

# 迅速・簡便な研究用試薬 「細胞外小胞用イムノクロマトキット」

Development of a Quick and Easy Research Reagent Set  
 "Immunochromatographic Kit for Extracellular Vesicles"

スペシャルティ事業部門  
 スペシャルティ事業部  
 機能材開発グループ  
 Speciality Business Div.  
 Speciality Business Dept.  
 Functional Materials Development Group



宗 芳和  
Yoshikazu SO



宮澤 雄太  
Yuta MIYAZAWA

## 1. はじめに

がん(悪性腫瘍)は1981年以降日本人の死因のトップであり、2021年時点で死因の26.5%を占めている。一方でがん疾患の詳細なメカニズムは解明されておらず、寿命の高齢化に伴い、がん患者数が増加傾向にあるなか、革新的ながん予防、診断、治療法の開発が求められている。がん細胞は分裂速度が正常な細胞と比べて速く、進行度(ステージ)が進むにつれて生存率が低くなるため、早期にがんを発見することががん治療の成功率を高めるカギとなる。

がんの発見には、従来、生体組織を体内から採取する検査手法(組織生検)が用いられてきた。このような手法は検査精度に優れるものの、患者の身体的・精神的な負担が大きく、がんの早期検査のスクリーニングには不向きである。また、侵襲性の低い手法として近年ではMRI(Magnetic Resonance Imaging)などの画像検査技術が採用されており、直径1cm以下の小さながんの可視化も可能である。しかし、コストや時間的・地理的な制限があり、早期検査技術としての利用は困難である。したがって、安価で侵襲性が低く、高度な医療施設・技術を必要としない、血液検査や尿検査などの方法によるがん早期検査技術が求められている<sup>2)</sup>。このような検査手法を「リキッドバイオプシー(Liquid Biopsy)」という。

表1 がんの検査手法

	リキッドバイオプシー	組織生検	画像検査
侵襲性	低い(採血、採尿など)	高い(手術)	低い(撮像)
検査費用	比較的安い	高い	高い
検査精度	※検査対象による	高い	※装置による

近年、がん発見を目的としたリキッドバイオプシーの対象物質(マーカー)として、血液に含まれる循環物質が注目されている。この循環物質としては、腫瘍由来する①cfDNA(cell free DNA)、②細胞、③細胞外小胞(Extracellular Vesicles:EVs)などが挙げられる。とりわけ、③は進行したがん細胞のみでなく、ステージ初期のがん細胞からも分泌されるため、がん早期発見のマーカーとして利用できる可能性が高く、研究が盛んに行われている。特に近年研究は著しく活発化しており、論文投稿の件数は2010年以降で指数関数的に増加している(図1)。

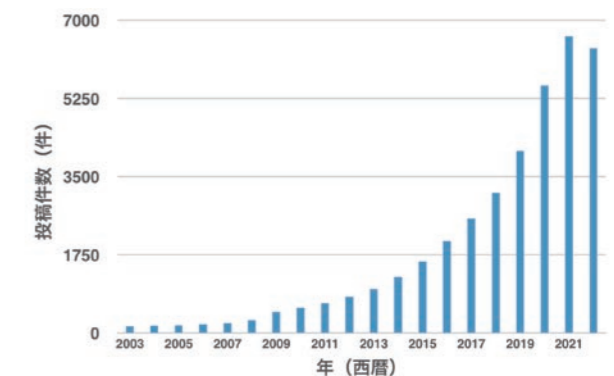


図1 EVs 論文検索結果

しかしながら、EVsの検出手法には煩雑な工程や高度な技術、あるいは高価な装置を必要とするものが多く、研究者の負担が大きいといった課題がある。そこで、弊社は迅速・簡便な検査手法の一つである「イムノクロマトグラフィー (Immunochromatography; IC) 法」に着目し、EVsを検出できるICキットの開発を行った。本報では、EVsの構造や研究事例に関する解説をはじめ、IC用の標識材として弊社にて開発した青色粒子「金ナノプレート(図2)」を使用した、イムノクロマトキットについて解説する。

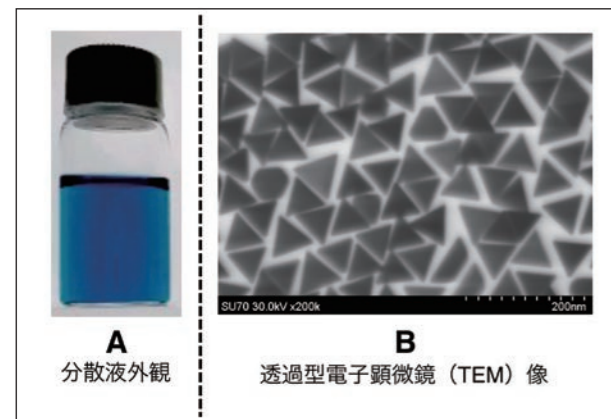


図2 金ナノプレート分散液

## 2. 細胞外小胞とは

### 2.1 細胞外小胞について

1983年にJohnstoneらによって、脂質二重膜構造を有する100nmほどのEVsが発見され、1987年に「エクソソーム」と命名された。発見当初、エクソソームは細胞内や細胞膜に含まれる余分なタンパク質を細胞外に排出するためのゴミ袋として考えられていたが、1996年にはRaposoらによって細胞間のコミュニケーションツールとして機能していることが明らかとなった。さらに、2007年には、エクソソームが分泌元の細胞に由来する物質を含むことが明らかとなり、これを機にEVsに関連した研究が活発となった<sup>2)</sup>。

