

細胞外小胞分析の標準化



前 川 正 充

1 はじめに

細胞外小胞 (EVs) は、ほぼすべての細胞から分泌される脂質二重膜構造を有するナノ粒子である。その生成過程には、細胞内の多胞体と細胞膜の融合による放出や、細胞膜からの直接的な出芽などが知られており、粒径はおよそ 30 nm から数 μm と幅広い分布を示す。EVs の内部や膜表面には、由来する細胞のタンパク質、脂質、核酸 (miRNA, mRNA, DNA など) や代謝物など多様な生体分子が封入されており、これらを輸送することで細胞間情報伝達の重要な媒体として機能している。近年、外科的手術を伴う組織生検に代わり、血液や尿などの体液試料を用いて低侵襲に診断を行うリキッドバイオプシーが注目されている。循環腫瘍細胞 (CTC) や循環腫瘍 DNA (ctDNA) に続く第 3 の分析対象として、血漿中の EVs が期待されているが、その分離計測には分析化学的な難題が存在する。第一の課題は、前述の通り EVs が単一成分ではなく、サイズや組成において極めて不均一な粒子分散系である点にある。第二に、血液などの複雑なマトリックス中には、リボタンパク質 (LPPs) などの夾雑成分が EVs よりも圧倒的に高濃度で共存しており、これらが測定妨害要因となる点である。こうした要因などにより、測定値の正確さや施設間での再現性が損なわれており、分析法の標準化が喫緊の課題となっている。本稿では、国際的な標準化指針における EVs の再定義から、クロマトグラフィー/質量分析法を活用したマルチオミクス解析による EVs 特異的マーカーの探索、EVs 濃縮の分離技術、EVs 粒子表面を含む特性評価について、分析化学における重要性の視点から概説する。

2 MISEV2023 による操作的定義と報告基準の標準化

国際細胞外小胞学会 (ISEV) は、EVs 研究の再現性と透明性を高めるため、2023 年に包括的な指針 (MISEV2023) を公開した¹⁾。本指針における最大の変更点は、サイズ、密度、生化学的組成といった客観的に測定可能な用語の使用を明確に推奨した点である。また、試料の採取、前処理、精製、特性評価の各段階において、推奨される項目が整理された。特に精製法については、回収率と特異性の間にトレードオフが存在することを認識し、研究目的に応じて手法を選択し、その妥当性を定量的指標 (粒子数/タンパク質比など) で示すことが求められている。また、血漿中 EVs 分析においては、溶血の評価や LPPs の混入度合いを評価する MIBlood-EV (minimal information to enhance the quality and reproducibility of blood extracellular vesicle research) の活用が、標準化の第一歩となる可能性がある。

3 マルチオミクス解析による循環 EVs の「ホールマーク」特定

EVs を非 EVs 粒子から識別するための定量的分子指標の確立は、標準化を推進する上で重要な課題である。Rai らは、密度勾配分離法 (DGUC) を用いてヒト血漿試料から EVs を精製し、4500 種以上のタンパク質と 829 種の脂質を同定した。この解析により、膜タンパク質である ADAM10 を含む 182 種のタンパク質と、ホスファチジルセリン (PS) などの 52 種の脂質が、循環 EVs において極めて保存性の高いホールマーク分子 (特徴的 EVs 指標) として同定された。特に ADAM10 は、EVs に特異的に濃縮され、非 EVs 画分と明確に区別可能であることから、機械学習においても 97% 以上の精度で EVs を識別できる強力なバイオマーカーとして提案されている²⁾。

一方、Su らは DGUC とサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) という分離原理の異なる手法を組み合わせた直交分離法を評価し、LPPs の主要成分であるコレステリルエステル (CE) の枯渇を確認することが、EVs の濃縮度を測る重要な指標となり得ることを示した。高度に精製された EVs 画分では、CE が顕著に減少する一方で、PS などの脂質が有意に濃縮される。このような指標の確立は、異なる手法・施設間での EVs 特性の比較に用いられる可能性がある³⁾。

4 単離技術の高度化：微量迅速化と直交分離の最適化

臨床現場やバイオバンクの試料に対する多検体分析を視野に入れた、EVs 精製・分析技術の改良も進んでいる。従来の超遠心法は大量の試料 (数 mL 以上) と長時間の

処理（数時間～数日）を要し、標準化の大きな妨げとなっていた。Haversらは、捕捉用のシリカ粒子を用いた音響トラッピング法を開発し、わずか8 μ Lの血漿から6分間でEVsを抽出する手法を開発した⁴⁾。この手法は、マイクロ流体デバイス内で超音波放射圧を利用してシリカ粒子の周囲にEVsを捕捉・洗浄するものであり、従来の超遠心法に比べ劇的な迅速化を実現しつつ、非小胞性血漿タンパク質を大幅に低減できる。特筆すべきは、抽出されたEVs画分から未処理の血漿では検出困難であった51種の低存在量タンパク質（その半数はEVs関連タンパク質として知られる）が検出された点である。また、Suらの研究では、SECカラムの細孔径の選択が、不純物である高比重リポタンパク質（HDL）の除去効率に著効することが示された³⁾。DGUCによる密度分離後に適切なSECを組み合わせた直交分離は、不純物に埋もれていた中枢神経系由来タンパク質などの検出を可能にし、新たなバイオマーカー探索をも可能にする有望な技術と考えられる。

