

# 博士論文

## 食の機能性評価と「未病の見える化」を 実現する好中球活性評価システムの開発と その事業化

2022年9月

光産業創成大学院大学

バイオフィotonicsデザイン分野

數村 公子

# 要旨

## 食の機能性評価と「未病の見える化」を実現する 好中球活性評価システムの開発とその事業化

數村公子

本論文は、筆者が長年取り組んできた好中球活性評価システムの開発と、光産業創成大学院大学入学後に取り組んだこのシステムの事業化の試みについて総括したものである。自然免疫の主役である好中球の免疫反応を利用すると「食の免疫機能性」評価および「未病の見える化」が可能となる。

日本は、世界に先駆けて 2007 年に超高齢社会に突入した。超高齢社会とは、世界保健機構（WHO）によると「65 歳以上が全人口の 21%を超える社会」のことである。現在、「超高齢化」は世界規模の問題となっており、国連においても「急速な高齢化に対する備えを考えるべきときだ。」との警告が発せられている（Madrid Plan of Action and its Implementation(2002)）。国家が「超高齢化」すると、医療費の増大を引き起こし、国民全体の大きな負債となることは明らかである。「超高齢化」社会のトップランナーである日本は、病気の治癒が中心の医療から、疾患発症や重症化を未然に防ぐトータルケアにシフトして、医療費削減や健康寿命の延伸を目指す様々な政策を打ち出している。

これが「未病」という概念が注目されている所以であり、まさに、「超高齢化」医療対策として「未病」評価の必要性がうたわれているのである。しかし、「未病」の定義は未だ曖昧である。例えば、検査所見には異常が認められずに自覚の有無にかかわらず、軽微な徴候があるものから、自覚症状が無く検査に異常があるものまで、様々である。将来の疾患発症や重症化を招くリスクを軽減し、可逆性を求めた対策が必要なことは共通の課題である。しかし、ここで問題として捉えなくてはならないことは、病気でも健康でもない「未病」が、保健医療に関わらないカテゴリーであり、個人の自覚と適切な対策が必要なことである。未病対策としては、各個人の状態に適した食事や運動等の生活習慣の改善への取り組みが重要であることは明白である。

そこで、筆者が「未病」対策の問題として挙げたいことは、その評価指標の整備が殆どなされていないことである。また、機能性食品やサプリメント等の選択やその効果の判断が個々人の主観的な評価に委ねられており、個人の責任で行わなければならない現状である。これらを打破するためには、食品機能性評価法と未病評価法の開発の両方が必要である。保健機能食品表示制度に基づく、敏感で簡便、医学的根拠が明確な手法の開発もその1つであり、個人が、「未病」対策の軽微な効果を数値として実感し、継続を促すことが

できる簡便な指標の開発も重要である。

本研究では、好中球の最速応答性に着目して「未病」を測ることができる可能性のあるシステムを開発し、その事業化を試みた。即ち、*in vitro*、*in vivo* 食品機能性評価システム、及び未病ケアを推進するための鋭敏で簡便な未病評価システムの開発と、開発したこれらのシステムを「未病ケア」「疾病予防」市場に事業化を図るための事業計画立案を目的として取り組んだ。

微弱光検出技術を駆使し、好中球の自然免疫反応時の細胞応答を利用して *in vitro* 機能性食品評価システムとしての「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」を確立した。好中球は白血球の一種であり、外敵の侵入に対して活性酸素を産生して最初に対抗する。本試験は、好中球における活性酸素のスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) 産生と、 $O_2^{\cdot-}$ 産生を惹起する細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 上昇とを、化学発光と蛍光という二種類の光情報で同時並行的かつ継時的にモニターし、被検物質の共存による光信号量の変化から、3つの機能性、即ち抗酸化作用と抗炎症作用と自然免疫賦活作用を判別する方法である。体内で実際に起こっている細胞応答を再現した本手法は、*in vitro*でありながら *in vivo*に近い情報が得られるため、多くの機能性食品研究者に利用され、新たな生理活性物質の探索に貢献している。

本システムは発光・蛍光同時計測システムであるため、活性酸素や Ca 以外の指標も計測することができる。複数のユーザーからの要望を受け、食品を摂取した後の真の効果を評価できる *in vivo* 食品機能性評価システムの開発に取り組んだ。光計測の障害となる赤血球や夾雑物による光吸収の影響を、最小限に抑えることに注力した。その結果、僅か 3  $\mu$ L の全血を希釈するだけの簡便な前処理で、血液中の好中球の次亜塩素酸イオン ( $OCl^-$ ) 産生 (ミエロペルオキシダーゼ活性として) と  $O_2^{\cdot-}$ 産生の同時計測に成功した。これは世界初の成果である。

更に、システムのユーザビリティ向上に取組み、高感度化と安定性、再現性の向上も達成した新たな *in vivo* 食品機能性評価システムを確立することができた。自己採血可能で、複雑な専門技術も不要な本システムは、多くの機能性食材の介入試験に利用されている。

また、健常ボランティアの協力を得て実施した縦断研究では、炎症マーカーである CRP の上昇よりも早い段階で、風邪や胃痛、筋肉疲労等の異変が、平常時の揺らぎ範囲を大きく超えて検出できている。本システムは、体内の異変に最も早く反応する好中球活性を指標としているため、他のマーカーと比較して応答が早く敏感である。治療効果が高い薬とは違い非常に軽微な食や運動等の生活習慣改善効果を早期に敏感に捉え、未病ケア継続のためのモチベーション維持に有効な未病評価システムとしての有効性が示された。

この未病評価システムの「未病ケア」「疾病予防」市場での事業実践を目指して、事業計画の立案に取り組んだ。顧客のセグメンテーションから始めて市場調査をし、SWOT 解析等で事業性を分析、3段階のステップで市場投入していく事業計画を立案した。更に、顧客ヒアリング等の実施によりブラッシュアップを繰り返して実現可能性を高めた。

その事業計画では、第 1 段階として、筆者のこれまでの研究フィールドで多くの人脈がある食品機能性分野の研究者に研究ツールとして投入を図る。密な連携と研究サポートにより、未病評価のエビデンス強化（他の評価系との比較検証による論文化）、機能性表示の取得実績の蓄積、未病解決策の蓄積、新たな価値創造を目指すこととした。そして次の段階では、未病解決策と科学的エビデンスが備わった一般ユーザー向け体調管理ツールとして、現在開発中の廉価版普及システムを市場投入する計画とした。最終的には医療機器として、医療分野に展開を図り、重症化予防で医療費削減に貢献したいと考えている。ヒトの疾患診断を目的とした好中球活性を測る従来法は、血液の分離プロセス、煩雑な専門性が必要であることから、正確性にも欠け、これまであまり普及してこなかった。本システムの好中球活性計測結果の医学的根拠を明確にすることができれば、早期の異常検出（重症化予測）が可能な疾患診断ツールとなることも期待され、現在医療機関の協力を得てデータ蓄積に着手している。

立案した事業計画にて社内ベンチャーを立上げて、事業実践の第 1 歩を踏み出すことができた。今後も事業活動において得られる顧客要望や社会課題等に真摯に向き合い、健康長寿社会実現への貢献を目指してチャレンジを続けていく所存である。

## Abstract

# Development and commercialization of neutrophil activity evaluation systems for food functionality assessment and “visualization of pre-symptomatic diseases ”

Kimiko Kazumura

This dissertation describes the author’s long-term endeavor to develop neutrophil activity evaluation systems and continued attempts to commercialize these systems, the latter of which had been undertaken since the author’s entry into the Graduate School for the Creation of New Photonics Industries. The author has made use of the immune response of neutrophils, which plays a major role in innate immunity, evaluated the immune functionality of foods and visualization of “pre-symptomatic diseases ”in humans.

In 2007, Japan became the world’s first super-aging country. According to the World Health Organization (WHO), “a super-aging society ”refers to a society in which over 21% of the population is aged 65 years or older. “Super-aging ”is now a global problem, and the United Nations has warned that “It is time to prepare for the rapid aging of the population. ” (Madrid Plan of Action and its Implementation (2002)). It is clear that super-aging causes an increase in medical costs, which are substantial financial liabilities incurred by the country’s entire population. Japan, the leading super-aging country, has shifted its healthcare treatment policy from medical care that focuses on curing illnesses to total care that prevents the onset and severity of diseases. In addition, Japanese government has launched various policies aimed at reducing medical costs and extending healthy life expectancy.

These are the reasons why the concept of pre-symptomatic diseases is attracting attention, and the diagnosis of “pre-symptomatic diseases ” can be a medical countermeasure for super-aging. Even under these circumstances, the definition of pre-symptomatic diseases is unclear. Pre-symptomatic diseases range widely from minor signs of illness without abnormal findings on examination to no symptoms with abnormal findings on examination. A fact that has to be specifically considered is that pre-symptomatic diseases are not subject to medical care and thus, self-awareness and lifestyle modifications are required. Lifestyle modifications, such as diet and exercise, are essential in combating pre-symptomatic

diseases.

Thus, the author poses a problem that no evaluation indicators for pre-symptomatic diseases exist. In addition, the selection of functional foods and supplements and judgment of their effectiveness are left to the subjective evaluation of each individual. To these overcome challenges, the development of assessment methods for both food functionality and pre-symptomatic diseases is needed. One example is the development of a sensitive, simple, and medically proven method based on the Foods with Health Claims labeling system. Another example is the development of simple indicators that enable individuals to realize even the minor effects of measures against pre-symptomatic diseases as numerical values and encourage them to continue the measures.

In this study, the author developed systems that can potentially visualize pre-symptomatic diseases by focusing on the fastest response of neutrophils and has also made efforts to commercialize these systems. Specifically, the author developed systems for *in vitro* and *in vivo* food functionality evaluation and systems for sensitive and simple pre-symptomatic diseases evaluation. Amidst these developments, the author formulated a business plan to commercialize these systems in the pre-symptomatic disease care and disease prevention markets.

For the *in vitro* food functionality evaluation system, the author established “a simultaneous evaluation cell assay for antioxidant, anti-inflammatory, and innate immune activation” using weak-light detection technology. Neutrophils, a type of white blood cell, are the first line of defense against invading external pathogens by producing reactive oxygen species. The assay is used to monitor superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) production, a type of reactive oxygen species, and increase in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) that induces  $O_2^{\cdot-}$  production simultaneously and continuously by chemiluminescence and fluorescence. The assay also distinguishes the three functionalities (namely antioxidant, anti-inflammatory, and innate immune activation) based on the changes in these signals produced by the coexistence of the substance being tested. This assay, which reproduces cellular reactions occurring in the body, has been used by many researchers in the field of functional foods and has contributed to the discovery of new bioactive substances because it can mimic *in vivo* conditions.

As this system simultaneously measures luminescence and fluorescence, it can also measure indicators other than  $O_2^{\cdot-}$  and  $[Ca^{2+}]_i$ . In response to requests from several users of these systems, the author developed an *in vivo* food functionality evaluation system to evaluate the net effects of food intake and effectively minimized the influence of light scattering by blood components and light absorption by the red blood cells. As a result, the author succeeded in simultaneously measuring hypochlorite ion ( $OCl^-$ ) production

(myeloperoxidase [MPO] activity) and  $O_2^{\cdot-}$  production by neutrophils in the blood by a simple pretreatment of diluting only 3  $\mu$ L of whole blood. This was the very first achievement of the study.

Furthermore, the author improved the usability of the system and established a new *in vivo* food functionality evaluation system with higher sensitivity, stability, and reproducibility. This system, which allows self-blood collection and does not require complicated specialized techniques, has been used in many functional food ingredient intervention studies.

In a longitudinal study conducted with the help of healthy volunteers, anomalies such as cold, stomach pain, and muscle fatigue were detected well beyond the normal fluctuation range, earlier than the rise in the inflammatory marker C-reactive protein (CRP). As this system uses neutrophil activity, which is the earliest to react to abnormalities in the body, as an indicator, the response is quicker and more sensitive than that of other markers. Such quick and sensitive response characteristics enable the system to detect even the minor effects of lifestyle improvements in diet and exercise. Therefore, the systems can be used to maintain one's motivation to continue caring for oneself with pre-symptomatic diseases.

The author drew a business plan to implement these evaluation systems in the pre-symptomatic diseases care and diseases prevention markets. The author started market research with customer segmentation, analyzed the business feasibility of the systems using strengths, weaknesses, opportunities and threats (SWOT) analysis, and drew a business plan to bring the systems to the markets in three stages. The author repeatedly expanded the business plan and increased its feasibility through customer interviews.

In the first stage, the author planned to bring the systems to researchers in the food functionality research field, where the author has many personal connections, and to encourage them to use these systems as research tools. With the author's close collaboration and research support, the author plans to strengthen the evidence of the system's superior evaluation capability of pre-symptomatic diseases by publishing papers that include comparison and verification with other conventional evaluation systems. The author also plans to accumulate achievements in obtaining functional labeling approvals and solutions to treat pre-symptomatic diseases and create new values. Further plans include launching the widely used low-cost version of the systems, which has scientific evidence and can offer solutions for pre-symptomatic diseases to the market as tools for general users to monitor their health conditions currently under development. Ultimately, the author hopes to expand these systems into the medical field as medical devices and contribute to reducing medical costs by predicting disease severity. Conventional methods of measuring neutrophil activity for human disease diagnosis have not been widely used because of their inaccuracy owing to the complicated blood separation process and requirement of special expertise.

Medical verification of systems for neutrophil activity measurements would find applications in disease diagnosis for early-stage abnormality detection and disease severity prediction. Thus, the author has just begun to accumulate relevant data with the cooperation of medical institutions.

The author took the first step toward implementing the business plan by launching an in-house venture and will continue to take on the challenge of contributing to the realization of a healthy society with a long life expectancy by sincerely addressing customer needs and social issues identified during the course of business activities.



# 目次

第1章 序論 .....	1
1-1 本研究の背景 .....	1
1-2 本研究の目的 .....	2
1-3 未病と未病ケア .....	2
1-4 機能性食品と表示制度 .....	3
1-4-1 食品の機能性.....	3
1-4-2 保健機能表示制度.....	4
1-5 活性酸素と酸化ストレス.....	5
1-6 好中球の自然免疫反応と疾患との関連性.....	6
1-6-1 好中球の自然免疫反応.....	6
1-6-2 ネットーシスと疾患との関連性 .....	8
1-7 蛍光・発光同時計測技術.....	9
1-7-1 蛍光・発光同時計測の原理 .....	9
1-7-2 蛍光・発光同時計測装置 .....	10
1-8 本論文の構成 .....	12

第1章引用文献.....	14
第2章 抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験.....	17
2-1 背景と目的.....	17
2-2 抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験の評価原理.....	17
2-3 抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験の評価方法.....	19
2-4 既知の抗酸化物質と抗炎症性物質、自然免疫賦活物質での検証.....	20
2-4-1 検証方法.....	20
2-4-2 結果.....	22
2-4-3 考察.....	26
2-5 抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験による評価事例.....	28
2-5-1 アントシアン類.....	28
2-5-2 ササクレヒトヨダケ（コブリーノ）とその機能性成分エルゴチオネインの 評価.....	31
2-5-3 茶類の評価.....	34
2-6 本章のまとめ.....	39
第2章引用文献.....	41

第3章	<i>in vivo</i> 法 ~ 極微量血液による好中球活性評価システム ~ .....	46
3-1	好中球活性評価システムの開発 .....	46
3-1-1	背景・目的 .....	46
3-1-2	発光試薬の選択と光学構成 .....	46
3-1-3	試料容器の変更 .....	47
3-1-4	溶液の混合方法 .....	47
3-1-5	チャンバー内の保湿及び保温機能 .....	49
3-1-6	APF、MCLA による $O_2^{\cdot-}$ 、 $OCI^-$ モニタリングの整合性確認 .....	49
3-1-7	極微量全血による $O_2^{\cdot-}$ 産生と $OCI^-$ 産生の同時計測 .....	52
3-1-8	全血計測液における $O_2^{\cdot-}$ 産生と $OCI^-$ 産生計測結果の相関性検討 .....	55
3-1-9	食事と運動が $O_2^{\cdot-}$ 産生と $OCI^-$ 産生に及ぼす影響：ボランティアによる酸化 ストレスのパイロットスタディ .....	57
3-1-10	考察 .....	59
3-2	好中球活性評価システム CFL-P2200 の利用例 .....	62
3-2-1	SAMP8 マウスに対する機能性成分（糖脂質 LPS）の経口投与の効果検証試 験 .....	62

3-2-2 apoE 欠損マウスに対する機能性成分（糖脂質 LPS）の経口投与の効果検証 試験.....	66
3-3 本章のまとめ.....	68
第3章引用文献.....	69
第4章 システム改良とヒト臨床研究によるシステムの検証.....	74
4-1 システム改良とヒト縦断研究.....	74
4-1-1 背景と目的.....	74
4-1-2 方法.....	75
4-1-3 結果.....	80
4-1-4 考察.....	89
4-2 ヒト横断研究.....	94
4-2-1 方法.....	94
4-2-2 基準範囲算出.....	95
4-2-3 生化学マーカー、生活習慣等との関連性.....	96
4-2-4 基準範囲を基にした個人データの検討.....	100
4-3 本章のまとめ.....	101

第4章引用文献.....	102
第5章 社内ベンチャーによる事業実践に向けて.....	105
5-1 背景及び目的.....	105
5-2 顧客と市場規模の検討.....	106
5-2-1 開発システムの特長と2段階ビジネス.....	106
5-2-2 1stStep 未病解決策研究用ツール.....	108
5-2-3 2ndStep 体調管理ツール.....	109
5-3 SWOTによる分析.....	111
5-4 所属企業における本事業の位置づけ.....	113
5-5 ビジネスプランの立案.....	115
5-5-1 事業コンセプト.....	115
5-5-2 ビジネスロードマップ.....	115
5-5-3 ビジネスモデル.....	117
5-6 ビジネスプランのブラッシュアップ.....	119
5-7 まとめ.....	124
第5章引用文献.....	125

第6章 本論文の総括と今後の展開 .....	127
6-1 総括 .....	127
6-2 結論 .....	128
6-3 今後の展開 .....	128
謝辞 .....	130
業績目録 .....	131



# 第1章 序論

本章では、本研究の背景と目的を最初に記載し、本研究に必要となる基本的な情報について概説する。

## 1-1 本研究の背景

日本は、世界に先駆けて2007年に超高齢社会に突入した。高齢化と共に医療費も増大の一途を辿り、2030年には高齢者割合は31.2%、医療費は63兆円を超えると予想されている(図1-1)。これに対し、生産年齢人口(15~64歳)は50%程度であり、1.7人で高齢者を支えなければならない。高齢化に伴う医療費の増大は、国民全体の大きな負債になる。更に、この問題は日本だけでなく、2020年集計時点でイタリア、ポルトガル、フィンランド、ギリシャ、ドイツなど8か国が高齢化率21%を上回っており[1]、世界規模の問題となっている。

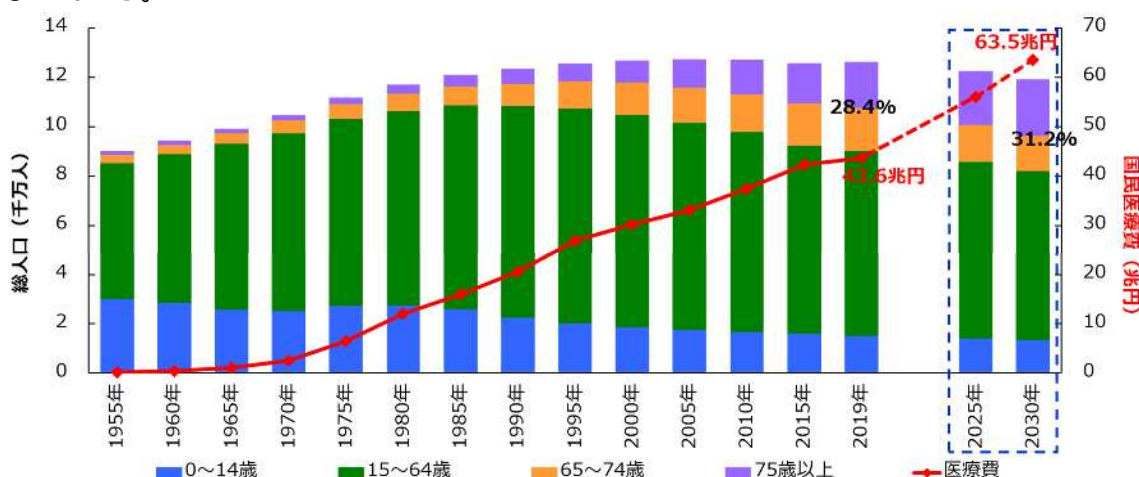


図1-1 日本の高齢化及び医療費の推移と将来推計

人口：～2015年総務省「国勢調査」、2019年「人口推計」、2020年～国立社会保障・人口問題研究所「日本の将来推計人口(平成29年推計)」

医療費：～2015年総務省「国民医療費」、2019年厚労省「令和元年度 医療費の動向」、2025年～厚労省「2040年を見据えた社会保障の将来見通し」より作成

トップランナーである日本では、見本となるべく多くの政策が打ち出されている。目指すべき「健康長寿社会」実現に向けて、これまでの「治療」を中心とした医療から、疾患発症を未然に防ぐ「未病ケア」や「疾病予防」へのシフトを推進している。食品の保健機能表示制度の整備もその一つである。未病の治療薬となる機能性食品の開発が盛んとなり、食が持つ機能性とその作用機序を科学的根拠に基づいて評価できる手法の開発が求められるようになった。また、サプリメント先進国である米国の規制制度を参考にした新たな機能性表示制度も施行された。予防医療へのシフトとの相乗効果で、医療機関での治療サポートや未病ケアに有効なEBS(Evidence Based Supplement)の需要が高まった。これら



により、製品に対するヒト試験によるエビデンスデータの蓄積が必須なものと捉えられるようになってきた。現状、機能性成分等のヒトでの軽微な効果を実証するためには、遺伝子発現や腸内細菌叢解析など煩雑で専門的な技術を必要とする評価系が多く用いられている。「未病ケア」のモチベーション維持のためにも、食や運動等の軽微な効果が「見える化」できる敏感で簡便、医学的根拠が明確な評価手法の開発が急務である。

一方筆者は、14年間のバイオ系専門学校の教員を経て、「光を使いこなす技術を開発して社会に役立てる」ことを理念として掲げる企業に研究者として入社した。異業種からの転職で困惑することも多かったが、所属企業の強みである微弱光検出技術により健康長寿社会実現へ貢献することを目標として、日々研究に励んだ。蛍光・発光同時計測技術のアプリ開発を担当した筆者は、白血球の一種、好中球の最速応答性と疾患との関連性に着目して、蛍光・発光同時計測技術により好中球の自然免疫反応をモニターする技術を確立した。そして、この技術を「食」の機能性評価や未病評価に適用させることを目指して本研究に取り組んだ。

## 1-2 本研究の目的

本研究の目的は、健康長寿社会実現と医療費削減に貢献するために、所属企業の強みである微弱光検出技術を最大限活かし、細胞機能を利用した「食」の機能性評価から未病評価までの一連の好中球活性評価システムを開発すること、そしてこれらのシステムを「未病ケア」「疾病予防」市場に広く普及させるための実現性高い事業計画を立案し、事業化に挑戦することである。

## 1-3 未病と未病ケア

「未病」は、2000年以上前の後漢時代の中国の医学書「黄帝内経」に、「完全な病気ではないが健康でもない、病気への入口的な状態で、その状態を治すことで健康を保つ、病気にさせないということが、喉が乾いてから井戸を掘るよりも重要である」として、最初に現れている [2]。日本では、江戸時代の儒学者、貝原益軒によって書かれた健康についての指南書「養生訓」で登場している。日本未病学会では、「自覚症状はないが検査では異常がある状態」(西洋型未病)と「自覚症状はあるが検査では異常がない状態」(東洋型未病)そして、「自覚症状もあるが検査でも異常がある状態」を「病気」と定義している [3]。つまり、自覚症状がない初期の段階で物理的検査による病気の臨床診断法によって診断を受けて医療介入の対象となっても、自立的に支障なく日常生活を送り、有意義な人生を楽しむことができる時間としての健康寿命という観点から、未病として扱うことが妥当であるとしている [2]。検査では特段異常はないが、身体的、精神的不調や異常を感じる状態を未病、検査では異常値を示すが、日常生活に支障を及ぼす症状がない状態を

未病 として新たに定義がなされている [2] ( 図 1-2 )。



図 1-2 未病概念と未病ケア [2]

未病ケアは、未病の状態からケアを始めて、大きな病気につながらないように日々心掛けることであり、食や運動等の生活習慣の改善が重要となる。未病 では、健常人が健康を維持するために行う健康実践が該当する [2]。未病 では、検査数値をマーカーにした未病管理となるため、セルフメディケーションに加えて医者当医療スタッフと連携したとりくみが必要となる [2]。いずれにしても、図 1-3 に示すような継続した取組みが必要であり、行動変容の効果がタイムリーに「目に見える」計測システム及びマーカーの存在が重要と考えられる。

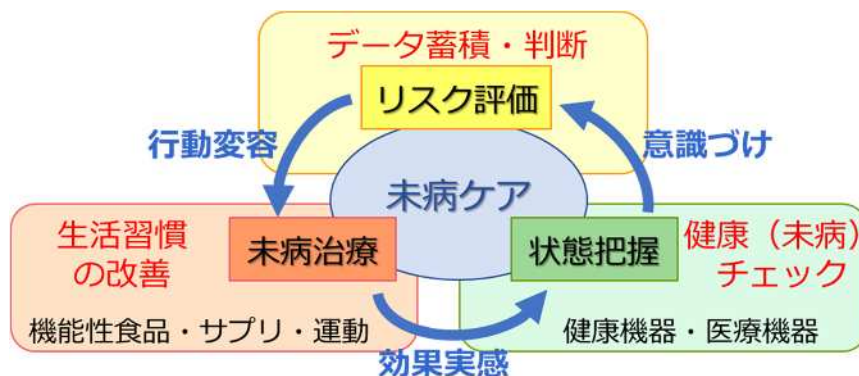


図 1-3 未病ケアの仕組み

## 1-4 機能性食品と表示制度

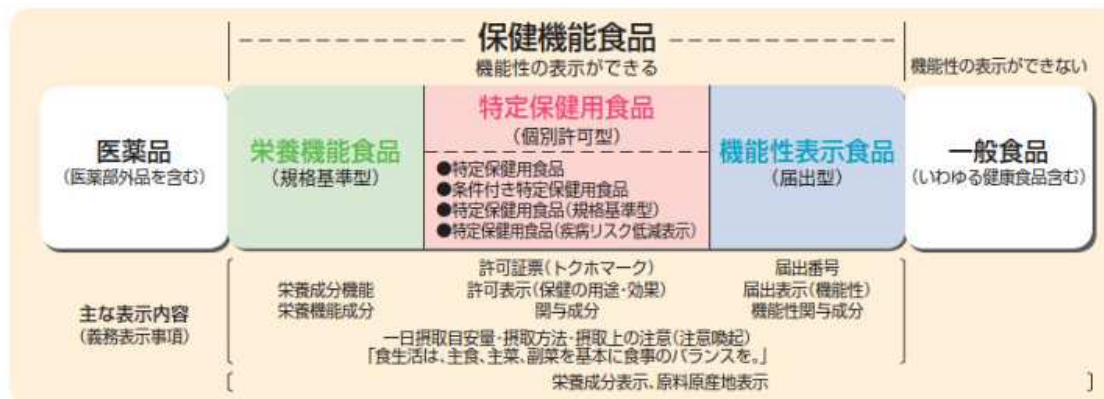
### 1-4-1 食品の機能性

20 世紀初頭の日本では、「食薬区分」の政策に基づいて「食」は生命現象を営むために必要不可欠なエネルギー源や生体構成成分の補給に必要な栄養分、一次機能の「栄養」に関する研究が盛んにおこなわれた。第二次世界大戦による深刻な食糧不足もあり「栄養学」として益々発展してきた。1960 年代の高度経済成長時代を迎え、食事を楽しむ余裕が生ま

れて、食は栄養だけでなく美味しさや香りと言った感覚機能が重要視されるようになってきた。食の二次機能「嗜好」に着目した研究が中心となった。食の欧米化が益々進み、いわゆる「飽食の時代」に突入する。その結果、生活習慣病が増加し、高齢化の進展も相まって、食による疾病予防への期待が高まるようになってきた。それを受けて日本では、1984年に世界に先駆けて食品の機能性に関する産官学連携のプロジェクトがスタートし、食品の一次機能の栄養、二次機能の嗜好に次ぐ第三の機能、「生理的生体調節機能」という新しい概念が誕生、「機能性食品」として世界に提案された [4]。この概念は、「食品から機能性成分を取り出して他の食品や飲料に添加するのではなく、あくまで食品の形態を保ちつつ有効成分が濃縮されて機能を果たすように創製しよう」というものである。これが世界的なレベルで広がり、特に、欧米では Nutraceuticals とか Medical Foods , Designer Foods などの概念が提案されたが、現在、「ファンクショナルフーズ：Functional Foods」として定着している」 [5]とのことである。

#### 1-4-2 保健機能表示制度

「食品機能性」の対象は、神経系、循環系、内分泌、外分泌系、細胞分化調節、生体防御、免疫、消化系調節機能というように広い範囲に及んでいる [4, 6]。しかし、日本では当初「機能性食品」の概念は取り入れられず、限定された「健康への効能表示」のみが許可された「特定保健用食品（トクホ）制度」が 1991年にスタートした。その後、2001年に制定されたビタミンやミネラル等 20種類の成分に関して一定の規格基準を定めて栄養機能表示をする「栄養機能食品」とをまとめた総称として「保健機能食品」となった（図 1-4） [7]。トクホ制度は、日本が世界に先駆けて制度化されたものであったが、この間にアメリカでは「栄養表示教育法」が成立（1994年完全実施）し、栄養成分強調表示に加えて健康強調表示が可能となっただけでなく、疾病のリスク要因を低減させる食品成分の表示も可能となり、ビタミン、ハーブ、ミネラルやアミノ酸等「栄養補助食品」に規定される食品素材は、米国食品医薬品局の承認を得ずに販売が可能となった [5]。その動きを受けて日本でも、2013年6月より「規制改革実施計画及び日本再興戦略」において新規機能性表示制度についての検討がスタートし、国ではなく事業者の責任で「特定の保健機能表示ができる機能性表示食品」が、2015年7月の食品表示法施行と共に導入されて現在に至っている（図 1-4） [7]。



### 特定保健用食品の類型

特定保健用食品	身体の生理機能などに影響を与える特定の成分を含んだ食品の、有効性、安全性、品質などの科学的根拠を示して、国の厳しい審査・評価のもとに国より表示が許可される。
条件付き 特定保健用食品	有効性の科学的根拠が特定保健用食品のレベルに届かないものの、一定の有効性が確認された食品を、限定的な科学的根拠であるという表示条件付きで許可される。
特定保健用食品 (規格基準型)	特定保健用食品として許可実績が十分あるなど、科学的根拠が蓄積されている食品について規格基準により許可される。
特定保健用食品 (疾病リスク低減表示)	関与成分の疾病リスク低減効果が医学・栄養学的に確立されている場合に、許可表示の一つとして疾病リスク低減の特定保健用食品として表示が許可される。

図 1-4 保健機能食品の位置づけ [8]

トクホの有効性審査基準は、関与成分の作用機序が明確、無作為化比較試験で取得した結果について、危険率 5%以下に設定した統計処理で効果が示されること、査読付き論文に掲載されることが条件（条件付きトクホ等一部除外有）となっており、許可を受けるまでに莫大な費用と長い時間が必要であった。これに対し、機能性表示食品の科学的根拠は、最終製品或いは機能性関与成分に関する研究レビュー（システマティックレビュー）で示すことができる。また、これまでにガイドラインが複数回改訂され、例外的に軽症者データが利用できていた 7 領域（コレステロール、中長期的血中中性脂肪、食後血中中性脂肪、血圧関係、食後血糖、体脂肪及び整腸）に、2 領域（鼻目のアレルギー反応、中長期的血清尿酸値）が追加された。有効性検証のハードルが更に下がり、機能性表示食品は 2022 年 5 月 6 日現在でトクホの 1075 件を大きく上回る 5409 件が登録されている [9]。

### 1-5 活性酸素と酸化ストレス

疾患の発症や老化の進行に大きく関与している活性酸素種（ROS：reactive oxygen species）とは、反応性の高い酸素種の総称である。好気性生物であるヒトは、大気中に 20%程度存在する酸素を取り込んで代謝することで生命活動を営むためのエネルギーを得ている。取り込まれた酸素の 95 %がエネルギーとして利用されて 4 電子還元を受けて最

最終的に水となるが、5 %程度はその還元のプロセスで部分的に還元された ROS (スーパーオキシド： $O_2^{\cdot-}$ 、過酸化水素： $H_2O_2$ 、一重項酸素： $^1O_2$ 、ヒドロキシルラジカル： $HO^{\cdot}$ ) となる (図 1-5)。

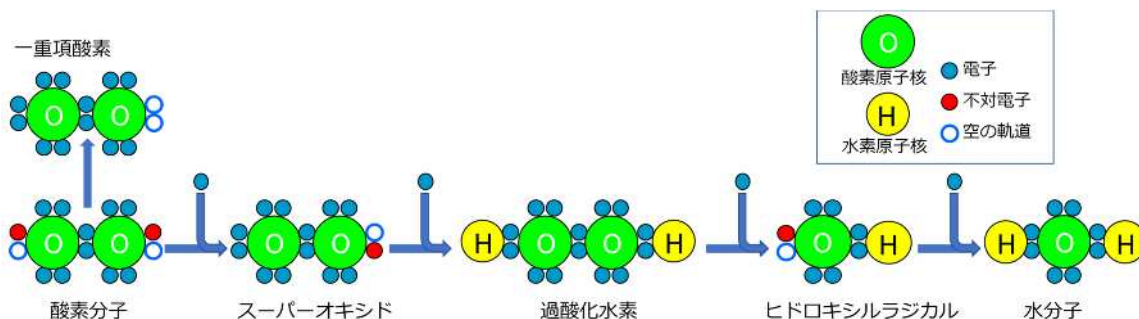


図 1-5 生体内のレドックス (酸化還元) 反応と活性酸素種

広義においては、 $HO^{\cdot}$ の脂質攻撃で始まる連鎖的脂質過酸化反応によって生じる脂質ラジカル： $L^{\cdot}$ やペルオキシラジカル： $LOO^{\cdot}$ 、アルコキシルラジカル  $LO^{\cdot}$ 、好中球のミエロペルオキシダーゼ (MPO) により生成される次亜塩素酸： $HOCl$ 、二酸化窒素： $NO_2^{\cdot}$ 、また NO 合成酵素により生成される一酸化窒素： $NO^{\cdot}$ 、 $NO^{\cdot}$ と  $O_2^{\cdot-}$ により生成する  $ONOO^{\cdot}$  等も ROS である。

通常生体は、これらの体内で産生される ROS を除去する防御機構、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) をはじめとする多くの活性酸素消去酵素や低分子抗酸化物を備えており、生体の恒常性を保っている。しかし、過度の運動、精神的・肉体的ストレス、感染、炎症や喫煙、紫外線、放射線、大気汚染等により、防御機構による除去能力を上回る ROS が産生されるとこのバランスが破綻する。この状態が「酸化ストレス」であり、多くの疾患との関連性が指摘されている。まさに「未病」状態である。

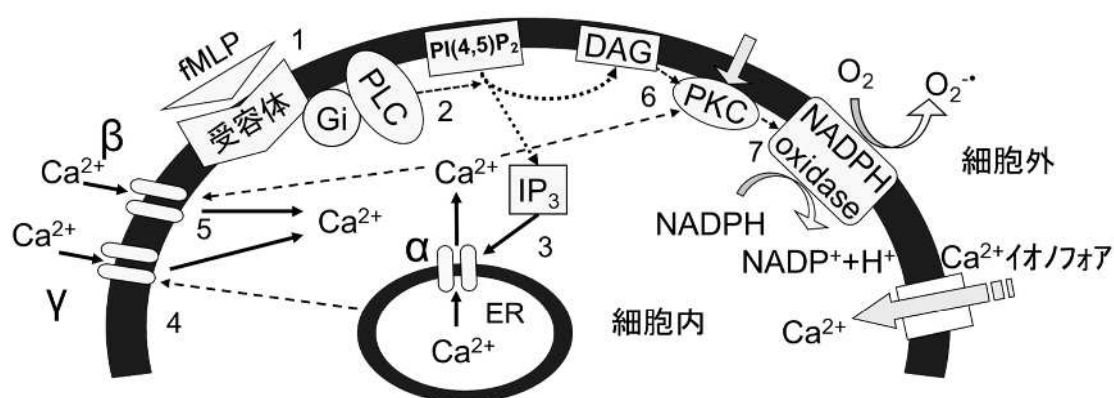
酸化ストレスの概念は、1985 年に Helmut Sies が「酸化的傷害につながる可能性のある酸化物質の産生と、細胞の抗酸化能との間の不均衡を表す用語」として定義 [10]し、その後 2015 年に「酸化物質と抗酸化物質の間の不均衡によるレドックスシグナル/コントロールの乱れ、分子へのダメージ」として更新 [11]されている。

## 1-6 好中球の自然免疫反応と疾患との関連性

### 1-6-1 好中球の自然免疫反応

生体内で ROS を生じる内因性の大きな要因の一つとして、生体にとって重要な免疫反応の担い手である活性化白血球が知られている。特に、好中球は主要な ROS 産生源であり、自然免疫系で産生された ROS により細菌やウイルス等の感染性微生物を排除している。好中球における自然免疫のシグナル伝達経路 (呼吸バースト) の概略モデルを図 1-6 に示す。

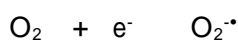
なお、本スキームの説明部分は、筆者の研究 [12]より転載している。



Gi: Gタンパク, PLC: ホスホリパーゼC  
 PI(4,5)P<sub>2</sub>: ホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸  
 DAG: ジアシルグリセロール, PKC: プロテインキナーゼC  
 IP<sub>3</sub>: イノシトール1,4,5-三リン酸, ER: 小胞体  
 α: 小胞体Ca<sup>2+</sup>チャネル  
 β: Ca<sup>2+</sup>透過性陽イオンチャネル  
 γ: SOCE Ca<sup>2+</sup>チャネル

図 1-6 好中球のシグナル伝達経路の模式図

- 1) 好中球の表面受容体に刺激剤 ( fMLP : N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine 菌体成分に含まれる細胞走化性ペプチド) が結合すると、GTP 結合タンパク質を介してホスホリパーゼ C を活性化するシグナルが伝達される。
- 2) 活性化したホスホリパーゼ C は、膜リン脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸を加水分解し、イノシトール 1,4,5-トリリン酸 ( IP<sub>3</sub> ) とジアシルグリセロール ( DAG ) が生成される。
- 3) IP<sub>3</sub> が細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアである小胞体上の Ca<sup>2+</sup>チャネルである受容体に結合すると、小胞体から Ca<sup>2+</sup>が放出され、その結果 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ( 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度 ) が増加する。
- 4) 小胞体に蓄積された Ca<sup>2+</sup>が枯渇すると、細胞膜の SOCECa<sup>2+</sup>チャネルを通じて細胞外の Ca<sup>2+</sup>が流入し ( SOCE: store-operated Ca<sup>2+</sup> entry ) , [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が増加し続ける。
- 5) 細胞外 Ca<sup>2+</sup>の流入は SOCE によって起こるだけでなく、Ca<sup>2+</sup>透過性陽イオンチャネルを含む非 SOCES によっても引き起こされる。
- 6) Ca<sup>2+</sup>と DAG は、其々プロテインキナーゼ C ( PKC ) の特定ドメインに結合し、PKC を細胞膜にリクルートする。
- 7) 活性化された PKC は、p47phox や p67phox といった NADPH オキシダーゼの細胞質成分をリン酸化し、膜に移行させる。これらの膜成分によって、活性型 NADPH オキシダーゼの最終的な会合が成立し、その結果、活性型 NADPH オキシダーゼは以下の反応を促進し細胞外に O<sub>2</sub><sup>•-</sup>を産生する。



上述したように、好中球の  $O_2^{\cdot-}$  産生において、 $Ca^{2+}$  はセカンドメッセンジャーとして重要な役割を果たしている。

更に  $O_2^{\cdot-}$  は、不対電子を持つフリーラジカルであり、非常に不安定（半減期は  $10^{-6}$  秒）で、体内に備わっている特異的分解酵素 SOD により速やかに不均化（単一分子 2 つを 2 種類の別の分子にすること）され、過酸化水素へと変換される。



好中球は、呼吸バースト時に  $O_2^{\cdot-}$  を産生すると共に、顆粒から MPO も放出する。MPO が過酸化水素に作用し、塩化物イオンなどを 2 電子還元することで、より強力な活性酸素種 HOCl などを生成する（図 1-7）。



HOCl は、高い殺菌能を有する反面、生体成分とも非常に高い反応性を示すため、好中球の過剰活性化により酸化ストレス状態となり、組織障害や炎症が進むことが知られている。

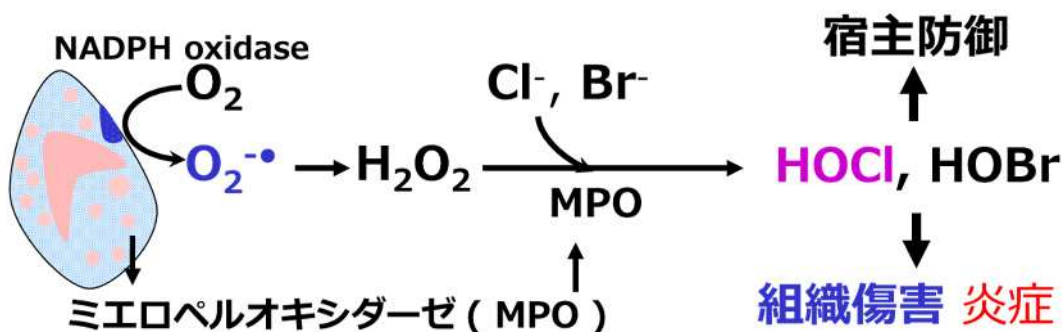


図 1-7 好中球の活性化と組織障害

### 1-6-2 ネットーシスと疾患との関連性

また、2004 年に Brinkmann らによって新たな好中球の生体防御反応、好中球細胞外トラップ（NETs：neutrophil extracellular traps）が報告された [13]。活性化した好中球は、ネクローシスやアポトーシスとは違う独特な細胞死（NETosis）をおこし、自らの凝縮したクロマチンや DNA、顆粒由来のエラスターゼや MPO を含む繊維状の構造体を放出して病原体を捕捉・攻撃すると共に、組織障害も促進する（図 1-8）。



図 1-8 NETs の仕組み 一部引用 [14]

NETs が自己免疫疾患 [15, 16, 17]、炎症性疾患 [18, 19, 20]、血栓性疾患 [21, 22] など様々な疾患と関連していることを示唆する報告が多くなされている。また最近、NETs が COVID - 19 の重症化に関与していることも報告された [23]。

NETs のみならず、好中球の過剰活性化により引き起こされた酸化ストレスが、様々な疾患の病因となっていることが、実に多くの論文で報告されている。図 1-9 に 2 報の総説 [24, 25] をまとめた図を示す。左の総説は、MPO の過剰活性化と心臓血管疾患、がん等の疾患との関連性を遺伝子発現や MPO 欠損マウス等を用いた様々な方法で示した約 400 報の論文をまとめたものである (図 1-9)。右の総説では、好中球に由来する酸化ストレスが、多くの自己免疫疾患の病因となっていることを、約 200 報の論文から示している (図 1-9)。

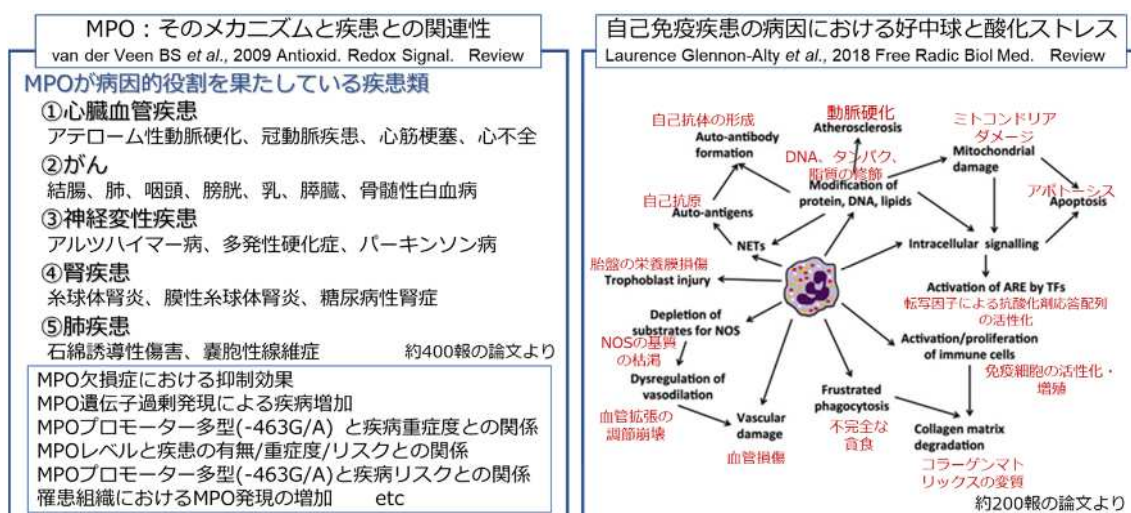


図 1-9 好中球活性と疾患との関連性

好中球の過剰活性化の状況を早期に捉えることが、疾患の発症や重症化の予防につながる可能性が示唆されている。

## 1-7 蛍光・発光同時計測技術

### 1-7-1 蛍光・発光同時計測の原理

蛍光・発光同時計測技術は、筆者が所属する浜松ホトニクス(株)の中央研究所にて開発された独自技術である (特許第 3889334 号)。「蛍光 (FL)」は、励起光によるエネルギー供給を必要とするため、励起光点灯時のみ光を発する。「化学発光 (CL)」は、化学反応によって励起エネルギーを得るため、励起光に関係なく常時光を発する。この 2 種類の光信号の特徴を活かして、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て蛍光信号を得る方法 (図 1-10) により、一つの光検出器で経時的に蛍光・発光同時計測を可能とした技術 [12, 26] である。0.5 秒間に 4 回、LED の ON/OFF を繰り返し、FL+CL から



