

シングルユースベッセルを用いたバイオリアクター、 高速冷却遠心機および超遠心機を用いた、 幹細胞からのエクソソームの迅速かつ効率的な回収

Pascal Rowart^{1*}, Vincent Dufey¹, Jan Knop², Françoise De Longueville¹

¹ Eppendorf Application Technologies S.A., Namur, Belgium

² Eppendorf SE, Hamburg, Germany

* rowart.p@eppendorf-eat.be

Additional contact : bioprocess-experts@eppendorf.com

要旨

細胞は細胞外環境にさまざまな種類の膜小胞を放出します。それらは細胞外小胞（EV）と呼ばれ、エクソソームと微小小胞で構成されます。エクソソームは比較的小さな細胞外膜小胞（30 ~ 150 nm）で、核酸、タンパク質、酵素、脂質などの生体分子を細胞間で移動させて細胞間コミュニケーションを実現する重要なツールとして知られています。さらに、さまざまな疾患のバイオマーカーとして使用されたり、次世代治療薬の天然のドラッグ・デリバリー・システムとしても研究されています。

このアプリケーションノートでは、高速冷却遠心機と超遠心機を組み合わせ、脂肪由来幹細胞からエクソソームを高速かつ簡単に分離するプロセスについて説明します。細胞はシングルユースベッセル BioBLU® 0.3c で培養し、DASbox® ミニバイオリアクターシステムで制御しました。DASbox ミニバイオリアクターシステムの登場により、幹細胞の大量培養とエクソソームの大量生産が可能になりま

した。その後、馴化培地の除去は、最大速度 $32,300 \times g$ に達する高速冷却遠心機 Centrifuge CR22N によって実行しました。今回は、50 mL × 10 本および 15 mL × 10 本コニカルチューブを一度に遠心できるアングルタイプの Rotor R15A を使用しました。エクソソームをさらに濃縮するために、最大遠心加速度 $803,000 \times g$ の超遠心機 Centrifuge CP100NX を、40 mL チューブを 6 本遠心できるスイングバケットの Rotor P32ST と組み合わせて使用しました。さらに、超遠心分離ステップ中にスクロースクッション法を使用することで、スクロース（ショ糖）を使用しない場合の不均一なエクソソーム集団と比較して、純粋で均質なエクソソームを迅速に分離することができました。

大容量のローターを利用する事により、遠心分離の繰り返しステップ数が減少し、エクソソームの分離時間は 4 時間未満で済みました。これは、他の分離方法（例：沈降法、ろ過捕集法）よりもスピーディーです。

はじめに

細胞シグナル伝達あるいは細胞間コミュニケーションとは、細胞が環境との間で信号を受信、処理、送信する能力のことです。これは、細胞組織の適切な発達と機能に必要なプロセスです

[1]。この細胞間コミュニケーションは、直接的な細胞相互作用または可溶性因子の分泌によって達成されます。ほとんどの真核細胞は、細胞外小胞（EV）とも呼ばれる膜由来小胞を放出



図 1: この研究では、Eppendorf 社のバイオプロセスと遠心分離ソリューションを組み合わせることで、エクソソームの生成と分離のワークフローを実現しました。DASbox ミニバイオリアクターシステムは、小容量アプローチ、ベンチアプローチ、および大容量アプローチを可能にする Eppendorf 社製バイオプロセス コントローラー ポートフォリオの一部で、小容量パラレルバイオリアクター操作用に設計されています。さらに、Centrifuge CR22N および Centrifuge CP100NX は、包括的なローター ポートフォリオを備えており、最大 6 L の大容量遠心処理と最大 $803,000 \times g$ の遠心力を実現します。



DASbox ミニバイオリアクターシステムと Eppendorf 遠心機ソリューションの可能性については、以下をご覧ください。

<https://www.eppendorf.com/dasbox/>

<https://www.eppendorf.com/exosomes/>

します。これは、隣接する細胞と離れた細胞の両方に影響を与える可能性があります [2-4]。サイズが $30 \sim 1,000 \text{ nm}$ の EV は、さまざまな生理学的・病理学的状態において、細胞外空間にある血液細胞、樹状細胞、内皮細胞および上皮細胞、神経細胞、腫瘍細胞、さらには胚性幹細胞や成体幹細胞などの多数の細胞型によって放出されます [5]。EV は、血清、唾液、羊水、滑液、母乳、尿などの体液からも確認されています [6,7]。EV は細胞の原形質膜と同様に、脂質二重層膜と親水性タンパク質で囲まれた球状のサイトゾル断片で、RNA、DNA、タンパク質、mRNA、マイクロ RNA、脂質などのさまざまな生物活性分子で構成されています [7,8]。

EV は、エクソソーム ($30 \sim 150 \text{ nm}$) と微小胞 (MV、 $150 \sim 1,000 \text{ nm}$) で構成される不均一な小胞集団です [4,7,9]。エクソソームは多胞体 (MVB) に由来し、エンドソーム膜の内向きの出芽によって形成された後に蓄積します。対照的に、MV は細胞膜から直接外向きに出芽して形成されます [10]。エクソソームは 1983 年に「逆エンドサイトーシス」のプロセスと

