特集

動物実験代替えを 目的とした バイオセンシング

“動物実験代替えを目的としたバイオセンシング”を特集して

本特集では、従来、動物実験を用いて行われていた「薬剤スクリーニング」「安全性試験」「診断」などを非動物実験系で行なうことを可能にするバイオセンシング技術に関する研究を展開しておられる4グループに執筆をお願いした。動物実験は医薬開発をはじめ、安全性試験などにも必要不可欠であるが、動物保護の観点から多くの制限が課せられる世界的趨勢がある。また、実験動物固体間の差異や実験の定量性などに関する問題点も指摘されており、可能な範囲での動物実験代替え法開発が強く望まれるようになった。本特集では、鈴木先生による、「生物材料として酵母や真正粘菌を用いる毒性センサセンシングの試み」、春山らによる「培養細胞系を用いた薬剤スクリーニングシステムの開発」、新井氏らによる「微生物の呼吸活性を指標とした薬剤スクリーニング」など、医薬開発あるいは安全性試験の分野で動物実験代替え法となり得る研究の成果に関して原稿を執筆していただいた。また、中村先生に執筆していただいた「アレルギーセンサ」は、アレルギー同定診断の分野で皮膚テストなど苦痛を伴う診断法の代替え法になり得るものとして本特集に加えさせていただいた。ここで特集する研究はいずれも実験動物を必要としていた特定の実験系の代替え法となり得る先駆的研究である。本特集が動物実験代替え法開発の萌芽となれば幸いである。

春山 哲也 (東京工業大学 生命理工学部)

1 アレルギーセンサ

中村 徳幸

1 はじめに

生体内には酵素、抗体、結合タンパク質など特定物質に対する分子認識機能の優れた生体物質が存在する。なかでも抗体は生体が外部からの異種タンパク、細菌、ウィルス、薬剤などの抗原の侵入に対し産生され、この抗原を排除し自己を防御する。これが、免疫応答である。しかし、この免疫応答は生体の防御以外に、ある条件のもとでは全身または局所に障害を起こす場合がある。この異常な反応に基づく生体障害作用がアレルギー反応、あるいは過敏症(hypersensitivity)とよばれている。現在、アレルギーはCoombsとGellによってI~IVの4つの型に分類されている¹⁾。また、RoittによってV型が提唱されている²⁾。この中で、I型アレルギー反応

は血液中の好塩基球や組織中の肥満細胞の表面に存在するイムノグロブリンE (IgE) レセプターにIgEが結合し、この抗体の抗原認識部位に対応する抗原(アレルギー)が架橋的に結合することにより、細胞での脱顆粒反応が起こる。この脱顆粒反応により、ヒスタミン、セロトニンやSRS-A(slow reacting substance of anaphylaxis)などのケミカルメディエーターが放出され、気管支の収縮、血管透過性亢進、腺分泌の亢進などが起こる。アレルギー性鼻炎、花粉症、アトピー性皮膚炎などのI型アレルギー反応による疾患は近年、徐々にその患者数も増加し、現代病あるいは文明病と呼ばれている。

現在、アレルギーの同定、IgE抗体の検出・定量には皮膚

テスト(皮内, プリック, スクラッチ), アレルゲン吸入誘発試験, および RAST (radioallergosorbent test) などが行われている^{3,4)}。しかし, 皮膚テストやアレルゲン吸入誘発試験では患者がアナフィラキシーショックを起こす場合があり, また RAST では放射性同位元素を用いるため, 操作が煩雑なこと, 高価であり, その処理に問題があるなどの欠点を有する。このため, 新たな検出・定量法の開発が望まれている。

近年, 不必要な動物実験やテストを排除しようという社会的認識の高まりに伴い, 種々の代替法の検討やその情報の提供が CAAT (center for alternatives to animals testing, Johns Hopkins Univ.) や FRAME (fund for the replacement of animals in medical experiments) を始め, 多くの研究機関で行われている。代替法(alternatives)は, 主に以下の3つの観点から研究が展開・開発されている。

- (1) 実験材料としての動物を他のものに置き換えること (replacement)
- (2) 実験方法を工夫して使用数を削減し, また実験期間の短縮化を図ること (reduction)
- (3) 実験対象の苦痛を軽減すること, もしくは実験技術の改良により同じ規模の実験から, より多くの情報を得ること (refinement)

すなわち, あらゆる面から動物実験の効率的運用を図り, 可能な限り他のものに置き換えていこうとするものである。

このような観点を踏まえて, 筆者らのグループは, これまでに抗原抗体反応を利用した迅速・簡便なセンシングシステムの開発について進めてきた。本稿では, 代替動物実験を目的とした電極型のアレルゲンセンサについて, 原理とその応用ならびに, 最近の研究動向を含めて紹介する。

