

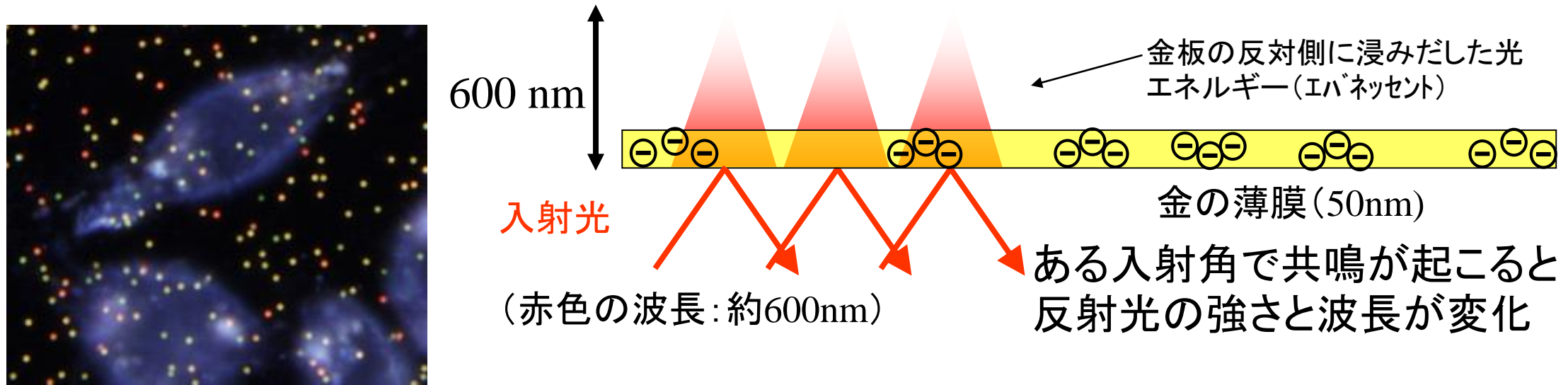
表面プラズモン共鳴イメージング センサによるアレルギー・ がん診断法の開発

広島大学大学院医系科学研究科皮膚科学
教授 秀 道広

令和2年10月1日

研究背景

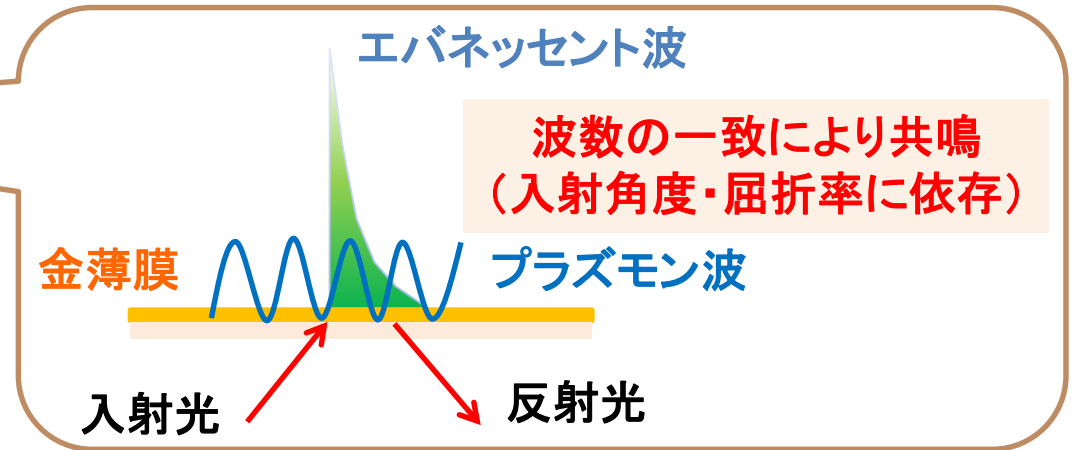
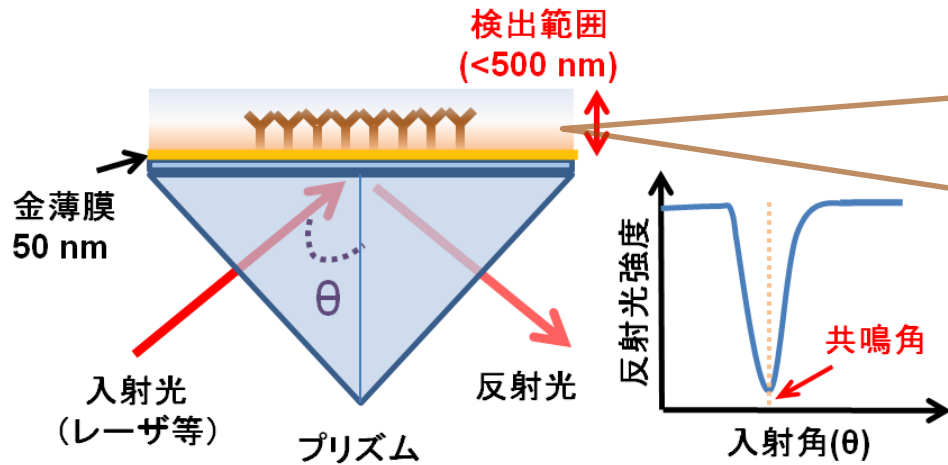
表面プラズモン共鳴 (SPR; Surface Plasmon Resonance) は、金属薄膜の光の反射で反対界面面の屈折率をリアルタイムで高感度に検出できることから、細胞機能を解析するバイオ研究支援装置及び臨床診断装置への応用が期待される。



研究の目的

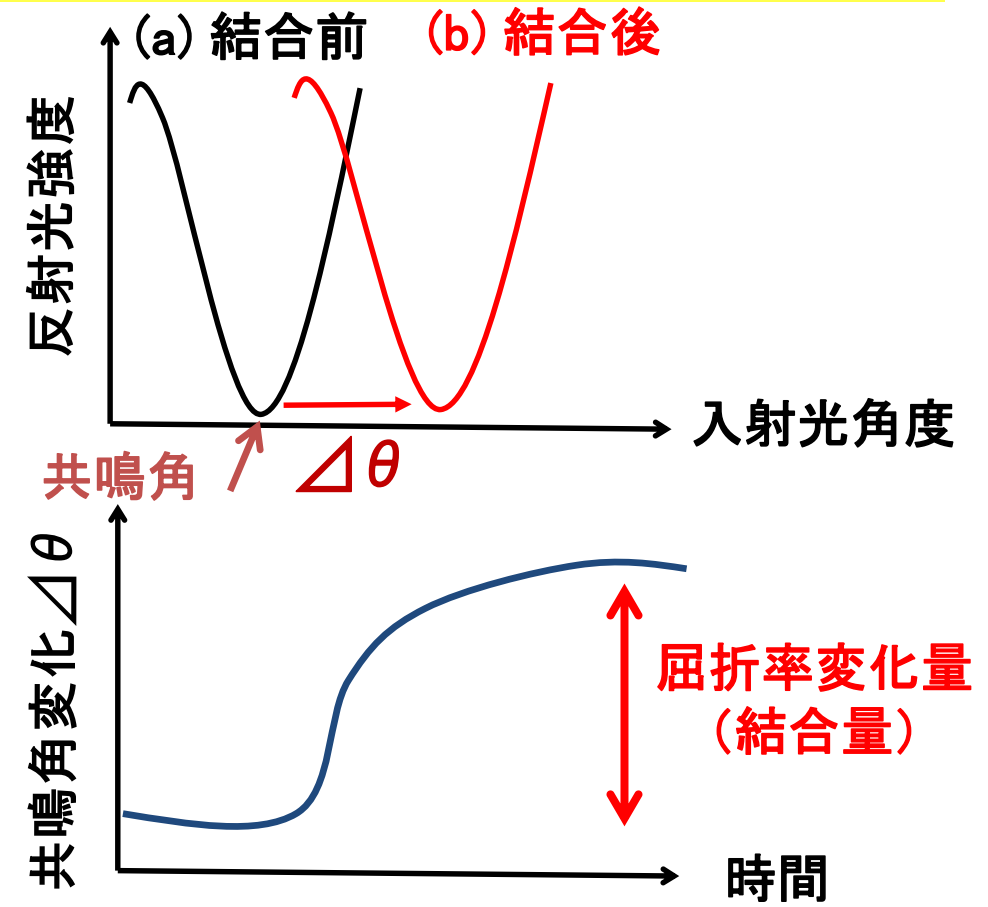
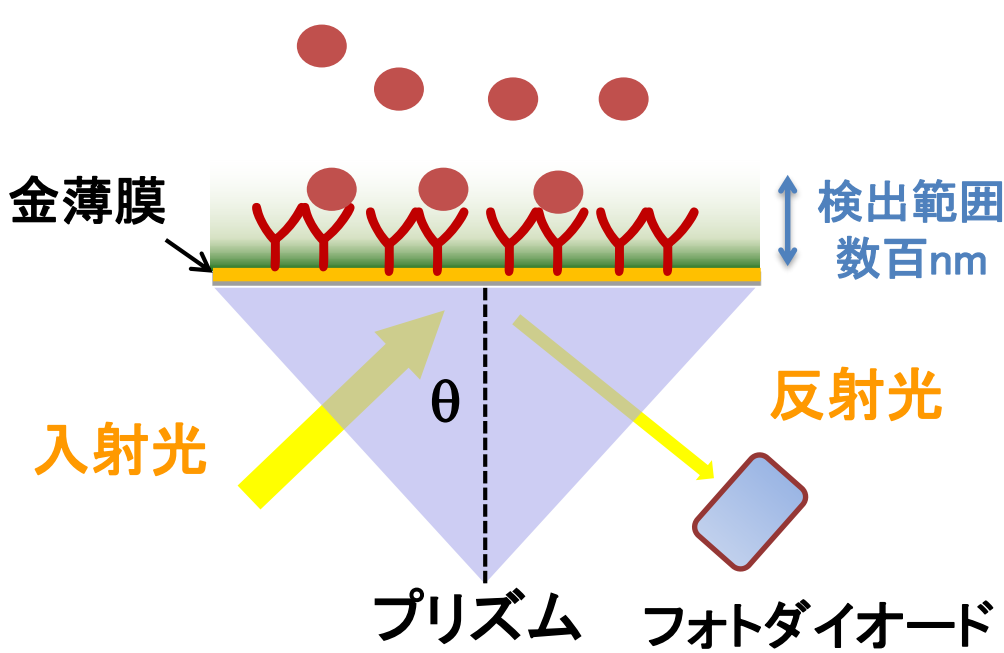
- ・個々の生細胞の刺激応答を、無標識・リアルタイムに検出できる技術の開発
- ・微量の血液から迅速に責任原因抗原を特定できるアレルギー診断法と、正常・腫瘍細胞の刺激応答や屈折率の違いを利用したがん診断法の確立