して初めて説明されました。エンドソームを由来とすることから、エクソソームには CD63、CD9、CD81 などの後期エンドソーム成分が豊富に含まれています [11,12]。最近では、エクソソームは免疫応答 [13]、中枢神経系関連疾患 [14]、腫瘍発生と癌 [15,16]、ウイルスの蔓延 [17]、神経障害 [18] と関連していると考えられています。このような関係から、診断におけるバイオマーカーとしての有用性 [19,20] や、さまざまな病状の治療への応用が広く研究されています [21]。

エクソソーム研究分野には多くの課題が残されています。そのひとつは収量が低いことと、細胞からエクソソームを効率的に生産するためのバイオ製造プラットフォームが確立されていないことです。そのため、細胞培養方法の確立が求められており、シングルユースベッセル BioBLU を使用する方法を以前に説明しています [22-24]。さらに、研究用途においては、周囲のタンパク質、リポタンパク質、および核酸からの汚染によって偽陽性や解釈の誤りが生じやすく、結果として異なる研究グループの科学的結果の間に齟齬が生じる可能性があります [25]。



図 2 : ① DASbox ミニバイオリアクターシステムと ② シングルピッチブレードインペラを備えたシングルユースベッセル BioBLU 0.3c を使用して、エクソソーム産生ヒト脂肪由来幹細胞 (hADSC) を培養しました。増殖パラメータは、DASware® 制御ソフトウェアで監視・制御しました。分離は、固定角で 50 mL × 10 本および 15 mL × 10 本を一度に遠心できるアングルタイプの Rotor R15A と ③ Centrifuge CR22N を使用して行い、さらに、4 mL チューブを 6 本を一度に遠心できる ④ スイングタイプの Rotor P32ST と Centrifuge CP100NX も使用しました。

エクソソームの研究応用への関心が高まるにつれ、再現可能な精製方法の重要性がますます高まっています。最も一般的な方法は遠心分離法、クロマトグラフィー、限外ろ過法、沈降法、免疫アフィニティ精製法の 5 つです [26–32]。今日最もよく使用されているのは遠心分離法です [33,34]。そこで、このアプリケーション ノートではシングルユースベッセル BioBLU 0.3c

を搭載した DASbox ミニバイオリアクターシステムのマイクロキャリア上でヒト脂肪由来幹細胞 (hADSC) を懸濁培養した後、High-Speed Centrifuge CR22N と Centrifuge CP100NX で エクソソームを分離しました (図 2)。このワークフローで生細胞の収量が増加し、高品質のエクソソームが大量に得られました (図 3)。

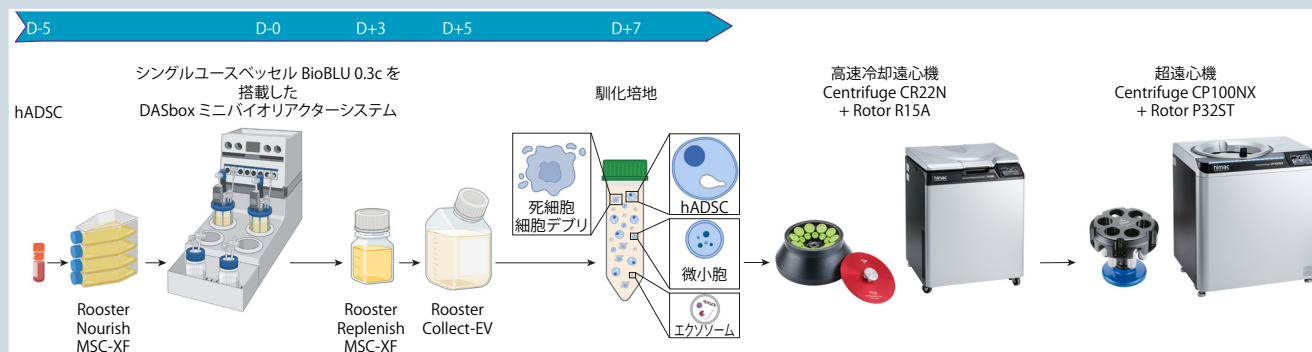


図 3 : シングルユースベッセル BioBLU 0.3c を備えた DASbox ミニバイオリアクターシステムでの細胞増殖とエクソソーム生成、およびアングルタイプの Rotor R15A を備えた Centrifuge CR22N および Rotor P32ST を備えた Centrifuge CP100NX の組み合わせを使用したエクソソーム分離の概略図。画像は BioRender.com を利用して作成

材料と方法

シングルユースベッセル BioBLU 0.3c による マイクロキャリア上の hADSC 培養

第 3 継代 (P3) のヒト脂肪由来幹細胞 (hADSC、Lonza、PT-5006) を、RoosterNourish-MSX-XF 培地 (RoosterBio®、KT-016) 存在下で、T75 BioCoat® コラーゲン I でコーティングした培養フラスコ (Corning®, 10175430) で増殖させました。5 日後、0.025% トリプシン-EDTA (Lonza、CC-5012) およびトリプシン中和溶液 (Lonza、CC-5002) を使用して細胞をトリプシン処理しました。Vi-CELL XR 自動細胞計数装置 (Beckman Coulter®, 731050) を使用して細胞数を計測しました。総量 6×10^6 hADSC を 3.4 g の Synthemax® II 低密度 マイクロキャリア (Corning、CLS3781) と組み合わせ、懸濁培養しました。DASbox ミニバイオリアクターシステムで RoosterNourish MSX-XF 培地を 250 mL 使用しました。このシステムでは、シングルユースベッセル BioBLU 0.3c を 2 台備えられています。ビーズへの最初の細胞接着を促進するために、最初の 4 時間は細胞とマイクロキャリアを撹拌しませんでした。その後、残りのプロセスでは撹拌速度を 80 rpm に設定しました。細胞は、溶存酸素 (DO) レベルを 40% に設定して 37°C で培養しました。増殖培地は、容器のヘッドスペースに CO₂ および NaOH (1M) を自動添加することによって pH7.2 に維持しました。

