



機器分析セミナー 超遠心機の安全な取扱いと目的に合った選び方

於： 大阪大学大学院 医学系研究科附属共同研究実習センター 様

ベックマン・コールター株式会社
ライフサイエンス 遠心機事業本部
シニアアプリケーションスペシャリスト

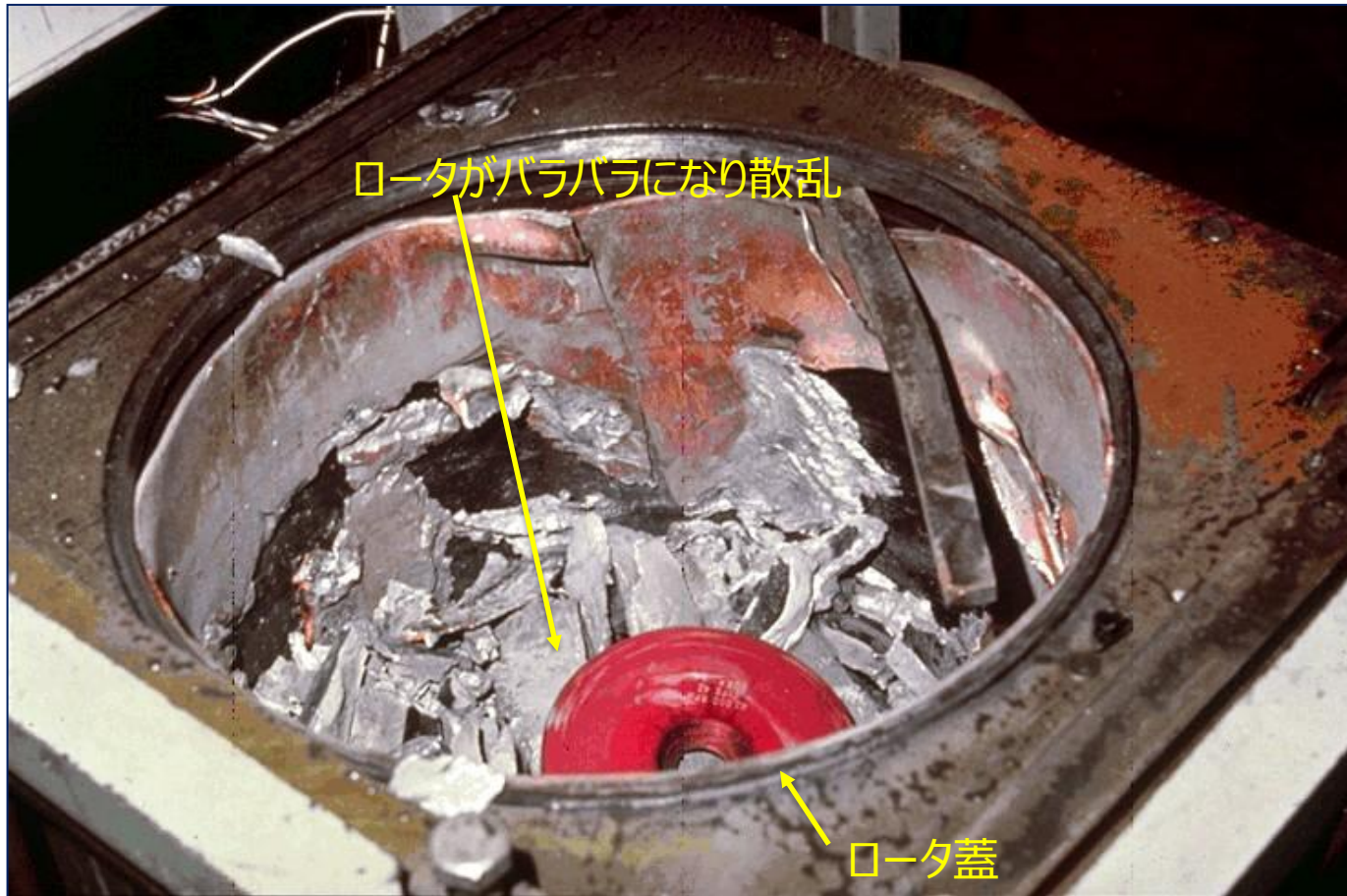
村山 宗司



超遠心機ならびにロータの安全な取り扱いポイント



ロータ転倒事故例





セミナーの目的

- ベックマン遠心機を安全に使用していただくため
- ベックマン遠心機を永く使用していただくため
- お客様の予算を無駄に使わないため



超遠心機の取り扱い

- 超遠心機の操作は、簡易マニュアルを参照し、ご利用ください。

Optima XPN-100 クイック操作ガイド



- ① ホームページボタン
どの画面からこのボタンを押せばホームに戻ります
- ② メニューボタン
オプション設定、参考資料閲覧などに行くためのボタンです
- ③ ヘルプ機能ボタン
- ④ スピード設定ボタン
- ⑤ 時間設定ボタン
- ⑥ 温度設定ボタン
- ⑦ スタートボタン
- ⑧ バキュームボタン
- ⑨ 加速設定ボタン
- ⑩ 減速設定ボタン
- ⑪ 停止ボタン



使用方法は共同研究実習センターのポスターを確認する

SW 41Ti スウィングローター並びに肉薄オーブントップチューブの使用法

●バケットにサンプルチューブをセットするまで

1. 使用前にすべてのバケットおよびローターを確認する

- (1) バケットのフック部分、ローターヘッドのハンガー部、全体に破損や変形がないか
- (2) バケット内にアダプター、スペーサ、チューブの残存がないか
- (3) バケット内にサンプルリーク等の汚れがないか

※ 異常がある場合は絶対に使用せずに共同研担当者まで連絡する



2. バケットの状態を確認する

- (1) バケットキャップがスムーズに締まるか
 - ・バケットキャップのねじ部分が歪んだり壊れていないか
 - ・バケットキャップのねじ部分に汚れがないか
- (2) バケット内の黒色のガスケットが良好な状態か
 - ・ガスケットにヒビや傷などがみられないか
 - ・ガスケットに光沢があるか