表面プラズモン共鳴(SPR)センサの原理

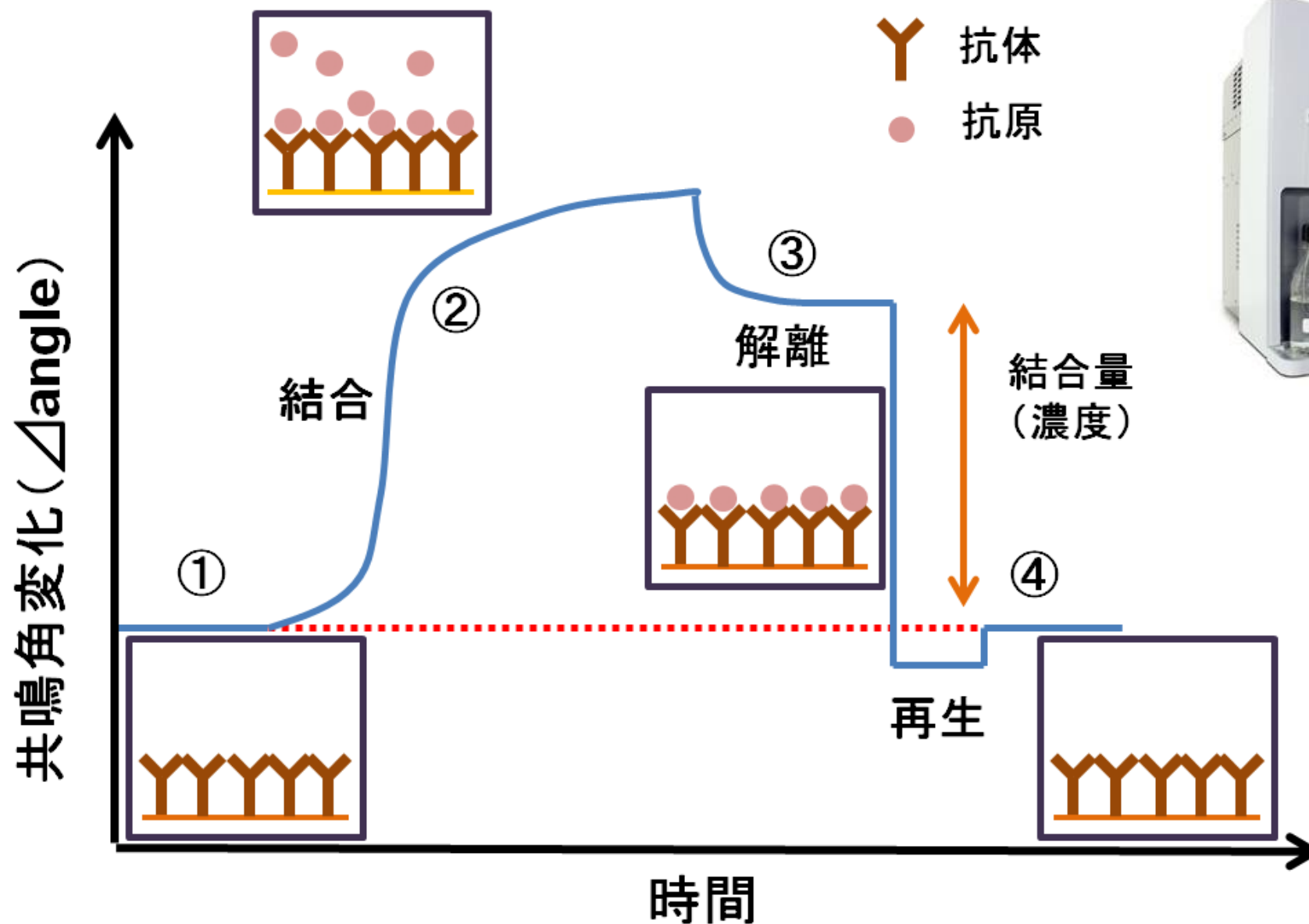


反射光が最も減衰する入射角度（共鳴角）変化からセンサ上の屈折率変化を検出できる

屈折率変化の測定例



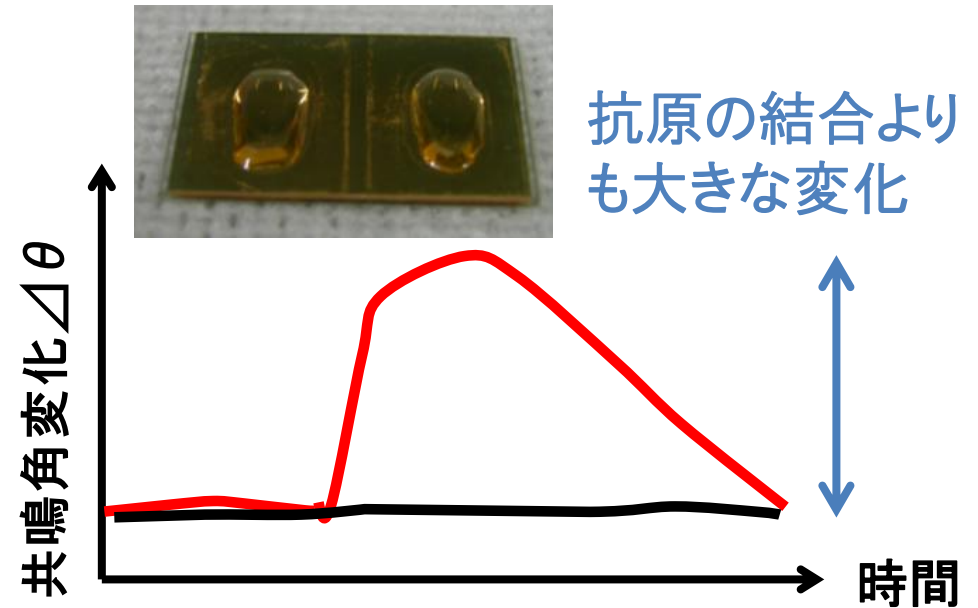
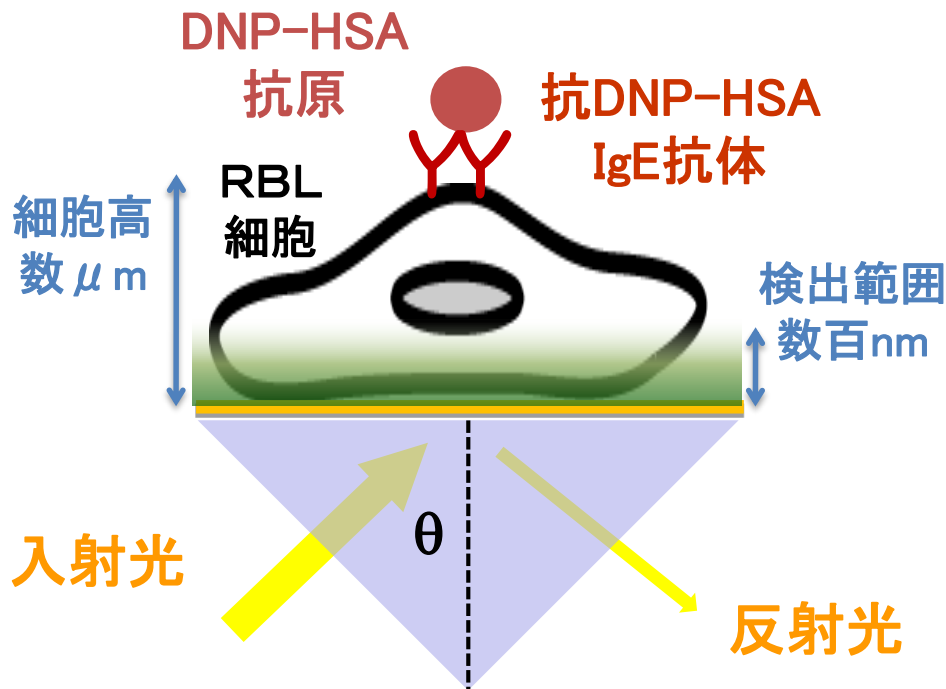
従来のSPRセンサによる抗原-抗体反応検出例