3 日目に、5 mL の RoosterReplenish-MSX-XF (RoosterBio、SU-023) を懸濁液に添加して、細胞に成長因子を追加しました。培養 5 日目に、各シングルユースベッセル BioBLU 0.3c を細胞培養フードの下に移し、そこで培地を廃棄し、100 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) でビーズを洗浄し、RoosterCollect-EV 培地 (RoosterBio、M2001) を 250 mL 添加しました。次に、シングルユースベッセル BioBLU 0.3c を DASbox ミニバイオリアクターシステムに 48 時間戻しました (EV 回収フェーズ)。細胞増殖は、蛍光分子 Invitrogen Calcein AM (Thermo Fisher Scientific®, C3099) で細胞を染色し、Thermo Scientific Invitrogen Evos FL Auto 2 顕微鏡 (Thermo Fisher Scientific、AMAFD2000) で可視化して、適時評価しました。

7 日目に、その後の遠心分離ステップのために細胞培養馴化培地 (CCM) を回収しました。細胞数は Vi-CELL XR を使用して計測しました。

遠心分離によるエクソソームの分離

培養上清液からエクソソームを分離するために、CCM を回収

し、50TC (50 mL) および 15TC (15 mL) チューブに分配し、 $500 \times g$ で 10 分間、4°C で遠心分離しました。上澄み液を新しいチューブに移し、 $2,000 \times g$ 、4°C で 10 分間再度遠心分離しました。次に、上澄み液を新しいチューブに再度移し、 $20,000 \times g$ 、4°C で 20 分間の最終遠心分離ステップを実施しました。上澄み液のうち少量を、さらなる分析のために -80°C で保存しました。ここまでのすべての遠心分離ステップは、Rotor R15A と Centrifuge CR22N を使用して実施しました。次に、エクソソームの純度および完全性に対するさまざまな遠心分離法の影響を比較するために、30% スクロースクッション法を使用した場合と、使用しない場合の両方で分離を実施しました [35]。これらの超遠心分離は、スイングタイプの Rotor P32ST と、Centrifuge CP100NX を使用して実施しました。スクロースベースの分離では、27 ゲージの針とシリンジを使用してゆっくりと重ねることによって、CCM を 4 mL の 30% スクロース溶液 (PBS で調製) を入れた 40 PET チューブに移しました。スクロースクッションを使用しない場合では、CCM を直ちに 40 PET チューブに移しました。PET チューブを使用したのは、この材料の透明度が高く、遠心分離後のペレットが見えるためです。その後、チューブを 4°C、 $100,000 \times g$ で 90 分間遠心分離しました。上澄み液は廃棄しましたが、4 mL がチューブの底に残りました。チューブ内の均衡を再度整えるために、追加の CCM または PBS (CCM の初期量に応じた量) を上部にゆっくりと加え、続いて 4°C、 $100,000 \times g$ で 90 分間遠心分離してエクソソームを回収し、ペレット状に濃縮しました。ペレットが崩れない程度で最大量の上澄み液を廃棄しました。エクソソームを含むペレットを 600 μ L の PBS に再懸濁し、さらに使用のために 200 μ L に分けて -80°C で保存しました。非馴化培地 (RoosterCollect-EV 培地) をネガティブコントロールとして CCM と同時に使用しました。

粒度分布分析

EV の粒度分布プロファイルは、動的光散乱法 (DLS) で測定しました。測定は、ナミュール大学のプラットフォームと薬学部によって行われました。DLS 法では、EV の粒度分布 (PSD) は、 $\lambda = 633$ nm 波長のレーザーを備えた ゼータサイザー Ultra (Malvern Panalytical、ZSU5700) によって測定しました。ゼータサイザー小容量ディスプレイブル粒子径測定セルキット

(Malvern Panalytical, ZSU1002) を使用して、透明なキュベット内のエクソソーム ペレットを分析しました。モデル系にはリポソームを選択しました（屈折率：1.45、粘度：1.2 PI、温度：20℃）。この脂質小胞は、組成、サイズ、密度などの物理的特徴がエクソソームと類似しているためです [36]。したがって、粒子は密度が 1.2 mg/mL、屈折率が 1.45、吸収係数が 0.001 の球形であると考えられました。