※ バケットキャップのねじ部分にはスピコート、ガスケットにはバキュームグリースを塗布してから使用する



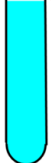
3. 肉薄オーブントップチューブの容量・バランスを確認する

- (1) サンプルをチューブトップから3 mmの位置まで正確に注入されているか

※ 3mmの位置までサンプルが満たない場合、サンプルを溶解した同一の溶媒もしくはミネラルオイルを重層しメスアップする

※ 奇数本数でサンプルをセットする場合、サンプルの対角の位置にセットするリファレンスは、サンプルと同一の密度の溶媒で作成しバランスをとる

肉薄オーブントップチューブ
↑上から2~3 mm



4. 専用工具を使ってバケットキャップのねじをしっかりと閉める

- (1) 6本全てのバケットにバケットキャップをセットしたか
- (2) 専用工具（ヒンジピンツール）を使ってしっかりと閉めたか

※ 必ず6本全てのバケットにバケットキャップを装着する



ヒンジピンツール

●バケットにサンプルチューブをセットしてから

5. バケットをローターにセットする

- (1) ローターヘッドの決められた番号のホールに、同じ番号のバケットを慎重にセットしたか
- (2) バケットの首部分を指でつまんでから、左右に軽く水平方向に移動させて、バケットがスムーズに動くか

※ サンプルチューブが入ってなくても必ず6本全てのバケットをローターにセットする



6. ローターを超速心機にセットする

- (1) ローターピンと超速心機のスピンドルピンの位置を確認したか
- (2) これらが接触しないように十字の位置となるように予め位置決めをしたか
- (3) バケットに手が触れないように両手で慎重にローターヘッドを持ち上げているか
- (4) 超速心機のスピンドルの真上から静かにローターを下ろし設置できたか

ローターピンの位置



スピンドルの位置



7. 設置後のローターの動作を確認する

- (1) 軽くローターを手で回し、バケットが均等でスムーズな動きをしているか

※ スピンドルに負荷がかからないように、絶対に強くローターを回転させない





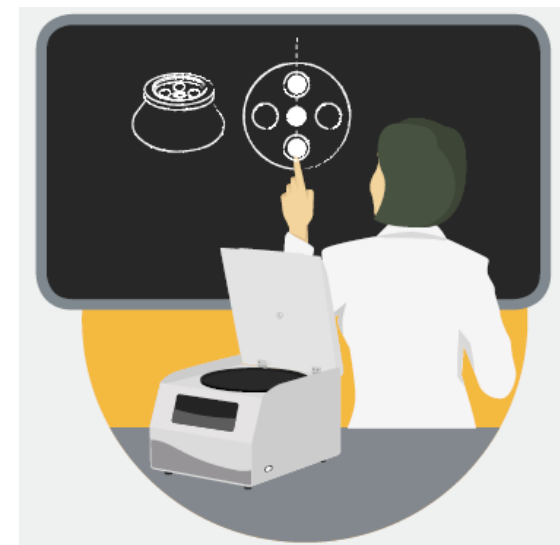
正しいロータの取り扱いとは

1. サンプルバランスを正しくとる
2. サンプル密度を考慮して使用する
3. チューブ、アダプタ、ツールを正しく使う
4. ロータ本体、フタ、バケットを正しくセットする
5. 適切にメンテナンスされているロータを使う



1. サンプルバランスを正しくとる

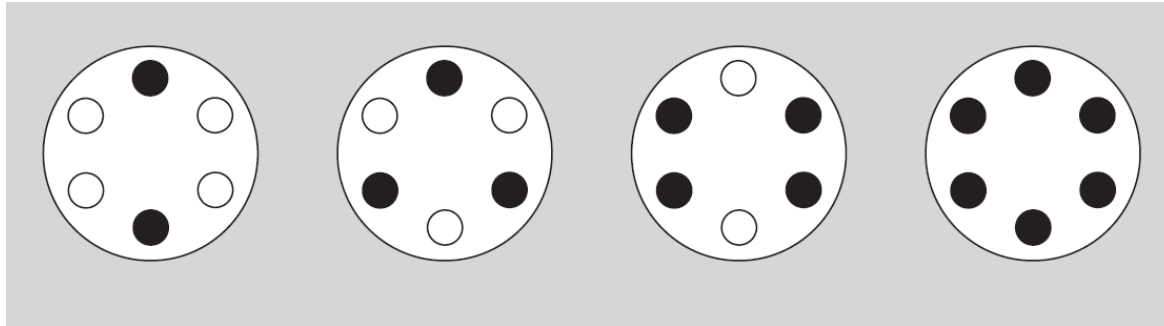
- ロータの対角位置のサンプルは、
① 同じ比重でかつ、② 少なくとも目分量で同じ量
であることを確認する
(設置施設の基準がある場合はそれに従う)
- ロータの対角位置のバランス許容量を確認する
- チューブやボトルの種類毎に異なる最大ならびに最小処理容量
を確認する





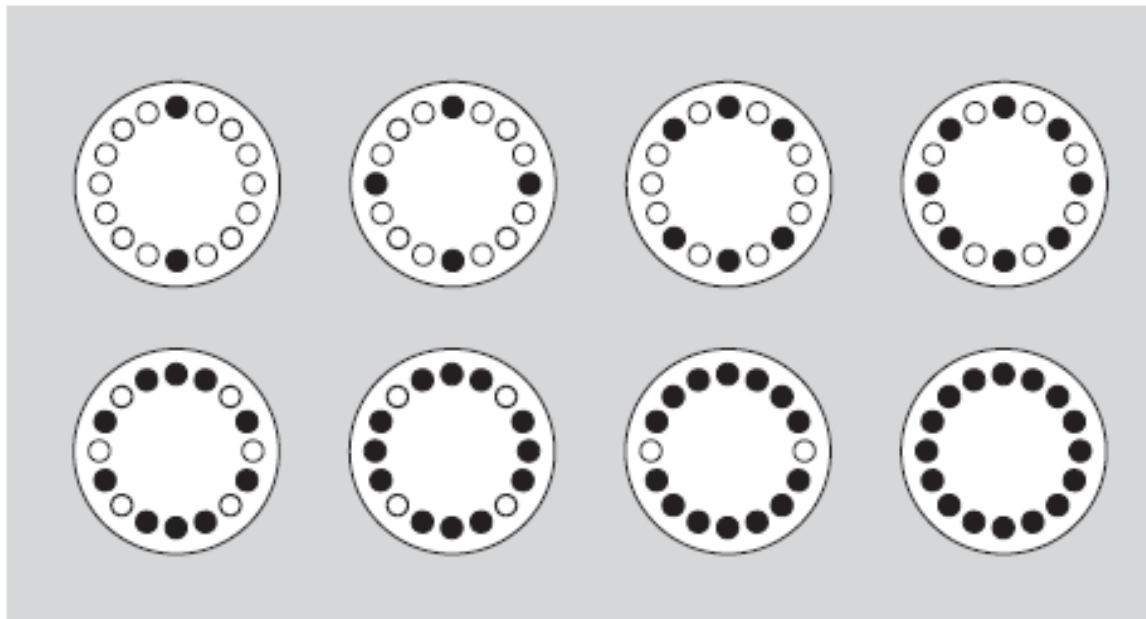
1. サンプルバランスを正しくとる (ロータ対角位置)

