

微量用限外濾過フィルター“ユニセップ”シリーズ

浜	田	基	宏
田	中	信	夫
味	村	洋	子
大	野	省	太
松	下	一	郎
深	野	一	幸

Disposable Filter “UNISEP” Series

Motohiro HAMADA
Nobuo TANAKA
Yoko AJIMURA
Shotaro OHNO
Susumu MATSUSHITA
Kazuyuki FUKANO

Disposable filter “UNISEP” series have been developed for the ultrafiltration of a small volume of macromolecular solutions. Three types of “UNISEP”, ULTRA CENT, MINI CENT, and AIR PRESS are fitted out with a UF membrane of nominal cut-off molecular weight 1×10^4 or 3×10^4 . Here, the specifications of “UNISEP” series are described.

1. はじめに

臨床検査，細胞工学，分析化学において，微量試料の脱塩，濃縮，除タンパク，緩衝液交換の簡略化が重要な意味を持っている。

従来，これらの処理は，ゲル濾過，透析，塩析，有機溶媒沈澱法などの方法が行なわれている。しかし，上述の方法には，以下に示す様な欠点がある。

- 1) 操作が煩雑である。
- 2) 溶質が希釈される。
- 3) 失活しやすい。
- 4) 処理に時間がかかる。
- 5) 多検体処理が困難である。

ユニセップは，限外濾過膜を装着したフィルターで，タンパク質，コロイドなどの高分子物質は阻止し，無機

イオンや低分子有機化合物は素通りしてしまう。

ユニセップは，加圧又は遠心力を駆動力とし，脱塩，濃縮，除タンパク，緩衝液交換といった処理を簡単に短時間で多検体同時に行うことができる。

ここでは，種々の微量試料の処理を目的として開発した限外濾過フィルター“ユニセップ”シリーズについて紹介する。

2. ユニセップの種類と装着限外濾過膜の仕様

ユニセップは，Table-1 に示す様に5種類ある。

遠心タイプの ULTRA CENT 及び MINI CENT は，装着している膜の分画分子量が 3×10^4 と 1×10^4 の2種類がある。

ユニセップに装着している膜の分画性能は，Table-2 に示す球状タンパク質を標準試料とし，その阻止率を目

Table-1 List of UNISEP Series

UNISEP	Nominal Molecular Wt.	Type
ULTRA CENT-30	30,000	centrifugal type (swinging rotor or angle rotor)
ULTRA CENT-10	10,000	centrifugal type
MINI CENT-30	30,000	centrifugal type (angle rotor)
MINI CENT-10	10,000	centrifugal type
AIRPRESS-30	30,000	press type

Table-2 Percent Protein Exclusion

Sample	Nominal Molecular Wt.	Conc.	Typical Exclusion	
			ULTRA CENT-30	ULTRA CENT-10
Human Serum			>99.9%	>99.9%
Bovine Serum Albumin	67,000	1.0 mg/ml	>99.9%	>99.9%
α -Chymotrypsinogen	24,500	0.25 mg/ml	>92 %	>99.9%
Myoglobin	16,800	0.25 mg/ml	>60 %	>99 %
Cytochrome C	12,400	0.25 mg/ml	>20 %	>99 %

1 ml starting volume, 35° fixed-angle rotor, 2000×G, 25°C

安として決めている。

また、装着している膜は、一般に“非対称構造”と呼ばれる構造(膜表面が緻密で膜内部は粗のスポンジ構造)をとっている。この構造は、膜表面を透過した溶質が膜内部で目詰りすることがほとんどない。そのため、高い透過性を維持することができ、除タンパク、濃縮、脱塩といった操作が短時間でこなせる。

装着している膜材質は、セルロースであるため非特異的吸着がほとんどない。また、セルロースは、親水性であることから、疎水性物質を殆んど吸着しない。

Table-3 は、ULTRA CENT-30 を使用した抗てんかん薬の回収実験結果である。この結果より、どの抗てんかん薬もほとんど回収され、吸着が起こっていないことが明らかである。

3. 遠心タイプの ULTRA CENT と MINI CENT

Fig.-1 に遠心器用限外濾過フィルター ULTRA CENT と MINI CENT を示し、その仕様と材質を Table-4 に示す。

ULTRA CENT は、0.5~1.5 ml の試料を処理することができる。

特徴としては、Fig.-1 に示す様に膜が斜めに装着してあるため、アングル型の遠心器のみならず、スイング型の遠心器にも使用できることである。

スイング型の遠心器を使用する場合、膜が水平に装着してあると Fig.-2 に示す様に遠心力が膜面に対し垂直にかかる。このため膜は、すぐに目詰りを起こし、濾過

Table-3 Drug Recovery

Drug	Recovery
Primidone	99.2±1.1%
Phenobarbital	99.5±1.1%
Carbamazepine	98.2±1.0%
Phenytoin	98.7±1.4%

ULTRA CENT-30, 1.0 ml starting volume, 35° fixed-angle rotor, 2000×G, 25°C.

