

## 光センシングと自然免疫応答を利用した食品機能性評価法

(浜松ホトニクス (株) 中央研究所) 数村 公子

近年、食生活の欧米化による生活習慣病の増加やストレス社会などを背景として、人々の健康に対する意識が高まり、元来「栄養」を補い、「嗜好」を満たすものであった「食」について、第3の役割としての「生体調節」が重要視されるようになってきた。特に、疾病や老化の主な原因と考えられている酸化ストレスに対する「食」の抗酸化作用に注目が集まり、ESR法、ORAC (oxygen radical absorbance capacity; 活性酸素吸収能力) 法など多くの手法を用いて、活性酸素消去能の評価が盛んになされている。しかし、これらの多くは化学的に産生させた *in vitro* での活性酸素に対する「食」の作用を見ており、生体内での効果を正確に評価するには限界がある。また、*in vivo* の評価法である動物実験は、経費面、倫理面、簡便性などの制約がある。一方、活性酸素は感染防御や情報伝達など生体に有益な面もあり、バランスを保つことが重要である。

筆者らは、これまで自然免疫細胞の生体防御機能を利用し、「食」が持つ活性酸素消去能だけでなく自然免疫反応に及ぼす影響も同時に評価できる、より *in vivo* に近い食品機能性評価法を開発<sup>1-3)</sup>してきた。現在、受託試験を実施している「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」について紹介する。

### 「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」

**自然免疫応答のモニタ** 白血球の一種である好中球は、自然免疫の最大の担い手として細菌などの外敵の侵入に対し、活性酸素のスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) を産生して第一線で対抗する。その際、カルシウムイオン ( $Ca^{2+}$ ) がセカンドメッセンジャーとして重要な役割を果たす(図1)。これらを、“化学発光”と“蛍光”という2つの光情報に変換して同時かつ経時的に検出する技術を開発<sup>4-6)</sup>し、好中球の免疫応答モニタを可能とした。すなわち、好中球を fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine; 走化性因子) などの刺激剤で刺激した際

に起こる細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化および  $O_2^-$  の産生を、 $Ca^{2+}$  濃度測定用蛍光指示薬 (Fluo-3 など) の蛍光ならびに  $O_2^-$  検出用化学発光試薬 (CLA など) の化学発光として同時に検出する(図2)のものであり、この技術を食品機能性評価に応用した。

**蛍光・化学発光同時測定原理** 励起光によるエネルギー供給を必要とする蛍光と、化学反応によって励起エネルギーを得る化学発光は、通常同時に測定することは困難である。筆者らは、励起光として用いるLEDを、高速、断続的に照射することによって、LED点灯時の蛍光と化学発光の重畳信号から、LED消灯時の化学発光信号を減算し、蛍光と化学発光の同時測定を可能とした(図3)。光検出器には光電子増倍管を用い高感度測定

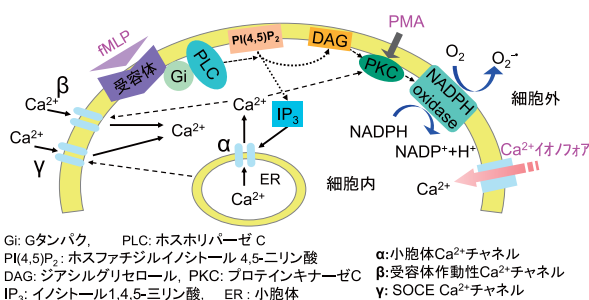


図1. 好中球の活性化経路。参考文献3の掲載図を改変。

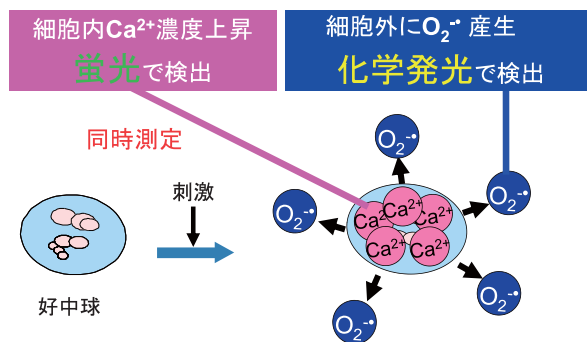


図2.  $O_2^-$  産生・細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇の同時測定概念図。参考文献3の掲載図を改変。