6本がけロータのサンプル位置



● サンプル

12本がけロータのサンプル位置





1. サンプルバランスを正しくとる（チューブの液量）

チューブの液量とシールについて

チューブまたはボトル	水平ロータ	固定角ロータ	垂直/近垂直ロータ
ポリアロマー（PA）			
肉薄（オープントップ）チューブ	トップから2～3mmまで、キャップ不要	フル容量、キャップ必要	-
肉厚（オープントップ）チューブ	フル容量の1/2以上、キャップ不要	フル容量の1/2以上、キャップなし、キャップありどちらも可能	-
クイックシールチューブ	フル容量、熱シール必要	フル容量、熱シール必要	フル容量、熱シール必要
オブチシールチューブ	フル容量、プラグでシール必要	フル容量、プラグでシール必要	フル容量、プラグでシール必要
コニカル・クイックシールチューブ	フル容量、熱シール必要	-	-
コニカル・オープントップチューブ	トップから2～3mmまで、キャップ不要	-	-
ウルトラクリアチューブ（UC）			
肉薄（オープントップ）チューブ	トップから2～3mmまで、キャップ不要	フル容量、キャップ必要	-
クイックシールチューブ	フル容量、熱シール必要	フル容量、熱シール必要	フル容量、熱シール必要
ポリカーボネイト（PC）			
肉厚（オープントップ）チューブ	フル容量の1/2以上、キャップ不要	フル容量の1/2以上、キャップなし、キャップありどちらも可能	-
ボトル	-	フル容量の約1/2以上（詳細はロータマニュアルを参照）、キャップまたはキャップアッセンブリでシール必要	-
ポリプロピレン（PP）			



1. サンプルバランスを正しくとる（チューブの液量）

肉薄のオープントップチューブ（PAチューブ、UCチューブ）

スウィングロータの場合

- ・上から2～3mmまで満たします
- ・チューブキャップは必要ありません

固定角ロータの場合

- ・フル容量を満たします
- ・チューブキャップが**必要**です



チューブキャップ

肉厚のオープントップチューブ（肉厚PA、肉厚PCチューブ）

スウィングロータの場合

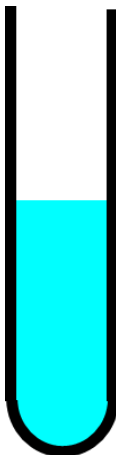
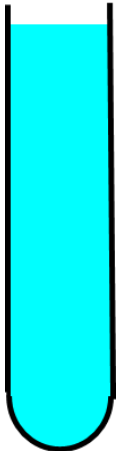
- ・半分量以上で使用可能です
- ・チューブキャップは必要ありません

固定角ロータの場合

- ・半分量以上で使用可能です
- ・チューブキャップは**なくても使用可能**

※ただし、最大液量が変わります

【詳細はロータマニュアルを参照】



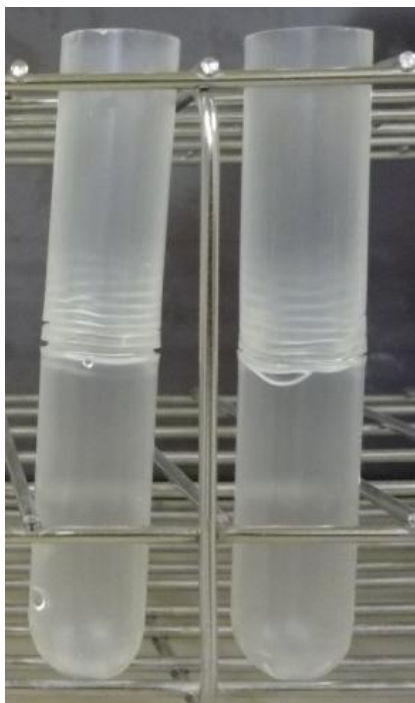


1. サンプルバランスを正しくとる（チューブの液量）

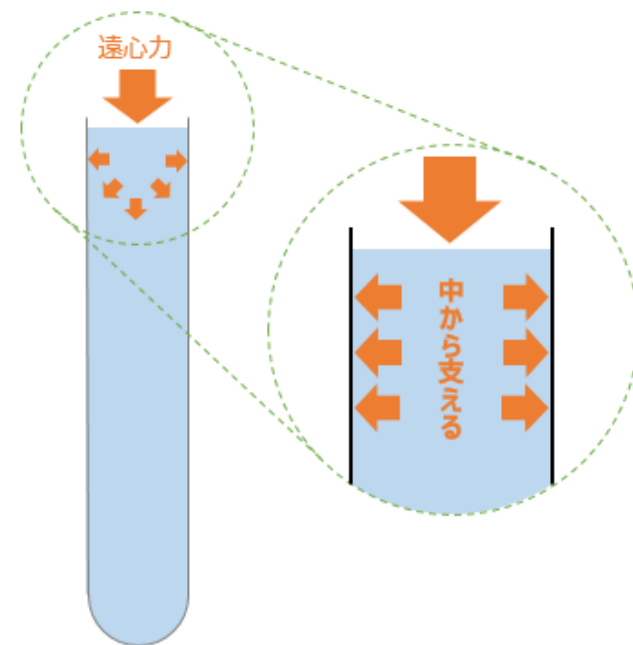
肉薄のオープントップチューブ（PAチューブ、UCチューブ）

スウィングロータの場合、上から2～3mmまで満たします

誤ってスウィングロータで少ない液量で遠心した場合



チューブ中央が
蛇腹状になり破損





2. サンプル密度を考慮して使用する

- フロア型超遠心機 (Optima) 用ロータ
 - 固定角ロータ / スウィングロータ 1.2 g/mL
 - 垂直 / 近垂直ロータ 1.7 g/mL
- 卓上型超遠心機 (Optima) 用ロータ
 - MLS-50, MLA-50, MLA-55 1.2 g/mL
 - 上記以外のロータ 1.7 g/mL