### 2.2 細胞外小胞の種類と構造

EVsはエクソソームをはじめ、細胞から分泌される様々な小胞体の総称である。100~1000nm程度の大きさを有するマイクロベシクル、1~5μmのアポトーシス小胞などが存在する(表2)。アポトーシス小胞は細胞死により分泌されるが、エクソソームやマイクロベシクルは生きている細胞から分泌される。エクソソームは細胞の内部で産生され、マイクロベシクルは細胞膜の陥没により産生される<sup>3)</sup>。国際細胞外小胞学会(International Society for Extracellular Vesicles: ISEV)において、EVsの分類方法が示されているが、産生や分泌の機構について未解明な部分が多く、識別するマーカーも十分に定まっていないため、現時点で明確に区別、単離することは困難である<sup>4)</sup>。

表2 細胞外小胞の種類

細胞外小胞の種類	エクソソーム	マイクロベシクル	アポトーシス小胞
サイズ(目安)	50~150nm	100~1000nm	1~5μm
産生機構	細胞からの開口分泌	細胞膜からの出芽	細胞死による分泌
マーカー	CD9, CD63, CD81など	各細胞特異的マーカー	Histone, Annexin V
構成成分	タンパク質、RNA、miRNA、脂質		

EVsの中でも特に、エクソソームは細胞間の情報伝達物質として非常に有用であることから、研究対象として活発に取り上げられている。エクソソームを識別できるマーカーとしては、CD9、CD63、CD81などが知られている。以下にEVsの一例として、エクソソームの構造<sup>2)</sup>について説明する(図3)。

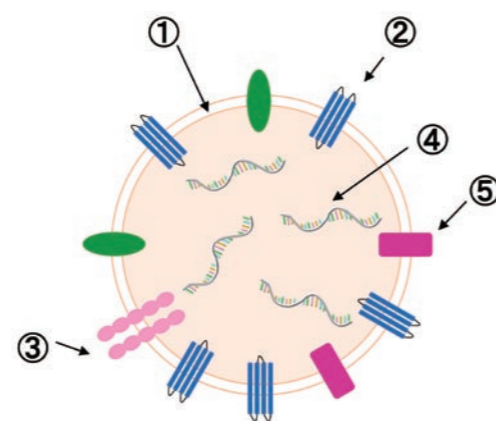


図3 エクソソームの構造

#### ① 脂質二重膜<sup>5)</sup>

極性をもった薄い脂質が二重になった膜であり、細胞膜の基本構造とほぼ同じである。

#### ② テトラスパニン鎖(表面抗原)<sup>2)</sup>

脂質二重膜を4回貫通するタンパク質である。CD9、CD63、CD81はエクソソーム検出に利用されるマーカータンパク質として知られている。

#### ③ インテグリン鎖<sup>2)</sup>

2量体の膜貫通型の構造をもつ、糖タンパク質受容体である。細胞どうしのコミュニケーションツールとして機能する部位である。

#### ④ 核酸(mRNA, miRNAなど)<sup>2)</sup>

エクソソーム内に存在し、分泌元の細胞に由来する情報を含んでいる。

#### ⑤ MHC分子<sup>2)</sup>

主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex; MHC)という。膜表面に存在し、ウイルスなどの抗原と結合することで免疫を活性化する。

## 2.3 エクソソーム研究事例

### 2.3.1 細胞外小胞による情報伝達とがんの転移<sup>6)</sup>

多細胞生物では、離れた細胞間の情報伝達は単一分子、またはEVsを介して構成される信号の送受信によって行われている。がんの進行と転移においても、がん細胞由来のエクソソームを媒介するタンパク質が関与していることが示唆された。がん細胞から分泌されるエクソソームは、膜表面に存在するインテグリン(インテグリン末端のフィブロネクチンという部位)を介して細胞の指向性・運動性を促進することができる。さらに、血管透過性を誘発することによって、周囲のみでなく離れた非腫瘍細胞の細胞生理機能を変化させ、がん細胞の播種および増殖を可能にすることができる。

### 2.3.2. エクソソームを介した薬物送達による膵臓がんの抑制<sup>7),8)</sup>

マイクロRNAや酵素などの「メッセージ」分子はエクソソームにカプセル化されており、分泌されたエクソソームはヒトの恒常性やがんなどの疾患の進行において重要な役割を果たしている。さらに、エクソソームは、(i) 低い細胞毒性、(ii) 制御された免疫原性、(iii) 細胞間コミュニケーションの効果的な利用などの薬学的利点から、治療用分子を細胞内に送達するための次世代キャリアとして期待されている。Kalluriの研究チームは生体内において、マクロピノサイトーシス(細胞の取り込み機構の1つ)を誘導している膵臓がん細胞に対して、K-Rasの変異体(がん細胞における遺伝子変異)に作用するshort hairpin RNAを内包したエクソソームを投与することで、顕著にがんの増殖が抑制されることを示した。

### 2.3.3 ExoScreen を使用した循環細胞外小胞の超高感度リキッドバイオプシー<sup>9),10)</sup>

がん細胞が分泌するEVsの検出は、がん早期診断において有望ではあるが、臨床サンプル(血液や尿など)には健康な細胞に由来するEVsも多く存在し、またその他の生体成分も多いことから、がん由来のEVsの同定と定量は依然として困難である。

「ExoScreen法」はEVsを2種類の抗体で捕捉し、予め抗体に固定化された光増感剤ビーズによって検出する手法であるため、精製を行うことなくがん由来のEVsを検出できる。本法により、結腸直腸がん患者から採血した血液では「CD147」を含むEVsが多く検出されることが報告されている。