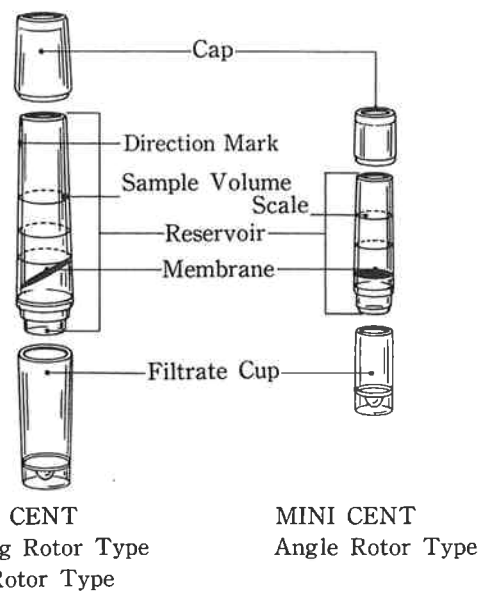


Fig.-1 ULTRA CENT and MINI CENT

できなくなる。

しかし、膜が斜めに装着してあるため遠心力が膜面に垂直にかからない。それでアングル型と同様な透過速度を保つことができる。

また、膜を斜めにするにより、有効濾過面積も大きくなり、処理時間も短くなった。

MINI CENT は、アングル型遠心器専用で極微量試料の分離精製に適している。

ULTRA CENT と MINI CENT の用途としては、以下の様なものがある。

- 1) 酵素, 抗体, 核酸等の精製時における濃縮, 脱塩, 緩衝液交換
- 2) ドラッグアッセイの前処理
- 3) ビタミン, 金属イオン等低分子物質測定の際のタンパク質やコロイドの除去 (特に液体クロマトグラフ

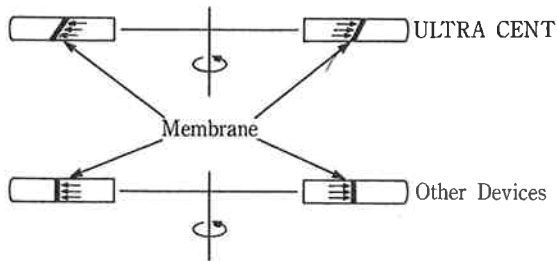


Fig.-2 The difference between ULTRA CENT and other devices in centrifugal effect with swinging rotor.

ィーの前処理法)

使用法は、まずキャップをはずしリザーバに試料を入れる。キャップをし全体がピッタリ装着しているのを確認し、遠心器にセットする。このとき ULTRA CENT 又は、MINI CENT がピッタリ入る遠心チューブを使用する。ULTRA CENT をアングル型遠心器で使用する場合は、リザーバ外面の遠心方向を示す目印(筋状突起)が上(外側)を向くようにセットする。これは、膜面に遠心力が垂直にかからない方向を示している。使