CL を減算して FL を確定し、其々4 回分を積算した値が 1 ポイントとして計測ソフト上に記録される。点灯時間と消灯時間が同じであることはもちろん、LED 消灯後、燐光などの減衰が収まる時間（数 ms）を待って、CL の計測を開始することが CL を正確に取るための重要なポイントである。

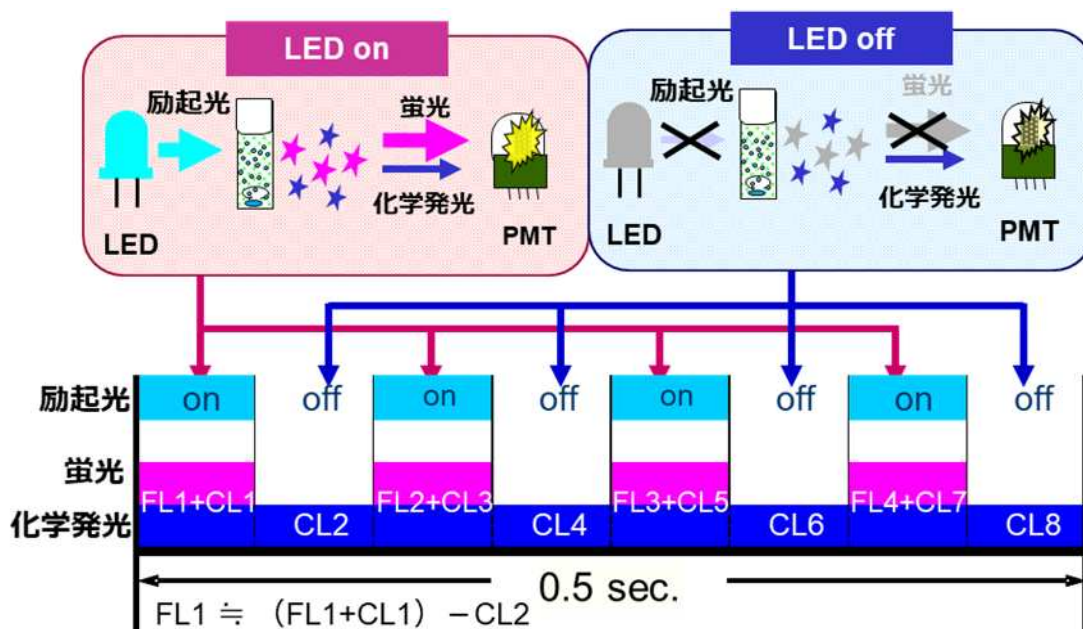


図 1-10 蛍光・発光同時計測の原理 [27]

### 1-7-2 蛍光・発光同時計測装置

試料の特徴に合わせて、浮遊系細胞に適した 1 cm 角のディスプレイキュベットに対応したキュベットタイプ CFL-C2000、接着系細胞や微量測定に適した高撥水性印刷 2 穴スライドガラスに対応したプレパラートタイプ CFL-P2200（2 試料同時型）血液試料に適した専用薄型角セルタイプ CFL-H2200（2 試料同時型）を開発した（図 1-11）。



図 1-11 蛍光・発光同時計測装置と試料容器 [28]

蛍光・発光同時計測装置 CFL-C2000 (励起波長：500 nm、発光検出波長 350 ~480 nm、520 ~620 nm) を例として装置の構成について説明する。図 1-12 は、試料容器として 1 cm 角のディスプレイブルキューベットに対応した蛍光・発光同時計測装置 CFL-C2000 を上から見た模式図である。図 1-13 は、励起波長：500 nm、発光検出波長 350 ~480 nm、520 ~620 nm の場合の検出ユニットのイラストを示した。検出器は、光電子増倍管と高速フォトンカウンティング回路、高圧電源を内蔵した小型フォトンカウンティングヘッド H10682-210 (高感度なウルトラバイアルカリ光電面：浜松ホトニクス製) を使用しており高感度測定が実現している。励起光は、バンドパスフィルター (500 nm  $\pm$  10 nm) を介して発光ダイオード (LED) 500 nm から供給される。バンドパスフィルターと LED の間に、アパーチャを設置して、LED からの斜め光のバンドパスフィルターへの入光を制限している。単色になった励起光をレンズで集光して、キューベットの淵に当たることによる散乱防止と、試料への照射範囲との兼ね合いで、適度なサイズ (6 mm) になるよう調整している。検出側は、試料から検出器まで十分な距離を取り、試料からの発光を効率よく集め、かつ励起光を確実に除去できるレンズとバンドリジェクションフィルターの配置を最適化している。通常、これらの配置には鏡筒が使われるが、レンズやフィルターが持つ自家蛍光や壁の乱反射による迷光が検出器に入って、S/N 比の低下につながることもある。また、誘電体多層膜フィルターの特徴として、入射する光の入射角が大きくなると、所定の波長範囲外の光が誘電体多層膜を通過してしまうおそれがある。そこで本装置では、光を吸収する部材を選別してこれらの迷光をトラップできるような空間を設けて、斜め光がバンドリジェクションフィルターに入り込むのを最小限に抑えた構造とした。高い S/N 比を維持した高感度な装置を実現している。また、生体試料や細胞の利用を想定して、試料ホルダにブロックヒーターを組込み、所定温度に制御できるようになっている。また、細胞等試料の沈降を防ぐため、攪拌子で常時攪拌できる機能を備えている。外部接続のマイクロピペットであらかじめ所用量の試薬をセットしておくことで、刺激剤等の計測中の自動注入も可能である。オーバーナイト等長時間にわたる経時的連続計測にも対応している。

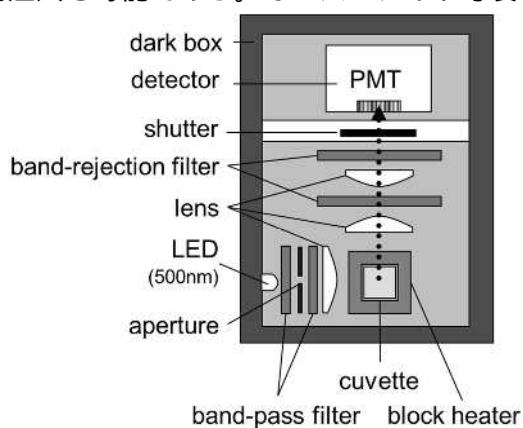


図 1-12 装置構成模式図 [12]

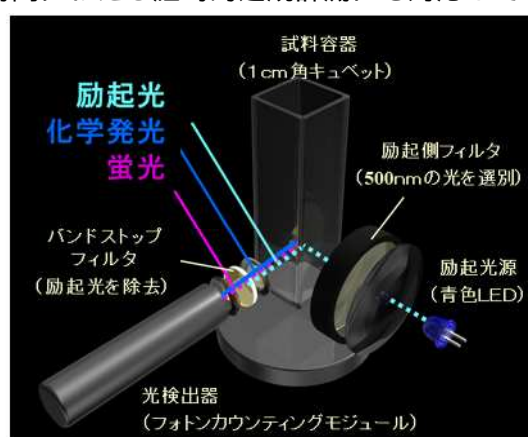


図 1-13 検出ユニットのイラスト

画像作製：里園浩氏 (浜松ホトニクス)

同一試料で発生した蛍光及び化学発光其々を同時に実時間で経時的に検出可能な本技術により、細胞等試料内で起こる 2 つのイベントの関連性の解明につながることを期待される。

## 1-8 本論文の構成

本論文は、先述した目的を達成するための取組みについて記載し、全 6 章で構成される。

第 1 章は、序論として研究の背景と目的、そして本研究に必要となる基本的な情報、未病尾の定義、機能性食品と表示制度、活性酸素と酸化ストレス、好中球の自然免疫反応と疾患との関連性、蛍光・発光同時計測技術について概説している。

第 2 章では、好中球細胞の自然免疫機能を再現した技術を利用した *in vitro* 食品機能性評価法「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」の開発と、社内外での利用例について述べる。

第 3 章では、第 2 章の *in vitro* 食品機能性評価法の複数のユーザーから得たニーズに基づき開発した *in vivo* 機能性評価システムの開発とその利用例についての概説と、社会情勢から得た新たな利用価値、未病評価システムへの展開の可能性について述べる。

第 4 章では、第 3 章で開発した *in vivo* 機能性評価システムの問題点に基づき、それを解決して利便性を高めたことにより完成した未病評価システムの開発と、ヒト試験によるシステムの検証について述べる。

第 5 章では、第 2-4 章で述べた細胞機能を利用した「食」の作用機序解明ツールから未病評価までの一連の好中球活性システムの、事業化プロセスの検討や事業計画立案について述べる。ユーザーインタビュー等によるブラッシュアップを経て改良した事業計画にて、事業化の第 1 歩を踏み出したところまでを記載している。

第 6 章は、本論文のまとめとなる。本論文の内容を総括し、今後の課題及び展開について述べる。

以上に述べた本論文の全体構成を、図 1-14 にまとめる。

1章 序論 研究背景・目的・論文構成
<p>2章 <i>in vitro</i>食品機能性評価法の開発</p> <p><b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>・O<sub>2</sub><sup>-</sup>同時計測技術</b> CFL-C2000 (キュベットタイプ)</p> <p>好中球細胞を使って、<i>in vitro</i>で自然免疫反応を再現</p> <p>食材の活性酸素消去能と自然免疫反応への影響の両方を評価する「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」</p> <p>JPBA, 84, 90-96, 2013</p>
<p>3章 <i>in vivo</i>法</p> <p>～極微量血液による好中球活性評価システム～</p> <p><b>OCI<sup>-</sup>・O<sub>2</sub><sup>-</sup>同時計測技術</b> CFL-P2200 (プレパレートタイプ)</p> <p>極微量血液中の好中球の自然免疫反応をモニター</p> <p>食材摂取前後の比較により、体内での食の真の効果の評価</p> <p>血液試料露出の問題・操作性の問題あり</p> <p>PLOS ONE, 13(8):e0200573, 2018</p>
<p>4章 システム改良とヒト臨床研究による検証</p> <p><b>OCI<sup>-</sup>・O<sub>2</sub><sup>-</sup>同時計測技術</b> CFL-H2200 (薄型角セルタイプ)</p> <p>極微量血液中の好中球の自然免疫反応をモニター</p> <p>3章記載の問題点を解決</p> <p>微細な体調変化＝未病状態を評価できる未病評価システム</p> <p>Scientific Reports, 11(1), 14545, 2021</p>
5章 社内ベンチャーによる事業実践に向けて
6章 総括・今後の展開

図 1-14 本論文の構成

## 第 1 章引用文献

- [1] GLOBAL NOTE, “グローバルノート - 国際統計・国別統計専門サイト,” GLOBAL NOTE, 24 12 2021. [オンライン]. Available: <https://www.globalnote.jp/post-3770.html>. [アクセス日: 3 5 2022].
- [2] 小西徹也, “健康寿命延伸における未病ケアと未病ケア食品,” *日本未病学会雑誌*, 第 28 巻, 第 1, pp. 63-68, 2022.
- [3] (一社)日本未病学会, “未病とは?”, (一社)日本未病学会, [オンライン]. Available: <https://www.j-mibyouto.or.jp/mibyotowa.htm#mibyotowa>. [アクセス日: 3 5 2022].
- [4] Arai S, "Studies on functional foods in Japan - State of the art.," *Biosci. Biotechnol. Biochem*, no. 60, pp. 9-15., 1996,.
- [5] 大澤俊彦, “食品機能評価におけるバイオマーカーの重要性,” *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)*, 第 132, pp. 140-144, 2008.
- [6] Osawa T, “Chapter 1, Functional Foods for Disease Prevention II,” 著: *Recent Progress of Functional Food Research in Japan*, Washington DC, ACS Publications, 1998, pp. 2-9.
- [7] 山田和彦、田中弘之、石見佳子、梅垣敬三、井出留美, “保健機能食品の課題と展望,” *日本栄養・食糧学会誌*, 第 70 巻, 第 3, pp. 91-99, 2017.
- [8] (公財)日本健康・栄養食品協会, “特定保健用食品の法的な位置づけ,” (公財)日本健康・栄養食品協会, [オンライン]. Available: <https://www.jhnfa.org/tokuho2.html>. [アクセス日: 2 5 2022].
- [9] プラスエイド, “機能性表示食品データベース,” 1 日 5 月 2022 年. [オンライン]. Available: <https://db.plusaid.jp>. [アクセス日: 4 日 5 月 2022 年].
- [10] Sies H, "Oxidative stress: Introductory Remarks," in *In Oxidative Stress*, Elsevier,, 1985, p. 1–8.
- [11] Sies H, "Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine.," *Redox Biol.*, vol. 4, p. 180–183, 2015..
- [12] Kazumura K, Sato Y, Satozono H, Koike T, Tsuchiya H, Hiramatsu M, Katsumata M, Okazaki S., "Simultaneous monitoring of superoxides and intracellular calcium ions in neutrophils by chemiluminescence and fluorescence: evaluation of action mechanisms of bioactive compounds in foods," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 84, p. 90–96, 2013 .
- [13] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A., "Neutrophil extracellular traps kill bacteria," *Science*, vol. 303, pp. 1532-1535., 2004 .

- [14] 射場敏明, 好中球が関与する凝固の活性化と血栓形成, "血栓止血誌, 第 27 巻, 第 3 号, pp. 308-315, 2016.
- [15] Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemmarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne HJ, Brinkmann V, Jenne DE, "Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis," *Nat. Med.*, vol. 15, pp. 623-625, 2009.
- [16] Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A., "Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, vol. 107, pp. 9813-9818, 2010.
- [17] Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, Masuda S, Hasegawa R, Kobayashi T, Nishio S, Kasahara M, Ishizu A., "Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis," *Arthritis. Rheum.*, vol. 64, pp. 3779-3787, 2012.
- [18] Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kuberski P, "Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood.," *Nat. Med.*, vol. 13, pp. 463-469, 2007.
- [19] Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR., "Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury.," *J. Clin. Invest.*, vol. 122, pp. 2661-2671, 2012.
- [20] Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS., "Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease.," *Blood*, vol. 123, pp. 3818-3827, 2014.
- [21] Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD., "Extracellular DNA traps promote thrombosis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, vol. 107, pp. 15880-15885, 2010.
- [22] von Brühl ML, Stark K, Steinhilber A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, "Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice *in vivo*.," *J. Exp. Med.*, vol. 209, pp. 819-835, 2012.
- [23] Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk A, Cools-Lartigue J, Crawford JM, et al., "Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps.," *J.*

*Exp. Med.*, vol. 217, p. 1–7, 2020.

- [24] B.S. van der Veen, M.P. de Winther, P. Heeringa, "Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease," *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 11, no. 11, pp. 2899-2937, 2009.
- [25] Glennon-Alty L, Hackett AP, Chapman EA, Wright HL., "Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 125, p. 25–35, 2018.
- [26] Satozono H, Kazumura K, Okazaki S, Hiramatsu M., " Simultaneous measurement of superoxide generation and intracellular calcium ion of neutrophil-like culture cells," *Luminescence*, vol. 21, no. 2, pp. 69-71, 2006.

## 第2章 抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験

本章では、微弱光検出技術を活かして新たな *in vitro* の食品機能性評価法を開発したこと、並びに本評価法を利用して複数の食品成分等を評価した例について概説する。なお、本章の記述や図表の一部は筆者の研究 [1, 2] から転載している。

### 2-1 背景と目的

酸化ストレスが大きな原因の一つと考えられている老化や生活習慣病の予防の役割が期待されるものとして、抗酸化食品に注目が集まっている。

食品が持つ抗酸化活性を評価するための多くの *in vitro* 法がすでに開発されている。例えば、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去活性法 [3]、化学発光法 [4]、電子スピン共鳴 (ESR) 法 [5, 6]、活性酸素吸収能力 (ORAC) 法 [7, 8] である。しかし、これらのほとんどは化学的に発生させた *in vitro* での活性酸素に対する「食」の作用を見ているだけであり、生体内での効果を正確に評価するには限界がある。一方、抗炎症活性に対する評価実験のほとんどは、炎症の動物モデル (カラギーナン誘発足浮腫モデル [9]、ホルマリン誘発関節炎モデル [10]) が使用されているが、これらの *in vivo* 実験には、経費面、倫理面、簡便性等の問題がある。

抗酸化モニタリングのための従来法、化学発光法の一つでは、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系によって生成された  $O_2^{\cdot-}$  を、 $O_2^{\cdot-}$  特異的発光試薬を使って化学発光によって検出する。この評価系において、機能性食品成分の共存下での化学発光強度の低下は、食品成分による  $O_2^{\cdot-}$  の消去、即ち抗酸化作用によるものと判断されている。また、好中球やマクロファージの  $O_2^{\cdot-}$  産生能を利用した実験においても同様に、食品成分共存下での化学発光の減少は、 $O_2^{\cdot-}$  の消去によるものと判断されている。これらの方法では、 $O_2^{\cdot-}$  を検出している化学発光の減少が  $O_2^{\cdot-}$  の消去によるものか、好中球やマクロファージの  $O_2^{\cdot-}$  産生能の抑制によるものかどうかを区別することはできなかった。 $O_2^{\cdot-}$  産生の抑制は、自然免疫応答、即ち免疫作用によって引き起こされる宿主組織への炎症ダメージを軽減する、即ち抗炎症作用と判断すべきである。

一方で、活性酸素は感染防御 [11] や情報伝達 [12] 等生体に有益な面もあり、バランスを保つことが重要と考えられる。そこで筆者らは、自然免疫応答メカニズムに着目し、「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「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」の確立を目指した。

### 2-2 抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験の評価原理

白血球の最大のポピュレーション (60~70%) である好中球は、第1章で述べたように、



自然免疫の最大の担い手として外敵の侵入に対し、活性酸素を積極的に産生して第一線で対抗するが、その際、 $\text{Ca}^{2+}$ がセカンドメッセンジャーとして重要な役割を果たしている。即ち、好中球を走化性因子である fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) で刺激した際に起こる PI レスponseによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の上昇と、それにより惹起される  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 産生を、蛍光並びに化学発光で同時にモニター (図 2-1) することで、活性酸素を消去する作用 (抗酸化作用) と活性酸素の産生を抑制する作用 (抗炎症作用) が区別できるのではと考え、第 1 章で述べた蛍光・発光同時計測技術を適用することとした。

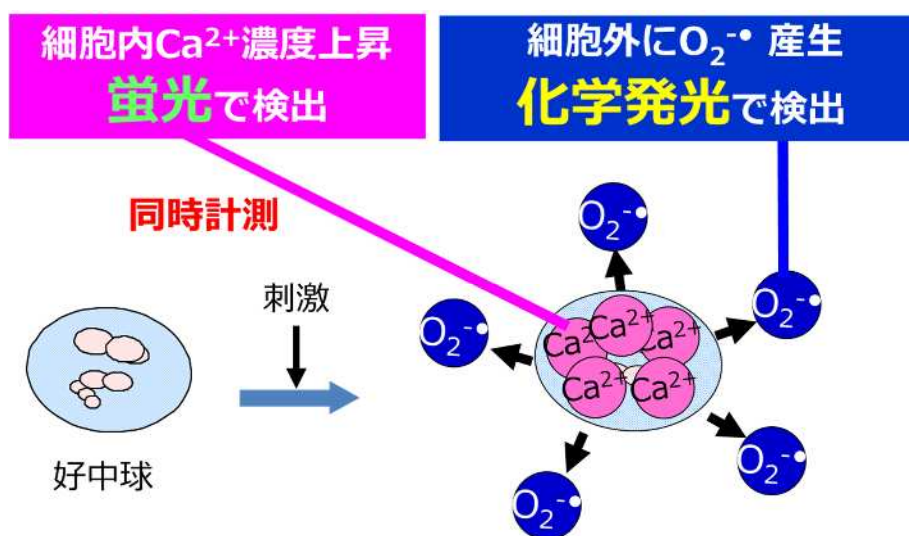


図 2-1 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇・ $\text{O}_2^{\cdot-}$ 産生の同時測定計測概念図 [2]

好中球細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を蛍光で、細胞外に産生される  $\text{O}_2^{\cdot-}$ を化学発光で同時に経時的にモニターし、評価したい食品や食品成分等の被験物質の存在の有無で、刺激剤投与によって惹起された自然免疫反応時の蛍光と化学発光の発光量の違いを算出し、以下の3つの機能を判別する仕組みである (図 2-2 参照)。

化学発光のみ減少 **抗酸化 (活性酸素消去) 作用**

蛍光・化学発光共に減少 **抗炎症 (過剰な炎症反応抑制) 作用**

化学発光増加 **自然免疫賦活作用**

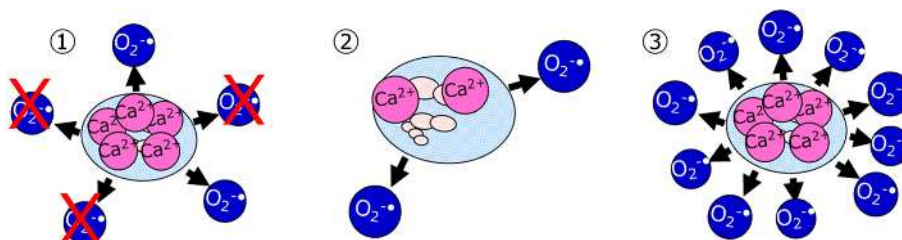


図 2-2 抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価原理概念図 [2]

## 2-3 抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験の評価方法

評価に用いる好中球細胞は、末梢血から Percoll や Ficoll を用いて密度勾配遠心により好中球を単離してもよいが、HL-60 細胞（急性前骨髄球性白血病細胞：American Type Culture Collection から取得）を GIT 培地（コージンバイオ(株)）で維持し、1.3% (v / v) DMSO（Sigma-Aldrich：細胞凍結用）にて 96 時間分化誘導培養して得られた好中球様細胞を使用した（図 2-3）。

好中球様細胞に細胞内  $Ca^{2+}$  指示薬である fluo-3 AM（Ex:508 nm En:527 nm, 同仁化学研究所）を 3  $\mu$ M の濃度でロードし、37、5%CO<sub>2</sub> で 45 分間インキュベート後、RH buffer（154 mM NaCl、5.6 mM KCL、10 mM Hepes、pH7.4）で 2 回洗浄し、同 buffer に懸濁して計測に供した（図 2-3）。

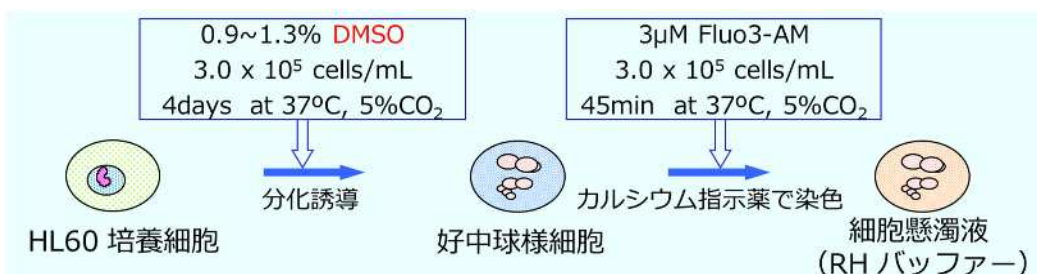


図 2-3 計測用細胞の調製法

1 mM  $CaCl_2$ 、0.5  $\mu$ M MCLA（Max:465 nm, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>特異性化学発光試薬：東京化成）、細胞濃度 1.0  $\times 10^5$  cells/ mL の全量 1.5mL 計測液になるように 1 cm 角のキュベット（3 mL PMMA 製）に調製し、37 でインキュベートした。同時計測装置にセットして計測開始 150 秒後、1  $\mu$ M fMLP（Sigma-Aldrich 製、細菌の膜成分）を投入して、自然免疫反応を惹起した。刺激を受けた好中球様細胞からの化学発光と蛍光を同時計測装置にて経時的にモニターした（図 2-4）。

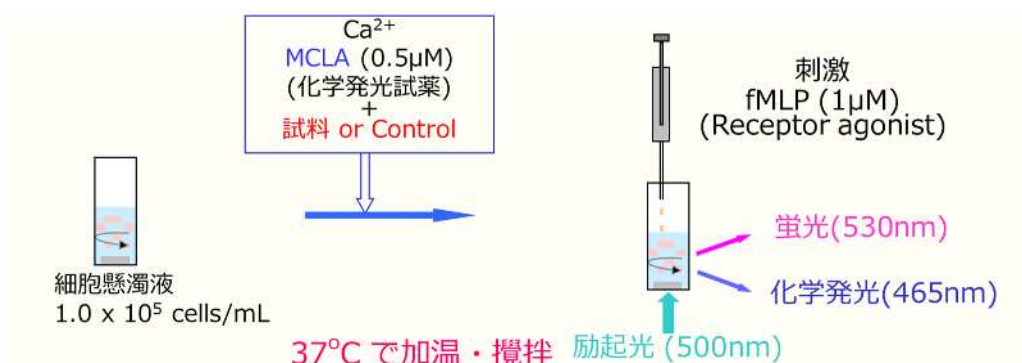


図 2-4 計測方法

図 2-5 に、同時計測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（秒）

縦軸が発光強度である。37 で保温、攪拌しながら刺激剤を添加すると共に、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を表す蛍光信号が増加し、やや遅れて  $\text{O}_2^{\cdot-}$  産生を表す化学発光信号も増加して其々ピークを形成している。被験物質を共存させた場合の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。専用開発した解析ソフトで、蛍光と化学発光其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、被験物質ごとの  $\text{IC}_{50}$  値 (50% Inhibition Concentration : 50%発光阻害濃度) の算出も可能である。

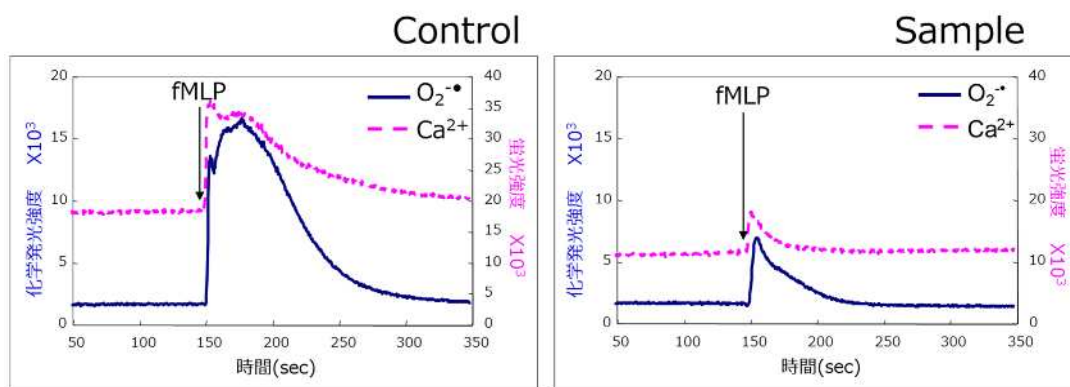


図 2-5 計測結果 左 試験試料無添加 右 試験試料共存下 [2]

## 2-4 既知の抗酸化物質と抗炎症性物質、自然免疫賦活物質での検証

### 2-4-1 検証方法

本計測システムで、正しく抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活が正しく評価できるかを、既知の試料を用いて検証した。使用した被験物質と検証濃度範囲を以下の表 2-1 に示した。

表 2-1 被験物質とその濃度

Test samples		Concentration						
抗炎症物質	$\text{Zn}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	0.3	1	3	10	30	100	
	Ibuprofen (mM)	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2		
抗酸化物質	Ascorbic Acid ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.01	0.03	0.1	0.3	1		
	SOD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3*
免疫賦活物質	Lactoferrin ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	1.5	3	6	15	30	60	150

すべて RHバッファーに溶解 Ibuprofen : NaOHにて pH7.4に調製  
\* : 3 $\mu\text{M}$  SOD は、化学発光法のみ

また、検証濃度範囲における、被験物質の細胞毒性の有無を MTT アッセイ法 [13, 14]

を用いて細胞生残率で評価した。HL-60 細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/ mL の密度で 96 穴プレートにまき、100  $\mu$ L RH buffer 中で 37  $\cdot$  20 分間、被験物質の上記濃度で暴露した。暴露液を除去後、新鮮な RH buffer で 1 回洗浄後して 10  $\mu$ L MTT を含む 100  $\mu$ L GIT 培地に再懸濁し、4 時間インキュベートした。その後、図 2-6 に示す MTT アッセイ法にて細胞生残率を評価した。



図 2-6 MTT アッセイ法

更に、抗酸化評価の従来法である化学発光法で  $O_2^{\cdot-}$  消去活性の評価も行った (図 2-7)。1 mM ヒポキサンチンと 0.5  $\mu$ M MCLA を RH buffer で混合し、被験物質の上記濃度を其々加えて 37  $\cdot$  で 3 分間インキュベートした後、キサンチンオキシダーゼを添加して、 $O_2^{\cdot-}$  産生反応を開始した。混合物からの化学発光強度を装置のルミノメーターモード (LED を消灯した状態で得られる信号を検出) でモニターした。化学発光のピーク面積から被験物質の  $IC_{50}$  値を算出した [4]。

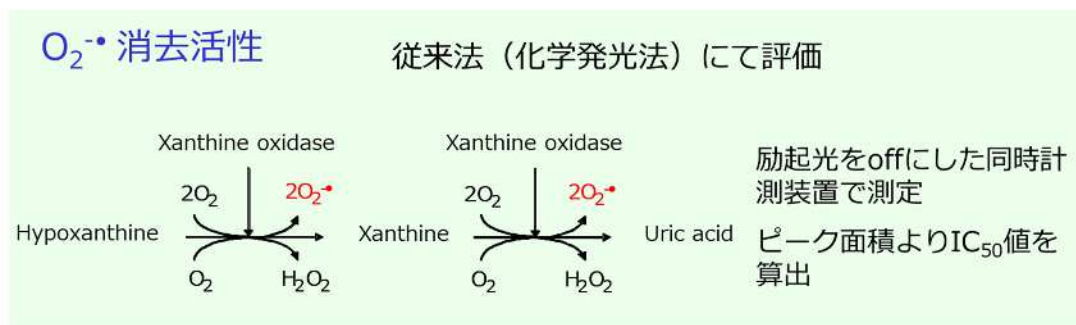


図 2-7 化学発光法による  $O_2^{\cdot-}$  消去活性の評価

統計解析については、以下の様に行った。

計測データは、最低 3 回 (アスコルビン酸とラクトフェリン=3、SOD とイブプロフェン=4、 $Zn^{2+}$ =5) 独立して行った計測から算出した平均値  $\pm$  SD で表した。同時計測の結果は、被験物質とコントロールの平均ピーク面積を、添加した被験物質の濃度レベルごとに均質な分散で t-test により解析した。コントロールのデータを含む細胞生存率の結果は、一元配置分散分析により解析した。

## 2-4-2 結果

### ・抗炎症物質

図 2-8 に、0  $\mu\text{M}$  (左: コントロール) と 100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  存在下 (右) での好中球様細胞における  $\text{O}_2^{\cdot-}$  産生と  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  のレベルの時間経過を示した。100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  で処理することで、化学発光と蛍光信号の両方が著しく減少した。

$\text{Zn}^{2+}$  について、表 2-1 で示した 6 濃度を其々共存させて評価を行った。専用の解析ソフトを用いて其々のピーク面積を算出し、添加濃度毎に  $\text{Zn}^{2+}$  添加試料で得られた化学発光のピーク面積をコントロールの化学発光のピーク面積で割ったピーク面積比、及び  $\text{Zn}^{2+}$  添加試料で得られた蛍光のピーク面積をコントロールの蛍光のピーク面積で割った面積比 (以下ピーク面積比) を算出した。

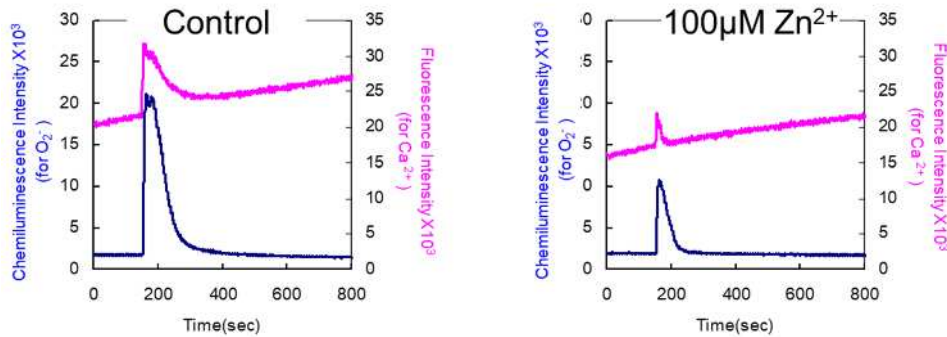


図 2-8  $\text{Zn}^{2+}$  非存在下と 100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  存在下での計測結果

図 2-9 に算出されたピーク面積比と、 $\text{Zn}^{2+}$  の添加濃度との関係を示した。 $\text{Zn}^{2+}$  存在下でのピーク面積比は、化学発光信号、蛍光信号ともに用量依存的に顕著な減少を示した。化学発光と蛍光の  $\text{IC}_{50}$  値は、化学発光法と同様の方法で、各ピーク面積比を用いて算出した。化学発光の  $\text{IC}_{50}$  値は 7.8  $\mu\text{M}$ 、蛍光の  $\text{IC}_{50}$  値は 6.6  $\mu\text{M}$  であった (表 2-2 参照)。

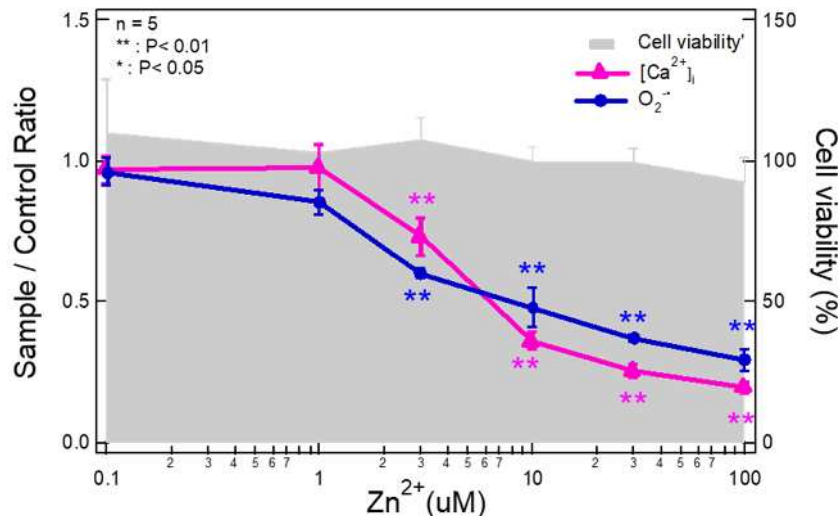


図 2-9  $\text{O}_2^{\cdot-}$  産生・細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇と  $\text{Zn}^{2+}$  濃度との関係

一方、ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼを用いた化学発光法では、表 2-2 の右欄に示すように、 $Zn^{2+}$ の  $IC_{50}$  値を算出することができなかった。これは、 $Zn^{2+}$ が  $O_2^{\cdot-}$ 消去作用を示さなかったこと、つまり抗酸化剤として作用しなかったことを意味する。

$Zn^{2+}$ の細胞毒性を調べるために、MTT アッセイ法により細胞生存率を評価した。図 2-7 に示すように、 $Zn^{2+}$ は 100  $\mu M$  濃度まで細胞毒性を示さなかった。従って、化学発光信号および蛍光信号の減少は、細胞毒性によるものではないことが確認された。幼児の血漿中の  $Zn^{2+}$ 濃度は約 10  $\mu M$  [15]であり、成人の場合、通常正常値は 10~16.8  $\mu M$  と報告されている [16]。これらの血漿中の  $Zn^{2+}$ 濃度は、我々の方法で得られた  $IC_{50}$  値とほぼ同じレベルであった。

次に、もう一つの抗炎症物質であるイブプロフェンの影響を検討した。図 2-10 に示すように、化学発光と蛍光の信号は、 $Zn^{2+}$ の場合と同様にイブプロフェン共存量に依存して減少した。其々の  $IC_{50}$  値は表 2-2 に示した通りである。

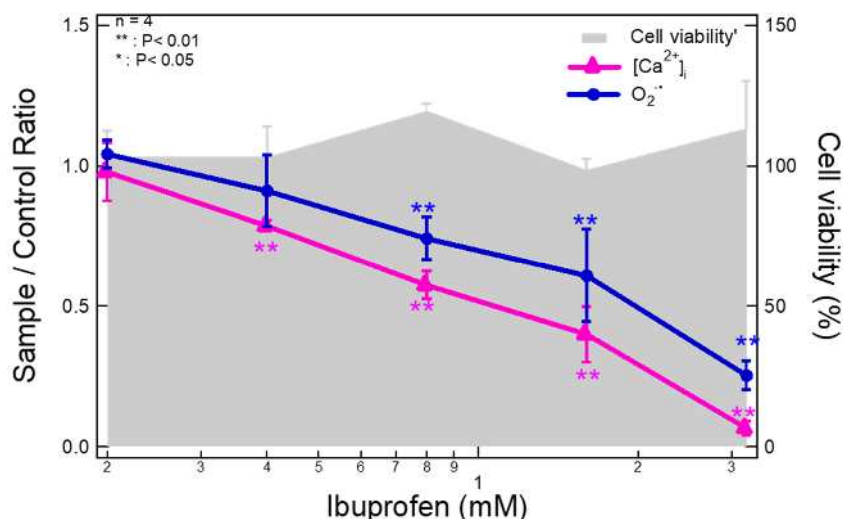


図 2-10  $O_2^{\cdot-}$  産生・細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇とイブプロフェン量との関係

ヒポキサンチンおよびキサンチンオキシダーゼを用いた化学発光法では、イブプロフェンにおいても  $IC_{50}$  値を算出することができなかった。また細胞毒性に関して、今回設定した濃度範囲の 3.2 mM 以下では細胞毒性を示さなかった。

以前の研究において、イブプロフェンの  $O_2^{\cdot-}$ 産生における  $ID_{50}$  (half maximal inhibitory dose) は 0.9 mM で、この値はイブプロフェンを治療用で服用する患者で得られた血漿レベルの濃度とほぼ同等であったと報告されている [17]。

表 2-2 被験物質の IC<sub>50</sub> 値

Test substances	同時計測法 IC <sub>50</sub>		化学発光法 IC <sub>50</sub>
	CL	FL	
Zn <sup>2+</sup> ( $\mu$ M)	7.77 $\pm$ 0.83	6.56 $\pm$ 0.20	n.d.
Ibuprofen (mM)	1.93 $\pm$ 0.45	1.16 $\pm$ 0.29	n.d.
Ascorbic Acid ( $\mu$ g/mL)	0.13 $\pm$ 0.04	n.d.	0.08 $\pm$ 0.02
SOD ( $\mu$ g/mL)	0.03 $\pm$ 0.00	n.d.	2.76 $\pm$ 0.04
Lactoferrin ( $\mu$ g/mL)	n.d.	n.d.	n.d.

