

明 細 書

発明の名称：細胞外小胞の分離精製方法

技術分野

[0001] 本開示は、細胞外小胞を分離精製するための分離精製方法に関する。

背景技術

[0002] 培養液から有用物を分離精製する方法として、分離膜を使用した方法が知られている。

[0003] 特開平3-39084号公報には、単細胞藻類の培養液を分画分子量10,000~1,000,000の中空系型限外濾過膜（UF膜）モジュールを用いてクロスフロー濾過することにより濃縮するに際して、定期的な伏流洗浄を行う単細胞藻類培養液の濃縮方法の発明が記載されている。

[0004] クロスフロー濾過により培養液を濃縮すると、UF膜の外側に濃縮液が存在し、UF膜の内側に透過液が入る。伏流洗浄をすると、洗浄水はUF膜の内側に入った後、UF膜の外側に出てくることでUF膜が洗浄される。

[0005] 特開2018-76291号公報には、細胞の培養槽から培養液を排出し、排出した培養液と同量の新鮮培地を前記培養槽に加えるブリーディング工程と、前記培養槽から抽出した培養液を、実質的に緻密層を有しない多孔膜を用いて濾過する濾過工程とを含み、前記濾過工程における濾過がタンジェンシャルフロー濾過であり、前記濾過工程における透過液の速度が1.0 L M H以下である、有用物質を回収する方法の発明が記載されている。

[0006] 前記有用物質は、タンパク質、ウイルス、エクソソーム、および核酸からなる群から選択されることが記載されている。前記タンジェンシャルフロー濾過としては、交互タンジェンシャルフロー濾過も実施できることが記載されている。細胞外小胞とは、細胞外に放出される脂質二重層で覆われた核をもたない粒子を総称しており、核酸、タンパク質、脂質、各種代謝産物などを含み、エクソソーム、マイクロベシクルおよびアポトーシス小胞などが該当する。

[0007] Cytometry Research 26 (1) : 1~6, 2016
、「Exosomeによるリキッドバイオプシーの新展開」、吉岡祐亮, 落谷孝広には、エクソソームの新しい検出法として、エクソスクリーン (ExoScreen) 法が記載されている。

発明の概要

[0008] 本開示は、細胞外小胞を分離精製するための分離精製方法を提供することを課題とする。

[0009] 本開示は、細胞外小胞と不要物が含まれる溶液から前記細胞外小胞を分離精製する分離精製方法であって、

前記分離精製方法が、前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液の培養上清液と吸着剤を接触させることで、前記吸着剤に前記細胞外小胞を除いた不要物を吸着保持させる吸着剤処理方法であり、

前記吸着剤が、細孔内部が正に荷電されている多孔質粒状物であり、前記細孔内部に前記細胞外小胞を除いた負に荷電されている不要物を吸着保持できるものである、細胞外小胞の分離精製方法を提供する。

[0010] 本開示の1つの実施形態によれば、前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液は、細胞外小胞を含む培養上清液であることができる。

[0011] 本開示の1つの実施形態によれば、前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液は、細胞外小胞を含む間葉系幹細胞の培養上清液であることができる。

[0012] 本開示の1つの実施形態によれば、前記吸着剤処理方法は、前記吸着剤を充填したカラムに前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液を通液する方法、前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液が入った容器内に前記吸着剤を加えた後、攪拌混合する方法から選ばれる方法であることができる。

[0013] 本開示の1つの実施形態によれば、前記吸着剤として、異なる吸着性能を有している複数の吸着剤を使用して、前記複数の吸着剤による複数回の吸着剤処理方法を実施することができる。

[0014] 本開示の1つの実施形態によれば、前記異なる吸着性能を有している複数の吸着剤は、多孔質粒状物の細孔径が異なるもの、多孔質粒状物の比表面積が

異なるもの、多孔質粒状物の平均粒子径が異なるもの、多孔質粒状物を構成する基材の種類が異なるもの、多孔質粒状物の細孔内部表面に存在する官能基の種類や密度が異なるものから選ばれる１または複数のものであることができる。

[0015] また本開示は、細胞外小胞と不要物が含まれる溶液から前記細胞外小胞を分離精製する分離精製方法であって、

前記分離精製方法が、上記の吸着剤処理方法と、膜分離方法を組み合わせる方法である、細胞外小胞の分離精製方法を提供する。

[0016] 前記分離精製方法は、前記吸着剤処理方法と前記膜分離方法による処理を交互に実施する方法、またはランダムに実施する方法であることができ、また最初の処理が前記吸着剤処理方法であることができる。

[0017] 本開示の１つの実施形態によれば、前記膜分離方法は、中空糸膜を使用し、ろ過する膜分離方法であることができる。

[0018] 本開示の１つの実施形態によれば、前記膜分離方法が、中空糸膜を使用し、ろ過する膜分離方法であることができ、

前記膜分離方法で使用する中空糸膜は、内径が $0.2\text{ mm} \sim 1.4\text{ mm}$ 、分画分子量が $10\text{ 万} \sim 100\text{ 万}$ のものであることができ、

前記膜分離方法におけるろ過方法は、一方向または交互方向のタンジェンシャルフローろ過であることができる。

[0019] 本開示の１つの実施形態によれば、前記膜分離方法は、中空糸膜を使用し、ろ過する膜分離方法であることができ、

前記膜分離方法で使用する中空糸膜は、内径が $0.2\text{ mm} \sim 1.4\text{ mm}$ 、分画分子量が $10\text{ 万} \sim 100\text{ 万}$ のものであることができ、