電子顕微鏡法

電子顕微鏡観察は、GIGA Neurosciences Laboratory for Cell and Tissue Biology（リエージュ大学）によって行われました。簡単に説明すると、エクソソーム懸濁液を透過型電子顕微鏡（TEM）グリッドにロードし、1 時間インキュベートしました。エクソソームをろ過した 2.5% 酢酸ウラニル溶液で 10 分間染色し、シリンジを使用して TEM グリッドの表面に塗布しました。余分な酢酸ウラニル溶液は濾紙でグリッドから除去しました。グリッドを水で素早く洗浄して、余分な染色溶液を除去しました。JEOL 透過型電子顕微鏡（JEOL、JEM-1400）を 80 kV で使用して、エクソソームの外観を分析しました。

結果と考察

シングルユースベッセル BioBLU 0.3c での hADSC の増殖と培養

85 ~ 90% の十分なコンフルエンスを確保するために、T75 培養フラスコ内で hADSC を 5 日間初期増殖させた後（図 4、D-2/D-0）、細胞をトリプシン処理し（ 5.3×10^5 細胞/mL、生存率：96.7%）、細胞対ビーズ比 3.7 細胞/ビーズの低濃度 Synthemax® II マイクロキャリア（Corning 社製）に播種しました。シングルユースベッセル BioBLU 0.3c での増殖期 1 日目のカルセイン染色後の顕微鏡画像は、ビーズへの細胞の接着が成功していることを示しました（図 4、D+1）。6 日目に、細胞の増殖とマイクロキャリア上の均一な分布が観察されました（図 4、D+6）。バイオリアクターで 5 日間培養した後の 2 日間、RoosterNourish-MSC-XF 培地を 250 mL の RoosterCollect-EV 培地に交換することによって EV 回収を開始しました。この低粒子培地は、ヒト間葉系幹細胞（hMSC）を使用する際に、クリーンな EV 回収のためのバイオプロセス スケールで使用されます。培養期間終了時（D+7）の細胞生存率は 97% に達し、細胞密度は 1.96×10^6 細胞/mL でした。DASbox ミニバイオリアクターシステムは温度、pH、DO レベルなどのさまざまな

CD63 ELISA によるエクソソームの定量化

エクソソームの量は、ExoELISA-ULTRA Complete Kit CD63 Detection（System Biosciences、EXEL-ULTRA-CD63-1）を製造元の指示に従って使用して測定しました。簡単に説明すると、各サンプル 50 μ L を 96 ウェルプレートに添加し、37℃で 1 時間インキュベートしました。Eppendorf ThermoMixer® C を使用して振盪しながらプレートを 5 分間で 3 回洗浄しました。CD63 一次抗体をブロッキング溶液で希釈しました（1:100）。次に、50 μ L の抗体溶液を各ウェルに添加し、振盪しながら室温（RT）で 1 時間インキュベートしました。一次抗体を廃棄し、続いて 5 分間の洗浄ステップを 3 回実施しました。二次抗体をブロッキング溶液で希釈し（1:5000）、50 μ L を各ウェルに添加、振盪しながら室温で 1 時間インキュベートしました。最後の 3 回の洗浄ステップの後、プレートを 50 μ L の TMB（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン）ELISA 基質とともに室温で 15 分間インキュベートしました。同量の停止緩衝液を添加し、分光測光マイクロプレートリーダー xMark（Bio-Rad Laboratories、1681150）を使用して 450 nm でプレートを直ちに分析し、アッセイの固定エンドポイントを設定しました。

培養パラメータを厳密にモニタリングできるため、プロセス全体を通じて標準化された多数の生細胞を生産する理想的な培養システムの構築が可能になりました。これは、細胞培養中に再現性のあるエクソソームの量と品質を確保するために非常に重要です。

連続遠心分離ステップを使用した馴化培地からのエクソソームの分離

2 つのシングルユースベッセル BioBLU 0.3c の培地（500 mL）を次のステップのためにプールしました。次に、培地を 15TC および 50TC コニカルチューブに再分配し、その後、アングルタイプの Rotor R15A と、Centrifuge CR22N を使用して 3 つの遠心分離ステップを実行しました（図 5A）。これら 3 つの遠心分離ステップを経て、生細胞とビーズ（500 $\times$ g）、細胞破片、死細胞、アポトーシス小体（2,000 $\times$ g）、および微小胞（20,000 $\times$ g）を除去しました。各遠心分離ステップの後、上澄み液を新しいチューブに移しました。

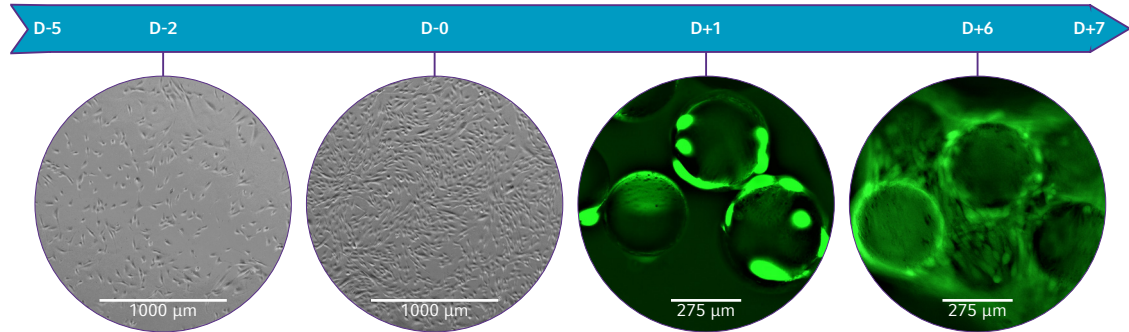


図 4：シングルユースベッセル BioBLU 0.3c (D-0 ～ D+7) を備えた DASbox ミニバイオリアクターシステムを使用した、T75 フラスコ (D-5 ～ D-0) およびビーズ上の細胞培養。カルセイン染色でビーズ上の細胞増殖を追跡しました。