2 血球細胞を利用したアレルゲンセンサ

抗体は抗原と結合すると, 種々の生物活性を示す。この活性の一つに, 組織の細胞を刺激して抗原を排除する機能を始動させる作用がある。抗体のこの作用にตอบสนองして, アレルゲンを排除する細胞の種類は多く, その主なものとしては血液中に存在する顆粒球と単球, 組織中に存在するマクロファージと肥満細胞があげられる。

これまでに研究された電極型の免疫センサの多くは, 電極表面あるいは膜上に形成された抗原抗体複合体による電極電位もしくは膜電位の変動を測定することを原理として構成されている⁵⁾。しかしながら, これらセンサの測定対象はホルモンの一種であるヒト絨毛性ゴナドトロピンや腫瘍性抗原 α -フェトプロテインなどであり⁶⁾、直接, アレルゲンを検出, 測定できるセンサについては報告されていなかった。ここでは血球細胞を利用したアレルギーセンサについて述べる。

2.1 動物細胞を利用したアレルゲンセンサ

アレルギー性鼻炎・喘息などの即時型(I型)アレルギーは, アレルゲンに対して生体内で産生されるIgE抗体が主な原因と考えられている。好塩基球や肥満細胞は, 細胞表層に識別素子としてIgEレセプターを有している。このIgEレセプターに結合したIgEがアレルゲンで架橋されると, 細胞内の塩基性顆粒やヒスタミン, セロトニンなどの化学物質が放出されてアレルギー反応が起こる。したがって, 電極を利

用して細胞から放出される上記の物質を計測することで, アレルギー反応の検出も可能であると考え, Fig. 1に示した原理により, 動物細胞を用いたセンサシステムの構築を行った。まず, IgEレセプターを有するRBL-1 (rat basophilic leukemia)細胞をモデル細胞として使用した。このRBL-1細胞をメンブランフィルター上に吸着固定し, これをBPG (basalplane pyrolytic graphite) 電極に装着させ作用極とし, 対極には白金線, 参照極には飽和甘コウ電極(SCE: saturated calomel electrode)を用い, リン酸緩衝生理食塩水(PBS: pH 7.0)中でサイクリックボルタメトリーを行った(Fig. 2)。その結果, 0.34~0.35 Vと0.68~0.70 V(vs. SCE以後省略)付近に特異的なピーク電流が得られた。0.68 V付近のピーク電流値と細胞内の補酵素A (CoA)の間には相関関係が得られ, CoAがこの電位における細胞-電極間の電子移動反応の媒介物と推定された⁷⁾。もう一方の0.34 V付近のピーク電流は, 細胞中に含まれるセロトニンが関与していることが示された。そこで, マウスIgE(抗DNP)で感作したRBL-1細胞にアレルゲンとしてジニトロフェニル化した牛血清アルブミン(DNP-BSA)を加え, 抗原抗体反応を行わせた。IgEで感作させていないRBL-1細胞の0.34 Vでのピーク電流値は 2.0×10^5 の細胞から $1.26 \mu\text{A}$ であったのに対し, 2時間の抗原抗体反応により, 脱顆粒が起きた細胞のピーク電流値は $0.96 \mu\text{A}$ に減少していた(Fig. 3)。しかしながら, マウスIgE, DNP-BSAのみを加えた場合ではピーク電流値に変化はみられなかった。液体クロマトグラフィーによる分析結果から, 1.4×10^5 の細胞当たり, $0.90 \mu\text{M}$ のセロトニンの細胞外への放出が確認された。さらに, 他のアレルゲン(卵白, ミルク, 花粉など)の抽出液を加えた場合

Fig. 1 Schematic diagram showing mechanism of allergen detection by cyclic voltammetry.

Fig. 2 Schematic diagram of the electrode system for allergen detection using animal cells.

1: Function generator, 2: Potentiostat, 3: X-Y recorder, 4: Reference electrode (SCE), 5: Counter electrode (platinum wire), 6: Working electrode (BPG), 7: Cells, 8: Membrane filter, 9: Holder.