・抗酸化物質

抗酸化物質として、アスコルビン酸について評価した。図 2-11 は、0~1  $\mu$ g/mL の 6 濃度（表 2-1 参照）のアスコルビン酸を添加した好中球様細胞における O<sub>2</sub><sup>•</sup>産生（左）と [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇（右）の時間経過を示したものである。O<sub>2</sub><sup>•</sup>産生を反映する化学発光のピーク面積はアスコルビン酸の濃度の増加とともに徐々に減少したが、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の変化を示す蛍光面積はすべて一定であった。

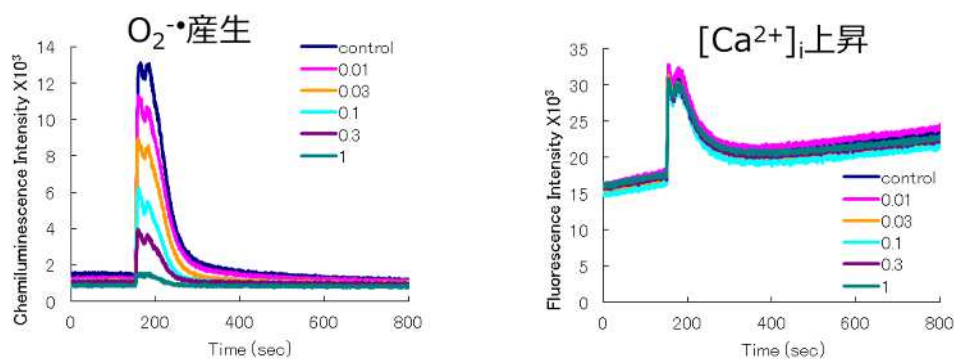


図 2-11 アスコルビン酸存在下 (0~1 $\mu$ g/mL) での計測結果

計測結果より算出されたピーク面積比とアスコルビン酸の濃度との関係を図 2-12 に示した。アスコルビン酸は、共存濃度の増加に伴って化学発光信号のみ顕著に抑制した。化学発光の IC<sub>50</sub> 値は 0.13  $\mu$ g/mL であった。しかし、蛍光信号変化には影響を及ぼさず一定であり、IC<sub>50</sub> 値は算出できなかった。

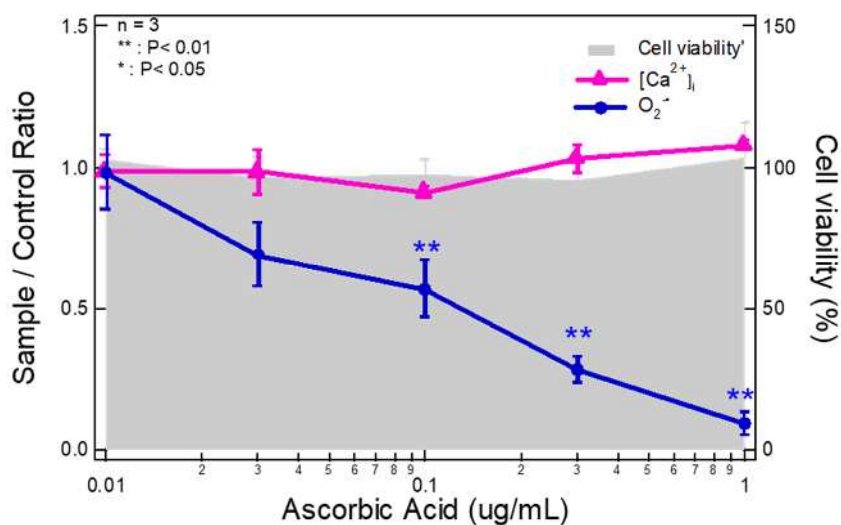


図 2-12 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 産生・細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇とアスコルビン酸濃度との関係

今回設定した 1 μg/mL までの濃度範囲においてアスコルビン酸は、細胞毒性を示さなかった。また、ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼによる化学発光法で算出された IC<sub>50</sub> 値は 0.08 μg/mL であった。健常人の血漿中のアスコルビン酸の一般的な濃度は、約 7 ~ 14 μg/mL と報告されている [18]。今回の評価により得られた IC<sub>50</sub> 値はそれよりもはるかに低い値となった。

図 2-13 に、もう一つの抗酸化物質としてスーパーオキシドディスムターゼ (SOD : O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 分解酵素) の検討結果を示した。アスコルビン酸と同様に、SOD 共存量の増加に伴い化学発光信号のみが減少し、IC<sub>50</sub> 値は 0.03 μg/mL となった。蛍光信号は、コントロールと比較して変化はなく、アスコルビン酸と同様に IC<sub>50</sub> 値は算出できなかった。

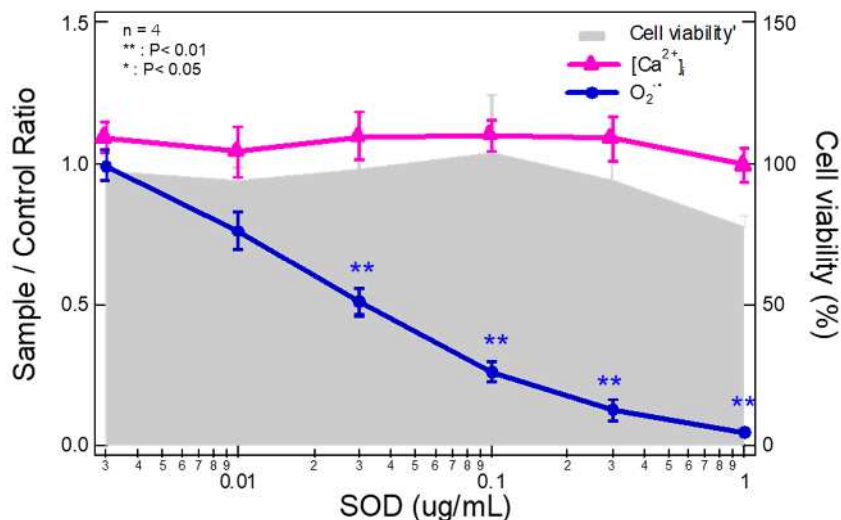


図 2-13 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 産生・細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇と SOD 濃度との関係

SOD は 1 μg/mL 以下では細胞毒性を示さなかった。健常人の正常な血漿中の SOD 濃



度は 1.5-1.6 U/mL と報告されている [19]。我々の方法で得られた IC<sub>50</sub> 値である 0.08 U/mL はそれよりはるかに低い。また、ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼによる化学発光法で算出された IC<sub>50</sub> 値は 2.8 µg/mL であった。

#### ・免疫賦活物質

免疫賦活物質として、0 ~150 µg/mL の 8 濃度のラクトフェリンについて評価した。計測結果より算出されたピーク面積比とラクトフェリンの濃度との関係を図 2-14 に示した。

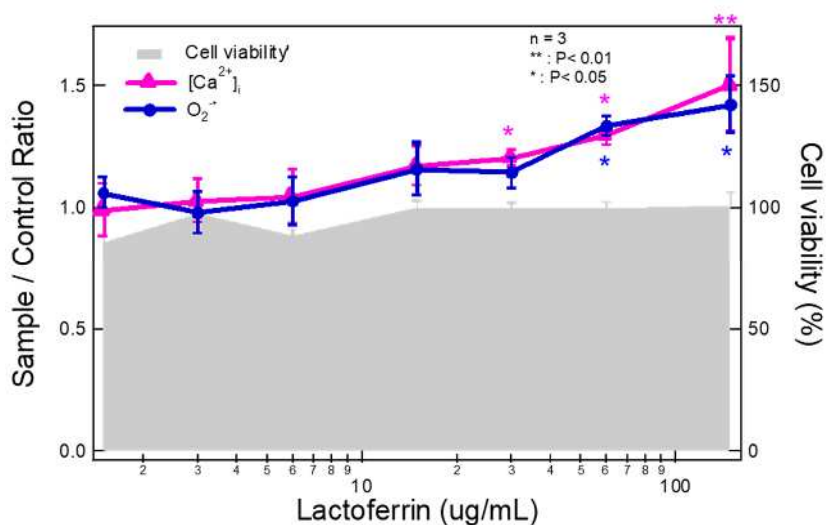


図 2-14 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 産生・細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇とラクトフェリン濃度との関係

ラクトフェリンの濃度依存的に、蛍光と化学発光共に信号量が上昇しており、IC<sub>50</sub> 値は算出できなかった。また、ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼによる化学発光法でも、コントロール (0 µg/mL) と比較して信号量に変化は見られず、IC<sub>50</sub> 値は算出できなかった。細胞毒性に関して、ラクトフェリンにおいても検証濃度範囲内で毒性は見られなかった。

#### 2-4-3 考察

前述したように、Ca<sup>2+</sup>は O<sub>2</sub><sup>·-</sup>産生のセカンドメッセンジャーとして重要な役割を担っている。従って、生理活性物質を評価するためには、O<sub>2</sub><sup>·-</sup>産生だけをモニターするだけでは不十分であり、活性化した好中球の呼吸バースト時の O<sub>2</sub><sup>·-</sup>産生と[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇を同時にモニターすることにより、被験物質が O<sub>2</sub><sup>·-</sup>産生を抑制したのか、産生された O<sub>2</sub><sup>·-</sup>を消去したのかの区別が可能であると考えている。

Zn<sup>2+</sup>とイブプロフェンの結果は、これらの物質が O<sub>2</sub><sup>·-</sup>を消去しているのではなく、Ca<sup>2+</sup>の細胞内への動員を阻害することで O<sub>2</sub><sup>·-</sup>の産生を抑制していることが示唆された。Zn<sup>2+</sup>が細胞内への Ca<sup>2+</sup>の流入を抑制することは以前の研究でも報告されている [20]。本実験系は

以前の報告の実験系とは異なるが、 $Zn^{2+}$ の作用に関する今回の結果は、報告されている観察結果と一致するものであった。 $Zn^{2+}$ とイブプロフェンがともに好中球様細胞の過剰な炎症反応を確実に抑制することを示すこれらの結果を考慮すると、この方法は生理活性物質の抗炎症作用を効果的にかつ迅速に評価することができるかと結論付けられる。

アスコルビン酸と SOD の 2 つの抗酸化物質は、好中球様細胞における細胞内への  $Ca^{2+}$  の動員とそれに伴う  $O_2^{\cdot-}$  産生に影響を与えず、好中球様細胞により産生された  $O_2^{\cdot-}$  を消去したと考えられる。即ち抗酸化作用である。これらの結果は、この方法が生理活性物質の抗酸化作用を評価できることを示している。

ちなみに、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ化学発光法による SOD の  $IC_{50}$  値 ( $2.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) は、同時計測法で得られた値 ( $0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) よりもはるかに大きな値であった。この  $IC_{50}$  値の相違は、2 つの方法の実験条件の違いに起因すると思われる。筆者らは、SOD が  $O_2^{\cdot-}$  を産生する好中球の細胞膜近傍に局在していると予想した。SOD は食細胞の膜表面に結合することが以前の研究で明らかにされている [21, 22]。従って、筆者らの方法での  $O_2^{\cdot-}$  消去効率は、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ化学発光法の場合よりもはるかに高いと予想された。この可能性を蛍光染色で検証してみた。その結果、Alexa-labeled-SOD 処理後の洗浄細胞の蛍光強度と非処理細胞の蛍光強度の差は、5%水準で統計的に有意であった（データ未掲載）。これは、SOD が好中球様細胞の膜表面にしっかりと結合して  $O_2^{\cdot-}$  の産生領域付近に局在していることを示唆していると思われる。化学発光法の場合、SOD と  $O_2^{\cdot-}$  は溶液中に均一に分散しているはずである。

抗炎症物質と抗酸化物質、免疫賦活物質を評価したことによって、本方法の有効性を確認できた。本手法により、機能性食品やその生理活性成分を 4 つのカテゴリーに分類することが可能であろう。化学発光が増加した場合は、好中球の自然免疫作用を増強した、芽根喜賦活作用があると考えられる。化学発光と蛍光の強度がともに低下している場合は、 $Ca^{2+}$  の動員を抑制することで  $O_2^{\cdot-}$  の産生を抑制していると考えられる。一方、化学発光強度のみが低下した場合は、産生された  $O_2^{\cdot-}$  を消去していると考えられる。後者の場合、被験物質が、好中球のシグナル伝達系における受容体やセカンドメッセンジャーの下流に位置している PKC や NADPH オキシダーゼなどの酵素に作用することによって、 $O_2^{\cdot-}$  産生を抑制していることも考えられる。今回一緒に行った従来法のヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ化学発光法などを用いた活性酸素消去能の評価により、 $O_2^{\cdot-}$  消去と  $O_2^{\cdot-}$  産生抑制を区別することが可能である [4, 5]。

この実験系を活用することで、身体の状態に応じて、どのような生理活性物質を摂取するのが良いかを判断することができるようになる。例えば、変性性関節炎のような慢性炎症性疾患を患っているような場合、抗炎症作用を示す天然免疫抑制剤を適用することが有効であると考えられる。一方、喫煙や紫外線などの外的要因による酸化ストレス状態になっているような場合は、活性酸素を除去する抗酸化物質を適用することが有効である。また、疲労等で免疫力が低下しているような場合は、免疫力をアップするような物質を摂取

することで、風邪等の予防が可能になると考えられる。

## 2-5 抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験による評価事例

抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験が利用された事例の一部を記載する。

### 2-5-1 アントシアン類

アントシアンは、植物色素の一種で、花や葉、果実等の色素成分で、フラボノイドの一種である。本体部分のアグリコンのみのものがアントシアニン、アグリコンに糖が結合した配糖体がアントシアニンであり、これらの総称がアントシアンである。アントシアンは健康に寄与する機能性物質として多くの研究がなされ、機能性表示食品も数多く流通している。カシス（ボイセンベリー）には、シアニンとデルフィニンをアグリコンとして、グルコースとルチノースが各々結合したものが多く含まれている [23]（図 2-15）。

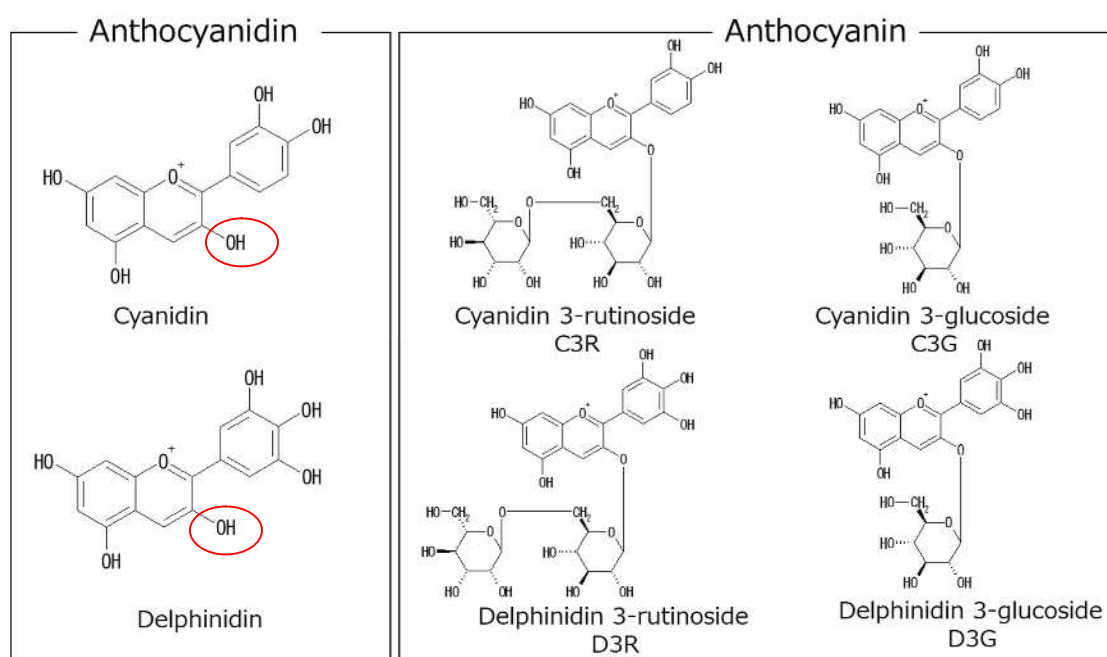


図 2-15 アントシアン類（赤丸は糖鎖の結合位置）

其々以下に示す濃度について検討した。

配糖体 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30, 100  $\mu\text{M}$ （DMSO 終濃度 0.3%）

アグリコン 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30  $\mu\text{M}$ （DMSO 終濃度同上、ただし 30  $\mu\text{M}$  は 0.5%）

アグリコンは、DMSO 終濃度 0.5%でも 100  $\mu\text{M}$  では結晶が析出し、溶解できなかった。結果を以下の図 2-16、2-17、2-18 に示す。

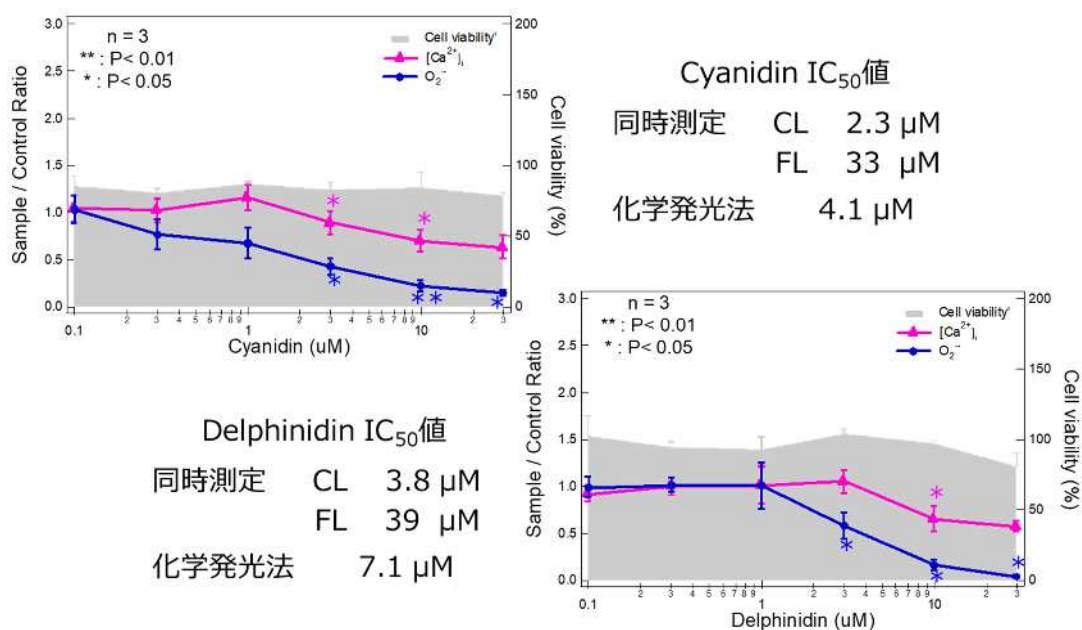
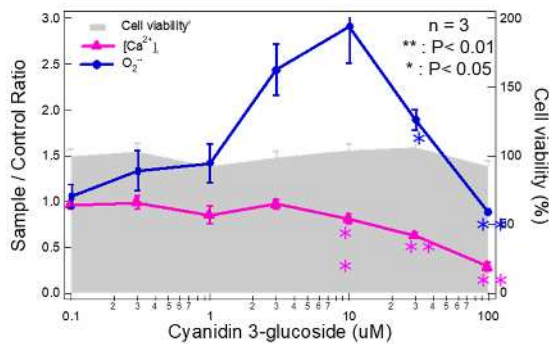


図 2-16 アントシアニン類の結果

図 2-16 に示したように、アントシアニン類のシアニン、デルフィニジンの両物質において、蛍光・化学発光ともに濃度依存的に信号が抑制されている。 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑えることで、 $O_2^{\cdot -}$ 産生を抑制していると考えられ、シアニンとデルフィニジンは抗炎症作用を有すると推察された。また、ヒポキサンチン キサンチンオキシダーゼ系による化学発光法でも、濃度依存的に抑制がみられ、 $IC_{50}$  値も産出されたことから、抗酸化作用も有していることが確認された。蛍光・発光同時計測で得られた  $IC_{50}$  値において、蛍光と化学発光で一桁濃度が違っていたが、これは抗酸化作用、即ち  $O_2^{\cdot -}$ を消去する作用も同時に働いていることが原因で CL の方が小さい  $IC_{50}$  値になったと考えられる。

次に、シアニンをアグリコンとしてグルコースとルチノースが各々結合した 2 種類の配糖体 C3G,C3R の結果を、図 2-17 に示した。



C3G IC<sub>50</sub>値  
 同時測定 CL N/A  
 FL 52 μM  
 化学発光法 N/A

C3R IC<sub>50</sub>値  
 同時測定 CL N/A  
 FL 60 μM  
 化学発光法 90 μM

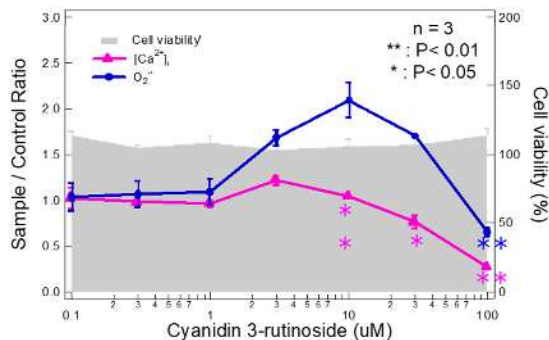


図 2-17 アントシアニン シアニジン誘導体の結果

C3G,C3R 共に、1 ~ 10 μM にかけて化学発光が濃度依存的に上昇していた。好中球の O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生作用を亢進し、自然免疫を賦活する作用があると推察された。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇は、3 μM まではほぼコントロールと同値であったが、その後減少する傾向がみられた。それに伴い、O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生も徐々に低下した。細胞毒性は見られていないので、高濃度域で若干の抗炎症作用があると言えるがその活性はかなり弱い。また O<sub>2</sub><sup>-</sup>消去活性は、C3R で IC<sub>50</sub> 値は算出されたが、こちらも活性はかなり弱いと言える結果となった。

最後に、デルフィニジンをアグリコンとしてグルコースとルチノースが各々結合した 2 種類の配糖体 D3G,D3R の結果を図 2-18 に示した。両物質共に、0.1μM から濃度依存的に、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇と O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生が増加している。好中球の細胞内への Ca<sup>2+</sup>の取り込みを亢進して O<sub>2</sub><sup>-</sup>の産生を亢進した、即ち自然免疫賦活作用があると推察された。その後化学発光が先に低下を始めている。これは化学発光法の IC<sub>50</sub> 値からもわかるように O<sub>2</sub><sup>-</sup>の消去活性が働いたと考えられる。細胞毒性は見られていないので、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇が下がり始める 10μM 以上では、抗炎症作用が働いていると推察された。濃度域によって、違う作用がみられるという興味深い結果が得られた。

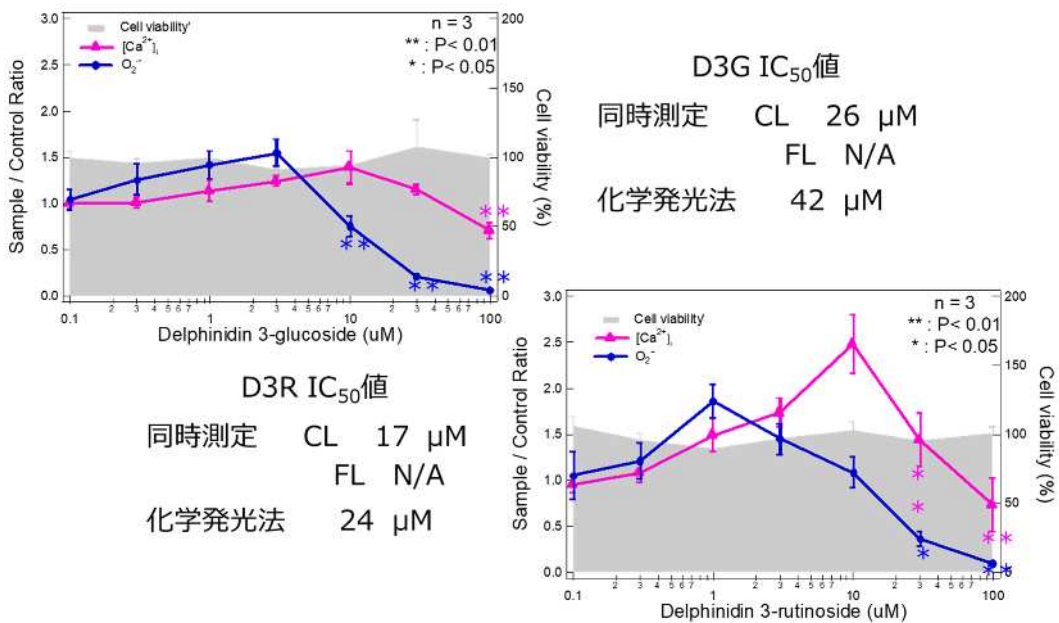


図 2-18 アントシアニン デルフィニジン誘導体の結果

シアニジンとその配糖体、デルフィニジンとその配糖体で、同様な傾向が得られると予想していたが、全く異なる結果となった。アグリコンは、抗炎症作用と抗酸化作用を有している。配糖体はいずれも、自然免疫を賦活する作用がみられた。デルフィニジン配糖体では抗酸化作用と高濃度域で弱い抗炎症作用を有しているのに対し、シアニジン配糖体は、抗酸化、抗炎症共に作用は弱いという結果となった。

配糖体において、シアニジン配糖体よりもデルフィニジン配糖体で強い抗酸化作用が見られたのは、抗酸化作用に貢献しているといわれている-OH 基がデルフィニジンでひとつ多いことに起因していると推測された。

### 2-5-2 ササクレヒトヨダケ (コブリーヌ) とその機能性成分エルゴチオネインの評価

ササクレヒトヨダケ (学名: *Coprinus comatus*) は、ボサボサのたてがみなどと呼ばれる食用キノコで、栄養価に優れ、味も良く形も図 2-19 に示すようにユニークであるため、スープなど様々な料理に使われる [24]。機能性に関する研究が多く実施され、抗酸化作用 [25]、免疫調節作用、抗腫瘍作用 [26, 27]、血糖降下作用 [28]があることが報告されている。また、ササクレヒトヨダケにはエルゴチオネイン (EGT: キノコ類や一部の細菌のみが生成) という水溶性アミノ酸 (図 2-20) を非常に多く含むことがわかってきた [29]。EGT の機能性に関しては、*in vitro*におけるラジカル消去活性 [30]、腫瘍壊死因子 (TNF-) による脂肪細胞の炎症抑制効果 [31]等が報告されている。

抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験を用いて、ササクレヒトヨダケの熱水抽出物と EGT を評価し、両者の機能性を比較検証した。



図 2-19 ササクレヒトヨダケ

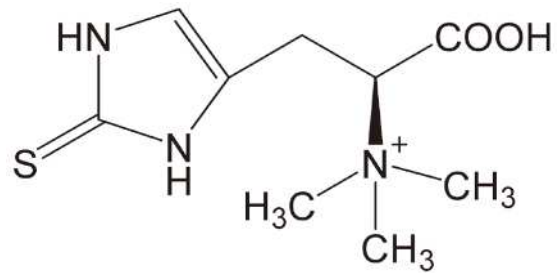


図 2-20 エルゴチオネイン構造式 [24]

出典：(株)ヘルスケアシステムズ HP <https://hc-sys.com/project/coprino/>

ササクレヒトヨダケの熱水抽出液は、以下の方法で取得した。

ササクレヒトヨダケ 2.5 g を 50 mL の熱水と混合、攪拌しながら 30 分間加熱した  
 10,000 rpm、10 分間遠心分離後、ろ過  
 沈殿物を回収して、50 mL の熱水で再度抽出し、上澄み液を回収  
 を 2 回繰り返す、回収した上澄み液をバキュオ内で蒸発させて 50 mL とした  
 最終的に蒸留水にて 10 mg/mL に調製した

始めに、機能的成分である EGT の評価を行った。蒸留水を溶媒として濃度は、0.001、0.01、0.1、0.5、1、2 mM の 6 濃度で行った。結果を図 2-21 に示す。

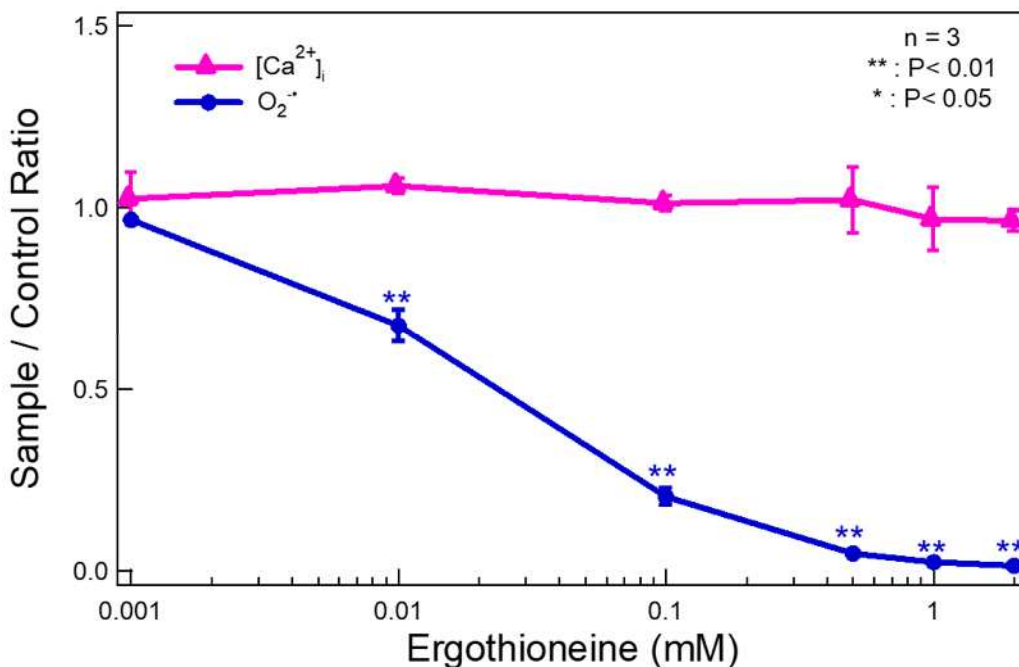


図 2-21 EGT の結果

濃度依存的に化学発光のみが減少し、蛍光はコントロールと同等であったことから、EGT 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  $\text{O}_2^{\cdot-}$  産生には関与せず、産生された  $\text{O}_2^{\cdot-}$  を消去していると考えられ、抗酸化作用と判別される結果となった。IC<sub>50</sub> 値は、0.033 mM となった。化学発光法でも同等の  $\text{O}_2^{\cdot-}$  消去活性が確認された。Franzoni F らの報告 [30] では、ペルオキシラジカルやヒドロキシラジカル、ペルオキシナイトライドでの消去活性が報告されていたが、本検討では  $\text{O}_2^{\cdot-}$  の消去活性が確認された。先に述べたように、EGT には腫瘍壊死因子(TNF- ) による脂肪細胞の炎症抑制効果が報告されていたが、本評価系においては  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇には影響が見られなかったことから、過剰な自然免疫反応を抑制する作用はないと判断された。

次に、ササクレヒトヨダケ熱水抽出液について、はじめに濃度検討を行い、活性が見られて IC<sub>50</sub> 値が算出可能な濃度範囲として、0.05、0.5、5、50、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の5濃度で評価した。結果を図 2-22 に示す。

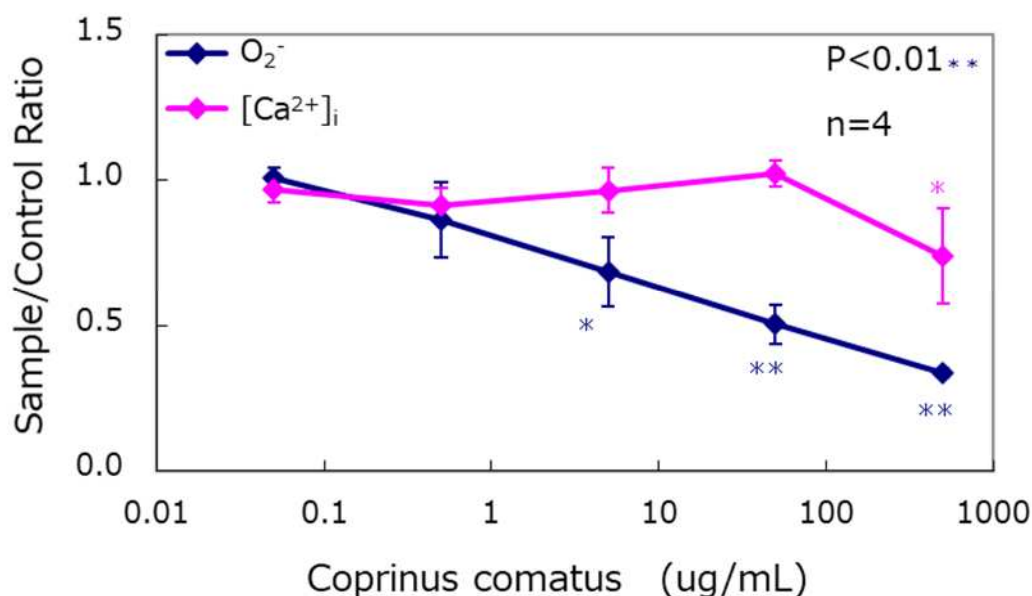


図 2-22 ササクレヒトヨダケ抽出液の結果

$\text{O}_2^{\cdot-}$  産生量を示す化学発光量は、濃度依存的に減少しており、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を示す蛍光は、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  まではコントロールと同等で変化がなかった。以上よりササクレヒトヨダケ熱水抽出物は、EGT と同様に好中球の免疫反応である  $\text{O}_2^{\cdot-}$  産生機構には影響を及ぼさず、免疫反応によって産生された  $\text{O}_2^{\cdot-}$  を消去する作用、即ち抗酸化作用を有していると推定される。IC<sub>50</sub> 値は、48.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となった。

更に、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度上昇が抑制されていることから、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  産生抑制作用、即ち抗炎症作用も有していることが示唆されたが、かなり弱い作用と思われる。

ササクレヒトヨダケの抗酸化作用に関して、EGT の寄与度を検討した。ササクレヒトヨ



ダケ 1 mgに EGT は凡そ 0.02 mg含まれているとの報告がある [24]。EGT の IC<sub>50</sub> 値の 0.033 mM は凡そ 7.6 µg/mL である。ササクレヒトヨダケの IC<sub>50</sub> 値が 48.6 µg/mL であることを考えると、ササクレヒトヨダケの抗酸化作用は EGT 以外の物質の関与もあることが推測される。ササクレヒトヨダケには、フラボノイドやトコフェロール等の抗酸化作用を有する生理活性物質が含まれていることが報告されている [32]。これらの物質も寄与していると考えられる。

また、*in vitro* の評価では、摂取不可能な量での機能性が謳われている例が散見されるため、今回評価で使用した量が、成人が摂取した場合に凡そどの程度の量になるかを考えてみた。本評価系では、好中球懸濁液を使用しているため、血液量で考えることとした。人間の血液量は、体重 1 kgあたり 80 mL と言われている。体重 50 kgとした場合、4000 mL の血液量となる。消化・吸収も、内在の抗酸化因子も全く考慮していないためあくまでも参考値ではあるが、本評価での添加量が 1 mg/ml の場合、成人摂取量は 4 g と考えた。ササクレヒトヨダケの IC<sub>50</sub> 値の 48.6 µg/mL を摂取するためには、200 g 程度を摂取する必要があることになる。このように食品の場合、単独の食材の摂取だけで効果を得るのは困難であり、同様な機能を持つ食材を複数一緒に摂取することで、効果が期待できると思われる。

### 2-5-3 茶類の評価

機能性食品として注目されている茶類について、茶葉の発酵過程に生じる機能性変化に着目して「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」で評価した。茶葉の発酵は、カテキン類等の成分の酸化であり、酒や漬物等の微生物による発酵とは違うものである。茶は発酵の方法や度合いによって、「不発酵茶」「半発酵茶」「発酵茶」「後発酵茶」の 4 種類に分類される。後発酵茶とは、摘採後酸化発酵が生じないように葉を加熱処理した後、微生物を添加して発酵させたお茶である。代表的な以下の 7 種類を選択した。発酵茶ではない麦茶は、対照として選択した。

#### ➤ 試料

緑茶（不発酵茶）：抗酸化性 [33]・細胞増殖抑制 [34]・ヒスタミンリリース抑制 [35]

ウーロン茶（半発酵茶）：高脂血症予防効果 [36]・ $\alpha$ -アミラーゼ阻害 [37]

紅茶（発酵茶）：循環器系の健康増進作用 [38]・虚血性脳卒中の発症予防 [39]

麦茶（茶外茶）：

阿波番茶（後発酵茶：嫌氣的微生物発酵茶）：糖尿病予防 [40]

プーアル茶（後発酵茶：好氣的微生物発酵茶）：抗高脂血症・抗肥満・抗酸化他 [41]

碁石茶（後発酵茶：微生物二段発酵茶）：動脈硬化予防 [42]

➤ 試料調製法

茶其々で飲用する場合にメーカーにより推奨されている方法で、抽出液を調製した。

緑茶：2 g 沸騰後、80 にした 60 mL の湯で抽出（2分30秒）後、フィルターろ過

ウーロン茶：6 g 沸騰した 1200 mL の湯で抽出（5分）後、フィルターろ過

紅茶：3 g 沸騰した 150 mL の湯で抽出（3分）後、フィルターろ過

麦茶：70 g 沸騰した 1200 mL の湯に入れて3分煮出し、フィルターろ過

阿波番茶：1.4 g 沸騰した 200 mL の湯で抽出（3分）後、フィルター濾過

プーアル茶：2 g 沸騰した 250 mL の湯で抽出（3分）後、フィルター濾過

碁石茶：1.5 g 沸騰後、70 程度にした 250 mL で抽出（2分）後、フィルターろ過  
調製した試料を、測定液の中に表 2-3 上段に示した量を添加し、評価した。

添加量に対して、血液量から算出したヒトへの添加量の概算（消化・吸収及び内在抗酸化物質等の影響は考慮しない）を、表 2-3 の下段に示した。

（測定液量は、1.5 mL ヒトの血液量を 4.5 L とした場合、約 3000 倍の量となるため）

表 2-3 被験物質の投与量と摂取した場合の換算量

添加量 (μL)	0.66	2	6.6	20
換算量 (mL)	2	6	20	60

また、Hypoxanthine xanthine oxidase 系による化学発光法で、 $O_2^{\cdot-}$ 消去活性（抗酸化活性）と、MTT アッセイ法による細胞毒性評価も同時に行った。

➤ 結果

試料の吸収スペクトル

茶類が持つ吸収の影響を確認するため、試料の吸収スペクトルを今回設定した最大試料濃度で調製して測定した。図 2-23 に示した結果からわかるように、茶類の吸収はほとんど 400nm 以下であり、蛍光試薬 Fluo3 (Ex = 508nm、Em = 527nm) や、化学発光試薬 MCLA (Max465nm) の発光にはほとんど影響はないと確認された。

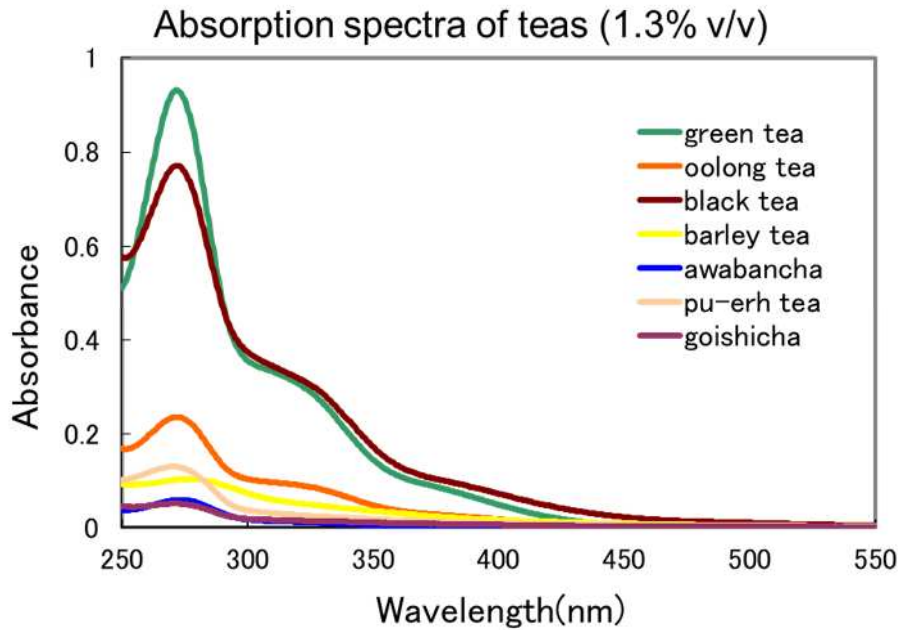
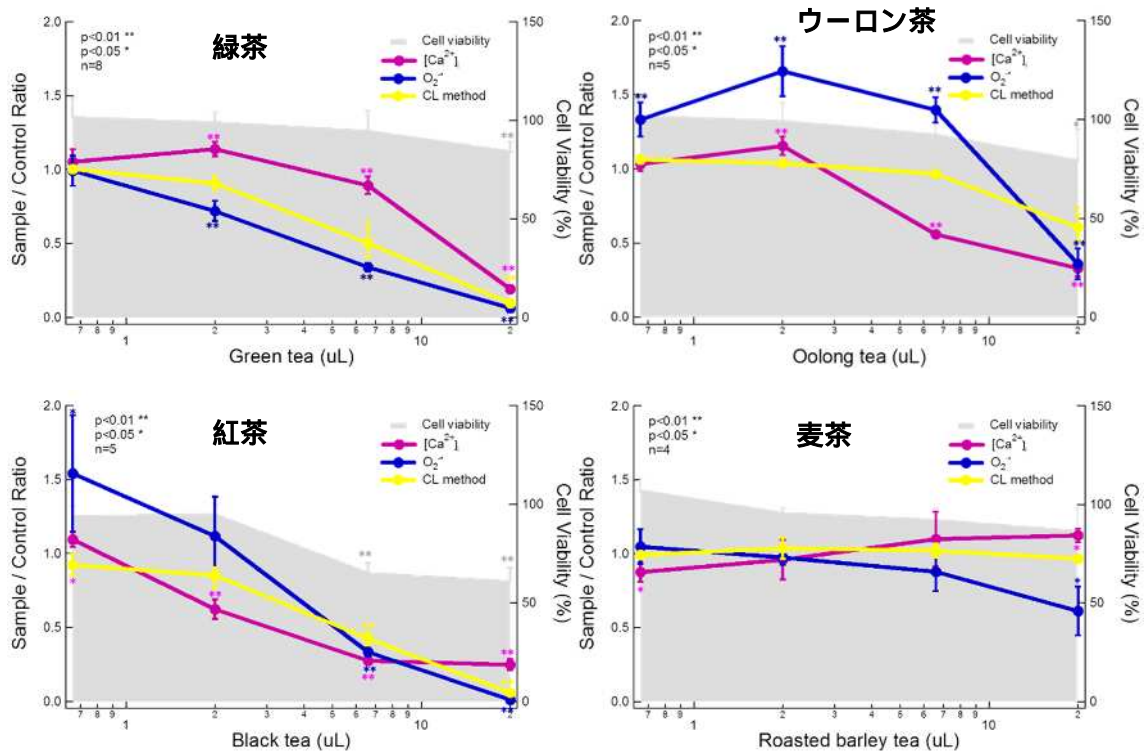


図 2-23 茶類の吸収スペクトル

同時測定、化学発光法、細胞毒性の結果を以下の図 2-24 に示した。横軸は茶類抽出物の添加量、縦軸（左）はピーク面積のコントロール比を其々プロットした。細胞毒性は、細胞生残率を縦軸（右）にプロットした。統計解析は、1 標本検定（一対の標本による平均の検定）で行い、コントロール値 1.0 と比較して、各値に有意差があるかを表している。



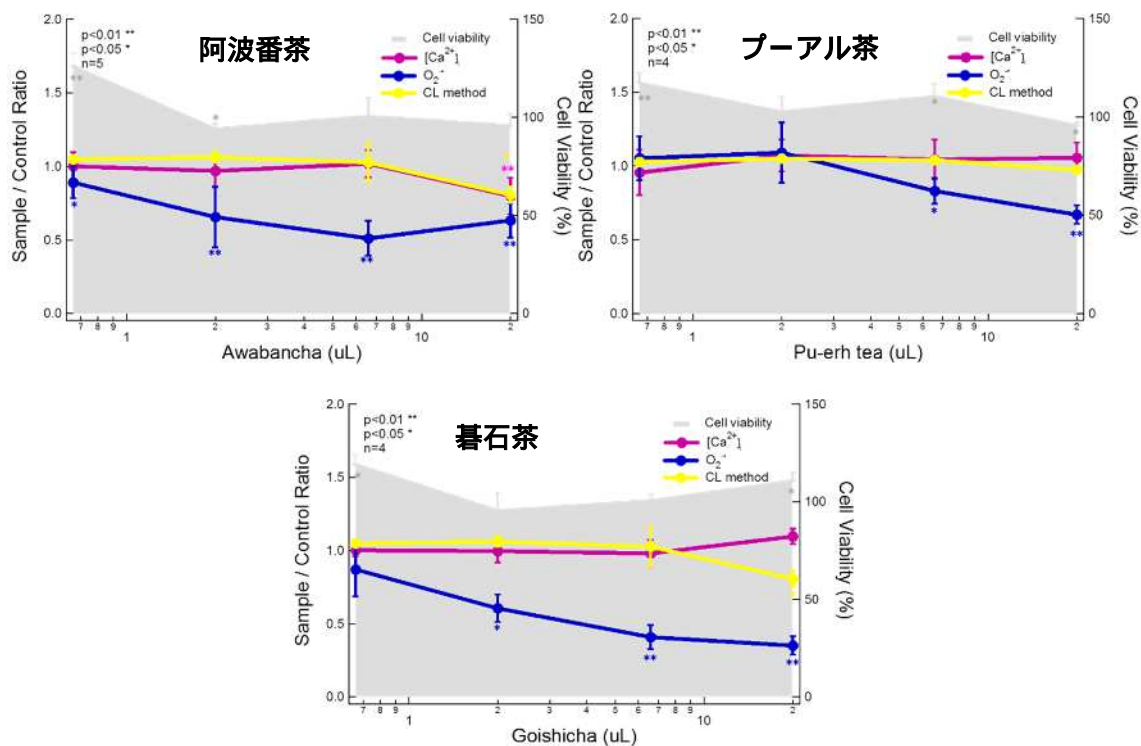


図 2-24 茶類の評価結果

抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験と化学発光法で算出された IC<sub>50</sub> 値を表 2-4 に示した。更に、一元配置分散分析法にて有意差検定を行った結果を、図 2-25 に示した。

表 2-4 IC<sub>50</sub> 値一覧表

	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (FL)	O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> (CL)	CL method
Green tea	11.6 ± 0.7	4.2 ± 0.5	6.6 ± 1.3
Oolong tea	9.9 ± 1.2	16.8 ± 2.1	N/A
Black tea	3.2 ± 0.5	4.9 ± 0.5	5.5 ± 0.6
Roasted barley tea	N/A	N/A	N/A
Awabancha	N/A	N/A	N/A
Pu-erh tea	N/A	N/A	N/A
Goishi tea	N/A	4.2 ± 2.1	N/A

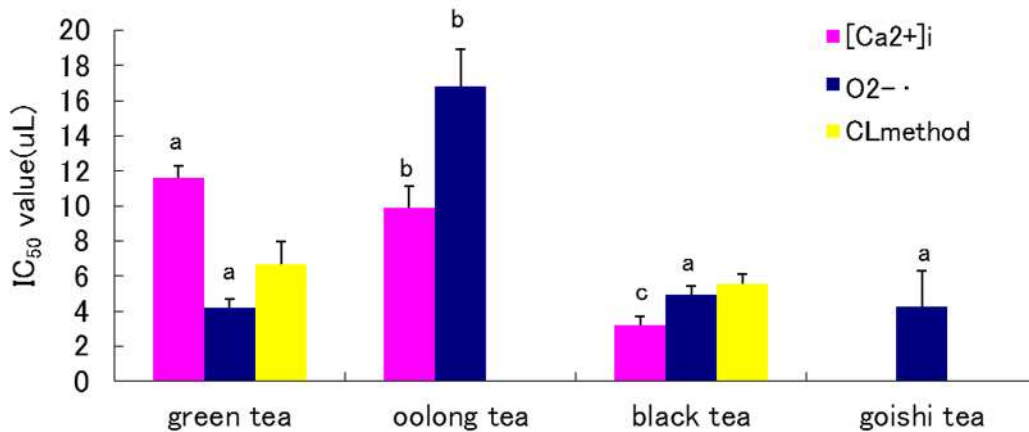


図 2-25 IC<sub>50</sub> 値の有意差検定結果

緑茶と紅茶についてのみ、抗酸化作用を表す化学発光法での IC<sub>50</sub> 値が算出された。また、緑茶、ウーロン茶、紅茶には、細胞内への Ca<sup>2+</sup>取り込みに影響を及ぼして O<sub>2</sub><sup>-·</sup>産生を抑制する、即ち抗炎症作用があることが示唆された。そして、緑茶、ウーロン茶と比較して紅茶のほうが有意にその作用は強かった。緑茶 ウーロン茶 紅茶と酸化発酵が進むにつれて、抗炎症作用を示す物質が産生されることが推測された。また、紅茶の高濃度域で強い細胞毒性がみられたことから、酸化発酵の進行により、細胞毒性を示す物質も産生されることが示唆された。これは、緑茶よりも紅茶のほうが高い抗菌活性を示すという報告 [43] と一致する結果である。ウーロン茶、紅茶の低濃度域で O<sub>2</sub><sup>-·</sup>産生を更新するような作用がみられたが、これは酸化発酵によって生じた最終糖化物 (AGEs: advanced glycation end products) の影響ではないかと考えている。ウーロン茶に比べて紅茶の方が低濃度で大きく影響が出ていることから、酸化発酵による茶葉の褐変の進行とともに、AGEs の量も増えていることが想像される。

茶外茶の麦茶、微生物嫌気発酵茶である阿波番茶と微生物好気発酵茶であるプーアル茶では、いずれも高い活性は見られず、細胞毒性もなかった。微生物二段発酵 (好気性カビ菌と嫌気性乳酸菌) 茶である碁石茶で、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇に関与しない部分での O<sub>2</sub><sup>-·</sup>産生を抑制する、即ち抗炎症作用と思われる結果が得られた。

今回の検討は、飲用した時の効果を推測するために、飲用に最適とされる各メーカーが推奨する方法で抽出液を調製した。そのため、各抽出液の濃度については統一されていない。そこで、化学発光法で得られた結果のみ、濃度で補正をして比較を試みた。

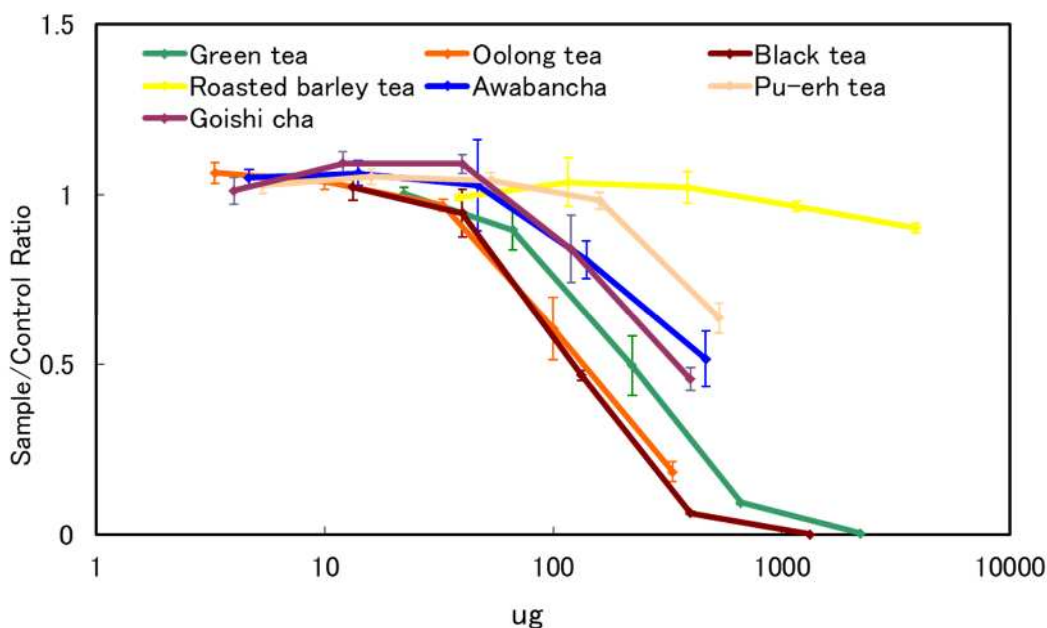


図 2-26 抽出液濃度で補正した化学発光法の結果

図 2-26 に示したグラフから、紅茶、ウーロン茶、緑茶の順に抗酸化活性が強いという結果が得られた。酸化発酵が進むと共に抗酸化活性が強くなっていることがわかった。ウーロン茶は、おいしく飲むためにはかなり薄い濃度（緑茶の約 1/7 の濃さ）で淹れることが推奨されており、そのため飲用に抽出した場合の活性が低くなっていた。

緑茶に多く含まれるカテキン類は、酸化発酵によりテアフラビン類、テアルビジン類に変わることが知られている。これらが紅茶の高い抗酸化活性に寄与していると考えられる。

今後、今回用いた 7 種類の茶類の HPLC による成分分析を行うと共に、テアルビジン、テアフラビン、ウーロン茶ポリフェノール類等の機能性を「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」や化学発光法により評価をしていく予定である。

## 2-6 本章のまとめ

微弱光検出技術と好中球の自然免疫反応を利用した「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」は、生体内で起こる実際の作用を再現して評価に利用しているものであり、また 3 つの機能性を同時に評価できるため、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結果が得られ、より生体内での効果に近い情報が得られると考えられる。これまでに、複数台の装置を試作販売し、また受託検査機関を介しての受託分析も実施してきた。利用例として、アントシアン類、ササクレヒトヨダケとその機能性成分、茶類を挙げたが、醤油仕込み液の経日変化、ヒスチジン関連ジペプチド、クルクミン類、フラボノイド類、マヌカはちみつ成分、新姫の成分 [44]、チョコ

レートポリフェノール類、染色体操作技術で創造した高機能性ネギ属野菜、ニンニク類、アスタキサンチン、輸血用血液評価 [45]、薬剤 [46]等、実に多くの物質の機能性評価に利用された実績がある。

更に、好中球における  $O_2^-$  産生を誘導する信号伝達がほぼ判明しているため、 $Ca^{2+}$  キレート剤や、 $IP_3$  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、被験物質の作用機序までも推定できる可能性を秘めている。筆者らは、作用機序の一端を解明する方法の一つとして、細胞質内への  $Ca^{2+}$  流入経路について、詳細な解析を可能とした方法を開発し [47]、生薬紫根の有効成分シコニンの作用を解明 [47]している。

また、蛍光・発光同時計測技術の好中球以外の細胞への適用も進めて、脳神経細胞の保護活性評価法 [48, 49]を開発し、セサミンの有効性を評価した結果が報告 [50]されている。血管内皮細胞の一酸化窒素産生を亢進する物質のスクリーニング方法 [51]も開発し、桜島大根の新たな機能性の発見にも貢献した。

## 第2章引用文献

- [1] Kazumura K, Sato Y, Satozono H, Koike T, Tsuchiya H, Hiramatsu M, Katsumata M, Okazaki S., "Simultaneous monitoring of superoxides and intracellular calcium ions in neutrophils by chemiluminescence and fluorescence: evaluation of action mechanisms of bioactive compounds in foods," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 84, p. 90–96, 2013.
- [2] 數村公子, "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," *生物工学会誌*, 第 卷 93, 第 6, pp. 356-358, 2015.
- [3] Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J., "HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 62, pp. 1201-1204, 1998.
- [4] Hirayama O, Takagi M, Hukumoto K, Katoh S., "Evaluation of Antioxidant Activity by chemiluminescence.," *Anal. Biochem.*, vol. 247, pp. 237-241, 1997.
- [5] Harada K, Okano C, Kadoguchi H, Okubo Y, Ando M, Kitao S, Tamura Y., "Peroxy radical scavenging capability of fish sauces measured by the chemiluminescence method.," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 12, pp. 621-625, 2003.
- [6] Nagatsuka N, Harada K, Ando M, Nagao K., "Measurement of the radical scavenging activity of chicken jelly soup, a part of the medicated diet, 'Yakuzen,' made from gelatin gel food 'Nikogori,' using chemiluminescence and electron spin resonance methods.," *Int. J. Mol. Med.*, 第 %1 卷 (全 %2 卷)18,, pp. 107-111, 2006,.
- [7] Maeda T, Komoda H, Tsujimura A, Ito T, Shimada T, Kitao S, Ando M, Tamura Y, Harada K, "Peroxy and hydroxyl radical scavenging activities of raw and processed sea urchins measured by chemiluminescence and electron spin resonance methods.," *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 43, pp. S567-S570., 2008,.
- [8] Wu X, Beecher G. R, Holden J. M, Haytowitz D. B, Gebhardt S. E, Prior R. L., "Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, pp. 4026-4037, 2004.
- [9] Noguchi M, Kimoto A, Gierse J. K, Walker M. C, Zweifel B. S, Nozaki K, Sasamata M., "Enzymologic and pharmacologic profile of loxoprofen sodium and its metabolites.," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 28, pp. 2075-2079, 2005.
- [10] Jaiswal S. R, Sontakke S. D., "Experimental evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of simvastatin and atorvastatin.," *Indian J. Pharmacol.*, vol. 44, pp. 475-479, 2012.
- [11] Bassoy, E.Y. Walch, M. Martinvalet, D., "Reactive Oxygen Species: Do They Play a Role in Adaptive Immunity?," *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 755856, 2021.



