

[研究助成 (A)]

イオノエレクトロニクスに基づく生体微粒子の機能解明

2251021

研究代表者
(助成金受領者)

東京農工大学

講師 田 畑 美 幸

[研究の目的]

近年、0.1-1 μm の細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EVs) が細胞間情報伝達の重要な担い手であり、がんの進行・転移、神経変性疾患、免疫応答など多様な病態と密接に関連することが明らかになりつつある。EV は血液、尿、唾液などの体液中に安定して存在するため、患者負担の少ない体液診断における新規バイオマーカーとして大きな期待が寄せられている。しかし、従来の FACS や NTA といった光学的 EV 解析手法は、装置の大型化、光学系の複雑性、前処理の煩雑さなどの制約から、急性期医療現場で求められる迅速性・簡便性を備えた POCT (point-of-care testing) 機器としての実装が困難である。この制約は、体液診断の臨床応用を加速させる上で大きな障壁となっている。

一方、EV の生物学的意義や発生メカニズム、疾患特異性を示す膜タンパク質や表面電荷の違いなど、基礎的理解が未解明な点も多く、単一 EV レベルでの高精度計測技術の確立が強く求められている。特に、EV のゼータ電位はその起源細胞や病態に依存して変化する可能性が指摘されており、電気的特性に基づく新たな識別指標として有望である。

本研究では、イオンと電子の両方を情報の担体とするイオノエレクトロニクスの概念を基盤とし、シリコンナノワイヤ電界効果トランジスタ (SiNW-FET) を用いたシングル EV 計測デバイスの開発を目的とする。200-300 nm 開口

のウェル構造を有する SiNW-FET を作製し、単一 EV の吸着挙動を電氣的に捉えることで、EV 間のゼータ電位差を識別可能な計測基盤の構築を目指す。

これにより、将来的には光学系を必要としない小型・低消費電力の EV 計測技術を実現し、POCT 機器としての展開に向けた技術的基盤を確立する。最終的には、EV 表面特性と疾病との関連性を高精度に評価できる新規診断手法を創出し、体液診断科学にイオノエレクトロニクスを融合した新たな学問領域の確立に寄与することを目指す。

[研究の内容、成果]

〈EV の回収とゼータ電位測定〉

ヒト乳がん細胞株 (MDA-MB231) および、ヒト乳管上皮細胞株 (MCF10A) を 37°C、5% CO_2 雰囲気下で培養したのち、無血清培地に交換した。48 時間のインキュベーション後、上清液を回収し、超遠心にて EV を回収した。ペレット化した EV を pH 7.4 のビストリスプロパン緩衝液 (BisTris propane buffer, BTP buffer) で洗浄し、EV 懸濁液を回収した。懸濁液中の EV の含有量および粒度分布は、ナノ粒子トラッキング解析 (Nanoparticle tracking analysis, NTA) の NanoSight システムを用いて測定した。また、各細胞由来の EV のゼータ電位は動的光散乱法 (Dynamic light scattering, DLS) を用いて測定した。

EV はアポトーシス小体，マイクロベシクル (Microvesicles, MV)，エクソソームの 3 つ微小生体分子の総称である。これらはその生成過程に違いがあり，サイズも異なる。アポトーシス小体は 1-5 μm ，MV は 100-1000 nm，エクソソームは 40 ~ 160 nm 程度の直径を有するとされる^(1, 2)。細胞培養上清から超遠心法で回収した粒子は NTA 法にて解析し，その粒子径は 130 nm 程度であった。この結果からがん細胞および健常細胞由来の EV が回収されていること，また，回収したサンプルはエクソソームと MV を中心として構成されていることが示された。細胞は膜上にタンパク質や糖鎖を有していることから，通常生理環境下で負の電荷を有している。同様に，EV もその膜特性から負電荷を帯びており，SiNW-FET を用いた電気的な検出が見込まれる。さらには，がん細胞と正常細胞では，主にはシアル酸の発現量の差に起因する膜特性の違いにより，がん細胞由来の EV が正常細胞由来の EV と比べて，より負に帯電していることが既に明らかにされている⁽³⁻⁵⁾。実際に DLS にて回収した EV のゼータ電位を測定したところ，乳がん細胞株である MDM-MB231 由来の EV の方が 4 mV 程度負に帯電している結果が得られた。

