2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

学　校　名	**東　　洋　　大　　学**	研究所名等	工 業 技 術 研 究 所	
研 究 課 題	ミクロ界面精密制御システムの創出とバイオ応用 －細胞外小胞体の分離抽出と解析への展開を目指して－		研 究 分 野	工　　学
キ ー ワ ー ド	①ナノ構造、②表面増強ラマン散乱、③ナノマイクロシステム、④表面弾性波、⑤エクソソーム			

〇研究代表者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
山　口　明　啓	東 洋 大 学 理 工 学 部	教　　授	研究総括、統合システムの創製と特性評価、各種実験と解析、論文執筆

〇研究分担者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
安　永　峻　也	愛 知 学 院 大 学 薬 学 部	講　　師	SAW輸送解析、薬剤効能調査
筧　　康　正	神 戸 大 学 医 学 部 ・ 医 学 部 附 属 病 院	講　　師	エクソソーム解析と病気との関連性調査
田　畑　美　幸	東 京 農 工 大 学 工 学 部	講　　師	電気化学反応解析とバイオセンシング

ミクロ界面精密制御システムの創出とバイオ応用
－細胞外小胞体の分離抽出と解析への展開を目指して－

1. 研究の目的

細胞外小胞体（EVs）は、癌の転移機構を担っていると考えられ、最近、注目されている。EVs は、ほぼすべての生細胞から分泌される不均一な脂質二重膜構造を有する小胞の総称である。EVs は、細胞内の産生機構の違いから、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体の 3 種類に大別される。エクソソームの大きさは、直径 30～150 nm で、エクソソームは後期エンドソーム膜の内向きの出芽により形成され、さらに細胞膜と融合することで完全な粒子を形成しエキソサイトーシスにより細胞外へ分泌される。一方、マイクロベシクル（MVs）は、細胞膜が外側へ出芽して分離することによって生成される。その大きさは、直径 100～1,000 nm と、かなり広範囲に分布している。 アポトーシス小体は、細胞が組織的な細胞死（アポトーシス）を起こすことで生じる。その大きさは、広範囲にわたり（直径 50 ～ 5,000 nm）、その範囲はエクソソームや MVs と重なっている。エクソソームと MVs は、細胞内での起源が異なるにもかかわらず、この２種類の細胞外小胞の産生には共通の細胞内メカニズムと機構が関与している。図 1 のように、EVs の内部には、RNA や DNA の断片、すなわち dsDNA, mRNA, miRNA などを有しており、エンドサイトーシスによって細胞に容易に取り込まれる他、抗原マーカーも有しているので、ウイルスなどと同様に細胞内に mRNA などを伝達することも可能である。この点から、細胞情報伝達を担っている。例えば、miRNA-92a は、18 - 22 塩基の小分子 RNA の一種で細胞内で mRNA と結合してその転写を制御することが知られている。この miRNA-92a は、急性白血病や悪性リンパ腫、骨髄種患者由来の血清中において著減することが発見され、ここで述べた病気に関するバイオマーカーとして注目されている。miRNA の分泌に関わる機構はエクソソームだけではなく、アポトーシス小体も担っている。以上の点から、エクソソームの本来の機能を理解するためには、その単離と分析及び生命現象との関連付けが必要である。エクソソームの本来の機能を解明できれば、生命現象の理解や病気の抑制や根治などへつながる可能性がある。

本研究では、エクソソームの単離と内容物に関する分子レベルでの理解を行い、各エクソソームの役割を精密かつ定量的かつ系統的に解明するためのナノマイクロ化学システムを創生する。ナノ構造表面増強ラマン散乱活性を有する電極を配置した in situ 電気化学マイクロ流路と表面弾性波(SAW)を組み合わせた統合システムを用いることで、分泌物やエクソソームを任意に単離して抽出しつつ、内容物を分子レベルでその反応過程などを制御しながら、追跡することで機構解明と治療などへの応用展開を図る。

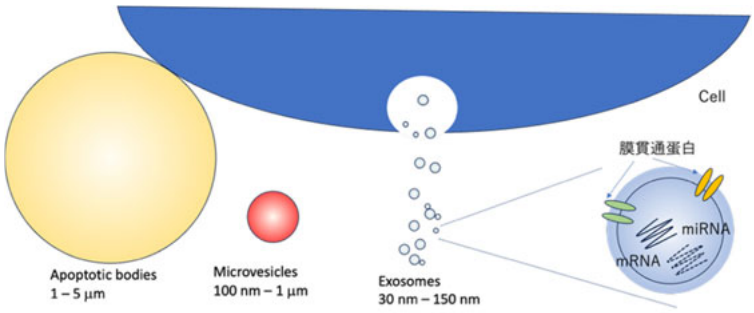


図 1 細胞外小胞体の産生概念図とエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体のサイズおよび内容物の概念図

