

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23587

研究課題名(和文) 網羅的環境中微粒子分析法の創出とエクスポソーム解析への展開

研究課題名(英文) Comprehensive Characterizations of Particulate Matters for Exposome Analysis

研究代表者

嶋田 泰佑 (Shimada, Taisuke)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：00850140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを取り巻く周辺環境中には、様々な特性(組成、サイズ、濃度など)の微粒子が存在する。それら微粒子への曝露(エクスポソーム)は人間の健康に密接に関わるため、微粒子の特性を個人レベルで分析する必要がある。本研究課題では、エクスポソーム解析に向けて、濃縮捕集法・イオン成分分析法・単一微粒子分析法の各要素技術を開発し、さらにそれらを融合することで、環境中微粒子の特性を網羅的に分析可能な手法を創出することを目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、環境中微粒子を水薄膜内に濃縮捕集することで、イオン成分分析・単一微粒子分析を超高感度化し、それら分析法により環境中水溶性・非水溶性微粒子の特性情報を網羅的に取得するところにある。また、社会的意義として、個人レベルで異なる微粒子のエクスポソームを解析し、健康と環境の関係を明らかにすることで、環境を含めた予防医療の開拓とオーダーメイド医療の創出に資する波及効果を有する。

研究成果の概要(英文)：Human beings are exposing to a mixture of airborne fine particles showing various properties such as size (<10 μm), compositions (elemental carbons and organic/inorganic compounds) with different concentration, and exposure to them causes health damages reaching to increase mortality. Comprehensive detections and characterizations of exposed particles are highly required for understanding their impacts on ones' health. However, conventional techniques are unable to match the requirements due to difficulties in particle characterizations and in applicability to the person level. This work aim to develop an analytical method to comprehensively characterize PMS' size and composition via collection of particles into aqueous solution and followed-by single particle and ion detections.

研究分野：ナノバイオリフサイエンス

キーワード：エクスポソーム解析 粒子状物質 濃縮捕集 ナノワイヤ 単一微粒子センシング マイクロポア イオン選択性電極 集積化チップ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、環境中物質への暴露（エクスポソーム）が人間の健康と密接に関わることが明らかになり、医療・ヘルスケアの観点からもエクスポソーム解析の必要性が増している（*Eur. Respir. Rev.*, 25, 124-129, 2016）。エクスポソームの中でも環境中微粒子は重要課題の一つであり、WHOの報告によると、当該微粒子により引き起こされる健康被害の死者数は年間 700 万人にも達する（WHO, 2018）。環境中には化学物質粒子と生物粒子（*e.g.*, 花粉、真菌、細菌）が存在しており、サイズ（ $< 10 \mu\text{m}$ ）も多岐にわたる。また、それらの組成（種類）も多様であり、水溶性と非水溶性成分に大別される（*Science*, 326, 1525-1529, 2009; *Nature*, 514, 218-222, 2014）。これらの微粒子に暴露すると、その特性（組成、サイズ、種類など）に応じて異なる健康への影響が惹起されることが分かっている（*Nature*, 525, 367-371, 2015）。また、環境中に存在する微粒子は個人レベルで異なることも突き止められており（*Cell*, 175, 277-291, 2018）、オーダーメイド医療の観点から個人レベルでの微粒子分析の重要性も増している。

しかしながら、現行の微粒子分析は、定点サンプリングでの微粒子をひとまとめにした測定により行われており（*Environ. Sci. Technol.*, 51, 13161-13169, 2017）、個人レベルでの環境中微粒子の詳細情報を取得できない。また、サンプリングフィルタを有するリストバンドを用いたエクスポソーム解析が行われたが（*Cell*, 175, 277-291, 2018）、週単位での微粒子捕集が必要なため、時間的・空間的な変化を詳細に追跡できないという問題がある。このため、個人周辺の環境中にどのような特性の微粒子が存在し、それらが時間的・空間的にどのように変化するかは依然として解明されていない。

研究提案者は、ナノ構造体を用いた環境中微粒子の濃縮捕集法（*Micro Total Analysis Systems* 2016, 1, 1473-1474, 2016; *Micro Total Analysis Systems* 2017, 1, 1433-1434, 2017; *Micro Total Analysis Systems* 2018, 1, 270-271, 2018）、および、マイクロポアを用いた微粒子検出法（*Analytical Science*, 10, 1347-1349, 2018; *ACS Sensors*, 3, 574-579, 2018）に関する研究を進めてきた。本研究課題では、これまでの成果をさらに発展させることで、濃縮捕集法・イオン成分分析法・単一微粒子検出法を融合することで、環境中微粒子の水溶性・非水溶性成分を個人レベルで網羅的に分析可能な手法を創出する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、環境中微粒子の水溶性・非水溶性成分の網羅的分析法を創出し、個人レベルでの環境中微粒子の時間的・空間的变化を明らかにすることである。そのために、(1)水溶性成分の検出法と(2)非水溶性微粒子の検出法をそれぞれ開発し、(3)濃縮捕集法との融合による微粒子センシング法を開発する。

