)

マクロセップ (5 – 20 mL)

ジャンボセップ (20 – 60 mL)



MWCO : 3K – 300K



Nanosep
(~0.5 mL)

MWCO : 1K – 100K



Microsep
(0.5 – 5 mL)

MWCO : 1K – 100K



Macrosep
(5 – 20 mL)

MWCO : 3K – 300K



Jumbossep
(20 – 60 mL)

小

サンプル量

大

製品情報 (大容量 (>100 mL) のエクソソーム精製)

スーパークャップ50, 100デプスフィルターカプセル

高性能デプスフィルター (Seitz) を搭載したスケーラブルなカプセル

特長 (スーパークャップ50)

- フィルターの保持量が少ないため、1–3 Lのサンプルろ過で回収率を高めることが可能です。
- 開発からパイロットスケール、生産スケールに至るまでより高い柔軟性と実用途での結果品質の向上を保証します。カプセルだけでなく、ポールの従来の高性能モジュールの全ラインナップに対応する拡張性があります。
- Seitz BIO 20メディアは、非経口輸液、治療用タンパク質、透析液、タンパク質診断薬などのイオン感受性の高いサンプルに最適です。
- Seitz P900メディアの用途は、バイオテクノロジー産業の工程のろ過に使用されています。
- Seitz HPシリーズは、研究スケールの用途に最適です。



特長 (スーパークャップ100)

- プレろ過と大きな粒子除去のためにフィルターメディアを柔軟に選択できます。
- フィルターの保持量が少ないため、サンプルの回収率が高く、使用後の洗浄も少量で可能です。
- 3–100 Lのろ過に対応しています。
- 機械的に丈夫なデザインにより、プロセスフローを妨げず、一貫したスケーラブルなろ過結果を提供し、高いフィルターメディアの完全性を実現します。
- カプセル型のデザインにより、実験者がバイオハザードに曝されるリスクを低減します。
- ISO 9000とISO 9001の認証を受けた品質管理システムとISO 14001の認証を受けた環境管理システムの下で製造しています。

バキューキャップ ボトルトップフィルター

複数のボトルに対応できる革新的なボトルトップフィルター

特長

- 保管スペースと廃棄物の削減
- プラスチック廃棄物を最小限に
- リザーバーから直接サンプルを吸引
- 滅菌容器に直接ろ過することで、コンタミネーションリスクを軽減
- スーポアメンブレンの使用で高流量を実現、低抽出物/界面活性剤フリー
- プレフィルターを搭載することで、溶液の処理能力を向上



製品情報 (大容量 (>100 mL) のエクソソーム精製)

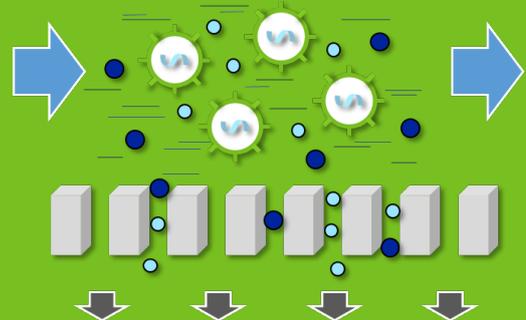
ミニメイトEVO TFFシステム

タンジェンシャルフローろ過システム

TFFは、液体サンプルをメンブレン表面と平行にフローすることでメンブレン側に一定の圧力を与え、溶質や小分子をメンブレンに透過させるろ過手法です。ミニメイトは、このTFFの技術と限外ろ過膜を併用するシステムです。

特長

- **プラグ&プレイ**:ミニメイトTFF限外ろ過カプセルは各種コネクタやチューブを同梱しているため、セットアップ済みの各種TFFシステムで使用できます。
- **経済的**:ハウジング等主要部品はプラスチック製で、またオメガ膜は幅広い薬品適合性があり、クリティカルではない使用分野では、洗浄や再使用が可能です。
- **スケールアップ**:広い膜面積が必要な場合には、ミニメイトを平行につないで使用することができます。パイロットプラントや実生産用のセントラメイトやセントラセットと同じ流路長を持ち、同じ構成部品を使用しています。そのため、プロセスをスケールアップする時に必要な、同等性確保の時間を節約できます。
- **高い回収率**:流路最適化と低タンパク質吸着性のオメガメンブレンにより、非特異的吸着を最小限にしています。
- **効率的**:ユーザーの操作をほとんど必要とせずに濃縮操作と脱塩操作が同じ系で実施することができます。ホールドアップ・ボリュームが少なく、一回の処理工程で、高い濃縮倍率が得られます。
- **ディスプレイザブル**:1バッチのみの使用に限定する場合、洗浄バリデーシンのために必要とされる時間を排除することができます。
- **信頼性**:製造時に、全品完全性試験を実施しています。クリティカルな使用分野では、最初の使用後に、完全性試験を実施できます。本製品は、品質保証書が入手可能です。