2. 研究の計画

血液、唾液、尿、精液、喀痰、母乳、脳脊髄液など様々なところから取得可能なエクソソームであるが、分離と機能解明を結びつけるのが難しい。超遠心分離法、沈殿法、濾過法、サイズ排除クロマトグラフィ法、抗原抗体反応(ELISA)法で分離されるが、一般的なのは遠心力を用いた分離である。遠心力は重さのみで分離するので、単分離することは困難である。加えて、内容物を特定して分離することもできない。

そこで、近年、注目されているのが表面弾性波(SAW)を用いたマイクロ化学システムである。ペンシルバニア大学の Wu ら(PNAS 114(2017) 10584.)は、血液中に含まれるエクソソームおよびマイクロベシクルを見立てて、マイクロ流路に SAW を照射することで、分球することに成功した。非常に精度がよく効率が良い手法であることが実証されている。しかし、このシステムには、非常に大きな欠陥がある。それは SAW を発生させる圧電体基板そのものに SAW 発生、流路などをすべて実装して組み込む必要があり、コンタミ（汚染：異なる生体由来の試料が混ざる）が起き

る可能性がある点である。コンタミがあれば、結果に重大な問題を引き起こすことが予想される。申請者らは、マイクロ流路と SAW 基板の間にカップリング液を導入することで、コンタミなしでマイクロ流路に SAW を用いた送液や混合などの単位化学操作を行えることを実証した。また、エクソソーム内に含まれる mRNA や miRNA 他、低分子から高分子の材料について、その分光分析や電気化学反応による酸化還元機能などの究明を行うことは、エクソソームの理解や生体内での役割を理解することにつながるそこで、これらの分光イメージングを行うために、貴金属ナノ構造をマイクロ流路に配置したシステムと顕微分光システムの構築を行う必要がある。これらの要素技術を組み合わせ統合化することで、エクソソームの分離・抽出と機能解明を実施し、病気の発生機構の解明や創薬への展開を実施したいと考えた。

以上の内容を 3 年計画にして、表 1 に示す計画実施案を考案した。

表 1　研究項目と実施計画案

研究項目	2025		2026		2027	
	前半	後半	前半	後半	前半	後半
顕微システムの創製	←――→					
SAW システムの創出と評価	←――→		←――→			
電気化学反応計測系の構築と運用	←――→		←――→		←――→	
統合型システムの創出とバイオ応用				←――→	←――→	

3. 研究の成果

以下、2025 年度の研究成果を行う。本年度は、このカップリング液を用いた手法を発展させて、SAW 励起機構とマイクロ流路を分離して組み合わせて用いるシステムの創製を行い、基本的な単位化学操作の特性理解や制御を確立した。

図 2 に示したシステムを用いて、酵素免疫測定法(ELISA)の一部のプロトコルにおいて、SAW による混合プロセスを実施した例を図 3 に示す。図 3(a)に実験セットアップ概略図を示し、取り替え可能なマイクロカップ内での発色基質と抗体反応の模式図を図 3(b)に示す。SAW による混合がある場合とない場合での 650 nm での吸光度の濃度依存性を示したのが図 3(c)である。こ