## 3. 細胞外小胞の検出手法

### 3.1 細胞外小胞の一般的な検出手法

EVsをターゲットとしたリキッドバイオプシーの研究は、直近10年の間に拡大しており、EVsの検出手法についても様々な手法が開発されている。現在一般的に使用されている、代表的なEVs検出手法を以下に示す。

### 1 ELISA法<sup>2),11)</sup>

エクソソームの膜上のタンパク質を解析する方法の一つ。抗体と抗原(マーカー)の結合により検出する点ではIC法と同様であるが、ELISA法では試験紙でなく、溶液中で反応を行う。プレートにエクソソームマーカーに対する抗体を固定化し、エクソソームを捕捉した後、酵素標識した抗体を用いて蛍光や化学発光により検出する。

### 2 ウェスタンブロッティング(WB)<sup>2),12)</sup>

ウェスタンブロッティングは、タンパク質の免疫検出法である。電気泳動による移動度の違い(分子量の違い)から、検体中のタンパク質を分離した後、ゲルから微多孔膜へのパターンの転写を行い、酵素標識した抗体を用いて蛍光や化学発光により検出する。

### 3 ナノトラッキング解析(NTA)<sup>2),13)</sup>

①、②がエクソソームのタンパク測定を目的とするのに対し、③は粒子数のカウントを目的としている。粒子のブラウン運動より解析し粒子数を算出することができる。エクソソームと同程度の大きさのタンパクの凝集塊を見分けることは不可能なため、予め遠心分離などで精製しておくことが好ましい。

### 4 フローサイトメトリー(FCM)<sup>2)</sup>

エクソソームなどの粒子に励起光を当てて、フローサイトメーターで個々の粒子の蛍光を測定することで、粒子の大きさや、蛍光を発している粒子の数を測定する手法であり、細胞の解析方法として使用されてきた。しかし、数 $\mu\text{m}$ もある細胞とは異なり、100nm程度とサイズの小さいエクソソームを直接検出することは困難であるため、予めビーズに固定化したエクソソームに蛍光色素結合抗体結合させてフローサイトメーターで検出する手法がとられている。

## 3.2 細胞外小胞の検出方法としてのイムノクロマトグラフィーへの適用

今般、弊社の貴金属ナノ粒子を活用し、EVsを迅速・簡便に検出できる「細胞外小胞用イムノクロマト

キット(弊社製品名:Exorapid-qIC、図4)を「株式会社島津製作所」と共同で開発した。



図4 細胞外小胞用イムノクロマトキット  
※商品紹介: <https://www.dnt.co.jp/technology/new-business/exorapid-qic/>

### 3.2.1 イムノクロマトグラフィー(IC)法とは

IC法は、妊娠検査やインフルエンザウイルス、新型コロナウイルスの検査キットなどに適用されている検査手法である。イムノクロマト試験紙に固定化された抗体と、標識材に固定化された抗体を用い、試験紙上で検体(ウイルスやタンパク質など)をサンドイッチすることで検査対象物を検出する仕組みとなっている。ハーフストリップと呼ばれる形式のイムノクロマト試験紙の模式図を示す(図5)。また、イムノクロマト試験紙の写真を示す(図6)。

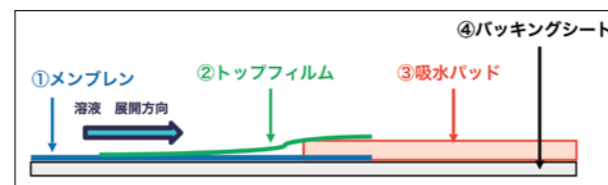


図5 イムノクロマト試験紙(模式図)

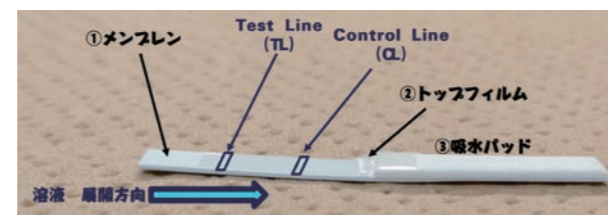


図6 イムノクロマト試験紙

イムノクロマト試験紙は下記1~4の部材で構成される。

### 1 メンブレン

ニトロセルロース素材で構成されるタイプが多く、溶液の展開速度の異なる複数のグレードが存在する。展開速度は、メンブレン上の抗体と検体との反応性を大きく左右する。

### 2 トップフィルム

吸水パッドとメンブレンとの接触を保持するために貼付するフィルムである。また、メンブレンが傷つかないように保護する目的もある。

### 3 吸水パッド

メンブレンに展開した溶液を吸い上げる駆動力となる材料である。吸水パッドに吸水できる水分量は、おおむね吸水パッドの厚みに比例する。

### 4 バッキングシート

メンブレンと吸水パッドを固定化するための支持体である。バッキングシートはポリスチレン、ポリエ

ステル、塩化ビニルなどのプラスチックシートに粘着剤を貼り合わせた構成になっている。吸水パッドとメンブレンを接触させ、毛細管現象による溶液の展開を補助する役割がある。

メンブレンのTest Line、Control Lineと呼ばれる部分には、それぞれ抗体が固定化されている。Test Lineには検体と結合する抗体が固定化されており、Control Lineには試験が正常に行われていることをチェックするための抗体が固定化されている。