5 バイオ分子コロナ：標準化における新たな解析次元

粒子としてのEVsだけでなく、その周囲を覆うバイオ分子コロナ（BCs）の存在が、EVsの議論に新たな視点を与えている。BCsは、EVsが分泌された環境（細胞、血漿や組織液）から獲得したタンパク質、脂質、核酸の多層構造であり、EVsの安定性、体内分布、細胞取り込み効率の重要な決定因子となり得るとされている。BCsは単なる付着した汚染物質ではなく、EVsの生物学的特性の一部として捉え直す必要がある。BCsには強固に結合したハードコロナと動的に入れ替わるソフトコロナが存在し、温度やpH、タンパク質組成に応じて変化する。また、このコロナ層が受容体結合を阻害したり、貪食細胞による排除が促進されることも明らかにされている。BCsはEVsの表面物性を変化させ、粒子間相互作用やコロイド安定性にも影響を与える。さらに、BCsを人工的に制御するコロナエンジニアリングは、薬剤の標的輸送能を高める次世代のEVs治療薬開発における有望な戦略ともなっている。したがって、EVsの標準的な特性評価には、粒子径や粒子数だけでなく、表面BCs構成成分などの化学的性質も考慮すべき要素と認識されつつある⁵⁾。

6 結言と今後の展望

EVs分析の標準化は、MISEV2023指針による命名法や報告基準の統一という形式的標準化から、ホールマーク分子の特定やBCsの解析という実質的なEVsの標準化へ向けた方向へ深化している。また、近年の研究における、ADAM10やPS（36：1）などのホールマーク分子は、EVs識別を可能にすることから、異なる施設間で

のデータ比較や品質管理に資する。今後の展望として、分析化学的な視点から三つの重要な方向性が挙げられる。第一に、LPPs、非EVs粒子や共存成分の排除を定量的評価する純度評価基準の設定である。第二に、臨床現場や大規模バイオバンク試料への適用を見据えたハイスループット抽出・分析技術の普及である。第三に、BCsを含めた包括的なEVsの特性評価が挙げられる。将来的には、粒子評価と界面分子評価が融合することで、EVs研究は生命医科学における確固たる分析プラットフォームへと進化しうると考えられる。こうした進展は、EVs研究を探索的段階から定量科学へと移行させ、その基盤技術として分析化学が重要な貢献を果たすことが期待される。

文 献

- 1) J. A. Welsh, D. C. I. Goberdhan, L. O'Driscoll, E. I. Buzas, C. Blenkiron, B. Bussolati, H. Cai, D. Di Vizio, T. A. P. Driedonks, U. Erdbrügger, J. M. Falcon-Perez, Q. Fu, A. F. Hill, M. Lenassi, S. K. Lim, M. G. Mahoney, S. Mohanty, A. Möller, R. Nieuwland, T. Ochiya, S. Sahoo, A. C. Torrecilhas, L. Zheng, A. Zijlstra, S. Abuelreich, R. Bagabas, P. Bergese, E. M. Bridges, M. Bruciale, D. Burger, R. P. Carney, E. Cocucci, R. Crescitelli, E. Hanser, A. L. Harris, N. J. Haughey, A. Hendrix, A. R. Ivanov, T. Jovanovic-Talman, N. A. Kruh-Garcia, V. Ku'ulei-Lyn Faustino, D. Kyburz, C. Lässer, K. M. Lennon, J. Lötvall, A. L. Maddox, E. S. Martens-Uzunova, R. R. Mizenko, L. A. Newman, A. Ridolfi, E. Rohde, T. Rojalin, A. Rowland, A. Saftics, U. S. Sandau, J. A. Saugstad, F. Shekari, S. Swift, D. Ter-Ovanesyan, J. P. Tosar, Z. Useckaite, F. Valle, Z. Varga, E. van der Pol, M. J. C. van Herwijnen, M. H. M. Wauben, A. M. Wehman, S. Williams, A. Zendrini, A. J. Zimmerman, C. Théry, K. W. Witwer : *J. Extracell. Vesicles*, **13**, e12404 (2024).
- 2) A. Rai, K. Huynh, J. Cross, Q. H. Poh, H. Fang, B. Claridge, T. Duong, C. Duarte, J. E. Shaw, T. H. Marwick, P. Meikle, D. W. Greening : *Nat. Cell Biol.*, **27**, 1 (2025).
- 3) H. Su, C. Fowler, C. L. Masters, K. J. Barnham, G. E. Reid, L. J. Vella : *J. Lipid Res.*, **66**, 100877 (2025).
- 4) M. Havers, A. M. Scott, N. Ortenlöv, C. Welinder, S. Ekström, T. Baasch, M. Evander, A. Lenshof, M. Gram, T. Laurell : *Anal. Chim. Acta*, **1379**, 344661 (2025).
- 5) A. Esmacili, M. Baghaban Eslaminejad, S. Hosseini : *Biomed. Pharmacother.*, **188**, 118202 (2025).



前川 正充 (MAEKAWA Masamitsu)

東北大学病院薬剤部/東北大学大学院医学系研究科/東北大学大学院薬学研究科/東北大学未来型医療創成センター（〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1）。東北大学大学院薬学研究科博士課程前期2年の課程。博士（薬学）、薬剤師。《現在の研究テーマ》LC-MS/MSを用いる臨床分析化学研究。《主な著書》“ニーマンピック病C型（NPC）診療ガイドライン2023”，診断と治療社。《趣味》卓球、蹴球、軽音楽、料理。

E-mail : m-mackawa@tohoku.ac.jp