前記膜分離方法におけるろ過方法は、前記吸着剤処理方法による処理液を前記中空糸膜の一端側の第１開口部から圧入してろ過し、透過液と第１濃縮液に分離する第１ろ過工程と、

前記第１濃縮液を前記中空糸膜の他端側の第２開口部から圧入してろ過し、透過液と第２濃縮液に分離する第２ろ過工程を有し、

前記第1ろ過工程と前記第2ろ過工程を交互に複数回実施する、一方向または交互方向のタンジェンシャルフローろ過により前記細胞外小胞の濃度が高められた濃縮液を得る方法であることができ、

前記第1ろ過工程と前記第2ろ過工程における膜面速度は 0.3 m/sec ～ 2 m/sec であることができる。

[0020] 本開示の1つの実施形態によれば、前記膜分離方法におけるろ過方法は、前記吸着剤処理方法による処理液を孔径 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ ～ $0.5\text{ }\mu\text{m}$ の精密ろ過膜によりろ過した後、前記精密ろ過膜のろ過液を使用し、前記第1ろ過工程と前記第2ろ過工程を交互に複数回実施する工程であることができる。

[0021] 本開示の1つの実施形態によれば、前記第1ろ過工程を実施するとき、前記吸着剤処理方法による処理液または前記第2ろ過工程で得られた第2濃縮液に対して緩衝液を加えて希釈した後、前記第1ろ過工程を実施することができる。

[0022] 本開示の1つの実施形態によれば、前記第1ろ過工程と前記第2ろ過工程は、窒素ガス、不活性ガス、二酸化炭素、H E P Aフィルターでろ過された空気から選ばれるガスを導入することで圧入して実施されることができる。

[0023] 本開示の1つの実施形態によれば、出発原料となる前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液に含まれているタンパク質量を $1/5$ 以下の量に減少させることができる。

[0024] 本開示の1つの実施形態によれば、前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液に含まれている細胞外小胞の量を基準とすると、前記濃縮液に含まれている細胞外小胞のエクソスクリーン (ExoScreen) 法を用いて測定される量は、濃縮倍率が5倍以上かつ回収率が50%以上であることができる。

[0025] 本開示の1つの実施形態によれば、前記中空糸膜は、複数の液出入口を有するケースハウジング内に複数本の中空糸膜が収容されている中空糸膜モジュールであることができる。

[0026] 本開示の1つの実施形態によれば、前記第1ろ過工程と前記第2ろ過工程

を交互に実施するとき、前記実施回数が増加するにつれて、第１ろ過工程のろ過対象の希釈倍数を増加させることができる。

[0027] 本開示の１つの実施形態によれば、前記第１ろ過工程と前記第２ろ過工程を交互に実施するとき、前記実施回数が増加するにつれて、第１ろ過工程のろ過対象の希釈倍数を２容量倍～１５容量倍の範囲で増加させることができる。

[0028] 本開示の細胞外小胞の分離精製方法によれば、細胞外小胞を高い濃度まで濃縮することができる。

図面の簡単な説明

[0029] [図１]細胞外小胞の分離精製方法を実施する分離精製装置を示す図である。

[0030] [図２]図１に示す分離精製フローで使用する図１とは異なる実施形態の分離精製装置の部分拡大図である。

発明を実施するための形態

[0031] 本開示の細胞外小胞と不要物が含まれる溶液から前記細胞外小胞を分離精製する方法の一実施形態を説明する。

[0032] 前記一実施形態の分離精製方法は、前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液と吸着剤を接触させることで、前記吸着剤に前記細胞外小胞を除いた不要物を吸着保持させる吸着剤処理方法である。

[0033] 前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液は、細胞外小胞を含む培養上清液であるものが好ましく、細胞外小胞を含む間葉系幹細胞の培養上清液であるものがより好ましい。

[0034] 細胞外小胞を含む間葉系幹細胞としては、骨髓、血液、脂肪、臍帯、臍帯血、骨膜、軟骨膜など、および他の体細胞組織などの様々な起源に由来するものを用いることができる。その培養方法については、例えば特開２０１１－６７１７５号公報、特開２００３－５２３６０号公報に記載されている。

[0035] 吸着剤は、前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液中の細胞外小胞を除いた不要物を吸着保持できる多孔質粒状物であり、例としては公知の吸着剤やクロマトグラフィーの担体、ろ紙、膜、フィルター、中空糸、繊維、ナノフ

アイバーに加工できる高分子、無機材料の多孔質粒状物が挙げられる。

[0036] 前記多孔質粒状物は、多数の細孔を有しており、前記細孔内部が正に荷電されているものであり、前記細孔内部に前記細胞外小胞を除いた負に荷電されている不要物を吸着保持できるものである。

[0037] 前記多孔質粒状物は、例えばセルロース、アガロース、デンプン、アミロース、デキストラン、プルラン、グルコマンナンなどの多糖類、ポリアクリル酸またはその誘導体、ポリビニルアルコール、ナイロン、ポリスルホン、ポリアクリルニトリル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンなどの合成高分子、ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、ヒドロキシアパタイトなどを基材とするものである。

[0038] 前記多孔質粒状物は、前記不要物の種類などに応じて、平均細孔径が0.1～1000nmの範囲のものから選択して使用することができる。前記平均細孔径は、水銀圧入法や逆サイズ排除クロマトグラフィーにより測定することができる。

