

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 6月 1日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591432

研究課題名（和文） 表面プラズモン共鳴による細胞機能センサーを用いた次世代アレルギー診断法の開発

研究課題名（英文） Development of diagnostic system for Allergy by living cell-SPR

研究代表者

秀 道広 (Hide Michihiro)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50284188

研究成果の概要（和文）：

本研究では、正確かつ微量の血液を使ったアレルギー診断を実現するため、センサチップ上の個々の細胞応答を可視化できる、二次元表面プラズモン共鳴センサを開発した。この装置を利用して、アレルギー原因細胞である好塩基球の、各種抗原に対する応答を、1細胞レベルで可視化することに成功した。このセンサを利用すれば、数百・1以下の僅かな血液を使って、抗原に対する過敏性を診断することが可能である。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we developed a surface plasmon resonance imaging (SPRI) sensor for accurate clinical diagnosis of allergy with small amount of blood. We could detect individual basophil activations in response to various kinds of allergens using this sensor. This system may be a useful tool for clinical diagnosis of type I allergy using a drop of patient blood.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：アレルギー

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：表面プラズモン共鳴、アレルギー、イメージング、バイオセンサー、ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

近年、食物や花粉、ハウスダストなどに対する過敏性を持つ患者数が増加しつつあり、深刻な問題に発展している。これらの疾患では、原因抗原を特定し、それを回避することで症状の出現を防ぐことができ、抗原の種類

によっては減感作療法などの根治的治療も可能である。しかし、小児の食物アレルギーは成長とともに過敏性は変化することが多く、1回だけの検査、あるいはアナフィラキシー症状の既往のみでは適切な診断を下すことはできない。

現在、最も信頼できる責任抗原同定の方法は、原因として疑われる食物（抗原）を負荷することで症状の誘発を確認する方法（誘発試験）であるが、被験者への負担が大きく、経時的な過敏性の評価はもとより、多くの施設では1回の検査すら実施することが困難である。そこで代替検査法として、主に血液、または患者皮膚を用いた検査が行われているが、小児では採取できる血液量に限りがあり、特に食物アレルギーにおいては偽陰性、偽陽性の割合が高く、しばしば思いこみによる不適切な食物除去が行われているのが現状である。

これまで申請者らは、SPR センサーを利用することで、様々な細胞の活動をリアルタイム、無侵襲的、かつ高感度に検出できることを見出してきた(Hide et al. 2002. Anal. Biochem. 302; 28-37、日本(3795312)および米国(米国 2004-0990A)で特許取得済み)。またヒト好塩基球を短時間で金表面に固定する方法を見出し、各種抗原による好塩基球の活性化を感度良く検出することを可能にした(Yanase et al 2007. Biosens Bioelectron. 23: 562-567、国内特許出願済み；生細胞固定化法 特開 2007-14327)。生きた細胞の活動を、蛍光標識などの操作を加えることなく把握するための手法としては、SPR の他、インピーダンスセンサー (Abassi et al. 2004. J. Immunol. Methods. 292, 195-205) と水晶振動子 (QCM) (Li et al. 2005. Biosens. Bioelectron. 20, 1333-40) を利用した生細胞センサーが開発されているが、これらは主に細胞の付着面積の変化を反映したもので、生細胞機能を評価する装置としては検出される内容が限定的である。そのため、ヒト好塩基球のような球状の浮遊細胞の解析には適さない。申請者らは、SPR センサーが、細胞の付着面積や形態変化のみならず、

QCM やインピーダンスセンサーでは知ることができなかった何らかの細胞内シグナル伝達過程に関わる変化を検出すること(Hide et al. 2002. Anal Biochem)、および、SPR を用いると、既存のヒスタミン遊離試験では解析不能の好塩基球（ノンレスポンドー）の反応でも検出できる場合があることを明らかにした(Suzuki et al. 2008. Allergol Int)。しかし、この方法で、どれほどの割合でノンレスポンドーの反応を検出できるかは不明で、かつ現在の技術では必要とする血液量が多く、また採血後結果が出るまでに数時間以上を要する。そこで今回、金薄膜をアレイ化し、反射光を顕微鏡と CCD カメラで解析することでセンサーの小型化および二次元化を実現し、多数の検体を同時、かつリアルタイムで観察することにより新しい臨床検査法として利用することを立案した。

