

細胞外小胞 (EVs) の SEC 分離はこれで決まり！

TSKgel カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーによる分離



細胞外小胞 (Extracellular Vesicles; EVs) は、細胞から放出された膜小胞です。近年、EVs には mRNA や miRNA が含まれており、細胞間の情報交換機能をもつことがわかってきました。特に直径約 30~150 nm の EVs であるエクソソームは、細胞の活性化・不活性化や免疫機能制御への関与が示唆されています。また、がん細胞の EVs は、細胞の転移やがん化に関与していることから、がんマーカーとして診断や治療予後の確認の他、ドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用研究が行われています。

EVs の分離、精製には液体クロマトグラフィーが多用されており、中でもサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) が数多く適用されています。以下に EVs の分析法とその特長の比較、EVs の分析、分離に使用されるクロマトグラフィーの分離モード、SEC 分析に用いられるカラムについて示します。

●細胞外小胞 (EVs、エクソソーム) の分析法と特長

分離法	サイズ排除 クロマトグラフィー (SEC)	超遠心分離 (dUC)	限外ろ過膜 (UF)	ポリエチレン- グリコール(PEG)沈殿	イムノアフィニティー (IA)	微小流路デバイス (MF)
分離原理	分子サイズ	分子サイズ、密度	分子サイズ	表面電荷、溶解性	マーカー分子への 抗体の特異的吸着	免疫アフィニティー 密度、分子サイズ
特異性	++	++	+	+	+++	+++
回収率	+++	++	++	+++	++	+
純度	+++	+++	+	+	+++	+++
試料負荷量	+++	++	++	+	++	+
短時間分析	+++	++	+	++	+	++
コストメリット	+++	+	++	+++	+	+
操作の簡便性	+++	++	+++	+++	++	+
分離効率	+++	++	++	++	++	+++
スケールアップ	+++	++	++	+++	+	+

評価基準：+ (低い)、++ (中程度)、+++ (高い；着色表示)

Ref.; K. Sidhom et al., A review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option? Int. J. Mol. Sci. (2020) Sep 4;21(18):6466, CC BY

<https://doi.org/10.3390/ijms21186466> のデータを一部改変

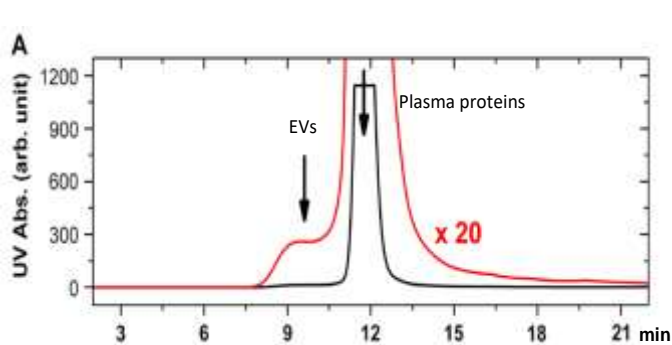
●細胞外小胞 (EVs) の分析、分離に用いられる液体クロマトグラフィー

分離モード	分離原理	長所	短所	主な分離条件
サイズ排除 クロマトグラフィー (SEC)	分子サイズ	・たんぱく質、核酸などの分離 ・分析および精製に使用	・試料負荷量が少ない ・リポたんぱく質(VLDL) の混入	・中性付近の溶離液でアイソクラ ティック溶離
イオン交換 クロマトグラフィー (IEC)	静電的相互作用 (EVsは負に帯電)	・試料負荷量が多く、精製に応用 ・VLDLなどを分離可能	・脱塩、希釈などの前処理が必要	・中性付近のpHの溶離液中、塩濃度 によるグラジエント溶離
マルチ (ミックス) モード クロマトグラフィー (MXC)	静電的相互作用 疎水性相互作用	・VLDLなどを分離可能 ・前処理、精製に応用	・脱塩、希釈などの前処理が必要 ・分離条件の設定が難しい	・中性付近のpHの溶離液中、塩濃度 によるグラジエント溶離 ・塩耐性IECも適用可能