本目的を達成するために、濃縮捕集では超親水性表面上に形成した薄膜状の水（水薄膜）、イオン成分分析ではイオン選択性電極、単一微粒子分析では微細孔をそれぞれ用いる。濃縮捕集において、微小体積である水薄膜に空気中微粒子を能動的に接触させることで捕集し、濃縮を行う。加えて、水薄膜を連続的に流し続けることで、濃縮捕集しつつ、下流のイオン選択性電極・微細孔に送液可能である。イオン成分分析では、微細流路内に作製したイオン選択性電極を用いて、捕集水溶性微粒子から溶解したイオン成分の種類と濃度を分析する。当該電極は固体電極にイオン感応膜を修飾することで作製し、これを発展させ、異なるイオン選択性電極を並列化することで、複数種イオンの同時検出を目指す。単一微粒子分析では、微細孔の両端に電圧印加して、イオン電流計測を行う。微粒子の通過はイオン流の減少を引き起こし、微細孔の電気抵抗値が変化する。この変化に由来したシグナル形状から、微粒子のサイズ・濃度・組成を分析可能である。これらの要素を融合することで、個人レベルでの環境中水溶性・非水溶性微粒子の網羅的分析法を創出する。

学術的独自性は、水薄膜を連続的に流し続けることで、従来法では困難であった個人レベルでのリアルタイム分析を達成するところにある。さらに、水溶性・非水溶性微粒子の網羅的な分析を可能にすることで、微粒子特性情報を含むエクスポソーム解析が可能となる。本研究の創造性は、環境中微粒子を水薄膜内に濃縮捕集することで、イオン成分分析・単一微粒子分析を超高感度化し、それら分析法により環境中水溶性・非水溶性微粒子の特性情報を網羅的に取得するところにある。

3. 研究の方法

本研究では、(1)水溶性成分の分析法と(2)単一微粒子の分析法をそれぞれ開発し、(3)濃縮捕集法との融合による微粒子センシング法を開発を行った。

(1)水溶性成分の分析法：マイクロ流路内の並列化イオン選択性電極によるセンシング

水溶性粒子状物質成分は溶液中で水和してイオンとなるため、これらイオンの検出のために、マイクロ流路内にイオン選択性電極を組み込んだデバイスを開発した。ガラス基板上に銀/塩化銀電極を作製し、その上に硝酸イオン、アンモニウムイオン、ナトリウムイオンのイオン感応膜を塗布することによってイオン選択的電極（ISE）を作製した。具体的には、白金電極を成膜し、電気化学反応に基づき銀メッキした後、塩化物形成することで、 Ag/AgCl 電極を作製した。電極形状を基に、紫外線硬化性のポリジメチルシロキサン（PDMS）をウェル状に成型した。イオン認

識分子(イオノフォア)を含むポリ塩化ビニル膜をウェル内の電極上に塗布して加熱硬化することで、ISE を作製した。また、イオノフォアを含まないポリ塩化ビニル膜をウェル内電極上に塗布して参照電極(RE)も開発した。これらの電極を有する基板と PDMS 製のマイクロ流路を貼り合わせ、微小体積の検体でもセンシング可能なデバイスを創製した。

硝酸ナトリウム、塩化アンモニウムを水に溶かした溶液をサンプルとして用い、各 ISE と市販の外部 RE を用いて濃度に対する電位変化を計測した。同様に、基板上の内部 RE を用いても計測可能であることを確認した。内部 RE に対する各 ISE の電位変化を同時計測し、複数種イオンを同時センシングした。さらに、水に溶解させた実試料(都市大気粉塵、国立環境研究所)をろ過して、含有イオン成分を抽出し、ISE を用いて計測した。

(2)単一微粒子分析：界面活性とマイクロポアによる網羅的センシングと機械学習判定による微粒子識別

マイクロポア(W; 5 μm , L; 5 μm , H; 5 μm)を有する PDMS 製チップを作製し、陰イオン性界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を 2 mM 添加した 5 \times tris-borate EDTA(5 \times TBE)溶液でポアを満たした。本研究では、(a)サイズ・濃度分析と(b)粒子種同定に関する実験を行った。(a)では、未修飾及びカルボキシル基末端のポリスチレンビーズ(UPS, CPR)、元素状炭素の微小粒子状物質モデルとしてカーボン粒子を計測した。計測の際、電氣的駆動力による粒子のマイクロポア導入だけでなく、シリンジポンプを利用した圧力駆動を加えることで、濃度感度を検討した。ベースラインからのピーク強度(S)とノイズ強度(N)を求め、 $S/N > 3$ 以上の信号をカウントした。また、(b)では、1 μm UPS 及び CPS、1 μm シリカ粒子(未修飾、アルミナ膜)を計測した。各シグナルからピーク強度やピーク幅、尖度などのシグナル形状を表すパラメーターを抽出し、それらによって 10 次元の特徴量ベクトルを作成した。各微粒子由来のベクトルを学習及びテスト用に分割し、機械学習を駆使して学習用データから最適なモデルを構築し、テスト用データを用いてその評価を行い、微粒子を識別した。