Biacore

溶液中の特定物質の濃度、結合の強さ等を測定することができる

Living-Cell SPR (LCSPR) (生細胞応答測定用SPR)



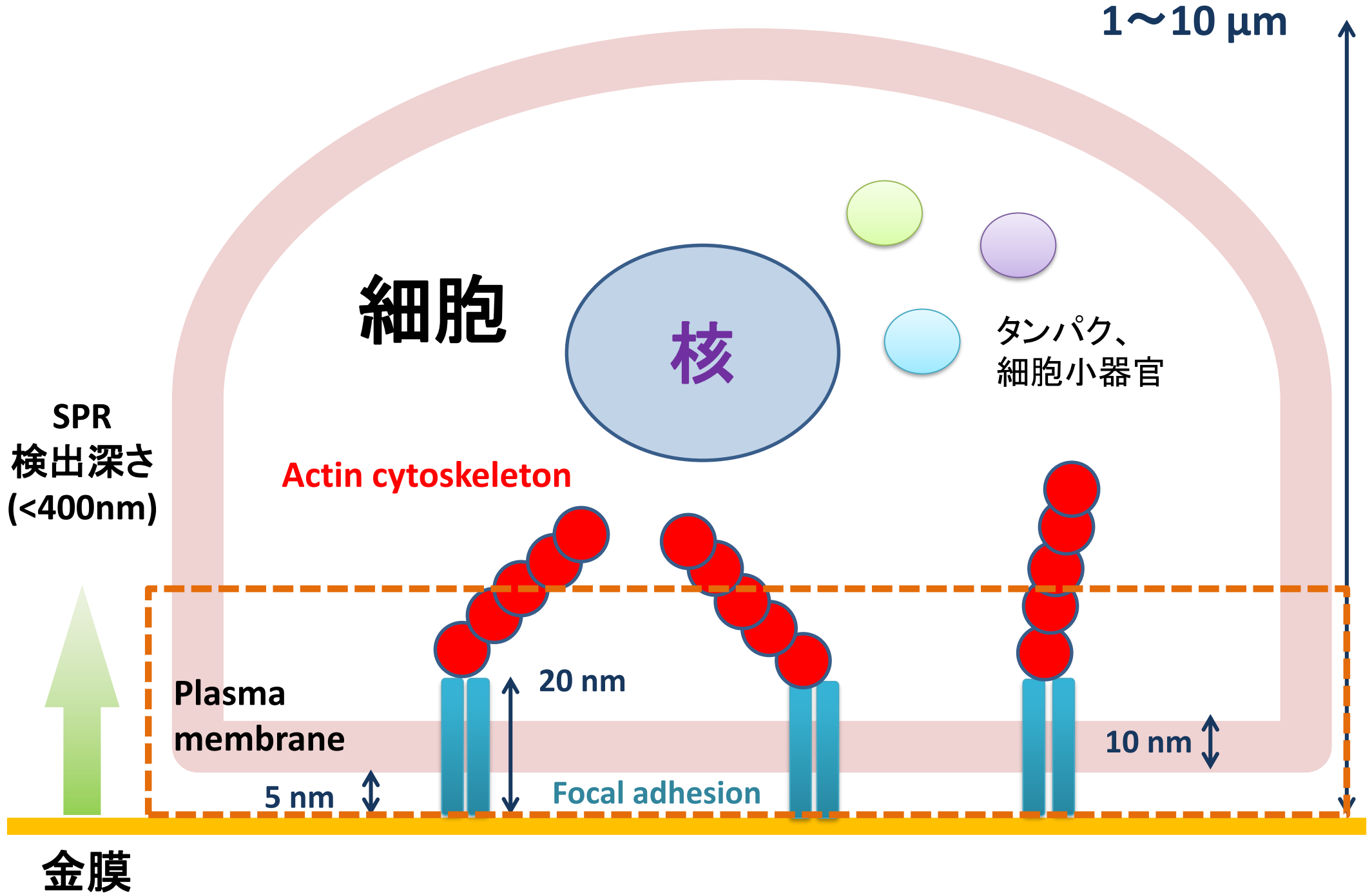
(Hide M, et al. Anal Biochem 302: 28-37, 2002)

刺激による膜近傍屈折率変化を検出

特徴

1. 生きた細胞の刺激応答を検出できる(生体に近い)
2. 無標識でよい(細胞を痛めない・本来の状態を損わない)
3. 迅速(リアルタイム)・高感度
4. 従来の方法とは全く異なる細胞機能測定原理に基づく(細胞膜近傍の屈折率変化(ヒスタミン遊離とは無関係))

細胞とSPR検出深さの関係



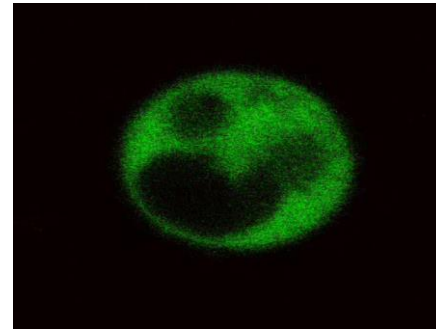
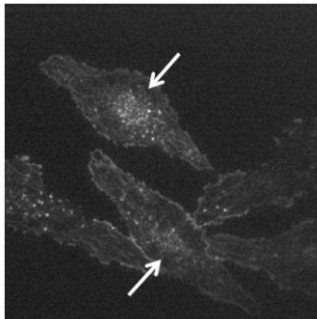
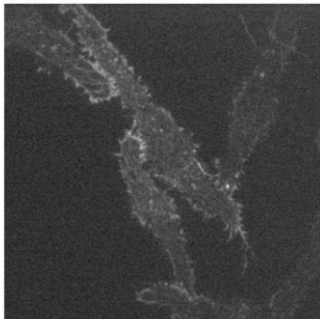
細胞活性化時の細胞内外の変化

細胞内

検出エリア
(< 400 nm)

Before stimulation

After stimulation

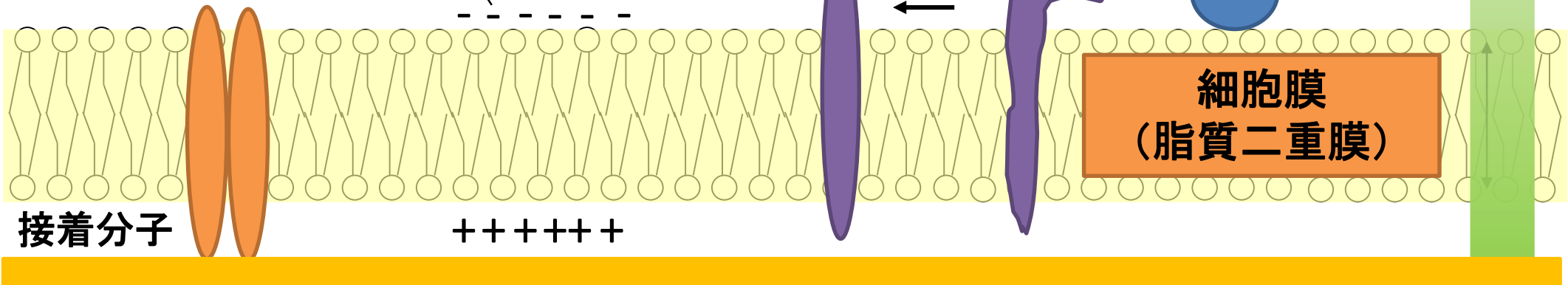


4. タンパク質の移動

1. 細胞接着状態

2. 膜電位
(membrane potential)

3. タンパク質構造



細胞膜
(脂質二重膜)

