

# 免疫蛍光法と多角度光散乱 (MALS) によるプロセスモニタリング – 分析HPLCにおける細胞外小胞の追跡

K. Vrabec<sup>1</sup>, T. Lojpur<sup>1</sup>, P. Gagnon<sup>1</sup>  
1 BIA Separations d.o.o., Mirce 21, 5270 Ajdovščina, Slovenia



## INTRODUCTION

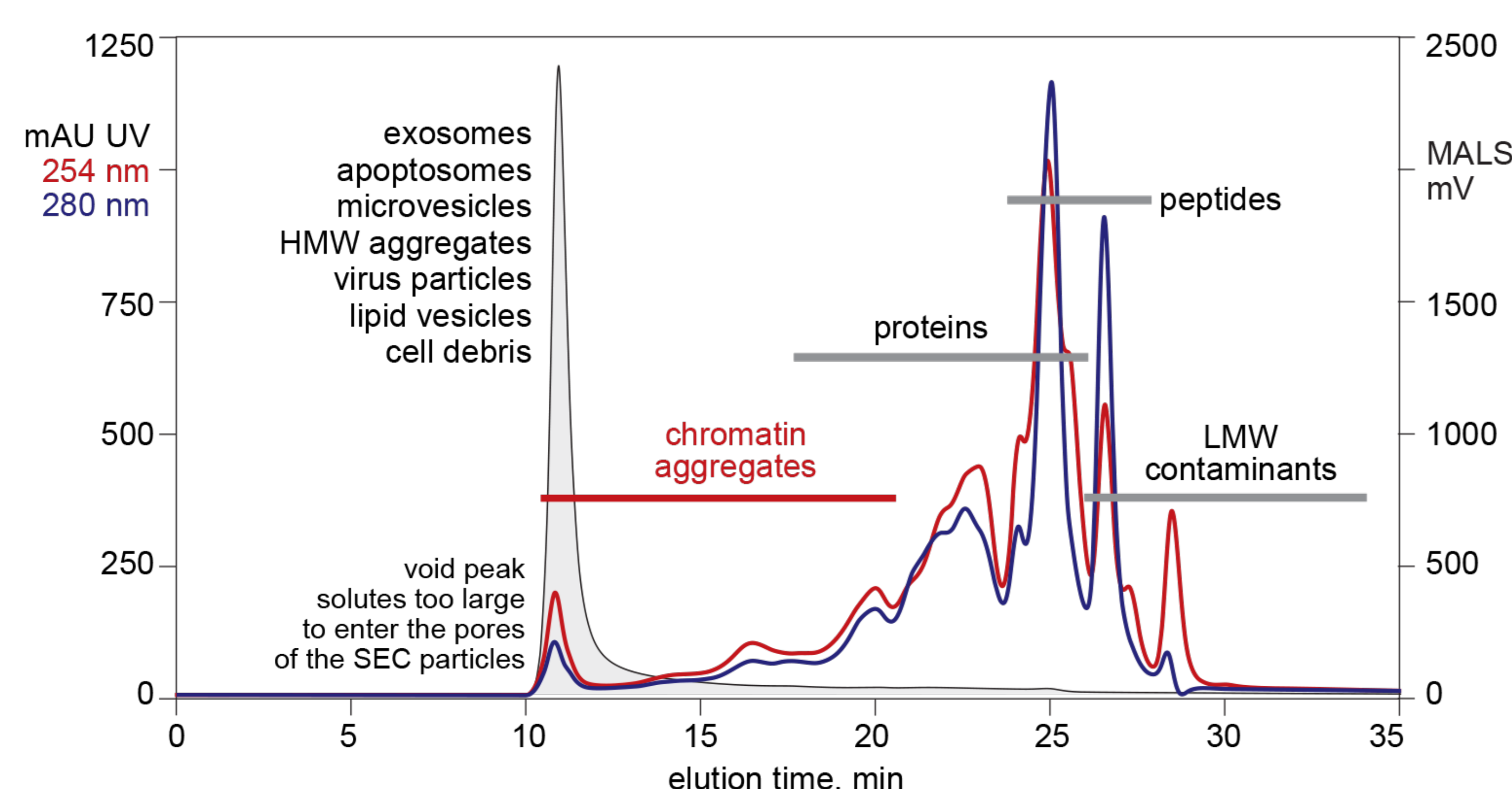
本資料では、分析HPLCシステムに接続した多角度光散乱検出器 (MALS) と蛍光検出器を使用して、精製プロセスにおいて細胞外小胞 (EV) を追跡する手法をご紹介します。

サンプルのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による分析を試みました。SECでは、クロマトグラフィー媒体の細孔への拡散により、細胞培養成分は概ねサイズに基づいて分離される一方、メディアの細孔径よりも大きい粒子は、ボイドピークに排出されます。このピークは、アポトソーム、微小小胞体、エクソソーム、細胞破片、凝集物などを含みます。

多角度光散乱検出器 (MALS) は、クロマトグラフィー分析に貴重な視点を追加します。EVのような大きな粒子はUV光をほとんど吸収しないため、UV検出器での追跡は困難です。MALSは、SEC上の大部分の非小胞性の夾雑物から小胞類を識別するのに役立ちます。

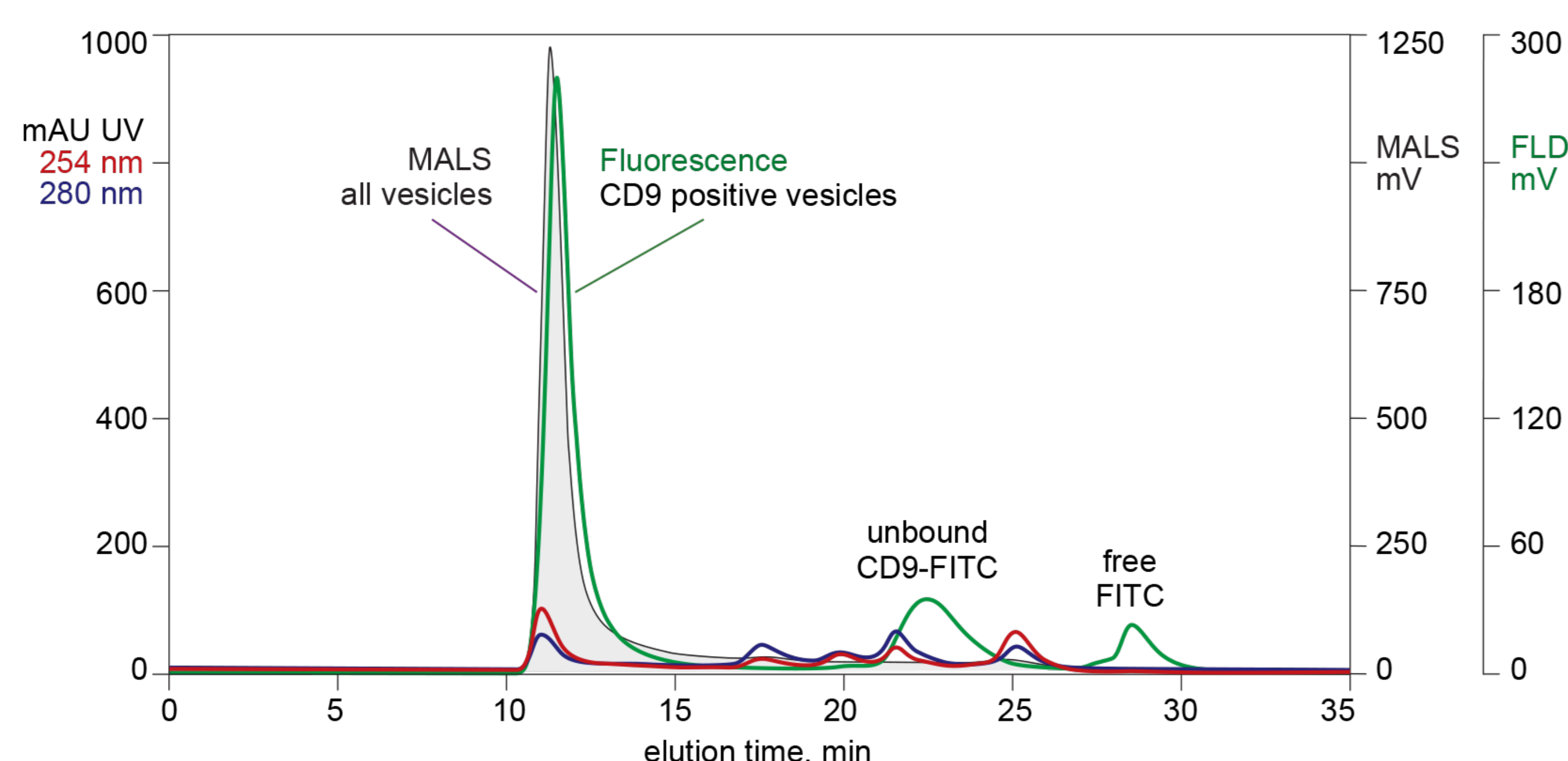
免疫蛍光法 (IF) は、特定の抗原を有する小胞を検出するために使用されます。MALSに結合したSECは、細胞培養中に存在する一群の小胞類を区別できません。さまざまな小胞が、それぞれ免疫学的マーカーとして使用できる多様な抗原を有しています。免疫蛍光法では、エクソソーム表面に存在する免疫学的マーカーを使用してエクソソームを追跡できます。