[0039] 前記多孔質粒状物は、前記不要物の種類などに応じて、平均粒子径が1～1000μmの範囲のものから選択して使用することができる。前記平均粒子径は、レーザー回析散乱法により測定することができる。

[0040] 前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液の培養上清液と吸着剤を接触させる方法としては、

前記吸着剤を充填したカラムに前記培養上清液を通液する方法と、

前記培養上清液が入った容器内に前記吸着剤を加えた後、攪拌混合する方法とから選ばれる方法、または前記各方法の一部を改変した方法を使用することができる。

[0041] 前記カラムを使用する接触方法は、複数本のカラムを使用することができ、前記複数本のカラムは内径と長さが異なるもの（すなわち、吸着剤の充填量が異なるもの）を組み合わせ使用することができる。

[0042] 前記容器を使用する接触方法は、複数の容器を使用することができ、前記複数の容器は内容積が異なるもの（すなわち、吸着剤の添加量が異なるもの

）を組み合わせ使用することができる。

[0043] 本開示の細胞外小胞と不要物が含まれる溶液から前記細胞外小胞を分離精製する方法は、前記吸着剤として異なる吸着性能を有している複数の吸着剤を使用して、前記複数の吸着剤による複数回の吸着剤処理方法を実施することもできる。

[0044] 異なる吸着性能を有している複数の吸着剤としては、多孔質粒状物の細孔径が異なるもの、多孔質粒状物の比表面積が異なるもの、多孔質粒状物の平均粒子径が異なるもの、多孔質粒状物を構成する基材の種類が異なるもの、多孔質粒状物の細孔内部表面に存在する官能基の種類や密度が異なるものから選ばれる1または複数のものを組み合わせ使用することができる。

[0045] 例えば、前記多孔質粒状物の比表面積が同一であっても、前記多孔質粒状物の細孔内部表面に存在する官能基の種類や密度によって細孔内部の正電荷の状態が異なるため、吸着されやすい負電荷を有する不要物の種類が異なってくる。

[0046] 複数回の吸着剤処理方法を実施するときは、1回ごとに吸着剤の種類や量を変更することもできる。

[0047] このように異なる吸着性能を有している複数の吸着剤を組み合わせ使用し、複数回実施することで、前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液中に含まれている細胞外小胞を除いた不要物の種類や量の変化に対する対応力（吸着保持力）が高められるため好ましい。

[0048] 吸着剤処理方法を実施した後、不要物を吸着保持した吸着剤をろ過などの方法で分離することで、目的とする吸着剤処理方法を実施した処理液を得ることができる。

[0049] 本開示の細胞外小胞と不要物が含まれる溶液から前記細胞外小胞を分離精製する方法の別実施形態を説明する。

[0050] 前記別実施形態の細胞外小胞の分離精製方法は、上記した吸着剤処理方法と膜分離方法を組み合わせる方法である。

[0051] 前記別実施形態の細胞外小胞の分離精製方法は、前記吸着剤処理方法と前

記膜分離方法による処理を交互に実施する方法、またはランダムに実施する方法のいずれの方法でもよいが、いずれの方法であっても、最初の処理は前記吸着剤処理方法であることが好ましい。

[0052] 前記膜分離方法に使用する膜の材質や形態および細孔径は特に制限を受けるものではなく、また膜分離方法としては、全量ろ過、タンジェンシャルフローろ過が適用可能である。

[0053] 例えば、膜の形態としては、平膜、中空糸膜、管状膜などが適用可能である。

[0054] 前記膜分離方法は、平膜形態の精密ろ過膜を注射器シリンダーにセットし、全量ろ過する膜分離方法や、中空糸膜の形態での限外ろ過膜を使用してろ過する膜分離方法であることが好ましい。

[0055] 前記膜分離方法で使用する中空糸型限外ろ過膜としては、内径が0.2 mm～1.4 mm、分画分子量が10万～100万のものが好ましい。

[0056] 前記中空糸型限外ろ過膜におけるろ過方法は、一方向または交互方向でのタンジェンシャルフローろ過であることが好ましい。

[0057] 次に図1に示す分離精製装置1を使用した製造フローによって、最初に吸着剤処理方法により処理して処理液を得たのち、前記処理液を膜分離方法により処理する分離精製方法の例を説明する。

[0058] 第1工程では、吸着剤による吸着剤処理方法により処理された処理液を第1タンク10に入れる。

[0059] 第1タンク10は、図1ではシリンダー形状であるが、これに限定されるものではなく、形状および容積は設置場所の状況や処理量に応じて決定することができる。

[0060] 第1タンク10は、目視で内部の液面が観察できる透明性を有しているものが好ましく、さらに第1タンク10の内壁面に液体が付着して残留することを防止するため、撥水性を有している材料からなるものが好ましい。

[0061] 第1タンク10は、一部または全部が、例えばポリアクリロニトリル、ポリアクリル酸エステルなどのアクリル系樹脂、ポリカーボネート、フッ素樹

脂からなるものが好ましい。

[0062] 第1タンク10には、第1タンク10内から最終的な濃縮液を取り出すための取り出しラインを設けることができる。

[0063] 図2に例示的に示すとおり、第1タンク10の液体出入口10aを含む部分の中空糸膜30との接続部11は、第1タンク10側から中空糸膜30側に径が小さくなるような円錐状の傾斜面11aと筒状の垂直面11bを有していることができる。

[0064] 図2では、接続部11は円錐状の傾斜面11aと筒状の垂直面11bを有しているが、円錐状の傾斜面11aを有していれば、筒状の垂直面11bはなくてもよい。