●細胞外小胞 (EVs) の分析に用いられる SEC カラム

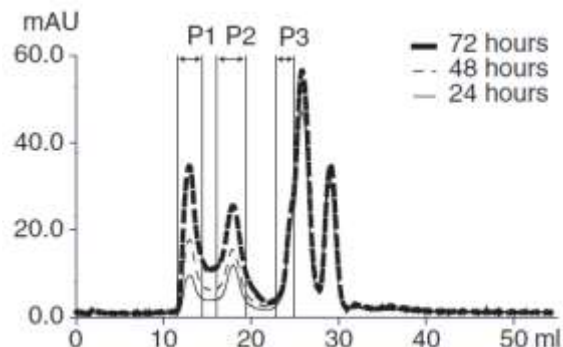
分離可能な EVsの大きさ (直径)	充填剤細孔径	応用可能なSECカラムグレード	備考	文献
10 - 200 nm	>100 nm	TSKgel G6000PWxL, G-DNA-PW (TSKgel SuperAW6000, α-6000)	・200 nmのEVsは排除される場合がある ・TSKgel G6000PWxL+G4000PWxLの連結で使用 される場合もある	1, 2
10 - 100 nm	100 nm	TSKgel G5000PWxL (TSKgel SuperAW5000, α-5000)	・100 nmのEVsは排除される場合がある	3
10 - 50 nm	50 nm	TSKgel G4000PWxL, (α-4000, SuperAW4000) TSKgel G4000SWxL, UltraSW Aggregate TSKgel UP-SW Aggregate	・50 nmのEVsは排除される場合がある ・TSKgel G6000PWxL+G4000PWxLの連結で使用 される場合もある	4, 5

●細胞外小胞 (EVs) の SEC 分離例



Column ; TSKgel G6000PW (7.5 mm I.D. x 30 cm)
 Eluent ; PBS
 Flow rate ; 1.0 mL/min
 Detection ; UV(210 nm), Light scattering
 Temperature ; Room temperature
 Sample ; Erythrocyte Extracellular vesicles

Ref.; Z. Varga et al., Towards traceable size determination of extracellular vesicles, *J. Extracell. Vesicles*, 3 (2014) 23298, CC BY, <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23298>



Column ; TSKgel G4000SW_{xL} (7.8 mm I.D. x 30 cm)
 Eluent ; 20 mmol/L phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.15 mol/L NaCl
 Flow rate ; 0.5 mL/min
 Detection ; UV(220 nm), Light scattering
 Temperature ; 25 °C
 Sample ; Mesenchymal stem cell (MSC) cultured medium after 24, 48, 72 hr
 フラクションP1はエクソソームと同定された

Ref.; S. S. Tan et al., Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane, *J. Extracellular Vesicles*, 2 (2013) 22614, CC BY, <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.22614>

●TSKgel を用いた EVs の分析に関する文献、および EVs に関する総説、ガイドライン

1. Z. Varga et al., Towards traceable size determination of extracellular vesicles, *J. Extracell. Vesicles*, 3 (2014) 23298, CC BY, <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23298>
2. G. E. Benedetto et al., Multiple Techniques for Size Determination of Generalized Modules for Membrane Antigens from *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*, *ACS Omega* 2017, 2, 11, 8282–8289, <https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.7b01173>
3. R. M. M. da Silva, A chromatography approach towards large-scale purification of mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles, (2020) Instituto Superior Técnico, Lisboa
4. S. S. Tan et al., Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane, *J. Extracellular Vesicles*, 2 (2013) 22614, CC BY, <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.22614>
5. K. Vrabec et al., Emerging tools for exosome: Purification and in-process monitoring, *BioProcess International*, 17(3)E1, March 2019
6. 研究開発の俯瞰報告書、2.4.2 細胞外微粒子・細胞外小胞、ライフサイエンス・臨床医学分野(2021), p499 <https://www.jst.go.jp/crds/pdf/2020/FR/CRDS-FY2020-FR-04.pdf>
7. C. Thery et al., Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of MISEV2014 guideline, *J. Extracellular Vesicles*, 2018 Vol 7, 1535750, <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
8. K. Sidhom et al., A review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option? *Int. J. Mol. Sci.* 2020 Sep 4;21(18):6466, <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
9. H. Kaddour et al., The past, present, and future of the size exclusion chromatography in extracellular vesicles separation, *Viruses*, November 2021, 13(11):2272, <https://dx.doi.org/10.3390/v13112272>

※たんぱく質、ペプチド、核酸等の SEC 分析に関する技術資料は、弊社ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/litjp> からアクセスできます



※ “TSKgel” は日本等における東ソー株式会社の登録商標です

※ 掲載のデータ等はその数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎(03) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
 大阪支店 バイオサイエンスG ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
 名古屋支店 バイオサイエンスG ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
 福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2
 仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
 カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>
 HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>
 お問い合わせE-mail hlc@tosoh.co.jp