サンプル密度がロータの許容密度を超えていた場合、下式で許容回転数を算出する

$$\text{ロータの最高回転数} \times \sqrt{\frac{1.2 \text{ g/mL}}{\rho}}$$

$$\text{ロータの最高回転数} \times \sqrt{\frac{1.7 \text{ g/mL}}{\rho}}$$

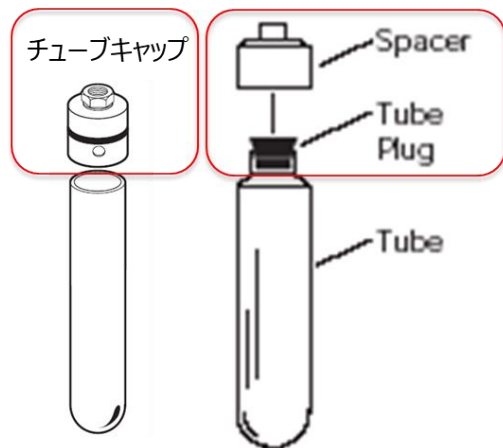
ρ : サンプル密度(g /mL)



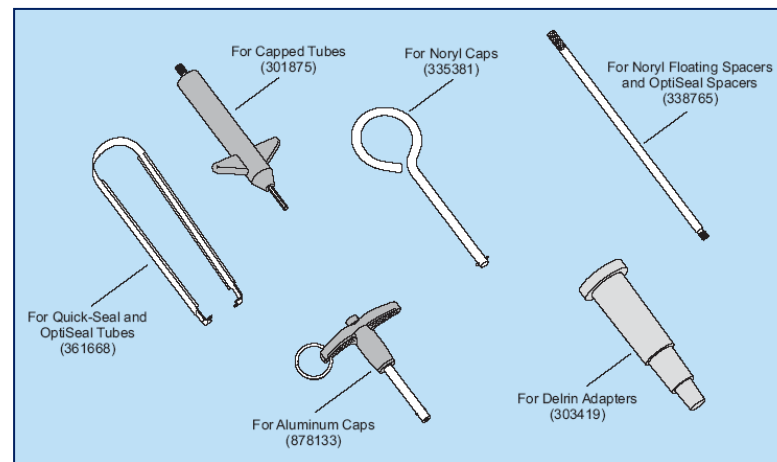
3. チューブ、アダプタ、ツールを正しく使う（使用前確認）

ロータを使用する前に、アクセサリ、工具類がそろっているかを必ず確認する

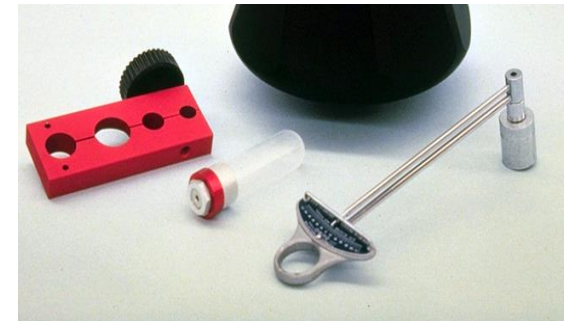
チューブアクセサリ



引き抜き工具



チューブキャップ締め込み工具





4. ロータ本体、フタ、バケットを正しくセットする（使用前確認）

ロータを使用する前に、ロータ、バケット、部品に破損がないかを必ず確認する



ロータ

バケットフックが破損していないか

バケット

- ・サンプル漏れがないか
- ・アダプタ、チューブが残っていないか
- ・ガスケットが破損していないか



4. ロータ本体、フタ、バケットを正しくセットする（使用前確認）

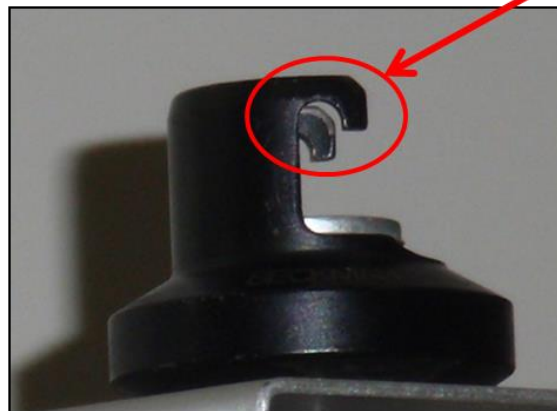
ロータを使用する前に、ロータ、バケット、部品に破損がないかを必ず確認する

SW 41 Ti など

水平になっているか？



摩耗、曲りはないか？





4. ロータ本体、フタ、バケットを正しくセットする 専用工具を使ってバケットキャップのねじをしっかりと閉める

(SW 41の場合)