## RESULTS



**Figure 1. SEC-MALSによる細胞培養物からのエクソソームの分析**

ろ過後のHEK293T 無血清培養上清をSEC-MALSにより分析した。多角度光散乱はサイズの大きな対象への感度が高い。SECはエクソソームと非エクソソーム小胞やその他の高分子量成分を識別できないが、全体的な夾雑物のサイズ分布の分析に有用な視点を提供する。

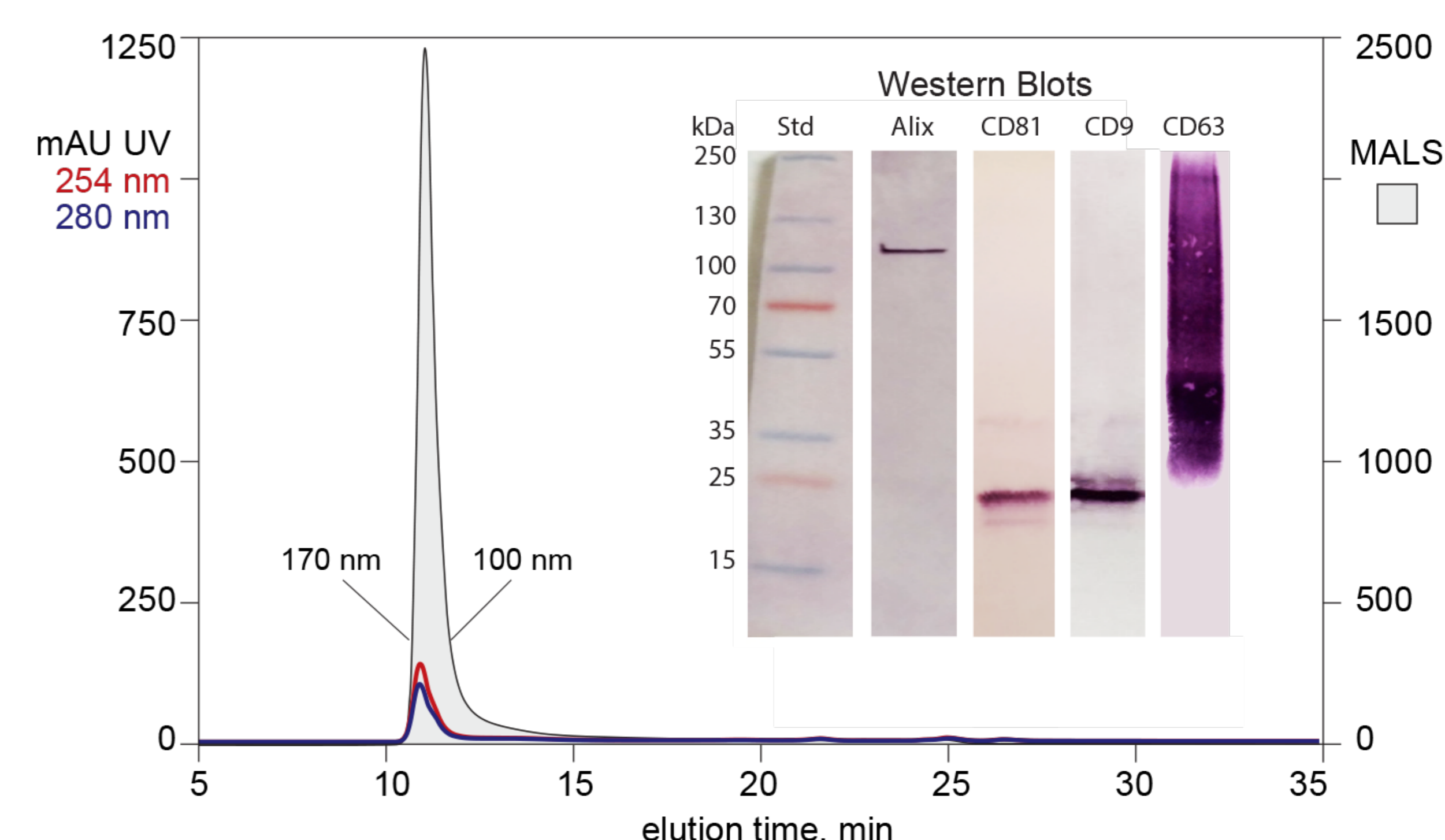