Fig. 3 Cyclic voltammograms of IgE sensitized RBL-1 cells before (A) and after (B) 2 h of incubation with allergen. Scan rate: 20 mV/s

では、ピーク電流値の減少はみられず、セロトニンの放出も確認されなかった。以上の結果より、IgE レセプターを有する細胞とアレルゲンの2時間の反応で、そのIgE に対応したアレルゲンを電極のピーク電流値の減少量によって検出できることが明らかになった。しかも、ピーク電流値の減少量は細胞から放出されるセロトニンの量と相関関係があり、これを指標にアレルギー反応の度合も推定できることが示唆された⁸⁾。

また、小麦アレルギーのラットより血清を採取して調製した小麦抗体を用いて RBL-1 細胞を感作させ、食物タンパク質に対する応答について調べた。感作させた RBL-1 細胞に小麦のタンパク質を加え、インキュベーションした後、サイクリックボルタンメトリーを行ったところ、セロトニンに由来する 0.35 V のピーク電流値は、アレルゲンとなる小麦を添加直後では 4.0×10^5 細胞当たり $0.02 \mu\text{A}$ であったのに対し、インキュベーションの時間とともに電流値は増大し、アレル

ゲン添加 25 分後に最大 $0.50 \mu\text{A}$ となり、その後徐々に減少した (Fig. 4)。また、アレルゲンを添加せずにインキュベートした時は、ピーク電流値の増大はみられず、 $0.02 \mu\text{A}$ で一定であった。これは、細胞内顆粒がある時間までは細胞内で蓄積され、後に細胞外に放出されるという、アレルギー反応にみられる脱顆粒反応の過程をモニタリングしているものと推測された。

一方、小麦タンパク質濃度に対するピーク電流値を調べたところ、濃度の増加とともにピーク電流値は増大し $0.01 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ の範囲では良好な相関関係が得られ、 $1 \mu\text{g/ml}$ 以上ではピーク電流値は一定になった (Fig. 5)。このシステムによる検出限界は $0.01 \mu\text{g/ml}$ であり、他の大豆や牛乳、卵のタンパク質を加えてもピーク電流値は変化しないことから選択性にも優れていることが示された⁹⁾。このように電極を用いることで、食物に含まれるアレルゲンを 30 分以内で検出可能となり、しかも従来の皮膚テスト等に比べてより高感度な検出に適用可能なが示された。

2. 2 白血球を利用したアレルゲンセンサ

白血球には顆粒球、リンパ球、単球などが含まれ、免疫反応に関与することが知られている。前項で取りあげた RBL-1 細胞はラット由来のものであり、継代培養を行わなければならないといった、実際のヒトに対するアレルゲンの検出の際に不利な点があった。そこで、ヒトの血液より白血球を分離し、識別素子としてセンサへ利用した。

採血後、血液に 2% メチルセルロース溶液を添加し、赤血球を沈降させ、上清に含まれる白血球を遠心により分離し、それぞれの電極反応について調べた。まず、サイクリックボルタンメトリーを行ったところ、赤血球では $0.67 \sim 0.70 \text{ V}$ で $0.87 \mu\text{A} / 10^6 \text{ cells}$ のピーク電流値が得られたが、白血球 (10^6 cells) では $0.30 \sim 0.34 \text{ V}$ と $0.65 \sim 0.67 \text{ V}$ で $0.65 \mu\text{A}$ と $0.25 \mu\text{A}$ のピーク電流値がそれぞれ得られた。また、白血球を超音波処理し、その上清のサイクリックボルタンメトリーを行ったところ、 0.29 V でピーク電流値が得られた。これ

Fig. 4 Relationship between incubation time and peak current of sensitized RBL-1 cells with (●) and without (□) allergen.

Fig. 5 Relationship between wheat protein concentration and peak current of sensitized RBL-1 cells.

はセロトニン溶液のみのピーク電位とほぼ一致していた。これより、白血球においても RBL-1 細胞と同様にセロトニンが電極反応していることが示された。そこで、卵のアレルギー患者から得られた白血球にアレルゲンとして卵白を加えた後、サイクリックボルタンメトリーを行ったところ、0.33 V 付近のピーク電流値が $0.27 \mu\text{A} / 10^6 \text{ cells}$ から $0.19 \mu\text{A} / 10^6 \text{ cells}$ に減少した。これは、白血球中のセロトニンが脱顆粒により放出されたためと推察された。さらに、放出されるセロトニンを蛍光分光光度計で測定したところ、何も加えていないときのセロトニンの放出量が $0.06 \text{ nmol} / 5.0 \times 10^5 \text{ cells}$ であったのに対し、卵白の抽出液を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ 加えたときには $0.34 \text{ nmol} / 5.0 \times 10^5 \text{ cells}$ となった。アレルゲンの濃度を増加させていくと、 $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ で放出量が $0.42 \text{ nmol} / 5.0 \times 10^5 \text{ cells}$ となり、この濃度以上ではセロトニンの放出量は、ほとんど変化しなくなった。また、アレルゲンの濃度を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ として大豆、牛乳で同様な実験を行いセロトニンの放出を測定したところ、大豆では $0.16 \text{ nmol} / 5.0 \times 10^5 \text{ cells}$ 、牛乳では $0.10 \text{ nmol} / 5.0 \times 10^5 \text{ cells}$ 放出されたが、卵白に比べセロトニンはあまり放出されなかった。この結果から、卵のアレルギー患者から得られた白血球は卵白にのみ特異的に反応し、脱顆粒によりセロトニンが放出されたことが明らかになった。また、セロトニンの放出量からアレルゲンを検出することができ、ヒトに対するアレルギー反応を白血球を用いて直接測定できることが示された¹⁰⁾。