- [12] Nishida M, Kumagai Y, Ihara H, Fujii S, Motohashi M, Akaike T , "Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species," *Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 58, no. 2, pp. 91-98, 2016.
- [13] M. T, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *J. Immunol. Methods.*, 第 卷 65, 第 1-2, pp. 55-63, 1983.
- [14] Green L.M, Reade J.L, Ware C.F , 'Rapid colorimetric assay for cell viability : Application to the quantitation of cytotoxic and,' *J. Immunol. Methods*, 第 卷 70, p. 257-268, 1984.
- [15] Lo NB, Aaron GJ, Hess SY, Dossou NI, Guiro AT, Wade S, Brown KH, "Plasma zinc concentration responds to short-term zinc supplementation, but not zinc fortification, in young children in Senegal," *Am. J.Clin. Nutr.*, vol. 93, p. 1348-1355., 2011.
- [16] Kurasawa, R. Kubori, S. , "Zinc, Deficiency and its clinical features in the cases found in Kitamimaki, a rural area in Japan,," *Biomed. Res. Trace Elem.*, vol. 17, pp. 91-93, 2006.
- [17] Simchowit L, Mehta J, Spilberg I., "Chemotactic factor-induced generation of superoxide radicals by human neutrophils: effect of metabolic inhibitors and antiinflammatory drugs,," *Arthritis Rheum.*, vol. 22, pp. 755-763, 1979.
- [18] Du, J., Cullen, J.J. and Buettner, G.R. , "Ascorbic Acid Chemistry, Biology and the Treatment of Cancer.," *Biochimica et Biophysica Acta.*, vol. 1826, pp. 443-457, 2012.
- [19] Cooke M, Iosia M, Buford T, Shelmadine B, Hudson G, Kerksick C, Rasmussen C, Greenwood M, Leutholtz B, Willoughby D, Kreider R. , "Effects of acute and 14-day coenzyme Q10 supplementation on exercise performance in both trained and untrained individuals," *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, vol. 5, pp. 1-14, 2008.
- [20] Kawamura, M., Terasaka, O., Ebisawa T, Kondo I, Masaki E, Ahmed A, Kagata M., "Integrity of actin-network is involved in uridine 5 -triphosphate evoked store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in bovine adrenocortical fasciculata cells,," . *Pharmacol. Sci.*, vol. 91, pp. 23-33, 2003.
- [21] Manni ML, Tomai LP, Norris CA, Thomas LM, Kelley EE, Salter RD, Crapo JD, Chang LY, Watkins SC, Piganelli JD, Oury TD, "Extracellular superoxide dismutase in macrophages augments bacterial killing by promoting phagocytosis,," *Am. J. Pathol.*, vol. 178, pp. 2752-2759, 2011.
- [22] Johansson M.W, Holmblad T, Thornqvist P.-O, Cammarata M, Parrinello N, Soderhall K, "A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin a cell-adhesive peroxidase in crayfish," *J. Cell Sci.*, vol. 112, pp. 917-925, 1999.

- [23] M. C. Bustos, D. Rocha-Parra, I. Sampedro, S. dePascual-Teresa, A. E. León, "The influence of different air-drying conditions on bioactive compounds and antioxidant activity of berries," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 66, no. 11, pp. 2714-2723, 2018.
- [24] Kanno T, Kazumura K, Niwa T, Harada E, Miyake Y, Osawa T, "Evaluation of anti-inflammatory properties of hot water extract from *Coprinus comatus* using HL-60 and 3T3-L1 cells," *Jpn. J. Food Chem. Safety*, vol. 27, no. 2, pp. 53-59, 2020.
- [25] Zhao H, Zhang J, Liu X, Yang Q, Dong Y, Jia L., "The antioxidant activities of alkali-extractable polysaccharides from *Coprinus comatus* on alcohol-induced liver injury in mice.," *Sci. Rep.*, vol. 11695, pp. 1-12, 2018.
- [26] Rouhana A.T, Wasser S.P, Fares F., "The shaggy ink cap medicinal mushroom, *Coprinus comatus* (higher basidiomycetes) extract induces apoptosis in ovarian cancer cells via extrinsic and intrinsic apoptotic pathways.," *Int. J. Med. Mushrooms*, vol. 17, pp. 1127-1136, 2015.
- [27] Zhao S, Rong C.B, Kong C, Liu Y, Xu F, Miao Q.J, Wang S.X, Wang H.X, Zhang G.Q., "A novel laccase with potent antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from mycelia of mushroom *Coprinus comatus*.,," *BioMed. Res. Int.*, vol. 417461, pp. 1-8, 2014.
- [28] Silva D.D.D, Rapior,S, Hyde,K.D, Bahkali A.H, "Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus," *Fungal Diversity*, vol. 56, pp. 1-29, 2012.
- [29] Cohen N, Cohen J, Asatiani M.D, Varshney V.K, Yu H.T, Yang Y.C, Li Y.H, Mau J.L, Wasser S.P, "Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher basidiomycetes mushrooms.," *Int. J. Med. Mushrooms*, 第 卷 16, pp. 273-291, 2014.
- [30] Franzoni F., Colognato R., Galetta F., Laurenza I., Barsotti M., Di Stefano R., et al., "An *in vitro* study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox.," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 60, pp. 453-457, 2006.
- [31] Ito T, Kato M, Tsuchida H, Harada E, Niwa T, Osawa T, "Ergothioneine as an anti-oxidative/anti-inflammatory component in several edible mushrooms," *Food Sci. Technol. Res.*, vol. 17, pp. 103-110, 2011.
- [32] Li, B., Lu, F., Suo, X., Nan, H., Li, B., "Antioxidant properties of cap and stipe from *Coprinus comatus*.,," *Molecules*, vol. 15, pp. 1473-1486, 2010.
- [33] SENBA Y, NISHISHITA T, SAITO K, YOSHIOKA H, YOSHIOKA H, "Stopped-Flow and Spectrophotometric Study on Radical Scavenging by Tea Catechins and the Model Compounds," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 47, no. 10, pp. 1369-1374, 1999.

- [34] Umeda D, Tachibana H, Yamada K., "Epigallocatechin-3-O-gallate disrupts stress fibers and the contractile ring by reducing myosin regulatory light chain phosphorylation mediated through the target molecule 67kDa laminin receptor.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 333, pp. 628-635, 2005.
- [35] Fujimura, Y., Umeda, D., Kiyohara, Y., Sunada, Y., Yamada, K., and Tachibana, H, "The involvement of the 67 kDa laminin receptor-mediated modulation of cytoskeleton in the degranulation inhibition induced by epigallocatechin-3-O-gallate," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 348, pp. 524-531, 2006.
- [36] He RR, Chen L, Lin BH, Matsui Y, Yao XS, Kurihara H., "Beneficial effects of oolong tea consumption on diet-induced overweight and obese subjects," *Chin. J. Integr. Med*, vol. 15, pp. 34-41, 2009.
- [37] "Effects of Oolong tea polyphenols, EGCG, and EGCG3 Me on pancreatic - amylase activity *in vitro*," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, no. 39, pp. 9507-9514, 2014.
- [38] Lorenz M, Urban J, Engelhardt U, Baumann G, Stangl K, Stangl V, "Green and black tea are equally potent stimuli of NO production and vasodilation: new insights into tea ingredients involved," *Basic Res. Cardiol.*, vol. 104, p. 100–110, 2009.
- [39] Arab L, Liebeskind DS., "Tea, flavonoids and stroke in man and mouse," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 501, no. 1, pp. 31-36, 2010.
- [40] Hiasa M, Kurokawa M, Akita H, Harada M, Niki K, Ohta K, Shoji M, Echigo N, Kuzuhara T., "Suppression of increased blood glucose levels in mice by Awa-ban tea following oral administration of mono- and disaccharides," *J Funct. Foods*, vol. 8, pp. 188-192, 2014.
- [41] Lee L.K, Foo K.Y., "Recent advances on the beneficial use and health implications of Pu-Erh tea," *Food Res. Int.*, vol. 53, pp. 619-628, 2013.
- [42] Miyamura M, Moriyama H, Murata S, Yokota J, Yoshioka S, Takuma D, Hamada A, Nishioka Y, "Inhibitory effects of " Goishi-tea" as a post-fermented-tea on dietary-induced hypercholesteremia and atherosclerosis in rabbits," *The Pharm. Soc. Jpn*, vol. 128, no. 7, pp. 1037-1044, 2008.
- [43] Naderi NJ, Niakan M, KharaziFard MJ, Zardi S., "Antibacterial activity of Iranian green and black tea on streptococcus mutans: an *in vitro* study," *J. Dent. (Tehran)*, vol. 8, no. 2, pp. 55-59, 2011.
- [44] Miyake Y, Mochizuki M, Ito C, Kazumura K, Itoigawa M., "Estimation of bioactivity of seven aromatic compounds isolated from niihime fruit by simultaneously monitoring superoxide generation and intracellular calcium ion levels of neutrophils.," *Food Sci. Technol. Res.*, vol. 22, no. 5, pp. 713-718, 2016.

- [45] Saigo K, Hashimoto M, Jyokei Y, Takenokuchi M, Sugimoto T, Kazumura K, Tsuchiya H, Imoto S, Kumagai S., "Activation of human neutrophils by hemin.," *Rinsho Byori.*, vol. 56, no. 11, pp. 967-972, 2008.
- [46] Yang Y, Luo J, Kazumura K, Takeuchi K, Inui N, Hayashi H, Ohashi K, Watanabe H., "Cilostazol suppresses adhesion of human neutrophils to HUVECs stimulated by FMLP and its mechanisms.," *Life Sci.*, vol. 79, no. 7, pp. 629-636, 2006.
- [47] Kazumura K, Yoshida LS, Hara A, Tsuchiya H, Morishita N, Kawagishi H, Kakegawa T, Yuda Y, Takano-Ohmuro H., "Inhibition of neutrophil superoxide generation by shikonin is associated with suppression of cellular Ca<sup>(2+)</sup> fluxes.," *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 59, no. 1, pp. 1-9, 2016.
- [48] Wu Y, Kazumura K, Maruyama W, Osawa T, Naoi M., "Rasagiline and selegiline suppress calcium efflux from mitochondria by PK11195-induced opening of mitochondrial permeability transition pore: a novel anti-apoptotic function for neuroprotection.," *J. Neural Transm.*, vol. 122, no. 10, pp. 1399-1407, 2015.
- [49] Wu Y, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Osawa T, Naoi M., "Rasagiline prevents cyclosporine A-sensitive superoxide flashes induced by PK11195, the initial signal of mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis.," *J. Neural Transm.*, vol. 123, no. 5, pp. 491-494, 2016.
- [50] Wu Y, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Osawa T, Naoi M., "Phytochemicals prevent mitochondrial membrane permeabilization and protect SH-SY5Y cells against apoptosis induced by PK11195, a ligand for outer membrane translocator protein.," *J. Neural Transm.*, vol. 124, no. 1, pp. 89-98, 2016.
- [51] Kuroda R, Kazumura K, Ushikata M, Minami Y, Kajiya K., "Elucidating the Improvement in Vascular Endothelial Function from Sakurajima Daikon and Its Mechanism of Action: A Comparative Study with *Raphanus sativus*.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 66, no. 33, pp. 8714-8721, 2018.

## 第3章 *in vivo*法 ~ 極微量血液による好中球活性評価システム ~

食品の機能性評価として次に求められたのは、*in vitro*の細胞試験で効果が判明した食品について、摂取して本当に効果があるのかを判別できる方法である。そこで、血液中の好中球活性を簡便に評価できるシステムの開発に取り組んだことについて概説する。なお、本章の記述や図表の一部は筆者の研究 [1]から許可を得て転載 (©2018 Public Library of Science / CC-BY-4.0) している。

### 3-1 好中球活性評価システムの開発

#### 3-1-1 背景・目的

超高齢化が進む中、目指すべき「健康長寿社会」実現に向け、疾患発症を未然に防ぐ「未病ケア」や「予防」に大きな期待が寄せられている。新しい機能性表示制度も始まり、機能性食品市場は増加の一途を辿っている。機能性食品の開発や未病ケアの普及に貢献するためには、食や運動等の軽微な効果を、簡便に「見える化」できるシステムが必要だと考えた。筆者はこれまでに、好中球の細胞機能を利用した *in vitro* 食品機能性評価法を開発してきた (第 2 章参照)。自然免疫の最大の担い手である好中球は、体内で最も早く反応する細胞である。万病の元と言われている酸化ストレスや慢性疾患への関与も多数報告されている (第 1 章参照)。ヒトの診断を目的とした好中球活性を測る従来法は、血液の分離プロセス、煩雑な専門性が必要であった。そのため、正確性にも欠け、これまであまり普及してこなかった。被験者の負担を極力少なくし、簡単な操作で精度よく好中球活性が評価できるシステムが開発できれば、機能性食品や運動レシピの開発が進むだけでなく、未病ケアのモチベーション維持のツールになりえる。更に、このツールによる好中球活性計測結果の医学的根拠を明確にすることができれば、早期の異常検出が可能な手法となることも期待される。

*in vitro* 法で開発した  $O_2^{\cdot-}$  産生と  $[Ca^{2+}]_i$  変化を同時にモニターできるシステムを改良して、細胞から直接産生される活性酸素種  $O_2^{\cdot-}$  と、 $O_2^{\cdot-}$  より生成される  $OCI^-$  産生をモニターできるシステムの開発を目指すこととした。 $OCI^-$  は、より反応性が高く疾患との関連性が多数報告 (第 1 章参照) されている MPO の生成物であるからである。痛み少なく自己採血可能な少量の全血中の活性酸素種モニタリング法の開発について、概説する。

#### 3-1-2 発光試薬の選択と光学構成

$O_2^{\cdot-}$  産生は、従来通り化学発光試薬 MCLA (Em-Max 465 nm)、 $OCI^-$  産生は蛍光試薬、アミノフェニルフルオレセイン (APF: 五稜化薬製、Ex-Max 490 nm、Em-Max 515 nm) を用いることとした。これらの試薬に合わせて、LED を 470 nm、BPF を  $480 \pm 10$  nm、バンドリジェクションフィルターも励起光を効率よく除去できるように中心波長 488 nm に変更して光学系を最適化した。蛍光信号と化学発光信号の分離は、第 1 章で述べた

CFL-C2000 と同様に、励起光の ON/OFF を高速で繰り返すことにより、1 つの光電子増倍管 (PMT : H10682-210、浜松ホトニクス製) で実現した [2]。

### 3-1-3 試料容器の変更

血液 1  $\mu\text{L}$  中には、好中球はおよそ 5000 個程度存在している。 $\text{O}_2^{\cdot-}$  産生と  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化の細胞計測では、好中球細胞 1000 cells/mL でも何とか信号が検出できたことから、血液 3  $\mu\text{L}$  を 1500 mL で希釈した計測液でキュベットタイプの CFL-C2000 を用いて計測を試みたが、化学発光信号はほとんど検出できなかった。キュベットの光路長 10 mm では、赤血球や夾雑物による強い光吸収の影響を受けてしまうことが原因と考えられた。この問題を回避するため、試料容器としてスライドガラスを選択し、図 3-1 右、図 3-2 のように励起部と検出部を同じサイドに設置する構成を試みた。この構成により、光路長はキュベットと比較して 1/4 に短縮されることになる。

キュベットタイプの CFL-C2000 スライドガラスタイプで得られた化学発光データを比較した。キュベットでは全血を 750 倍希釈した場合に最も高い化学発光信号のピーク面積が得られ、これに対応するスライドガラス上の試料のデータは 500 倍希釈で得られたものであった。

試料容器として選択したスライドガラスは、サンプル液滴形状の安定性を確保するため、高撥水性材料 (松浪硝子工業製、特注品) のリムを印刷した円形領域 (直径 19 mm) を 2 箇所所有している。図 3-3a は、血液を含む混合試料をその上の所定の領域に撒いたものである。信号のクロストークが効果的に抑制されているため、隣接する 2 つの試料を同時に測定することができる (例: 被験試料と対照試料を測定する)。

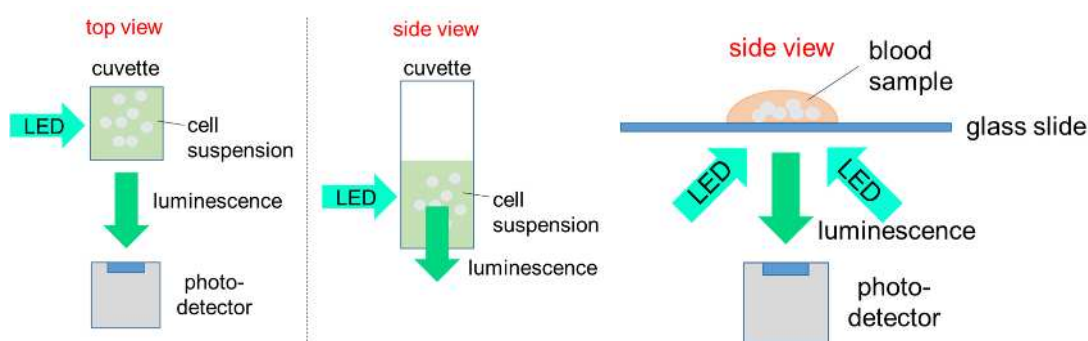


図 3-1 キュベットとプレパラートの検出ユニット構成 [1]

### 3-1-4 溶液の混合方法

本測定系では、好中球細胞に刺激剤を添加してそれを速やかに拡散させる必要がある。また血液試料の場合、血液の凝集を防ぐため、攪拌が必要となる。試料容器の底から光検出する構成でありまた試料懸濁液の厚さが薄いことから、攪拌子等の使用は不可能である。そこで気流での攪拌方法を考案した。図 3-2 に示すように、斜め上 2 箇所より空気を送る

方法である。この気流攪拌を効果的に行い、安定した光信号を得るために、気流の量、時間、方向を慎重に調整した。気流が強すぎると、液面の乱れにより蛍光信号強度が顕著に変動した。逆に、空気の流れがない場合や方向が適切でない場合は、添加した刺激剤の拡散が不十分となり、血球の凝集が起こるため、誤った測定結果となった（図 3-3c）。攪拌効率を微調整するために、無色の試薬の代わりに青色のインクを使用した。スライドグラス上の試料液に滴下したインクが図 3-4 のパネル 1~4 の順で拡散していく様子を示した。約 2 秒で均一に拡散し、実際に血液試料に滴下した刺激物は数秒で効率よく混合されることがわかった。図 3-3 b に計測後のスライドグラス上の血液を含むサンプル混合液の結果を示すが、血液の凝集もなく空気の流れによって十分に攪拌されていることがわかる。

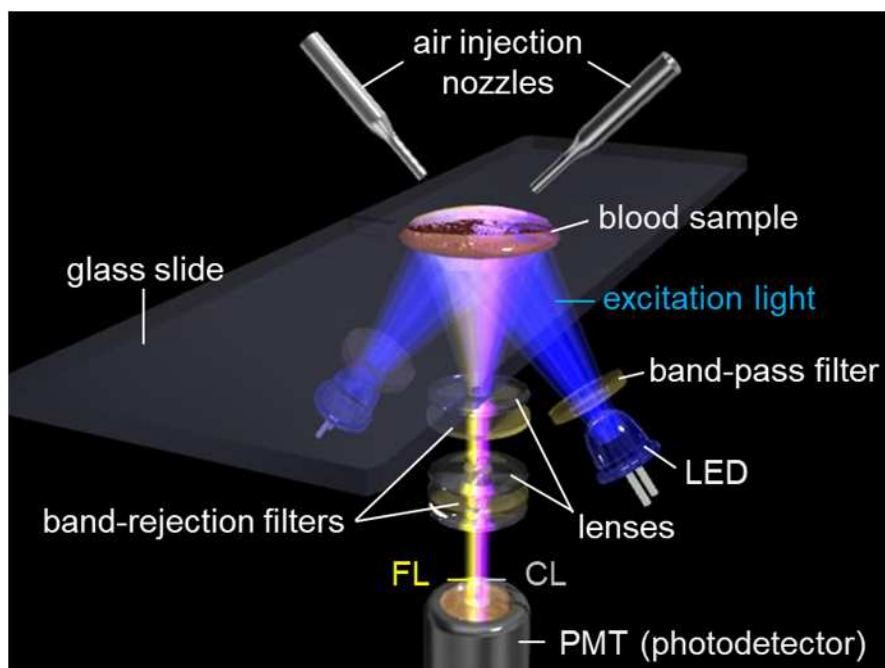


図 3-2 検出ユニットのイラスト図 [1]

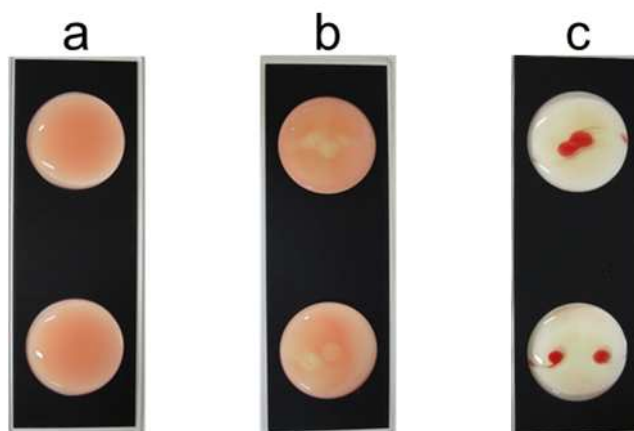


図 3-3 スライドグラス上の計測液 [1]

a : 計測前    b : 計測後    c : 計測後（攪拌不具合）

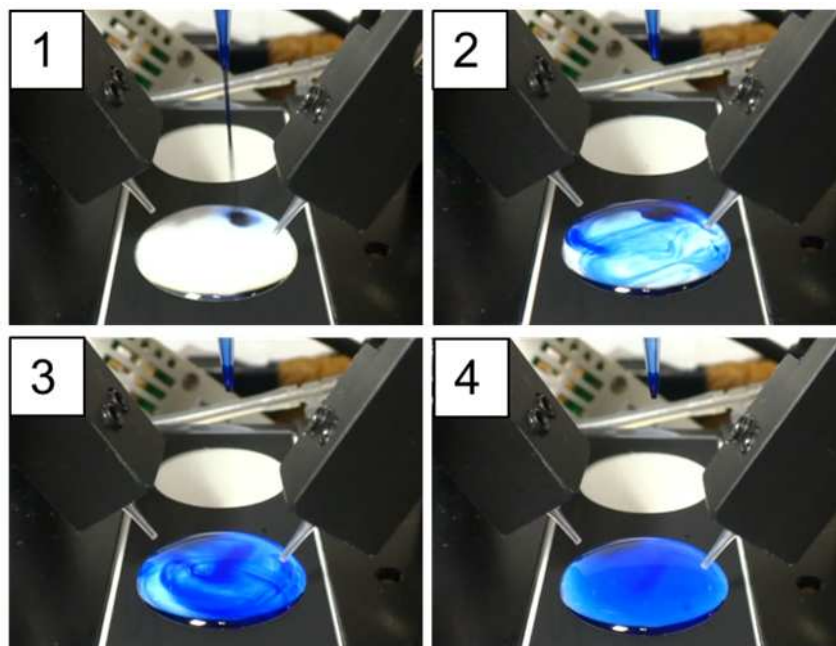


図 3-4 青インクの気流攪拌による拡散状況 [1]

### 3-1-5 チャンバー内の保湿及び保温機能

細胞の活性を評価するため、試料温度を 37 に保つ必要がある。測定チャンバーの内側に、温度を自動制御できるラバーヒーターを使用し、チャンバー内温度を一定に保つこととした。また、攪拌のための空気も加温する機構を設置した。30 分以上の計測時間中、気流攪拌をするため、試料懸濁液の蒸発を防ぐ必要も生じた。チャンバー内に加湿器を設置して、湿度 100% で計測が実施できる構成とした。

### 3-1-6 APF、MCLA による $O_2^{\cdot-}$ 、 $OCI^-$ モニタリングの整合性確認

先述した通り、細胞膜の NADPH オキシダーゼによって生成される細胞外  $O_2^{\cdot-}$  を測定するプローブとして、既報の通り MCLA を用いた [2]。MCLA は、リン酸緩衝液による自動酸化に由来する弱い非特異的発光を示すことが知られている [3]。この自動酸化を最小限に抑えるため、本システムでは RH バッファーを使用した。 $OCI^-$  の検出には、高反応性活性酸素の一部を累積的にモニターする蛍光プローブである APF を最初を選択した。APF は、 $-OH$ 、 $ONOO^-$ 、 $OCI^-$  などの hROS (高反応性活性酸素) によって酸化されると、蛍光化合物であるフルオレセインを選択的かつ用量依存的に放出するが、他の ROS では放出しない [4]。一方、類似の蛍光プローブである HPF は、 $-OH$ 、 $ONOO^-$  による酸化でフルオレセインを放出するが、 $OCI^-$  には反応しない [4]。従って、HPF と APF を併用することで  $OCI^-$  を特異的に検出することができる [4]。筆者らは、血液から単離した好中球\*の APF による蛍光信号と HPF による蛍光信号を比較した (試料調製方法は 3-1-7-1 のプロトコルを参照)。図 3-5 は、PMA 刺激した好中球で得られた蛍光信号から、PMA の溶



媒のみを添加して得られた蛍光信号（刺激剤が入っていないためコントロール）を差し引いた HPF と APF の両方の純増加量を示している。HPF の FL 増加量は APF より少なく、HPF の AUC は APF の AUC より 90.7%少なかった。

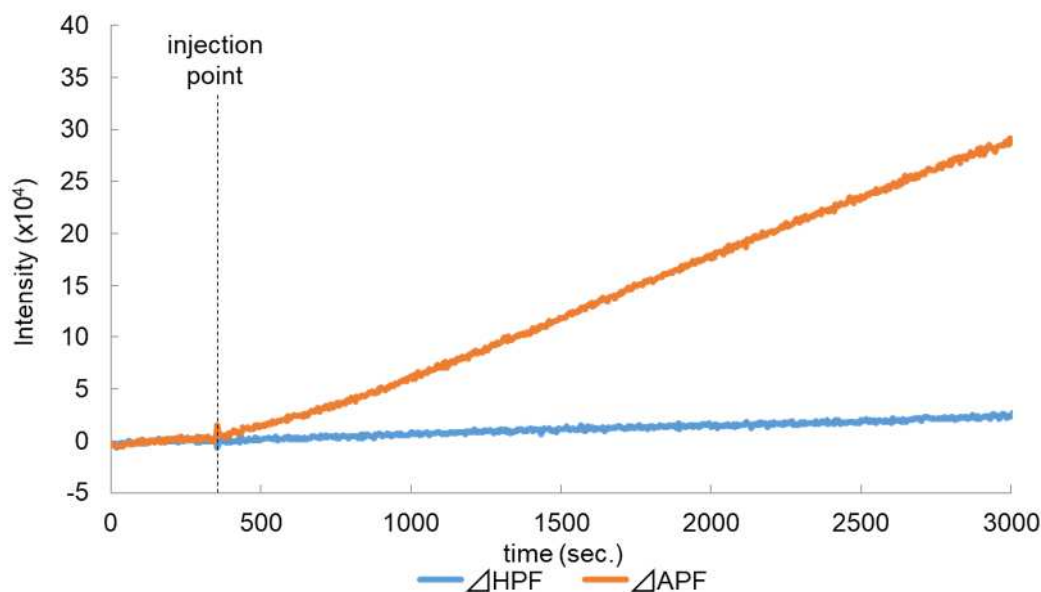


図 3-5 単離好中球懸濁液からの HPF と APF の蛍光信号 [1]

#### \* 全血からの好中球の単離方法

モノポリ分離培地（DS ファーマバイオメディカル製）を用いて、製造者の取扱説明書に従って、全血から好中球を分離した（若干の修正：血液と培地の両方の体積を縮小）。通常、525  $\mu\text{L}$  の抗凝固処理した血液を、微量遠心管（Thermo Fisher Scientific, Waltham）内の 450  $\mu\text{L}$  の Mono-Poly 分解培地にロードした。その後、血液サンプルをスイングローターで 400  $\times$  g で 20 分間、室温で遠心分離した。遠心分離したチューブ内の中間の白い層（好中球を含む層）を慎重に回収し、750  $\mu\text{L}$  の RH バッファーで 1 回洗浄し、再度遠心分離し、最後に 4 の冷 RH バッファーに溶解させて細胞懸濁液とし、計測に供した。

次に、培養した HL-60 由来の好中球様細胞（細胞調製法は第 2 章参照）から MCLA による化学発光と APF による蛍光を測定した（試料調製方法は 3-1-2-6 の計測液調製方法を参照）。図 3-6 は、刺激直後（点線）、化学発光強度が瞬間的に上昇し、その後すぐにベースラインレベルに戻ったことを示している（図 3-6、黒線）。このパターンは、以前に報告されたものとほぼ同じであった [2,5]。このシグナルが発生した  $\text{O}_2^{\cdot-}$  に起因するものかどうかを調べるために、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD：和光純薬）を添加して  $\text{O}_2^{\cdot-}$  を消去して信号量の変化を確認した。3 種類の濃度の SOD を添加すると、化学発光強度は用量依存的に有意に減少した（図 3-6、青色系統の線）。化学発光信号の一過性の増加とは対照的に、蛍光強度は APF の酸化によって徐々に蓄積されたことを示すプロファイルとなった（図 3-7、黒線）。同様に、この信号が MPO によって生成された  $\text{OCI}$  に起因する

かどうかを調べるために、MPO 特異的阻害剤である 4-アミノ安息香酸ヒドラジド (ABAH : Sigma-Aldrich) を添加した [6, 7]。3 種類の濃度の ABAH を添加すると、予想通り 蛍光強度が用量依存的に著しく減少した ( 図 3-7、赤色系統の線 )。

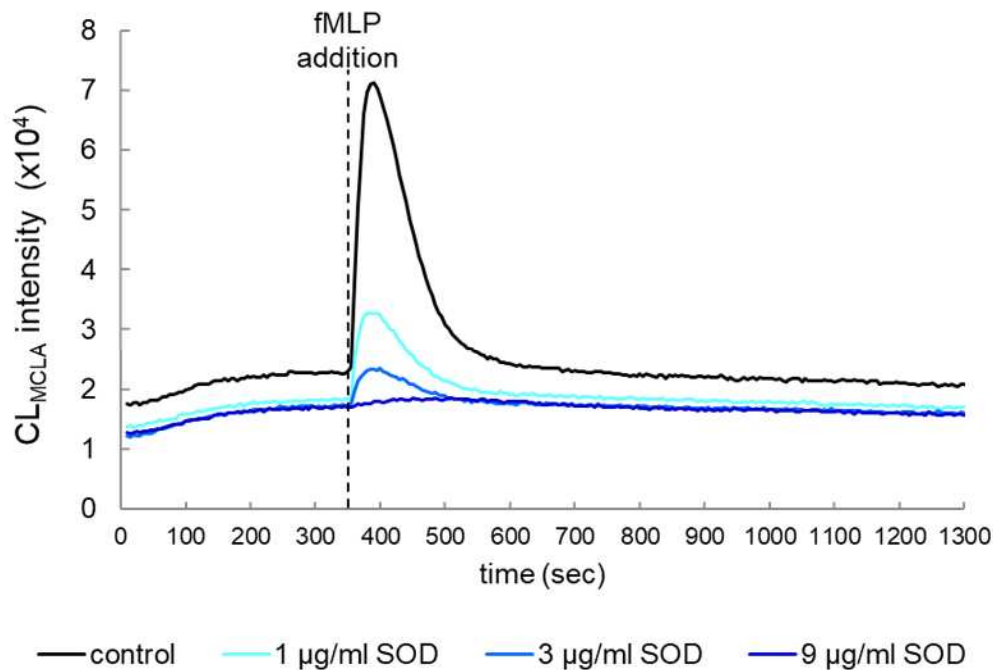


図 3-6 好中球様細胞懸濁液からの化学発光信号と SOD による阻害 [1]

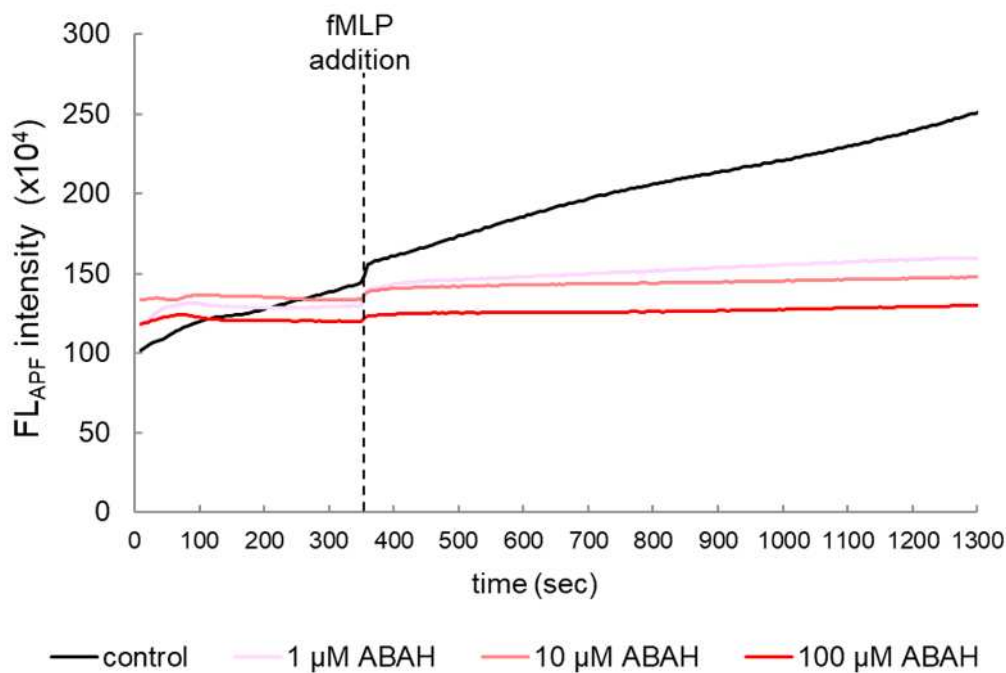


図 3-7 好中球様細胞懸濁液からの FL 信号と ABAH による阻害 [1]

### 3-1-7 極微量全血による O<sub>2</sub><sup>•</sup> 産生と OCl<sup>-</sup> 産生の同時計測

#### 3-1-7-1 全血試料での O<sub>2</sub><sup>•</sup> 産生と OCl<sup>-</sup> 産生の同時計測プロトコール

全血を試料として O<sub>2</sub><sup>•</sup> 産生と OCl<sup>-</sup> 産生を同時計測のプロトコールを検討し、以下の様に決定した (表 3-1)。刺激物質として fMLP の代わりに PMA を用いたのは、fMLP よりも PMA の方が好中球を刺激する効果が高いことが判明したからである。血液サンプルは、ボランティアの指先から採取し、室温で保存した\*。

#### \* 血液採取

インフォームドコンセントを得た後、ランセット (Becton, Dickinson and Company, または Nipro,) を用いてボランティアが指先から自己採血した。血液は、血液凝固防止用に内側が K<sub>2</sub>EDTA でコーティングされた BD Microtainer Tubes (Becton, Dickinson and Company) に入れて室温で保存した。採取後 2 時間以内に使用した。採血を伴う実験はすべて、浜松ホトニクス株式会社の研究倫理委員会のガイドラインに遵守して行い、同委員会から番号 H-86(57) で承認を得た。

#### < 全血計測液調製プロトコール >

表 3-1 使用する試薬の使用量及び濃度

Reagent	Stock conc.	Volume (μL)	Final conc.
RHB	-	466 ~467.5	-
MCLA	50 μM	5	0.5 μM
CaCl <sub>2</sub>	100 mM	5	1 mM
APF	5 mM	1	10 μM
ABAH	10 mM	5	100 μM
SOD	300 μg/mL	15	9 μg/mL
Blood	-	1.5 ~3	~1/167
PMA	5 μM	10	0.1 μM

- 0.5 μM MCLA、10 μM APF、1 mM CaCl<sub>2</sub> を含む RH バッファーを専用スライドグラス上にプレインキュベーションした。
- 37 °C で 2 分間インキュベートする。
- 陰性対照試料については、スライド上の溶液に SOD と ABAH を添加する。  
O<sub>2</sub><sup>•</sup> スカベンジャー : SOD (9 μg/mL)、MPO 特異的阻害剤 : ABAH (100 μM) 添加
- 全血又は分離好中球 1 × 10<sup>4</sup> 個、好中球様細胞 2 × 10<sup>4</sup> 個の懸濁液を 1.5 ~ 3 μL 添加する。
- 穏やかなピペティングで溶液を撹拌する。
- スライドグラスを装置にセットする。
- 装置内で 30 秒間インキュベートする。
- 測定を開始する。
- fMLP または PMA を自動添加し、サンプル細胞を刺激する。

10 化学発光信号と蛍光信号を同時に記録する。

11. 専用ソフトウェアと Excel によるデータ解析を実施。化学発光信号と蛍光信号の刺激による増強分は、曲線下のピーク面積 (AUC) を計算することで決定した [2]。

### 3-1-7-2 全血試料での $O_2^{\cdot-}$ 産生と $OCI^-$ 産生の同時計測

図 3-8a は、化学発光 (青色と淡青色の線) と蛍光 (赤色とピンク色の線) の典型的なタイムコースで、左縦軸が化学発光強度、右縦軸が蛍光強度を示している。化学発光信号は PMA 刺激後 90 秒頃からゆっくりと増加し始め、その後徐々に減少した (図 3-8a、青線)。この増加は、SOD 存在下での化学発光を観察することにより、全血計測液中に発生した  $O_2^{\cdot-}$  に対応していることが確認できた [8, 9, 10] (図 3-8a、淡い青線)。一方、蛍光信号の連続的な増加は PMA 刺激後 320 秒付近、即ち化学発光信号のピーク点付近から始まっていることがわかる (図 3-8a、赤線)。ABAH 阻害実験により、蛍光信号の増加が  $OCI^-$  産生に起因することが確認された [6, 7]。ABAH による抑制は約 600 秒で顕著になった (図 3-8a、ピンク色の線)。次に、これらの結果の化学発光信号と蛍光信号の AUC を算出したところ、SOD 存在下での化学発光信号の AUC は非存在下と比較して 97.9% 減少し (図 3-8b、右列)、ABAH 存在下での蛍光信号の AUC は 98.3% 減少していた (図 3-8b、左列)。

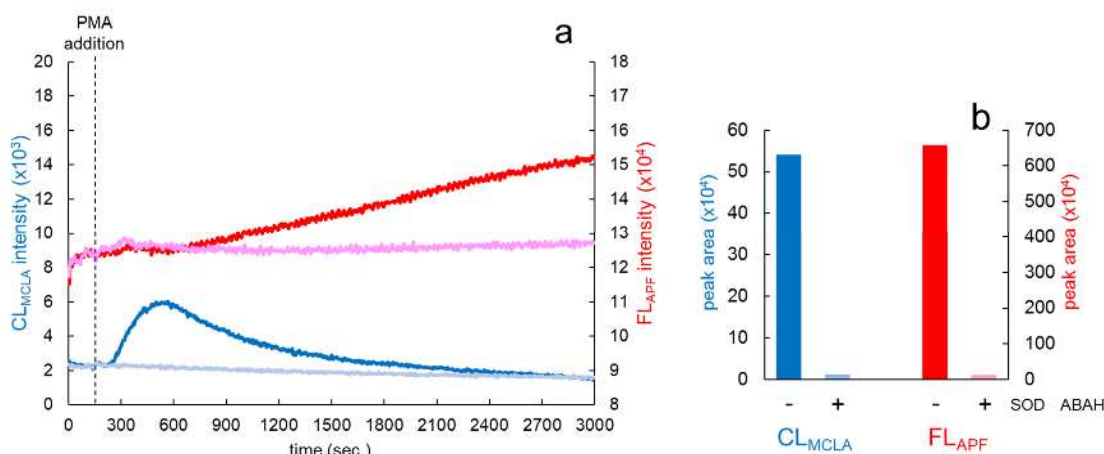


図 3-8 全血計測液からの化学発光と蛍光 阻害剤添加試料との比較 [1]