〈SiNW-FET の作製と特性評価〉

SiNW-FET の作製は，p 型 SOI 基板を用いて，EB リソグラフィー，Si エッチング等のプロセスを経てアクティブ領域を形成した後，ソース / ドレイン，ゲート絶縁膜，コンタクトホール，アルミ電極を形成した。その後，保護膜として形成した電子線レジストに適切なサイズのホールをあけ，ゲート絶縁膜層が露出した SiNW-FET を得た。

SiNW-FET をバイオセンサとして利用するために，まずは液中動作の安定性を評価した。本実験で利用した実験系を図 1 に示す。参照電極には Ag/AgCl 電極，ゲート絶縁膜は $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{SiO}_2$ スタック構造を用いた。絶縁膜が金属酸

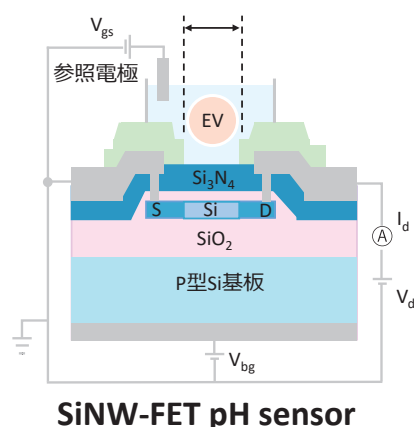


図 1 試作した SiNW-FET の断面図

化物や窒化シリコンである場合 pH 応答を示すことはよく知られており，これは，金属酸化物表面に存在する水酸基が暴露した溶液に存在する水素イオンと相互作用し，その解離状態が変化することに起因する。まずは各 pH 標準緩衝液に対する V_g - I_d 特性を評価した。用いた標準緩衝液は，pH 4（フタル酸塩標準液），pH 7（中性リン酸塩標準液），pH 9（ホウ酸塩標準）とした。一般的に ISFET の出力電位の変化はネルンスト式（式（1））に従う。

$$E = E_0 - (RT/zF) \ln \alpha = E_0 - 59.2 \text{pH} \quad \text{式 (1)}$$

E ：電極電位， E_0 ：標準電極電位， R ：気体定数

T ：絶対温度， z ：移動電子数， F ：ファラデー定数， α ：活量

pH 4, 7, 9 の各 pH 標準緩衝液に対する V_g - I_d 特性を計測（図 2）したところ，閾値電圧が正の方向にシフトしていることがわかる。さらに，ドレイン電流 1 μA を基準とした際の pH に対する電圧値の変化を求めたところ，傾きは 45.8 mV/pH であった。この値は，ネルンスト式より求められる室温での pH 感度の理論値であるネルンストの傾き（室温での理論値：59.2 mV/pH）には一致しないものの，本デバイスが pH 応答を示し，液中 pH 計測を実現していることを示す。このことより，作製した SiNW-FET

