

アレルギー診断に向けた半導体原理に基づくバイオセンサの創製

Development of semiconductor-based bio-sensing for allergy tests

東京大学工学部¹、東京大学大学院工学系研究科²、広島大学大学院医歯薬保健学研究院³本多 正俊志¹、齋藤 暁子²、柳瀬 雄輝³、加治佐 平²、坂田 利弥^{1,2}Faculty of Engineering Univ. of Tokyo¹, School of Engineering, Univ. of Tokyo²,Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima Univ.³,○M.Honda¹, A. Saito², Y. Yanase³, T. Kajisa², T. Sakata^{1,2}sakata@biofet.t.u-tokyo.ac.jp

【はじめに】アレルギー疾患は、日本では約 2 人に 1 人が罹患し、世界的にも患者数が増加している。しかしながら、診断結果には長期間を要し、また、酵素を用いて抗体の有無のみを評価する簡易診断キットでは、診断の正確性に欠ける。そのため、臨床や創薬研究等の現場では簡便で正確な評価手法が求められている。本研究では、即時型アレルギーである I 型アレルギー機構に着目し、アレルギー反応を示す肥満細胞による抗原抗体反応を化学物質放出・呼吸変化をバイオパラメータ(指標)とし、半導体原理により簡便・定量・安価かつ非標識で評価可能か検討する。

【実験方法と結果】評価には Ta₂O₅/(Si₃N₄/SiO₂) をゲート絶縁膜とする n チャネルデプレッション型の電界効果トランジスタ(Field Effect Transistor; FET)を用いた。まず、アレルギー研究分野で広く使用されているラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3(Rat basophilic leukemia)を用いた。測定前日に Trypsin 処理で細胞を回収し、1500rpm、5min で遠心洗浄を行う。洗浄後の細胞液を希釈する際、培養液にはあらかじめ anti-DNP IgE 抗体(RPMI+10%FBS+PS/SM1%+IgE0.5μl)を添加しておいた。細胞数をカウントし最終細胞濃度 1×10⁵/ml で FET のゲート絶縁膜上に播種し一晚培養した。翌日、測定開始前に IgE 抗体を除去するため新しい培養液への交換を行った。炭酸ガス培養器内(5%CO₂、37℃、湿度 95~97%)に静置し気相を 2h~3h 平衡化後、測定を開始した。測定開始から約 1h 後に Ag(DNP-HAS)溶液(RPMI+10%FBS+PS/SM1%Ag5μl)を FET 上の培養液中へ 10μl 添加し、測定・反応を観察した。また、アレルギー反応により RBL-2H3 細胞より分泌されるヒスタミン濃度への応答を確認するため、センシング表面近傍の細胞とゲート界面に着目し、細胞の形状変化を制御する Cytochalasin 溶液(Cytochalasin-D:Calbiochem250255)を用いて計測を行った。次に、ヒスタミン受容体を有する正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC(Normal Human Umbilical Vein-Endothelial Cells)を RBL-2H3 と同様の方法で FET 上に播種し、抗ヒスタミン薬の有無による電気特性変化への影響を検討した。計測までの一連の方法は前記とほぼ同様であるが、異なる点として、RBL-2H3 を 1μm の孔を多数有する Trans well 上で培養し、それを HUVEC を予め培養しておいた FET 上に設置することで共培養を再現した点である。計測を開始する前にあらかじめ、抗ヒスタミン薬 Levocetirizine(sigma:L7795)を培養液中に最終添加濃度 200ng~500ng/ml になるよう添加しておいた。その後、計測開始から約 1h 後に Ag(DNP-HAS)溶液を添加し評価を行った。

以上の結果、RBL-2H3 細胞へのアレルギー反応に基づく半導体バイオセンサの電気特性変化は、ヒスタミン分泌が最大の電位変化因子である可能性が高く、本研究により半導体原理によるアレルギー反応の評価が可能であることが明らかとなった。