### 3-1-7-3 全血計測液への $O_2^{\cdot-}$ と $OCI^-$ 添加と化学発光及び蛍光信号との関係検証

次に、ヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ機構 [2, 5] を用いて、全血計測液中に  $O_2^{\cdot-}$  が独立して発生する場合に化学発光信号が増加するかどうかを検証した (図 3-9)。  $O_2^{\cdot-}$  は、ヒポキサンチン (0, 0.1, 0.2 nM) を共存させた全血計測液にキサンチンオキシダーゼ (67 ユニット) を加えて生成した [5]。キサンチンオキシダーゼと上記濃度のヒポキサンチンを上記計測液に添加すると、化学発光信号の AUC は用量依存的に増加した (図 3-9 4 と 5)。更に、ヒポキサンチンを含まない (0 nM) 全血計測液にキサンチンオキシダーゼのみを添加した際、顕著な化学発光信号が検出された (図 3-9、3) ことから、既に血液試

料中にある程度のヒポキサンチンが含まれていることが示唆された。また、全血計測液に OCl<sup>-</sup>（6 種類の濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液）を添加すると、添加した OCl<sup>-</sup>濃度に比例した蛍光信号の AUC の増加と、明確な直線相関が認められた（図 3-10、R=0.9979）。

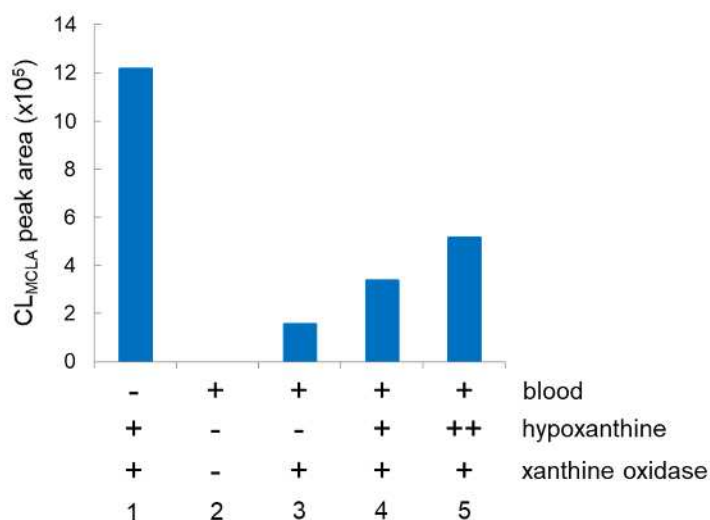


図 3-9 全血計測液における O<sub>2</sub><sup>•-</sup>増加と化学発光信号との関係 [1]

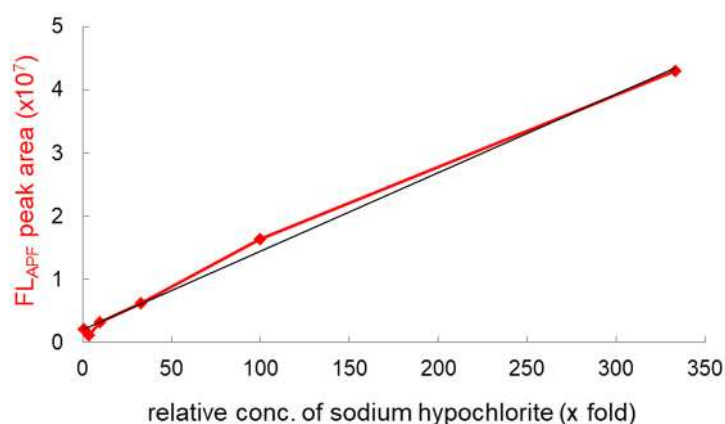


図 3-10 全血計測液における OCl<sup>-</sup>増加と蛍光信号との関係 [1]

### 3-1-7-4 全血計測液における O<sub>2</sub><sup>•-</sup>産生と OCl<sup>-</sup>産生計測の再現性

次に、1 名のボランティアから採取した血液で調製した 4 つの全血計測液でデータの再現性を検証した（血液採取後 2 時間以内に全ての計測を実施）。図 3-11 は、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>産生（青系統の線）と OCl<sup>-</sup>産生（赤系統の線）の時間経過を示す（蛍光信号のベースラインの高さは、4 つの独立した実験が同じレベルで始まるように調整した）。線の色の明るさは測定の順番を表している（明るい方が新しい）。再現性は非常に高く、4 つのタイムコースはほぼ重なり合っていた（図 3-11a）。O<sub>2</sub><sup>•-</sup>産生と OCl<sup>-</sup>産生の 4 つのタイムコースの AUC をすべ

て算出した。得られた 4 つの AUC の相対誤差は OCI 産生が 7.94%、 $O_2^{\cdot-}$ 産生が 7.06% であった (図 3-11b)。

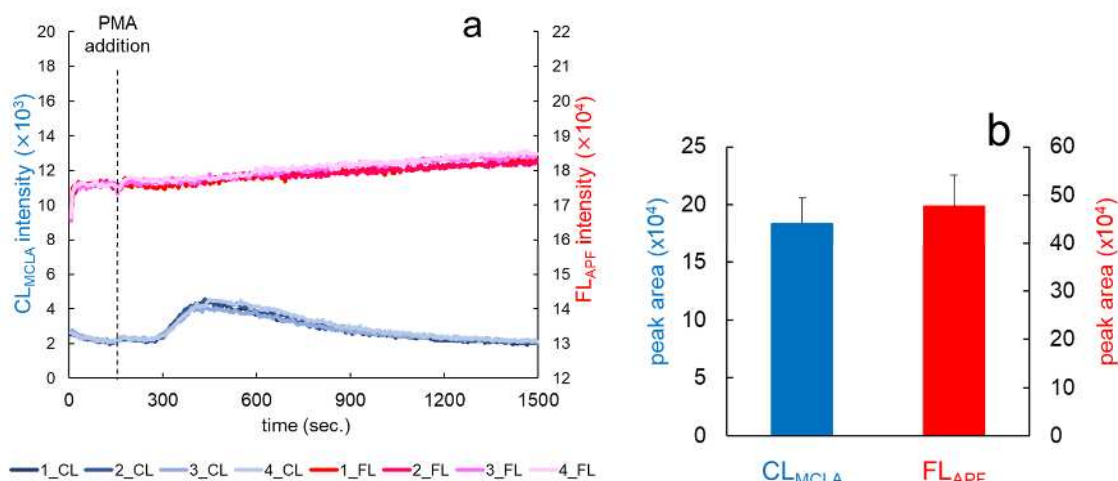


図 3-11 全血計測液における  $O_2^{\cdot-}$ 産生と OCI 産生計測の再現性 [1]

### 3-1-8 全血計測液における $O_2^{\cdot-}$ 産生と OCI 産生計測結果の相関性検討

次に、3 人の健康なボランティアから採取した血液由来の  $O_2^{\cdot-}$ 産生と OCI 産生の相関解析を実施した。解析は、(1) 全血計測液から得られた AUC、(2) 血液試料の分離好中球から得られた AUC、(3) 血液試料の好中球濃度 という 3 つの観点に着目して行った。健康なボランティアから 12 時間の絶食後に血液試料を採取し、その後、好中球を単離した (単離方法は 3-1-6 参照)。血液試料中及び単離好中球懸濁液の好中球濃度は、Pentra MS CRP (堀場製作所製) を用いて、メーカーの説明書に従って測定した。単離好中球懸濁液は、平均 73.23% (16 回の実験) 好中球が存在していた。顕微鏡による直接観察でも再確認した。

まず、全血計測液と単離した好中球懸濁液で計測を行って得られた結果の相関を検証した。ボランティアから得た同量の全血 (3  $\mu$ L) 及び同数の単離好中球 ( $1 \times 10^4$  個) を用いて、其々計測液を調製し、 $O_2^{\cdot-}$ 産生と OCI 産生を計測した。図 3-12a および b はその散布図であり、全血計測液から得られた AUC (横軸) と単離好中球懸濁液から得られた AUC (縦軸) の間の相関を示した。 $O_2^{\cdot-}$ 産生 (図 3-12a、 $R=0.981$ )、OCI 産生 (図 3-12、 $R=0.990$ ) とともに明確な線形相関が認められた。また、全血計測液から得られた AUC が、其々の血液試料中の好中球濃度と相関があるかについても検討した。図 3-12c と d は、全血計測液から得られた AUC (横軸) と各血液試料中の好中球濃度 (縦軸) の相関を示した散布図である。 $O_2^{\cdot-}$ 産生 (図 3-12c、 $R=0.991$ )、OCI 産生 (図 3-12d、 $R=0.993$ ) とともに、ここでも明確な線形相関が見いだされた。次に、血液試料中の好中球濃度を利用して、単離した好中球を  $1 \times 10^4$  個懸濁した計測液で得られた AUC (図 3-12a および b の縦軸) を各全血計測液中に含まれる好中球数から得られた AUC に換算した結果を図 3-12e および f

の縦軸にプロットし、全血計測液から得られた AUC (図 3-12e および f の横軸) との相関を検討した。明らかに、 $O_2^{\cdot-}$  産生 (図 3-12e、 $R=0.996$ ) と  $OCI$  産生 (図 3-12f、 $R=0.999$ ) の両方で最も優勢な相関が見出された。

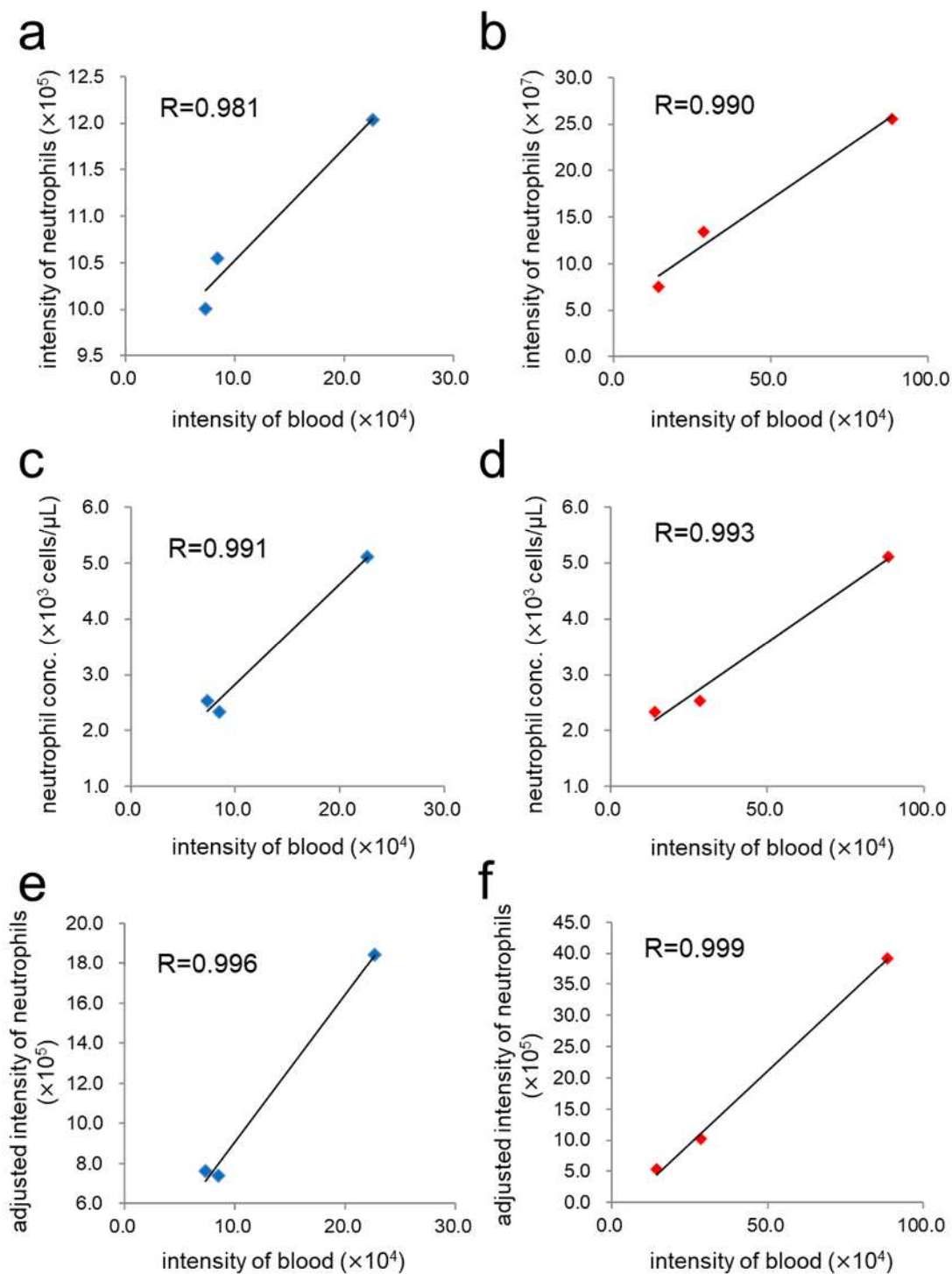


図 3-12 全血計測液と単離好中球懸濁液・好中球数・好中球数を合せた単離好中球懸濁液との  $O_2^{\cdot-}$  産生と  $OCI$  産生計測の相関性 [1]

$O_2\cdot$ 産生と  $OCI\cdot$ 産生の信号量が、好中球の濃度依存的に増加するかどうか確認するために、全血計測液に高濃度の新鮮な単離好中球懸濁液を追加した（図 3-13）。全血計測液中に潜在的な干渉因子が含まれていた場合、単離好中球追加による線形応答は見られないことになる。結果は、 $O_2\cdot$ 産生（図 3-13、 $R=0.995$ ）と  $OCI\cdot$ 産生（図 3-13、 $R=0.970$ ）の両方で明確な線形相関があることが示された。

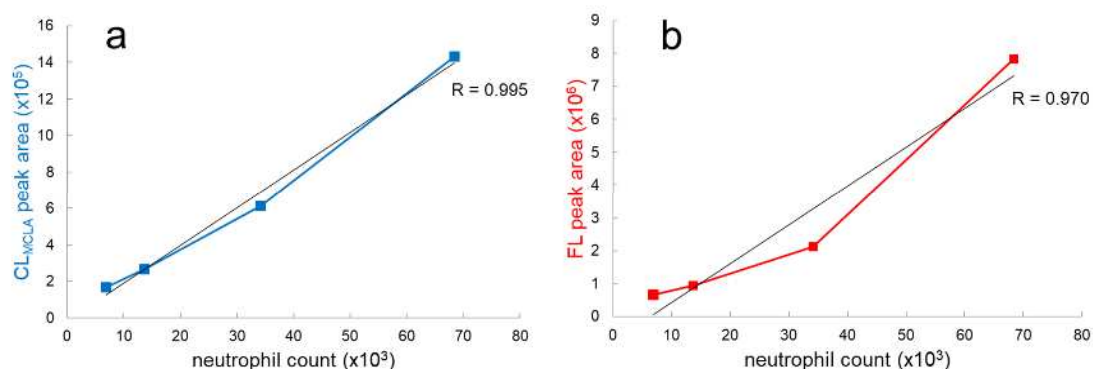


図 3-13 全血計測液へ単離好中球追加による  $O_2\cdot$ 産生と  $OCI\cdot$ 産生の線形応答 [1]

### 3-1-9 食事と運動が $O_2\cdot$ 産生と $OCI\cdot$ 産生に及ぼす影響：ボランティアによる酸化ストレスのパイロットスタディ

開発した好中球活性評価システムは、血中の  $O_2\cdot$ 産生や  $OCI\cdot$ 産生に影響を与える様々な因子の評価に応用できる可能性がある。そこで、食事と運動がボランティア血液中の  $O_2\cdot$ 産生や  $OCI\cdot$ 産生に及ぼす影響について検討した。抗酸化物質を含む食品やサプリメントは、白血球の過剰活性化によって引き起こされる酸化ストレスに対抗することが期待される [2,5,11,12]。また、 $OCI\cdot$ 産生に関連する MPO 活性は運動 [13, 14, 15, 16]、加齢 [17, 18]、アルコール [19]、喫煙 [20] など様々な要因によって影響を受けることが報告されている。その中でも食事（= 食事摂取量）と運動は、日常生活で最も影響力のある因子とみなされているため、この 2 つを選択した。

まず、5 日間連続で食事前後の活性酸素  $O_2\cdot$ 産生および  $OCI\cdot$ 産生を比較した。採血時間は、(1) 12 時間以上の空腹時終了時（7：30 頃）、(2) 昼食後 1 時間以内（13：00 頃）である。昼食のメニューに制限は与えていない。図 3-14a（絶食終了時）および図 b（昼食後）は、 $O_2\cdot$ 産生の AUC（青）、 $OCI\cdot$ 産生の AUC（赤）および好中球濃度（緑）の日内変動を示している。図 3-14c 及び図 d は、 $O_2\cdot$ 産生又は  $OCI\cdot$ 産生の AUC（横軸、青： $O_2\cdot$ 産生、赤： $OCI\cdot$ 産生）と血液中の好中球濃度（縦軸）との相関を示す散布図である。空腹時は  $O_2\cdot$ 産生（ $R=0.866$ ） $OCI\cdot$ 産生（ $R=0.953$ ）ともに有意な線形相関が得られた（図 3-14c）。一方、食事摂取直後は  $O_2\cdot$ 産生（ $R=0.412$ ） $OCI\cdot$ 産生（ $R=0.638$ ）とも相関がやや悪くなった（図 3-14d）。相関係数低下の再現性を確認するために、別の健常者ボランティアで任意の 8 日間（3 週間以内）に同様の解析を行った。採血時間は、最初のボランティ



アに揃えて (1) 12 時間以上の絶食明け (10 時頃) (2) 昼食後 1 時間以内 (13 時頃) とした。同様に、食事摂取後は、 $O_2\cdot^-$  産生 ( $R=0.856$  0.447)  $OCI^-$  産生 ( $R=0.844$  0.512) とともに相関係数が低下した (図 3-14e、f)。

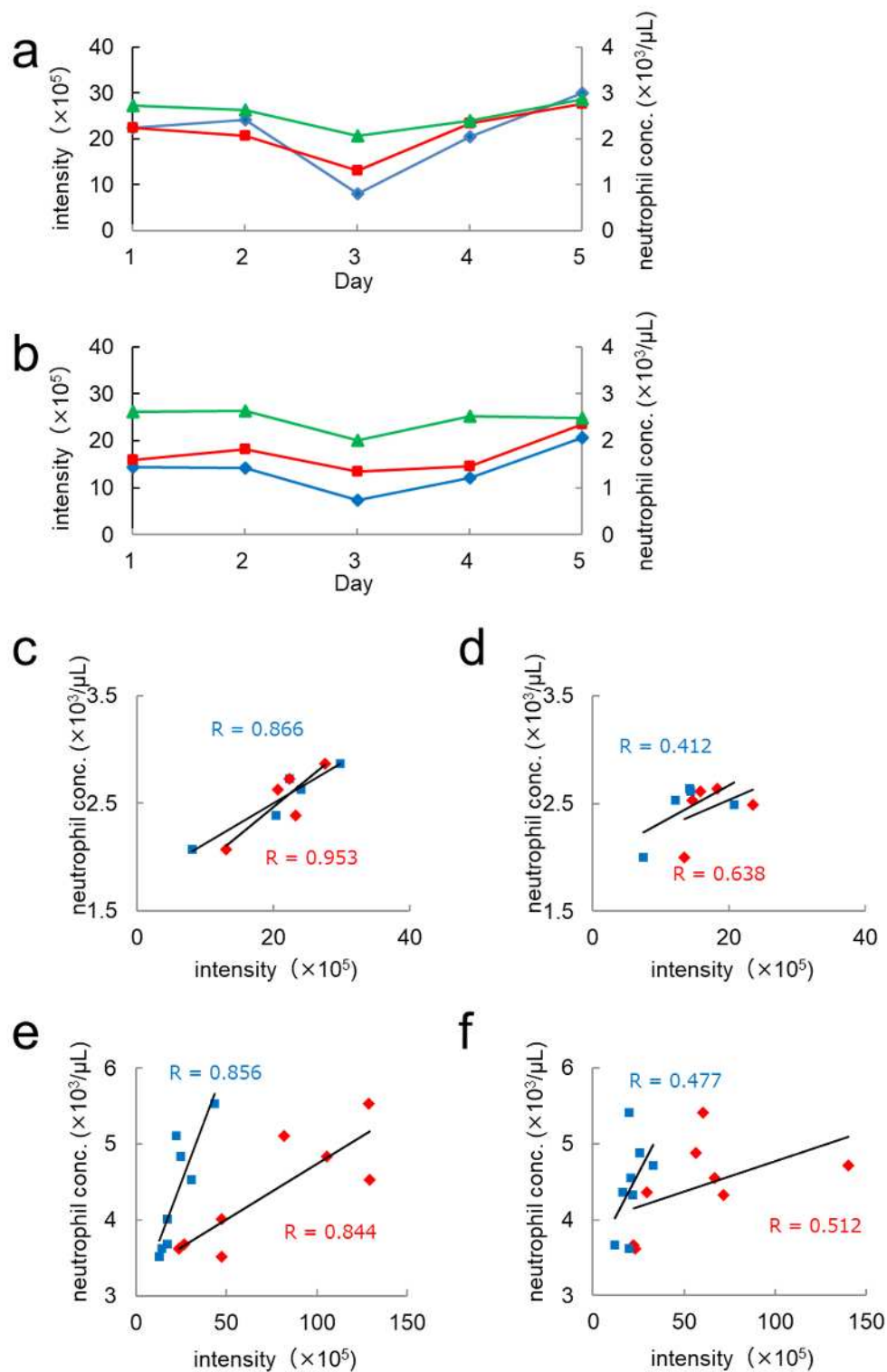


図 3-14 全血計測液による  $O_2\cdot^-$  産生と  $OCI^-$  産生に及ぼす摂食の影響 [1]

次に、運動直前と直後（10分以内）の全血計測液による  $O_2^{\cdot-}$  産生と  $OCI^-$  産生を 5 日間連続で実験した。この実験は、空腹状態（12 時間以上の絶食）で行った。5 日間のほぼ同時期に、運動として自転車に乗り、同じルートを約 20 分走行した。心拍数と血圧は、運動直後に常に高い値を示した。図 3-15 は、 $O_2^{\cdot-}$  産生または  $OCI^-$  産生の AUC（横軸、青： $O_2^{\cdot-}$  産生、赤： $OCI^-$  産生）と血液中の好中球濃度（縦軸）との相関を示す散布図である。運動前では、 $O_2^{\cdot-}$  産生（ $R=0.866$ ）、FLAPF（ $R=0.953$ ）ともに有意な線形相関が認められた（図 3-15a）。運動後では、 $O_2^{\cdot-}$  産生（ $R=0.584$ ）、 $OCI^-$  産生（ $R=0.150$ ）ともに相関が減少した（図 3-15b）。

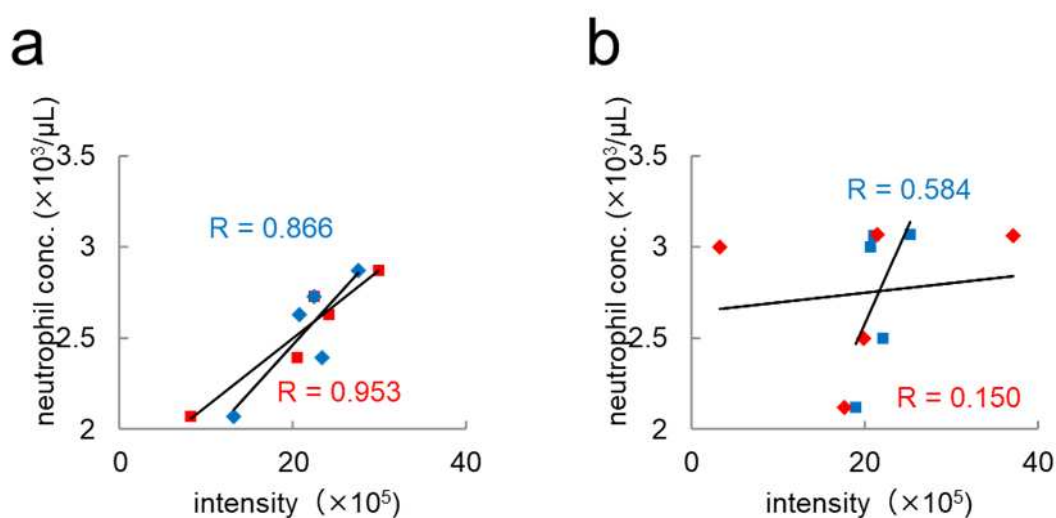


図 3-15 全血計測液による  $O_2^{\cdot-}$  産生と  $OCI^-$  産生に及ぼす運動の影響 [1]

### 3-1-10 考察

*in vitro* 法で開発した  $O_2^{\cdot-}$  産生と  $[Ca^{2+}]_i$  変化を同時にモニターできるシステム（CFL-C2000）[2,5]の光学系を継承しつつ他の部分を改良し、全血中の酸化ストレスの簡易・高精度モニターを目的とした新システムを開発した。極微量血液の主に白血球から放出される  $O_2^{\cdot-}$  産生と  $OCI^-$  産生を同時に検出できるように最適化した。更に、全血計測液を蒸発させることなく、効率的に試料を混合できる気流攪拌機構を搭載したことにより、 $O_2^{\cdot-}$  産生と  $OCI^-$  産生を長時間安定してモニター可能となった。

化学発光プローブである MCLA は、活性酸素の一つである  $O_2^{\cdot-}$  検出に一般的に使用されている [21, 22]が、MCLA は自己酸化により非特異的な弱い化学発光を放出することが知られている [8, 10]。また、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) と反応することも知られている。しかしこれらの発光信号は SOD によって消去されない [9]ため、 $O_2^{\cdot-}$  由来の発光信号と区別可能である。また、蛍光プローブである APF や HPF も活性酸素の検出に広く用いられている [4]。APF は  $OCI^-$ 、ヒドロキシルラジカル ( $-OH$ )、ペルオキシナイトライト ( $ONOO^{\cdot-}$ ) によって酸化され、蛍光分子であるフルオレセインを放出するが、HPF は  $-OH$  と  $ONOO^{\cdot-}$

よってのみ酸化され同じ分子のフルオレセインを放出することが知られている [4]。従って、OCIは APF と HPF の組み合わせで検出することができる [4]。

この新しい  $O_2^{\cdot-}$  産生と OCI 産生モニタリングシステム (CFL-P2200) により得られた結果は、少なくとも 4 つの重要な知見を示している。まず、 $O_2^{\cdot-}$  濃度を変化させる実験 (図 3-6、3-8、3-9) により、化学発光信号の増加 (AUC) が  $O_2^{\cdot-}$  に対応することが示された。特に、SOD による  $O_2^{\cdot-}$  消去が化学発光信号の増加の大部分を抑制するという結果は、好中球、好中球様培養細胞、全血計測試料由来の化学発光信号でモニターされた活性酸素のほとんどが  $O_2^{\cdot-}$  であることを明確に示している。

次に、2 種類の刺激物、fMLP と PMA は、全く異なる時間経過でこれらの細胞を活性化した (図 3-6 と 3-8)。PMA で刺激した細胞からの  $O_2^{\cdot-}$  産生開始時間は、fMLP で刺激した際の産生開始時間よりも遅かった。また、PMA で刺激した細胞の  $O_2^{\cdot-}$  産生時間は、fMLP の場合よりもはるかに長くピーク形状がブロードだった。これは、NADPH オキシダーゼを活性化するプロテインキナーゼ C の挙動が刺激剤により違うことを反映していると考えられる [23, 24]。これらの結果より、化学発光信号の上昇は、刺激を受けた白血球の NADPH オキシダーゼにより細胞外に産生された  $O_2^{\cdot-}$  が特異的に検出されたと考えられる。

第 3 に、APF 由来の蛍光信号は刺激剤添加により、蓄積的に増加していった。MPO 阻害剤である ABAH を加えて OCI の産生を抑制したところ APF 由来の蛍光信号の増加が抑えられ (図 3-7、3-8)、次亜塩素酸ナトリウム溶液の添加は、蛍光信号の AUC を用量依存的に増加させることがわかった (図 3-10)。OCI が変化すれば蛍光信号の AUC が変化することを確認した。また、単離好中球による検討において、蛍光試薬 HPF を使用した際の蛍光信号の増加は APF 由来の蛍光信号増加よりはるかに小さかった (図 3-5) ことから、単離好中球が生成する高反応性の活性酸素の大部分は OCI であることがわかった。全血を用いた場合でも、蛍光信号の増加の時間微分値は化学発光信号の増加の時間微分値よりも遅れて上昇を開始しており (データ未掲載)、また ABAH は APF 由来の蛍光信号の増加を有意に抑制したが (図 3-8)、HPF を使用した場合の信号増加は ABAH により抑制されなかった (データ未掲載)。これらのことから、全血でも蛍光信号の増加の大部分は MPO が産生する OCI に由来していることがわかった。

第 4 に、OCI の産生は、 $O_2^{\cdot-}$  産生より遅いことがわかった。瞬間的な OCI の産生は FL の時間微分 (即ち  $dFL/dt$ ) に比例する。図 3-7 の好中球様細胞で得られた蛍光信号の  $dFL/dt$  曲線から、刺激後約 400 秒を過ぎた辺りから信号増加が始まっており (データ未掲載)、それは明らかに 400 秒より前にある  $O_2^{\cdot-}$  産生のピーク (図 3-6 の化学発光曲線) より遅いことが確認された。これは、OCI が  $O_2^{\cdot-}$  より生じる二次生成物であることや、APF がファゴソームへ徐々に浸潤することを反映している可能性がある。

全血で得られた結果は、単離細胞で得られた結果よりも複雑な様であり、 $O_2^{\cdot-}$  と OCI の産生に関与しうる血中細胞を特定することを試みた。図 3-14 の全血と分離好中球の相関

結果から、今回の研究では全血計測液から得られた信号増加が、主に好中球に由来することが示唆された。実際、化学発光信号の AUC、蛍光信号の AUC とともに全血計測液に添加した好中球の数に比例しており（図 3-13）、好中球数に起因する化学発光と蛍光の割合を推定することができた。これは、観察された信号増加全体の約 90%であることがわかった。好中球に起因しない残りの 10%の信号増加は、まだ同定されていない高反応性活性酸素や未知のアーチファクトが含まれている可能性がある。

市販装置による白血球数の計測は非常に容易になったが、白血球数だけでは活性酸素の産生量を直接知ることはできない。白血球の過剰活性化による活性酸素の過剰産生は、様々な疾患との関連が指摘されている [25, 26]。また、活性酸素の産生は食事や運動などの要因によって変化することが報告されており [2,5,13,14,15,16]、これは本研究の結果（図 3-14、3-15）からも明らかである。従って、活性酸素を直接検出する方法を開発することは非常に重要であると考えられる。この目的のために、これまで多くの研究で全血から単離された好中球が用いられてきた [13]。しかし、好中球の分離にはいくつかの手順が必要であり、少なくとも数 mL の血液が必要である。更に、その手順が好中球にストレスを与える可能性があり、また血液中の好中球の挙動は、単離した好中球の挙動とは異なる可能性もある。本システムは、分離の必要なく 2 種類の活性酸素種を測定できるため、こうした問題を解決できると期待される。また、ある疾患のような特定の状況における、好中球以外の細胞（単球など）の ROS 産生をモニターすることもできる可能性がある [27]。このような酸化ストレスに起因する疾患を予防し、個人の体質を改善するためには、生体内の酸化状態のアンバランスを早期に発見することも重要である。

今回、全血で  $O_2^{\cdot-}$  産生と  $OCI^-$  産生のデュアルモニタリングが可能となったので、酸化ストレスの指標として、食事と運動が  $O_2^{\cdot-}$  産生と  $OCI^-$  産生に及ぼす影響についてパイロットスタディを実施した。その結果、食事（図 3-14）および運動（図 3-15）後に活性酸素産生量と好中球濃度との相関が低下しており、好中球数では酸化ストレスの全体像を把握できないことが示唆された。従って、本システムは、好中球数があまり変化しない場合にも活用できる可能性がある。図 3-14 の結果は、食品中のある種の機能性物質が血液中の酸化性物質と相互作用し、循環好中球の  $O_2^{\cdot-}$  産生と  $OCI^-$  産生を調節していることを示唆している可能性がある。図 3-15 の結果は、運動が、運動条件の日差によって、循環好中球の  $O_2^{\cdot-}$  産生と  $OCI^-$  産生を調節し [15]、血漿抗酸化活性の増強を誘導すること [16] を示唆しているのかもしれない。今後、より多くの被験者、固定食、定量的な運動による研究が必要である。

近年、MPO の過剰活性を示す様々なバイオマーカーが開発された [28, 29, 30]。これらは、酸化ストレスの「産物」ともいえるものであり、疾患症状の良い指標となる。一方、本システムで評価できるのは、酸化ストレスの「基質」ともいえる活性酸素や活性酸素産生量である。従って、このようなバイオマーカーと本システムを組み合わせることで、酸化ストレスのメカニズムやプロセスをより詳細に明らかにすることができる可能性がある。

今後、複数の疾患と活性酸素産生との詳細な関係を明らかにする予定である。

また、血液だけでなく、接着細胞など様々な細胞のモニタリングが容易に行えることも本システムの利点である。以前、接着性の神経細胞を剥離し浮遊させて従来のキュベットタイプ CFL-C2000 で活性酸素産生を計測したが [31]、開発した CFL-P2200 ではより簡単かつ効果的に計測することが可能である。また、本システムは光信号に非常に敏感であるため、筋肉細胞や神経細胞のように活性酸素を積極的に産生しない細胞にも適用できる可能性がある。その他、本システムは、ROS の検出に限らず、混濁したサンプルで 2 種類以上の光信号を同時計測することも原理的に可能である。しかしながら本システムは、空気流による攪拌の調節や露出した試料の取扱などに注意深い操作が必要である。抗酸化食品の選択や日常の体調管理などの疾病予防に貢献できるよう、今後ユーザビリティを向上したシステムの開発に取り組んでいく。

### 3-2 好中球活性評価システム CFL-P2200 の利用例

CFL-P2200 が利用された事例の一部を記載する。

#### 3-2-1 SAMP8 マウスに対する機能性成分（糖脂質 LPS）の経口投与の効果検証試験

本稿の記述や図表の一部は、筆者の共同研究 [32]から許可を得て転載（©2018 Public Library of Science / CC-BY-4.0）している。

SAMP8 (the Senescence Accelerated Mouse-Prone 8) マウスは、糖尿病の発症と並行して AD 様の病態と認知障害を示すことが実証されている [33]。Pantoea agglomerans 由来の糖脂質 LPS (LPSp) が、マウスのミクログリア細胞株およびマウス脳から分離した初代ミクログリアにおいて A<sub>1</sub>-42 ペプチドに対する貪食活性を著しく高めることが実証されている [34, 35]。また、LPSp はもともと小麦粉の水抽出物に含まれており、マウスに適度なマクロファージ活性化をもたらすことも報告されている [36]。更に LPSp の経口投与は、アトピー性皮膚炎 [37]、糖尿病 [38]、高脂血症 [39]に対して予防効果を発揮することが *in vivo* 研究で明らかにされている。そこで、SAMP8 マウスを用いて、機能性成分 LPSp の経口投与によるアルツハイマー発症抑制効果検証試験を実施した。

図 3-16 に実験スケジュールを示した。低脂肪食 (LFD ; 16.1 kJ/g、脂肪としてのエネルギーの 10%) 群 (NC : n=4) をコントロールとし、アルツハイマー病発症を促進させるために高脂肪食 (HFD ; 21.9 kJ/g、同 60%) を与えた群 (HFD : n=6)、高脂肪食と共に LPS を 0.3 と 1 mg/kg 体重 (BW) /日を与えた群 (両群ともに n=7) の 4 群に分けた。全ての群について、12 時間の明暗サイクル、温湿度管理下で、餌と水へのアクセスを制限しない条件で飼育した。17 週間後、学習と記憶評価のための Morris 水迷路試験 [40] を実施した。その後血液と脳を回収して、開発システムによる好中球活性評価と一般生化学検査、アミロイド (A<sub>β</sub>) 測定を行った。

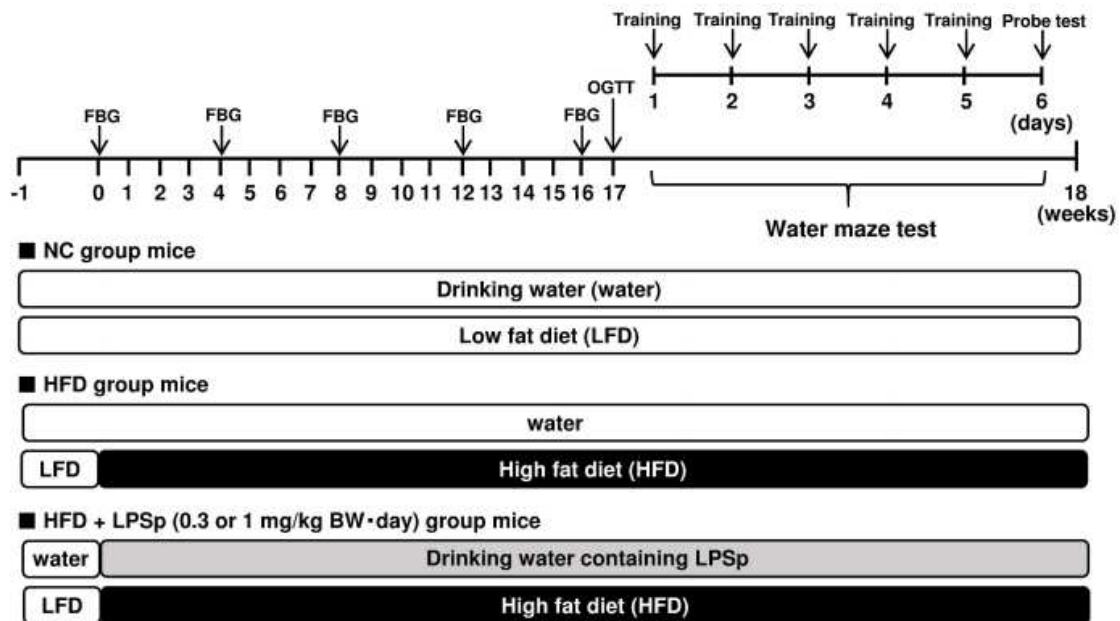


図 3-16 実験スケジュール [32]

今回行った水迷路試験は、トレーニング試験とプローブ試験からなっている。トレーニング試験は、マウスに円形プール内の水面下にあるプラットフォーム（安全地帯）の場所を探索、記憶させる試験（図 3-17）であり、プラットフォームに到達するまでの時間を評価した。プローブ試験では、プラットフォームを除去した状態でマウスを泳がせて（60 秒間水泳）、プラットフォームが置かれていたエリアでの滞在時間の長さを評価することで、学習機能を評価できる試験である。トレーニング試験は、1 日 4 回のトレーニングを 5 日間連続して行った。



図 3-17 水迷路試験

図 3-18 に水迷路試験の結果を示した。トレーニング日数が増加するに従って、プラットフォーム到達に要する時間が短縮されている（図 3-18B）ことから、トレーニング試験によって、マウスがプラットフォームの位置を記憶していることを確認した。なお、トレーニング試験において、高脂肪食投与あるいは LPSp 投与による学習機能への影響は認められなかった。プローブ試験はトレーニング試験終了日の翌日に実施した。任意の位置からマウスをプール内に入れ、60 秒間自由水泳させ、プールを 4 分割したエリア（図 3-18A）

のうちプラットフォームを置いていたエリアに滞在する時間を計測した。このエリアでの滞在時間が長いほど学習機能が良いと判断した。高脂肪食群で、滞在時間が明らかに減少した（図 3-18C）ことから、本実験での高脂肪食摂取 SAMP8 マウスは、認知機能（学習機能）が低下している、即ちアルツハイマー病を発症していることを従来法で実証した。一方、LPSp 投与により、滞在時間の延長（図 3-18C）が認められており、マウスの水泳軌跡からも、LPSp 投与による学習機能改善効果を実証した。

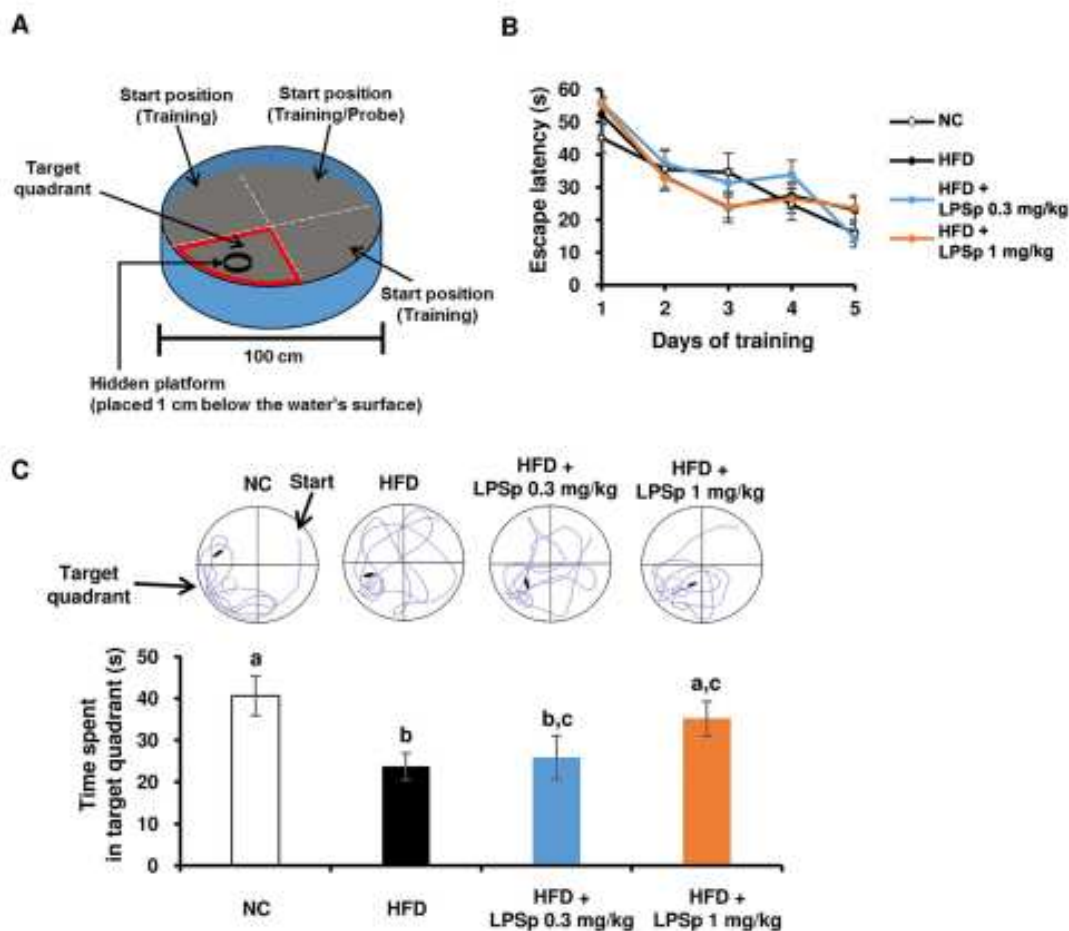


図 3-18 水迷路試験の結果 [32]

次に投与マウスの脳から A を抽出し、脳内の A 蓄積量を評価した結果を図 3-19 に示した。

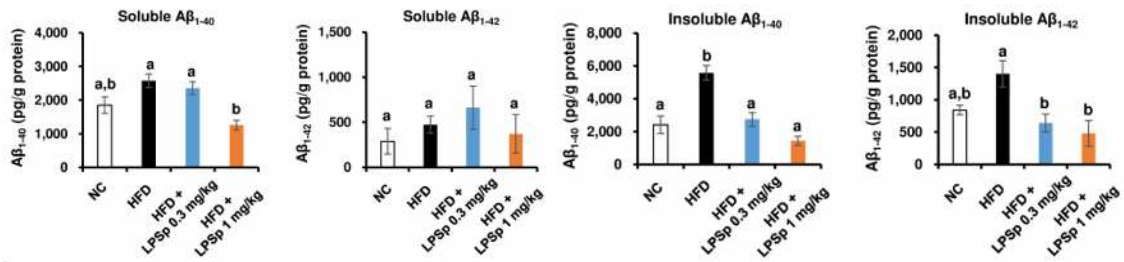


図 3-19 脳内 A $\beta$  蓄積量の評価結果 [32]

アルツハイマー発症のエビデンスとなる不溶性の A $\beta$  が、有意に高脂肪食群で蓄積している結果となり、本測定でも高脂肪食群でのアルツハイマー病発症が確認された。また LPSp 投与による A $\beta$  蓄積量の低下が認められ、LPSp 投与発症抑制も示唆される結果となった。

開発システムによる好中球活性評価では、同様に高脂肪食摂取群で O $_2^{\cdot-}$  産生と OCl $^-$  産生ともに高値を示す結果が得られた (図 3-20)。但し、マウスはヒトと比較して赤血球が多く白血球が極端に少ないため、希釈のみの全血での計測は難しく末梢血 30  $\mu$ L を溶血して計測に供した。

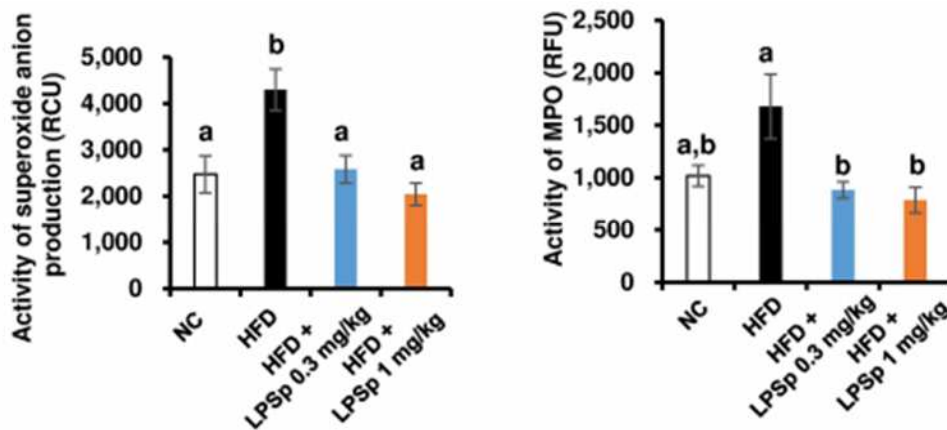


図 3-20 開発システムによる好中球活性評価結果 [32]