3 マイクロ電極を用いたアレルゲンセンサ

動物細胞や白血球を用いた手法は、培養が必要なことや分離操作が煩雑であるといった問題点を有していた。各個人が何に対してアレルギーなのか、すなわち何がその人のアレルゲンとなりうるのかを容易に知ることも重要である。そこで、マイクロ電極と全血を利用したアレルゲンセンサについて、そのシステムを作製し、アレルゲンに関する自己診断への適用の可能性について検討した。電極には市販の微小クシ型電極を用い、微小電極用ポテンショスタットおよびレコーダーからなるシステムを作製した。サンプルとなる血液は、血糖

値測定用キットの中にあるディスボタイプの剥刺を用いて、指先から $20 \mu\text{l}$ を採取した。凝血防止のためヘパリンで処理したマイクロチューブに滴下し、抗 IgE 抗体や市販のスギ花粉、卵やエビのアレルゲン溶液を添加、インキュベートし、電流を測定した。

まず、マイクロ電極を用いて報告されているセロトニンの電極反応についてサイクリックボルタンメトリーを用いて検討した。その結果、これまでと同様に 0.35 V 付近にセロトニン由来のピーク電流が確認された。そこで、全血にセロトニンを加え、 0.35 V の定電位で測定を行った結果、セロトニンの濃度が $50 \sim 800 \text{ ng/ml}$ の範囲では得られた電流値の間に良好な相関関係が示された (Fig. 6)。血液中のセロトニン含量は $120 \pm 10 \text{ ng/ml}$ であることから、マイクロ電極による全血を用いたアレルギー反応に基づくアレルゲンの検出が可能であることが示唆された。次に、全血に抗 IgE 抗体を加えアレルギー反応を誘発させ、脱顆粒反応により放出されるセロトニンの経時変化を調べた。抗 IgE 抗体を全血に添加し、 37°C で $0 \sim 60$ 分間インキュベートした後、電流値を測定したところ、添加後 20 分から値の増加がみられ、40 分後に最大に達し、以降は徐々に減少した。対照として緩衝液を添加して同様の実験を行った場合には、電流値の増加はみられなかった。このことから、抗体添加 20 分以降の電流値の増加はアレルギー反応により、血液中に存在するセロトニンが電極で反応したもので、40 分以降は時間とともに活性が失われたものと考えられた。対照実験との比較で、電流値の差は添加後 40 分に最大となったことから、この時の電流値で実際のアレルゲンの検出に適用することにした。スギ花粉症の患者の全血にスギ花粉、卵及びエビのアレルゲンを添加し、 0.35 V の定電位での電流値の測定を行い比較した。その結果、スギ花粉のアレルゲンを添加した全血から得られた電流値は 27.1 nA であったのに対し、卵、エビのアレルゲンを添加した場合には 17.7 , 18.0 nA であった。スギ花粉のアレルゲンを添加することにより、電流値が約 10 nA 増加していることが示された (Table 1)。スギ花粉の添加による電流値の増加はアレルギー反応によって生じたものと考えることができ、この検出システムの測定における選択性が優れていることが示唆さ

Fig. 6 Calibration curve for serotonin concentration.

れた¹¹⁾。以上のことから、20 μ l という微量な全血とマイクロ電極を用いたアレルギーセンサにより、アレルギーの自己診断への適用可能なシステムが構築できた。

4 おわりに

以上、電気化学的なアレルギーセンサについて、その原理や応用について述べてきた。今後、デバイスの改良や開発により、高感度化、高選択性などの特性を持つセンサが作製され、その応用も広がるものと考えられる。すでに電極以外に、光ファイバーと抗体固定化膜を組み合わせたアレルギーセンサ¹²⁾や磁気微粒子を抗体固定化担体として IgG¹³⁾や微生物¹⁴⁾の検出に適用した例もある。また、抗原抗体反応により形成された複合体の分子量や等電点の差からイオン交換カラムと発光基質¹⁵⁾や蛍光色素¹⁶⁾によるアレルギーの検出も行われている。さらには、膠原病患者の血清中の抗 ds DNA 抗体の検出への適用が報告されている¹⁷⁾。今後の進展により抗原抗体反応のメリットを生かした花粉症、アトピー性皮膚炎などのアレルギー反応の診断や、アレルギーの検出などへの展開が期待される。

文 献

- 1) R. R. A. Coombs and P. G. H. Gell, *Clinical Aspects of Immunology*, 3rd edition, Blackwell Scientific Publishing (1975).