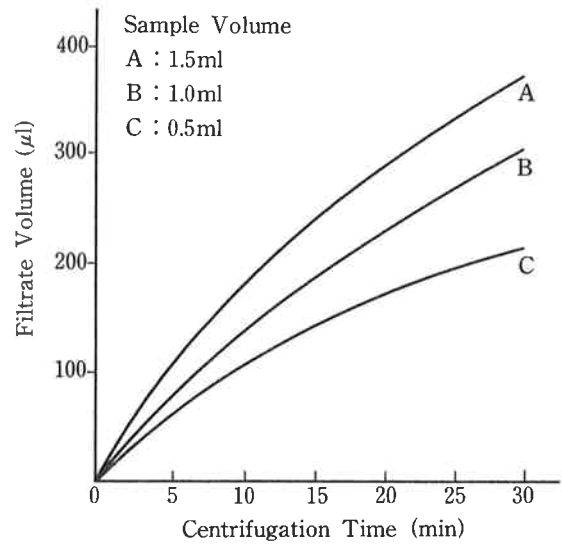


Fig.-3 Typical Flow Rate of ULTRA CENT-30 Human serum, swinging rotor, 1000×G

Table-4 Specifications and Materials of Construction

	ULTRA CENT	MINI CENT
Maximum Initial Sample Volume	1.5 ml	0.5 ml
Minimum Initial Sample Volume	0.5 ml	0.1 ml
Maximum Relative Centrifugal Force	3000×G	3000×G
Effective Membrane Surface Area	0.69 cm ²	0.23 cm ²
Typical Final Concentrated volume	approx. 0.05 ml	approx. 0.03 ml
Dimensions Diameter	15 mm	11 mm
Total Length	92 mm	58 mm
Membrane Angle	slant	level
Filtrate Cup Capacity	approx. 2.0 ml (swinging rotor) approx. 1.5 ml (45° angle rotor)	approx. 0.5 ml (45° angle rotor)
Membrane	cellulose	
Reservoir	acrylic	
Filtrate Cup	acrylic	
Cap	polypropylene	

用遠心力は、1000~3000Gで任意の時間遠心する。遠心後は、濾液カップをはずし適当な場所に保管する。また、リザーバに残った濃縮液は、脱イオン水や緩衝液を加え、繰り返し遠心すれば脱塩、緩衝液の置換が行なえる。

Fig.-3~Fig.-6 に ULTRA CENT-30 (分画分子量

3×10^4) と ULTRA CENT-10 (分画分子量 1×10^4) の血清の濾過速度とアルブミンの濃縮速度を示す。また同様に、MINI CENT-30 (分画分子量 3×10^4) 及び MINI CENT-10 (分画分子量 1×10^4) については、Fig.-7~Fig.-10 に示した。

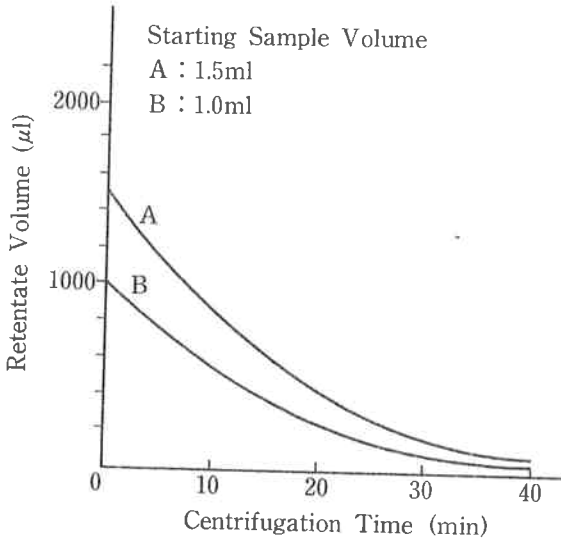


Fig.-4 Concentration Rate of ULTRA CENT-30 1 mg/ml bovine serum albumin, Swinging Rotor, 1000×G

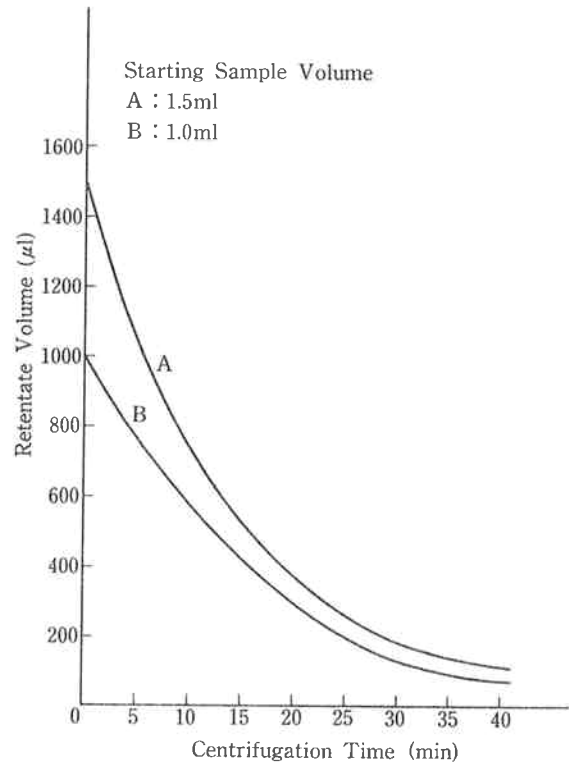


Fig.-6 Concentration Rate of ULTRA CENT-10 1 mg/ml bovine serum albumin, Swinging Rotor, 2000×G