一般生化学検査に関しては、O $_2^{\cdot-}$  産生は、空腹時血糖値、HbA1c、インスリン、中性脂肪、総コレステロール、HDL コレステロールとの間に強い相関 (相関係数:0.42 ~ 0.72)、OCl $^-$  産生は、空腹時血糖値、インスリン、総コレステロール、HDL コレステロールとの間に強い相関 (相関係数:0.47 ~ 0.87) が認められた。

本研究により好中球活性は、アルツハイマー病の既存マーカー (水迷路試験や脳内 A $\beta$  蓄積量) の結果と対応しており、機能性成分によるアルツハイマー病発症抑制の評価に有用であることが示唆された。



### 3-2-2 apoE 欠損マウスに対する機能性成分（糖脂質 LPS）の経口投与の効果検証試験

本稿の記述や図表の一部は、筆者の共同研究 [41]から許可を得て転載（©2018 Public Library of Science / CC-BY-4.0）している。

動脈硬化は、依然として世界的に罹患率および死亡率の主要な原因の一つであり、高脂血症は動脈硬化の発症の主要な危険因子であることが知られている [42]。動脈硬化性プラークの形成は、主に TLR を含む病原体認識受容体が誘発する過剰な炎症反応を伴う活性化した血管免疫細胞（マクロファージ、単球、好中球）により引き起こされるが、TLR を介した動脈保護作用に関する知見も出てきている [43]。しかし、LPSp の経口投与による抗動脈硬化作用について述べた報告はまだない。そこで、高脂肪食（HFD）誘発動脈硬化モデルにおいて、LPSp の経口投与が apoE 欠損マウスの動脈硬化発症を抑制するかどうかを検証することとした。

0-12 週齢の雄 BALB/c.KOR/StmSlc-Apoesh1 マウス（日本 SLC 製）を、温度と湿度が調整された部屋で 12 時間の明暗サイクルのもと、餌と水へのアクセスを無制限にして維持した。すべてのマウスは、低脂肪食（LFD; 16.1 kJ/g、脂肪エネルギーの 10%）を与え、水道水を受け取りながら 1 週間馴化させた。マウスを 3 群に分け（n=8 ずつ）、16 週間高脂肪食（HFD; 21.9 kJ/g、脂肪エネルギーの 60%）を与えた。併せて P. agglomerans 由来の精製 LPS（LPSp; マクロフィ社製）を飲料水に溶解し、0、0.3 または 1 mg/kg 体重（BW）/日を投与した。飲料水は毎週交換し、LPSp の濃度は平均 BW と飲水量に応じて調整した。BW、摂餌量、飲水量は毎週記録した。16 週目にマウスを一晩絶食させ、セボフルラン蒸気下で麻酔した。血液サンプルは、ヘパリンコートした注射器で心臓穿刺により収集した。胸部大動脈は慎重に摘出し、新たに調製した固定液（リン酸緩衝生理食塩水中 4%パラホルムアルデヒド）中に 4 で 24 時間保存した。固定した大動脈を 0.2 % w/v Oil red O 溶液で 60 分間染色した。この溶液は、Oil Red O（和光純薬製）をメタノールに溶解して新たに調製し、使用前に膜（0.45 μm）で濾過しておいたものである。染色した大動脈を縦に開き、解剖皿に固定し、内膜表面をデジタル写真で撮影した。Oil red O 陽性プラークの被覆率は、Image J ソフトウェア [44]を使用して定量化した。

図 3-21 に大動脈の動脈硬化性病変染色法（血管内壁に蓄積した脂肪の染色）の評価結果を示す。高脂肪食摂取により血管内壁に脂肪が蓄積していることが観察され、動脈硬化を発症していることが確認された。そしてそれは、1 mg/kg 体重（BW）/日の LPSp 摂取により有意に低下することがわかった。

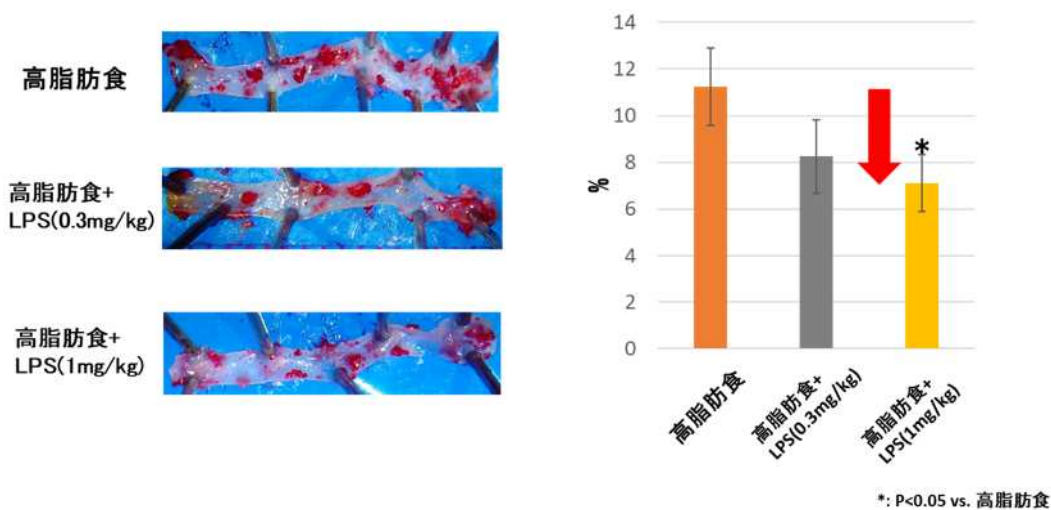


図 3-21 大動脈血管の病変（プラーク）染色解析 [41]

開発システムによる好中球活性評価では、同様に高脂肪食摂取群で  $O_2^{\cdot-}$  産生と  $OCI^-$  産生ともに高値を示す結果が得られた（図 3-22）。そしてそれは LPSp 摂取によって、抑えられることがわかった。但し、マウスはヒトと比較して赤血球が多く白血球が極端に少ないため、希釈のみの全血での計測は難しく末梢血 30  $\mu$ L を溶血して計測に供した結果である。

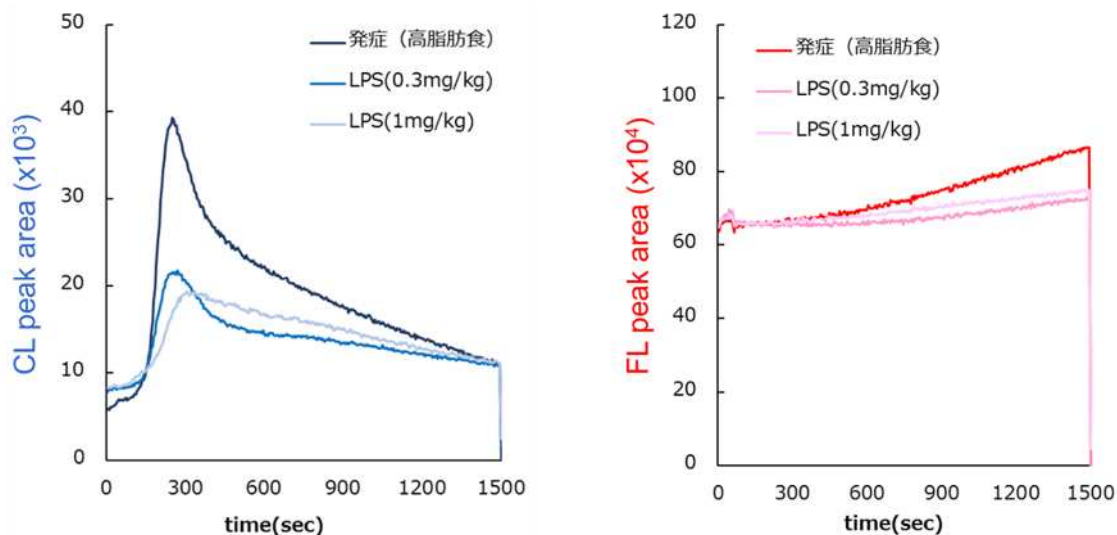


図 3-22 開発システムによる好中球活性評価結果

本結果より、CFL-P2200 による好中球活性評価法は、マウスを利用した *in vivo* 機能的成分介入試験に利用できることが確認された。

### 3-3 本章のまとめ

本章では、第 2 章で概説した細胞試験用に開発した蛍光・発光同時計測装置キュベットタイプ CFL-C2000 をベースに、ユーザーからの要望に基づいて、血液中の好中球活性が簡便に評価できる新しいシステム開発への取組みについて述べた。血液に含まれる赤血球や夾雑物による光吸収の影響を最小限に抑えるために、プレパラートを試料容器として光路長を短くし、光学系を最適化すること、プロトコルを工夫することにより、希釈するだけの簡単な操作で好中球活性を計測できる世界唯一の方法を確立することができた。これは、高度な微弱光検出技術を有する技術者と、我々生化学者が知恵を出し合い協力して成しえた成果である。利用例として、アルツハイマー病と動脈硬化症の 2 種類の疾患モデルマウスを用いた機能性成分 LPS の発症抑制効果を挙げたが、高血圧モデルラットによる検証 [45] やロスマリン酸のアルツハイマー病発症抑制効果のマウスによる検証、食物繊維と茶カテキンの組み合わせ効果のマウスによる検証や、筋肉細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇と  $O_2^{\cdot -}$  産生の同時計測系の確立等、多くの研究に利用された実績がある。

しかし、本システムは 3-1-10 でも述べた通り、攪拌の空気量と方向の調整に熟練したテクニックが必要であること、プレパラート上に血液試料が露出した状態で取り扱いに注意が必要であること、露出した試料の蒸発を抑えるために加湿機構が必要でありそのため装置が大掛かりとなっていることなど、いくつか問題があった。それを解決した新しいシステムについて、次章で概説する。

### 第3章引用文献

- [1] Kazumura K, Takeuchi K, Hara A, Miwa T, Hattori M, Wu Y, Morishita N, Tsuchiya H, Osawa T., "Rapid on-site dual optical system to measure specific reactive oxygen species (O<sub>2</sub>-• and OCl-) in a tiny droplet of whole blood," *PLoS One*, vol. 13, no. 8, p. e0200573, 2018.
- [2] Kazumura K, Sato Y, Satozono H, Koike T, Tsuchiya H, Hiramatsu M, Katsumata M, Okazaki S., "Simultaneous monitoring of superoxides and intracellular calcium ions in neutrophils by chemiluminescence and fluorescence: evaluation of action mechanisms of bioactive compounds in foods," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 84, p. 90–96, 2013.
- [3] Kambayashi Y, Ogino K. , "Reestimation of Cypridina luciferin analogs (MCLA) as a chemiluminescence probe to detect active oxygen species--cautionary note for use of MCLA.," *J. Toxicol. Sci.*, vol. 28, pp. 139-148, 2003.
- [4] Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T., "Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, pp. 3170-3175, 2003.
- [5] Kazumura K, Yoshida LS, Hara A, Tsuchiya H, Morishita N, Kawagishi H, et al. , "Inhibition of neutrophil superoxide generation by shikonin is associated with suppression of cellular Ca<sup>2+</sup> fluxes.," *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 59, pp. 1-9, 2016.
- [6] Kettle AJ, Gedye CA, Hampton MB, Winterbourn CC., "Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazides.," *Biochem. J.*, vol. 308, pp. 559-563, 1995.
- [7] Kettle AJ, Gedye CA, Winterbourn CC., "Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide.," *Biochem. J.*, vol. 321, pp. 503-508, 1997.
- [8] Kimura H, Nakano M., "Highly sensitive and reliable chemiluminescence method for the assay of superoxide dismutase in human erythrocytes.," *FEBS Lett.*, vol. 239, pp. 347-350, 1988.
- [9] Kimura C, Oike M, Koyama T, Ito Y., "Impairment of endothelial nitric oxide production by acute glucose overload.," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 280, pp. E171-178, 2001.
- [10] Midorikawa J, Maehara K, Yaoita H, Watanabe T, Ohtani H, Ushiroda S, et al., "Continuous observation of superoxide generation in an in-situ ischemia-reperfusion rat lung model.," *Jpn. Circ. J.*, vol. 65, pp. 207-212, 2001.
- [11] O. T., "Recent Progress of Functional Food Research in Japan. Functional Foods for Disease Prevention II.," *ACS Publications.*, pp. 2-9, 1998.

- [12] Alissa EM, Ferns GA., "Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases.," *J. Nutr. Metab.*, 2012.
- [13] Peake J, Suzuki K., "Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress.," *Exerc. Immunol. Rev.*, vol. 10, pp. 129-141, 2004.
- [14] Popovic LM, Mitic NR, Miric D, Bisevac B, Miric M, Popovic B. , "Influence of vitamin C supplementation on oxidative stress and neutrophil inflammatory response in acute and regular exercise.," *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2015.
- [15] Suzuki K, Sato H, Kikuchi T, Abe T, Nakaji S, Sugawara K, Totsuka M, Sato K, Yamaya K., "Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 81, pp. 1213-1222, 1996.
- [16] Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Liu Q, Kurakake S, Okamura N, Kumae T, Umeda T, Sugawara K., "Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses.," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 35, pp. 348-355, 2003.
- [17] Son TG, Zou Y, Yu BP, Lee J, Chung HY., "Aging effect on myeloperoxidase in rat kidney and its modulation by calorie restriction.," *Free Radic. Res.*, vol. 39, pp. 283-289, 2005.
- [18] Espino J, Bejarano I, Paredes SD, González D, Barriga C, Reiter RJ, et al., "Melatonin counteracts alterations in oxidative metabolism and cell viability induced by intracellular calcium overload in human leucocytes: changes with age.," *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 107, pp. 590-597, 2010.
- [19] Breitmeier D, Becker N, Weilbach C, Albrecht K, Scheinichen D, Panning B, et al., "Ethanol-induced malfunction of neutrophils respiratory burst on patients suffering from alcohol dependence.," *Alcohol Clin. Exp. Res.*, vol. 32, pp. 1708-1713, 2008.
- [20] Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG., "Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage.," *Am. J. Pathol.*, vol. 97, pp. 149-206, 1979.
- [21] N. M., "Assay for superoxide dismutase based on chemiluminescence of luciferin analog.," *Methods Enzymol.*, vol. 186, pp. 227-232, 1990.
- [22] N. M., "Determination of superoxide radical and singlet oxygen based on chemiluminescence of luciferin analogs.," *Methods Enzymol.*, vol. 186, pp. 585-591, 1990.
- [23] Shirai Y, Saito N., "Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting.," *J. Biochem.*, vol. 132, pp. 663-668, 2002.
- [24] S. Y., "Analysis of molecular mechanism regulating spatio-temporal localization and activity of protein kinase C and diacylglycerol kinase using live imaging.," *Nihon*

*Yakurigaku Zasshi.*, vol. 123, pp. 189-196, 2004.

- [25] Davies MJ, Hawkins CL, Pattison DI, Rees MD., "Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 10, pp. 1199-1234, 2008.
- [26] van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P., "Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, pp. 2899-2937, 2009.
- [27] Watanabe T, Yasunari K, Nakamura M, Maeda K., "Carotid artery intima-media thickness and reactive oxygen species formation by monocytes in hypertensive patients.," *J. Hum. Hypertens.*, vol. 20, pp. 336-340, 2006.
- [28] K. Y., "Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation.," *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 58, pp. 99-104, 2016.
- [29] Asahi T, Kondo H, Masuda M, Nishino H, Aratani Y, Naito Y, et al., "Chemical and immunochemical detection of 8-halogenated deoxyguanosines at early stage inflammation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, pp. 9282-9291, 2010.
- [30] S. K., "Exhaustive exercise-induced neutrophil-associated tissue damage and possibility of its prevention.," *J. Nanomedicine Biotherapeutic Discov.*, vol. 7, 2017.
- [31] Wu Y, Kazumura K, Maruyama W, Osawa T, Naoi M., "Rasagiline and selegiline suppress calcium efflux from mitochondria by PK11195-induced opening of mitochondrial permeability transition pore: a novel anti-apoptotic function for neuroprotection.," *J. Neural Transm.*, vol. 122, pp. 1399-1407, 2015.
- [32] Kobayashi Y, Inagawa H, Kohchi C, Kazumura K, Tsuchiya H, Miwa T, Okazaki K, Soma GI., "Oral administration of Pantoea agglomerans-derived lipopolysaccharide prevents metabolic dysfunction and Alzheimer's disease-related memory loss in senescence-accelerated prone 8 (SAMP8) mice fed a high-fat diet.," *PLoS One.*, vol. 13, no. 6, p. e0198493, 2018.
- [33] Mehla J, Chauhan BC, Chauhan NB, "Experimental induction of type 2 diabetes in aging-accelerated mice triggered Alzheimer-like pathology and memory deficits.," *J. Alzheimers Dis.*, vol. 39, p. 145-162, 2014.
- [34] Kobayashi Y, Inagawa H, Kohchi C, Okazaki K, Zhang R, Soma GI., "Effect of Lipopolysaccharide Derived from Pantoea agglomerans on the Phagocytic Activity of Amyloid by Primary Murine Microglial Cells.," *Anticancer Res.*, vol. 36, no. 7, pp. 3693-8, 2016.
- [35] Kobayashi Y, Inagawa H, Kohchi C, Okazaki K, Zhang R, Kobara H, Masaki T, Soma

- GI., "Lipopolysaccharides Derived from *Pantoea agglomerans* Can Promote the Phagocytic Activity of Amyloid in Mouse Microglial Cells.," *Anticancer Res.*, vol. 37, no. 7, pp. 3917-3920, 2017.
- [36] Nishizawa T, Inagawa H, Oshima H, Okutomi T, Tsukioka D, Iguchi M, Soma G, Mizuno D., "Homeostasis as regulated by activated macrophage. I. Lipopolysaccharide (LPS) from wheat flour: isolation, purification and some biological activities.," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 40, no. 2, pp. 479-83, 1992.
- [37] Wakame K, Komatsu K, Inagawa H, Nishizawa T, "Immunopotentiator from *Pantoea agglomerans* prevents atopic dermatitis induced by *Dermatophagoides farinae* extract in NC/Nga mouse.," *Anticancer Res.*, vol. 35, p. 4501–4508, 2015.
- [38] Iguchi M, Inagawa H, Nishizawa T, Okutomi T, Morikawa A, Soma GI, Mizuno D., "Homeostasis as regulated by activated macrophage. V. Suppression of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by LPSw (a lipopolysaccharide from wheat flour).," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 40, no. 4, pp. 1004-6, 1992.
- [39] Okutomi T, Nishizawa T, Inagawa H, Takano T, Morikawa A, Soma G, Mizuno D., "Homeostasis as regulated by activated macrophage. VII. Suppression of serum cholesterol level by LPSw (a lipopolysaccharide from wheat flour) in WHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) rabbit.," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 40, no. 5, pp. 1268-70, 1992.
- [40] Vorhees CV, Williams MT, "Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory.," *Nat. Protoc.*, vol. 1, p. 848–858, 2006.
- [41] Kobayashi Y, Inagawa H, Kohchi C, Kazumura K, Tsuchiya H, Miwa T, Okazaki K, Soma GI., "Oral administration of *Pantoea agglomerans*-derived lipopolysaccharide prevents development of atherosclerosis in high-fat diet-fed apoE-deficient mice via ameliorating hyperlipidemia, pro-inflammatory mediators and oxidative responses.," *PLoS One.*, vol. 13, no. 3, p. e0195008, 2018.
- [42] Weber C, Noels H., "Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options.," *Nat. Med.*, vol. 17, pp. 1410-1422, 2011.
- [43] Cole J E, Kassiteridi C, Monaco C., "Toll-like receptors in atherosclerosis: a Pandora's box 'of advances and controversies.," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 34, pp. 629-636, 2013.
- [44] Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W., "NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis.," *Nat. Methods*, vol. 9, pp. 671-675, 2012.
- [45] Zhang R, Inagawa H, Kazumura K, Tsuchiya H, Miwa T, Morishita N, Uchibori S, Hanashiro J, Masaki T, Kobara H, Soma GI., "Evaluation of a Hypertensive Rat Model

Using Peripheral Blood Neutrophil Activity, Phagocytic Activity and Oxidized LDL Evaluation.," *Anticancer Res.*, vol. 38, no. 7, pp. 4289-4294, 2018.



## 第4章 システム改良とヒト臨床研究によるシステムの検証

第3章で概説した *in vivo* 法の極微量血液による好中球活性評価システムは、性能上は十分なものであったが、ユーザビリティの観点からいくつか問題点があった。本章では、その問題点を解決できる新しいシステムの開発に取り組み、更にそれを用いてヒトによる検証を行ったことについて概説する。なお、本章の記述や図表の一部は、筆者の研究 [1] から許可を得て転載 (©2021 Nature Publishing Group / CC-BY-4.0) している。

### 4-1 システム改良とヒト縦断研究

#### 4-1-1 背景と目的

Helmut Sies は、1985年に Hans Selye のストレス理論にヒントを得て「酸化ストレス」という概念を導入した [2]。2015年には、「酸化物質と抗酸化物質の間のレドックスシグナル/制御の乱れ、分子損傷を引き起こす不均衡」と定義が更新された [3]。この概念が導入されて以来、多くの科学者が生物学的プロセスにおける酸化物質、フリーラジカル、抗酸化物質の研究を始め、スーパーオキシドラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) や過酸化水素などの活性酸素種 (ROS)、次亜塩素酸イオン ( $OCI^{\cdot-}$ ) などの高活性酸素種 (hROS) の生物学的役割を明らかにした。従って、酸化ストレスの強度ベースの分類とメカニズムベースのサブ分類が必要となっている [3, 4]。Lushchak によれば、酸化ストレスは、生体内における活性酸素の生成と除去の不均衡と言い換えることができる [4]。近年、様々な疾患における活性酸素の関与が明らかになりつつある [5, 6, 7]。

自然免疫反応の中心的な担い手である白血球 (WBC) は、酵素的に大量の活性酸素を産生することが知られている [5, 6, 7, 8]。従って、これらの細胞が産生する ROS や hROS をモニタリングする技術を開発することは、酸化ストレスの研究に貢献すると考えられる。

筆者らは、化学発光 (CL) と蛍光 (FL) の同時モニタリングシステム CFL-C2000 [9] を開発した。このシステムを改良し、CFL-P2200 [10]を開発して、CL と FL の検出試薬を用いて、少量の血液サンプル中に惹起される ROS と hROS、即ち  $O_2^{\cdot-}$  と  $OCI^{\cdot-}$  を半自動的に検出できることを実証した。この新しいシステムは、最近、アルツハイマー病 [11]、動脈硬化 [12]、高血圧 [13]などの疾患と  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OCI^{\cdot-}$  との相関関係を疾患モデルマウスで研究することに応用された。これらの用途以外にも、光吸収の影響を効果的に抑えることができるため、基本的に様々な着色液体試料の計測に使用することができる。

新しい CFL-P2200 は、旧来の CFL-C2000 などと比べて多くの利点があるが、血液サンプルを簡単かつ確実に測定するためには、まだまだ改良の余地があった。CFL-P2200 では、試料を専用のスライドガラスに載せ、空気の流れて攪拌していた。しかし、スライドガラスに載せた血液サンプルは露出状態であり、常に装置やオペレーターにさらされているため、バイオハザードの危険性があることが最も大きな問題点だった。次に、サンプル表面

の気流による攪拌は、光学的なデータ変動を引き起こすため、オフラインでのデータ平均化や他の分析技術によって除去する必要がある。更に、エアフローの量、タイミング、方向を微調整するためには、ある程度の練習とトレーニングが必要となる。

これらの問題を解決するために、従来の光学キュベットよりも薄くて幅が広い特殊な流体チップを開発した。このチップにはスターラーバーが内蔵できるよう設計した。チップは縦置きにし、CFL-P2200の高感度光学系構成もそれに合わせて縦置きにした。電気泳動チップに代表されるように、試料導入のための特別な構造を必要とする点で、チップの縦置きは横置きよりも有利となるためである [14]。

これらの改良により、本装置は血液サンプルに適しているだけでなく、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $OCI^-$ をより高感度に測定できるようになったことを報告する。また、CFL-P2200と比較して、より長時間安定したデータを取得することができる。本装置を用い、健康なボランティアを対象としたパイロット試験を実施した。正確には、全員が年1回の健康診断をクリアしており、健康な状態であるといえるレベルである。しかし、どの人も多かれ少なかれ不健康な状態を経験することがある。そこで、白血球の活性をモニターすることで、健康な人とそうでない人を区別する情報が得られるかどうかを調べることが、この研究の目的の一つである。このような白血球活性を簡単に測定する方法は、従来はなかったため、まずは健常者の基礎データを収集することから始める必要があった。6人の健常者の血液中の $O_2^{\cdot-}$ 、 $OCI^-$ を数ヶ月にわたってモニターした。その結果、各ボランティアの日々の $O_2^{\cdot-}$ 、 $OCI^-$ 産生量は一様に変動しており、産生動態も個人差があることがわかった。 $O_2^{\cdot-}$ 、 $OCI^-$ の変動を、好中球数、従来の炎症マーカー値、およびアンケートから推測されるボランティアの体調変動と比較したところ、多くの注目すべき知見が得られた。また、血中 $O_2^{\cdot-}$ 、 $OCI^-$ 産生能の新しい解析法も報告する。

#### 4-1-2 方法

##### 4-1-2-1 試薬

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) およびジメチルスルホキシド (DMSO) はシグマアルドリッチジャパン (東京、日本) より購入した。2-メチル-6-(4-メトキシフェニル)-3,7-ジヒドロイミダゾ [1,2-a] ピラジン-3-オン塩酸塩 (MCLA) は東京化成 (東京、日本) より購入した。アミノフェニルフルオレセイン (APF) は、五稜化薬 (札幌、日本) から購入した。

PMA (0.1 mM) を DMSO に溶解し、PMA ストック溶液として-80 °C で保存した。使用直前に Ringer-Hepes buffer (RH バッファー : 154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 10 mM Hepes pH7.4) で 1 : 20 (v/v) 希釈した。MCLA は Milli-Q 水に溶解し、ろ過後のモル消衰係数により濃度を調整した。

##### 4-1-2-2 開発した専用試料容器

今回開発した CFL-H2200 および-H2400 モデル専用の薄型流体チップを図 4-1 に示す。光路長は、血液成分による光の散乱や赤血球による光の吸収の影響を効果的に抑えつつ、十分な信号が得られる 2 mm に設定した。チップは、ポンプ部、計測部（図 4-1 右の光学系参照）、リザーバーの 3 つの部分から構成されている（図 4-1 左）。ポンプ部には、安価な磁性体のピンをポリテトラフルオロエチレン（PTFE）チューブで覆った専用の攪拌子を設置している。チップの中央に配置されたセパレータにより、溶液を速やかに均一に混合することができる。また、ポンプ部と光学計測部を分離したことにより、攪拌の信号への影響を最小限に抑えることができた。チップの上面は大きく開口しており、計測中の刺激剤添加はもちろん、計測試料の調製等も容易に行うことができる。

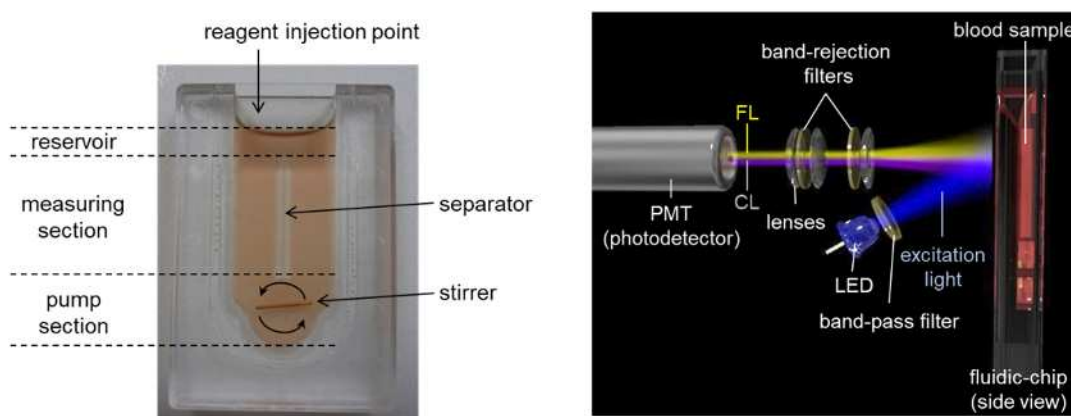


図 4-1 専用計測容器と光学系 [1]

#### 4-1-2-3 開発したシステムの光学系

今回開発した CFL-H2200 および-H2400 試作機の光学構成は、基本的に第 3 章で概説した CFL-P2200 と同じである（図 4-1 右、図 4-2B、C）。CL および FL の検出には、1 本の光電子増倍管（PMT：H10682-210）が使用されている。着色試料からの FL 検出に適した表面反射 FL を効率よく集光するために、励起光としての発光ダイオード（LED）を PMT 側に配置した。これは、透過型の FL 検出の場合は光信号にかなりの励起光が含まれていて、FL 信号そのものよりも励起光の強度が非常に高く、光学フィルターによる除去が困難であり、FL 信号から励起光をカットするには同側照明が有効だからである。励起光の波長（バンドパスフィルター 480 nm、FWHM10 nm）は、FL 試薬 APF（Ex-Max 490 nm）に対して最適化した。集光レンズと光学フィルターのセットは、PMT の前に配置され、バンドリジェクションフィルターは、励起光を効率よく遮断し、MCLA 由来の CL（Em-Max 465 nm）および APF 由来の FL（Em-Max 515 nm）を透過させるように最適化されている。CL への FL の混合を防ぐために LED 光量を絞る必要があるが、LED の安定性を保つために LED の前に ND フィルターを設置し、2 mA 程度の電流を流した時に最適な光量になるように調整した。励起光の ON/OFF を十分な速度で繰り返すことにより、単一の PMT に入射した CL と FL の分離を達成した [9, 10, 15]。

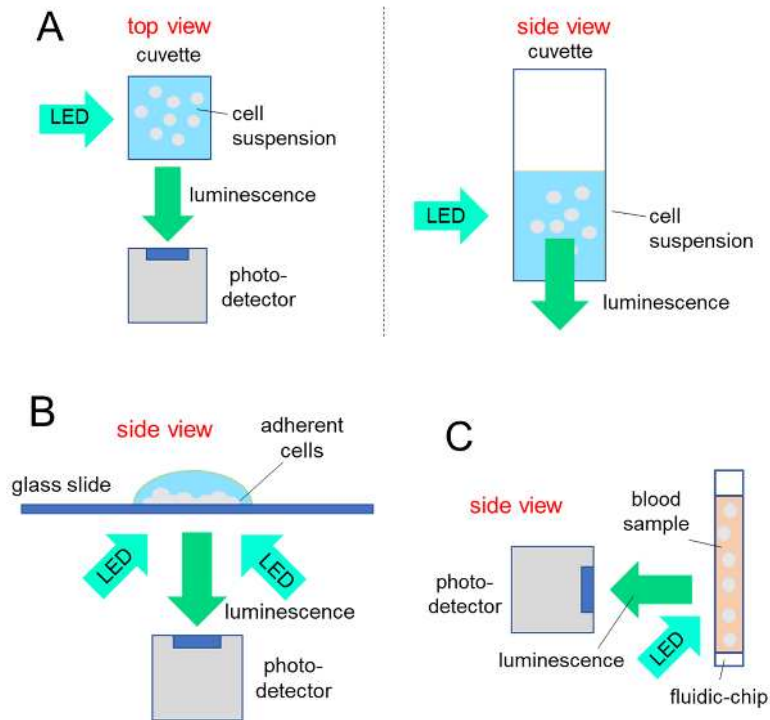


図 4-2 蛍光・発光同時計測装置 3 種の光学系イラスト図 [1]

A : CFL-C2000(キュベット) B : CFL-P2200(プレパラート) C:CFL-H2200 (薄型セル)

#### 4-1-2-4 CFL-H2200 と CFL-H2400

今回開発した CFL-H2200 は測定チャンネルが 2 つ、CFL-H2400 は 4 つある。つまり、CFL-H2200 は 2 サンプル、CFL-H2400 は 4 サンプルを同時に計測できる (図 4-3)。その他の仕様は基本的に共通である (表 4-1)。また、異なるチャンネル/システム間の互換性を保つため、上記の流体チップと同一形状の標準光源により、各光電子増倍管の感度を補正している。この光源は、血液サンプルと同程度の光を発するように設計されている。



図 4-3 蛍光・発光同時計測装置 [1]

A : CFL- H2200 (2 連型) B : CFL-H2400 (4 連型)

表 4-1 蛍光・発光同時計測装置 3 種の特徴 [1]

System	Key reference	Sample container	Stirring	Channel(s)	Sample volume	Size	Weight
CFL-C2000	Kazumura et al. (2013)	Cuvette (commercially available)	Stirrer (commercially available)	1	1500 $\mu$ L	W160 $\times$ D250 $\times$ H90 mm	2.6 kg
CFL-P2200	Kazumura et al. (2018)	Glass slide (custom-made)	Air flows (newly developed)	2	500 $\mu$ L	W213 $\times$ D233 $\times$ H224 mm	12.3 kg
CFL-H2200	This study	Fluidic-chip (newly developed)	Dedicated stirrer (newly developed)	2	750 $\mu$ L	W123 $\times$ D232 $\times$ H204 mm	3.4 kg
CFL-H2400	This study	Fluidic-chip (newly developed)	Dedicated stirrer (newly developed)	4	750 $\mu$ L	W213 $\times$ D232 $\times$ H204 mm	7.2 kg

#### 4-1-2-5 採血

血液サンプルはランセット (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA またはニプロ、大阪) を用いて、ボランティアの指先から自己採取した。血液凝固を防ぐために内側に  $K_2EDTA$  がコーティングされている BD Microtainer Tubes (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に回収し、保存した。血液は室温で保存し、採取後 2 時間以内に測定に供した。採血の際は必ずインフォームドコンセントを得た。すべての実験は、浜松ホトニクス株式会社研究倫理委員会の承認を得て (H-117) ガイドラインを完全に遵守して行われた。

#### 4-1-2-6 血球計数と CRP

血球数および全血中の C 反応性タンパク質 (CRP) 濃度は、Pentra MS CRP (堀場製作所、京都) を用いて、取り扱い説明書の指示に従い測定した。

#### 4-1-2-7 血液の $O_2^{\cdot-}$ と $OCI^-$ 産生計測

最初に体内で産生されると知られている [7]  $O_2^{\cdot-}$  と  $OCI^-$  (hROS) は、白血球が宿主防御のために産生する。これらは刺激剤によって上昇し、其々 MCLA の CL、APF の FL として検出される。本研究では、PMA を刺激に用いた。刺激剤による CL と  $dFL/dt$  は、其々瞬時の  $O_2^{\cdot-}$  と  $OCI^-$  の生成量に比例することが明らかにされている [10]。これ以降、これらのパラメータを CL- $O_2^{\cdot-}$  および FL- $OCI^-$  と表記する。

#### 4-1-2-8 CL- $O_2^{\cdot-}$ と FL- $OCI^-$ 計測方法

CFL-H2200 および H2400 による CL- $O_2^{\cdot-}$  と FL- $OCI^-$  の同時モニタリングは以下の手順で行った (表 4-2 参照)。

表 4-2 使用する試薬の使用量及び濃度

Reagent	Stock conc.	Volume (μL)	Final conc.
RHB	-	730.5	-
MCLA	50 μM	7.5	0.5 μM
CaCl <sub>2</sub>	100 mM	7.5	1 mM
APF	5 mM	1.5	10 μM
Blood	-	3	1/250
PMA	5 μM	15	0.1 μM

- 0.5 μM MCLA、10 μM APF、1 mM CaCl<sub>2</sub>を含む RH バッファーを専用計測容器に調製する。
- 専用インキュベーター内で攪拌しながら 37 °C で 4 分間プレインキュベーションする。
- 全血を 3 μL 添加する。
- 37 °C で 1 分間、攪拌しながらプレインキュベーションする。
- 全血試料調製済み専用容器を装置にセットする。
- 装置内で攪拌しながら 37 °C で更に 1 分間インキュベートする。
- CL-O<sub>2</sub><sup>•</sup>および FL-OCI<sup>-</sup>の計測を開始する。
- 設定したタイミングで PMA を自動添加、試料を刺激する（専用計測ソフトで制御）。
- 専用解析ソフトによるデータ解析、即ち CL-O<sub>2</sub><sup>•</sup>および FL-OCI<sup>-</sup>の解析。

（ステップ 2、4、6 のインキュベーション時間は、試料温度が 37 °C に達するために必要）

\*刺激後に生成される O<sub>2</sub><sup>•</sup>総量は CL AUC [10, 15]に比例し、FL は OCI<sup>-</sup>の累積量なので、刺激後に生成される OCI<sup>-</sup>総量は FL<sub>MAX</sub> - FL<sub>BASE POINT</sub> に等しい（図 4-4 の「a-b」）。FL BASE POINT は、FL-OCI<sup>-</sup>MAX の x 値で FL-OCI<sup>-</sup>の上昇点を通る水平線上の y 値である（図 4-4 中の青色点線）。

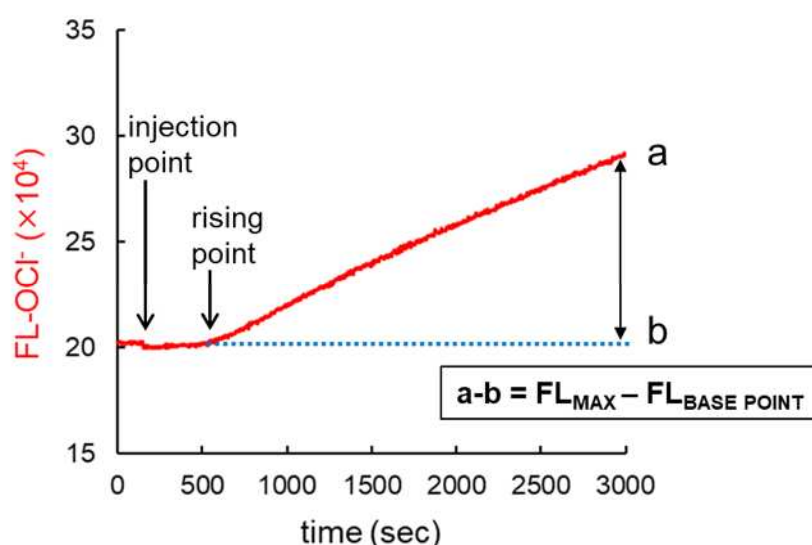


図 4-4 FL-OCI<sup>-</sup>の解析方法 [1]

#### 4-1-2-9 健常ボランティアの日間変動の解析

本研究に参加した、定期健康診断で基礎疾患を指摘されていない被験者は以下の 6 名である。

被験者 1) 35 歳女性 (n=21)

被験者 2) 42 歳女性 (n=24)

被験者 3) 54 歳女性 (n=63)

被験者 4) 35 歳男性 (n=39)

被験者 5) 43 歳男性 (n=22)

被験者 6) 52 歳男性 (n=25)

採血は、食事の影響を最小限にするため、10 時間以上絶食した後、朝 (8:30-10:30) に行った。実験およびボランティアへのアンケートは、非被験者により実施した。アンケートの内容は、絶食時間・睡眠時間、自覚症状の有無・服薬状況・医師の評価などである。

#### 4-1-3 結果

##### 4-1-3-1 開発システムでの血液中の CL と FL の測定例

新しい専用容器を用いたシステム (2 チャンネルモデル CFL-H2200) では、従来のスライドグラス式システム (CFL-P2200) で得られた  $O_2^{\cdot-}$  および  $OCI^-$  信号よりも大きく、より確実な信号を得ることができた。図 4-5A は、刺激剤 (PMA) 添加時と非添加時 (RHB を添加) の全血計測試料の CL- $O_2^{\cdot-}$  と FL- $OCI^-$  の時間経過を示したものである。4 つのタイムコースはいずれも、以前に得られたものと類似していることが確認された [10]。同じバッチの血液サンプルを用いて、図 4-6A のタイムコースを従来のシステム CFL-P2200 で得られたタイムコース (図 4-5A) と比較した。その結果、新システムでは CL で約 3.9 倍、FL で約 2.8 倍高い信号が得られることがわかった (図 4-5B、4-6B)。また、新システムでは CFL-P2200 に比べてノイズレベルが大幅に低下していることも注目される。

次に、4 チャンネルモデル (CFL-H2400) を用いて、同じバッチの血液サンプルから調製した 4 つの血液計測試料を用いて、チャンネル間の再現性を検証した。図 4-7A より、4 チャンネルともほぼ同じデータが得られていることが確認された。4 チャンネル間の誤差は CL- $O_2^{\cdot-}$  で 2.62 %、FL- $OCI^-$  で 1.74 %であった (図 4-7B)。また、CFL-H2200 と CFL-H2400 の誤差は同レベルであった (データ未掲載)。

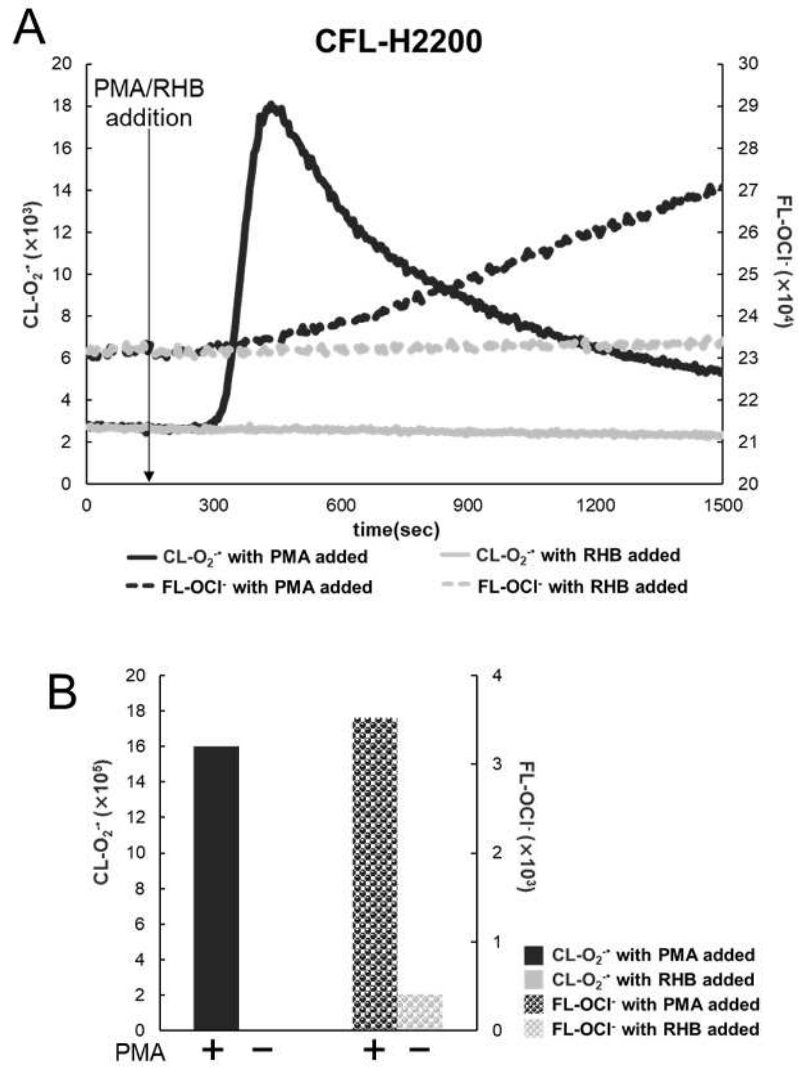


図 4-5 CFL-H2200 による CL-O<sub>2</sub><sup>-</sup>、FL-OCI<sup>-</sup>同時計測 [1]



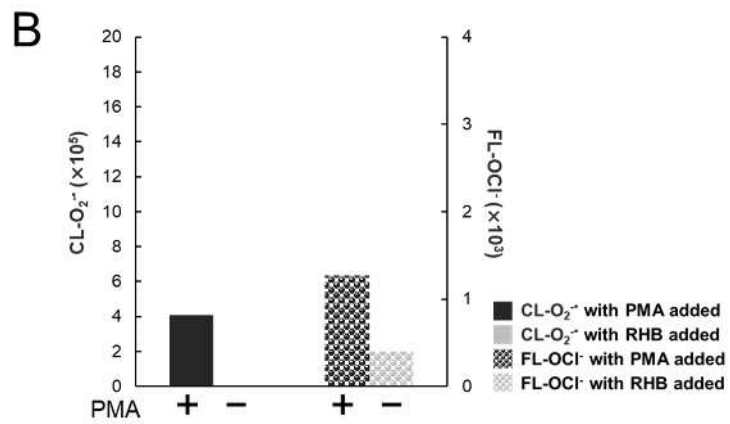
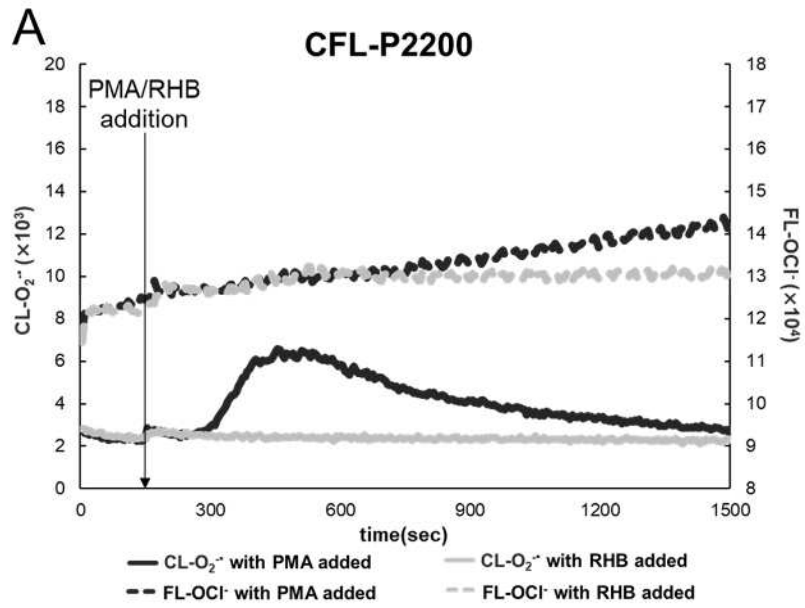