全てのバケットにバケットキャップをセットし、
専用工具（ヒンジピンツール）を使って、しっかりと閉める



ヒンジピンツール



4. ロータ本体、フタ、バケットを正しくセットする

バケットをロータにセットする

- ・ ロータヘッドに決められた番号のホールに、同じ番号のバケットを慎重にセットします
- ・ バケットが正しくセットされたかを確認する



サンプルチューブが入ってなくても
すべてのバケットをセットする



ロータにバケットが正しくセットされたか
確認する

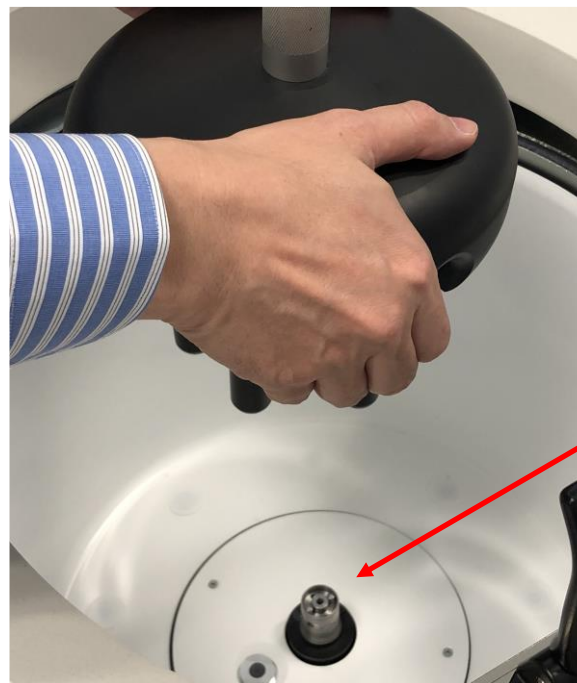


4. ロータ本体、フタ、バケットを正しくセットする

ロータを超遠心機にセットする

- ・ ロータピンと超遠心機のスピンドルピンの位置を確認する
- ・ 両手で慎重にロータヘッドを持ち上げ、超遠心機のスピンドルの真上から静かにロータを下ろし 設置する

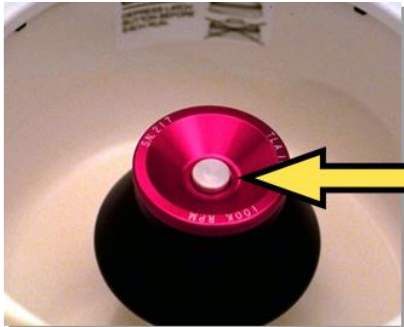
ロータピンの位置



スピンドル



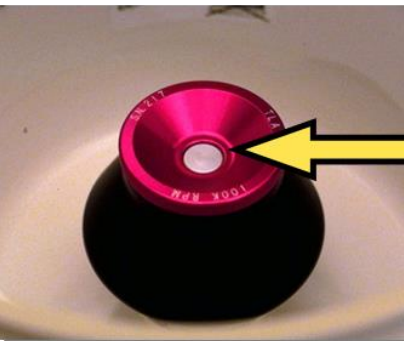
4. ロータ本体、フタ、バケットを正しくセットする 卓上型超遠心機への**ロックボタン式ロータ**のセッティング



蓋を閉めてからロータを
スピンドルに載せる



ボタンを押してロータを
スピンドルに固定する



固定されていることを
確認する



Optima MAX-XP



ロックボタンがないMLシリーズは
自動ロック方式です



遠心を開始したら、

- いままでの注意点を守ることで、安心して遠心することができます。
- なにか起きるとしたら3,000~5,000 rpmです。
- このため、**最高回転数に達するまでは遠心機の前においでください。**

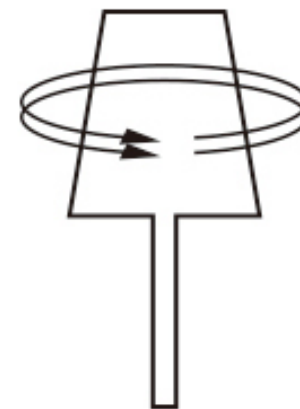
ロータの歳差運動



1. 遠心開始
安定



2. クリティカルポイント
歳差運動が始まる



3. 定常遠心
安定



5. 適切にメンテナンスされているロータを使う

ロータが汚染された時の滅菌方法

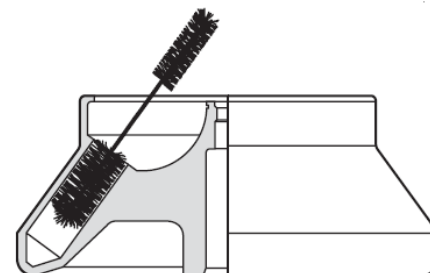
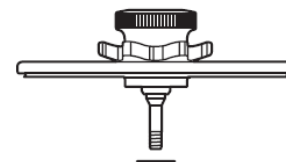
- オートクレーブ
ロータの金属部は 121℃ 1 時間以内
※ オートクレーブをかける前にO-リングは外し、
ロータと分けてオートクレーブをかけてください
- コールドメソッド
70% エタノール、6% 過酸化水素水の噴霧
※ 次亜塩素酸ナトリウムのような漂白剤は、
ロータ塗装面を剥がすので使用を避けます



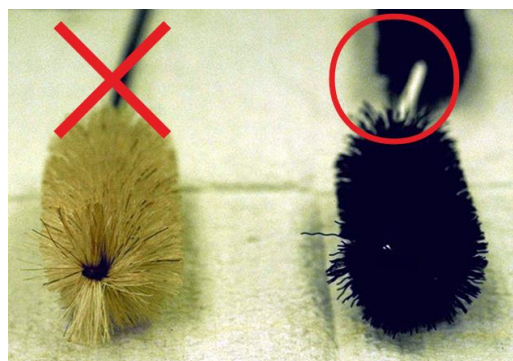


5. 適切にメンテナンスされているロータを使う (ロータ洗浄法)

- 定期的なロータ洗浄 例えば月1回程度
サンプルが漏れた場合は毎回
- 洗浄の前にO-リングをはずす
- 中性洗剤、柔らかなブラシを使用
- 蒸留水で充分すすぎ
- ロータを逆さまにして空気乾燥 (風乾)