**Figure 3. 細胞外小胞マーカーの免疫蛍光SECによる検出**

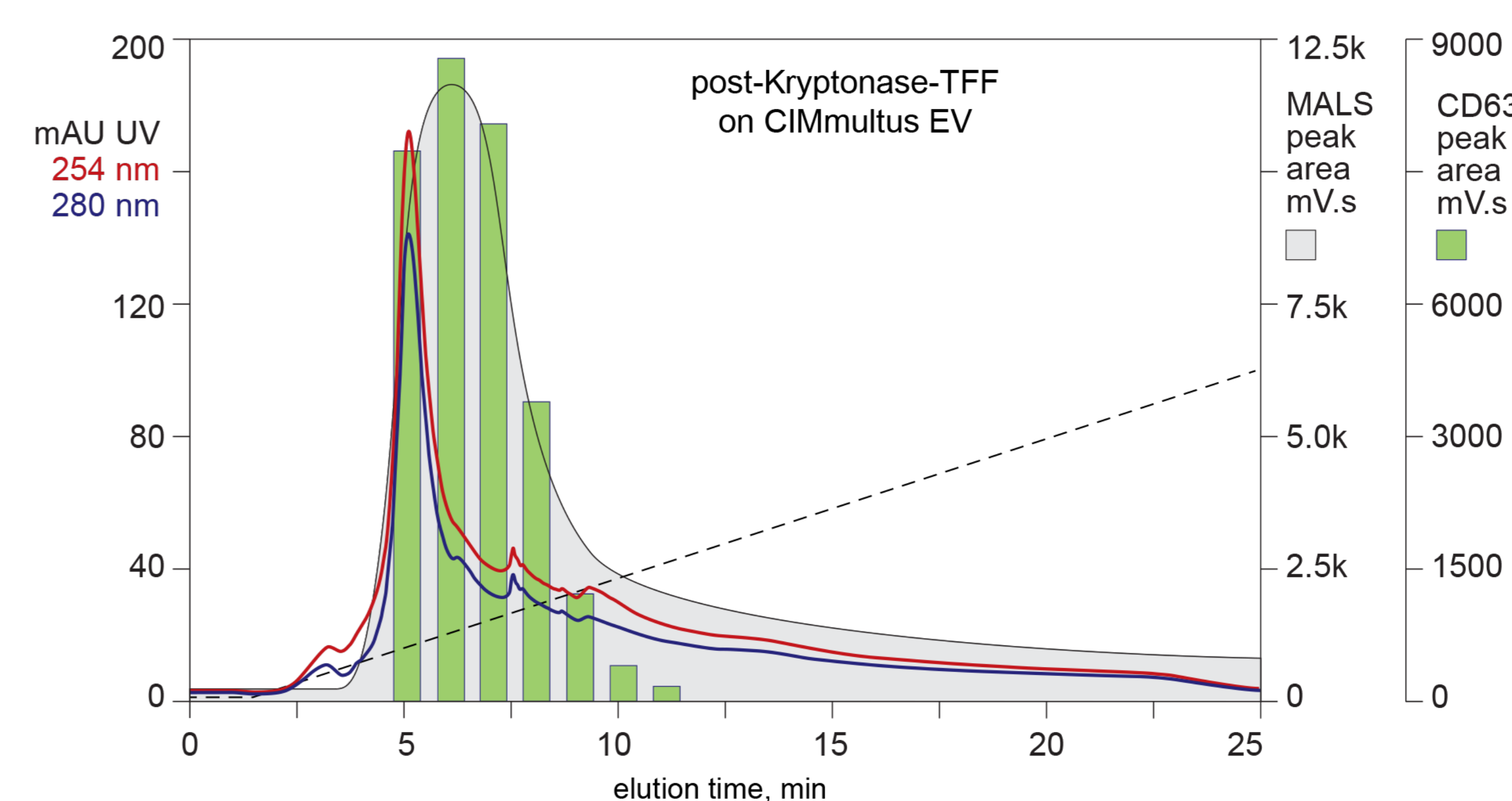
HEK293T細胞培養由来の細胞外小胞の粗精製物を、CD9-FITCコンジュゲート抗体とプレインキュベートし、SECに供した。SECでは、小胞に結合した抗体が11分付近のボイドピークに、またフリーの標識抗体が23分付近に溶出した。CD9は、総細胞外小胞の指標として用いることができる。

