

成果報告

電荷・サイズ選択的な高精度エクソソーム分離技術の研究

この研究は、競輪の補助を受けて実施されました



【はじめに】

エクソソームは細胞から分泌されるナノスケールの細胞外小胞であり、その表面電荷およびサイズは、由来する細胞の種類や生理学的状態に応じて変化することが知られている。したがって、これらの物理化学的特性に基づいてエクソソームを選択的に回収・検出できる技術は、がんの早期診断や疾患モニタリングの精度向上において極めて重要である。

陽極酸化アルミナ（AAO）はナノスケールの細孔を有しており、その細孔径は電解液条件およびポアワイドニング処理時間を調整することで任意に制御することができる。さらに、化学気相成長法（CVD）により AAO 表面に熱分解炭素を堆積させることで、炭素被覆 AAO（C/AAO）と呼ばれる導電性多孔質電極を作製することができる。C/AAO は、高い比表面積や優れた電気化学的安定性といった利点を有し、さらに膜厚を低減することで高い光学的透明性を実現することも可能である。

これらの特性により、C/AAO はバイオセンシング用途における汎用的なプラットフォームとして期待されており、精密に制御されたナノ多孔質構造を通じて小胞のサイズ選択的分離を可能にすると同時に、電気化学測定および光学測定の両方を実施することができる。特に、C/AAO は局在表面プラズモン共鳴（LSPR）などの光学検出技術と高い適合性を有する。

本研究では、C/AAO を光学バイオセンシング基板として応用することを目的として、まず細孔底部に絶縁性バリア層を有しない C/AAO 膜を作製し、その電気伝導性および光学的透明性を評価した（Fig. 1a）。さらに、C/AAO 電極に外部電圧を印加することにより、負に帯電したエクソソームをサイズ選択的に分離する手法を開発した（Fig. 1b）。

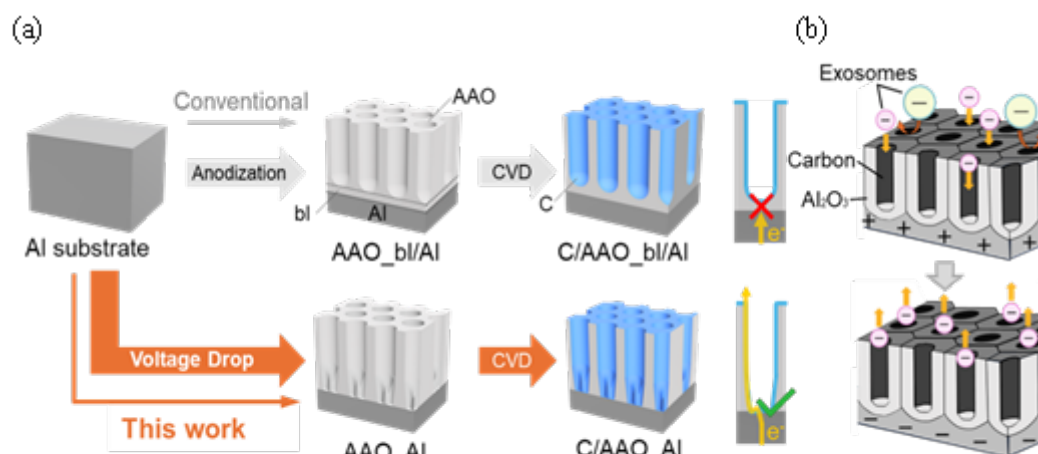


Fig. 1 (a) Schematic illustration of the fabrication of C/AAO_bI/Al (top) and C/AAO_Al (bottom).
(b) Schematic illustration of size-based separation of exosomes using C/AAO.

【実験】

バリア層を有する炭素被覆 AAO 膜およびバリア層を完全に除去した炭素被覆 AAO 膜を、リン酸水溶液（5 wt%）を用いて作製した。具体的には、バリア層を有する C/AAO とアルミニウム基板からなる試料（C/AAO_bI/Al）および、アルミニウム上のバリア層除去 C/AAO（C/AAO_Al）を作製した。

さらに、細孔径が電気伝導性および光透過率に及ぼす影響を評価するため、異なる酸性水溶液（H₂SO₄、(COOH)₂、および H₃PO₄）を用いて、十分に薄いバリア層除去 C/AAO 膜を作製した。これらをそれぞれ C/AAO_Al_Sul、C/AAO_Al_Oxa、および C/AAO_Al_Phos とした。

【結果と考察】

C/AAO 表面と Al 基板間の電気伝導性を測定したところ、バリア層を有する C/AAO（C/AAO_bI/Al）は $7.5 \times 10^{-3} \text{ S}$ の伝導度を示したのに対し、バリア層を除去した C/AAO（C/AAO_Al）は $3.7 \times 10^{-1} \text{ S}$ というはるかに高い伝導度を示した。この結果は、バリア層の除去によって電気伝導性が約 50 倍向上したことを示している。