このプロセス中、移し替えの間に細胞、細胞破片、アポトーシス小体、または MV ペレットが取り込まれるのを防ぐために、1 mL の培地をチューブ内に残しました。最後の遠心分離ステップの後、超遠心分離に使用できる約 470 mL の清澄な培地が得られました。Centrifuge CP100NX と Rotor P32ST を使用すると、2 台のシングルユースベッセル BioBLU 0.3c の合計容量を得るのに必要な操作は 2 回だけで済みました (図 5B/C)。これにより、エクソソーム回収時の作業手順と時間が削減されました。

通常、エクソソームは粗培地から最初に $100,000 \times g$ で遠心分離され、続いて同じ速度で第 2 ステップが実行されますが、スクロース勾配を使用して均一で純粋な無傷のエクソソームのみを回収します。時間を節約するために、スクロース勾配ステップを、チューブの底に 4 mL の 30% スクロースクッションを入れる技術に置き換えました (図 5C)。スクロースクッションを使用すると、回収チューブ内でグルコース勾配を作成するという多大な労力をかけることなく、インタクトで均一なエクソソームが得られます。

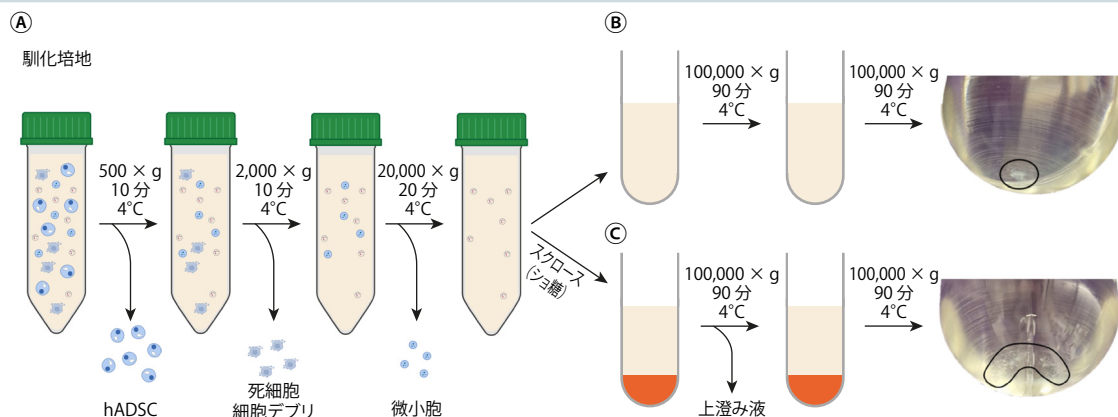


図 5：高速冷却遠心機と超遠心機を組み合わせた、培地からのエクソソームの分離方法。① Centrifuge CR22N とアングルタイプの Rotor R15A、② スクロースクッションを使用しない超遠心分離、③ エクソソームをペレット化するスクロースクッション有りの Centrifuge CP100NX とスイングタイプの Rotor P32ST。画像は BioRender.com を利用して作成。

このアプリケーションノートでは、スクロースクッション法を使用した場合と、使用しない場合を比較しました (図 5 ⑤ / ⑥)。ペレットの形状は、遠心分離後で明らかに異なっていました。実際、スクロースクッションを使用しない遠心分離では、主にチューブの底に凝縮したペレットが生成されましたが (図 5 ⑤)、スクロースクッション法 (図 5 ⑥) では、より拡散して広がったペレットが生成されました。これは、エクソソームがスクロースクッションを通り抜けて直線的かつ真っ直ぐに移動し、チューブの底でゆっくりとペレット化する一方で、スクロースがペレットを同じ場所に凝縮させないという事実によって説明できます。

エクソソームの特性評価と定量化

超遠心分離後、エクソソームペレットを PBS に再懸濁し、DLS、電子顕微鏡 (図 6 ①)、および ELISA (図 6 ②) を使用して特性評価をしました。DLS を使用して、PBS 懸濁液中の粒子径分布プロファイル、つまりエクソソーム集団の均一性を判断しました。上述のように、新鮮な非馴化ゼノフリー培地 (RoosterCollect-EV) を陰性対照として同時に使用しました。DLS 測定の結果、実験の最後の 48 時間でエクソソーム回収に使用された RoosterCollect-EV 培地にはエクソソームが含まれていないことが示されました。スクロースクッションの有無にかかわらず、エクソソーム分離株の DLS 測定では、どちらの手法でも約 100 nm にピークを持つエクソソームに典型的な粒子径分布が示されました (図 6 ①)。注目すべきことに、エクソ