(3)濃縮捕集法との融合による微粒子センシング：濃縮捕集・単一粒子検出チップの開発

単一微粒子分析と濃縮法を融合し、捕集とセンシングが可能なチップを創出した。そのために、捕集のためのナノワイヤ構造体と検出のためのマイクロポア構造体の作製プロセスを検討し、単一チップ上に両構造体を作製した。気相中の粒子状物質の実試料(都市大気粉塵、国立環境研究所)を分散させ、溶液中に捕集するとともに、同時にマイクロポアによる単一微粒子検出を行った。

4. 研究成果

(1)水溶性成分の分析法

外部 RE を用いて、硝酸イオン・アンモニウムイオン・ナトリウムイオンに対する ISE の電位応答計測に基づき、イオンをセンシングしたところ、10 μM - 100 mM までの濃度範囲を検出できることを確認した。同様に、基板上に作製した内部 RE でも、10 μM - 100 mM をセンシング可能であり、オンチップ上でのイオンセンシングの可能性を示した。マイクロ流路(W; 500 μm , L; 1,000 μm , H; 100 μm)と貼り合わせ、硝酸ナトリウムと塩化アンモニウムを含む溶液をこれらの ISE を用いて同時計測したところ、10 μM - 100 mM の濃度範囲で電位応答を示すことを実証した。これらの結果から、微粒子の実試料から抽出したイオンセンシングへと展開し、既存法(イオンクロマトグラフィー)との比較を行った。具体的には、粒子状物質の実試料(都市大気粉塵、国立環境研究所)からイオン成分を純水中に抽出し、フィルタ処理したサンプルを用いた。各 ISE は実試料濃度(0.2-20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)に対して直線的な応答を示し、濃度に基づき含有量を算出したところ、既存法と同等の結果が得られることを実証した。本手法は、数百 nL 程度の検体でも解析可能であるため、濃縮捕集法と高い親和性を有すると考えられる。

(2)単一微粒子分析

(a)のサイズ・濃度分析では、界面活性剤を利用したイオン電流計測により、疎水性微粒子モデルのカーボン微粒子を分析した。これまでに、研究代表者は、微細孔を用いたイオン電流計測による微粒子分析技術を開発してきたが、粒子状物質に含まれる分散性の低い疎水性微粒子の計測が困難であった。そこで本研究課題では、界面活性剤による分散性向上を利用したイオン電流計測法を開発し、疎水性微粒子のサイズ・濃度を分析した。SDS 未添加の計測では、ピーク数が < 1 signals/min となり、濃度定量は困難であった。そこで、2 mM SDS を 5 \times TBE 溶液に添加したところ、計測が可能となった。続いて、圧力導入を駆使して濃度感度の検討を行い、流量 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の条件で、 $5 \times 10^3 - 5 \times 10^7$ particles/mL の範囲を計測した。本条件のもと、元素状炭素モデルのカーボン粒子を計測し、サイズと濃度を分析した。SEM 画像に基づき長径を計測した分布とシグナル強度に基づき算出した直径分布を比較した結果、同形状の分布を示し、本検出法を用いてサイズ分析が可能であることを示した。また、顕微鏡観察とイオン電流計測により算出した個数濃度を比較すると、直線関係が得られたため、本検出法による濃度分析も可能であった。

(b)粒子種同定では、シグナルの形状を定量し、機械学習解析することで、電氣的に微粒子を識別した。界面活性剤の添加は、分散安定性の低い粒子(ポリスチレン(PS)粒子、表面：PS)を計測可能にした。同様に、COOH 基表面の PS 粒子に対しても、電気シグナルを取得した。従来のパラメーター(波高、波幅)では、プロットの重なるために識別は困難であった。シグナル形状を多次元パラメーター(波高や波幅、クリアランス率、波形率など)として定量し、機械学習元解析したところ、単一シグナルを精度 98.4%で識別した。さらに、無機粒子モデルとしてシリカ粒子(未修飾、アルミナ膜)のシグナルも加えても、4 種類粒子を精度 99.1%で識別可能であった。

