

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18728

研究課題名（和文）新規迅速バイオ診断手法のための誘電体微粒子の分極特性の解明

研究課題名（英文）Study of polarization of dielectric particles for developing rapid diagnosing methods

研究代表者

中野 道彦（Nakano, Michihiko）

九州大学・システム情報科学研究所・准教授

研究者番号：00447856

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：微粒子の分極について、その表面の導電率と誘電率からなる複素誘電率に着目した。微粒子表面の導電率は、ゼータ電位を測定することで得られる。一方、誘電率の測定法は確立しておらず、レーザー回折で測定できるかどうかを検証した。誘電体微粒子にDNAを結合し、そのレーザー回折・散乱光角度を計測したところ、DNA結合微粒子と未結合微粒子とで異なる結果が示され、微粒子表面の誘電率測定の可能性が示された。また、生体関連物質のひとつであるエクソソームの誘電体特性を調べ、その膜キャパシタンスが由来細胞と同等であること、正常細胞とがん細胞由来のエクソソームでは分極特性（誘電泳動特性）が異なることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、様々なバイオ関連物質を検出するための共通のプラットフォーム構築を目指し、微粒子表面に附着した物質の誘電率を測定する方法を考案した。これまででない新しい手法として、微粒子のレーザー光の回折・散乱光を用いることを試みた。その結果、表面に結合DNA分子によって、回折・散乱光が変化することを示し、本手法がこれまで不可能であった微粒子表面の誘電率測定の手法として使用できる可能性を示した。また、エクソソームの誘電体特性が由来細胞によって異なることを示し、特に、がん細胞由来エクソソームの特性を明らかにし、エクソソームを用いた診断の簡素化・迅速化の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate the polarization of a dielectric particle by considering its surface complex permittivity consisting of electric conductivity and permittivity. The surface conductivity can be estimated by measuring its zeta potential. Otherwise, a method to measure the surface permittivity has not been established. This study experimented on whether the laser diffraction from it represents the difference in its surface permittivity. As a result, DNA-labeled and non-labeled microbeads showed different diffraction patterns. It could mean the difference in the permittivity of the DNA attached to the particle surface. The dielectric property of exosomes was investigated. The exosome is one of the extracellular vesicles and is considered a biomarker for cancer diagnosis. From the measured dielectrophoretic property of the exosomes derived human breast cancer and normal cells, the membrane capacitance of the exosomes represents almost the same as that of the derived cells.

研究分野：静電気生物応用

キーワード：微粒子 分極 屈折率 誘電率 DNA分子 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

誘電泳動 (dielectrophoresis, DEP) は不平等電界中に置かれた誘電体に働く現象で、誘電体と周りの溶媒との分極の違いによって生じる。その分極は、誘電率と導電率からなる複素誘電率に依存する。分極によって、微粒子は微細電極に捕集 (positive DEP, p-DEP)、あるいは、電極から反発 (negative DEP, n-DEP) する。

申請者が開発した微粒子誘電泳動 DNA 検出法 (図 1) は、『誘電体微粒子の導電率は表面コンダクタンスに依存する』、ということから着想を得た。表面コンダクタンスは表面電荷密度に依存するので、電荷を有する DNA を微粒子に結合させると、微粒子の導電率が変化し、誘電泳動が変化すると考えた。このとき、誘電泳動が n-から p-DEP に変われば、DNA 結合微粒子のみを選択的に捕集する。本手法は、Real-time PCR と同等の検出感度 (2 個, 検出時間 25 分) を持つ (Biosens. Bioelectron. 117 (2018) 583-89)。

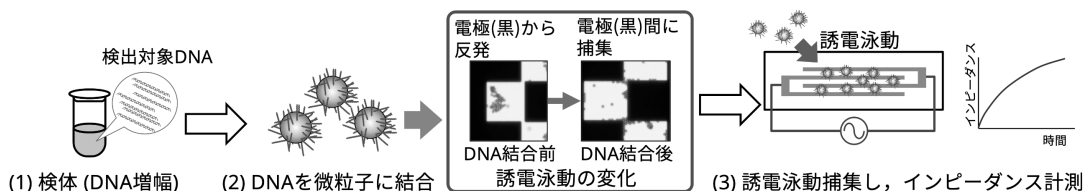


図 1 微粒子誘電泳動 DNA 検出法

ところが、本法を検証したところ、DNA が有する電荷だけでは説明できない結果が得られた。分極には複素誘電率が関与していることから、DNA の誘電率が微粒子の分極に作用していることが示唆された。これは、従来の界面電気現象の理解では説明できないものである。