[0065] 図2に示す接続部11を有していると、吸着剤による吸着剤処理方法により処理された処理液またはその濃縮液が第1タンク10の底部側に滞留することが防止でき、細胞外小胞の回収率を高めることができるので好ましい。

[0066] 第1工程の前には、必要に応じて精密ろ過膜（精密ろ過膜モジュール）による前処理工程を実施することができるが、吸着剤処理方法を実施しているため省略してもよい。精密ろ過膜（精密ろ過膜モジュール）は、孔径 $0.1\mu\text{m}$ ～ $0.5\mu\text{m}$ のものが好ましい。

[0067] 前処理工程において、吸着剤による吸着剤処理方法により処理された処理液を精密ろ過膜（精密ろ過膜モジュール）によりろ過したろ過液（前処理液）は、第1タンク10に送ることができる。

[0068] 第2工程では、開閉バルブ（電磁バルブなど）46を開けた状態で、緩衝液タンク40内の緩衝液を緩衝液送液ライン45から第1タンク10内に供給して、吸着剤による吸着剤処理方法により処理された第1タンク10内の処理液を希釈することができる。

[0069] 第1タンク10内に吸着剤による吸着剤処理方法により処理された処理液の希釈液が入った状態では、第1タンク10の上部には前記希釈液が存在していない空間が残っている。

[0070] 緩衝液タンク40内の緩衝液としては、医療用または生化学用の緩衝液が

好ましく、例えばリン酸緩衝液（PBS）、トリス塩酸緩衝液、クエン酸ナトリウム緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液などを使用することができる。

[0071] 緩衝液タンク40に緩衝液を補充するときは、緩衝液補充ライン41から補充することができる。

[0072] なお、第1工程と第2工程の順序を逆にして、緩衝液タンク40内の緩衝液を緩衝液送液ライン45から第1タンク10内に供給した後、吸着剤による吸着剤処理方法により処理された処理液を第1タンク10内に入れることもできる。

[0073] また、第1工程と第2工程を一つの工程にして、別途設けた混合タンク内に吸着剤による吸着剤処理方法により処理された処理液と緩衝液を添加混合して希釈液を調製した後、前記希釈液を第1タンク10内に入れることもできる。

[0074] 第3工程では、図示していないポンプなどを作動させ、図示していないガス供給源からガスを第1タンク10内に供給し、第1タンク10内の吸着剤による吸着剤処理方法により処理された処理液を加圧することで、吸着剤による吸着剤処理方法により処理された処理液を中空糸膜30の内側に圧入してろ過する第1ろ過工程を実施することができる。

[0075] なお、本開示では、第1タンク10内の液体を中空糸膜30でろ過して第2タンク20に送る工程を全て第1ろ過工程という。

[0076] 加圧のためのガスは、三方弁61を切り替えて、圧力計51を備えたガス供給ライン52と第1タンクガス供給ライン53を通して送る。このとき、開閉バルブ46、第1ガス抜きライン55の開閉バルブ62は閉じておき、第2ガス抜きライン56の開閉バルブ63は開けておく。

[0077] 加圧のためのガスとしては、窒素ガス、アルゴン、ヘリウムなどの不活性ガス、二酸化炭素、HEPAフィルターなどでろ過された清浄な空気などから選ばれるガスを使用することができる。

[0078] ろ過した透過液は透過液タンク35に貯め、細胞外小胞を含む濃縮液（第

1濃縮液)を第2タンク20に送ることができる。

[0079] 第2タンク20内に第1濃縮液が入った状態では、第2タンク20の上部には第1濃縮液が存在していない空間が残っている。

[0080] 中空糸膜30は、内径が0.2mm~1.4mmであることが好ましく、内径が0.2mm~1.0mmであることがより好ましく、内径が0.4mm~1.0mmであることがさらに好ましい。

[0081] 中空糸膜30としては、分画分子量が10万~100万の限外濾過膜が好ましく、分画分子量が10万~80万の限外濾過膜がより好ましく、分画分子量が10万~60万の限外濾過膜がさらに好ましい。分画分子量は、リン酸緩衝液中の γ グロブリン(SIGMA製牛血清 γ グロブリン、分子量15万)100mg/Lの溶液を中空糸膜30にろ過圧力0.1MPaでクロスフロー透過(膜面速度:0.2m/s)させた場合の γ グロブリンの透過率%($(\text{透過液中の}\gamma\text{グロブリン濃度}/\text{溶液中の}\gamma\text{グロブリン濃度}(100\text{mg/L})\times 100)$)によって評価することができる。中空糸膜30は、 γ グロブリンの透過率が5%~95%であることが好ましく、10~80%がより好ましく、10~70%がさらに好ましい。

[0082] 中空糸膜30は、ポリエーテルスルホン膜などの疎水性膜でもよいし、セルロース系の親水性膜でもよいが、セルロース系の親水性膜が好ましい。セルロース系の親水性膜としては、酢酸セルロース膜、再生セルロース膜、セルロースプロピオネート膜、セルロースブチレート膜、セルロースベンゾエート膜などを挙げることができる。

[0083] 中空糸膜30としては、ダイセン・メンブレン・システムズ(株)のFUS5082(ポリエーテルスルホン膜;分画分子量50万、 γ グロブリン透過率70%)、ダイセン・メンブレン・システムズ(株)のFUC1582(酢酸セルロース膜;分画分子量15万、 γ グロブリン透過率10%)などを使用することができる。