ベックマンロータクリーニングキット



適切なローターブラシを選ぶ

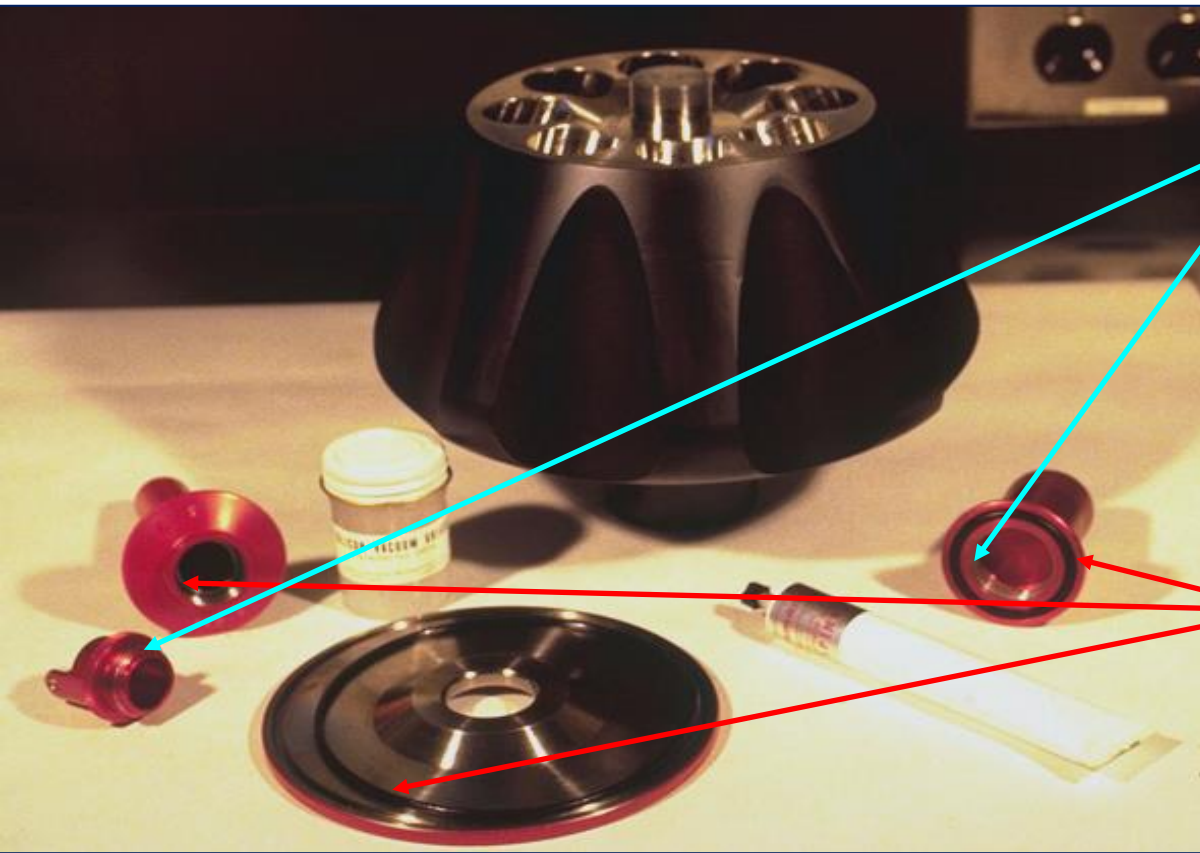


ローターの乾燥



5. 適切にメンテナンスされているロータを使う

ロータ乾燥後、各パーツにバキュームグリース&スピコート塗布する



スピコート
ねじ山の保護に使用



バキュームグリース
O-リングの保護に使用





正しいロータの取り扱いとは

1. サンプルバランスを正しくとる
2. サンプル密度を考慮して使用する
3. チューブ、アダプタ、ツールを正しく使う
4. ロータ本体、フタ、バケットを正しくセットする
5. 適切にメンテナンスされているロータを使う



