# 誘電泳動によるエクソソームの迅速分離・回収法の開発 Development of rapid separation and recovery of exosome using dielectrophoresis

九州大学 大学院システム情報科学研究院 電気システム工学部門 中野 道彦

## 研究の目的

本研究の目的は、(1) 誘電体微粒子に抗原抗体 反応によってエクソソームを結合して、(2) エク ソソーム結合微粒子を選択的に誘電泳動で捕集す る、という新しいエクソソームの分離・回収法の 構築をすることである。このとき、捕集に伴う電 極のインピーダンスの変化から、同時にエクソソ ームの量も測定する。従来法では数時間から数日 要しているが、本法によって簡便かつ迅速な分離・ 回収手法を実現する。エクソソームは、生体内の 細胞外ベシクルの一つであり、多様な核酸やタン パク質を含んでいることから、がん細胞などの早 期発見に有用ではないかと注目されている。本研 究によって、がん診断などの迅速・簡便化に貢献 する。

## 研究の内容、成果

上述の微粒子にエクソソームを結合させて検出 する手法は、微粒子の誘電泳動特性がエクソソー ムの結合によって変化することを期待して考案し た(図1)。

エクソソームは,生体内の細胞外ベシクルの一 つであり,多様な核酸やタンパク質を含んでいる ことから、がん細胞などの早期発見に有用ではな いかとして注目されている。本研究によって,が ん診断などの迅速・簡便化に貢献する。







誘電泳動とは,不平等電界中の誘電体粒子に生 じる現象で,溶媒と粒子との電気的特性(分極) の違いによって生じる。すなわち,誘電体微粒子 (直径数 µm)の分極がエクソソーム(直径数十 nm)の結合によって変化する必要がある。そこで, まずエクソソームの誘電泳動特性を明らかにする こととした。誘電泳動特性が明らかになることで, その分極特性を知ることができる。エクソソーム の誘電泳動特性を調べる前に,調製が容易なリポ ソームを用いてその誘電泳動特性を調べた。リポ ソームは,リン脂質二重膜で形成される液滴で, エクソソームと構造が似ている。以下,リポソー ムの誘電泳動特性およびエクソソームの誘電泳動 特性について述べる。

## 誘電泳動特性評価方法

試料溶液を微細電極上に滴下し,交流電圧を印 加して生じた誘電泳動を顕微鏡で観察した。誘電 泳動は分極に起因するため,印加電圧の周波数に 依存する。周波数によって誘電泳動力の向きが変



図2 誘電泳動特性評価に使用した電極.(左) 外観,(右)拡大写真.黒い部分が電極.

Fig. 2. Microelectrode used for evaluating dielectrophoretic property. Macro (left) and magnified (right) images. Black regions correspond to the chromium electrode.

化し,粒子の分極が溶媒の分極に比べて大きい時 は高電界領域に移動する方向に働き(正の誘電泳 動),粒子の分極が小さい場合は低電界領域移動す る(負の誘電泳動)。微細電極を用いた場合は,電 極部が高電界となる。誘電泳動力がゼロになる周 波数をクロスオーバー周波数と呼び,これが誘電 泳動特性の代表的な値である。

本研究では、キャッスルウォール型微細電極を 用いた。これはガラス基板上にクロムで形成した もので、最短ギャップ長は5µm である(図2)。

リポソームの誘電泳動特性

リポソームキット: リポソーム調製用脂質混合物 (L4395, Sigma-Aldrich)をリン脂質として用い, NanoSizer Extrusion Kit (T&T Scientific)を用いて粒径を調製した。リポソームの粒径は、1、5、10 µm とした。生体由来リポソームと同じ浸透圧にするために、リポソーム内部溶液に 9%スクロースを加えた。

