

論 文 内 容 要 旨

Impedance-Based Living Cell Analysis for Clinical Diagnosis of Type I Allergy

(インピーダンスセンサを利用した I 型アレルギー
診断法の開発)

Sensors, 17(11), 2503, 2017.

主指導教員：秀 道広教授

(医歯薬保健学研究科 皮膚科学)

副指導教員：平川 勝洋教授

(医歯薬保健学研究科 耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学)

副指導教員：田中 暁生准教授

(医歯薬保健学研究科 皮膚科学)

入福 令子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

従来の I 型アレルギー検査法には特異的 IgE 検査, HRT (Histamine release test), 皮膚テスト等があるが, それぞれ偽陰性, ノンレスポonder, アナフィラキシーショックの危険性の問題があり, より信頼性が高く, 患者への負担が少ない責任抗原特定法が求められている。近年, 水晶振動子マイクロバランス, 電界効果トランジスタ, 表面プラズモン共鳴 (SPR) センサ, インピーダンスセンサ等の生細胞応答を検出できるバイオセンサが注目されている。当科ではこれまでに, センサ (金薄膜) 上の屈折率分布を二次元的に可視化できる SPR イメージング (SPRI) センサを開発し, 1 細胞レベルの屈折率分布をイメージングすることに成功し, I 型アレルギー診断への応用を含め多くの研究を行い報告してきた。しかしながら, SPRI センサで検出される金薄膜近傍での細胞の挙動は不明な点が多く残されている。本研究では, SPRI センサと同様にセンサが金薄膜上にあり, 金薄膜上の細胞接着や細胞形態変化に由来するインピーダンス (電気抵抗) 変化を Cell Index (CI) として無標識かつリアルタイムにモニタリングできるインピーダンスセンサを利用して, 生細胞刺激時にセンサ面で起こる細胞イベントの解析を行い, I 型アレルギー検査法への応用を検討した。

インピーダンスセンサとして iCELLigence™ を利用し, 生細胞としてラット好塩気球白血病細胞株 (RBL-2H3 細胞) と RBL-2H3 細胞にヒトの高親和性 IgE 受容体を発現させた RBL-48 細胞を使用した。RBL-2H3 細胞は抗 DNP-IgE 入りの培地で, センサ上に一晚培養し, 翌日, 各種刺激・阻害薬と DNP-HSA (抗原) 刺激を行い, その後の変化をモニタリングした。さらに, RBL-48 細胞を, 健常人, もしくは汗アレルギーを有する患者血清存在下で一晚培養し, 翌日, 汗抗原に対するインピーダンス反応をモニタリングした。

RBL-2H3 細胞を抗原刺激した場合, 数十分程度の CI の上昇 (インピーダンスの上昇) が観察され, その後 1~2 時間程度でベースラインまで減少した。また, 抗原濃度依存性に CI が増加しているインピーダンス応答が確認できた。βヘキソサミニダーゼ法を用いてマスト細胞からのヒスタミン遊離率を確認し, 同様に濃度依存性に増加している結果が得られた。

次に, RBL-2H3 細胞に各種刺激物 (PMA, Ionomycin) と阻害薬 (Genistein, Cytochalasin D, Nocodazole) を加えた際の CI 変化と, βヘキソサミニダーゼ法を用いてマスト細胞からのヒスタミン遊離率を確認した。PMA と Ionomycin は CI を増加させており, protein kinase C や Ca 動員は生細胞の CI 変化に重要な役割を担っていることがわかった。また, チロシンキナーゼ阻害薬である Genistein は抗原誘導による CI 増加や脱顆粒を強く抑制していた。このことはチロシンキナーゼのリン酸化反応は RBL-2H3 細胞の CI 変化に重要であることを示している。さらに, Cytochalasin D と Nocodazole も CI の増加を抑制していた。また, PMA では, CI は増加するが, 脱顆粒は起こさなかった。Cytochalasin D は抗原刺激を受けた RBL-2H3 細胞からの脱顆粒を増加させたが, 抗原刺激を受けた RBL-2H3 細胞の CI 増加や形態変化を抑制した。また, シャーレ内で細胞形態変化を再現し, 確認したところ, 抗原刺激を行うと細胞が膨化するが, 抗原と Cytochalasin D を加えたシャーレ内では細胞形態変化が抑制されることを確認した。これらの結果より, インピーダンスセンサは脱顆粒よりも細胞形態変化をみていることが示された。

さらに、この方法を臨床応用するために、汗アレルギーのある患者血清と汗アレルギーのない患者血清を用いて、患者血清で感作した RBL-48 細胞を汗抗原刺激した際のインピーダンス応答を確認した。汗抗原陽性患者では汗抗原陰性患者よりも明らかな CI の増加を認め、インピーダンスセンサは I 型アレルギー診断に有用と考えられた。

インピーダンスセンサを利用した新規 I 型アレルギー診断法を確立した。本技術は微量の患者血清があれば実施可能であることから、従来法よりも侵襲性が低く高信頼性の診断法となり得る。