図 4-6 CFL-P2200 による CL- $O_2^-$ 、FL-OCI 同時計測 [1]

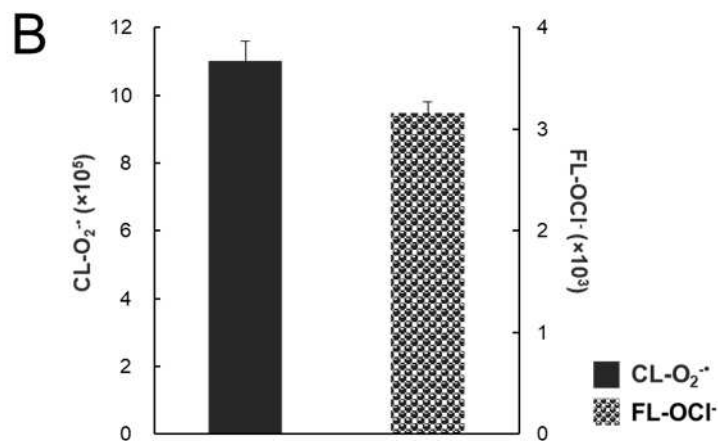
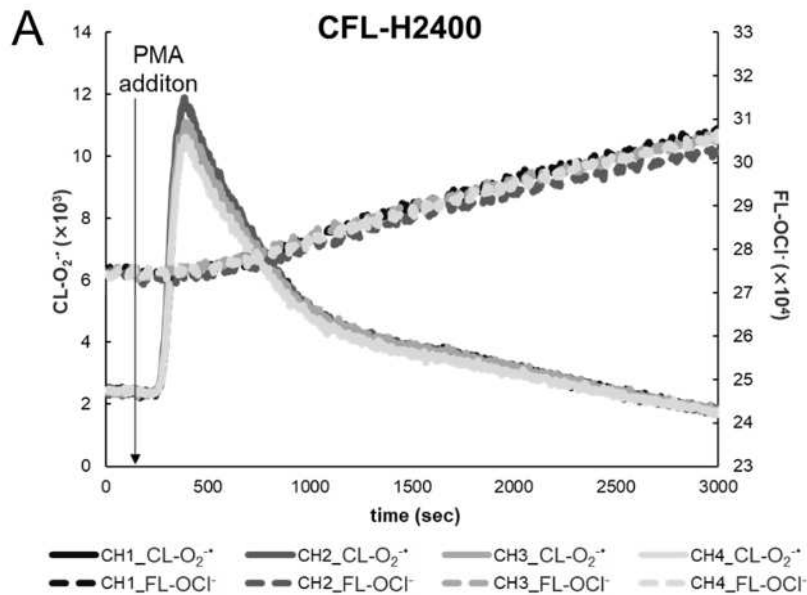


図 4-7 CFL-H2400 による  $CL-O_2^{\cdot-}$ 、 $FL-OCI^-$ 同時計測 再現性検証 [1]

#### 4-1-3-2 6人の健常ボランティアにおけるCLとFLの長期モニタリング

新システムは、より高感度で安定、再現性よく長時間全血計測試料を測定できることが確認されたので、本システムを用いて各ボランティアの  $O_2^{\cdot-}$ と  $OCI^-$ 信号の経時変化と個人間の信号のばらつきについて調査した。4-1-2 に記載したように、数ヶ月に渡って採血を朝食前に行った（食事摂取の影響を最小限にするため）。30代、40代、50代の男女から6名のボランティアに協力いただいた。対象として、好中球数とCRP値も一緒に計測した。

図 4-8 は、6人の健常者の  $CL-O_2^{\cdot-}$ （実線）、 $FL-OCI^-$ （破線）、好中球数（点線）、CRP（実線）の日間変動の散布図である。その動態は個人差が大きく、其々固有の平均値を持っており、その揺らぎに該当する変動係数（CV）は、 $CL-O_2^{\cdot-}$ ：0.15-0.38、 $FL-OCI^-$ ：0.15-0.43、好中球数：0.12-0.28 に収まっていた。各ボランティアの日々の  $O_2^{\cdot-}$ 、

OCI値は一定の範囲内で揺らいでいて、時々大きな変動を示した。この大きな変動は、ほぼ好中球数の大きな変化と一致していた（図 4-8）。そこで、これらの数値の相関関係を解析した。これ以降 A と B の相関係数を  $\text{Corr}(A, B)$  と表記することとする。程度の差はあるが、ほとんどの症例で  $\text{Corr}(\text{CL-O}_2^{\cdot-}, \text{好中球数})$  は  $\text{Corr}(\text{FL-OCI}, \text{好中球数})$  よりも高かった（表 3 左）。相関のない症例が 2 例あった（表 3 左、43 歳男性、52 歳男性、 $0 < R \leq 0.2$ ）。更に大きな信号変動やその他の信号の特徴を、従来の炎症マーカーである CRP 値やボランティアから得た問診票との関連で解析した。

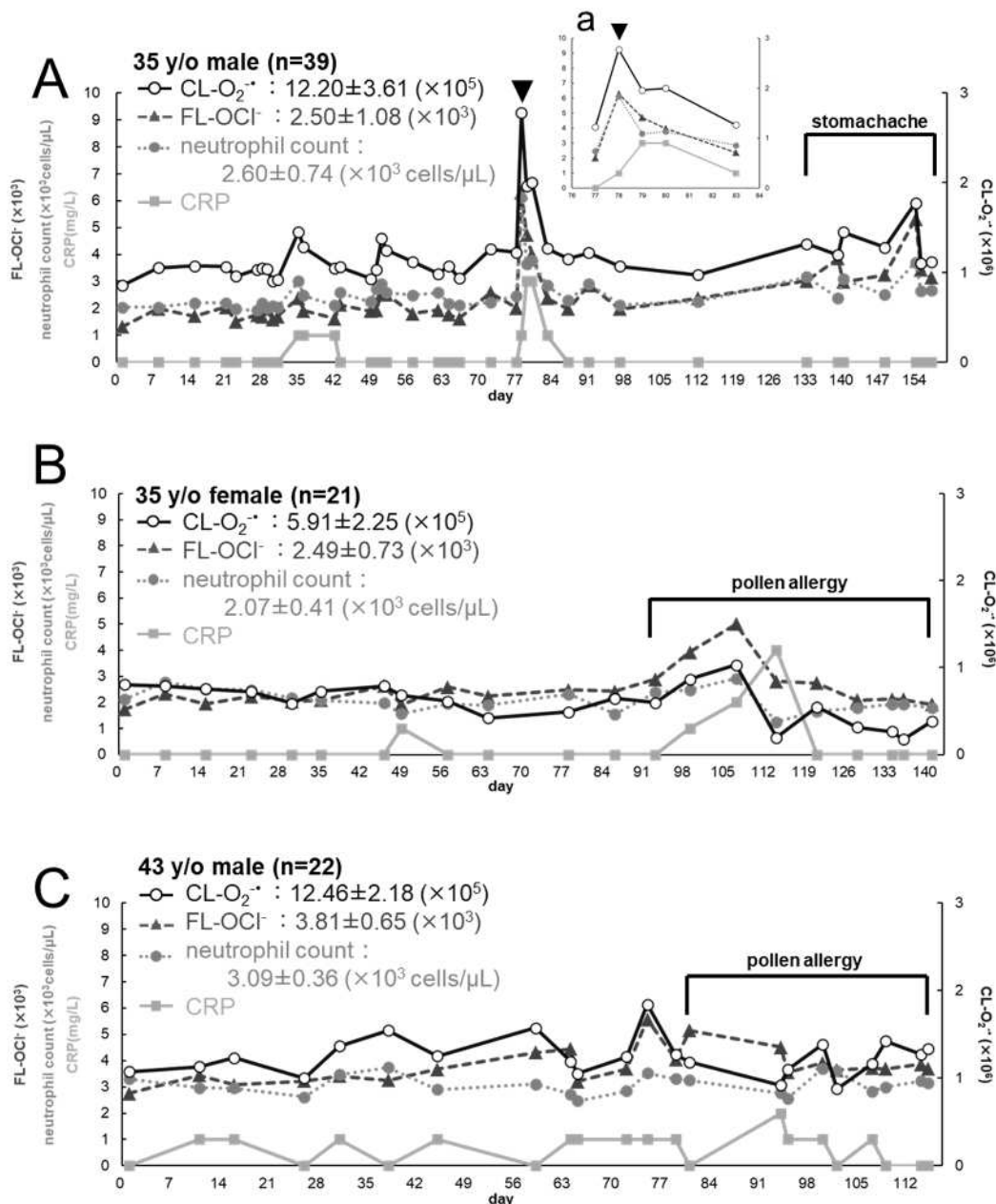


図 4-8 6 人の健常者の  $\text{CL-O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{FL-OCI}$ 、好中球数、CRP の日間変動の散布図 [1]  
 次ページに続く

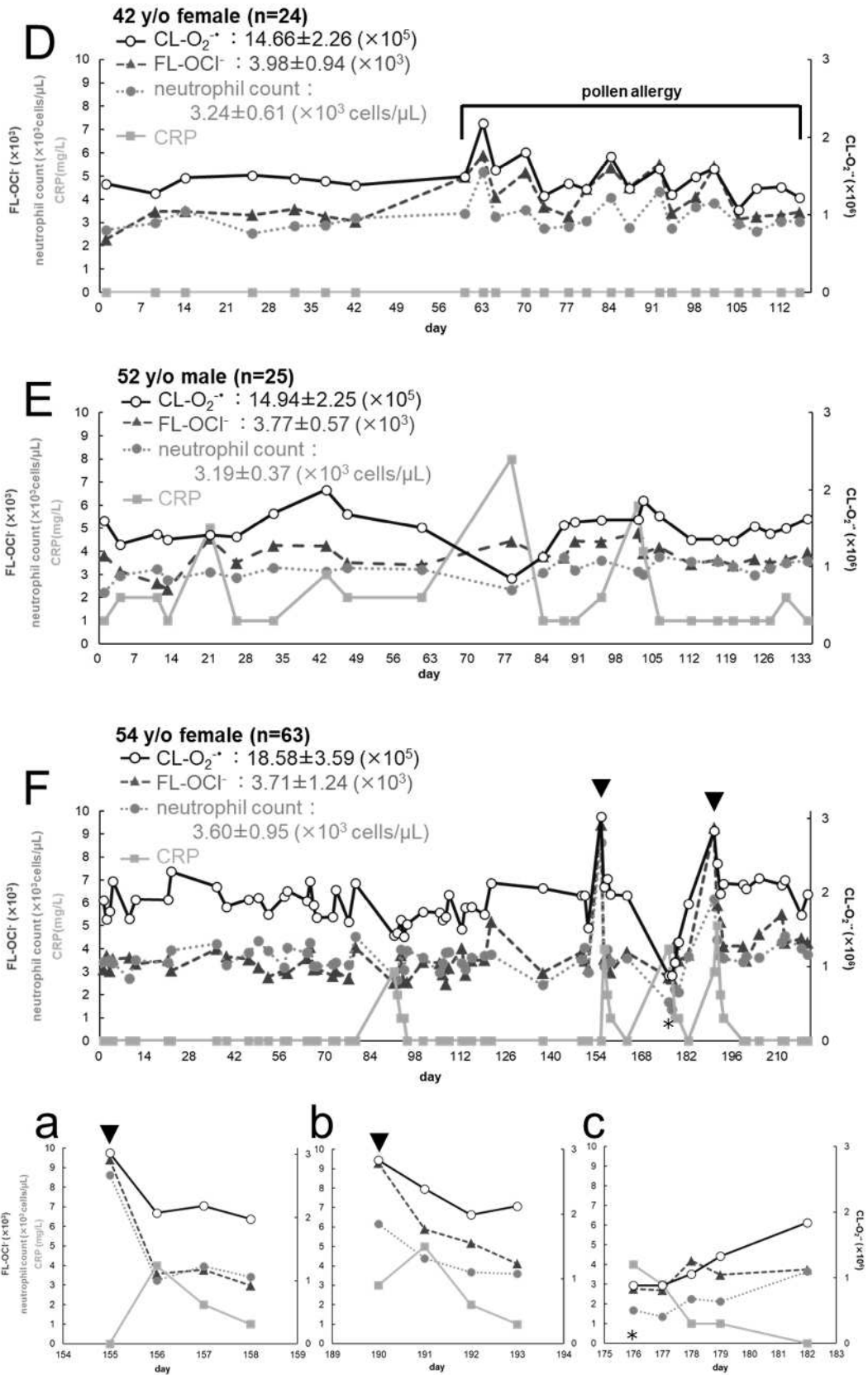


図 4-8 6 人の健常者の CL-O<sub>2</sub><sup>•-</sup>、FL-OCI<sup>-</sup>、好中球数、CRP の日間変動の散布図 [1]

表 4-3 CL-O<sub>2</sub><sup>-</sup>と好中球数との相関 FL-OCl<sup>-</sup>と好中球数との相関

	CL-O <sub>2</sub> <sup>-</sup> and FL-OCl <sup>-</sup> vs neutrophil count					
	total		stressed		normal	
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	OCl <sup>-</sup>	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	OCl <sup>-</sup>	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	OCl <sup>-</sup>
35 y/o male	<b>0.945</b>	<b>0.867</b>	<b>0.959</b>	<b>0.845</b>	<b>0.726</b>	<b>0.699</b>
35 y/o female	<b>0.644</b>	<b>0.423</b>	<b>0.841</b>	<b>0.745</b>	<b>0.294</b>	<b>-0.043</b>
43 y/o male	<b>0.478</b>	<b>0.162</b>	<b>0.174</b>	<b>0.064</b>	<b>0.694</b>	<b>0.197</b>
42 y/o female	<b>0.805</b>	<b>0.809</b>	<b>0.869</b>	<b>0.839</b>	<b>-0.133</b>	<b>0.324</b>
52 y/o male	<b>0.314</b>	<b>0.057</b>	<b>0.843</b>	<b>0.144</b>	<b>0.123</b>	<b>0.303</b>
54 y/o female	<b>0.807</b>	<b>0.752</b>	<b>0.907</b>	<b>0.886</b>	<b>0.414</b>	<b>0.360</b>

#### 4-1-3-3 急性咽喉炎および胃腸炎が血中 O<sub>2</sub><sup>-</sup>および OCl<sup>-</sup>に及ぼす影響。35 歳男性のケーススタディ

実験 78 日目、35 歳男性ボランティアは、採血時のアンケートで軽い喉の痛みの症状を訴えたが、その時は発熱などの症状はなく、普段と変わらない様子であった。しかし、その日の O<sub>2</sub><sup>-</sup>と OCl<sup>-</sup>は著しく高い値を示した（図 4-8A、一部拡大図 a、矢頭）。この日、血中に CRP がわずかに検出され（1 mg/L）好中球数は前日の 2 倍以上となっていた。その日の午後、症状がかなり悪化し、早退して受診したところ、急性咽喉炎と診断され、抗生物質が処方された。CRP は 78 日から後 1~2 日でピークに達し（図 4-8A、a : 79、80 日目）その後減少した（図 4-8A、a : 83 日目）。CL-O<sub>2</sub><sup>-</sup>、FL-OCl<sup>-</sup>、好中球数は CRP と同じ挙動を示したが、CRP のピークより 1 日早くピークに達した（図 4-8A、a、矢印部分）。実は、この男性には、この実験以前にすでに同じ現象が観察されていた（今回の日間変動の研究には含まれていない）。彼は急性咽喉炎を合計 5 日間患っていた。この 5 日間（n=5）のデータを、残りの正常範囲（アンケートでの回答で体調が正常だった日、後述の 2 番目の病気を除いた n=29）のデータと比較すると、CL-O<sub>2</sub><sup>-</sup>、FL-OCl<sup>-</sup>、好中球数が有意に増加していることがわかった（CL-O<sub>2</sub><sup>-</sup>と好中球数 : P<0.01、FL-OCl<sup>-</sup> : P=0.017）。

133 日目以降、アンケートで胃痛を訴え続けた。154 日目、クリニックで胃腸炎と診断され、H2 ブロッカーが処方された。155 日目、157 日目に薬を服用した。この 7 日間

(133-157 日目、n=7) のデータを正常範囲 (n=29) と比較すると、CL-O<sub>2</sub>・、FL-OCI、好中球数が有意に増加していた (いずれも P<0.01)。

#### 4-1-3-4 身体活動とウイルス感染が血中 O<sub>2</sub>・および OCI に及ぼす影響。54 歳女性のケーススタディ

この女性は運動として歩くことが好きで、歩数計で毎日の歩数を記録していた。過去 2 年間の 1 日の平均歩数は 6195 歩であった。休日や週末には旅行に出かけ、普段の 1.5~3 倍ほど歩くこともあるとのことだった。153 日目は 17475 歩、154 日目は 8695 歩、188 日目は 12267 歩、189 日目は 11834 歩を歩いた。155 日目と 190 日目、つまり普段より多く歩いた日の翌日に、血中の O<sub>2</sub>・と OCI が著しく高くなっていることがわかった (図 4-8F、a、b、矢頭)。両日とも好中球数は平常時の約 1.5~2 倍に増加していた (図 4-8F、a: 155 日目、b: 190 日目)。CRP は更にその翌日がピークでそれ以降は減少した。この場合も、CL-O<sub>2</sub>・、FL-OCI、好中球数は CRP より早く増加していた。35 歳男性の急性咽喉炎 (図 4-8A、a) と同様である。

また、アンケートによると、実験中に 2 回ほどウイルスに感染したことがあった。そのうちの 1 回、172 日目にクリニックでインフルエンザと診断され、その後 4 日間寝込んだ。回復後の 4 日間 (176-179 日目、n=4) CL-O<sub>2</sub>・が著しく低かった (図 4-8F、c、アスタリスク)。好中球数は平均の 50% 以下に減少し、CRP も検出された (4 mg/L)。診断を受けてから 10 日後、好中球数と CL-O<sub>2</sub>・は正常値付近に戻り、CRP 値も低下した (図 4-8F、c)。この 176-179 日目の 4 日間のデータと平常時 (アンケートで体調に問題がなかった時: n=47) のデータを比較すると、CL-O<sub>2</sub>・と好中球数が有意に減少していることがわかった (P<0.01)。一方、FL-OCI は減少傾向を保ったままであった。

また、アンケートで訴えがあったもう一つのウイルス感染については、88 日目に下痢と嘔吐があったとのことである。感染後 5 日間のデータ (91-94 日目: n=4) と平常時のデータ (n=47) を比較したところ、CL-O<sub>2</sub>・、FL-OCI、好中球数が有意に減少していた (CL-O<sub>2</sub>・: P<0.01、FL-OCI: P=0.05、好中球数: P=0.04)。

#### 4-1-3-5 季節性花粉症が血中 O<sub>2</sub>・および OCI に及ぼす影響。35 歳女性、42 歳女性、43 歳男性のケーススタディ

図 4-8B の 35 歳女性、図 4-8D の 42 歳女性、図 4-8C の 43 歳男性は、其々 93 日目以降、60 日目以降、81 日目以降、複数回、花粉症の症状を訴えた。アレルギー症状のある時期には、3 人とも CL-O<sub>2</sub>・、FL-OCI および好中球数の値が多少異なっていた。つまり、CL-O<sub>2</sub>・と FL-OCI の変動幅が大きくなっている (図 4-8B-D)。そこで、これらのボランティアの CL-O<sub>2</sub>・、FL-OCI、好中球数を症状の有無で比較した。

42 歳女性がアレルギー症状を自覚した時点 (図 4-8D の 60 日目) では、FL-OCI はすでに正常値を上回っていたが (P<0.01) CL-O<sub>2</sub>・と好中球数は一時的に増加しただけで、そ

の後正常範囲に戻った (CL-O<sub>2</sub>\* : P=0.46、好中球数 : P=0.14)。35 歳女性 (図 4-8B) では、FL-OCI が 2 週間かけてゆっくりと増加し (93 日目から 107 日目)、わずかながら CRP 検出された (1-2 mg/L)。一方、CL-O<sub>2</sub>\* と好中球数は、この間、正常範囲内あるいはそれに近い値で推移した。108 日目にクリニックで咳喘息と診断され、症状緩和のための薬剤が処方された。114 日目、CL-O<sub>2</sub>\* と好中球数は著しく低下し、FL-OCI は薬物療法によりほぼ正常値に戻った。しかし、症状は消えず、CRP は 4 mg/L で検出された (図 4-8B)。121 日目には CRP は検出されなくなり、症状も改善された。

#### 4-1-3-6 CRP 高値のボランティアのケーススタディ

このボランティアは 52 歳の男性で、実験中、すべての日に CRP が検出された。図 4-8E に日間変動データを示した。CRP は肝臓に何らかの炎症が起きていることを示しているが、CL-O<sub>2</sub>\*、FL-OCI、好中球数の平均値は、CRP を検出しなかった 42 歳女性とほぼ同じレベルであった。そこで、Corr (CL-O<sub>2</sub>\*、CRP)、Corr (L-OCI、CRP)、Corr (好中球数、CRP) を分析した。その結果、Corr (FL-OCI、CRP) は正の相関有 (R=0.490)、Corr (CL-O<sub>2</sub>\*、CRP) と Corr (好中球数、CRP) は其々弱い負の相関有 (R=-0.210、R=-0.392) であることが判明した。

次に、CL-O<sub>2</sub>\*、FL-OCI、好中球数について、CRP が基準値 (3 mg/L) を超えた日 (21 日目、78 日目、102 日目、103 日目) について検証した。CRP が 5 mg/L を示した 21 日目の 4 日前に風邪をひいており、FL-OCI だけが正常範囲よりわずかに高かった。CRP が 8 mg/L の 78 日目の時は、4 日前に発熱し、クリニックで風邪と診断されたとのことだった。だが、好中球数、CL-O<sub>2</sub>\* が平常時より低いことから、風邪ではなく、より悪性のウイルス感染症であった可能性がある。101 日目は腹痛があったとのことで、その翌日の 102 日目には CRP が 6 mg/L に上昇していた。その翌日の 103 日目も 4 mg/L と高値のままであった。この日の好中球数は正常範囲と変わらなかったが、CL-O<sub>2</sub>\* と FL-OCI がやや高値を示していた。

#### 4-1-3-7 正常時の O<sub>2</sub>\* および OCI、好中球数

これまで、6 名のボランティアの方々の事例を紹介したが、その方々は、時折、体調を崩すことはあったが、ほとんどの場合、通常健康な状態であった。時折、体調を崩すことがあった。そこで、アンケートで何等かの訴えがあった日を除く正常な状態での日間変動のみに着目した。それらの CV、いわゆる揺らぎは、CL-O<sub>2</sub>\* は 0.05~0.18、FL-OCI は 0.12~0.19、好中球数は 0.10~0.17 であった。これらは、いずれも同じ程度の範囲内で揺らいでいた。

次に、それらの正常時での揺らぎの原因を探るために、正常時のみの Corr (CL-O<sub>2</sub>\*、好中球数) と Corr (FL-OCI、好中球数) を解析した (表 3、右)。この表から、一部の例外 (43 歳男性の O<sub>2</sub>\* と OCI、52 歳男性の OCI) を除いて、正常時のみの O<sub>2</sub>\* と OCI は、

全データの場合よりも好中球数との相関が低かった（表 3 左、右）。予想通り、ストレス状態、即ち健康 / 正常時以外における  $O_2\cdot^-$  と  $OCI^-$  は、ほとんどの場合、全データ範囲の場合よりも好中球数と高い相関を示した（表 3、中、43 歳 / 男性の  $O_2\cdot^-$  と  $OCI^-$  と 35 歳 / 男性の  $OCI^-$  を除く）。

#### 4-1-4 考察

今回得られた結果から、以下の 2 つの重要な知見が示された。(1) 新しい CL/FL 同時測定システム (CFL-H2200/2400) は、より高感度で長時間安定した血液サンプル計測に最適であることが確認できた (図 4-1、3)。(2) 健康状態における血液中の好中球の数や  $O_2\cdot^-$ 、 $OCI^-$  の産生量の変動幅、および体調の変化と産生量の間関係を明らかにすることができ、白血球の活性が健康状態と不健康状態を区別することができるかどうかという問題に対する洞察を得ることができた。

これまで、CL/FL 同時計測プロジェクトでは、3 種類のシステムを開発した (図 4-2、表 4-1)。各装置は、その特性や要求に応じて使い分けられる (表 4-1)。スライドグラス式は高感度であるが、血液サンプルの測定には、気流混合による信号の乱れ、バイオハザードの危険性、気流調整の熟練が必要という欠点がある。そこで、血液測定に適した流体チップタイプの薄型計測容器を新たに考案し、流体チップ型容器にフィットする CL/FL 同時測定光学系ユニット (CFL-H2200/2400) に必要な改造を行った。透過型 FL よりも表面反射型 FL の検出に適した光学系 (検出器と同じ側からの励起) を選択した。光学フィルターを介して直接 PMT に入射する強い励起光を除去することが困難であることに加え、赤血球などの吸収成分によって励起光や FL の一部が遮断される可能性があり、S/N 比が悪化する可能性があるため、透過 FL の検出は避けるべきと考えたからである。検出領域には常に必要最小限の白血球が存在するように、計測容器の大きさ、血液量、希釈倍率を慎重に検討した。具体的には、分離好中球による細胞試験の結果から、検出領域 (LED 照射領域と同じ、直径約 10 mm) 内に約  $5 \times 10^2$  個の好中球があれば、十分な CL および FL 信号が得られることがわかった。実際の健康な血液サンプル (3  $\mu\text{L}$ ) を 250 倍に希釈した場合、検出領域内の推定細胞数は  $0.78 \times 10^3 \sim 2.89 \times 10^3$  であり、これは、信頼性の高い測定を行うには十分な数であることがわかった。このようにして、十分なシグナルを得るための最適条件、即ち、最終的に決定した流体チップ型容器サイズでの血液 3  $\mu\text{L}$  の 250 倍希釈を決定することができたのである。こうした努力の結果、自己採血できる少量の血液で評価可能な新システムを実現することができた。CFL-H2200/2400 システム は、スライドグラス式に比べ、約 3 倍の感度を持つことが判明した。そのため白血球由来の  $O_2\cdot^-$  と  $OCI^-$  を長時間安定して測定でき、S/N 比も大きくなった (図 4-5B、4-6B)。これは、流体チップ型容器内にスターラーバーと攪拌空間を設けることで、攪拌効率を向上させたことが大きな要因である。また、ポンプ部と測定部を分離することで、信号の揺らぎを抑え、S/N を大幅に改善することができた。更に、 $OCI^-$  との APF 反応後に生成するフルオレセ



イン分子は安定であるため、FL-OCIの値を既報の [10]における AUC から FL<sub>MAX</sub>-FL<sub>BASE POINT</sub> (図 4-4: 'a-b') に変更し、より正確に評価できるようにした。

今回開発したシステムを用いて、6 人の健常者の O<sub>2</sub><sup>•-</sup>信号 (= CL-O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) と OCI 信号 (= FL-OCI) の強度変化を数ヶ月にわたって日々明らかにすることができた (図 4-8)。その結果、各被験者が其々固有の信号レベルを持つことがわかった。被験者の数ヶ月間の健常時の信号レベルは、CV 0.20 以内で変動していた。体調に異常が発生した場合、シグナルは正常な状態の揺らぎレベルから大きな変動として観察された。図 4-8 の矢印やアスタリスクのように、正常な変動範囲から大きく逸脱していることがわかる。この大きな変動は、好中球数の増減とほぼ相関していた。2 つの信号のうち、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>シグナルは好中球数との相関が高いことがわかった (表 4-3、左、中)。このことは、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>は好中球が刺激された時の一次代謝物であるという事実によるものと思われる [7, 8]。

次に、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>と OCI のシグナルを、それらの細胞の産生能力と比較した。O<sub>2</sub><sup>•-</sup>と OCI シグナルには、好中球の数の情報に加えて、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>と OCI を産生する細胞の能力に関する情報が含まれていることを、我々は以前に報告した [10]。そこで、好中球の単位数 (1 × 10<sup>3</sup> 個) あたりの値、即ち O<sub>2</sub><sup>•-</sup>産生量/単位と OCI 産生量/単位を算出することにより、細胞の活性酸素産生能力を検証することができるようになる。これらの産生能力パラメータは、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>および OCI シグナルと同程度の変動を示すが、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>および OCI シグナルよりも個人への依存度が低いことがわかった。

そして、この産生能力パラメータと O<sub>2</sub><sup>•-</sup>および OCI シグナルの関係を、3 つの体調コンディションに分けて相関解析した。即ち、Corr (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>産生量/単位) と Corr (OCI、OCI 産生量/単位) について、全データ (表 4-4 左)、正常時のみのデータ (表 4-4 右)、正常時以外のデータ (表 4-4 中) での相関を解析した。相関係数はボランティアによって異なっていた。表 4-4 左の全データでは、35 歳女性を除いて、Corr (OCI、OCI 産生量/単位) は Corr (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>産生量/単位) よりも高かった (表 4-4 左)。体調による好中球数の変動が大きかった 35 歳男性、42 歳女性、54 歳女性の場合、Corr(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>産生量/単位) は、いずれもゼロか非常に小さい値となった。正常時のみのデータでは、すべてのボランティアで Corr(OCI、OCI 産生量/単位) が Corr(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>産生量/単位) よりも高かった (表 4-4 右)。この結果は、OCI が、好中球内の活性酸素産生スキームにおいて二次代謝物 [8, 16] であり、より細胞反応に依存していることを反映しているものと考えられる。更に、正常時のみのデータでは、Corr (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>生産量/単位) および (OCI、OCI 生産量/単位) (表 4-4 右) は、先の 4-1-3-2 項で示した Corr (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>、好中球数) および Corr (OCI、好中球数) (表 4-3 右) より高く、正常時の O<sub>2</sub><sup>•-</sup>および OCI 信号の微細な変動は、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>と OCI の細胞内活性酸素産生能の変動に由来していると考えられた。

表 4-4 CL-O<sub>2</sub><sup>•-</sup>と O<sub>2</sub><sup>•-</sup>産生能との相関 FL-OCI<sup>-</sup>と OCI<sup>-</sup>産生能との相関

	CL-O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> and FL-OCI <sup>-</sup> vs O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> and OCI <sup>-</sup> production / unit					
	total		stressed		normal	
	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	OCI <sup>-</sup>	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	OCI <sup>-</sup>	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	OCI <sup>-</sup>
35 y/o male	<b>0.262</b>	<b>0.733</b>	<b>0.332</b>	<b>0.139</b>	<b>0.376</b>	<b>0.675</b>
35 y/o female	<b>0.831</b>	<b>0.619</b>	<b>0.921</b>	<b>0.535</b>	<b>0.597</b>	<b>0.608</b>
43 y/o male	<b>0.753</b>	<b>0.786</b>	<b>0.767</b>	<b>0.720</b>	<b>0.744</b>	<b>0.811</b>
42 y/o female	<b>0.074</b>	<b>0.608</b>	<b>0.080</b>	<b>0.455</b>	<b>0.581</b>	<b>0.734</b>
52 y/o male	<b>0.704</b>	<b>0.734</b>	<b>0.969</b>	<b>0.388</b>	<b>0.645</b>	<b>0.664</b>
54 y/o female	<b>0.011</b>	<b>0.371</b>	<b>-0.332</b>	<b>0.112</b>	<b>0.429</b>	<b>0.732</b>

次に、細胞内活性酸素産生能とボランティアの体調との関係を調べた。図 4-9A は、その代表例として 52 歳男性の、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>産生量/単位（実線）、OCI<sup>-</sup>産生量/単位（破線）、好中球数（実線）、CRP（実線）の日間変動の散布図である。最初に、好中球の二次反応である OCI<sup>-</sup>産生量/単位に着目した。上記の例では、CRP が高値を示すと、OCI<sup>-</sup>産生量/単位も高値を示している。CRP が 4 mg/L 以上となった 4 日間（n=4）のデータと正常なデータ（n=21）を比較すると、OCI<sup>-</sup>産生量/単位が有意に増加することが明らかになった（P<0.01）。一方、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>産生量/単位では違いが見られなかった（P=0.71）。また、好中球数とは無関係に CRP が高値を示した場合、急性咽頭炎発症日（35 歳男性、図 4-8B）、過度の運動・風邪の日（54 歳女性、図 4-8C、D）、咳喘息の日（35 歳女性、図 4-8E）では、ほぼ全員が OCI<sup>-</sup>産生量/単位が高値で推移していることがわかった。これらの結果は、OCI<sup>-</sup>産生量/単位が炎症と強く関連していることを示唆している。これは、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）が炎症と関連しているという多数の既報とも一致した [5, 6, 7, 17]。より詳細な説明は以下の通りである。インフルエンザ（54 歳女性）および咳喘息（35 歳女性）の場合、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>シグナルは好中球とともに著しく減少していたが OCI<sup>-</sup>シグナルは正常範囲から大きく逸脱することはなかった（図 4-8B、F、c）。これらの場合では、細胞の OCI<sup>-</sup>産生能が多少とも亢進していることを示唆している。胃腸炎を起こした 35 歳男性の場合、CRP は検出されなかったが、OCI<sup>-</sup>産生量/単位が有意に（P<0.01）増加しており（データなし）、このボランティアは好中球の過剰活性化により胃腸炎を起こしたことが示唆された。35 歳および 42 歳の女性に花粉症の症状が出ている場合、OCI<sup>-</sup>産生量/単位

は正常範囲から有意に増加していた（35 歳女性：P=0.03、42 歳女性：P=0.02）。また、43 歳男性では、OCI-産生量/単位が増加傾向を示した。これらの結果は、アレルギー性鼻炎やアレルギー性喘息患者が対照群に比べ MPO を多く放出するというこれまでの報告と一致している [18, 19]。

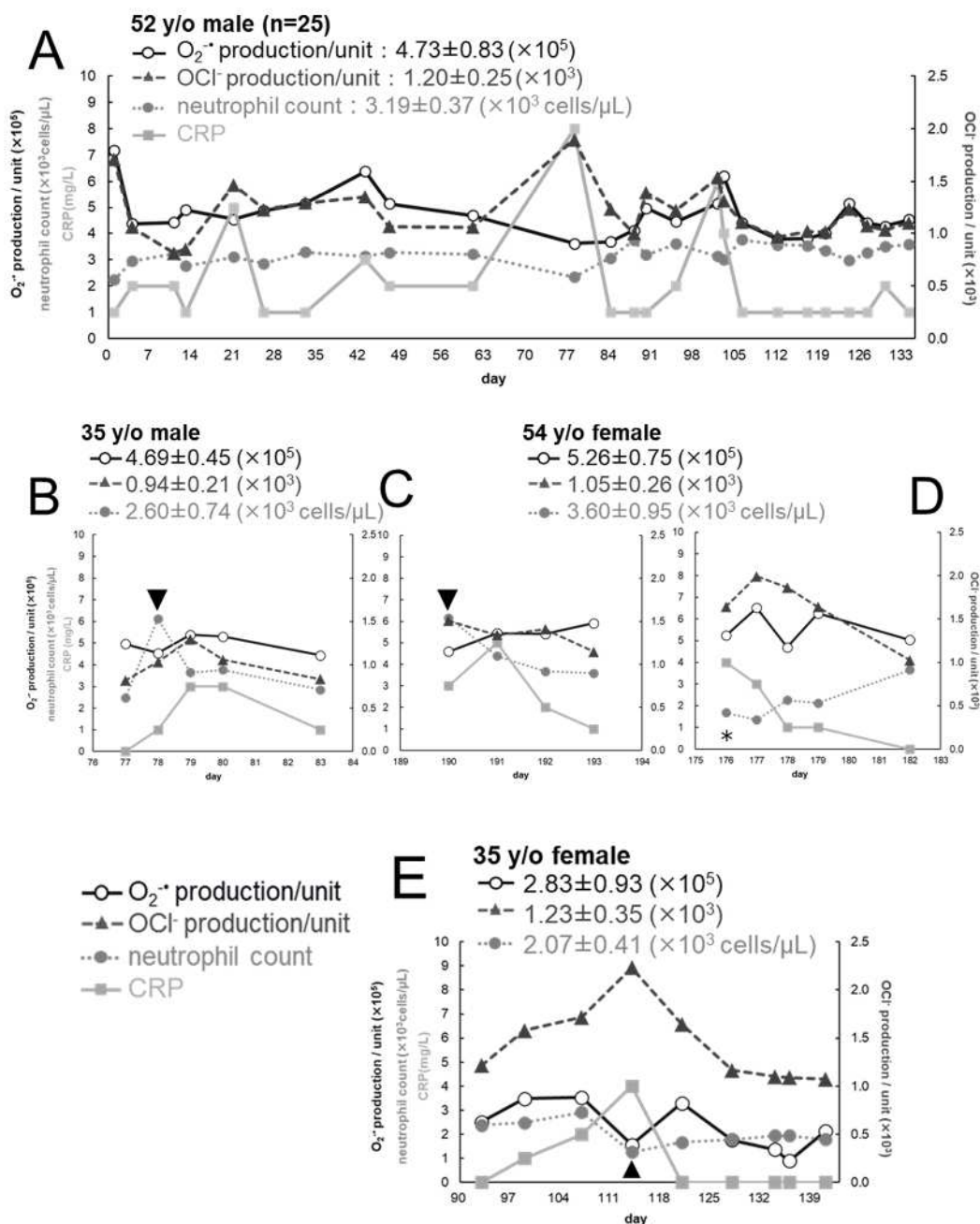


図 4-9 細胞内活性酸素産生能の日間変動 [1]

次に、好中球の一次反応を解析した。急性咽喉炎時（35 歳男性、図 4-9B、矢頭）および運動後（54 歳女性、図 4-9C、矢頭）では、好中球数は急激に増加していて、O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生

量/単位は減少する傾向があった。Peake と Suzuki は、運動が好中球の活性酸素を増加させることを報告している [20]。我々の研究では、 $O_2\cdot$ シグナル、 $OCI$ シグナル、および好中球数は、いずれも運動後に増加していた (図 4-8F)。 $O_2\cdot$ 産生量/単位の減少は、細菌感染や運動による好中球の急激な動員によって、辺縁部や骨髄プールの未熟な好中球が動員された可能性を反映しているのかもしれない。

もう一つの重要な発見は、従来の炎症マーカーである CRP と活性酸素シグナルの時間的な関係である。連日測定した場合、 $O_2\cdot$ と  $OCI$ シグナルの大きな変動は、CRP よりも早く検出された (図 4-8A、a、F、a、b)。免疫反応の初期は好中球の動員であり その結果、インターロイキン (IL) -6 の産生が誘導され、肝臓での CRP 合成を促進する [21, 22]ことから、ROS と hROS は酸化ストレスの「基質」、CRP は「その産物」とみなすことができる [10]。女子大生 12 名を対象とした脂肪負荷試験 (承認番号 H-87 浜松ホトニクス株式会社中央研究所倫理委員会承認) において、 $O_2\cdot$ および  $OCI$ の産生は脂肪摂取後 2 時間でピークに達し、その後減少したが、IL-6 の産生は 2 時間後からゆっくりと上昇し始め、6 時間後に実験を終了するまで上昇し続けた (データ未掲載)。これらの結果は、血中、特に好中球の  $OCI$ 産生が開始すると、それに続いてマクロファージによる IL-6 が産生され、そして肝臓での CRP 合成が起こるといった実験的証拠である。

また、本研究では、白血球の活性化が疾患の本格的な症状が現れる前に起こることが示唆された。35 歳男性の咽頭炎の例では、発熱などの症状よりも早く、著しい活性酸素産生量の増加が観察された。このエピソードは、一見健康そうに見える半日ほど前に、確実に活性酸素の産生量の増加が症状として現れていることを明確に示している。また、この実験には含まれていないが、全く症状のない健康な女性被験者の活性酸素の発生量が、通常の数倍になっていたという事例がある。その数時間後、女性被験者は突然体調を崩し仕事を早退することになった。しかし、これらは軽微なケースであり、健康な人が頻りに採血をすることは、有用であるにもかかわらず、負担が大きすぎる可能性がある。一方、糖尿病や糖尿病予備軍などの慢性疾患を患っている人は、体調チェックのために採血を頻りに行うことを許容するのかもしれない。実際、糖尿病性腎症モデルラットの場合、週齢が上がるにつれて、活性酸素の産生量が増えていることが確認されている。更に、血糖値が上昇する前の 5 週齢の時点で、すでに活性酸素の産生量がコントロールラットよりも多かったというデータがある。(データ未掲載、承認番号: HPK-2019-13B、浜松ホトニクス株式会社中央研究所動物実験安全部会承認)。今後の日常の健康チェックにおいては、一般人が不必要な採血を避けながら健康を維持するためには、採血のタイミングや頻度が重要であると思われる。

今回の研究により、活性酸素シグナルが従来の病気発症や自覚症状よりも早期に、酸化的なバランスの崩れた状態を検出できることが確認された。更に、個人の活性酸素シグナルの正常値とその変動は、好中球数だけでは正確に説明できない、好中球活性や内在性抗酸化物質の影響を含む酸化と抗酸化のバランスを反映していたのではないかと考えている。

また、細胞内の活性酸素産生能に関する情報は  $O_2^{\cdot-}$  シグナルよりも、二次代謝産物である  $OCI^-$  シグナルにより強く反映されている。これらの結果は、この方法が、通常の好中球数の変動には表れない、微妙な体調の変化を検出している可能性を示唆している。例えば、図 4-8 では、アンケートで取り上げたデータに含まれない日でも、 $O_2^{\cdot-}$  と  $OCI^-$  のシグナルが上昇していることがあり、これは、本人の自覚がない体調の変化や精神的ストレスが原因である可能性がある [23]。この研究結果を更に検証するために、現在、横断的および縦断的な研究を実施し、3年半で5000例以上のデータを蓄積しているところである。今後は、層別の基準範囲を設定し、主に慢性疾患を対象とした疾患の早期診断の可能性を検討していく予定である。

現在の薄型専用容器方式をベースに、市民センター、ドラッグストア、スポーツクラブなど様々な施設において、専門家でなくても簡単に操作できるより安価なシステムの開発を進めている。このような普及価格帯のシステムは、従来のマーカーである CRP に代わり、炎症性疾患の診断のための POCT (Point of Care Testing) [24, 25] に利用できる可能性がある。最近、好中球細胞外トラップ (NETs) が COVID-19 患者の重症度予測に利用できることが報告されており [26]、このようなシステムは、患者発見のための一次スクリーニングだけでなく、ベッドサイドでのモニタリングにも応用できる可能性が示唆されている。更に、炎症性疾患患者を対象とした新たな臨床研究において、疾患の進行に伴い、刺激から活性酸素シグナル上昇までのタイムラグがやや増加し、活性酸素シグナル強度が多少低下する傾向にあることがわかってきた。慢性的な炎症状態にさらされた好中球は、さらなる刺激に対する反応が鈍くなるのではないかと推測している。現在、このメカニズムの解明を試みている。活性酸素シグナルのピークや上昇点の情報は、未病のマーカーとして有用であり、体調の微細な変化をより正確かつ迅速に察知できるようになるかもしれないと期待している。

## 4-2 ヒト横断研究

本研究は、自然免疫制御技術研究組合との共同研究により実施したものである (承認番号: H-101 浜松ホトニクス株式会社中央研究所倫理委員会承認)。

### 4-2-1 方法

研究協力に同意いただいた健診受診者 1000 名について、本章で開発した好中球活性評価システムにて、好中球活性評価を実施した (試薬、測定方法は、全て 4-1-2 に記載した方法と同様)。同時に健診の身体情報と生化学検査項目情報の提供を受け、これらとの関連性を検討すると共に、健常者を抽出し基準範囲を設定した。

#### 4-2-2 基準範囲算出

最初に問診票を確認し、以下に該当する被験者を除外した（1次除外）。

- 1) 服薬中である。
- 2) 治療中の病気がある。
- 3) 妊娠している、授乳中である。
- 4) 採血前 10 時間以上絶食していない。

その結果、被検者数は 735 名（74%）となった。

次に、2 次除外として、潜在異常値除外法 [27]を参考にして、各生化学検査項目とのクロス集計を行い、関連がある生化学検査項目の異常値被験者データを除外した。具体的には、各検査項目の基準範囲外のデータ数が 10 以上あるもののみとし、関連異常値率で有意差あり（有意水準 95%）を満たすものを除外した。関連異常値リストを図 4-10 に示した。

		n=	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	OCI <sup>-</sup>
BMI	Total	730	0.62918	0.031603
	(-)	75		
	(+)	150		
WBC (白血球数)	Total	590	2.63E-23	7.08E-25
	(-)	12		
	(+)	24		
ヘモグロビン	Total	727	0.789711	0.004726
	(-)	59		
	(+)	27		
尿素窒素	Total	252	0.016574	0.416024
	(-)	10		
	(+)	5		
血糖	Total	722	0.924526	0.017261
	(+)	130		

図 4-10 関連異常値リスト

2 次除外後の被検者数は、O<sub>2</sub><sup>•-</sup>産生 685 名（69%）、OCI<sup>-</sup>産生：369 名（37%）となった。O<sub>2</sub><sup>•-</sup>と OCI<sup>-</sup>其々について、調整 Box-Cox べき乗変換法により正規分布化した [28]。得られた正規分布曲線から、両側 2.5%を除外した 95%を基準範囲とした（図 4-11、4-12）。