を実現した。

二つの光の量の変化から機能性を評価 評価したい食品や食品成分の存在で起こった蛍光と化学発光の発光量変化から、3つの生理活性を識別する(図4)。

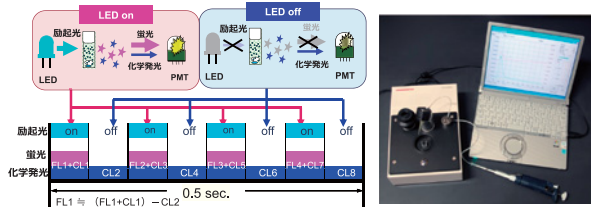


図3. 同時測定原理と装置

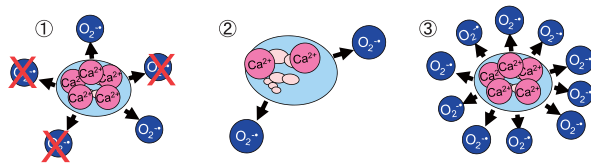


図4. 評価原理

- ①化学発光のみ減少-抗酸化(活性酸素消去)作用
- ②蛍光・化学発光共に減少-抗炎症(過剰な炎症反応抑制)作用
- ③化学発光増加-自然免疫賦活作用

**評価方法と評価事例** 評価に用いる細胞は、末梢血から好中球を単離してもよいが、通常はHL-60細胞(急性前骨髄球性白血病細胞)を、DMSOにて分化誘導して得られた好中球様細胞を使用している。図5に、測定によって得られるプロファイルの一例を示した。横軸が時間、縦軸が発光強度である。37°Cで保温、攪拌しながら刺激剤を添加すると、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を表す蛍光強度が増加し、やや遅れてO<sub>2</sub><sup>-</sup>産生を表す化学発光強度も増加し、それぞれピークを形成する。被験物質を加えた右のサンプル例では、蛍光、化学発光ともにピークがコントロールと比較して小さくなっている。蛍光と化学発光各々のピーク面積値と、そのコントロールピーク面積比を求め、被験物質濃度とコントロールピーク面積比の関係より生理作用を判別する。また、被験物質濃度を数点振ることにより、各々のIC<sub>50</sub>値の算出も可能で

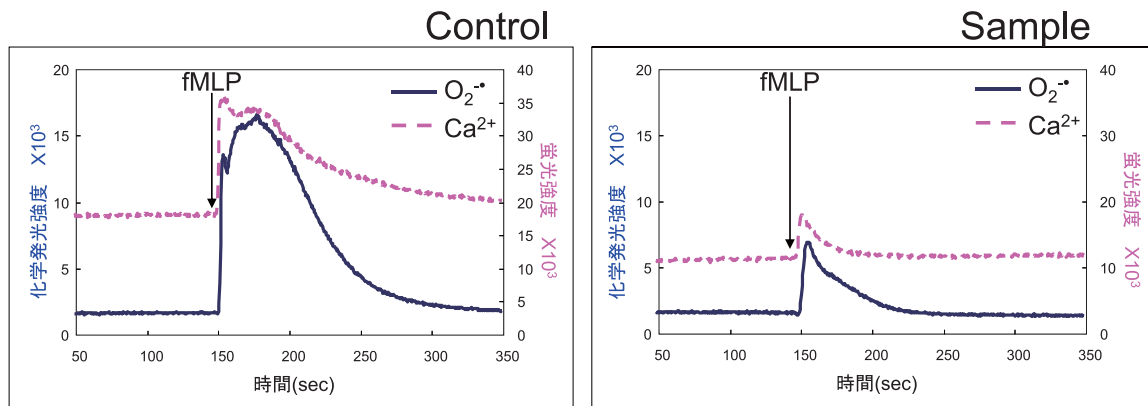


図5. 測定結果. 左: 試験試料無添加, 右: 試験試料共存下. 参考文献1の掲載図を改変.

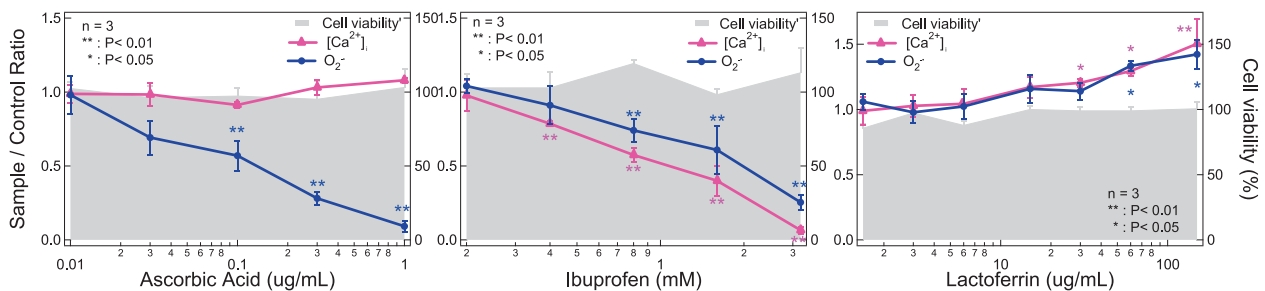


図6. 評価事例. O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生・細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇と評価試料濃度との関係. 参考文献1の掲載図の一部引用.