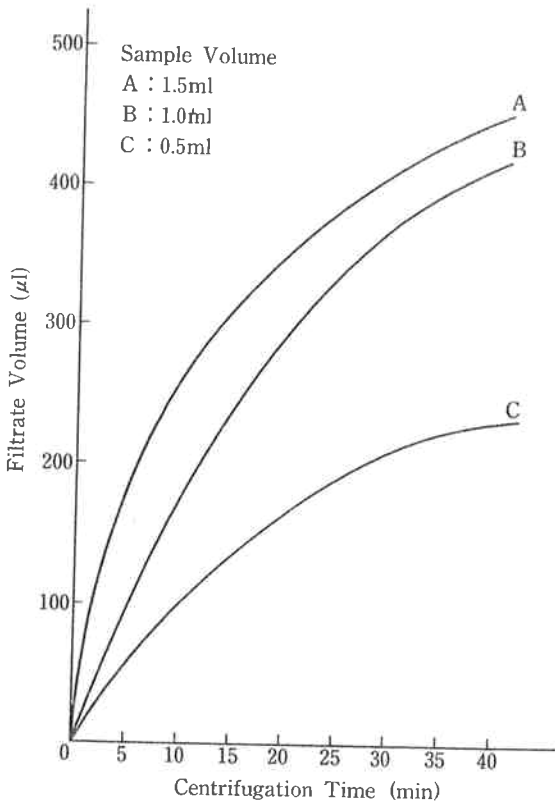


Fig.-5 Typical Flow Rate of ULTRA CENT-10 Human serum, swinging rotor, 2000×G

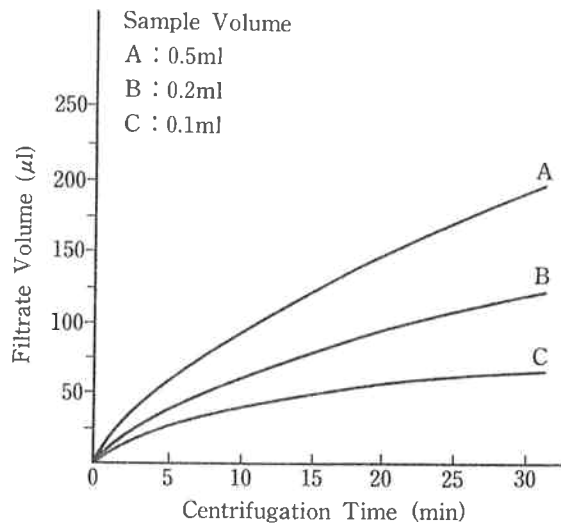


Fig.-7 Typical Flow Rate of MINI CENT-30 Human serum, 45° fixed-angle rotor, 1000×G

4. 加圧タイプの AIRPRESS

Fig.-11 に加圧タイプの AIRPRESS を示し、その仕様と材質について Table-5 に示す。

AIRPRESS は、シリンジ（注射筒）加圧タイプのディスポーザブル限外濾過フィルターである。

特徴としては、簡易逆止弁がついているので恒に加圧しておく必要がなく、一度シリンジ（注射筒）で加圧した後は、放置しておくだけで良い。また、有効膜面積が大きいので短時間で濾過できる。ハウジングは、透明で、濾過状態も良く観察できる。

用途としては、ビタミン、金属イオン等の低分子物質

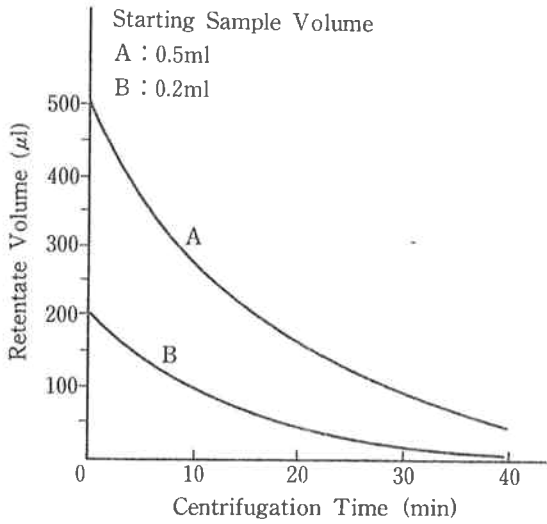


Fig.-8 Concentration Rate of MINI CENT-30
1 mg/ml bovine serum albumin, 45° fixed-angle Rotor, 1000×G