(3)濃縮捕集法との融合による微粒子センシング

微細加工工程のプロセス検討によって、ナノワイヤ構造体とマイクロポア構造体を単一チップ上に集積化した。本集積化チップでは、気相を導入しながら単一微粒子を検出することが求められるため、気相導入の有無によるベースラインノイズを確認したところ、導入無に対して二倍程度のノイズレベルに収まり、微粒子検出が可能であることを確認した。捕集のためのナノワイヤ構造体に 5×TBE を流し、水薄膜を形成して捕集を行い、マイクロポア構造体で検出を行ったところ、微粒子に由来すると考えられるシグナルを取得した。本結果より、集積化チップによる微粒子センシングの可能性を示すとともに、各要素技術を融合できることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 A. Yoshikawa, T. Yasui, T. Shimada, S. Yamasaki, K. Nishino, T. Yanagida, K. Nagashima, T. Washio, T. Kawai, Y. Baba	4. 巻 1
2. 論文標題 Discriminating drug-resistant bacteria using AI analysis on fine current changes from inner ion leakages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Micro Total Analysis Systems 2019	6. 最初と最後の頁 852-853
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 T. Shimada, T. Yasui, A. Yonese, T. Yanagida, N. Kaji, M. Kanai, K. Nagashima, T. Kawai, Y. Baba	4. 巻 11
2. 論文標題 Mechanical Rupture-Based Antibacterial and Cell-Compatible ZnO/SiO ₂ Nanowire Structures Formed by Bottom-Up Approaches	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 610～610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi11060610	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 K. Fujino, T. Shimada, T. Yasui, K. Nagashima, T. Yanagida, N. Kaji, Y. Baba	4. 巻 1
2. 論文標題 Analysis of particulate matters via surfactant-assisted ionic current sensing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micro Total Analysis Systems 2020	6. 最初と最後の頁 498-499
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 H. Yamauchi, T. Shimada, T. Yasui, T. Goda, N. Kaji, Y. Miyahara, Y. Baba	4. 巻 1
2. 論文標題 Analysis of ion components derived from particulate matter using ion selective electrodes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micro Total Analysis Systems 2020	6. 最初と最後の頁 490-491
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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 嶋田 泰佑
2. 発表標題 機能化ナノワイヤによる生体外微粒子及び生体分子分析法の創成
3. 学会等名 2019年度第1回応用分析化学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋田 泰佑、矢崎 啓寿、安井 隆雄、有馬 彰秀、火原 彰秀、柳田 剛、加地 範匡、金井 真樹、長島 一樹、鷺尾 隆、川合 知二、馬場 嘉信
2. 発表標題 生体外微粒子分析のための捕集・検出法の創成
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 39 回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Yoshikawa, T. Yasui, T. Shimada, S. Yamasaki, K. Nishino, T. Yanagida, K. Nagashima, T. Washio, T. Kawai, Y. Baba
2. 発表標題 Discriminating drug-resistant bacteria using AI analysis on fine current changes from inner ion leakages
3. 学会等名 The 23th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋田 泰佑
2. 発表標題 界面機能を利用した水溶性・非水溶性粒子状物質の分析
3. 学会等名 2019年度第3回応用分析化学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内 晴加、嶋田 泰佑、安井 隆雄、合田 達郎、加地 範匡、宮原 裕二、馬場 嘉信
2. 発表標題 イオン選択的電極を用いた微小粒子状物質由来水溶性成分の分析
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤野 慶子、嶋田 泰佑、安井 隆雄、長島 一樹、柳田 剛、加地 範匡、馬場 嘉信
2. 発表標題 界面活性剤による分散性向上を利用した微小粒子状物質の単一粒子分析
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Fujino, T. Shimada, T. Yasui, K. Nagashima, T. Yanagida, N. Kaji, Y. Baba
2. 発表標題 Analysis of particulate matters via surfactant-assisted ionic current sensing
3. 学会等名 The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 H. Yamauchi, T. Shimada, T. Yasui, T. Goda, N. Kaji, Y. Miyahara, Y. Baba
2. 発表標題 Analysis of ion components derived from particulate matter using ion selective electrodes
3. 学会等名 The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内晴加、嶋田泰佑、安井隆雄、合田達郎、加地範匡、宮原裕二、馬場嘉信
2. 発表標題 イオン選択的電極を用いた微小粒子状物質由来イオン成分の分析
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第42回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤野慶子、嶋田泰佑、安井隆雄、長島一樹、柳田剛、加地範匡、馬場嘉信
2. 発表標題 界面活性剤を利用したイオン電流計測による微小粒子状物質の単一粒子分析
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第42回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤野慶子、嶋田泰佑、安井隆雄、長島一樹、柳田剛、加地範匡、馬場嘉信
2. 発表標題 微小粒子状物質分析に向けたイオン電流信号解析による単一粒子識別
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院工学研究科 馬場研究室ホームページ https://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/bioana1/
--

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
---------	---------