2. 研究の目的

I型アレルギーは、生後数ヶ月から離乳期にかけて高頻度に出現し、時に生命に関わることがあり、正確な責任抗原の同定と過敏性の程度の把握は極めて重要である。しかし、現行の検査法はいずれも様々な難点があり、特に不適切な食物制限は成長障害などの多くの二次的な問題を生じる。本研究では、現在 I型アレルギーの診断法として利用されている末梢血好塩基球からのヒスタミン遊離試験の欠点を補う次世代検査法として、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance: SPR) により細胞機能を評価する新しいアレルギー検査法の構築を提案する。申請者らは、既に現有する SPR センサーを用いてヒスタミン遊離能のないヒト好塩基球の刺激応答を検出することに成功しており、本研究ではその変化に対応する細胞内分子機構を明らかにするとともに、微量の末梢血

液から効率的に好塩基球を分離・固定して多数の検体を同時並行的に評価できる SPR の多チャンネル化の方法を確立し、新しい臨床検査法として応用することを目指す。

3. 研究の方法

現在、細胞応答を検出できる SPR センサーは、多数の細胞の付着するセンサー面での反射光の光強度を一括して分光光度計で検出し、その強度変化を経時的に記録する。本研究では細胞の付着するセンサー面と光強度検出器の間に対物レンズと CCD カメラを配置することで、センサー面における二次元的な SPR 情報を得る。この方法により、これまで数百～数千個の細胞の平均化された刺激応答情報として得られていた SPR シグナルは、センサー平面上の二次元情報として解析されることになり、SPR センサーはマルチチャンネル化され、さらに十分な検出感度が得られた場合は単細胞レベルでの誘電率の変化を捉えることができる。本研究では、この装置に必要な最小限の好塩基球を末梢血液から分離する方法を確立し、抗原刺激による反応を解析して臨床的見地から最も有用なシグナル解析方法を検討、確立する。

4. 研究成果

1) 二次元表面プラズモン共鳴装置の作製

従来の SPR 光学系に、高屈折率プリズム、対物レンズ、CMOS カメラを組み合わせることで、センサチップ上の屈折率分布を二次元的に可視化できる、二次元表面プラズモン共鳴装置を開発し、屈折率等が異なる溶媒等の反射光強度の違いを画像として観察することに成功した。さらに、構築したセンサを使って生細胞の刺激応答を観察するため、37°C に保つ恒温槽と送液が可能なフローチャンバを組み合わせ、RBL-2H3 細胞（マスト細胞株）や PAM212（マウス角下細胞株）などを刺激し

た際の屈折率変化を 1 細胞レベルで可視化することに成功した。

2) 二次元表面プラズモン共鳴装置によるヒト末梢血由来好塩基球の刺激応答のイメージング

本研究では、既に確立された方法を用いてヒト末梢血より好塩基球を分離し、作製した細胞用二次元表面プラズモン装置を用いてヒト末梢血由来好塩基球の抗原刺激応答を解析した。好塩基球は、BA312モノクローナル抗体を用いて SPR チップ表面にコートされた金薄膜に固定され、各種抗原に曝露されると各々の個体の過敏性を反映する形で抗原特異的に誘電率が上昇し、臨床検査として利用可能であることが確認できた。また、異なるドナー由来の好塩基球を 1 つのチップの別々の場所の隣接した場所に固定し、これらを同時に抗原液に曝露すると、反応する細胞スポットと反応しないスポットを生じることも確認した。

3) マイクロ流路を用いたヒト末梢血液からの好塩基球の分離方法の開発

予めマイクロビーズでラベルした各種抗体を末梢血白血球浮遊液に添加し、マイクロ流路を通過する過程で好塩基球以外の細胞を補足し、好塩基球については少なくとも直接的に何の操作も加えない状態で流路出口で回収するチップを試作した。さらに流路出口には表面プラズモン共鳴チップを連結し、末梢血白血球分画から SPR センシングまでを一つの操作で行うことができるシステムを設計した。マイクロ流路には電磁力的に設計された磁気ビーズを埋め込み、検体注入部に入れられた白血球浮遊液は 16 本に分岐した流路を通