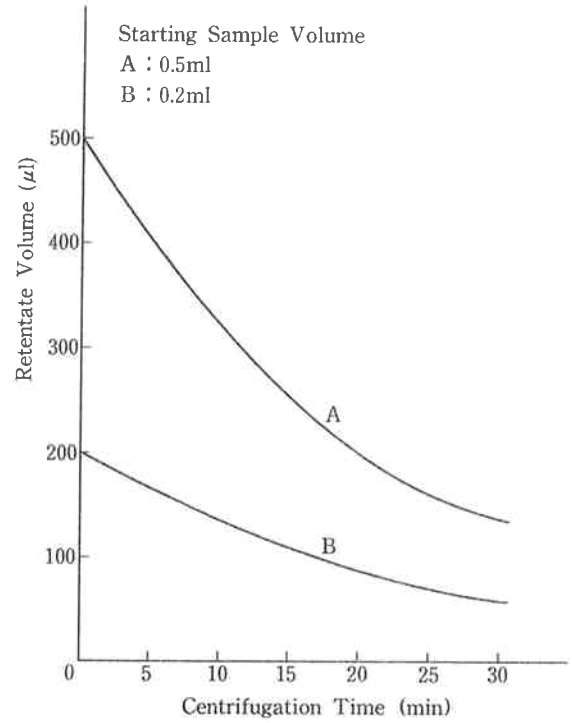


Fig.-10 Concentration Rate of MINI CENT-10
1 mg/ml bovine serum albumin, 35° fixed-angle Rotor, 3000×G

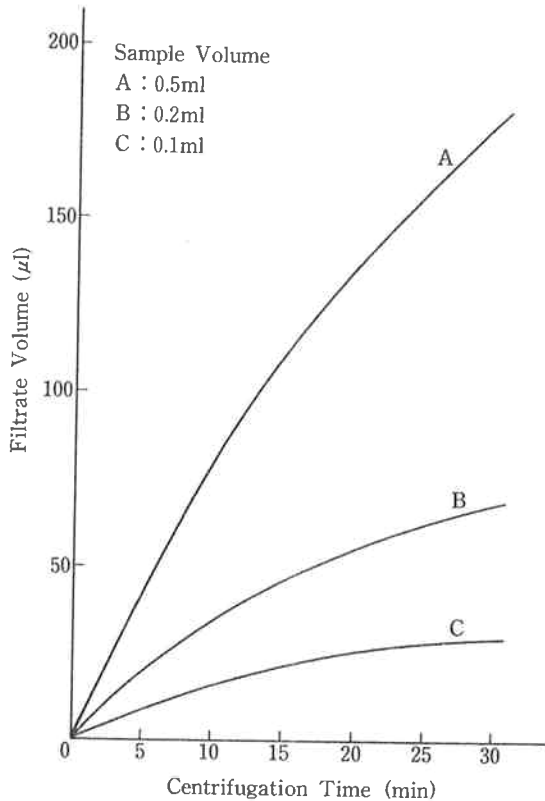


Fig.-9 Typical Flow Rate of MINI CENT-10
Human serum, 35° fixed-angle rotor, 3000×G