IC法を用いた検査は多くの場合、疾病に罹患しているかどうかを簡易的に判断するための定性検査を目的として使用される。唾液や尿などの液状物質をイムノクロマト試験紙の上流側(図6の左端)に接触させることにより検査できる。

以下、IC法の試験例を示す(図7)。図7に記載されている標識材、検体用抗体A、標識用抗体B、標識用抗体B捕捉用抗体について、以下説明する。

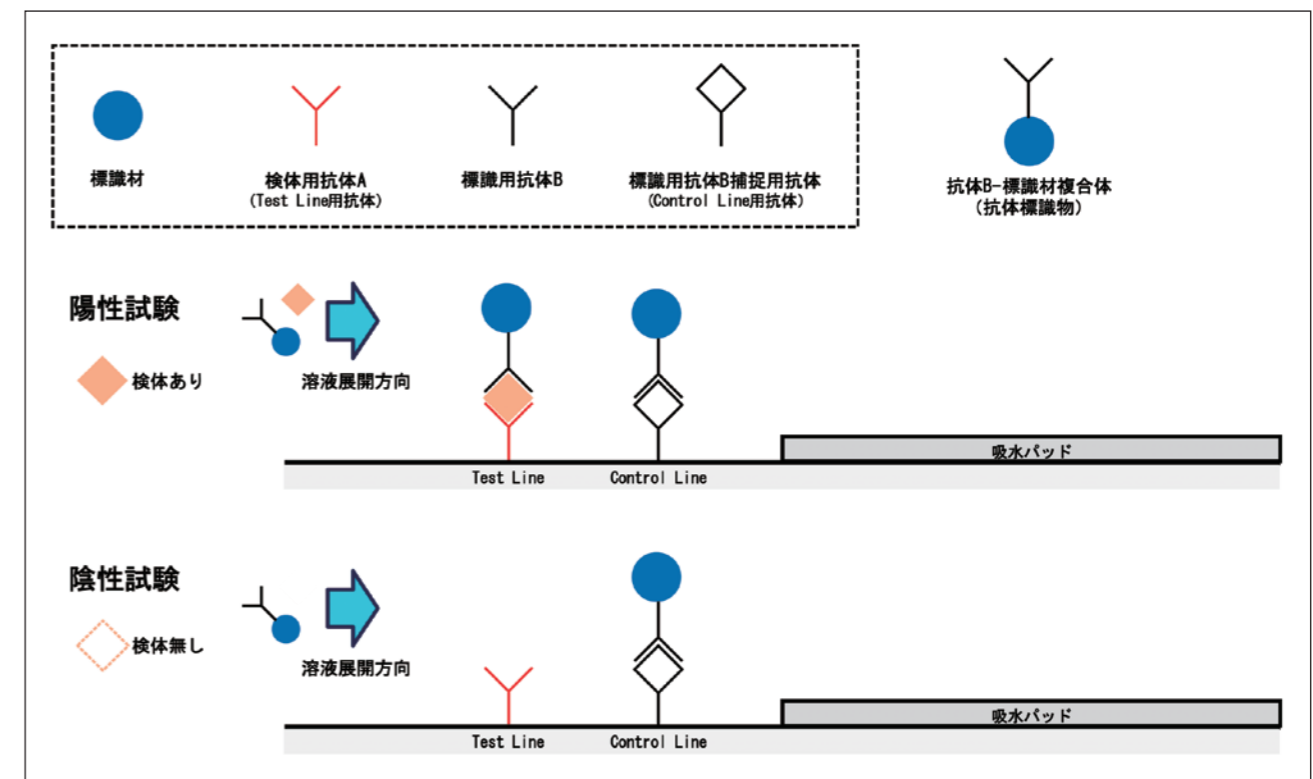


図7 IC法の陽性・陰性試験(模式図)

### ・標識材

標識材には貴金属ナノ粒子、着色したラテックスナノ粒子、または着色したセルロースナノファイバー粒子などが使用されており、診断薬メーカー各社で様々な検討が進められている。

標識材の一つである貴金属ナノ粒子は、自由電子の局在表面プラズモン共鳴(Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR)に由来する光吸収特性を有し、鮮やかな発色を呈するためICキットに広く使用されている。一般的には、化学的安定性の高い金を材質とす

る赤色の球状金ナノ粒子が使用されている。

弊社では様々な色調の貴金属ナノ粒子を開発している。プレート状やロッド状といった、異方性を有する形状の貴金属ナノ粒子については、それらのアスペクト比などを調整することにより色調をコントロールできる。一例として、銀ナノプレートのアスペクト比が及ぼす色調への影響を示す(図8)。色調の異なる粒子を標識材に使用することにより、IC試験におけるマルチカラーでの多検体同時検出が可能になる(図9)。

