

光センシングによる簡便な ホメオスタシス多視点評価システムの開発

數村 公子

筆者らは、本SIPプロジェクト内で「農産物・食品のホメオスタシス維持機能をもつ農林水産物・食品中の機能性成分多視点評価システムの開発と作用機序の解明」というテーマで、「食」や「運動」などがホメオスタシスに与える影響を極微量の血液で簡便に評価できるシステムの開発に取り組んでいる。具体的には、①酸化ストレスと密接な関連がある好中球活性、②生体内異物を排除する能力である食細胞貪食能、③生体内酸化により生成される酸化LDL量の三つの指標を統合して評価するシステムである。そしてこれらはすべて、自己採血可能な極微量の血液で、煩雑な前処理なく簡便に評価可能なシステムとすることを目標としている。①は浜松ホトニクスとヘルスケアシステムズ、②は自然免疫制御技術研究組合と浜松ホトニクス、③は農研機構・食品研究部門と生物機能利用研究部門が担当し、開発を進めている。各システムの特徴を以下に紹介する。

ホメオスタシス多視点評価システムの特徴

好中球活性 白血球の一種である好中球は、外敵の侵入に対し最初に働く免疫細胞で、活性酸素を出して外的を攻撃する。好中球が直接産生する O_2^- や不均化反応によって生じる過酸化水素(H_2O_2)は強力な活性酸素種ではないが、同時に好中球の顆粒から放出されるミエロペルオキシダーゼ(MPO)がハロゲンとの反応を触媒し、次亜塩素酸($HOCl$)などの強力な活性種が産生される。これらは生体防御に大きく貢献すると同時に、正常な組織を傷つけることで炎症を起こす。炎症は活性酸素を増加させ、酸化ストレスを引き起こす。筆者らは、この酸化ストレスの原因となる好中球の過剰活性化に着目し、好中球の活性化指標となる O_2^- 産生とMPO活性を、 O_2^- 検出用化学発光試薬MCLA (6-(4-Methoxyphenyl)-2-methyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one Hydrochloride)による化学発光と、 OCI^- 検出用蛍光試薬APF (aminophenyl fluorescein)による蛍光の、二つの光情報に変換して検出する技術を確認した。本技術は、生物工学会誌第93巻6号のプロジェクト・バイオで紹介した「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」¹⁻⁴⁾の技術を基にしたものであり、高感度測

定に適した光電子増倍管を光検出器として使用し、蛍光と化学発光を同時に計測する技術^{5,6)}を適用している。指先からランセットを用いて自己採取した極微量の血液中の好中球活性を、細胞分離することなく希釈のみで測定可能とするために、赤血球や血液中の夾雑物による影響を最小限にした光学系を開発し、新しいプレパラート型試作機(特許出願中、図1)を製作した。刺激剤添加により上昇する光信号を経時的に計測可能な装置であり、刺激剤の速やかな混合と血液凝集を防ぎ試料を均一に保つための空気流による攪拌機能や、37°C加温による試料液蒸発を防ぐ加湿機能を付加して、血液測定に最適化した。さらに、 O_2^- 消去剤のSOD (superoxide dismutase)、MPO阻害剤のABAH (4-Aminobenzoic acid hydrazide)を添加したネガティブコントロールを同時に測定できる2連型としたことで、より正確な活性評価が可能となり、前処理無の簡便な評価手法が確立できた。特異的阻害剤添加により、プロテインキナーゼC活性化剤であるホルボールエステル(PMA)刺激によって上昇した蛍光および化学発光が濃度依存的に抑制されたことから、各信号がそれぞれ目的としているMPO活性および O_2^- 産生を反映していることが確認され、またパイロットスタディから個人差や生活リズムとの関連性があることなどが確認できている。

食細胞貪食能 従来、食細胞貪食能の評価は、ラテックスビーズなどの蛍光粒子を取り込んだ細胞を顕微鏡で

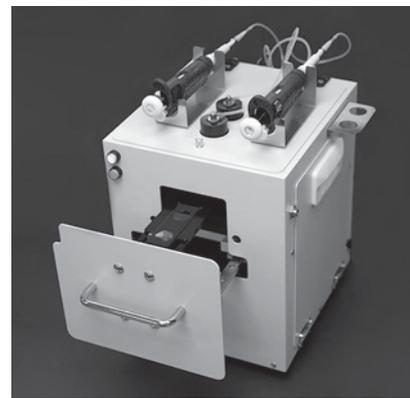


図1. 好中球活性評価用試作機. プレパラート型2連.

カウントする方法や、フローサイトメーターで解析する方法が一般的であったが、これらは細胞を分離して評価する必要があった。筆者らは、煩雑な前処理を不要とし、極微量の血液を希釈した試料にpH感受性蛍光粒子(pHrodo Green *E. coli*)を添加して数時間培養することで、血液中に含まれる食細胞に取込まれた蛍光粒子に由来する蛍光信号の上昇を検出するシステムを開発した。食食反応前後の蛍光信号量の差から、食食能を評価する手法である。刺激剤添加が不要であり短時間(数秒)の計測のため攪拌機能も不要な本評価には、試料の取扱いが容易なチューブ型を採用した(図2)。本試作機についても、食食抑制作用を持つサイトカラシンDを添加したネガティブコントロールを同時に測定できる2連型としたことで、より正確な活性評価が可能となり、前処理無の簡便な評価手法が確立できた(特許出願中)。マクロファージ様細胞にて、本試作機の評価結果とフローサイトメーターで得られた評価結果を比較したところ、高い相関が確認された(図3)⁷⁾。また、パイロットスタディから、食事摂取前後の違いや性差なども確認できている。