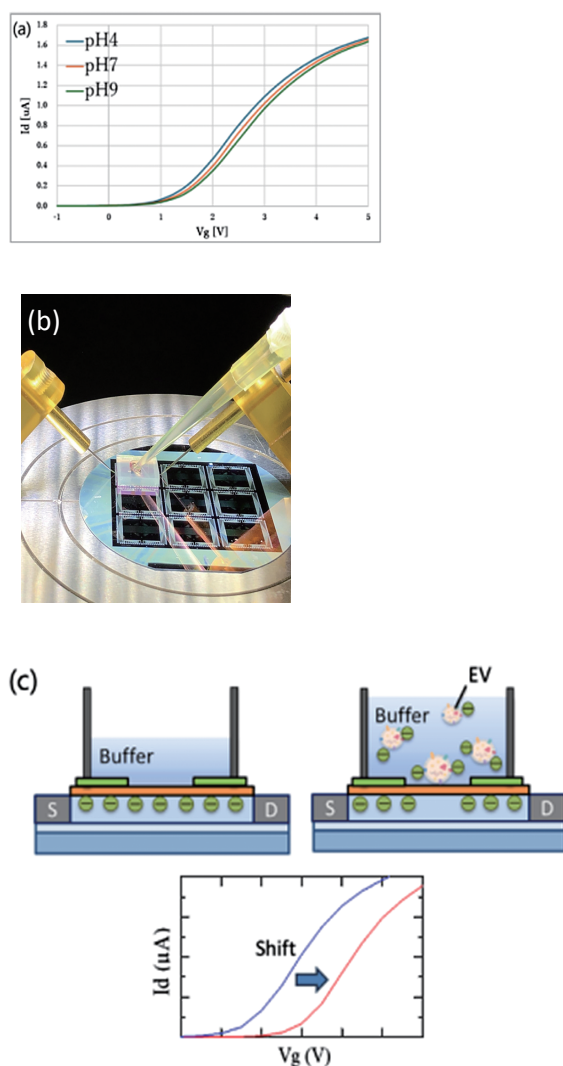


図2 SiNW-FETの電気特性評価

(a) 各pH標準液に対する V_g - I_d 特性, (b) 測定の様子, (c) EV検出の概念図。緩衝液を基準として負に帯電したEVを添加することによって変化するチャネル内の電荷密度変化を閾値電圧のシフトとして検出する。

の液中動作を確認することで、バイオセンサとして使用可能な性能を備えていることが認められた。SiNW-FETは、絶縁層を介した外部電場との相互作用に対応するチャネル内の電子密度の変化を検出することができる。この液中動作の確認結果からEVの負電荷に着目した電位シフトが観測されることが予測された。

〈EVサンプル溶液の電流－電圧特性評価〉

図1に示した実験系を用いて、EV溶液の電

位測定を行った。レジストホールサイズはEVが最大3個捕捉可能な設計となっている。BTP溶液50 μl の電位を基準として V_g - I_d を測定した後、EVをBTP溶液に分散させたサンプル溶液50 μl を添加した際の閾値電圧の変化を測定した。ネガティブコントロールとしてBTP溶液50 μl にBTP溶液50 μl を添加したEVなしの場合の閾値電圧変化を測定し、EVありなしの閾値電圧変化を比較した。

EVを含む懸濁溶液の電位測定を行った結果、EVの添加により、乳がん細胞であるMDA-MB231由来のEVは基準から電位がおよそ+60 mVシフトし、健常細胞であるMCF-10A由来のEVはおよそ+50 mV正の方向にシフトした。このことより、作製したSiNW-FETは絶縁膜近傍に存在するEVを電氣的に測定可能であることが分かった。乳がん細胞であるMDA-MB231由来のEVは健常細胞であるMCF-10A由来のEVと比べて約+10 mV正にシフトしていることが確認されたが、ゼータ電位測定の結果において、MDA-MB231はMCF-10Aと比べてより負に帯電していることが分かっており、これらの電位シフトはSiNW-FETのチャネル電荷密度の変化を反映していると考えられる。以上のことより、SiNW-FETを用いた測定により負に帯電しているがん細胞由来のEVを健常細胞由来のEVと区別して検出できる可能性が見出された。

引き続き、EVの濃度を変えて同様の測定を行った。どちらのサンプルもオリジナルの濃度から10倍ずつ希釈し、1 mlあたり 10^5 個まで希釈し、測定を行った。MCF10A由来のEVを $10^5 \sim 10^9$ 個の範囲で測定を行った結果では、 10^5 個 $\sim 10^8$ 個までは、ノイズに埋もれ、明確な変化はなく、 10^9 個で大きな閾値電位の変化が得られた。次に、MDA-MB231由来のEVサンプルを $10^5 \sim 10^{11}$ 個まで変化させて測定を行った結果では、MDA-MB231の結果でもMCF10A由来のEVの結果と同じく、 10^8 個まで変化はなく、 10^9 個から閾値電位の変化を計

測し、それ以降の濃度でも閾値電位の変化が見られた。また、 $10^9 \sim 10^{11}$ 個では、濃度の増加に伴ったシフト量の増加はなく、 10^9 個の結果で得られた 50 mV の電位変化量と同じだけの横ばいの結果が得られた。以上のように、濃度に対して閾値変化量が増加する濃度依存的な変化が得られたものの、 10^8 個から 10^9 個の間に電位シフトのオン/オフがあることが見出された。EV は SiNW 上に 1-3 個ほど収容可能な設計としていることから考えると、濃度変化に対して、現状の計測系においてセンサ上に付着する EV の数に影響を与える濃度が 10^9 個/mL であることが分かった。