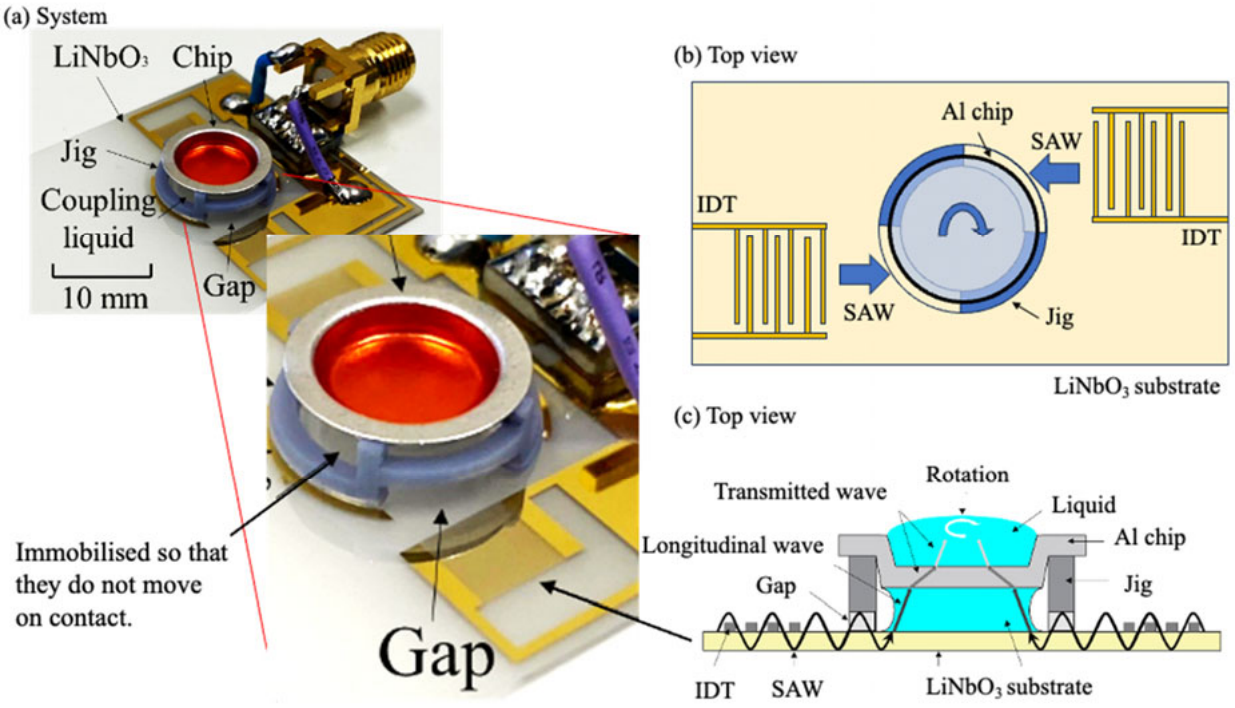


図 2 (a) SAW を用いた取り外し可能で試薬汚染をしないマイクロ混合システムの外観とそれを(b)上部から見た時の模式図並びに(c)真横から見た時の模式図

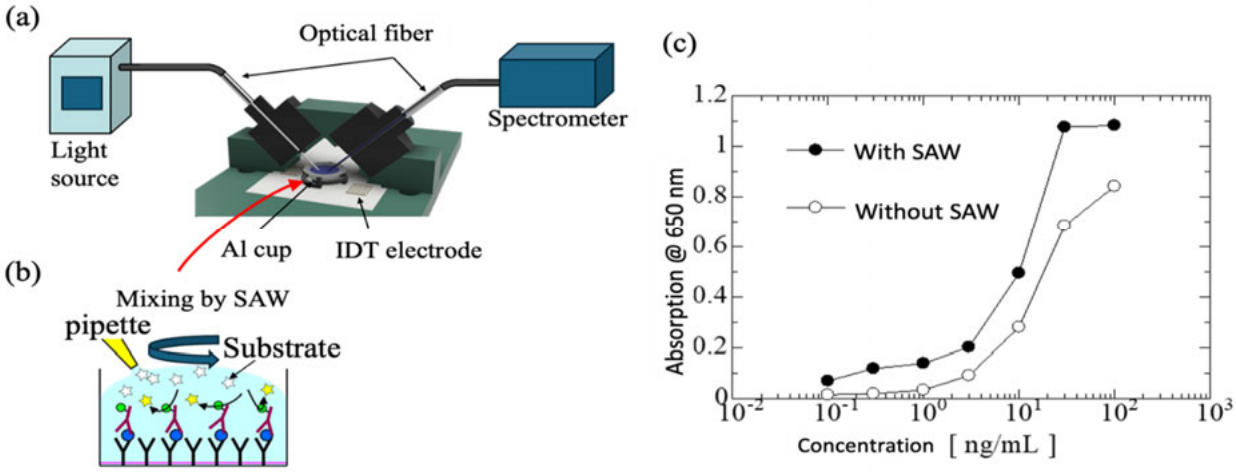


図 3 (a) SAW を用いた取り外し可能なマイクロチップを用いた ELISA 実験セットアップ概念図 (b) マイクロチップ内での反応概念図 (c) SAW 印加ある場合と SAW 印加ない場合の吸光度の IgG(H+L)濃度依存性