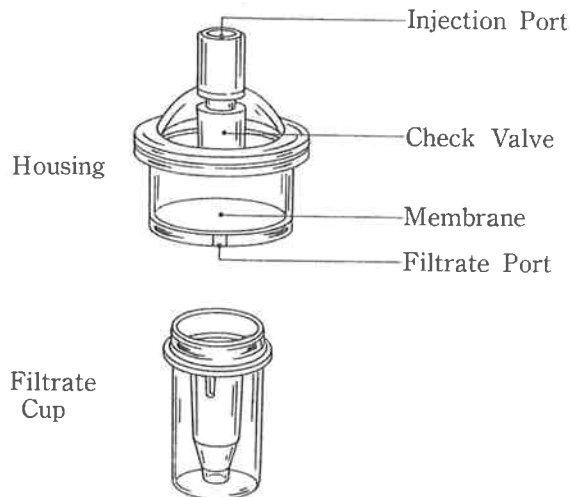
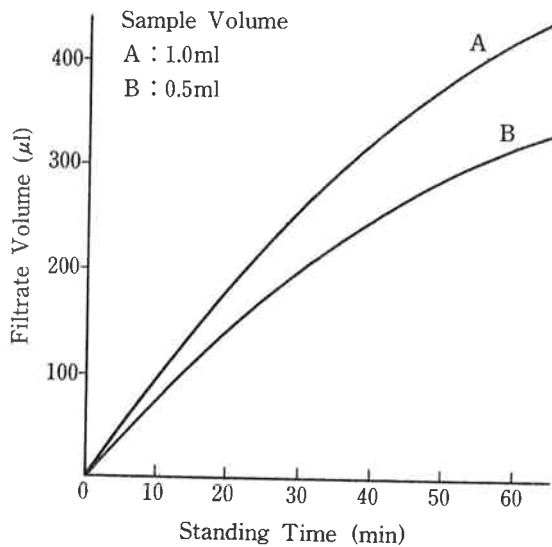


Fig.-11 AIRPRESS

Table-5 Specifications and Materials of Construction

	AIRPRESS
Maximum Initial Sample Volume	1.2 ml
Minimum Initial Sample Volume	0.2 ml
Pressure Compatibility	approx. 9 kg/cm ²
Effective Membrane Surface Area	2.34 cm ²
Dimensions Diameter	24 mm
Total Length	32 mm
Membrane	cellulose
Housing	acrylic
Filtrate Cup	styrene
Check Valve	Silicone Rubber

Fig.-12 Typical Flow Rate of AIRPRESS-30
Sample: Human serum

測定の際の高分子物質の除去（特に液体クロマトグラフィの前処理フィルターとして適している。）やドラッグアッセイの前処理フィルターなどがある。

使用法は、ラックに本体と濾液カップをセットし、試料をシリンジ（注射筒）にとり静かに注入する。次に、別のシリンジ（注射筒）で約 10 ml の空気をゆっくり注入し、本体内部を加圧する。加圧後は、シリンジをはずしラックにセットしたまま放置し、濾過する。

Fig.-12 に AIRPRESS の血清濾過速度を示す。

5. その他

(1) 耐薬品性

Table-6 に “UNISEP” の室温での耐薬品性を示す。

Table-6 Chemical compatibility UNISEP

Solvent	30 min 60 min 24 hr		
Urea (10 mmol/l)	○	○	○
Guanidine Hydrochloride (10 mmol/l)	○	○	○
Ethanol 50%	×	—	—
Ethanol 30%	○	○	○
Ethanol 10%	○	○	○
Methanol 10%	○	○	○
Methanol 5%	○	○	○
n-Butanol 10%	×	—	—
n-Butanol 5%	○	○	○
Mercaptoethanol	○	○	△
Acetic Acid	○	○	×
Formic Acid	○	○	×
0.1N Hydrochloric Acid	○	○	○
0.1N Sodium Hydroxide	○	○	○
0.1N Ammonia Water	○	○	○
Sodium Dodecyl Sulfate (1 mmol/l)	○	○	△
Triton X-100	○	○	×

○ Good, △ Usable, × No

(2) 取り扱い上の注意

“UNISEP” に装着しているセルロース膜は、保存のため微量のグリセリンとアジ化ナトリウムを含んでいる。これが使用上問題となる場合は、緩衝液または脱イオン水で洗浄するのが良い。

非特異的吸着が考えられる場合は、コントロール試験をするのが望ましい。

滅菌方法としては、ガス滅菌、25%エタノール、5%ホルマリンを用いることができる。

セルロース膜は、乾燥すると収縮し膜が破れたりするので室温又は低温（4～10℃）での保存が望ましい。

6. おわりに

微量試料の分離精製を目的とした微量用限外濾過フィルター “UNISEP” シリーズの特徴及び仕様について簡単に紹介した。

現在装着している膜の分画分子量は、 3×10^4 と 1×10^4 の二種類しかない。今後さらに用途を広げる意味でも分画性能の異なる膜を開発し、“UNISEP” シリーズの拡充が必要と思われる。