ポール製品の限外ろ過の分画分子量 (MWCO) の定義

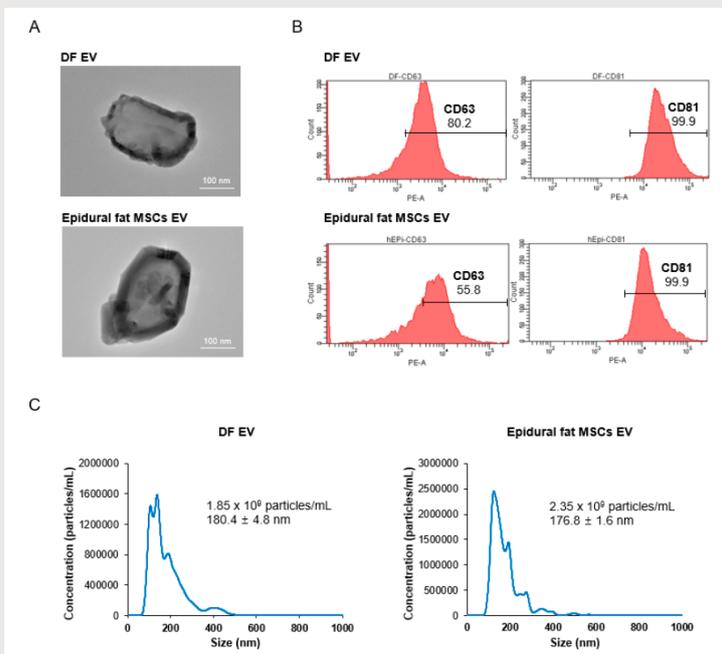
限外ろ過で使用するメンブレンの保持能は、分子量カットオフ値 (MWCO) で表されます。MWCOは、タンパク質がメンブレン上に90%保持される分子量を意味しています。しかし、分子の形状によっては、メンブレンの保持能に直接影響を与えることがあります。例えば、DNAのような直鎖状の分子は、同じ分子量を持つ生体分子を保持できるメンブレンのポアサイズであっても通過することがあります。

タンパク質アプリケーション		核酸アプリケーション		
MWCO	分子量	MWCO	二本鎖DNA	一本鎖DNA
1 K	3 K – 10 K	1 K	5 – 16 bp	9 – 32 bs
3 K	10 K – 20 K	3 K	16 – 32 bp	32 – 65 bs
10 K	30 K – 90 K	10 K	50 – 145 bp	95 – 285 bs
30 K	90 K – 180 K	30 K	145 – 285 bp	285 – 570 bs
100 K	300 K – 900 K	100 K	475 – 1450 bp	950 – 2900 bs
300 K	900 K – 1800 K	300 K	1450 – 2900 bp	2900 – 5700 bs
500 K	1500 K – 3000 K			
1000 K	>3000 K			

ウィルスアプリケーション		
MWCO	膜の公称孔径	ウィルスまたは粒子の直径
100 K	10 nm	30 – 90 nm
300 K	35 nm	90 – 200 nm

アプリケーション例

限外ろ過TFFデバイスによるエクソソームの分離



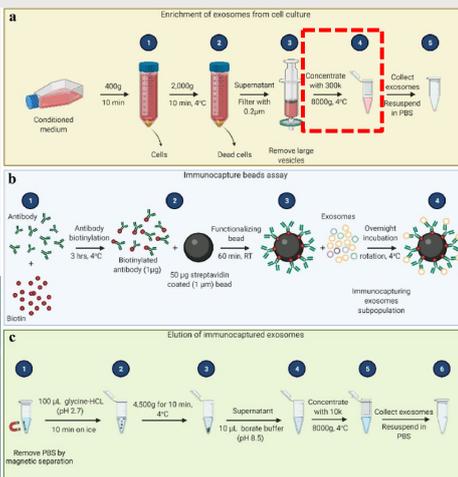
エクソソームの精製方法

- MSC細胞の培養液を48時間ごとに回収し、4°Cで保存、総量が50 mLになるまで回収した。
- 培養液を300g, 10分間遠心し、細胞のデブリスを除去した。
- TFFシステム (MWCO 100K) で流量12.5 mL/minでろ過した。
- 最後に保持液を2500g, 25分間遠心し、マイクロ粒子を除去した。

- DF MSCとEpidural fat MSCからエクソソームを精製した。
- フローサイトメトリーからエクソソームのマーカであるCD63とCD81を検出した。
- 粒子径分布より、30-200 nm付近の粒子サイズを確認した。

Sung, SE, et al., Comparisons of Extracellular Vesicles from Human Epidural Fat-Derived Mesenchymal Stem Cells and Fibroblast Cells. *Int J Mol Sci.* 22, 2889-2900 (2021)

限外ろ過遠心デバイスを用いるエクソソームの分離



培養細胞 (MCF-7 or 骨芽細胞) からエクソソームの精製

1. 細胞懸濁液を400g, 10分で遠心し、上清を回収
2. 上清を4°C, 2000g, 10分で遠心し、再び上清を回収
3. 上清を0.2 μmのシリンジフィルターでろ過し、ろ液を回収
4. ろ液をナノセップ遠心デバイス300Kメンブレンを使用して、8000g, 4°Cで遠心
5. 保持液をPBSで再懸濁して回収