過し、効率的に好塩基球を回収することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. Hiragun T, Yanase Y, Kose K, Kawaguchi T, Uchida K, Tanaka S, Hide M. Surface plasmon resonance-biosensor detects the diversity of responses against epidermal growth factor in various carcinoma cell lines. 査読有(2012) *Biosens Bioelectron.* 32(1):202-7.
2. Yanase Y, Hiragun T, Yanase T, Kawaguchi T, Ishii K, Hide M. Evaluation of peripheral blood basophil activation by means of surface plasmon resonance imaging. 査読有(2012) *Biosens Bioelectron.* 32(1):62-8
3. 柳瀬 雄輝、秀 道広 「表面プラズモン共鳴を利用した次世代アレルギー診断」査読無(2011) 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌 Vol.5 No.4: 373-379
4. Yanase Y, Hiragun T, Kaneko S, Gould H, Greaves M, Hide M. Detection of refractive index changes in individual cells by means of surface plasmon resonance imaging. 査読有(2010) *Biosens Bioelectron.* 26(2) 674-681
5. Yanase Y, Araki A, Suzuki H, Tsutsui T, Kimura T, Okamoto K, Nakatani T, Hiragun T, Hide M. Development of an optical fiber SPR sensor for living cell activation. 査読有(2010) *Biosens Bioelectron.* 25(5) 1244-7

[学会発表] (計10件)

1. 柳瀬 雄輝、秀 道広 「イメージング SPRを利用した1細胞応答解析」『第57回応用物理学関係連合講演会』平塚市(神奈川県) 2010年3月
2. Yuhki Yanase, Takaaki Hiragun, Michihiro Hide 「Development of imaging surface plasmon resonance (ISPR) sensor for living cells activation」『Biosensors 2010』Glasgow, UK (May 2010) poster presentation
3. 柳瀬 雄輝、石井 香、秀 道広 「SPRイメージングのI型アレルギー診断システムへの応用」『第71回応用物理学学会学術講演会』長崎市(長崎) 2010年9月
4. 柳瀬 雄輝、川口智子、石井 香、秀 道広 「SPRイメージングを利用した1細胞応答解析とアレルギー診断への応用」『2011年春季 第58回応用物理学関係連合講演会』厚木市(神奈川県) 2011年3月
5. 柳瀬 雄輝、秀 道広 「表面プラズモン共鳴を利用した1細胞応答解析とアレルギー診断への応用」『2011年応用物理学会有機分子・バイオエレクトロニクス分科会研究会』神戸市(兵庫) 2011年6月
6. 柳瀬 雄輝、川口 智子、石井 香、秀 道広 「細胞屈折率可視化技術を利用した次世代アレルギー診断法の開発」『第23回日本アレルギー学会春季臨床大会』千葉 2011年5月
7. 柳瀬 雄輝、鈴木 秀規、川口 智子、石井 香、秀 道広 「ヒトIgE受容体発現細胞株を利用したI型アレルギー診断法の開発」『第72回 応用物理学学会学術講演会』山形 2011年8月
8. 秀 道広 「皮膚I型アレルギーにおけるヒスタミン遊離試験の有用性」第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 グランドプリンスホテル新高輪 2011年11月

9. 平郡 隆明、柳瀬 雄輝、小瀬 和洋、川口 智子、内田 一恵、田中信治、秀 道広「Surface plasmon resonance-biosensor detects the diversity of responses against epidermal growth factor in various carcinoma cell lines」『日本研究皮膚科学会第36年次学術大会・総会』京都 2011年12月

10. 柳瀬 雄輝、坂本 憲児、玉田 薫、秀道広「SPRイメージングによる1細胞応答の可視化」『2012年春季 第59回応用物理学関係連合講演会』東京 2012年3月

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

名称：細胞活性分析装置及び細胞活性分析法、並びに細胞同定方法

発明者：秀 道広、柳瀬 雄輝

権利者：国立大学法人広島大学

種類：特許

番号：特願：2010-061710

出願年月日：平成22年3月18日

国内外の別：国内

名称：生細胞の分析方法および生細胞の分析システム

発明者：秀 道広、平郡 隆明、柳瀬 雄輝

権利者：国立大学法人広島大学

種類：特許

番号：特願：2010-278131

出願年月日：平成22年12月14日

国内外の別：国内

名称：細胞分離チップ

発明者：坂本 憲児、柳瀬 雄輝、三宅 亮、秀 道広

権利者：国立大学法人広島大学

種類：特許

番号：特願：2011-111234

出願年月日：平成23年5月18日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等

<http://hiroshima-dermatology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秀 道広 (Hide Michihiro)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50284188

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し