ソーム分離技術の曲線下面積は両方のアプローチで異なりしました。実際、スクロースクッション無しのエクソソームのピーク幅はより広く、より大きい粒子径の検出にシフトする傾向がありました。比較すると、スクロースクッション有りのエクソソームのピーク幅は狭く、より小さい粒子径付近に集中していました。したがって、スクロースクッション有りのエクソソーム集団は、スクロースクッション無しのエクソソーム集団と比較して均質性が高く、かつ粒子径が小さい、と結論付けられます。このデータは、電子顕微鏡を使用してエクソソーム集団を視覚化することによって確認されました (図 6 ②)。この分析は、前述の観察結果を裏付けるものです。RoosterCollect-EV 培地 (陰性対照) ではエクソソームは検出されませんでした。スクロースクッション無しのエクソソーム集団はより大きく不均一でしたが、スクロースクッション内のエクソソームはより小さくより均一で、検出されるデブリも少なくなりました (図 6 ①)。ELISA を用いてエクソソームのバイオマーカーである CD63 の発現を検出しました (図 6 ③)。この方法によって得られた相対的エクソソーム存在量は、両方のエクソソーム分離アプローチで同等でした。また、RoosterCollect-EV 陰性対照のサンプルに CD63 の発現が検出されず、外部エクソソームが存在しないことも確認されました。このデータは、分離に Centrifuge CR22N および Centrifuge CP100NX を使用した場合のエクソソーム収量を示しています。さらに、超遠心分離ステップ中にスクロースクッションを使用することで、高純度かつ均質なエクソソーム集団を回収することができました。

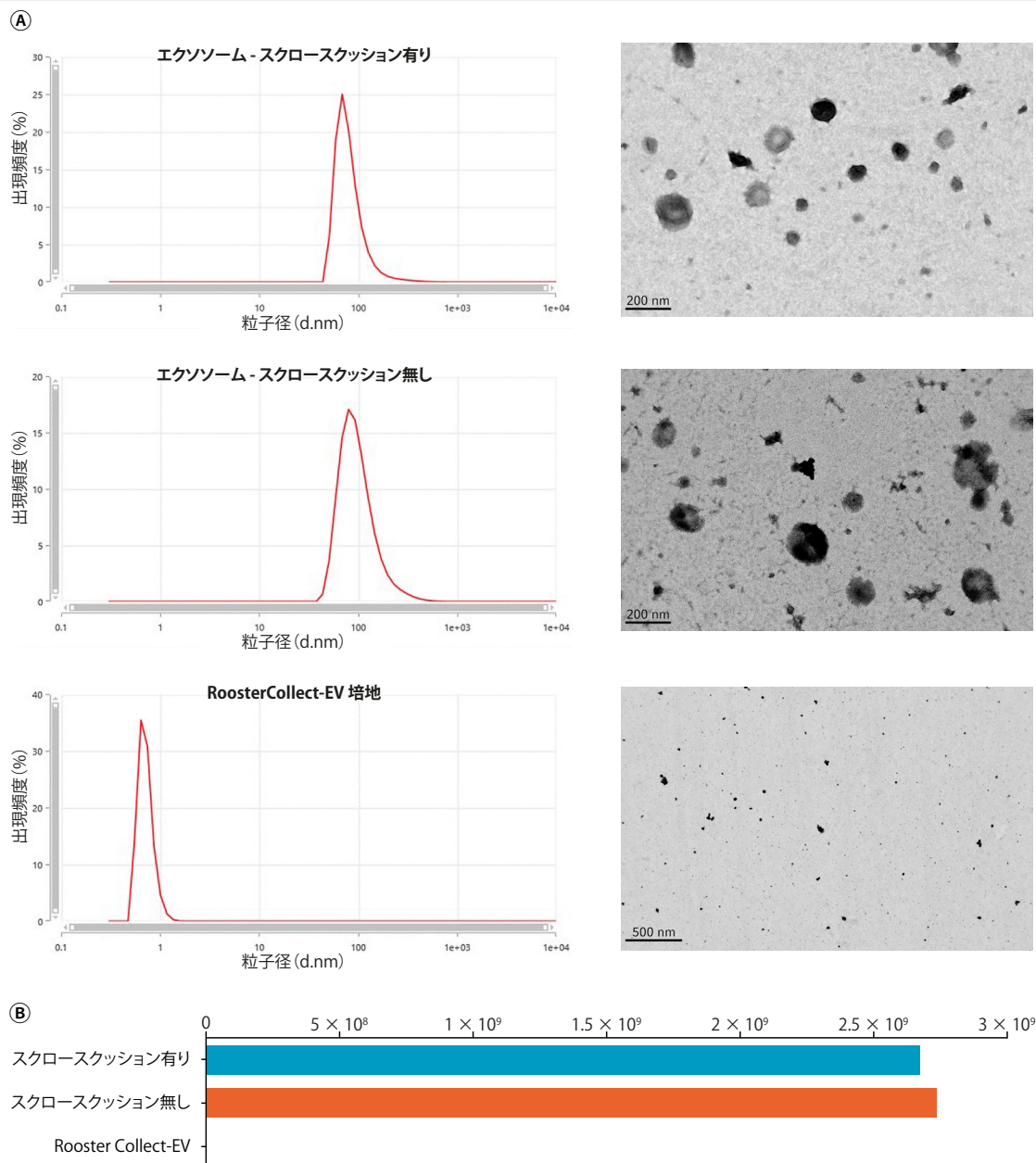


図 6 : (A) 遠心分離後の DLS 測定結果。上からスクロースクッション有り、スクロースクッション無し、Rooster Collect-EV 培地のみ。右はその電子顕微鏡画像。