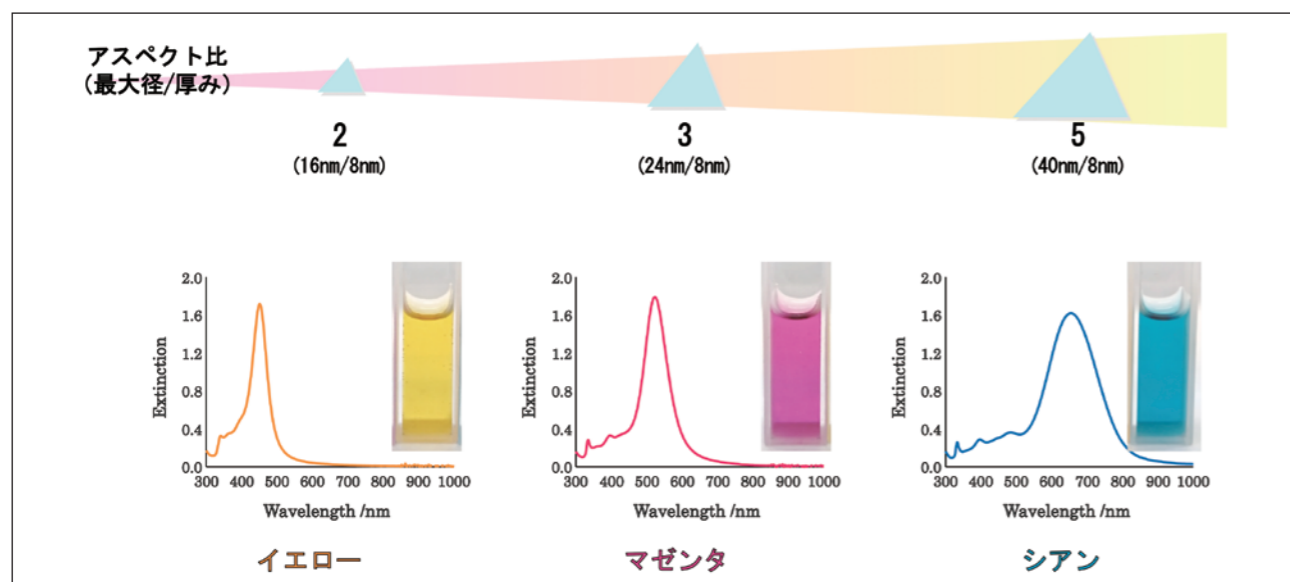


図8 銀ナノプレートのアスペクト比と色調

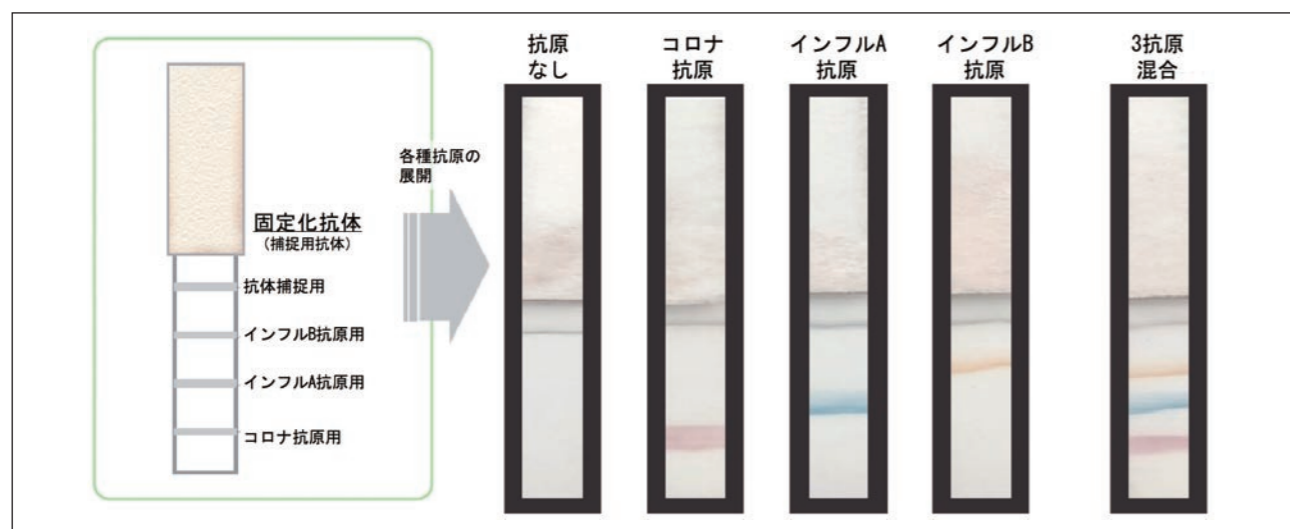


図9 マルチカラーでの多検体同時検出

### ・検体用抗体A

メンブレンのTest Line上に固定化される抗体であり、検体と反応する抗体が用いられる。

### ・標識用抗体B

標識材を固定化する抗体である。貴金属ナノ粒子を標識材として使用する場合、貴金属ナノ粒子の分散液と標識用抗体Bを含む溶液とを混合することにより、疎水性相互作用による物理吸着を介して標識することができる。

また、標識用抗体Bは、検体や後述する標識用抗体B捕捉用抗体と反応する抗体が用いられる。

### ・標識用抗体B捕捉用抗体

メンブレンのControl Line上に固定化される抗体であり、標識用抗体Bと結合する抗体が用いられる。

例えば、標識用抗体Bとして、マウスIgG抗体を使用する場合、標識用抗体B捕捉用抗体には抗マウスIgG抗体を使用できる。

メンブレンのTest Line及びControl Line上にそれぞれ抗体を固定化させた後、ウシ血清アルブミン(BSA)やカゼインを含むブロッキング試薬を用いてメンブレン全体をコーティングし、意図しない反応(非特異検出)やバックグラウンドの着色を抑制する。

り患している(検体が存在する)場合、Test Lineに固定化された検体用抗体Aと検体が反応する。その際、あらかじめ標識材に固定化された標識用抗体B(抗体標識物)が検体と反応することにより、Test Lineに標識材が集積する。また、Test Lineに捕捉された検体と反応しなかった標識用抗体BはControl Lineに固定化された抗体と結合する。したがって、検体を含む陽性試験では、Test LineとControl Lineの2か所に標識材由来の着色が認められる。