様々なバイオ関連物質 (タンパク質, 細胞外小胞 (エクソソーム等), インターロイキン, アレルゲンなど) は、それぞれ固有な複素誘電率を持っていると予想できる。そのため、微粒子表面に結合させて分極特性などを簡単に計測する手法を実現すれば、それらを迅速かつ簡便に検出する共通のプラットフォームへ進化できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

誘電体微粒子の分極は複素誘電率に依存する。これまでは複素誘電率のうち導電率の影響については詳しく調べられているものの、誘電率の影響についてはよくわかっていない。そこで、本研究では、微粒子表面に付着した物質の誘電率の分極に対する影響を明らかにし、その応用として、様々なバイオ関連物質を検出するための共通のプラットフォーム構築を目指す。その第 1 歩として、微粒子表面に結合した DNA の誘電率を測定可能かどうか検討する。また、バイオ関連物質のひとつであるエクソソームの誘電体特性をその誘電泳動特性から明らかにする。

3. 研究の方法

(1) レーザー回折式粒度分布測定法を用いた微粒子表面の誘電率測定の可能性検証

レーザー回折式粒度分布測定法による微粒子表面の誘電率の測定が可能かどうかを検証する。微粒子の分極が変化しているとき、微粒子の導電率と誘電率の関数である複素誘電率が変化している。微粒子の導電率は表面コンダクタンスに依存し、これはゼータ電位によって求められる。物体の電荷は化学構造から決まり、ゼータ電位の測定はすでにその手法が確立している。他方、結合物質による誘電率の変化については、その測定手法が定まてはいない。そこで本研究にて結合物質による誘電率の変化の測定のための新しい測定法を試みる。ここでは、レーザー回折式粒度分布測定法を応用する。レーザー回折式粒子径測定法は、レーザー光の回折パターンと試料の屈折率から粒度分布を計算する。屈折率と誘電率は本質的には同じものであることから、本研究では、回折パターンと屈折率の関係に着目し、回折パターンの変化による誘電率の測定を試みた。

直径 2.8 μm の誘電体微粒子の表面に DNA (391 bp) を結合し、その DNA 結合微粒子について、レーザー回折式粒度分布測定装置 (島津製作所, SALD-2300) を用いて計測し、DNA 未結合微粒子と比較した。

(2) エクソソームの誘電泳動特性測定と誘電体特性の見積もり

バイオ関連物質であるエクソソームの誘電泳動特性を測定し、その誘電体特性を見積もった。エクソソームは、細胞外小胞の一種の直径 100 nm 程度の微小ナリポソーム様粒子である。生体内の様々な細胞がエクソソームを放出していることが分かっており、また、由来細胞の情報 (核酸, タンパク質, 膜タンパク質など) を保持していることから、近年、がんなどの疾患のバイオマーカーになるのではないかと注目されている。特に、血液, 尿, 汗などの体液中にエクソソームが存在することから、低侵襲ながん診断のために重要であるとされる。

本研究では、がん細胞由来エクソソームが正常細胞由来エクソソームと異なる電気的特性を持っているのではないかと考え、それをそれぞれの誘電泳動特性から明らかにすることを試みた。さらに、得られた誘電泳動特性からエクソソームの誘電体特性について見積もった。

ヒト乳がん細胞 (MCF-7) 由来エクソソームとその比較として、ヒト母乳エクソソームと牛乳エクソソームを用いた。それぞれをリン脂質膜結合蛍光色素で染色し、その誘電泳動特性を顕微鏡で観察した。さらに、その結果から、それぞれのエクソソーム誘電体特性について見積もった。

4. 研究成果

(1) レーザー回折式粒度分布測定法を用いた微粒子表面の誘電率測定の可能性検証

DNA 結合微粒子と未結合微粒子とをレーザー回折式粒度分布測定計で測定した。粒度分布測定計が示した粒度分布を図 2 に示す。同じ微粒子を用いているのにも関わらず、DNA 結合微粒子の方が未結合微粒子に対して平均径で約 1.5 μm 程度小さな値を示した。