こでは、酵素標識抗体として、抗 IgG(H+L)（マウス・ヤギポリクローナル抗体）と西洋わさびペルビン酸オキシターゼ(HRP)(1mg/mL)を使用し、基質溶液としては、テトラメチルベンジジンを用いた。この２液を混合すると、抗体標識酵素である HRP が基質溶液中の過酸化水素水を分解して、活性酵素を生成する。生成された活性酵素は非常に不安定であり、酸化剤として作用し、TMB を酸化することで、酸化色素を生成して吸光度が変化する仕組みである。結果として、SAW による混合が反応効率を向上させ、有効に作用することが実証された。これまでの研究事例では、圧電体基板表面に直接、混合系を構築する例ばかりであったが、提案システムを用いることで取り替え可能で汚染しない混合システムの構築ができることを示した。この他、粉体輸送に関してもカップリング溶液を圧電体基板とマイクロチップを分離できることを示し、粉体と液体の輸送報告が逆方向になることを利用して、両者を混合できることなどを実証した。(A. Yamaguchi *et al.*, *ACS Measurement Science Au* 5, 4, 489 - 496 (2025).

さらに、金ナノ構造を電極に構築することで、電気化学反応や固液界面での酸化還元反応を精密制御しながら、表面増強ラマン散乱(SERS)でその化学反応追跡を分光的に行う仕組みの構築も実施した。図 4 に示した例は、マイクロ化学チップに実装した金ナノ構造電極に硝酸鉄水溶液を入れてサイクリックボルタンメトリーを実施しながら、その場で SERS 計測を実施し SERS 強度をカラーマップ化して表示した例である。1500 cm^{-1} 付近で 3 つのスペクトルが時間で振動している様子がわかる。このピークは硝酸イオンに由来するピークで電気化学反応が固液界面で起きていることを直接検出していることを示している。これらの結果は、現在、論文としてまとめており、投稿中のものが含まれるので、概要のみを紹介した。

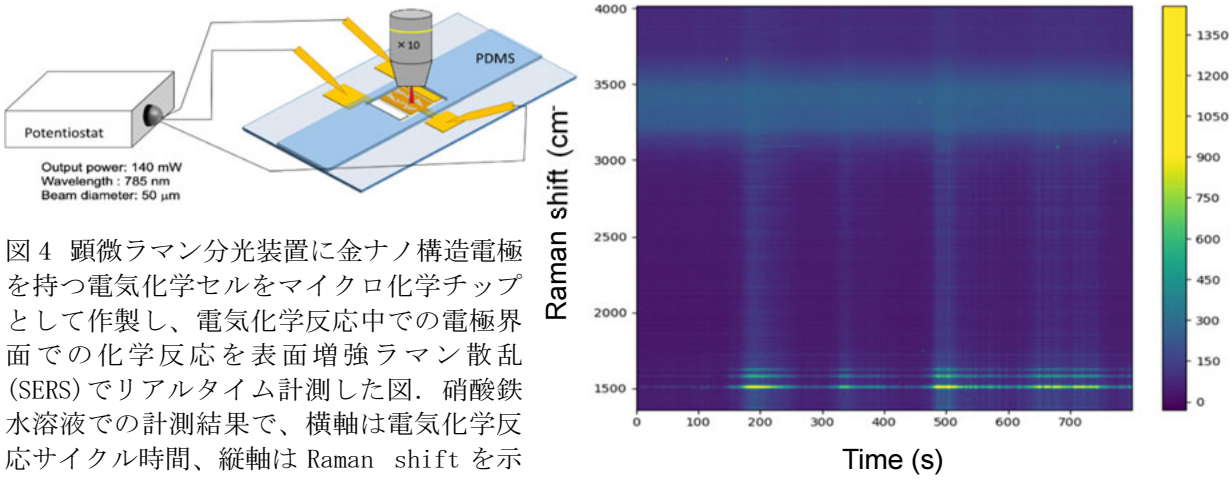


図 4 顕微ラマン分光装置に金ナノ構造電極を持つ電気化学セルをマイクロ化学チップとして作製し、電気化学反応中での電極界面での化学反応を表面増強ラマン散乱(SERS)でリアルタイム計測した図．硝酸鉄水溶液での計測結果で、横軸は電気化学反応サイクル時間、縦軸は Raman shift を示している。