一方、り患していない(検体が存在しない)場合、Test Lineで検体の捕捉が行われなため、Test Lineに固定された検体用抗体Aと抗体標識物が結合せず、標識材が集積しない。そのため、検体を含まない陰性試験では、Control Lineの1か所のみで標識材由来の着色が認められる。

### 3.2.2 EVs検出用イムノクロマトキットの開発

EVsを迅速かつ簡便に検出する手法として、市販の検査薬などで広く使用されているIC法を用いた。2.2で説明したようにEVsは表面にCD9、CD63、CD81など、抗体と結合可能なタンパク質が存在しており、EVsを検出する際のターゲット物質にすることができる。本キットはEVsを定量することを考慮し、EVs表面に広く分布するCD9をターゲット物質として選定した。本キットの開発においては、メンブレンへの抗体の固定化方法やブロッキング条件の最適化、ならびに金ナノプレートへの抗体の標識方法などを工夫した。

Exorapid-qICによるEVsの検出の仕組みについて説明する(図10)。

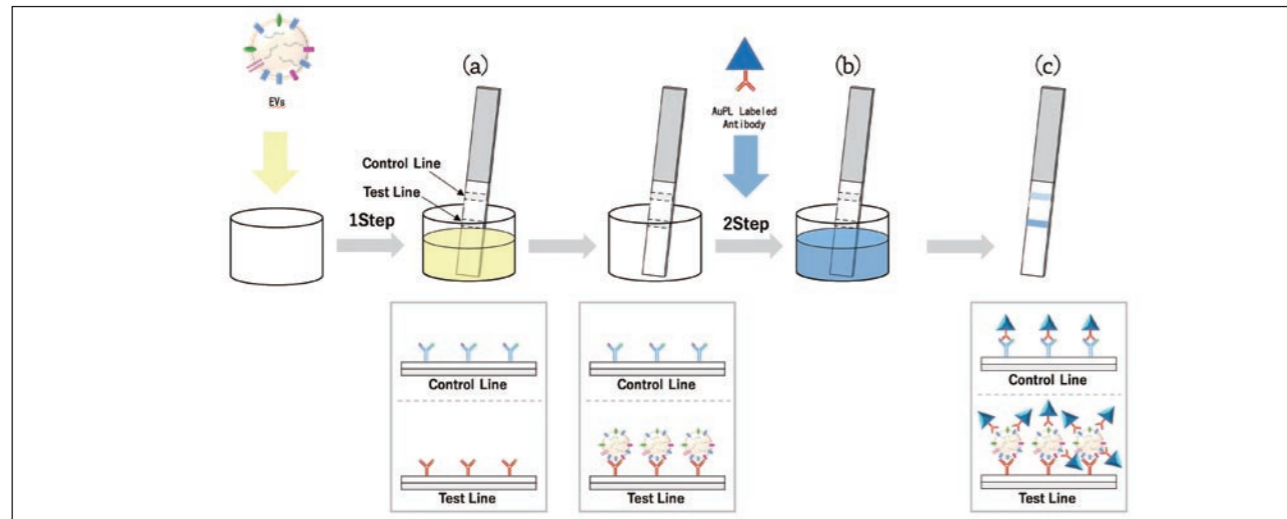


図10 EVs検出の仕組み

- (a) EVsを含む検体溶液を試験紙に展開すると、試験紙上に固定化された抗体によってEVsが捕捉される。Test LineにはEVsと結合する抗体が、Control Lineには金ナノプレート(AuPL)に標識した抗体と結合する抗体(抗体捕捉用抗体)が固定化されている。
- (b) 金ナノプレートを標識した抗体溶液を展開すると、(a)のステップで試験紙上に固定化されたEVsと結合する。
- (c) EVsが捕捉された部分に金ナノプレート標識抗体が集積することで、青色のラインが目視確認できる。

3.2.3 Exorapid-qICの内容物

Exorapid-qICには下記の内容物が含まれている(図11)。

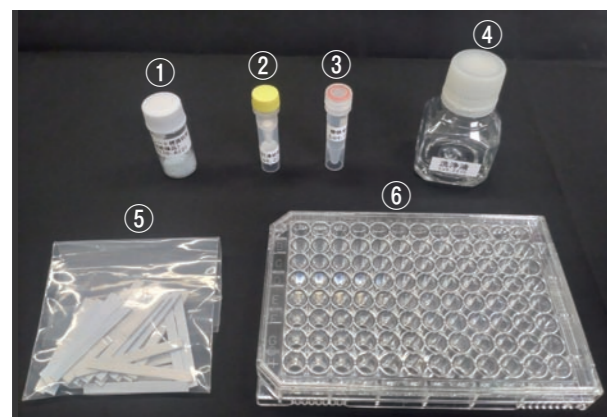


図11 Exorapid-qICの内容物

- ① 金ナノプレート標識抗体 [凍結乾燥] 弊社製の金ナノプレートにCD9抗体を標識し、凍結乾燥保存したものである。純水で溶解することで使用できる。
- ② 標準物質 [凍結乾燥] CD9のリコンビナントタンパク質を凍結乾燥保存したものである。純水で溶解し、希釈系列ごとに試験することで検量線を作成できる。
- ③ 検体希釈液 ②の希釈や、検体の希釈に使用するための溶液である。
- ④ 洗浄液 試験紙の洗浄に使用する溶液である。検体の展開後、および標識抗体の展開後に使用する。
- ⑤ イムノクロマト試験紙 Test Line、Control Lineにあらかじめ抗体が塗布された試験紙である。
- ⑥ 96well プレート 試験紙への溶液の展開を行うためのプレートである。