(B) (A)に示すサンプルのエクソソーム存在量の ELISA 定量化。

まとめ

シングルユースベッセル BioBLU 0.3c を搭載した DASbox ミニバイオリアクターシステムは、エクソソーム生産ワークフローの上流プロセスを効率化かつ最適化します。作業容量 100 ~ 250 mL の 4 つのバイオリアクターの並行処理が可能になるだけでなく、温度、pH、DO、ガス流量などの重要なプロセスパラメータの正確な制御も可能になります。エクソソーム分離プロセスにおける最大の課題には、純度が低くなることを防止すること、プロセスの最後に細胞膜の完全性を確保することがあります。沈降法やクロマトグラフィー技術などの精製・分離方法では、操作バッファーによるエクソソームの凝集または分解が発生します。最も一般的な超遠心分離法は、比較的低コストで、エクソソーム調製物を汚染する可能性のある試薬を添加する必要がなく、大量の生体材料からエクソソームを分離できるという利点があります。しかしながら、超遠心機を用いた分離法には、大量の培地を分離する場合、遠心分離操作を複数回繰り返す必要があり、多大な労力と時間が必要になります。またロータの種類やチューブの容量により、分離効率が変わってしまうのも欠点です。もうひとつの重大な欠点は、エクソソーム画分に非エクソソーム不純物が混じってしまうことです。純度と完全性を高めるために、エクソソームはスクロース勾配 (2.0 ~ 0.25 M) で分離し、210,000 × g で最大 16 時間遠心分離します。プロトコルを改善して時間を短縮するために、スクロースクッション法を使用して超遠心分離を実行しました。

これにより、遠心分離時間が 1 回あたりわずか 90 分に短縮されました。

この実験結果は、シングルユースベッセル BioBLU 0.3c を備えた DASbox ミニバイオリアクターシステムと高速遠心分離および超遠心分離で構成されるワークフローが、インタクトで均一な hADSC 由来エクソソームを回収できる組み合わせであることを実証しています。アングルタイプの Rotor R15A を備えた Centrifuge CR22N を使用すると、15TC × 10 本と 50TC × 10 本のコニカル チューブを同時に遠心処理できるため、1 ステップで最大 570 mL の遠心分離が可能になります。このユニークな機能で、細胞、細胞破片、微小胞などから 570 mL の培地を 1 時間以内に除去できるため、時間と反復作業を節約できます。同様に、一度に最大 40 mL チューブ × 6 本を遠心できるスイングタイプの Rotor P32ST (この作業では Centrifuge CP100NX と一緒に使用) は、最大 230 mL の培地を遠心処理できます。

この大容量遠心処理能力によって、Centrifuge CR22N を使用した 1 回の遠心分離プロセスと、Ultracentrifuge CP100NX を使用した 2 回の遠心分離プロセスで、2 つのシングルユースベッセル BioBLU 0.3c の培地含有物のクリアランスが可能になりました。その結果、プロセス全体の所要時間は 4 時間未満となり、このワークフローにより効率化・高速化を実現できる可能性が示されました。

参考文献

- [1] Liebner S, Cavallaro U & Dejana E. The multiple languages of endothelial cell-to-cell communication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1431–1438 (2006).
- [2] Yoon YJ, Kim OY & Gho YS. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. *BMB Reports* vol. 47 531–539 Preprint at <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.10.164> (2014).
- [3] Tetta C, Ghigo E, Silengo L, Deregibus MC & Camussi G. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine* 44, 11–19 (2013).
- [4] Iraci N, Leonardi T, Gessler F, Vega B & Pluchino S. Focus on extracellular vesicles: Physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles. *Int J Mol Sci* 17, (2016).
- [5] Yuana Y, Sturk A. & Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev* 27, 31–39 (2013).
- [6] Robbins P D & Morelli AE Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* 14, 195–208 (2014).
- [7] Raposo G & Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology* vol. 200 373–383 Preprint at <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138> (2013).
- [8] Tamkovich SN., Tutanov OS & Laktionov PP. Exosomes: Generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* 2016 10:3 10, 163–173 (2016).
- [9] Witwer KW et al. Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 10, (2021).
- [10] Stahl PD & Raposo G. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 34, 169–177 (2019).
- [11] Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS & Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 113, 1 (2013).
- [12] Pan BT & Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33, 967–978 (1983).
- [13] Qiu P, Zhou J, Zhang J, Dong Y & Liu Y. Exosome: The Regulator of the Immune System in Sepsis. *Front Pharmacol* 12, 880 (2021).
- [14] Liu W. et al. Role of Exosomes in Central Nervous System Diseases. *Front Mol Neurosci* 12, 240 (2019).
- [15] Liu J et al. The biology, function, and applications of exosomes in cancer. *Acta Pharm Sin B* 11, 2783–2797 (2021).
- [16] Dai J et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1 5, 1–10 (2020).
- [17] Hoen EN, Cremer T, Gallo RC & Margolis LB Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives? *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 9155–9161 (2016).
- [18] Lin Y, Anderson JD, Rahnema LMA, Gu Sv & Knowlton AA. Exosomes in disease and regeneration: biological functions, diagnostics, and beneficial effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 319, H1162–H1180 (2020).
- [19] Huda MN et al. Potential Use of Exosomes as Diagnostic Biomarkers and in Targeted Drug Delivery: Progress in Clinical and Preclinical Applications. *ACS Biomater Sci Eng* 7, 2106–2149 (2021).
- [20] Xu L, Wu LF & Deng FY. Exosome: An Emerging Source of Biomarkers for Human Diseases. *Curr Mol Med* 19, 387–394 (2019).
- [21] Muthu S, Bapat A, Jain R, Jeyaraman N & Jeyaraman M. Exosomal therapy—a new frontier in regenerative medicine. *Stem Cell Investig* 8, (2021).
- [22] Tejerina S, Dufey V, Hoet JF, Tacheny A & De Longueville F. The DASbox® Mini Bioreactor System as a Tool for Process Development And Stem-Cell Derived Exosome Production in Standardized Culture Conditions. (2021).
- [23] Escobar Ivirico JL, Suttle A & Sha M. SciVario® twin Self-Scale-up of CHO Culture-Based Antibody Production from BioBLU® 3c to BioBLU® 50c Single-Use Bioreactor. www.eppendorf.group/sci-vario (2022).