実験目的に応じた超遠心機、ロータの使い分け



超遠心機の使い分け

サンプル処理容量



フロア型

チューブ1本当たり

0.23 ~ 94 mL 0.2 ~ 32.4 mL

大容量

少容量



卓上型



ロータの使い分け

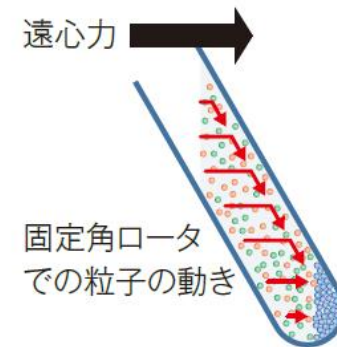
固定角ロータ

- 高い遠心力を使用可能
- 処理容量が多い
- 短時間で分離できる
- 取り扱いがしやすい
- **ペレットが壁面に尾を引くので、コンタミのリスク高い**

固定角ロータ



スウィングロータ



スウィングロータでの粒子の動き

スウィングロータ

- 密度勾配でキレイにバンド形成したい
- **コンタミのリスクが低い**
- ペレットの位置がチューブの中心にくる

トップローディング・スウィングロータ

- **初心者でも取り扱いやすい**
- 密度勾配でキレイにバンド形成したい
- **コンタミのリスクが低い**
- ペレットの位置がチューブの中心にくる



エクソソーム精製のゴールドスタンダード

超遠心機を使用したエクソソームの単離精製と解析



ベックマン・コールター株式会社
ライフサイエンス事業部 マーケティング本部
遠心機担当 シニアアプリケーションスペシャリスト

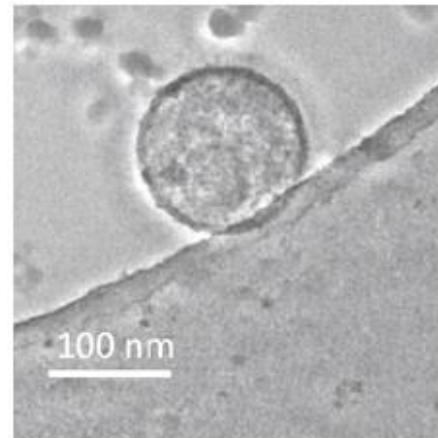
村山 宗司



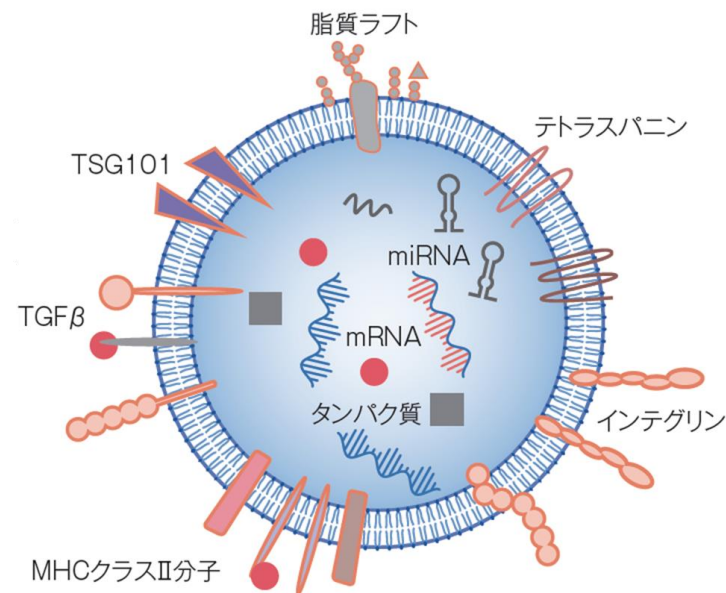
エクソソーム (Exosome) とは、

- 50 nm～150 nmの細胞外小胞
Extracellular vesicles (EVs)
- 小胞表面には、様々な膜タンパク質が存在
テトラスパニンファミリー (CD63, CD81, CD9など)
トランスポーター (Annexinsなど)
抗原提示タンパク質 (MHC)
接着分子 (ICAM、Integrinなど)
- 小胞内には、核酸やタンパク質などが存在
核酸 (mRNAやmiRNA)
タンパク質 (酵素、HSP、骨格タンパク質など)

エクソソームは、
・多様性に富む
・生体機能が複雑



位相差電子顕微鏡によるエクソソームの形態観察。脂肪由来間葉系幹細胞が分泌したエクソソームを超速心法にて回収後、位相差電子顕微鏡で観察したスケールバー：100 nm



【ご提供】国立研究開発法人 国立がん研究センター研究所 分子標的治療研究グループ 分子細胞治療研究分野吉岡祐亮先生



エクソソーム回収方法

- 超遠心法
 - ペレットダウン法
 - スクロースクッション法
 - 密度勾配遠心法
- 試薬キット
 - Polymer-based precipitationキット：
共沈により低速遠心で回収
 - 抗体キット：
膜表面タンパク質への抗体で回収



超遠心法

【メリット】

- ◆ **網羅的**にすべての種類のエクソソームを回収できる（表現マーカーに依存しない回収）
- ◆ **精製度合が高い**（サイトカインやケモカインのコンタミがない）
- ◆ 何かを加える必要がないため、第三の要因を考慮ことなく**投与実験に使用**できる
- ◆ ラニングコストが**安い**

【デメリット】

- ◆ スループットがロータに依存する

【使い方】

- 網羅的な回収
- 投与実験
- × 大規模な臨床検体のスクリーニング解析には不向き（固定角の多本数ロータなら？）



SW 41Ti



SW 32 Ti

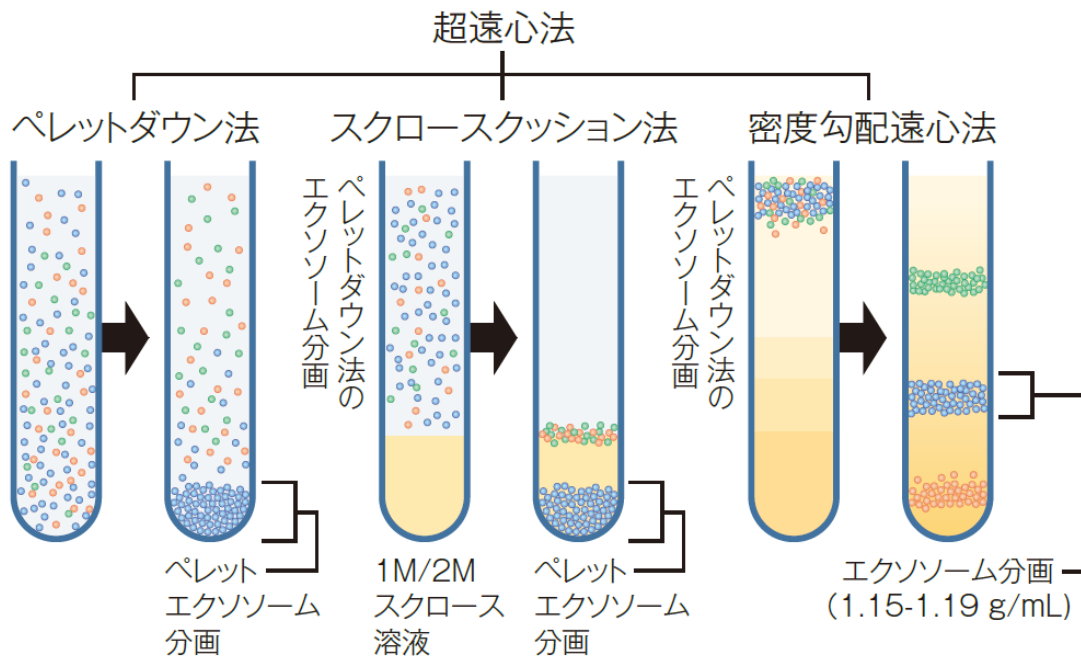


TLS 55



超遠心法によるエクソソームの分取方法

超遠心法			
	ペレットダウン法	スクロースクッション法	密度勾配遠心法
精製度	低	高	
用途	培養液中のエクソソームmiRNA解析	血清・尿などの体液由来のサンプルのエクソソームmiRNA解析	circulating miRNAなどと明確に区別したいmiRNA解析、小胞顆粒などその他の小胞とエクソソームの分離、プロテオーム解析