金膜

細胞外

細胞膜: 5-10 nm
Protein: ~ 10 nm
検出エリア: ~ 300 nm

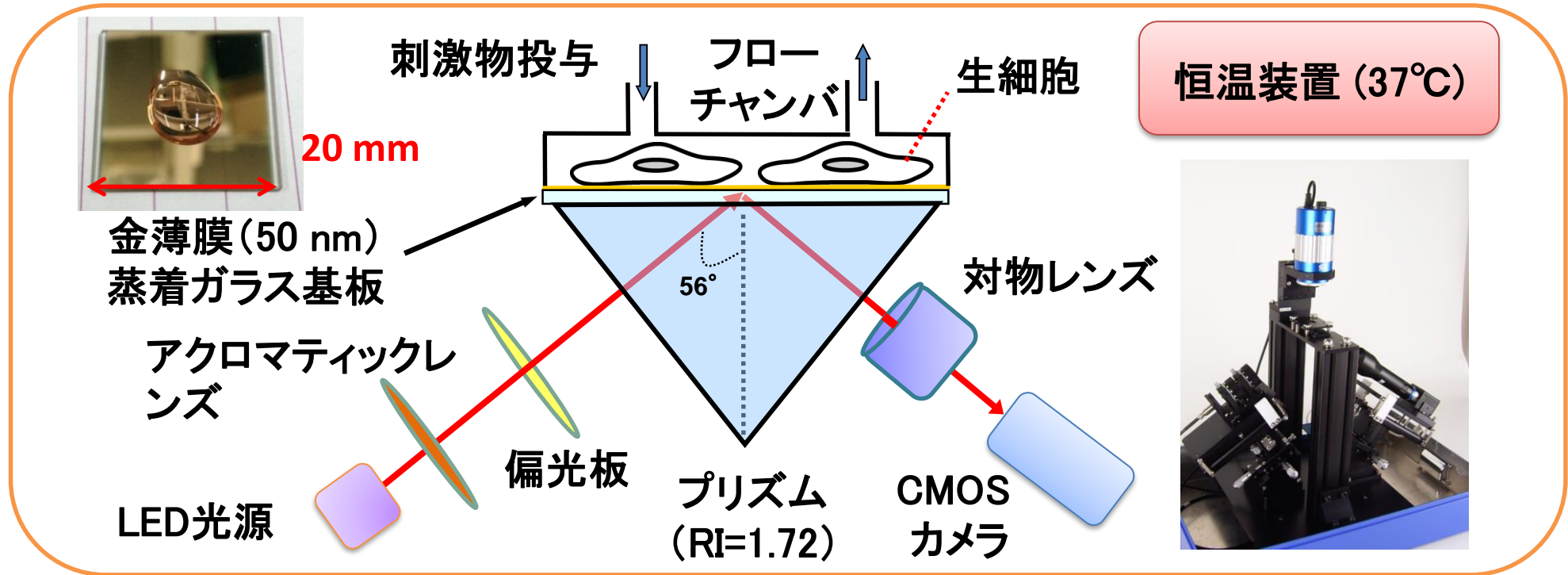
従来技術とその問題点

- ・ 1細胞の変化を検出することはできない
(細胞機能解析、試料の微量化に適さない)
- ・ マルチチャンネル化が困難
(スクリーニング装置に適さない)
- ・ 異なる細胞を個別に測定できない
(シグナルが平均化され小さな反応が見逃されてしまう)

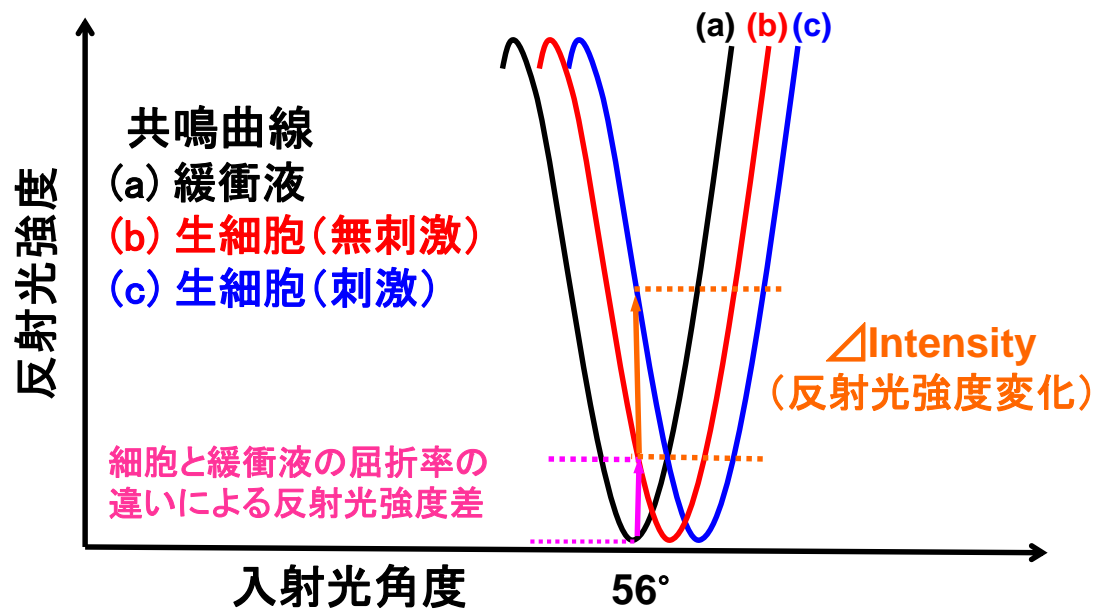


1細胞応答解析用SPRイメージング(SPRI)を開発

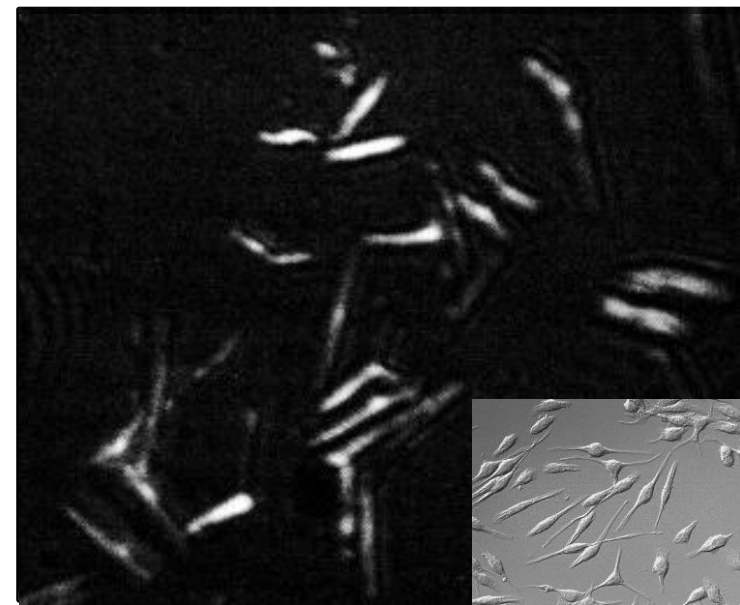
細胞応答可視化用SPRイメージング (SPRI)