4. 研究の反省・考察

顕微ラマン分光システムを構築し、SAW 励起システムと電気化学反応中の表面増強ラマン散乱分光計測を統合することに向けて、研究開発を進めている。これまでのところ、表１に示した計

画通りに進んでいるが、１点課題も見つかった。それは、高倍率のレンズを用いるとマイクロチップや電極との干渉が生じ、高倍率での観測・計測が難しい点である。そこで、ワーキング・ディスタンスの長いレンズを探して顕微ラマン分光システムを構築すれば、上記の課題を解決できた可能性がある。今後、レンズの交換とマイクロチップと電極との配置なども総合的に考えて、システムの設計と構築を実施したいと考えている。これまでに研究開発してきた SAW 励起機構、ナノ構造電極、電気化学反応機構、SERS 分光追跡など複数の機構を統合化することで、エクソソームの単離およびその分析を進めるとともに、細胞を播種した時にエクソソームが取り込まれて反応する過程などを直接追跡するような仕組みを構築していきたいと考えている。

5. 研究発表

(1)学会誌等

1) Akinobu Yamaguchi, Masatoshi Takahashi, Satoshi Amaya, and Tsunemasa Saiki, “Disposable. Microchip Platform with Removable Actuators Using SAW Excitation”, *ACS Measurement Science Au* 5, 4, 489 - 496 (2025). https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.5c00027
2) Shunya Saegusa, Masayuki Naya, Takao Fukuoka, Miyuki Tabakta, Koji Sumitomo, and Akinobu. Yamaguchi, “Microchemical systems for simultaneous measurement of surface-enhanced Raman scattering and electrochemical reactions”, *Scientific Reports* **15**, 18574 (2025). https://www.nature.com/articles/s41598-025-02647-y
3) 山口明啓, 明日にかける 「理想的な科学実験系と応用展開を目指したナノマイクロシステ. ムの活用事例」, 製剤機械技術学会誌 Vol. 34, No. 5, 75 - 86 (2025).

(2)口頭発表

1) Akinobu Yamaguchi, Syunya Saegusa, Masayuki Naya, Takao Fukuoka, Koji Sumitomo, Miyuki. Tabata, “Microchip for in situ SERS monitoring during electrochemical reaction”, P2-33, The 11th international Conference on Surface Plasmon Photonics, Hitotsubashi Hall, Japan (2025). (Poster)
2) 原田 栞大朗, 田畑 幸太, アルムレーキ シェイカ, 山口 明啓, “EC-SERSプラットフォームを用いた硝酸鉄、硫酸銅、酢酸銅の電気化学反応に関する研究”, G1_1_22, 2025電気化学秋季大会, 鳥取大学, 2025年
3) 山口 明啓, 花田 賢志, 関口 博史, 福岡 隆夫, 安永 峻也, 岡田 育夫, 櫻井. 郁也, “X線光化学反応における金ナノ粒子生成のX線エネルギー依存性”,G1_2_11, 2025電気化学秋季大会, 鳥取大学, 2025年
4) 田畑 幸太, 原田 栞大, ALMURAIKHI SHAILHA, 山口 明啓,”電気化学反応における表面修飾分子依存性”, S1_1_12, 2025電気化学秋季大会, 鳥取大学, 2025年
5) アルムレーキ シェイカ, 原田 栞大朗, 田畑 幸太, 山口 明啓, “電気化学表面増強ラマン散乱プラットホーム”, S11_2_06, 2025電気化学秋季大会, 鳥取大学, 2025年
6) Akinobu Yamaguchi, Masatoshi Takahashi, Satoshi Amaya, Tsunemasa Saiki, ”Replaceable. micromixer agitated by surface acoustic wave”, Oral Session 5C: Micro-Nano Systems I, 51st International Micro and Nano Engineering Conference, National Oceanography Centre, Southampton, United Kingdom, 15 -18 September 2025.
7) 山口明啓, 髙橋正俊, 天谷諭, 才木常正, “表面弾性波マイクロアクチュエータとマイクロ化学システム”, 第１１回材料WEEKワークショップ, 京都テルサ, 10月6日- 9日, 2025年 (他、5件)

(3)出版物

1) Akinobu Yamaguchi, Nano-Microsystems: Science and applications, IOP Publishing (著書)
https://iopscience.iop.org/book/mono/978-0-7503-3111-1