ある。

評価事例として、アスコルビン酸、イブプロフェン、ラクトフェリンの評価結果を図6に示した。横軸は試料濃度、縦軸はコントロールピーク面積比である。

アスコルビン酸では、濃度依存的に化学発光のみが減少し、蛍光は変化が見られなかった。アスコルビン酸は、好中球の免疫反応における細胞内への $\text{Ca}^{2+}$ の動員とそれに伴う $\text{O}_2^-$ 産生には影響を与えず、産生された $\text{O}_2^-$ を消去していると考えられる。すなわち抗酸化作用である。ただしこの場合、好中球の細胞内信号伝達の $\text{Ca}^{2+}$ に関与しない部分、たとえばプロテインキナーゼCやNADPHオキシダーゼなどに作用して、 $\text{O}_2^-$ 産生を抑制していることも考えられるが、それらは従来法のキサンチン - ヒポキサンチンオキシダーゼ系などを用いた活性酸素消去能評価を行うことで、判別が可能となる。

イブプロフェンの場合は、濃度依存的に $\text{O}_2^-$ 産生を示す化学発光・細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇を示す蛍光ともに減少した。これは、イブプロフェンが細胞内への $\text{Ca}^{2+}$ の取込みを抑えることによって、 $\text{O}_2^-$ の産生を抑制していると考えられる。好中球の過剰な炎症反応を抑える抗炎症作用を有していると判断できる。

ラクトフェリンでは、濃度依存的に、蛍光と化学発光共に上昇した。ラクトフェリンが、好中球の免疫反応において細胞内への $\text{Ca}^{2+}$ の取込みを亢進することによって、 $\text{O}_2^-$ 産生を亢進していると考えられる。好中球の自然免疫反応を賦活する作用を有していると判断できる。

**光による食品機能性評価の問題点の克服** 食品成分にはアントシアニンやウコンなど、色を持つものが多数存在する。発光計測において、試料の持つ着色による光吸収（内部露光効果）は、正確な評価の大きな障害となる。そこで筆者らは、試料の吸収スペクトルと化学発光試薬の発光スペクトルを用いて、内部露光効果によって生じた誤差を補正する方法を考案し、ピーク面積算出過程で補正することにより正確な評価を可能とした。

**終わりに** 本手法は、生体内反応を利用した*in vivo*に近い方法であり、3つの機能が評価でき、複数の機能性物質が存在すると考えられる複合物質では、相乗・相殺された最終的な効果が評価できる。また、好中球における $\text{O}_2^-$ 産生を誘導するシグナルトランスダクションがほぼ判明しているため、 $\text{Ca}^{2+}$ キレート剤や、 $\text{IP}_3$ 受容体阻害剤の添加、または、刺激剤としてPMA (phorbol myristate acetate) や、カルシウムイオノフォアなどを使用した場合の発光量や発光パターンの詳細な評価を行うことで、その作用機序までも推定できる可能性を秘めた方法である。研究を始めて実用化に至るまで多くの年月がかかったが、昨年思いがけず食品の技術開発に優れた業績が認められる研究者に贈られる飯島藤十郎食品技術賞をいただくことができ、大きな励みとなった。

現在、SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）の助成を受けて、新たに「食」を摂取し、消化・吸収を経た後の生体内での真の効果が簡便に評価できる手法の開発に取り組んでいる。少量の血液で、前処理なく酸化ストレス状態を評価できる手法である。本手法は、新しい健康付加価値農産物などの開発だけでなく、個人レベルの体調管理ツールとしても利用できると考えている。個人の体質や体調にあった最適な食、いわゆる「テーラーメイド食品」による予防医療の発展、そして健やかに生活して老いることができる「健康長寿社会」の実現への貢献を目指して、今後も努力していきたい。

## 文 献

- 1) 瀧本陽介, 数村公子: FOOD STYLE21, 16, 8, p. 55 (2012).
- 2) Kazumura, K. *et al.*: *Pharm. Biomed. Anal.*, 84, 90 (2013).
- 3) 原田和樹, 数村公子: 日本調理科学会誌, 46, 6 (2013).
- 4) 数村公子ら: 第63回分析化学討論会「展望とトピックス」, p. 15 (2009).
- 5) Ishibashi, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 344, 571 (2006).
- 6) Satozono, H. *et al.*: *Luminescence*, 21, 69 (2006).