[0084] 図1に示す例では、中空糸膜30は、第1タンク10の液体出入口10aと第2タンク20の接続部21にある液体出入口20aを接続して配置され

ている。

[0085] 中空糸膜30と第1タンク10の液体出入口10aとの接続は、例えば、第1タンク10の液体出入口10a側に固定された注射針のような細管に中空糸膜30の開口端部を嵌め込むことで行うことができる。中空糸膜30と第2タンク20の液体出入口20aとの接続も同様に実施することができる。

[0086] 透過液タンク35は、中空糸膜30においてろ過して得られた透過液を貯めるためのものである。図1では、透過液タンク35は小さく示しているが、中空糸膜30の大部分が中に入るような大きなタンクにすることもできる。

[0087] 図1では、中空糸膜30は1本が示されているが、複数本でもよく、例えば2～150本からなる中空糸膜束として使用することができる。

[0088] また、複数本の中空糸膜（中空糸膜束）30が、複数の液出入口を有するケースハウジング中に収容された中空糸膜モジュールを使用してもよい。前記中空糸膜束として使用するときには、一端部または両端部を接着剤で一体化することができる。

[0089] 前記中空糸膜モジュールを使用する場合には、中空糸膜モジュールの複数の液出入口と第1タンク10の液体出入口10aと第2タンク20の液体出入口20aを接続し、さらに中空糸膜モジュールの液透過出口と透過液タンク35を接続することができる。

[0090] 第3工程のろ過は、膜面速度が $0.3\text{ m/sec} \sim 2\text{ m/sec}$ の範囲でろ過することが好ましく、膜面速度が $0.5\text{ m/sec} \sim 1.5\text{ m/sec}$ の範囲でろ過することがより好ましい。膜面速度が 0.3 m/sec を下回ると精製効率が低下し、逆に 2 m/sec を上回ると、膜面速度を上昇させるための圧力レベルが高くなりすぎてしまい、ろ過時において細胞外小胞に対して加えられる剪断力も高くなりすぎる結果、細胞外小胞を変質させるおそれがある。

[0091] 前記膜面速度を前記範囲内に維持する方法は、中空糸膜30の入口圧力（

第1タンク10の液体出入口10a側)の圧力を0.01MPa~0.2MPaに調整することが好ましく、0.02MPa~0.15MPaに調整することがより好ましく、0.03MPa~0.12MPaに調整することがさらに好ましい。

[0092] 前記膜面速度を前記範囲内に維持する方法は、中空糸膜30の出口圧力(第2タンク20の液体出入口20a側)の圧力を0.03MPa以下に調整することが好ましく、0.01MPa以下に調整することがより好ましく、0MPaに調整することがさらに好ましい。

[0093] 第4工程では、図示していないポンプなどを作動させ、図示していないガス供給源からガスを第2タンク20内に供給し、第2タンク20内の細胞外小胞を含む液体(第1濃縮液)を加圧して、細胞外小胞を含む液体を中空糸膜30の内側に通してろ過する第2ろ過工程を実施することができる。

[0094] なお、本開示では、第2タンク20内の液体を中空糸膜30でろ過して第1タンク10に送る工程を全て第2ろ過工程という。

[0095] ろ過した透過液は透過液タンク35に貯め、細胞外小胞を含む濃縮液(第2濃縮液)は第1タンク10に送る。

[0096] 第2タンク20は、図1ではシリンダー形状であるが、これに限定されるものではなく、形状および容積は設置場所の状況や処理量に応じて決定することができる。

[0097] 第2タンク20は、目視で内部の液面が観察できる透明性を有しているものが好ましく、さらに第2タンク20の内壁面に液体が付着して残留することを防止するため、撥水性を有しているものが好ましい。

[0098] 第2タンク20は、一部または全部が、例えばポリアクリロニトリル、ポリアクリル酸エステルなどのアクリル系樹脂、ポリカーボネート、フッ素樹脂からなるものが好ましい。

[0099] 第1タンク10と第2タンク20は、同一形状で、同一容積であることが好ましい。第1タンク10と第2タンク20は、それぞれが間隔をおいて、同じ高さ位置になるように配置されることができる。

- [0100] 加圧のためのガスは、三方弁 6 1 を切り替えて、ガス供給ライン 5 2 と第 2 タンクガス供給ライン 5 4 を通して送る。このとき、第 2 ガス抜きライン 5 6 の開閉バルブ 6 3、開閉バルブ 4 6 は閉じておき、第 1 ガス抜きライン 5 5 の開閉バルブ 6 2 は開けておく。
- [0101] 加圧のためのガスとしては、窒素ガス、アルゴン、ヘリウムなどの不活性ガス、二酸化炭素、H E P A フィルターなどでろ過された清浄な空気などから選ばれるガスを使用することができる。
- [0102] 第 4 工程における膜面速度は第 3 工程の場合の膜面速度と同じ範囲にすることが好ましい。
- [0103] 前記膜面速度を前記範囲内に維持するために、第 4 工程における中空糸膜 3 0 の入口圧力（第 2 タンク 2 0 の液体出入口 2 0 a 側）は、0. 0 1 M P a ~ 0. 2 M P a に調整することが好ましく、0. 0 2 M P a ~ 0. 1 5 M P a に調整することがより好ましく、0. 0 3 M P a ~ 0. 1 2 M P a に調整することがさらに好ましい。
- [0104] 前記膜面速度を前記範囲内に維持するために、第 4 工程における中空糸膜 3 0 の出口圧力（第 1 タンク 1 0 の液体出入口 1 0 a 側）の圧力は、0. 0 3 M P a 以下に調整することが好ましく、0. 0 1 M P a 以下に調整することがより好ましく、0 M P a に調整することがさらに好ましい。
- [0105] 第 3 工程と第 4 工程は、ガス供給源からガス供給ライン 5 2 を通してガスを連続的に供給しながら三方弁 6 1 を切り替えることで、連続的に実施することができる。
- [0106] その後、第 1 ろ過工程（第 3 工程）および第 2 ろ過工程（第 4 工程）を複数回繰り返すことで細胞外小胞を含む液体中の細胞外小胞を分離精製することができる。
- [0107] 第 1 ろ過工程および第 2 ろ過工程を複数回繰り返すときは、繰り返し回数が増加するにつれて、第 1 ろ過工程の第 1 タンク 1 0 におけるろ過対象の緩衝液による希釈倍数（即ち、第 1 ろ過工程のろ過対象の希釈倍数）を増加させることが好ましく、例えば、2 容量倍 ~ 1 5 容量倍の範囲で増加させるこ