## MATERIALS AND METHODS

- 分析HPLC装置 (UV検出器装備) に、DAWN Heleos 多角度光散乱 (MALS) 検出器 (Wyatt社製) を接続。
- 分析カラム: サイズ排除クロマトグラフィカラム (平均粒子径 8 μm、平均細孔径 45 nm、長さ30 mm)
- 抗体コンジュゲート: BioLegend社製
- サンプル: HEK293T 無血清培地 (FiberCell社製) 培養物
- アニオン交換クロマトグラフィ: CIMmultus EVモリスカラム (BIA社製)



**Figure 2. 精製エクソソームのSEC-MALS分析とウェスタンブロットによる確認**  
エクソソームはその表面と内部に複数の抗原を有する。微小小胞体や形質膜、アポトソームなどと由来が共通することから、それら間では多くの抗原が共有される。エクソソームの確認には少なくとも3種以上の免疫マーカーのウェスタンブロットによる確認が必要とされる。ウェスタンブロットは手間・時間を要する手法である。抗原の存在の確認後は、エクソソームの追跡にはSEC-IF (免疫蛍光SEC) を使用した。



**Figure 4. アニオン交換クロマトグラフィ (AEX) 精製過程におけるエクソソーム性マーカーの追跡**

粗精製細胞培養物を、CIMmultus EVカラムによるAEXに供した。フラクションを回収し、CD63-FITC抗体とインキュベートし、SEC-IF分析した結果を、MALS強度のクロマトグラムと重ね書きした。MALSレスポンスとIF強度はエクソソームフラクション領域でよく一致した一方、MALS強度はその後も持続し、ベシクル類の溶出が続くことを示唆した。MALSおよびIFのピークはUVとは一致しておらず、UVがエクソソーム溶出のよい指標ではないことを示している。IF強度によれば本プロセスにおけるエクソソームの回収率は95%以上であった。

## CONCLUSIONS

- UV、蛍光およびMALSの同時モニタリングは、従来の検出法にさらに広範かつ有益な示唆を加えます。
- 免疫蛍光は迅速、特異的、かつ定量的な結果を与え、精製工程でのターゲットの回収状況の追跡を可能にします。
- これらの結果は、エクソソーム精製プロセスの開発において優れたガイダンスとなります。

The authors would like to thank Bernd Giebel and Simon Staubach from University Hospital Essen for welcome collaboration; Romina Žabar, Sebastijan Peljhan and Blaž Goričar from BIA Separations for integrating MALS into chromatography methods; and the applications development group at BIA for many valuable insights and suggestions.