

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	入福 令子
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主 査 教授	菅野 雅元	印	
審査委員 教授	杉山 英二		
審査委員 准教授	竹野 幸夫		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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nder, 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。申請者の所属する研究室では, 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や, I 型アレルギー診断への応用を報告してきた。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, 楕形の金薄膜電極に近接する細胞の接着面積や細胞形態を反映するインピーダンス (電気抵抗) 変化を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用い, 生きた細胞を刺激して起こる反応を Cell Index (CI) として解析し, I 型アレルギー検査への応用を検討した。</p> <p>インピーダンスセンサには iCELLigence™ を用い, 細胞にはラット好塩気球白血病細胞株 (RBL-2H3 細胞), および RBL-2H3 細胞にヒト高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) α サブユニットを発現させた RBL-48 細胞を使用した。RBL-2H3 細胞は抗 DNP-IgE 入りの培地で一晚センサ上または通常の培養皿に培養し, 翌日, 各種刺激・阻害薬と DNP-HSA (抗原) 刺激を行い, 細胞の応答を各々 CI 及び β-ヘキソサミニダーゼ遊離量により解析した。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晩培養し, 翌日, 精製汗抗原に対するインピーダンス反応を解析した。</p> <p>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, 抗原の濃度を変えること反応パターンが変わることなく CI が増加し, 培養皿中で抗原刺激して起きた β-ヘキソサミニダーゼ遊離 (脱顆粒) と同様の濃度依存性が確認された。</p>			

次に、RBL-2H3 細胞を各種阻害薬（ゲニスタイン、サイトカラシン D、ノコダゾール）で処理した後に PMA、イオノマイシンを加え、CI 変化と β ヘキソサミニダーゼ遊離率を比較検討した。その結果、PMA は β ヘキソサミニダーゼ遊離を起こすこと無く緩やかに CI を増加させ、イオノマイシンは β ヘキソサミニダーゼ遊離、CI ともに大きく増加させた。また、チロシンキナーゼ阻害薬のゲニスタイン、微小管重合阻害薬のノコダゾールはいずれも抗原誘導による CI 増加と脱顆粒を抑制した。これらの結果から、Fc ϵ RI 活性化により引き起こされるチロシンキナーゼのリン酸化、さらにその下流で生じるプロテインキナーゼ C の活性化、細胞内 Ca 動員および微小管重合は、生細胞の CI 増加に重要な役割を担っていることが示唆された。一方、サイトカラシン D で処理した RBL-2H3 細胞では抗原刺激による β ヘキソサミニダーゼ遊離が増加したが、CI 増加は逆に低下した。そこで RBL-2H3 細胞の細胞骨格をファロイジン標識 TRITC でラベルし、RBL-2H3 細胞の形態変化を確認したところ、無処理の RBL-2H3 細胞を抗原刺激すると細胞が膨化するが、サイトカラシン D により前処理すると細胞形態変化が抑制されることが確認された。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の形態変化をより強く反映することが示唆された。

最後に、今回確立したインピーダンス変化に基づく細胞応答評価法を I 型アレルギーの診断に有用できか、患者血清と RBL-48 細胞を用いて検討した。その結果、汗アレルギーを有する患者の血清存在下に培養した RBL-48 細胞においては精製汗抗原に対する CI の増加（細胞の活性化）が認められたが、健常人の血清存在下に培養した RBL-48 細胞では CI の変化は認められなかった。

以上より、今回確立したインピーダンスセンサによる細胞応答評価法とヒト IgE 受容体 (Fc ϵ RI α サブユニット) 発現細胞 (RBL-48) を組み合わせることで、わずかな血清から責任抗原を特定し得ることが明らかとなった。本技術は微量の患者保存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かつ信頼性の高い I 型アレルギー診断法となり得る。以上の結果から、本論文は、センサ上の細胞の形態変化・付着面積等に由来するインピーダンス変化を無標識、経時的に検出できる新規 I 型アレルギー診断法を確立し、臨床応用に有用であることを示した。本研究は、今後のアレルギー疾患の研究・診療に資すること大である。よって、審査委員会全員は、本論文が申請者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	入福 令子
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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)			
最終試験担当者			
主査 教授	菅野 雅元	印	
審査委員 教授	杉山 英二		
審査委員 准教授	竹野 幸夫		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年1月4日の第72回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年1月4日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 アトピー性皮膚炎の重症度とインピーダンスセンサにおけるCI値との関係 2 CI値、ヒスタミン遊離反応の大きさと固相法による抗原特異的IgE値の関係 3 細胞周期がCI値に与える影響 4 RBL細胞上に発現している抗親和性IgE受容体以外の受容体の種類 5 CIのキネティクスの示す意義 <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			