- [24] Escobar Ivirico JL & Sha M. Stem Cell Exosome Production on the SciVario® twin, a Flexible Controller for Your Bioprocess Needs. (2020).
- [25] Ludwig N, Whiteside TL & Reichert TE. Challenges in Exosome Isolation and Analysis in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 20, (2019).
- [26] Sidhom K, Obi PO & Saleem AA. Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *Int J Mol Sci* 21, 1–19 (2020).
- [27] Tauro BJ et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* 56, 293–304 (2012).
- [28] Szatanek R, Baran J, Siedlar M & Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (review). *International Journal of Molecular Medicine* vol. 36 11–17 Preprint at <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2194> (2015).
- [29] Livshits MA et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep* 5, (2015).
- [30] Chen J et al. Review on Strategies and Technologies for Exosome Isolation and Purification. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.811971> (2022).
- [31] Kotmakçı M & Akbaba GE. Exosome Isolation: Is There an Optimal Method with Regard to Diagnosis or Treatment? in *Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases* (InTech, 2017). doi:10.5772/intechopen.69407.
- [32] Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M & Kim JH. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* 8, (2019).
- [33] Momen-Heravi, F et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biological Chemistry* vol. 394 1253–1262 Preprint at <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0141> (2013).
- [34] Patel GK et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Scientific Reports* 2019 9:1 9, 1–10 (2019).
- [35] Gupta S et al. An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 9, 1–11 (2018).
- [36] Lane RE, Korbie D, Anderson W, Vaidyanathan R & Trau M. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. *Sci Rep* 5, (2015).

注文情報

製品	注文番号
DASbox® ミニバイオリアクターシステム：細胞培養アプリケーション用、シングルユース容器用 4 倍システム	お問い合わせください
シングルユースベッセル BioBLU® 0.3c：細胞培養、オープンパイプ、1 ピッチブレード インペラ、pH なし、滅菌、4 個	お問い合わせください
DASware® 制御ソフトウェア（PC、OS、ライセンスを含む）：4 倍 DASbox® ミニバイオリアクターシステム用	お問い合わせください
Centrifuge CR22N	5721 220 000
Centrifuge CP100NX	5720 110 010
Rotor R15A：CR22N 用、最高回転数 15,000 rpm、最大遠心加速度 32,200 × g	5721 221 007
Rotor P32ST：CP-NX シリーズ用、最高回転数 32,000 rpm、最大遠心加速度 RCF 180,000 × g	5720 214 003
Eppendorf ThermoMixer® C：サーモブロック無しの基本デバイス	5382 000 023
50TC Tube（100 本）：50 mL	5721 411 170
15TC Tube（100 本）：15 mL	5721 411 049
40PET Tube（50 本）：40 mL	5720 411 148

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact
 Eppendorf SE · Barkhausenweg 1 · 22339 Hamburg · Germany
eppendorf@eppendorf.com · www.eppendorf.com

www.eppendorf.com

Beckman Coulter® and Vi-CELL® are registered trademarks of Beckman Coulter, Inc., USA. BioCoat®, Synthemax® and Corning® are registered trademarks of Corning Inc., USA. RoosterBio® is a registered trademark of RoosterBio Inc., USA. Zetasizer® is a registered trademark of Malvern Panalytical Ltd., UK. Thermo Fisher Scientific® is a registered trademark of Thermo Fisher Scientific Inc., USA. Eppendorf®, the Eppendorf Brand Design, BioBLU®, and ThermoMixer® are registered trademarks of Eppendorf SE, Germany. DASbox® and DASware® is a registered trademark of DASGIP Information and Process Technology GmbH, Germany. All rights reserved, including graphics and images. Copyright © 2024 by Eppendorf SE.

Eppendorf SE reserves the right to modify its products and services at any time. This application note is subject to change without notice. Although prepared to ensure accuracy, Eppendorf SE assumes no liability for errors, or for any damages resulting from the application or use of this information. Viewing the application note alone cannot as such provide for or replace reading and respecting the current version of the operating manual.