生細胞屈折率可視化原理



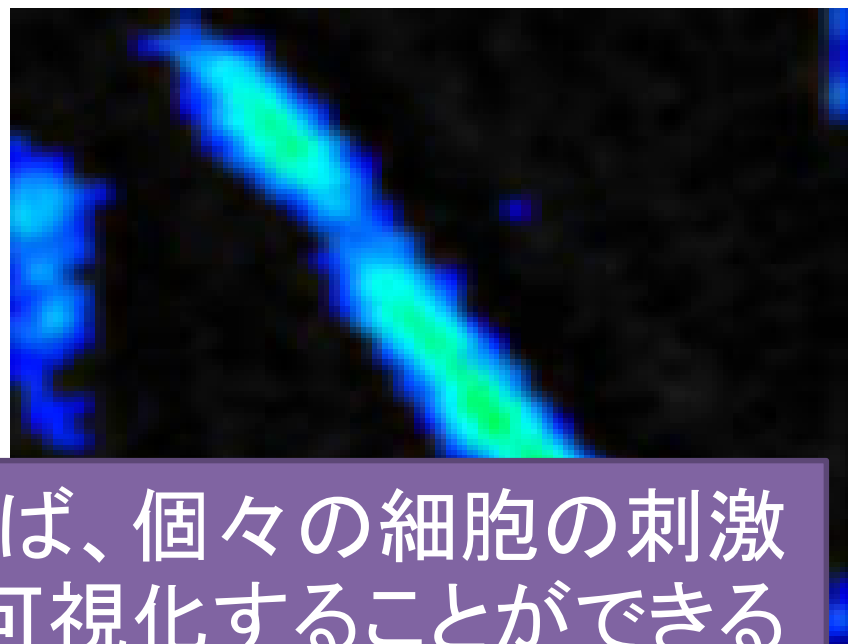
RBL-2H3細胞のSPRイメージ



1 細胞応答の可視化



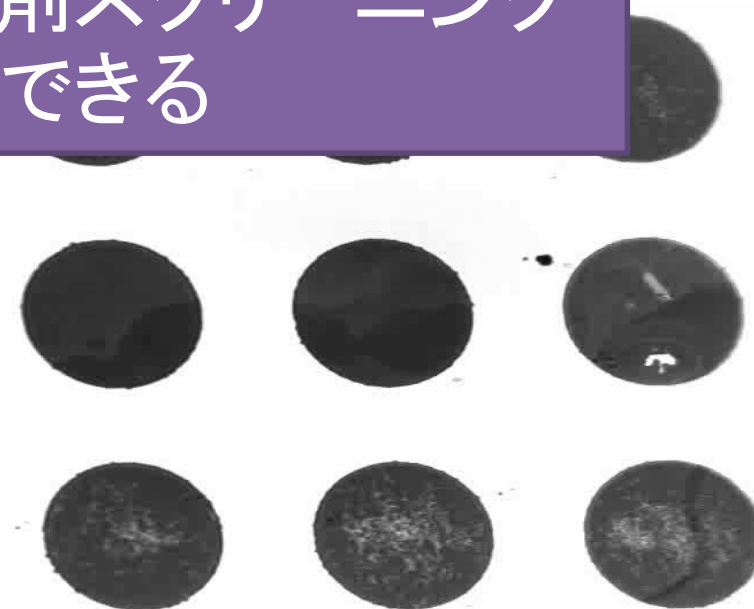
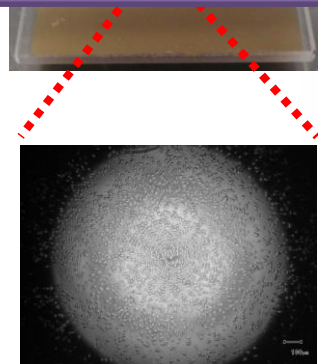
細胞内局所観察