SEM 観察の結果、C/AAO_bI/Al では細孔底部に約 160 nm 厚のバリア層が残存していた一方、C/AAO_Al では細孔が Al 基板まで貫通していることが確認された。これらの観察結果は、炭素層と Al 基板との直接的な電氣的接触が形成されたことが、著しく向上した電気伝導性の主要因であることを示している。

続いて、C/AAO_Al_Sul、C/AAO_Al_Oxa、および C/AAO_Al_Phos を SEM 観察したところ、それぞれの細孔径は 20 nm、40 nm、および 180 nm であり、一方で膜厚はいずれの試料においても 450～500 nm でほぼ一定であった。電気伝導性測定の結果、最も細孔径の小さい Sul 試料が最高の伝導度を示し、次いで Oxa 試料、Phos 試料の順であった。

単位面積当たりの総細孔周長と電気伝導性との関係をプロットしたところ、明瞭な線形相関が認められた (Fig. 2)。この結果は、電流が主として細孔壁上に形成された炭素層を通じて垂直方向に輸送されることを示しており、細孔周囲に沿った炭素層が主要な導電経路として機能していることを強く示唆している。

エクソソームのサイズ選択的分離法の開発

【結果と考察】

C/AAO の SEM 観察の結果、平均細孔径は 155 ± 31 nm であり、最大細孔径は 200 nm であった (Fig. 3)。

続いて、エクソソームを含むリン酸緩衝生理食塩水中において、C/AAO 電極を陽極として 0.9 V の電圧を印加し、細孔径より小さいエクソソームのサイズ選択的捕捉を行った。その後、ナノ細孔内に捕捉されたエクソソームを、 -2.0 V の逆電圧を印加することによって放出した。

捕捉前および放出後のエクソソームの粒径分布を、ナノ粒子追跡解析 (NTA) を用いて比較した。その結果、放出後には C/AAO の細孔径より大きい粒子数が顕著に減少していることが確認された (Fig. 4)。

一方、細孔径より小さい粒子に着目すると、その割合は 65% から 91% へと大幅に増加し、エクソソーム全体の回収率は 79% に達した。この回収率は、サイズ排除クロマトグラフィー ($64.7 \pm 13.1\%$)¹ および密度勾配遠心分離法 ($39.6 \pm 4.6\%$)¹ といった従来法による回収率を上回っており、本手法の有効性を示している。

【Reference】 1. J. Guo, et al., J Extracell Vesicles, 2021, 10, e12145

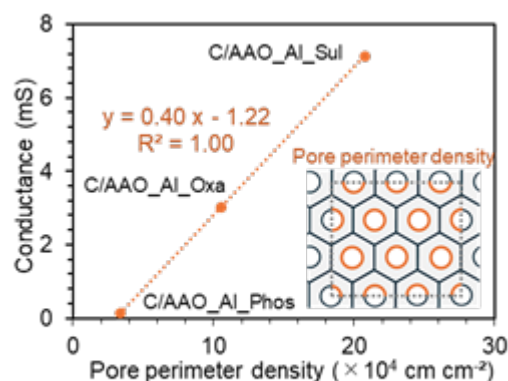


Fig. 2 The relationship between total pore perimeter per unit area and conductance.

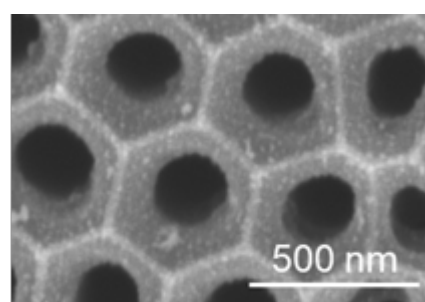


Fig. 3 SEM image of C/AAO for size-based separation of exosomes.

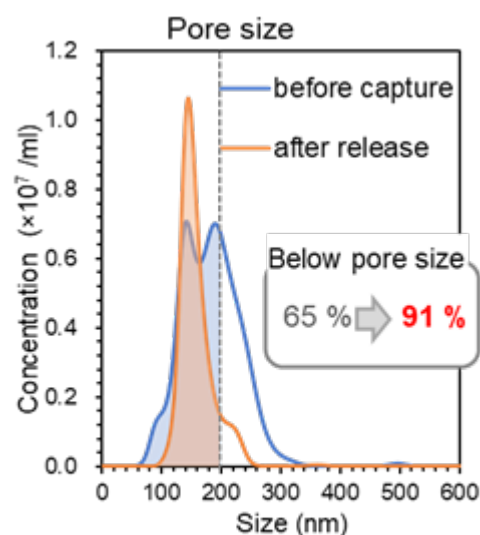


Fig. 4 Size distribution before and after size-selective separation measured by NTA.