落谷 孝広 先生

国立研究開発法人 国立がん研究センター研究所
分子標的的研究グループ 分子細胞治療研究分野
主任分野長

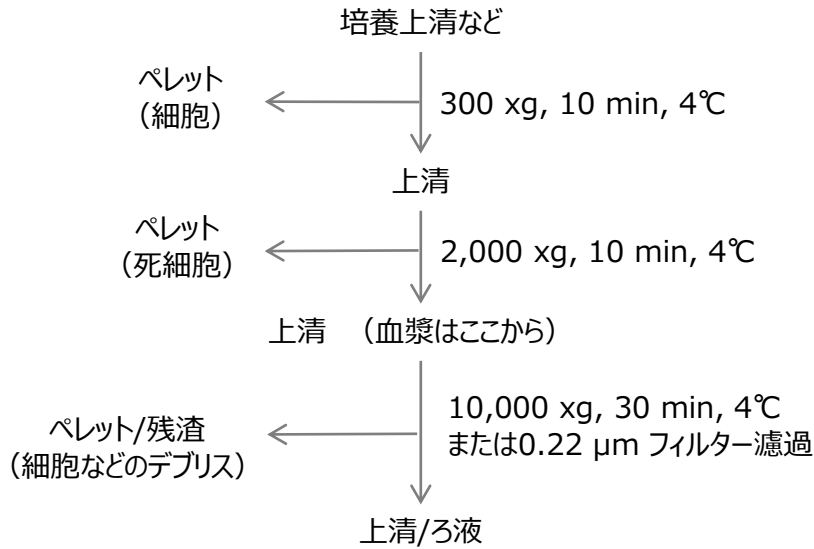
吉岡 祐亮 先生

国立研究開発法人 国立がん研究センター研究所
分子標的的研究グループ 分子細胞治療研究分野
研究員

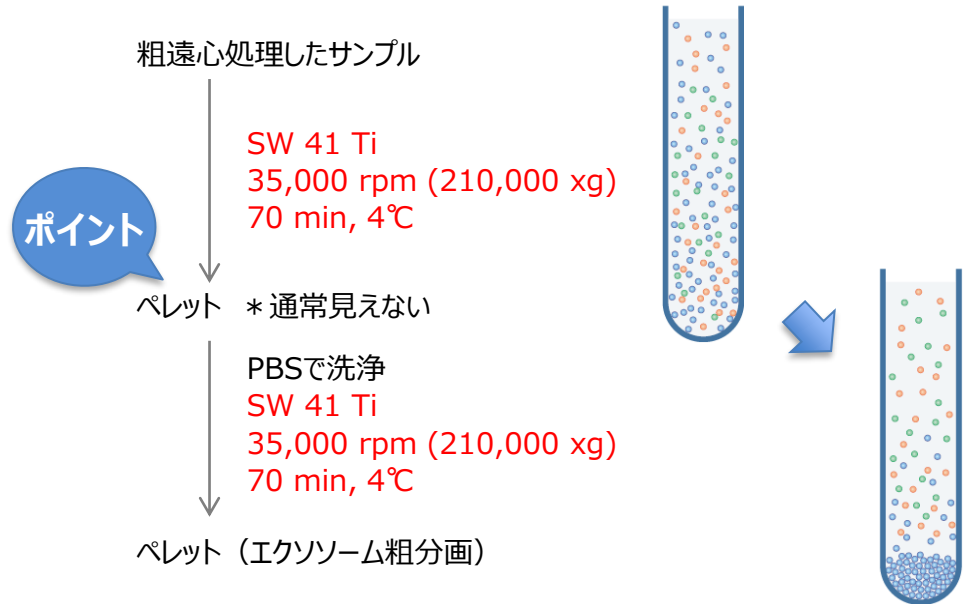


ペレットダウン法 (SW 41 Tiロータによる標準的な遠心条件)

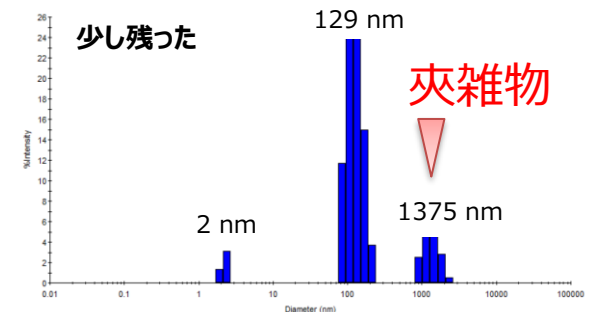
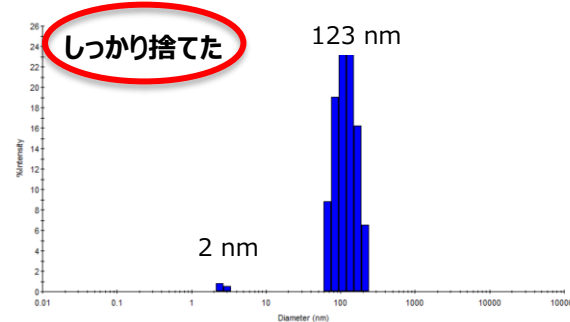
■ 粗遠心



■ ペレットダウン法



ポイント 上清をしっかりと捨てる



動的光散乱装置での確認 : FBSからのペレットダウン法で回収したサンプル結果



超遠心法によるエクソソームの分取方法

エクソソーム添加培養試験への対策

Certified-Free & 滅菌 超遠心用チューブ

※ Certified-Free : DNA, DNase, RNase, PCR inhibitors, Endotoxinフリー

Certified-Free (滅菌)

エチレンオキシドにより滅菌されています。

AAV、エクソソーム (*in vivo* 投与実験) などに最適です。

- Certified-Freeチューブの利点を兼備
- 滅菌済みのチューブがすぐに使用可能
- 滅菌の手順書を開発する手間は不要
- ワークフローベースの数量でパッケージ化
- ISO 11135 と ISO11607 に準拠した滅菌およびパッケージ
- 証明書は beckman.com で入手可能



STERILE EO



ウルトラクリア (UC)
チューブ



ウルトラクリア (UC)
Quick Seal チューブ



ポリプロピレン (PP)
チューブ



ポリプロピレン (PP)
Quick Seal チューブ



ポリプロピレン (PP)
コニカルチューブ



まとめ

- 基本的に超遠心法を選択、スループットが足りない場合には回収キットを検討
- どこまできれいにするかは目的に合わせて決める

超遠心法			
	ペレットダウン法	スクロースクッション法	密度勾配遠心法
精製度	低		高
用途	培養液中のエクソソームmiRNA解析	血清・尿などの体液由来のサンプルのエクソソームmiRNA解析	circulating miRNAなどと明確に区別したいmiRNA解析、小胞顆粒などその他の小胞とエクソソームの分離、プロテオーム解析



ご清聴ありがとうございました。