抗体アフィニティー (磁気ビーズ) アッセイに使用

Yousif, G, et al., Exosomes Derived Neuronal Markers: Immunoaffinity Isolation and Characterization. *Neuromolecular Med.* (2021)

注文情報

アクロプレップ24ウェルフィルタープレート (スーポアEKV)、ガンマ線滅菌済み

型式	製品概要	個数
97026	7 mL, Seitzデプスメディア/0.2 µmスーポアEKVメンブレン	8/個
97016	7 mL, Seitzデプスメディア/0.2 µmスーポアEKVメンブレン	2/個

スーポア・アクロディスクシリンジフィルター、ガンマ線滅菌済み、個別包装

型式	製品概要	個数
4602	0.2 µm, 13 mm	75/箱
4611	0.1 µm, 25 mm	50/箱
4612	0.2 µm, 25 mm	50/箱
4651	0.1 µm, 32 mm	50/箱
4652	0.2 µm, 32 mm	50/箱

限外ろ過用遠心ろ過デバイスフィルター

型式	製品概要	個数
OD100C33	ナノセップ遠心ろ過デバイス, 100K, クリア	24/箱
OD100C34	ナノセップ遠心ろ過デバイス, 100K, クリア	100/箱
OD300C33	ナノセップ遠心ろ過デバイス, 300K, オレンジ	24/箱
OD300C34	ナノセップ遠心ろ過デバイス, 300K, オレンジ	100/箱
MCP100C41	マイクロセップアドバンス遠心ろ過デバイス, 100K, クリア	24/箱
MCP100C46	マイクロセップアドバンス遠心ろ過デバイス, 100K, クリア	100/箱
MAP100C37	マクロセップアドバンス遠心ろ過デバイス, 100K, クリア	24/箱
MAP100C38	マクロセップアドバンス遠心ろ過デバイス, 100K, クリア	100/箱
FD100K65	ジャンボセップ遠心ろ過デバイス, 100Kスターターキット, クリア	4/箱
FD300K65	ジャンボセップ遠心ろ過デバイス, 300Kスターターキット, オレンジ	4/箱
OD100C65	ジャンボセップ用メンブレンインサート, 100Kメンブレンインサート, クリア	12/箱
OD300C65	ジャンボセップ用メンブレンインサート, 300Kメンブレンインサート, オレンジ	12/箱

スープラキャップ50, 100デプスフィルターカプセル、ガンマ線滅菌済み

型式	製品概要	個数
SC050PDH4	6 - 30 µm, Seitz PDP8メディア	1/個
SC050PDE2	0.2 - 3.5 µm, Seitz PDE2メディア	1/個
NP5LPDP87	127 mm, 6.0 - 30.0 µm, 1/4 インチホースバンプ, Seitz PDP8メディア	1/個
NP5LPDE21	127 mm, 0.2 - 3.5 µm, 1-1.5インチサニタリーフランジ, Seitz PDE2メディア	1/個
NP5LPDE26	127 mm, 0.2 - 3.5 µm, 13mm (1/2インチ) ホースバンプ, Seitz PDE2メディア	1/個
NP6LPDP81	254 mm, 6.0 - 30.0 µm, 1-1.5インチサニタリーフランジ, Seitz PDP8メディア	1/個
NP6LPDP86	254 mm, 6.0 - 30.0 µm, 13mm (1/2インチ) ホースバンプ, Seitz PDP8メディア	1/個
NP6LPDE21	254 mm, 0.2 - 3.5 µm, 1-1.5インチサニタリーフランジ, Seitz PDE2メディア	1/個
NP6LPDE26	254 mm, 0.2 - 3.5 µm, 13mm (1/2インチ) ホースバンプ, Seitz PDE2メディア	1/個

バキュキャップ ボトルトップフィルター、ガンマ線滅菌済み

型式	製品概要	個数
4621	0.1 µm, 90 mm	10/包装
4622	0.2 µm, 90 mm	10/包装
4628	0.8/0.2 µm, 90 mm	10/包装
TA4622	0.2 µm, 90 mm (チューブ付属)	10/包装

ミニメイトEVO TFFシステム、ミニメイトTFFカプセルフィルター

型式	製品概要	個数
OAPMPUNV	ペリスタポンプ、ポンプヘッド、圧力計x2、リザーバー、スターラー、ドリフトレイ、各種フィッティング	1/個
OA100C12	ミニメイトTFF限外ろ過カプセル/100K オメガメンブレン	1/個
OA300C12	ミニメイトTFF限外ろ過カプセル/300K オメガメンブレン	1/個
OA500C12	ミニメイトTFF限外ろ過カプセル/500K オメガメンブレン	1/個
OA990C12	ミニメイトTFF限外ろ過カプセル/1000K オメガメンブレン	1/個



ラボナリー事業部
〒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, , AcroPrep, Acrodisc, Nanosep, Microsep, Macrosep, Jumbosep, SupraCap, VacuCap, Minimate, Centramate, Centrassete, Omega, Supor, Seitzは、Pall Corporationの商標です。® は米国で登録された商標を示します