Table 1 Currents of whole blood obtained from a positive person with a cedar allergy when various allergens were added.

Allergen	Current (nA)
Cedar	27.1
Egg	17.7
Prawn	18.0
Control	17.7

Allergen concentration was adjusted to 100 μ g/ml.

Currents were measured after 40 min of incubation with allergen.

- 2) I. M. Roitt, *Essential Immunology*, Blackwell Scientific Publishing (1975).
- 3) 畔柳武雄, 大橋裕一, 松橋 直, 新免疫学業書 7, 免疫とアレルギー, 医学書院 (1981).
- 4) Y. Green-Graif and P. W. Ewan, *Clin. Allergy*, **17**, 431 (1987).
- 5) N. Yamamoto, Y. Nagasawa, S. Shuto, H. Tsubomura, M. Sawai, and H. Okumura, *Clin. Chem.*, **26**, 1569 (1980).
- 6) M. Aizawa, A. Morioka, S. Suzuki, and Y. Nagamura, *Anal. Biochem.*, **94**, 22 (1979).
- 7) T. Matsunaga and Y. Namba, *Anal. Chem.*, **56**, 798 (1984).
- 8) T. Matsunaga, A. Shigematsu, and N. Nakamura, *Anal. Chem.*, **61**, 2471 (1989).
- 9) N. Nakamura, S. Kumazawa, and T. Matsunaga, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 622 (1995).
- 10) N. Nakamura, I. Inoue, Y. Kitajima, T. Matsunaga, T. Chiba, and T. Honda, *Biosensors Bioelectr.*, **6**, 431 (1991).
- 11) T. Matsunaga, H. Yokouchi, M. Okochi, and N. Nakamura, *Abstr. 4th World Congress on Biosensors*, p. 285 (1996).
- 12) N. Nakamura and T. Matsunaga, *Anal. Lett.*, **24**, 1075 (1991).
- 13) T. Matsunaga, M. Kawasaki, X. Yu, N. Tsujimura, and N. Nakamura, *Anal. Chem.*, **68**, 3551 (1996).
- 14) N. Nakamura, J. G. Burgess, K. Yagiuda, S. Kudo, T. Sakaguchi, and T. Matsunaga, *Anal. Chem.*, **65**, 2036 (1993).
- 15) T. -K. Lim, N. Nakamura, and T. Matsunaga, *Denki Kagaku* (presently *Electrochemistry*), **63**, 1154 (1995).
- 16) T. -K. Lim, N. Nakamura, and T. Matsunaga, *Anal. Chim. Acta*, **354**, 29 (1997).
- 17) T. -K. Lim, Y. Komoda, N. Nakamura, and T. Matsunaga, *Anal. Chem.*, (1999), in press.

●著者プロフィール

氏名：中村 徳幸 Noriyuki NAKAMURA
 所属：通商産業省工業技術院 産業技術融合領域研究所 (〒305-8562 つくば市東 1-1-4)
 役職：主任研究官
 趣味：スポーツ(サッカー, スキー), ドライブを兼ねた温泉・名水巡り

□ 図書紹介 □

X 線分析の進歩 30

編集/ 日本分析化学会, X 線分析研究懇談会, 発行/ (株)アグネ技術センター (1999), 定価 5,500 円

I 特別寄稿

1. X 線分析法の進展と X 線分析研究懇談会の発展を顧みて

II 報文

2. Ti 酸化膜の波長分散型蛍光 X 線スペクトル測定
3. 簡易型二結晶分光器による X 線輻射スペクトル
4. Cu の K 系列 X 線輻射スペクトルの微細構造
5. カーボン材料の放射光励起高分解能軟 X 線発光・吸収スペクトル
6. 散乱と重なりを考慮した蛍光 X 線強度の理論計算, 及び定量分析への応用

ほか

III 技術報告

20. 小型放射光源を用いた全反射蛍光 X 線分析

IV ノート

21. 水溶液試料のポリイミドフィルム点滴による微量金属 EDS 分析

V. 既掲載 X 線粉末回折図形索引

VI. 1998 年 X 線分析のあゆみ

VII. X 線分析関連機器資料

ほか