とができ、好ましくは2容量倍～10容量倍の範囲で増加させることができる。

[0108] このように第1ろ過工程と第2ろ過工程を交互に実施する交互タンジェンシャルフローろ過により、細胞外小胞の濃度が高められた濃縮液を得ることができる。

[0109] 本開示の細胞外小胞の分離精製方法は、出発原料となる細胞外小胞と不要物が含まれる溶液が細胞外小胞を含む間葉系幹細胞の培養上清液であるとき、前記培養上清液に含まれているタンパク質量を1/5以下量、好ましくは1/10以下量に減少させるように実施することが好ましい。

[0110] 本開示の細胞外小胞の分離精製方法は、細胞外小胞と不要物が含まれる溶液が細胞外小胞を含む間葉系幹細胞の培養上清液であるとき、前記培養上清液に含まれている細胞外小胞の量を基準とするとき、第1ろ過工程と第2ろ過工程を交互に繰り返して実施することで得られる濃縮液に含まれている細胞外小胞の量 (Cytometry Research 26 (1) : 1～6, 2016, 「Exosomeによるリキッドバイオプシーの新展開」, 吉岡祐亮, 落谷孝広に記載のExoScreen法を用いて測定される量) が、濃縮倍率が5倍以上かつ回収率が50%以上になるように実施することが好ましい。

[0111] 本明細書に開示された各々の態様は、本明細書に開示された他のいかなる特徴とも組み合わせることができる。

[0112] 各実施形態における各構成およびそれらの組み合わせなどは一例であって、本発明の開示の主旨から逸脱しない範囲内で、適宜、構成の付加、省略、置換およびその他の変更が可能である。本開示は、実施形態によって限定されることはなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

[0113] 実施例1 (吸着剤処理方法の実施例)

＜細胞外小胞を含む間葉系幹細胞の培養上清液の調製＞

細胞外小胞と不要物が含まれる溶液として、下記の方法で調製した細胞外

小胞を含む間葉系幹細胞の培養上清液を使用した。

[0114] ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞は 培地としてUltra ExoMCulture Medium for Extracellular Vesicles (株式会社サンテジャ、FK-K0204024)を用いて培養した。

[0115] 培地を入れた15cmディッシュを用いて培養を行い、細胞が培養容器接着面の約80%を覆った状態でフェノールレッド不含のUltra ExoMCulture Mediumに交換して、48時間培養を行った。

[0116] その後、培養上清液を遠心力2000×gで10分間、4℃で遠心して細胞破片を取り除き、培養上清液を調製した。前記培養上清液中のタンパク質濃度、CD63陽性細胞外小胞をそれぞれBradford法、ExoScreen法によって定量分析したところ、タンパク質濃度1.1mg/mL、ExoScreenシグナル強度6,092であった。

[0117] <培養上清液からの細胞外小胞の分離・精製>

上記培養上清液25mLに対して、50mM Tris-HCl (pH7.2) 溶液で平衡化した吸着剤担体CaptorCore700 (17548101, Cytiva社)を2.5mL添加し、ローテーターを用いて15分間室温(約20℃)にて10r/minの回転速度で転倒混和した。

[0118] その後、担体-細胞上清混合液からステリカップ0.22umフィルトレーションユニット(S2GPU11RE, Merck Millipore社)を用いて、吸着剤を除去した。得られた吸着剤処理した培養上清液中のタンパク質濃度、細胞外小胞を定量分析したところ、タンパク質濃度0.4mg/mL、ExoScreenシグナル強度6,075であった。

[0119] 実施例2 (吸着剤処理方法と膜分離法の実施)

実施例1における吸着剤処理方法により処理して得られた処理液を使用し、図1に示す分離精製装置1を使用して膜分離法を実施した。分離精製は、室温(約20℃)で実施した。

[0120] 図1に示す分離精製装置1を以下の仕様に従って使用した。

- ・ 第 1 タンク 1 0 および第 2 タンク 2 0

材質：アクリル酸エステル樹脂

サイズ：長さ 2 5 c m、内径 0. 2 5 c m、容量 1 2 0 c m³

- ・ 緩衝液タンク 4 0

容量：1. 6 L

- ・ 中空糸膜 3 0

内径 0. 8 m m、外径 1. 3 m m、長さ 3 0 c m、膜面積 7. 5 c m²、分画分子量 3 0 万の酢酸セルロース（C A）製中空糸膜（品名：試作品 F U C 3 0 8 1 e x p.、ダイセン・メンブレン・システムズ株式会社製）