図 3 に直径 5 µm に調製したリポソームの誘電 泳動を示す。リポソーム内部導電率を 1.2 mS/cm, 外部水溶液の導電率を 20 µS/cm に調製したとき の結果で, 600 kHz 以上で正の, 400 kHz 以下で 負の誘電泳動が生じた。クロスオーバー周波数は およそ 500 kHz であった。同様に直径 1 µm, 10 µm に調製したリポソーム についてもクロスオーバ ー周波数を測定した。

図4に、リポソームのクロスオーバー周波数を



図3 リポソームの誘電泳動. 正 (左, 600 kHz) および負 (右, 100kHz)の誘電泳動. Fig. 3. Dielectrophoresis of prepared liposome (5 µm in diameter). Positive (left, 600 kHz) and negative (right, 100 kHz) dielectrophoresis.

直径に対してプロットしたグラフを示す。実験値 を基に、リポソームの電気的特性を予想し計算し



図 4 リポソームの直径とクロスオーバー周波 数の関係.ポイント:実験値, ライン:計算値. Fig. 4. Relationship between liposome diameter and the cross-over frequency of dielectrophoresis. Points and line indicate measured and calculated values, respectively.

#### 表1 計算されたリン脂質二重膜の性質

Table 1. Calculated electrical characteristics of phospholipid bilayer.

膜の導電率	$4.6 \times 10^{-9} \text{ S/m}$
膜の比誘電率	10
膜の表面コンダクタンス	$2.5 \times 10^{-23}$ S



図 5 水溶液の導電率とクロスオーバー周波数 の関係 (リポソーム:5 µm). ポイント:実験値, ライン:計算値.

Fig. 5. Relationship between medium conductivity and the cross-over frequency of dielectrophoresis. Diameter of prepared liposomes was 5 µm. Points and line indicate measured and calculated values, respectively. た結果を曲線で示す。計算結果から,リポソームの電気的特性について表1に示す数値が示された。

図5に直径5µmのリポソームにおいて,水溶 液の導電率を変化させたときのクロスオーバー周 波数を示す。表1の計算結果を用いて計算した結 果を曲線で示す。水溶液の導電率が大きくなるに つれて,計測値と計算値との間の差が大きくなる た。このことは、クロスオーバー周波数から電気 的特性を予想する場合には、複数の条件でクロス オーバー周波数を取得しなければ、良い予想に繋 がらないことを示唆している。

### エクソソームの誘電泳動特性

生乳由来エクソソーム(平均粒径:119 nm, EXMB100L, コスモ・バイオ)を対象として, エク ソソーム膜染色キット(Red)(EX02, Dojindo) を用いて蛍光染色した。蛍光染色したエクソソー ムは,限外ろ過膜(Amicon Ultra 10K, Merck)を 用いて濃縮・精製した。

図 6 に蛍光染色エクソソームの誘電泳動の様子 を示す。これは、水溶液の導電率を 186  $\mu$ S/cm に 調製したときの誘電泳動の様子で、50 kHz 以下の 周波数で負の誘電泳動を示し、200 kHz~5 MHz の範囲で正の誘電泳動を示した。水溶液の導電率 が 20  $\mu$ S/cm において、50 kHz~2 MHz の範囲で 正の誘電泳動を示した。また,水溶液の導電率が 1.65 mS/cm では,50 kHz~5 MHz の範囲におい て誘電泳動は生じなかった。

蛍光染色による電気的特性(ゼータ電位)の変 化は少ないことが示されている。そのため,ここ で得られた誘電泳動特性はエクソソームそのもの の分極に起因する。得られた誘電泳動特性は,コ アーシェル型誘電体の挙動を示唆している。エク ソソームは,そのサイズが非常に小さいために, 膜の影響が大きく,相対的に内部溶液の電気的特 性の影響が小さいと考えられていた。そのため, コアーシェル構造ではなく,均一粒子としての挙 動を予想していたが,そうではないことが示され た。すなわち,エクソソーム内部構成によって電 気的特性が変化すれば,その誘電泳動特性が変化 することを示唆している。この結果は,図1で示 す手法の実現可能性が高いことを示唆する。