SPRIセンサを利用すれば、個々の細胞の刺激
応答を標識することなく可視化することができる

異なる変

臨床診断、細胞品質評価、薬剤スクリーニング
等への応用が期待できる



I型アレルギー診断法としての応用例

抗原に対する好塩基球の応答を利用したアレルギー診断

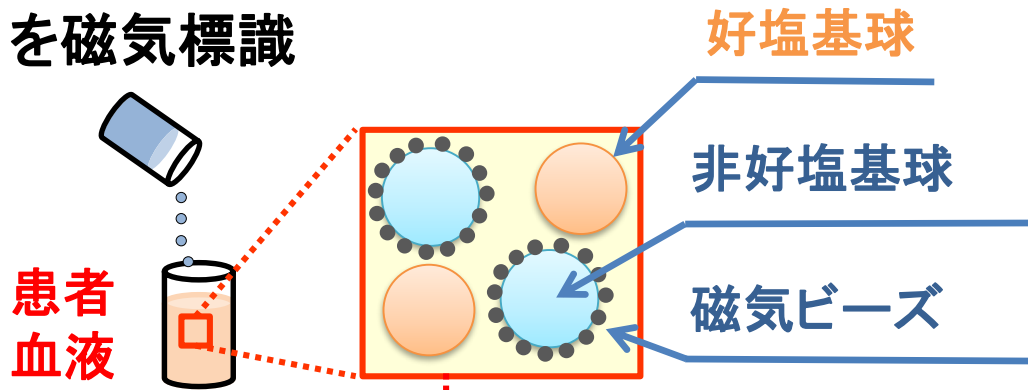
SPRIによる好塩基球活性化テストの流れ

1. 末梢血からの好塩基球分離



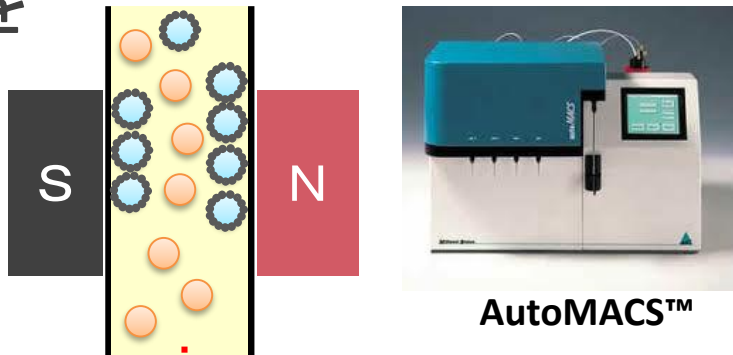
2. SPRIによる好塩基球活性化モニタリング

①好塩基球以外の細胞を磁気標識



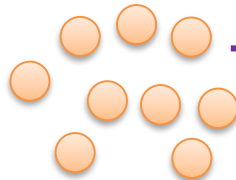
②標識細胞をトラップ

Magnetically trapped



③好塩基球回収

患者由来好塩基球

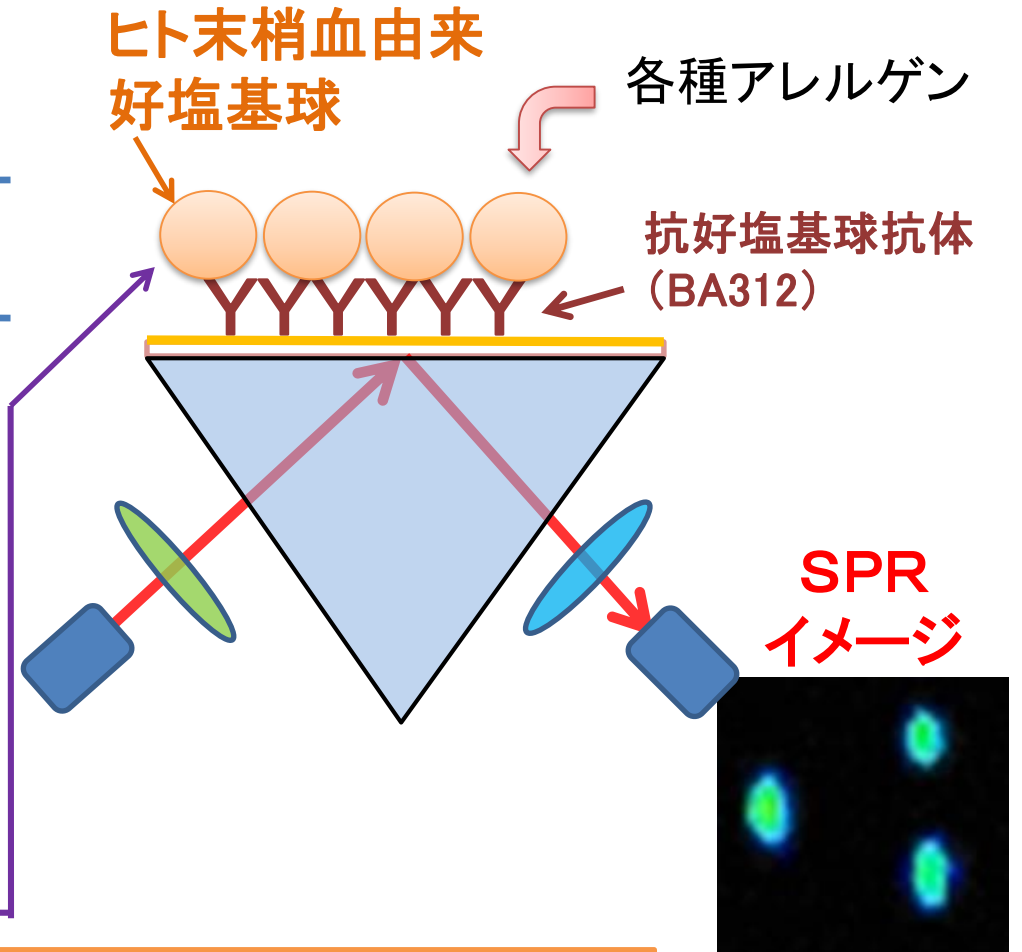


500 basophils from 100 μ l of peripheral blood

ヒト末梢血由来好塩基球

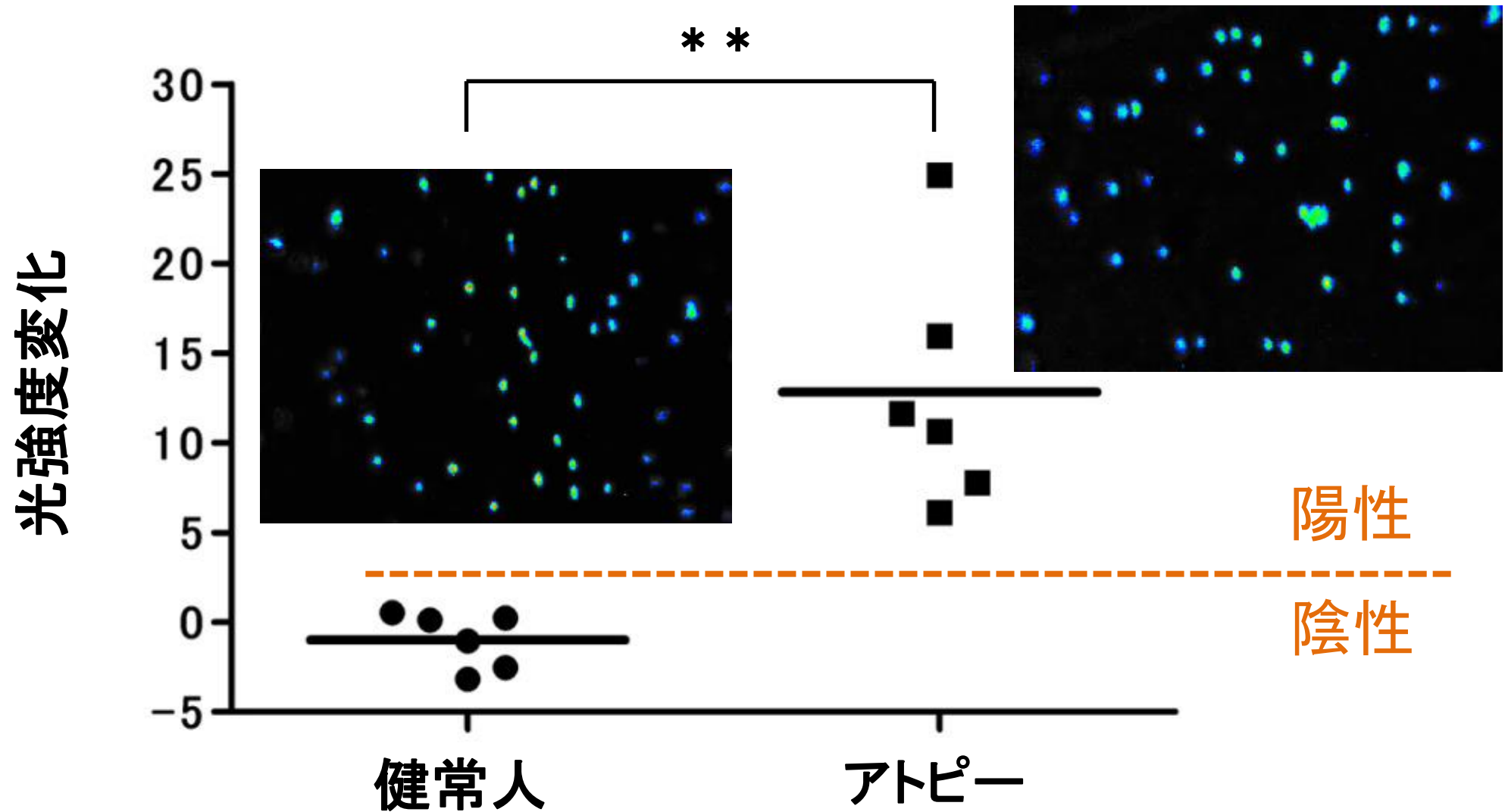
各種アレルゲン

抗好塩基球抗体 (BA312)