[0121] <吸着剤処理方法による処理液から細胞外小胞を分離精製する方法の実施>

上記に仕様を示した図 1 に示す分離精製装置を使用して、以下の工程で細胞外小胞を分離精製した。

[0122] （１）吸着剤処理方法による処理液を第 1 タンク 1 0 内に入れた。

[0123] （２）第 1 タンク 1 0 の上部空間に窒素ガスを圧力 0. 0 5 M P a で供給し、中空糸膜 3 0 の内側に上記の吸着剤処理方法による処理液の希釈液を通過させつつタンジェンシャルフローろ過を行った。

[0124] この際、第 2 タンク 2 0 は、開閉バルブ 5 6 を開にして大気開放されており、圧力はゼロであった。また、中空糸膜 3 0 の内側を流れる膜面速すなわち膜面速度は 1. 0 m / s であった。膜面速度は、第 2 タンク 2 0 での濃縮液量の増加速度から算出した。

[0125] 透過液は透過液タンク 3 5 に貯め、濃縮液（第 1 濃縮液）は第 2 タンク 2 0 内に移行させた（第 1 ろ過工程）。

[0126] （３）第 1 タンク 1 0 の吸着剤処理方法による処理液の希釈液が中空糸膜 3 0 の内側を通過してろ過され、大部分が第 2 タンク 2 0 に移行したとき、三方弁 6 1 の切り替えによって、窒素ガスを第 2 タンク 2 0 に供給し、同時に開閉バルブ 6 2 の開放によって第 1 タンク 1 0 の圧力を開放した。

[0127] （４）この操作によって、第 1 濃縮液を第 2 タンク 2 0 から第 1 タンク 1

0に移行させながらろ過を行い、透過液は透過液タンク35に貯め、濃縮液（第2濃縮液）は第1タンク10内に移行させた（第2ろ過工程）。

[0128] 第2タンク20内の第1濃縮液の大部分が第1タンク10に移行したとき、三方弁61の切り替えによって、再び第1タンク10内の第2濃縮液を中空糸膜30によりろ過して、濃縮液を第2タンク20内に移行させた（第1ろ過工程）。

[0129] 同様の第1ろ過工程と第2ろ過工程を複数回繰り返す交互タンジェンシャルフローろ過を行った。

[0130] 交互タンジェンシャルフローろ過は、液量が1.5mLになるまで行い、エクソソーム濃度が高められた濃縮液（最終濃縮液）を得た。

[0131] 最終濃縮液のエクソソームをExoScreen法によって定量評価したところ、そのシグナル強度は92,500であった。

[0132] 初期の培養上清液25.0mL中のエクソソームのシグナル強度は6,075であったから、分画分子量30万（相当膜孔径10～20nm）の中空糸膜を用いて分離精製することで、最終濃縮液1.5mL中のエクソソームの濃縮倍率は約15倍となった。

[0133] ExoScreenシグナル強度と溶液量から算出された細胞外小胞の回収率は91%であった。また、残存タンパク質濃度は約0.2mg/mLであり、残存タンパク質は、培養上清液（タンパク質濃度1.1mg/mL）の約18%であった。

[0134] 比較例1

実施例1で調製した細胞外小胞を含む間葉系幹細胞の培養上清液を使用し、実施例2の吸着剤処理方法を適用することなく、直接、実施例2の膜分離法を適用して、最終濃縮液1.2mLを得た。

[0135] 残存タンパク質濃度は、0.7mg/mLであり、実施例に比べて3倍以上高かった。交互タンジェンシャルフローろ過過程において、経時的にろ過液量をサンプリングし、その質量変化からろ過量を算出した。

[0136] 比較例1では累積透過液量が $2.5\text{ cm}^3/\text{cm}^2$ に達するまでのろ過時間と

して45分を要した。これに対して実施例2では、累積透過液量が $2.5\text{ cm}^3/\text{cm}^2$ に達するまでのろ過時間は22分と半分以下に短縮されていた。

産業上の利用可能性

[0137] 本開示の分離精製方法は、培養液から細胞外小胞を分離精製するとき利用することができる。

符号の説明

- [0138]
- 1 分離精製装置
 - 10 第1タンク
 - 20 第2タンク
 - 30 中空糸膜
 - 35 透過液タンク
 - 40 緩衝液タンク

請求の範囲

- [請求項1] 細胞外小胞と不要物が含まれる溶液から前記細胞外小胞を分離精製する方法であって、
- 前記分離精製方法が、前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液と吸着剤を接触させることで、前記吸着剤に前記細胞外小胞を除いた不要物を吸着保持させる吸着剤処理方法であり、
- 前記吸着剤が、細孔内部が正に荷電されている多孔質粒状物であり、前記細孔内部に前記細胞外小胞を除いた負に荷電されている不要物を吸着保持できるものである、細胞外小胞の分離精製方法。
- [請求項2] 前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液が、細胞外小胞を含む培養上清液である請求項1記載の細胞外小胞の分離精製方法。
- [請求項3] 前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液が、細胞外小胞を含む間葉系幹細胞の培養上清液である請求項1記載の細胞外小胞の分離精製方法。
- [請求項4] 前記吸着剤処理方法が、前記吸着剤を充填したカラムに前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液を通液する方法、前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液が入った容器内に前記吸着剤を加えた後、攪拌混合する方法から選ばれる方法である、請求項1～3のいずれか1項記載の分離精製方法。
- [請求項5] 前記吸着剤として異なる吸着性能を有している複数の吸着剤を使用して、前記複数の吸着剤による複数回の吸着剤処理方法を実施する、請求項1～4のいずれか1項記載の細胞外小胞の分離精製方法。
- [請求項6] 前記異なる吸着性能を有している複数の吸着剤が、多孔質粒状物の細孔径が異なるもの、多孔質粒状物の比表面積が異なるもの、多孔質粒状物の平均粒子径が異なるもの、多孔質粒状物を構成する基材の種類が異なるもの、多孔質粒状物の細孔内部表面に存在する官能基の種類や密度が異なるものから選ばれる1または複数のものである、請求項5記載の細胞外小胞の分離精製方法。