#### 微粒子の核酸増幅検査への応用

新型コロナウイルス感染症の大流行により, PCR (polymerase chain reaction) に代表される核 酸増幅検査法の需要が飛躍的に高まっている。こ こでは、微粒子を核酸増幅検査に応用して、簡便 かつ低価格な核酸検査手法を検討した。

核酸増幅検査法では,検出対象(ウイルスなど) から核酸(DNA や RNA)を抽出して,酵素を用



図 6 蛍光染色エクソームの誘電泳動. 電圧印加前(左),負(中,50 kHz)および正(右,200 kHz)の誘電泳動. 水溶液の導電率は 186 µS/cm.

Fig. 6. Dielectrophoresis of fluorescent-labeled exosomes. Before applying voltage (left), negative (middle, 50 kHz) and positive (right, 200 kHz) dielectrophoresis. The medium conductivity was adjusted to  $186 \,\mu$ S/cm.

いて特異的に核酸を増幅し,その増幅核酸を検出 する。すなわち,抽出,増幅,検出の三つの工程か らなる。本研究では,微粒子を用いて検出工程を 簡便かつ無電源に実施する方法を考案した。

その手法は、微粒子に磁性微粒子を用いて、増 幅工程にて得られた増幅 DNA をその微粒子に結 合する。その後、 DNA 微粒子を親水性基板上に 滴下し,基板下面に永久磁石を設置する。すると、 検出対象 DNA が結合した磁性微粒子は、永久磁 石の中心付近に凝集する一方で、未結合磁性微粒 子は、底面に均一に付着する。この違いは、目視 判定可能であるため、増幅 DNA を無電源で検出 することができる。

図8は、PCR 増幅した新型コロナウイルス遺伝 子を磁性微粒子に結合して検出した例を示す。 NTC は non-template control を示し、検出対象 DNA がない場合である。数字は PCR に導入した 遺伝子数を示しており、10 個以上で微粒子の凝集 が見られた。

磁性微粒子の凝集は1分以内に完了するため, 従来のゲル電気泳動法に比べて格段に速く, Realtime PCR のような蛍光検出に比べて安価に実施



図7 DNA 結合磁性微粒子の凝集の様子.

Fig. 7. Accumulation of DNA-labeled magnetic microbeads. Permanent magnets were placed under the hydrophilic substrate. NTC means non-template control. Numbers indicate initial copy numbers of target DNA poured in PCR solution. (Analyst, 2021, 146, 2818) 可能である。

#### 今後の研究の方向、課題

本研究期間において,リポソームおよびエクソ ソームの誘電泳動特性を明らかにした。この結果 を基に,図1に示すエクソソームの迅速分離・検 出手法を実現する。そのためには,最適な誘電率 および表面コンダクタンスを有する微粒子の選択 が必要であり,また,エクソソームの種類,特に 病気に関連するエクソソームの電気的な特徴付け が必要となる。

#### 成果の発表、論文等

学会発表

- 陳皓,吉田 諒,稲葉 優文,中野 道彦,末廣 純也,"リポソームの誘電泳動特性の数値計算 解析",2020年度電気・情報関係学会九州支部 連合大会(第73回連合大会).
- 吉田 諒,陳 晧,末廣 純也,中野 道彦,稲葉 優文,"DNA 増幅と微粒子誘電泳動を用いた DNA 検出を行うデバイスの検討",2020 年 度電気・情報関係学会九州支部連合大会(第 73 回連合大会).
- 陳皓,吉田 諒,山川 翼,稲葉 優文,中野 道彦,末廣 純也,"リポソームの誘電泳動特性 に関する基礎検討",令和3年電気学会全国 大会.

論文発表

 M. Nakano, M. Inaba, J. Suehiro, "Rapid and low-cost amplicon visualization for nucleic acid amplification tests using magnetic microbeads," Analyst (2021) 146, 2818-2824.