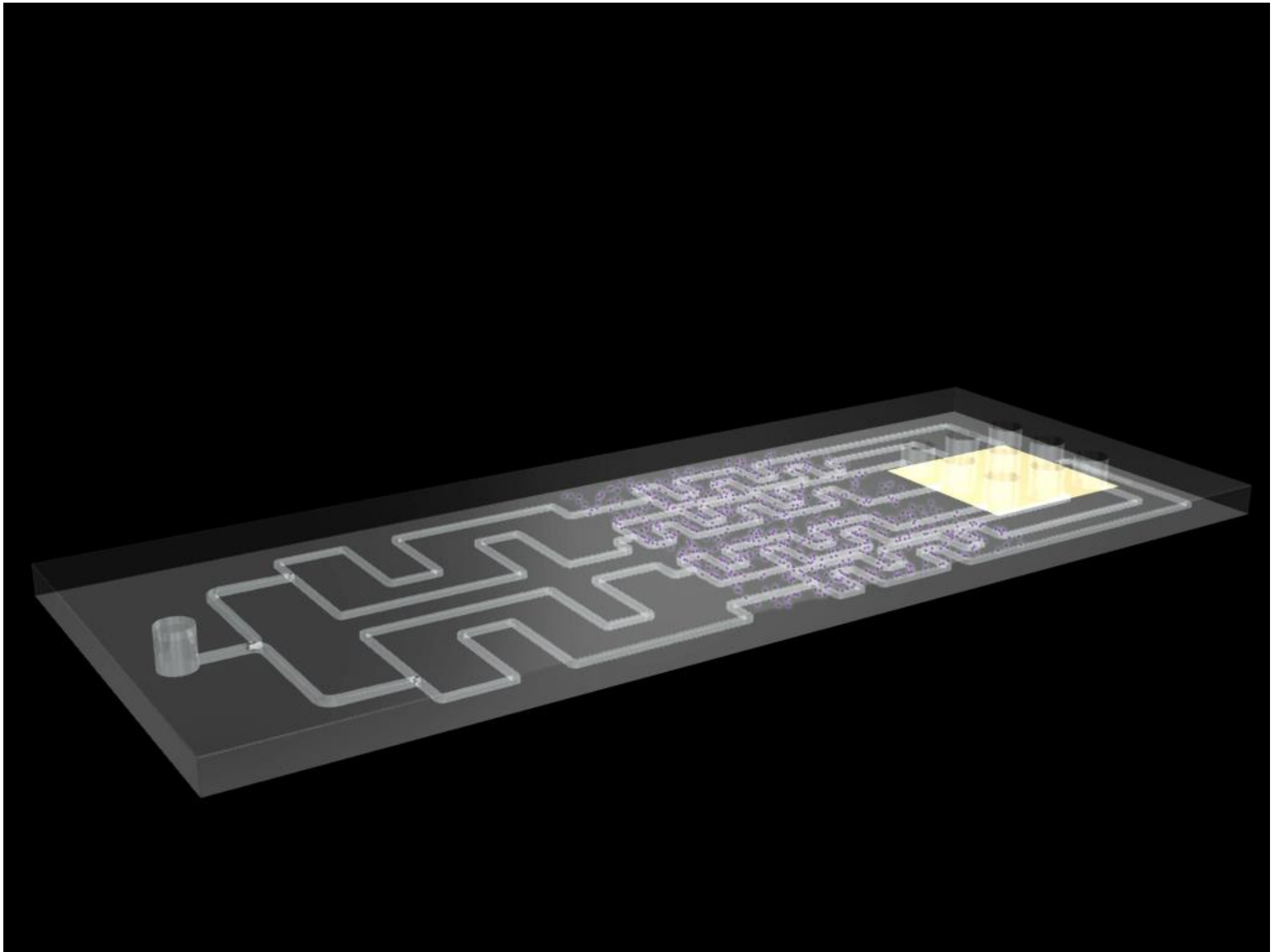


SPR
イメージ

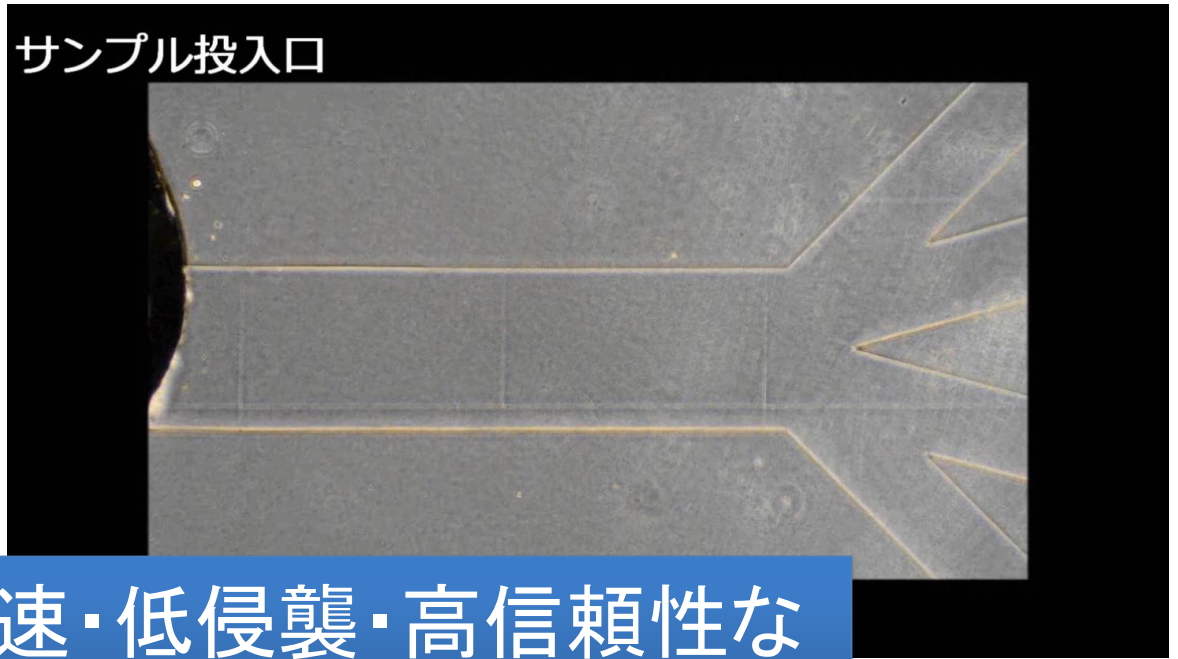
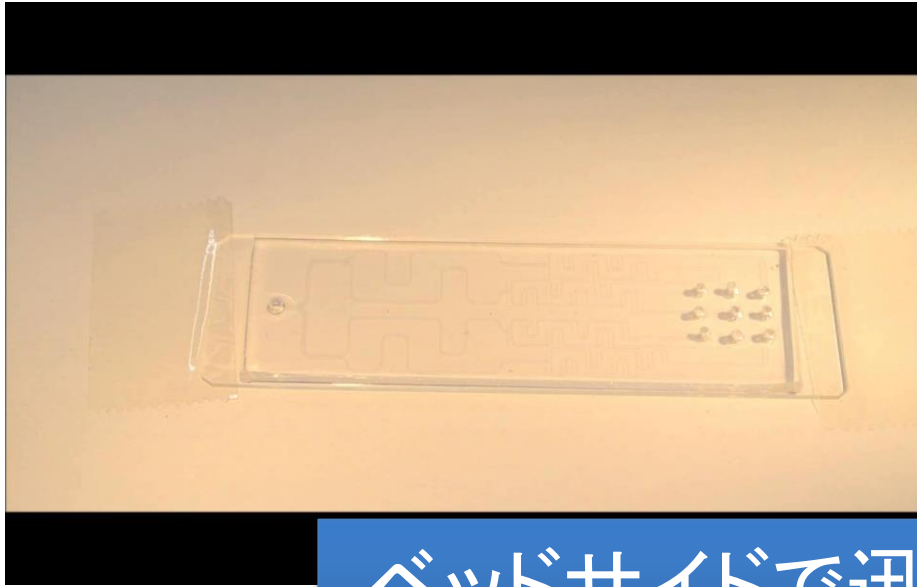
健常人、アトピー性皮膚炎患者の好塩基球を汗抗原刺激したときの細胞屈折率変化



数個の好塩基球の応答から患者のアレルゲンに対する過敏性を調べることができる

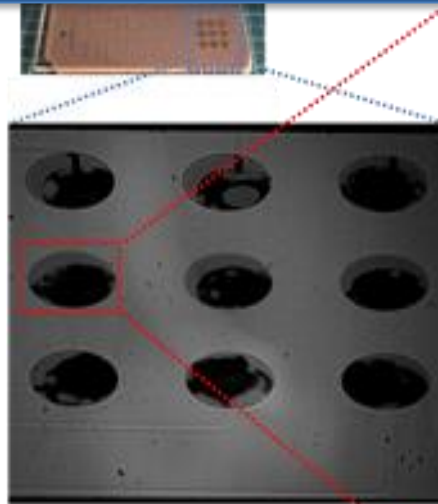
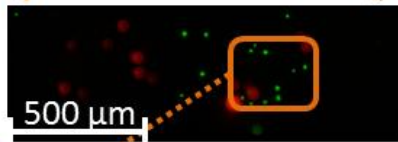
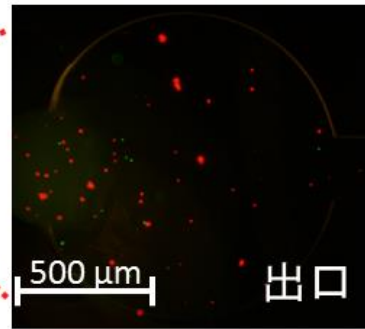
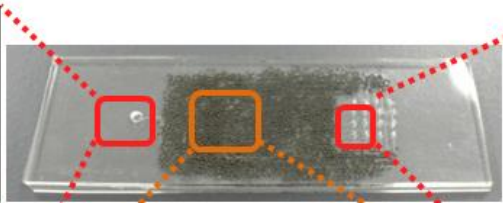
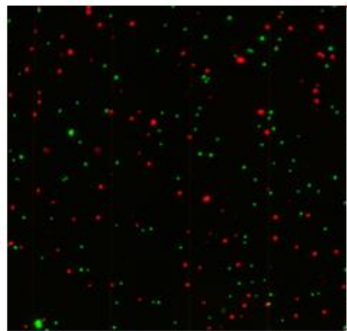