〈まとめ〉

本研究では、SiNW-FET を用いた単一 EV レベルの電氣的検出手法の確立を目指し、EV 懸濁溶液の電位測定を行った。200-300 nm のレジストホールを備えたデバイスを用いて、基準溶液 (BTP) に対する閾値電圧変化を評価した結果、EV の存在に応じて明確な電位シフトが生じることを確認した。特に、乳がん細胞 MDA-MB231 由来 EV では約 +60 mV、健常細胞 MCF-10A 由来 EV では約 +50 mV の正方向シフトが観測され、SiNW-FET が絶縁膜近傍に存在する EV の吸着挙動を電氣的に捉えられることが示された。また、MDA-MB231 由来 EV は MCF-10A 由来 EV より約 +10 mV 大きくシフトしたが、ゼータ電位測定では MDA-MB231 の方がより負に帯電していることが分かっており、この差異はチャネル近傍の電荷密度変化を反映した結果であると考えられる。これらの結果から、SiNW-FET により負に帯電したがん細胞由来 EV を健常細胞由来 EV と区別して検出できる可能性が示唆された。

さらに、EV 濃度を $10^5 \sim 10^{11}$ 個/mL の範囲で変化させて測定したところ、いずれの細胞由来 EV においても 10^8 個/mL までは閾値電圧変化がノイズに埋もれたが、 10^9 個/mL で明確な

電位シフトが出現し、それ以上の濃度ではシフト量が横ばいとなった。これは、本デバイスの構造上、センサ表面に付着する EV 数が濃度 10^9 個/mL 付近で急激に増加し、1-3 個の EV がホール内に収容される確率が閾值的に変化するためと考えられる。以上より、SiNW-FET を用いた EV 検出は濃度依存的な応答を示しつつ、特に 10^9 個/mL 付近でオン/オフ的な電位シフトが生じることが明らかとなった。

本研究により、SiNW-FET を用いた EV 吸着に基づく電氣的識別が可能であること、さらにがん細胞由来 EV と健常細胞由来 EV の電氣的特性差を捉えられる可能性が示された。これらの成果は、光学系を必要としない小型・簡便な EV 計測デバイスの実現に向けた重要な基盤となり、将来的な POCT 機器としての応用に大きく寄与するものと期待される。

〈謝辞〉

本研究の一部は、公益財団法人 立石科学技術振興財団、生体医歯工学共同研究拠点、文部科学省マテリアル先端リサーチインフラ事業 (ARIM) の支援を受けて実施された。ナノ粒子トラッキング解析は富士フィルム和光純薬株式会社にて実施された。

〈参考文献〉

- (1) David G Meckes Jr and Nancy Raab-Traub: "Microvesicles and Viral Infection", Journal of Virology, Vol. 85, No.24, 12844-12854 (2011)
- (2) Raghu Kalluri and Valerie S. LeBleu: "The biology, function, and biomedical applications of exosomes", Science, Vol 367, No.6478 (2020)
- (3) Ryu Nakabayashi, Rie Koyama, Masafumi Inaba, Michihiko Nakano, and Junya Suehiro: "Quantitative evaluation of dielectrophoretic separation efficiency of cancer exosomes based on fluorescence imaging", Japanese Journal of Applied Physics, Vol 63, No.3 (2023)
- (4) Sara H. Tamrin, Jolene Phelps, Amir S. Nezhad, and Arindom Sen: "Critical considerations in determining the surface charge of small extracellular vesicles", Journal of Extracellular Vesicles, Vol 12, No.9 (2023)

(5) Takanori Akagi, Kei Kato, Masashi Kobayashi, Nobuyoshi Kosaka, Takahiro Ochiya, and Takanori Ichiki: "On-Chip Immunoelectrophoresis of Extracellular Vesicles Released from Human Breast Cancer Cells", PLOS One (2015)

[成果の発表, 論文など]

1. Miyuki Tabata, Cell-based field-effect transistors and their medical application, The 22nd International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology, May 20-23, 2025, Oral, Invited

2. Kazuya Suzuki, Miyuki Tabata, Yuji Miyahara, Takahiro Arakawa, Development of a Reference Electrode Integrated Ir/IrOx Thin film pH Sensor for microRNA Detection, 18th International Conference on Sensing Technology (ICST2025), December 1-3, 2025, Oral

3. Kazuya Suzuki, Miyuki Tabata, Yuji Miyahara, Takahiro Arakawa, Development of an integrated reference electrode pH sensor chip and investigation of a label-free microRNA detection, International Meeting on Sensors and Microsystems for Sustainable Development Goals 2026 (IMSM-SDGs 2026), March 27-28, 2026, Oral (MSS-26-025, CHS-26-002, BMS-26-002)