3.2.4 Exorapid-qICの特長

Exorapid-qICは3.1に記載のEVs検出手法①～④と比較し、専用の検出機器を必要とせず、操作が簡便で検査時間が短い特長がある。他の検出手法と比較した結果を示す(表3)。

表3 検査手法の比較(弊社調べ)

	Exorapid-qIC	①ELISA	②WB	③NTA	④FCM
検査時間	短 (0.75時間)	短～中 (3時間)	長 (5～8時間)	短 (1時間)	短 (1時間)
操作性	◎	○	△	○	○
スループット性	○	◎	○	△	△
検出感度	○	○～◎	○	◎	○～◎
初期費用	◎ (安価)	○ (やや高価)	○ (やや高価)	△ (高価)	△ (高価)
検出機器	不要	必要 (やや高価)	必要 (やや高価)	必要 (高価)	必要 (高価)

Exorapid-qICはEVsを含む検体溶液の展開ステップ(①)と、EVs表面抗原であるCD9を認識する抗体を標識した金ナノプレートの展開ステップ(②)の2段階でEVsを検出する(図12)。EVsを含まない場合(試験例A)では、試験紙上にControlのラインのみが出現し、EVsを含む場合(試験例B)では、試験紙上に

TestとControlの2本のラインが出現する。試験時間は全工程で45分程度であり、迅速な評価が可能である。試験後に台紙に試験紙を貼付し、スキャナーやプリンタなどで保存した画像を、Image J(アメリカ国立衛生研究所の開発したフリーソフト)で解析することにより簡易的な定量ができる。