PDMS樹脂性のマイクロ流体チップ



ベッドサイドで迅速・低侵襲・高信頼性な
即時型アレルギー診断が可能

磁性粒子含有アッセイ（細胞分離能付）



磁力によって
捕捉された
修飾細胞

1チップ上で細胞分離・搬送・刺激応答観察が可能

がん診断法としての応用

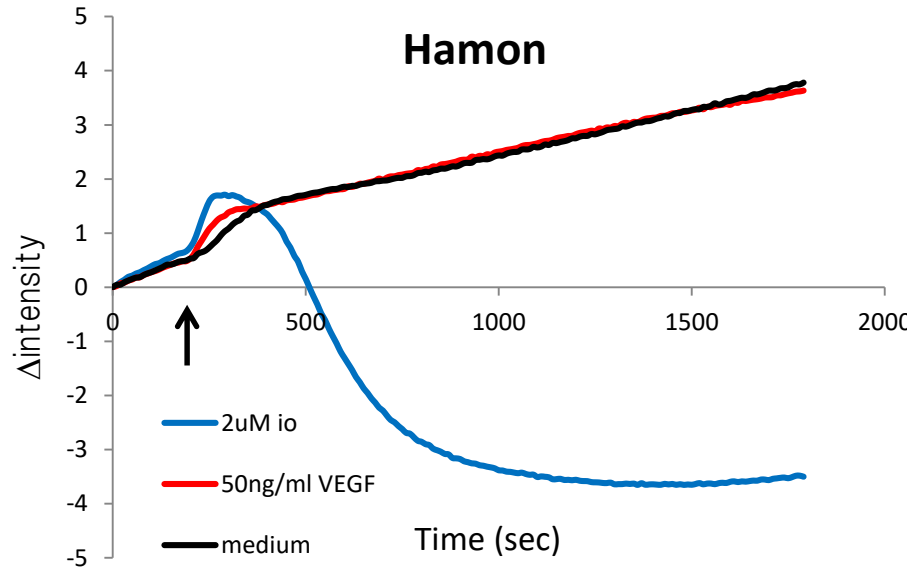
成長因子に対する正常・異常細胞の SPRシグナルの違い

正常
細胞

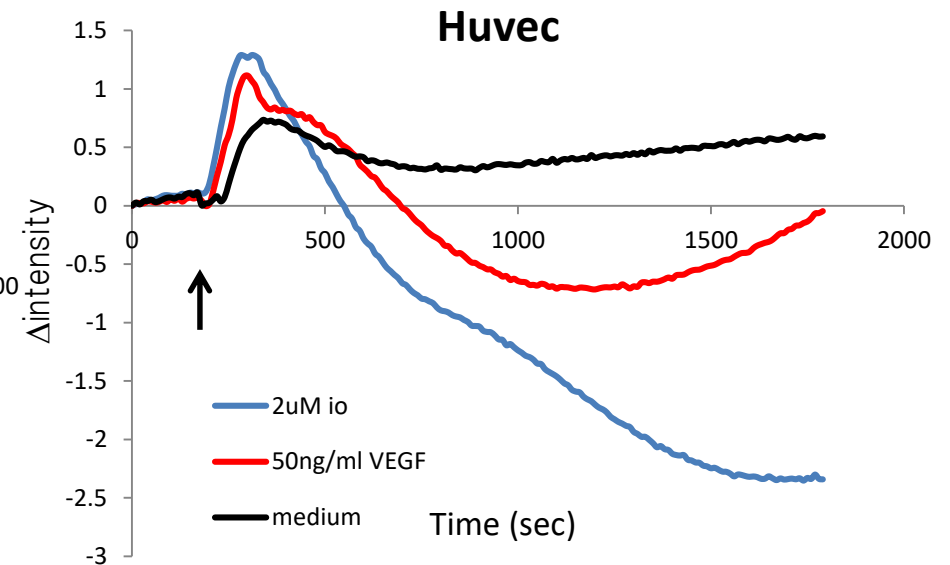


腫瘍
細胞

腫瘍細胞

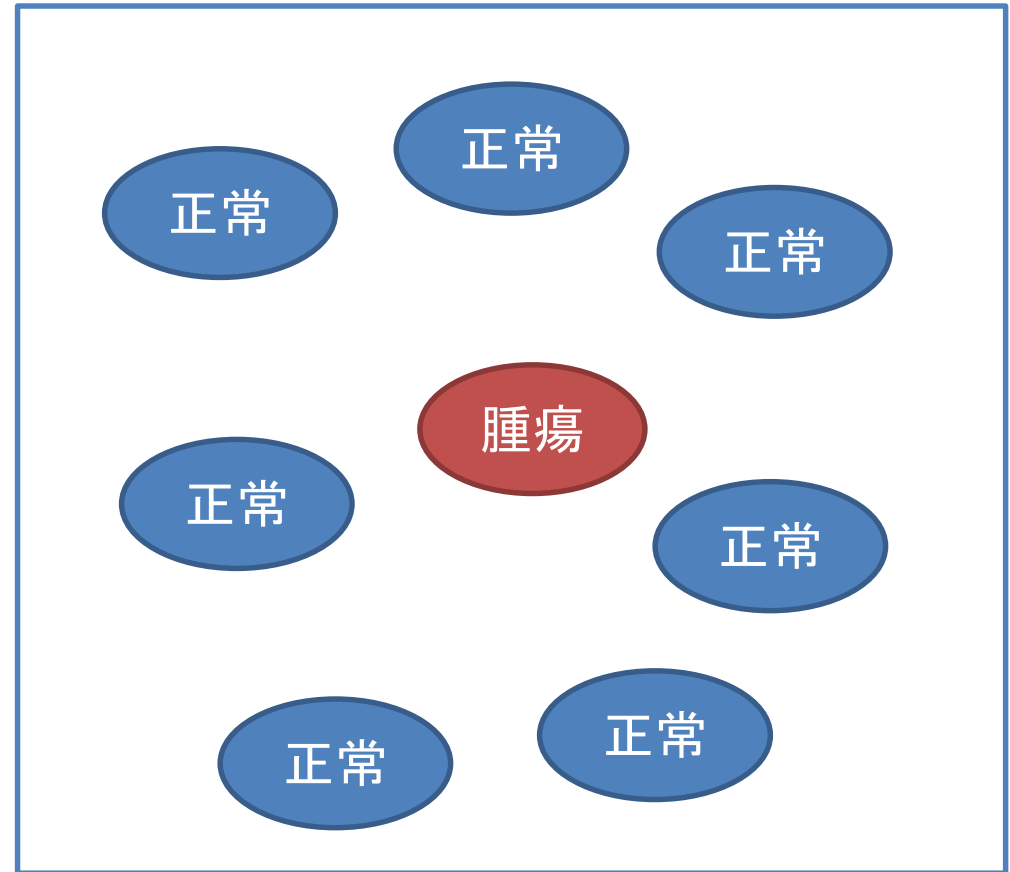
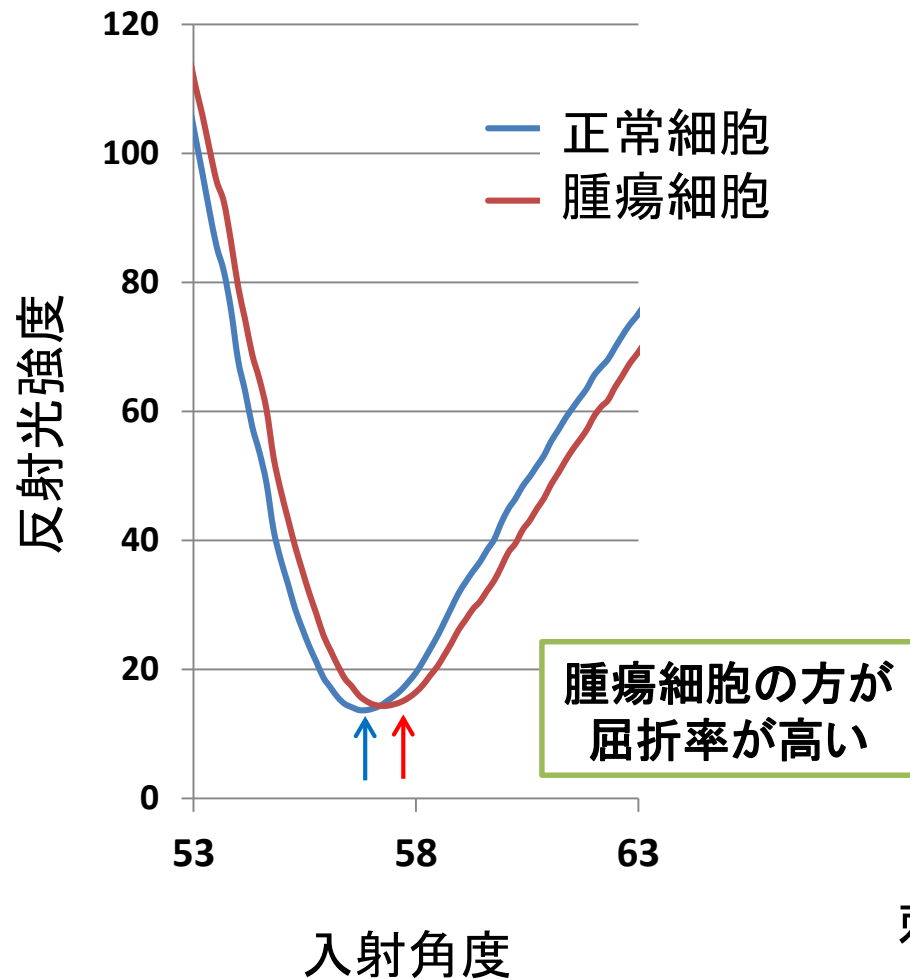


正常細胞



同じ組織中に異常細胞(腫瘍細胞)が混ざっていても、成長因子に対する反応性の違いを利用してがん細胞を発見できるかもしれない

正常細胞・腫瘍細胞の共鳴曲線の違い



刺激応答の違いや屈折率そのものの違いを利用して正常と腫瘍細胞の違いを見分けられる

- ・組織中の腫瘍細胞(生検組織から細胞を分離)
- ・末梢血を流れる腫瘍細胞(circulating tumor cells; CTC) の検出等に応用

新技術の特徴・従来技術との比較

- 生細胞の状態・刺激応答を、無標識で経時的に一細胞レベルで検出することに成功した
- 個々の好塩基球のアレルゲン刺激応答に基づく、迅速・正確なアレルギー診断が可能であることが示された
- 成長因子に対する応答の違いや、無刺激時の屈折率の違いから、がん診断に応用できる可能性が示された

想定される用途

- **基礎生物学研究分野**: 細胞膜近傍の屈折率を可視化することで、従来の手法では検出できなかった細胞の機能と微小構造の変化を経時的に解析
- **臨床診断分野**: アレルギーを起こす細胞の刺激応答や、悪性腫瘍細胞に特有の反応パターンを検出できた。
→アレルギー診断やがんの診断装置としての応用
- **再生医療分野**: 細胞に手を加えることなく細胞膜近傍の挙動を評価することによる、細胞治療、再生医療商品の品質管理(細胞の分化度や、健全さ等)など

実用化に向けた課題

- 研究に従事する人員と研究費が不足している
- 装置開発力の不足
(実用性を高めるための改良)
- 利益を生む製品としての利用方法についての検討が不十分

企業への期待

- 基礎研究分野・臨床分野の各々で用途に応じた製品の製造と販売を行うことができる企業との共同研究を進めたい。

新技術説明会で説明することによって、具体的に企業へ何を期待するか・求めているかを明確に記載してください。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 生細胞の分析システム
- 登録番号 : 特許第5946082号
- 出願人 : 国立大学法人広島大学
- 発明者 : 秀道広、平郡隆明、柳瀬雄輝

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞分離チップ
- 登録番号 : 特許第5812469号
- 出願人 : 国立大学法人広島大学
- 発明者 : 坂本 憲児、柳瀬 雄輝、
三宅 亮、秀 道広

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞分離チップの製造方法及び細胞分離チップ
- 登録番号 : 特許第5950278号
- 出願人 : 国立大学法人広島大学
- 発明者 : 柳瀬雄輝、秀 道広、
三宅 亮、杉本うらら、
有留克洋、坂本憲児

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : I型アレルギーの診断装置
およびI型アレルギーの診断方法
- 登録番号 : 特許第6226534号
- 出願人 : 国立大学法人広島大学
- 発明者 : 柳瀬雄輝、秀 道広、
川口智子、石井 香、坂本憲児

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : マルチウェル解析方法および
刺激用マルチウェルチャンバ
チップ
- 登録番号 : 特許第6170367号
- 出願人 : 国立大学法人広島大学
- 発明者 : 柳瀬雄輝、秀 道広、
川口智子、石井 香

産学連携の経歴(任意)

- 2000年-2001年 JSTの組織再生プロジェクトに
新技術コーディネーターとして参加
- 2002年-2007年 知的クラスター創成事業に採択
(研究代表者)
- 2005年-2007年 JST成果育成事業に採択
(研究代表者)

お問い合わせ先(必須)

広島大学

産学連携推進部 産学連携部門

産学官連携コーディネーター 川崎博和

TEL 082-257-5427

FAX 082-257-1567

e-mail hirokwsk@hiroshima-u.ac.jp