粒度分布の計算の基になった回折・散乱角分布を図 3 に示す。DNA 結合微粒子では、回折・散乱角度の小さいところ (10° 以下) と大きいところ (センサ素子番号 68 番以上) の回折・散乱光強度が小さくなっていることが示された。これは、微粒子表面に結合した DNA 分子によって回折・散乱光が変化したことを示唆しており、また、DNA 結合微粒子の屈折率、すなわち誘電率が未結合微粒子に対して変化していることを示唆している。すなわち、微粒子表面の DNA 分子が、粒子全体の誘電率を変化させている可能性が示された。この結果は、これまでに示されたことはなく、DNA の屈折率についてレーザー回折式粒度分布測定によって測定できる可能性について初めて示した。これまでの DNA 分子の屈折率に関する研究は、平板基板などに大量の DNA を付着させて、その DNA 層の屈折率を測定していた。本研究のように、微粒子表面上に結合した DNA についての研究は皆無であり、本研究が目指すバイオ関連物質を検出するための共通のプラットフォーム構築の実現可能性を示した。

(2) エクソソームの誘電泳動特性測定と誘電体特性の見積もり

乳がん細胞由来エクソソームとヒト母乳エクソソーム、牛乳エクソソームを比較したところ、それらの誘電泳動特性が大きく異なることが示された (図 4)。図 4 に誘電泳動特性の一つであ

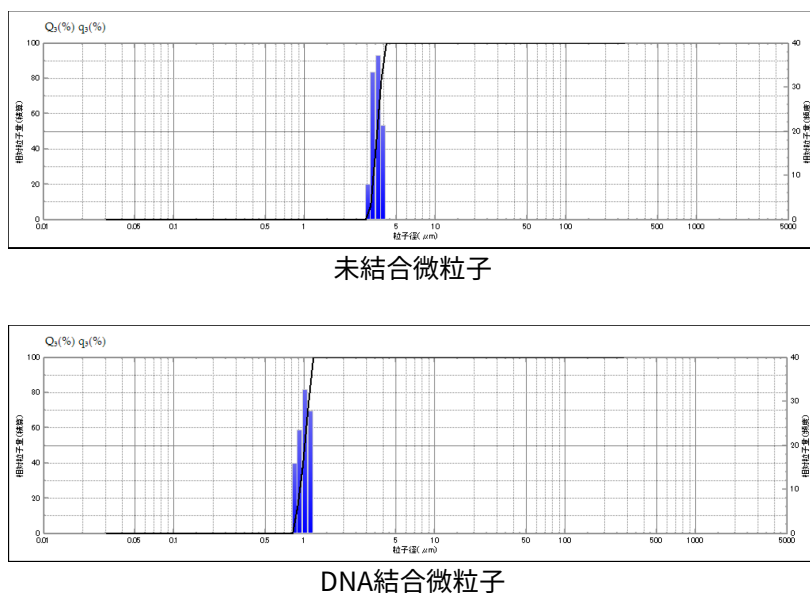


図 2 レーザー回折式粒度分布測定計が示した DNA 結合微粒子と未結合微粒子の粒度分布

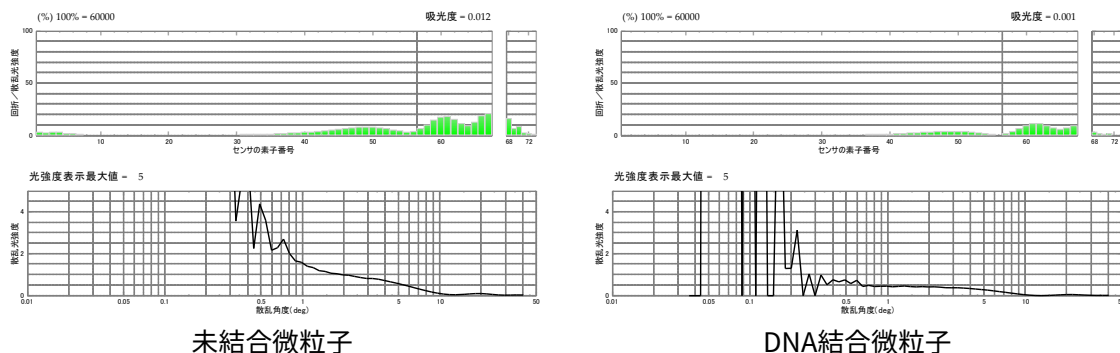


図 3 DNA 結合微粒子と未結合微粒子の回折・散乱光分布

る、誘電泳動のクロスオーバー周波数を示す。クロスオーバー周波数は、誘電泳動力がゼロになる周波数を意味し、誘電泳動を特徴付けるパラメータのひとつである。クロスオーバー周波数の違いはすなわち、分極特性が異なることが示しており、その由来細胞によってエクソソームの誘電体特性が異なることを示している。