酸化LDL 酸化LDLは、動脈硬化の発症・進展の



図2. 食細胞食食能評価用試作機。チューブ型2連。

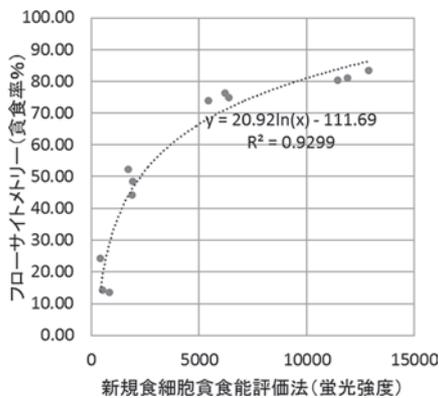


図3. 開発した食細胞食食能評価法と従来法(フローサイトメーター)との比較。参考文献7より引用。

危険因子であり、酸化ストレスマーカーとしてすでに利用されている。しかし、酸化LDLは多様な構造体の総称であり、生理的に意義のある全分子種を検出し評価できる手法はない。そこで本プロジェクトでは、血管内皮細胞に発現し、酸化的修飾を受けた多様な構造のLDLを認識する酸化LDL受容体(LOX-1)の認識能を活用した、新しい酸化LDL検出システムの構築に取り組んでいる。農研機構・食研は、LOX-1の高次構造や認識機構を世界に先駆けて明らかにし(図4)、また酸化LDL認識領域であるCTLD14の認識特性を再構築した組換えLOX-1生産手法の開発にも成功している^{8,9)}。これらの技術を利用して、本評価に関しても、前処理なしの自己採血可能な微量の血液で、生体内で活性を示す酸化LDLを検出し、健康状態を簡便に評価できる手法の開発を目指し、ラテラルフローアッセイ系(図5)へのCTLD14の適用を進めている。CTLD14供給系として、すでに確立している大腸菌発現系に加え、より操作性、長期保存性、pH安定性に優れた遺伝子組換えカイコ生産系を確立した。さらに抗体供給系としては、LDLで免疫したニワトリより得た抗LDLニワトリポリクローナル抗体や、酸化LDLに対する結合を指標に選抜した一本鎖抗体の供給系⁸⁾を確立している。これらの組合せの中から、酸化LDL検出に最適なものを選抜し、血漿対応のプレート型検出系の開発を終え(特許出願中)、さらに、ラテラルフローアッセイ系の開発を進めているところである。



図4. LOX-1による酸化LDLの認識。参考文献8のデータに加筆。

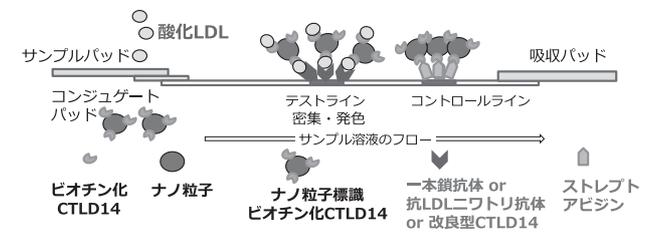


図5. ラテラルフローアッセイの構成。農研機構・町田氏より提供。

今後の展開

今後、開発したシステムを使って、健常なヒトや疾患患者でのデータを多数収集し、既存の *in vitro* 法との相関性・関連性を検討して本システムの有用性を検証していく計画である。また、現場使用の実証検証として複数のモデル食品を用いた介入試験も予定しており、不具合情報を基にしたシステムの改良を進めながら、科学的エビデンスが明確な評価システムの確立を目指していく。

また、本評価システムの汎用性を考慮して、好中球活性と食細胞貪食能の二つの評価を同一のシステムで対応できる融合型の開発に着手し、二つの評価に必要なノウハウを盛り込んだ専用容器（特許出願中）および容器に合わせた融合型計測装置の開発も進めている。両評価とも先行の単独装置と比較して、高感度化が実現し、安定性・再現性が向上している。

今後は、社会実装を見据えてこの融合型システムを基にして、「食」による健康維持が個人レベルで可能なツールとなりえる安価で手軽な汎用機（クラウドデータ管理分析システム装備）と試薬類を含めた専用試験キットの開発を進めていく予定である。

謝 辞

本研究は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」委託研究で実施した。

参考文献

- 1) 数村公子：生物工学, **93**, 356 (2015).
- 2) Kazumura, K. *et al.*: *J. 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) 瀧本陽介, 数村公子：FOOD STYLE21, **16**, 55 (2012).
- 5) Ishibashi, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **344**, 571 (2006).
- 6) Satozono, H. *et al.*: *Luminescence*, **21**, 69 (2006).
- 7) Zhang, R. *et al.*: *Anticancer Res.*, **36**, 3613 (2016).
- 8) Ohki, I. *et al.*: *Structure*, **13**, 905 (2005).
- 9) Matsunaga, S. *et al.*: *Exp. Cell Res.*, **313**, 1203 (2007).
- 10) Kumano-Kuramochi, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 287 (2016).