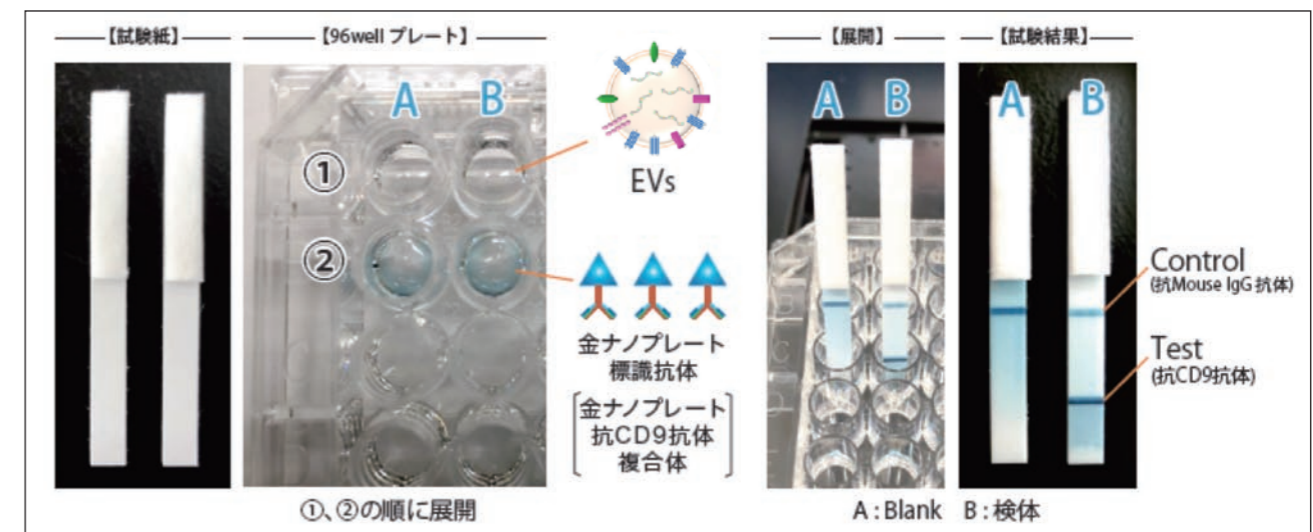


図12 Exorapid-qICを用いた試験の概要

## 3.3 Exorapid-qICを使用した試験例

Exorapid-qICを使用した試験例について以下に紹介する(図13)。

なお、試験例A,C,Dについては、がん由来の細胞を培養し、培養上清から回収したEVsを評価した。試験例Bについては、市販の血清を使用して評価した。

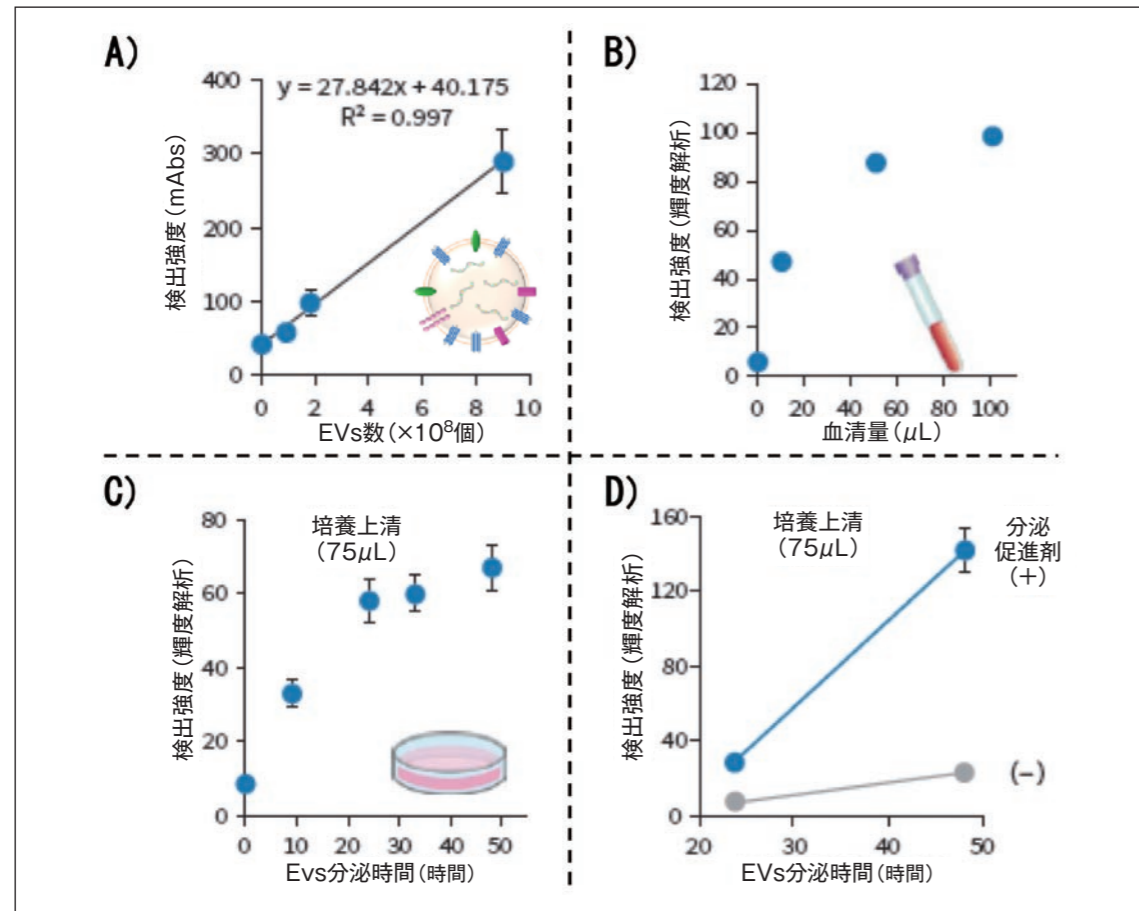


図13 Exorapid-qICを使用した試験例

## A) EVsの定量

Test Lineに捕捉されるEVs量に応じて金ナノプレート標識抗体の集積量が変わるため、Test Lineの色濃度を測定することによりEVsの定量が可能である。乳がん細胞MCF-7由来EVsを用いた試験において、ナノトラッキング装置で解析したEVs数と高い相関性が得られることを確認した。

## B) 血清中のEVs検出

血清を直接試験紙に展開することにより、EVsの検出が可能である。展開する血清の量に依存して検出強度が増大した。キットに付属の標準物質を用いて検量線を作成することにより、血清中のEVs量を間接的に定量することが可能である。

## C) EVs量のモニタリング

細胞培養上清(ウシ胎児血清(FBS)非含有)を直接試験紙に展開することにより、EVsの検出が可能である。細胞培養によるEVs放出量をモニタリングすることにより、培養の管理などに使用できる。(細胞株:MCF7)

## D) 薬剤によるEVs分泌促進評価

培養細胞のEVs分泌促進剤や抑制剤の効果を簡便に評価することが可能である。本試験ではCucurbitacin Bによる分泌促進の効果を評価した。(細胞株:HCT116)

## 4. おわりに

EVsの構造や研究事例、弊社の青色粒子「金ナノプレート」を標識材として使用したイムノクロマトキット(弊社製品名:Exorapid-qIC)について解説した。Exorapid-qICにより迅速・簡便にEVsを検出することができるため、EVs関連研究の推進・発展への寄与が期待される。また、将来的には早期のがん診断技術への応用も期待される。

EVs、とりわけエクソソームは、リキッドバイオプシーによるがんの早期検査の材料として大いに期待される。また、直近では美容・健康の分野でも利用されるようになり「エクソソーム」という用語の認知度が高まっているなか、Exorapid-qICが研究の一助となり、今後の技術発展に貢献することを期待している。

## 参考文献

- 厚生労働省 令和3年(2021)人口動態統計月報年計(概数)の概況  
(<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai21/dl/kekka.pdf>)
- 落谷孝広, 吉岡祐亮「医療を変えるエクソソーム-生体機能から疾患メカニズム、臨床応用まで」(化学同人, 第1版第1刷, 2018年8月25日発行)
- Borges FT, Reis LA, Schor N. Braz J Med Biol Res, 46(10), 824-30(2013)
- 門田 幸 他2名「日薬理誌(Folia Pharmacol. Jpn.)」149, 119~122 (2017)
- 高桑 雄一「綜説(Review Article):膜(MEMBRANE)」20(2), 92-102(1995)
- Mercedes Tkach, Clotilde Théry, Cell 164, March 10(2016)
- 中瀬生彦「生物物理」62(1), 13-18(2022)
- Sushrut Kamerkar et al., Nature volume 546, 498-503 (2017)
- Yusuke Yoshioka et al., NATURE COMMUNICATIONS, 5, article number:3591(2014)
- 吉岡 祐亮, 落谷 孝広, Cytometry Research 26(1):1 ~ 6, 2016
- Mariantonia Logozzi et al., PLoS One. 4(4): e5219(2009)
- Biji T. Kurien et al., Methods Mol Biol.; 1312: 17-30.(2015)
- Christina Coughlan et al., Curr Protoc Cell Biol. September ; 88(1): e110.(2020)