測定されたクロスオーバー周波数から、エクソソームの誘電体特性のひとつである膜キャパシタンスを見積もった結果を表 1 に示す。ヒト母乳エクソソームの膜キャパシタンスはヒト乳腺上皮細胞 (MCF-10A) とほとんど同じであり、また、ヒト乳がん細胞由来エクソソームの場合は、由来細胞である乳がん細胞とほぼ同じ値であることが示された。エクソソームが由来細胞と同じ膜タンパク質を持つことは知られていたが、膜の電気的特性が同じであることはこれまでに知られていない新しい発見であった。

本成果を用いて、体液中に含まれるエクソソームについて、誘電泳動を用いてがん細胞由来エクソソームを簡便かつ迅速に分離・計測が可能なシステムの構築を目指す。

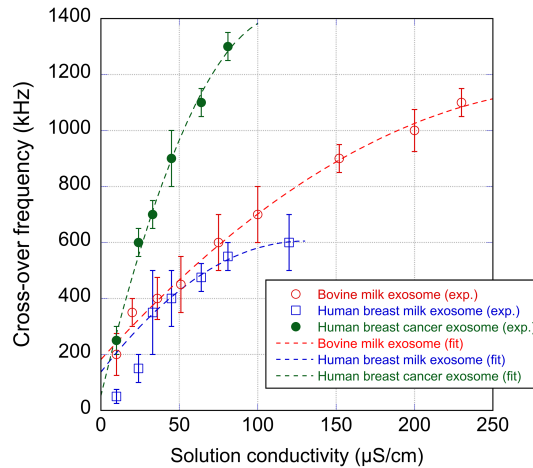


図 4 各種エクソソームの誘電泳動特性 (クロスオーバー周波数)

表 1 誘電泳動特性から見積もられた各種エクソソームの膜キャパシタンス

エクソソームの種類	膜キャパシタンス (mF/m ²)
牛乳エクソソーム	61.2
母乳エクソソーム	35.9
ヒト乳がん細胞 (MCF-7) 由来エクソソーム	19.4
ヒト乳腺上皮細胞 (MCF-10A)	39.4 (文献値)
ヒト乳がん細胞 (MCF-7)	19.5 (文献値)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 中野 道彦, 稲葉 雅文, 末廣 純也	4. 巻 45
2. 論文標題 誘電泳動を用いたウイルスや細菌の静電氣的計測法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 静電気学会誌	6. 最初と最後の頁 52-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Michihiko, Inaba Masafumi, Suehiro Junya	4. 巻 141
2. 論文標題 Detection of SARS-CoV-2 Gene by Microbeads Dielectrophoresis-based DNA Detection Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 233 ~ 236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1541/ieejsmas.141.233	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 M. Nakano
2. 発表標題 Electrostatic Virus and Bacteria Detection Based on Dielectrophoresis
3. 学会等名 2021 Annual Meeting of Electrostatics Society of America (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重本 真, 柴垣 有希, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 微粒子誘電泳動を用いたDNA分解酵素の検出
3. 学会等名 電気・情報関係学会九州支部第74回連合大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳 皓, 山川 翼, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 エクソソームの誘電泳動特性に関する基礎検討
3. 学会等名 電気・情報関係学会九州支部第74回連合大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重本 真, 柴垣 有希, 稲葉 優文, 中野 道彦, 末廣 純也
2. 発表標題 微粒子誘電泳動DNA検出法を用いたDNA分解酵素検出の検討
3. 学会等名 令和4年電気学会全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryu Nakabayashi, Masafumi Inanaba, Michihiko Nakano, Junya Suehiro
2. 発表標題 Separation of normal and cancer cell-derived exosomes based on their dielectrophoretic properties
3. 学会等名 Biosensors 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------