- [請求項7] 細胞外小胞と不要物が含まれる溶液から前記細胞外小胞を分離精製する方法であって、
- 前記分離精製方法が、請求項1～6のいずれか1項記載の吸着剤処理方法と、膜分離方法を組み合わせる方法である、細胞外小胞の分離精製方法。
- [請求項8] 前記分離精製方法が、前記吸着剤処理方法と前記膜分離方法による処理を交互に実施する方法、またはランダムに実施する方法であり、最初の処理が前記吸着剤処理方法である、請求項7記載の細胞外小胞の分離精製方法。
- [請求項9] 前記膜分離方法が、中空糸膜を使用してろ過する膜分離方法である、請求項7または8記載の細胞外小胞の分離精製方法。
- [請求項10] 前記膜分離方法が、中空糸膜を使用してろ過する膜分離方法であり、
- 前記膜分離方法で使用する中空糸膜が、内径が0.2 mm～1.4 mm、分画分子量が10万～100万のものであり、
- 前記膜分離方法におけるろ過方法が、一方向または交互方向のタンジェンシャルフローろ過である、請求項7～9のいずれか1項記載の細胞外小胞の分離精製方法。
- [請求項11] 前記膜分離方法が、中空糸膜を使用してろ過する膜分離方法であり、
- 前記膜分離法で使用する中空糸膜が、内径が0.2 mm～1.4 mm、分画分子量が10万～100万のものであり、
- 前記膜分離方法におけるろ過方法が、
- 前記吸着剤処理方法による処理液を前記中空糸膜の一端側の第1開口部から圧入してろ過し、透過液と第1濃縮液に分離する第1ろ過工程と、
- 前記第1濃縮液を前記中空糸膜の他端側の第2開口部から圧入してろ過し、透過液と第2濃縮液に分離する第2ろ過工程を有しており、

前記第１ろ過工程と前記第２ろ過工程を交互に複数回実施する、一方向または交互方向のタンジェンシャルフローろ過により前記細胞外小胞の濃度が高められた濃縮液を得る方法であり、

前記第１ろ過工程と前記第２ろ過工程における膜面速度が $0.3\text{ m/sec} \sim 2\text{ m/sec}$ である、請求項７～９のいずれか１項記載の細胞外小胞の分離精製方法。

[請求項12] 前記膜分離方法におけるろ過方法が、前記吸着剤処理方法による処理液を孔径 $0.1\text{ }\mu\text{m} \sim 0.5\text{ }\mu\text{m}$ の精密ろ過膜によりろ過した後、前記精密ろ過膜のろ過液を使用し、前記第１ろ過工程と前記第２ろ過工程を交互に複数回実施する工程である、請求項１１記載の細胞外小胞の分離精製方法。

[請求項13] 前記第１ろ過工程を実施するとき、前記吸着剤処理方法による処理液または前記第２ろ過工程で得られた第２濃縮液に対して緩衝液を加えて希釈した後、前記第１ろ過工程を実施する、請求項１１記載の細胞外小胞の分離精製方法。

[請求項14] 前記第１ろ過工程と前記第２ろ過工程が、窒素ガス、不活性ガス、二酸化炭素、ＨＥＰＡフィルターでろ過された空気から選ばれるガスを導入することで圧入して実施されるものである、請求項１１記載の細胞外小胞の分離精製方法。

[請求項15] 出発原料となる前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液に含まれているタンパク質量を $1/5$ 以下量に減少させる、請求項１１記載の細胞外小胞の分離精製方法。

[請求項16] 前記細胞外小胞と不要物が含まれる溶液に含まれている細胞外小胞の量を基準とすると、前記濃縮液に含まれている細胞外小胞のエクソスクリーン（ExoScreen）法を用いて測定される量が、濃縮倍率が５倍以上かつ回収率が５０％以上である、請求項１１記載の細胞外小胞の分離精製方法。

[請求項17] 前記中空糸膜が、複数の液出入口を有するケースハウジング内に複

数本の中空糸膜が収容されている中空糸膜モジュールである、請求項 1 1 記載の細胞外小胞の分離精製方法。

[請求項18] 前記第 1 ろ過工程と前記第 2 ろ過工程を交互に実施するとき、前記実施回数が増加するにつれて、第 1 ろ過工程のろ過対象の希釈倍数を増加させる、請求項 1 1 記載の細胞外小胞の分離精製方法。

[請求項19] 前記第 1 ろ過工程と前記第 2 ろ過工程を交互に実施するとき、前記実施回数が増加するにつれて、第 1 ろ過工程のろ過対象の希釈倍数を 2 容量倍～1 5 容量倍の範囲で増加させる、請求項 1 1 記載の細胞外小胞の分離精製方法。