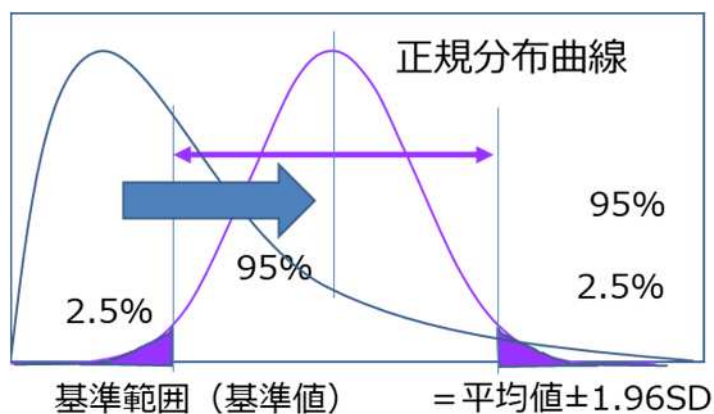


図 4-11 正規分布曲線と基準範囲

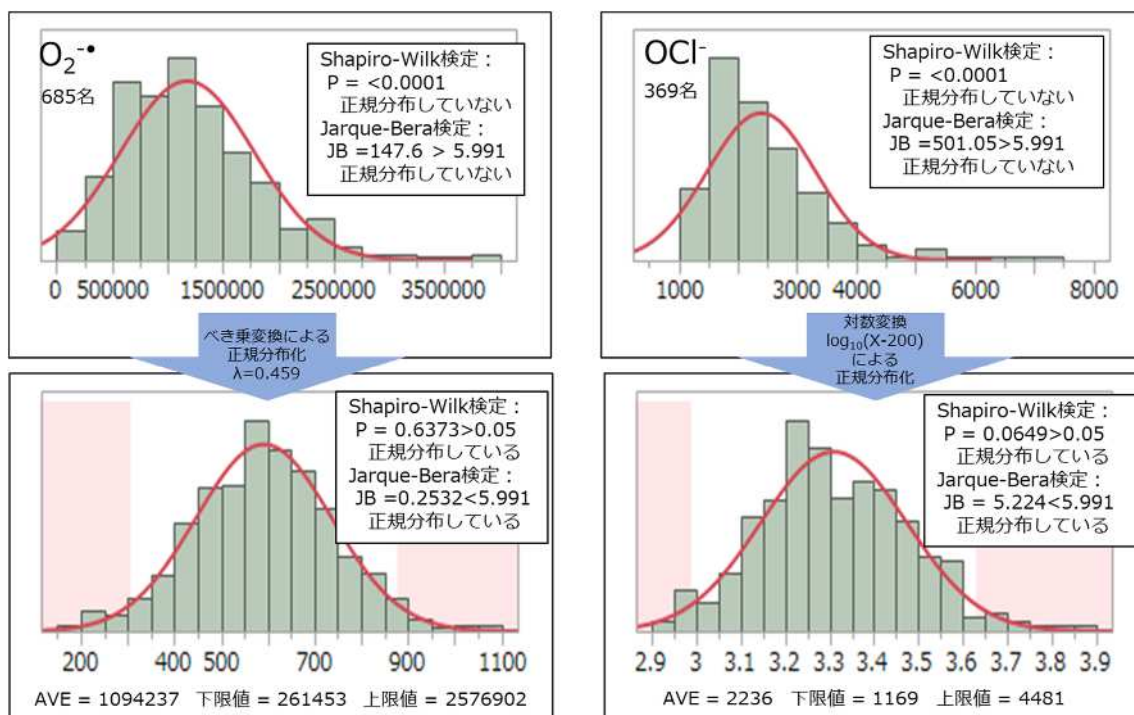


図 4-12 O<sub>2</sub><sup>-</sup>とOCI<sup>-</sup>の正規分布化

#### 4-2-3 生化学マーカー、生活習慣等との関連性

初めに、前項の 2 次除外後の健常者を対象に、性差と年齢差があるかを検討した。結果を図 4-13 に示す。

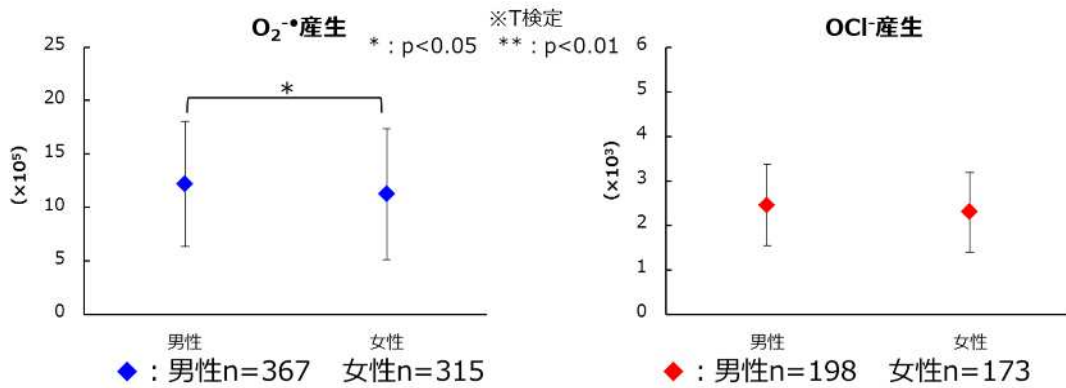


図 4-13 O<sub>2</sub><sup>-</sup>と OCIの男女比較

O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生でのみ男女間で有意差が見られ、男性の方が若干高いという結果となった。一次代謝物の O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生なので、好中球数に由来するとも考えられたが、体内での産生にホルモンの関与がない白血球数は、男女でほぼ同数とされている。白血球は個人差が大きい検査値であるため、今後数を増やして検証する必要がある。

次に、年代差について検討した。対象は 2 次除外の健常者で行った。結果を図 4-14 に示す。

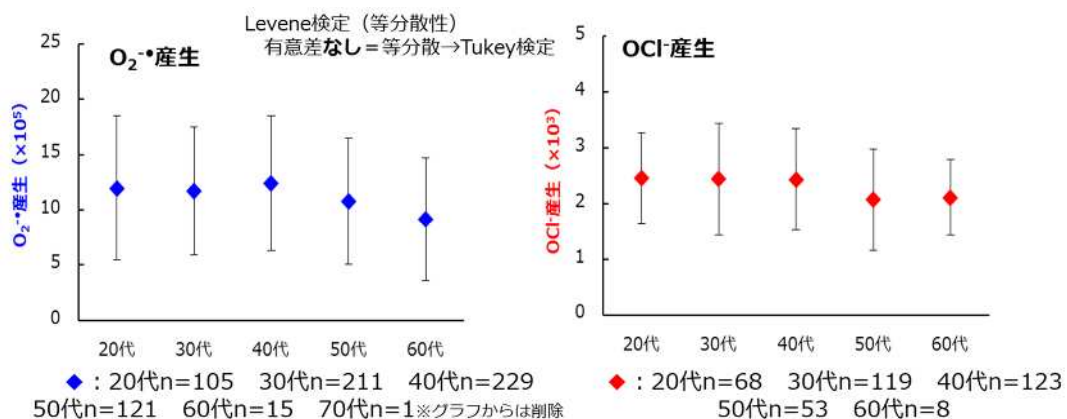


図 4-14 O<sub>2</sub><sup>-</sup>と OCIの年代別比較

4-1 で概説した縦断研究では、年齢が上がるごとに O<sub>2</sub><sup>-</sup>と OCIの産生量が多くなる傾向が見られていたが、本検討では 50 代と 60 代では、逆に減少する方向となっていた。

協力いただいた 1000 名の方のデータを対象として生化学検査項目との関連性を検討した。ただし、被検者ごとに受診項目が違うため、トータルは 1000 にはなっていない。



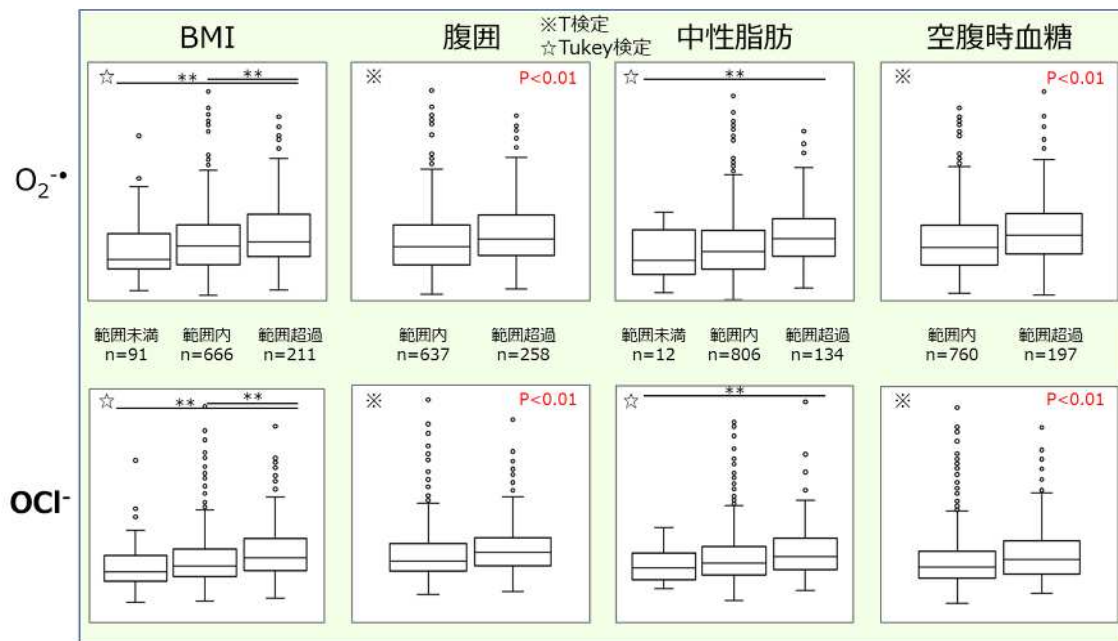


図 4-15 生化学検査項目との関連性 (メタボ指標)

生化学検査項目の基準範囲未満、内、外で其々O<sub>2</sub><sup>-</sup>とOCI<sup>-</sup>の産生量を比較したところ、メタボ指標の中で図 4-15 に示した 4 項目に関して有意差が得られた。ただし、中性脂肪では基準範囲未満と基準範囲超過との間の有意差であり、正常範囲内との間では有意差はなかった。中央値を見ると段階的に上がってはいるが、LDL でも有意差は見られなかったことから、脂質関連は関連性が低い可能性がある。BMI、腹囲のメタボ指標や、糖尿病マーカーである空腹時血糖で関連性が確認されたことから、本評価が未病マーカーとなり得る可能性が示唆された。更に、これらのマーカーは必ずしも白血球数と相関しないため、本評価は白血球数では検出できない生体内現象を検出できているとも考えられる。

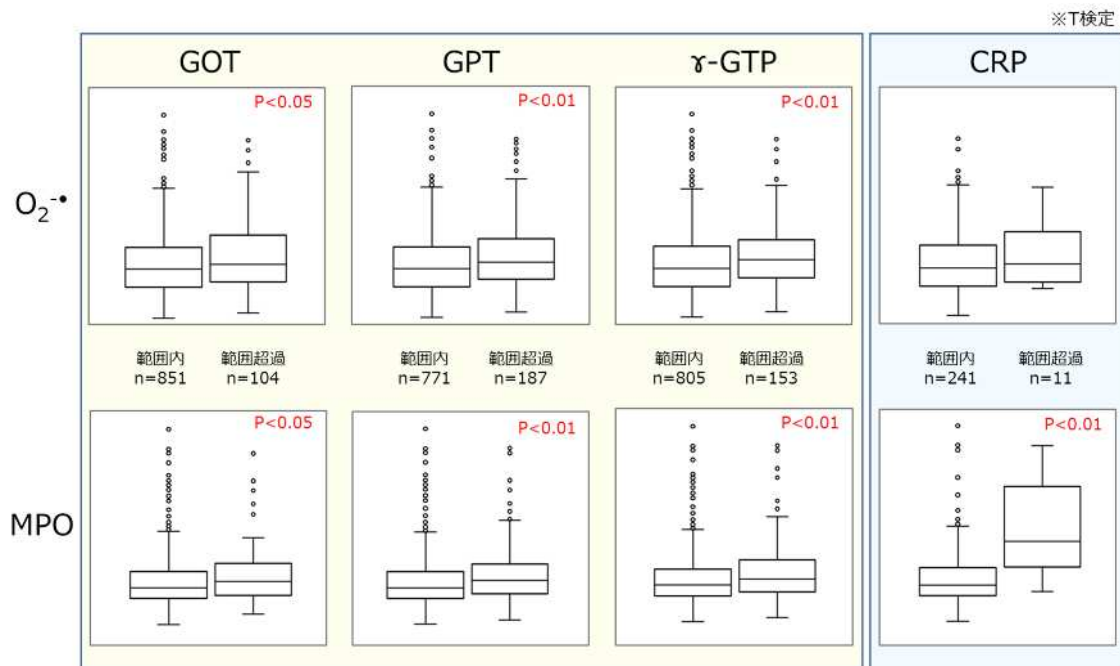


図 4-16 生化学検査項目との関連性 (肝機能・炎症マーカー)

肝機能マーカーでは、どの項目も O<sub>2</sub><sup>-</sup>と OCl<sup>-</sup>産生量共に有意差が得られた(図 4-16)。炎症マーカーの CRP 値では、OCl<sup>-</sup>産生量で顕著な有意差が見られた。4-1 で得られた OCl<sup>-</sup>産生は炎症に関連しているという結果の裏付けとなる。

最後に生活習慣、疾患との関連性を検討した。

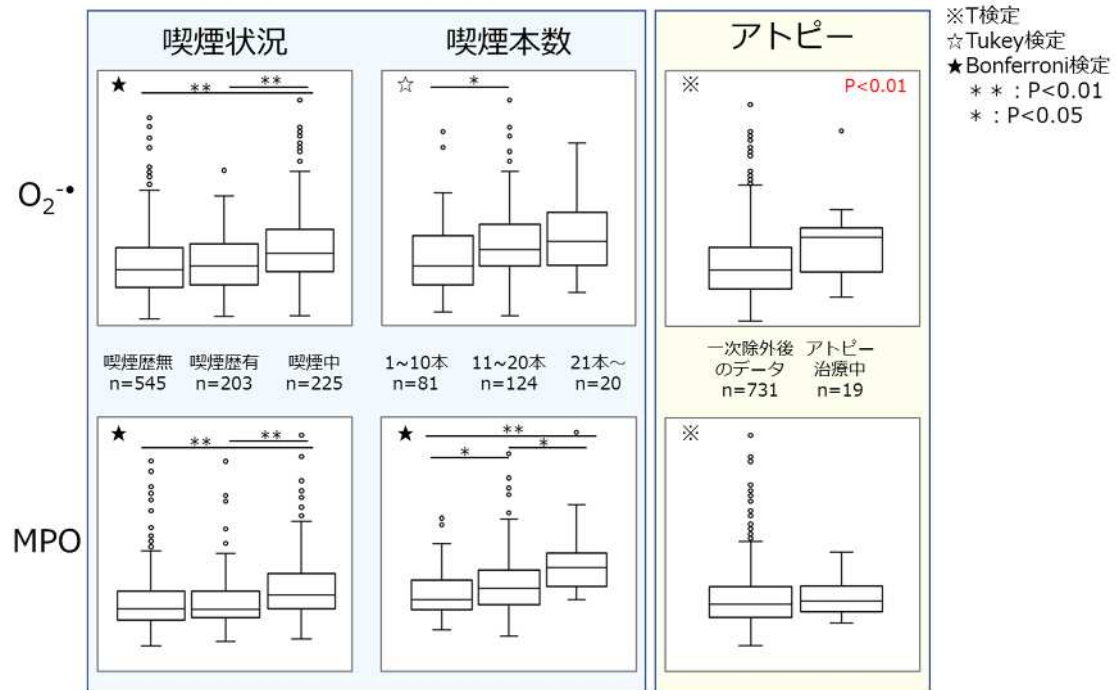


図 4-17 生活習慣・疾患との関連性 (喫煙・アトピー)

図 4-17 より、喫煙に関して、顕著な有意差が確認された。特に OCl<sup>-</sup> 産生量では、喫煙本数の違いでも有意差が得られ、かなり高い関連性があることがわかった。図 4-15、図 4-16 の生化学検査項目において、基準範囲内であっても O<sub>2</sub><sup>•-</sup> と OCl<sup>-</sup> 産生量が高い被験者が見られたが、喫煙等の影響があると考えられる。

#### 4-2-4 基準範囲を基にした個人データの検討

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> と OCl<sup>-</sup> 産生量の 2 つの指標を偏差値化し、各個人の値が基準値からどれくらい離れているかをグラフで視覚化してみた。図 4-18 に 6 名の例を示した。

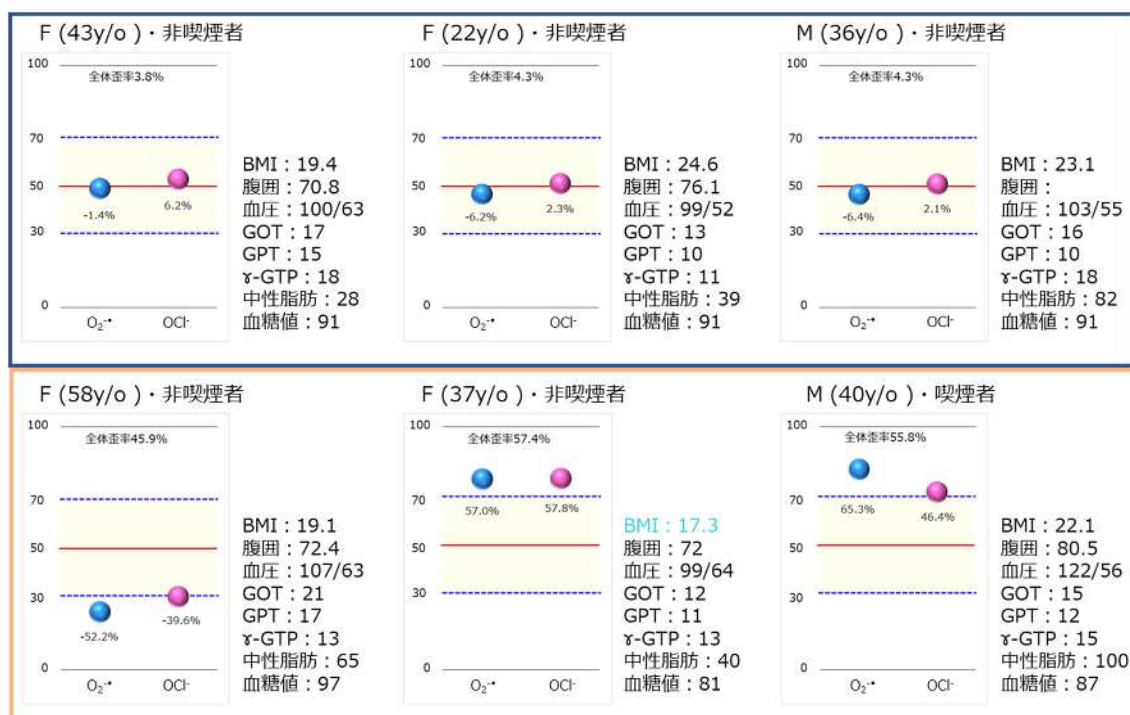


図 4-18 個人データと基準値との関係

ここで示した 6 名は、生化学検査項目において、下段中央の 37 歳女性の BMI が 17.3 であり基準範囲の 17.5 より若干少ないという異常があった以外は、異常値がなかった被験者である。上段 3 名は、O<sub>2</sub><sup>•-</sup> と OCl<sup>-</sup> 産生量共に偏差値 50 付近であり、従来の検査で得られた結果と同様に健康であると考えられる。それに対して下段の 3 名、左側の 58 歳女性は、O<sub>2</sub><sup>•-</sup> 産生量は下限値以下、OCl<sup>-</sup> 産生量も下限値ギリギリで、若干自然免疫力が弱っている状態と推測される。中央の 37 歳女性と 40 歳男性は、上限値を上回っており、過剰活性化、酸化ストレス状態にあることが懸念される。40 歳男性は、喫煙が影響していると考えられる。下段 3 名に関して、既存の検査では検出できない未病を検出できた可能性があるが、横断研究であり、追跡調査はできていないため、残念ながら詳細は不明である。

### 4-3 本章のまとめ

本章では、第3章で概説した *in vivo* 法の極微量血液による好中球活性評価システム CFL-P2200 プレパレート型の問題点を解決し、より高感度に安定性、再現性を向上させた新しいシステム CFL-H2200/H2400 薄型角セル型について述べた。CFL-P2200 と比較して、ユーザビリティが格段に向上した CFL-H2200/H2400 は、これまで多くのヒト臨床研究に利用されている。本章で概説した縦断・横断研究だけでなく、疾患患者対象研究では、動脈硬化患者カテーテル治療効果モニター試験（論文投稿中）、重症筋無力症患者横断試験（論文投稿中）、消化器系疾患患者試験（基準範囲との比較で OCI 産生量に関して有意差確認）に利用された。食品介入試験では、玄米介入試験（並行群間比較ランダム化クロスオーバー試験で、OCI 産生量に関して摂取前後で有意差確認）、ハトムギ介入試験（二重盲検並行群間比較試験：論文投稿準備中）、その他ムカゴやミカンジュースの介入試験にも利用された。本章でも少し記載したが、脂肪負荷試験では、脂肪摂取後2時間で OCI 産生量に関して摂取前と比較して有意に上昇が確認され、従来のマーカーでは検出が難しい食後一過性酸化ストレスが検出できている。また、サルによる手術侵襲後の経過観察や敗血症罹患サルにおいて、OCI 産生量の非常に顕著な上昇が確認され、炎症との関連性の更なる実証ができた。現在、PET 検診受診者の協力を得て、5000 データ以上の蓄積を目指して横断・縦断研究も実施中である。これにより、基準範囲の高精度化、層別化はもとより、従来マーカーや疾患、加齢等との関連性の解明を行う予定である。

微量血液中の好中球活性をより正確に評価するために、従来の好中球活性化指標である  $O_2^{\cdot-}$  産生と MPO 活性の2指標を、其々化学発光と蛍光の2種類の光信号で同時に検出できるシステムを構築した。このシステムを用いて複数のヒト臨床研究を行った結果、本章で報告したように、一次代謝物である  $O_2^{\cdot-}$  産生は好中球数の情報を主に反映していること、そして二次代謝物である OCI 産生量には好中球の質、つまり活性酸素産生能の情報を主に反映していることを明らかにすることができた。万病の元である炎症と大きく関連することを示す結果がたくさん得られた OCI 産生のみを計測する廉価版普及機の開発に、現在取り組んでいる。併せて計測キットの開発も進行中であり、一般ユーザーが健康チェックマーカーとして手軽に利用できるシステムに仕上げることも目指している。

第2章から第4章に渡って報告してきた好中球活性評価システムを、事業化していくための取組みについて、次章で概説する。

#### 第 4 章引用文献

- [1] Kazumura K, Takeuchi K, Hatano Y, Hara A, Miwa T, Hattori M, Kondo F, Morishita N, Tsuchiya H, Osawa T., "Correlation between human health and reactive oxygen species produced in blood: a long-term chemiluminescence and fluorescence analysis.," *Sci Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 14545, 2021.
- [2] S. H., "Oxidative Stress: Introductory Remarks.," in *Oxidative Stress*, pp. 1-8, 1985.
- [3] S. H., "Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine.," *Redox Biol.*, vol. 4, pp. 180-183, 2015.
- [4] L. V. I., "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification.," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 224, pp. 164-175, 2014.
- [5] Chami B., Martin N. J. J., Dennis J. M., Witting P. K., "Myeloperoxidase in the inflamed colon: A novel target for treating inflammatory bowel disease.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 645, pp. 61-71, 2018.
- [6] Glennon-Alty L., Hackett A. P., Chapman E. A., Wright H. L., "Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 125, pp. 25-35, 2018.
- [7] Hoffmann M. H. ,Griffiths H. R., "The dual role of Reactive Oxygen Species in autoimmune and inflammatory diseases: evidence from preclinical models.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 125, pp. 62-71, 2018.
- [8] Klebanoff S. J., Kettle A. J., Rosen H., Winterbourn C. C., Nauseef W. M., "Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 93, pp. 185-198, 2013.
- [9] Kazumura K, Sato Y, Satozono H, Koike T, Tsuchiya H, Hiramatsu M, Katsumata M, Okazaki S., "Simultaneous monitoring of superoxides and intracellular calcium ions in neutrophils by chemiluminescence and fluorescence: evaluation of action mechanisms of bioactive compounds in foods," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 84, p. 90–96, 2013.
- [10] Kazumura K, Takeuchi K, Hara A, Miwa T, Hattori M, Wu Y, Morishita N, Tsuchiya H, Osawa T., "Rapid on-site dual optical system to measure specific reactive oxygen species (O<sub>2</sub>-• and OCl-) in a tiny droplet of whole blood," *PLoS One*, vol. 13, no. 8, p. e0200573, 2018.
- [11] Kobayashi Y, Inagawa H, Kohchi C, Kazumura K, Tsuchiya H, Miwa T, Okazaki K, Soma GI., "Oral administration of Pantoea agglomerans-derived lipopolysaccharide prevents metabolic dysfunction and Alzheimer's disease-related memory loss in senescence-accelerated prone 8 (SAMP8) mice fed a high-fat diet.," *PLoS One.*, vol.

13, no. 6, p. e0198493, 2018.

- [12] Kobayashi Y, Inagawa H, Kohchi C, Kazumura K, Tsuchiya H, Miwa T, Okazaki K, Soma GI., "Oral administration of Pantoea agglomerans-derived lipopolysaccharide prevents development of atherosclerosis in high-fat diet-fed apoE-deficient mice via ameliorating hyperlipidemia, pro-inflammatory mediators and oxidative responses.," *PLoS One.*, vol. 13, no. 3, p. e0195008, 2018.
- [13] Zhang R., Inagawa H., Kazumura K., Tsuchiya H., Miwa T., Morishita N., Uchibori S., Hanashiro J., Masaki T., Kobara H., Soma GI., "Evaluation of a hypertensive rat model using peripheral blood neutrophil activity, phagocytic activity and oxidized LDL evaluation.," *Anticancer Res.*, vol. 38, pp. 4289-4294, 2018.
- [14] Pan Y., Karns K., Herr A. E., "Microfluidic electrophoretic mobility shift assays for quantitative biochemical analysis.," *Electrophoresis*, vol. 35, pp. 2078-2090, 2014.
- [15] Kazumura K, Yoshida LS, Hara A, Tsuchiya H, Morishita N, Kawagishi H, et al. , "Inhibition of neutrophil superoxide generation by shikonin is associated with suppression of cellular Ca<sup>2+</sup> fluxes.," *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 59, pp. 1-9, 2016.
- [16] Hampton M. B., Kettle A. J., Winterbourn C. C., "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing.," *Blood*, vol. 92, pp. 3007-3017, 1998.
- [17] Davies MJ, Hawkins CL, Pattison DI, Rees MD., "Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 10, pp. 1199-1234, 2008.
- [18] Kämpe M. et al., "Patients with allergic rhinitis and allergic asthma share the same pattern of eosinophil and neutrophil degranulation after allergen challenge.," *Clin. Mol. Allergy*, vol. 9, p. 3, 2011.
- [19] M. J., "Neutrophils and asthma.," *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, vol. 19, pp. 340-354, 2009.
- [20] Peake J, Suzuki K., "Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress.," *Exerc. Immunol. Rev.*, vol. 10, pp. 129-141, 2004.
- [21] Sproston N. R., Ashworth J. J. , "Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection.," *Front. Immunol.*, vol. 9, pp. 1-11, 2018.
- [22] D. S. P., "Cellular and oxidative mechanisms associated with interleukin-6 signaling in the vasculature.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, 2017.
- [23] Tsukamoto K., Machida K., "Effects of life events and stress on neutrophil functions in elderly men.," *Immun. Ageing*, vol. 9, pp. 1-5, 2012.
- [24] Pfäfflin A., Schleicher E. , "Inflammation markers in point-of-care testing (POCT).," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, pp. 1473-1480, 2009.

- [25] Millot G., Voisin B., Loiez C., Wallet F., Nseir S., "The next generation of rapid point-of-care testing identification tools for ventilator-associated pneumonia," *Ann. Transl. Med.*, vol. 5, pp. 1-9, 2017.
- [26] Barnes, B. J. et al., "Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps.," *J. Exp. Med.*, vol. 217, pp. 1-7, 2020.
- [27] 市原清志, "潜在基準値抽出法の理論とその検査情報学的意義," *臨床病理*, 第 卷 44, pp. 245-259, 1996.
- [28] 市原清志, *バイオサイエンスの統計学*, 南江堂, 1990.

## 第5章 社内ベンチャーによる事業実践に向けて

本章では、第2章から第4章で論じてきた細胞機能を利用した「食」の機能性機序解明ツールから未病評価までの一連の好中球活性評価システムの事業化について、社内ベンチャーにおける事業実践に向けた事業計画を立案し、事業化に踏み出すまでの取組みを概説する。

### 5-1 背景及び目的

筆者は、「光を使いこなす技術を開発して社会に役立てる」ことを理念として掲げる企業に、30代後半に研究者として入社した。前職はバイオ系の専門学校の教員で、講義や基礎の実験実習を担当していたので、異業種からの転職である。蛍光・発光同時計測技術のアプリ開発を担当した筆者は、好中球の自然免疫反応を *in vitro* で再現させて、それを「食」の評価に適用させることを目標として、細胞と真摯に向き合い試行錯誤を重ねた。その結果、第2章に記載した「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」を確立し、(公財)飯島藤十郎記念食品科学振興財団の食品技術賞の受賞に至った。所属企業にとって食品機能性分野は未知の領域で、ゼロからのスタートであったが、徐々に人脈が広がり、数多くの共同研究を実施して多くの成果を公表した。試作装置販売や受託計測にもつながり、顧客の満足感を肌で感じられたことから、事業化への意欲も芽生えた。更に、顧客との直接的な触れ合いからニーズを明確に捉えて、より利便性の高い *in vivo* 法の開発に挑戦することとして、内閣府戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)の第1期に応募し、採択に至った。SIPプロジェクトにおいて、筆者は機関代表者として他部署に渡るメンバーと密に連携を図り、課題を確実に遂行して第3章、第4章に記載した *in vivo* 法の開発に取り組み、計画以上の成果を挙げた。またコンソーシアムの副代表として代表をサポートし、15機関を取りまとめた。多くの社外活動を通じて、更に豊富な人脈を築くことができ、信頼関係を得ることができた。SIP期間中、多くの食や運動レシピ開発に携わっている研究者が、本開発システムに対し興味を持ち、高い評価を下さっている。事業化に向けて機は熟したと感じられた。しかし、スタートが遅かった筆者にとって、事業部移管による従来方法での事業化は、時間的に難しい状況となっていた。そのようなタイミングで、新たに社内ベンチャー制度が発足した。これまで培った人脈をフルに活用して、顧客と同じ研究者マインドも持っている開発者だからこそ可能な、顧客に寄り添うビジネスから始めて、大きな市場に展開を図っていくことを目指してチャレンジすることとした。

本章の目的は、第2章から第4章までに開発してきた、細胞機能を利用した「食」の機能性機序解明ツールから未病評価までの一連の好中球活性評価システムを、「未病ケア」「疾病予防」市場に広く普及を図るための実現性高い事業計画を立案し、事業化に挑戦することである。



## 5-2 顧客と市場規模の検討

### 5-2-1 開発システムの特長と2段階ビジネス

事業化を検討するにあたって、第2~第4章で述べた好中球活性評価システムについて整理した。本システムの最大の特徴は、体内の異変に最も早く反応する細胞の活性を簡単に捉えられることである。万病の元と言われている酸化ストレスや炎症状態を評価できる従来マーカーとの比較を以下の図5-1に示した。



図 5-1 好中球活性評価システムと従来マーカーとの比較

横軸は、その評価方法で、体内の異変が検出できるまでの時間を示している。赤血球中のヘモグロビンと糖が結合してできるヘモグロビン A1c (HbA1c) は、1~3ヶ月程前、炎症マーカーであるCRPは1~3日前の状態を反映すると言われている。これに対し、好中球は体内の異変に対し最も早く反応するため、本システムでの異変検出は他のどの方法よりも早い。縦軸には、操作の簡便性をプロットした。上に行くほど煩雑な操作が必要となる。左上にある好中球活性は、保険収載検査項目となっている従来の顆粒球機能検査法（好中球は顆粒球の一種、最も高い存在比率）である。この方法では、数mLの血液から好中球だけを取り出す専門的な技術と長い時間が必要とされ、煩雑であると同時に結果の信頼性も低いと言われている。これに対し開発システムは、3μLの血液を希釈するのみの操作で評価できる。自己採血も可能であり、いつでも、どこでも、だれでも！手軽に利用できることが最大の特徴である。

図5-1には記載していないが、他に未病状態を評価できるとされているものとして、遺伝子発現解析や腸内細菌叢解析等がある。どちらも高度な専門技術と煩雑な操作が必要であり、一般レベルへの普及は難しい。また、ウェアラブルでモニターできる指標には、まだまだ限りがあり、精度の問題もあるのが現状である。

1-3で述べたように、未病（図5-2）においては健康人が健康を維持するために行う

食や運動等の生活習慣改善による健康実践が重要となる。この効果は、疾患発症の検出を得意とする従来の検査マーカーでは検出範囲外である。敏感な好中球活性評価システムであれば、医薬品と比較してとても軽微である食や運動等の効果を、‘見える化’できると考えられた。このことは、第3章、第4章で得られた結果からも示唆されている。



図 5-2 未病概念と未病ケア [1]

まずは 1stStep として、第4章で開発した好中球活性評価システム CFL-H2200/H2400 を、新規の食品機能性成分や運動レシピ等を複雑な評価系を駆使して開発している産業界とアカデミアの研究者に投入を図ることとした。筆者のこれまでの研究フィールドで多くの人脈もある。同じ研究者目線でこれまでの共同研究で培った研究サポートにより、実績と信頼を積み重ねること、未病の解決策を蓄積すること、新たな価値をみいだすことを目的とする。CFL-H2200/H2400 は、第2章で記載した CFL-C2000 と基本的には同じ光学システムで試料容器が違っただけであり、「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」や「脳神経細胞の保護活性評価法」、「血管内皮細胞の一酸化窒素産生を亢進する物質のスクリーニング方法」にも適用が可能である。顧客の研究者にとっては、細胞試験でのスクリーニングにより絞り込んだ候補物質の動物試験、ヒト試験まで同一のシステムで対応できることとなり、利便性が高いと言える。

また、食や運動等生活習慣改善の未病ケアには継続が必要であり、個々の未病ケアのモチベーション維持が重要となる。本システムは、極微量（3 μL）の血液を希釈するだけの簡単な操作で利用できるため、いつでも、どこでも、だれでも使えるという大きな強みがある。次のステップ（2ndStep）ではこの強みを最大限に活かして、一般消費者へ体調管理ツールとして普及を図ることを目指すこととした。第4章で述べた、体調変化をより敏感に反映することが確認された OCI+だけをモニターする普及型廉価版システム FLP-H4200 を投入する。また、試料調製も不要な計測キットの開発にも着手している。未病ケアのモチベーション維持に最適な‘目に見える’行動改善効果計測システム、1stStep で蓄積した未病の解決策を備えた体調管理ツールとして、未病ケアの普及に大いに貢献できると考えている。

1stStep 未病解決策研究用ツールと 2ndStep 体調管理ツール、其々について、顧客をセ

グメンテーションして市場規模の検討を行った。

### 5-2-2 1stStep 未病解決策研究用ツール

この研究ツールとしての展開について、ターゲット顧客を選別して市場調査を実施した。表 5-1 に、1stStep のターゲット顧客とプロフィール、顧客数と算出したターゲット毎の市場規模を示した。市場規模は、TAM（獲得可能な最大市場規模）として、顧客数に装置単価 3,500 千円（積上げ原価から算出：仮定）をかけた総額を算出した。顧客数は、経済情報プラットフォーム SPEEDA により調査した。食品機能性研究者数は、（一財）食品需給研究センター「食品研究者等データベース」[2]から得た。

表 5-1 1stStep の顧客と市場規模

ターゲット顧客	機能性食材開発企業	臨床試験受託業	食品製造企業	食品機能性研究者
プロフィール	機能性表示を得るため、健康人でのヒト介入試験を実施	薬品だけでなく機能性表示のための食品の介入試験も受託	自社製品の高付加価値化のために機能性を研究している	食品企業と連携して、機能性のメカニズム研究を実施。ヒト試験も重要
顧客数	日本：26社 世界：214社	日本：21社 世界：97社	日本：280社 アジア：1000社以上	日本：868名
市場規模 (数値×金額 千円)	840,000	413,000	4,480,000	3,038,000
市場規模 トータル	8,771 (百万円)			

機能性食材開発企業は、健康食品やサプリメント、原材料を開発している企業である。

臨床試験受託業は、最近食品成分のみ専門に受託している機関もあるが、ここでは OTC 医薬品（処方箋無しで購入できる医薬品）を考慮して医薬品を扱う機関も全て含めて対象とした。

食品製造企業は、第 1 章で述べたように新規機能性表示制度が施行され、その後の改定もありハードルが下がったことから、自社製品の高付加価値化による他社との差別化を目指して機能性表示を取得する例が多くみられている。

食品機能性研究者は、日本国内のみカウントしている。企業と連携して機能性作用機序について研究していることが多い。細胞試験や動物試験からヒト試験まで、需要があると考えられる。

今回選別した 4 つの業種での TAM は、約 88 億円となった（表 5-1 参照）。算出に加えなかった消耗品販売や海外研究者等を考慮すると参入には十分な市場規模と言える。また、2019 年 6 月 28 日作成の日経バリュアリーサーチによると、健康食品・サプリメント市場は、2018 年度で 1 兆円超、ヘルスケアフーズ全体で 2 兆円超であり、多種多様な業界の企業の新規参入が多く、今後更なる拡大が見込まれているジャンルとの報告もある [3]。更に、コロナ禍により消費者の健康志向や免疫への関心が高まったことも、健康食品・サプリメントの需要拡大の大きな要因となっている。

### 5-2-3 2ndStep 体調管理ツール

2ndStep についても、同様にターゲット顧客を選別し、市場規模を調査した。タイアップビジネス等で未病ケアを取り入れている業種（生命保険会社等）もあるが、まずは表 5-2 に示した 5 つの業種について調査した。

表 5-2 2ndStep の顧客と市場規模

ターゲット	検体測定室	健診施設	老人介護施設	老人ホーム	健保組合
<b>プロフィール</b>	自己採血で行える検査を実施	健康診断・特定診断（メタボ）を実施	要介護高齢者の介護、医療、機能訓練等を実施	高齢者の生活支援・健康管理等を実施	従業員の健康保険事業を実施
<b>顧客数</b>	2,046件 (2022年4月30日) 検体測定室連携協議会作成	920施設 (2021年7月20日) 人間ドック学会・日本総合検診医学会・労働衛生サービス機能評価認定施設のHPを参考に、保健指導リソースガイドが作成	13,649施設 (2019年10月1日) 厚労省統計一覧 介護老人福祉施設 8 234 介護老人保健施設 4 337 介護医療院 245 介護療養型医療施設 833	20,875施設 (2019年10月1日) 厚労省統計一覧 有料老人ホーム 15 134 サービス付高齢者住宅 5741	1,387組合 (2021年4月1日) 健康保険組合連合会 700人以上の社員がいる企業が設立する健康保険組合の連合組織
<b>市場規模</b> (数量×金額 千円)	1,432,200	644,000	9,554,300	14,612,500	970,900
<b>市場規模</b> <b>トータル</b>	27,214 (百万円)				

検体測定室は、日本再興戦略（平成 25 年 6 月 14 日閣議決定）等を踏まえ 2014 年 4 月よりスタートした制度で、薬局等で利用者が自ら採取した検体について、事業者が簡易の検体検査を行うサービスである [4]（図 5-3）。

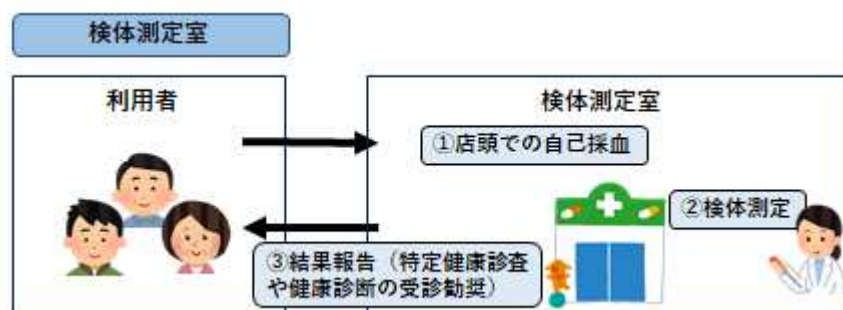


図 5-3 検体測定室 [5]

血液の場合、自己採血で得られる（指先からの採血）血液量で測れる検査項目として、現状では血糖値、HbA1c、脂質関連（HDL、LDL、中性脂肪）、肝機能（ $\gamma$ -GTP、AST、ALS）の 8 項目が行われている。本システムは、3 $\mu$ L の血液量で評価可能なため、十分に導入できる可能性があると考えられる。検体測定室連携協議会の調べでは、開始当時（2014 年 4 月 23 日）の 34 件から 2022 年 4 月 30 日時点の 2046 件まで増加している [6]。また、厚労省では 2015 年 10 月 23 日付で「患者のための薬局ビジョン～「門前」から「かかりつけ」、そして「地域」へ～」を公表し、2025 年までにすべての薬局をかかりつけ薬局に再編する道筋を示した [7]（図 5-4）。

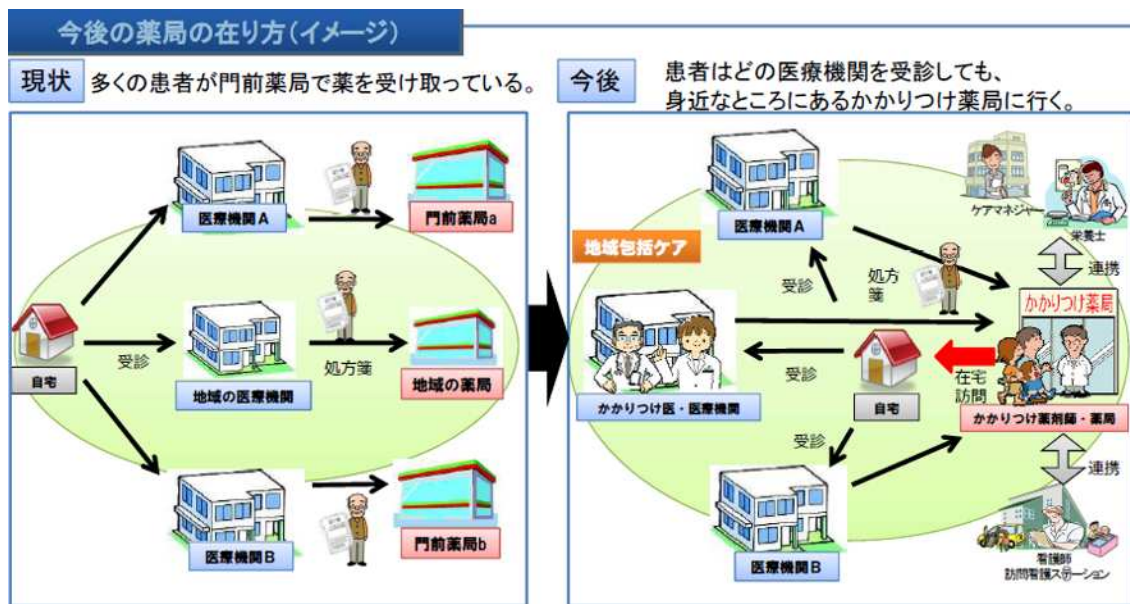


図 5-4 薬局再編 [8]

このかかりつけ薬局は、健康サポート機能、高度薬学管理機能、服薬情報の一元管理や 24 時間対応（在宅患者への薬学的管理）等を有することが記されており、検体測定室の拡大の加速が期待される場所である。

健診施設は、人間ドック等のオプション検査への導入を想定している。また最近、アンチエイジングドックが普及し始めている。酸化ストレス度の評価項目もあり、本システムを導入できる可能性があると思われる。

介護施設と老人ホームは、主に要介護高齢者を対象とした介護施設と、健康保持及び生活の安定を目的とした老人ホームとに分けて調査した。介護施設は、更に介護老人福祉施設（特別養護老人ホーム：要介護高齢者のための生活施設）、介護老人保健施設（要介護高齢者にリハビリ等を提供し在宅復帰を目指す施設）、介護医療院（2018 年～介護療養型医療施設：医療の必要な要介護高齢者の長期療養施設）に分類される [9]。どの施設も顧客ターゲットとなりえるが、特に入居者同士の接触機会が多い先の 2 施設で有効と思われる。

老人ホームに関しては、表 5-2 に記載した有料老人ホームとサービス付き高齢者向け住宅以外に、養護老人ホーム（環境的、経済的に困窮した高齢者の入所施設）、軽費老人ホーム（低所得高齢者のための住居）、グループホーム（認知症高齢者のための共同生活住居）もある [9] が、本システムの導入の可能性が高い先の 2 施設を対象とした。

最後に健保組合である。日本の医療保険制度は、国民健康保険（自営業者、年金生活者、非正規雇用者等）、協会けんぽ（中小企業サラリーマン）、健康保険組合（大企業サラリーマン）、共済組合（公務員）で成り立っている [10]。その中で、本システムを導入できる可能性が高い、700 人以上の社員がいる企業が設立している健康保険組合を対象とした。

TAM を算出したところ、272 億円となった（表 5-2 参照）。先述したタイアップ事業等、顧客となる業種は、今回上げたターゲット以外にも相当多岐にわたると考えられる。算出に加えなかった計測キット販売や顧客数を考慮すると参入には十分な市場規模と言える。

このように、これまでの研究成果を生かし、まずは研究ツールとして小さなビジネスから始め、未病診断への仮説検証、エビデンス強化により先取ニーズをつかんで、大きな市場を目指すロードマップで事業計画を構築することとした。

### 5-3 SWOT による分析

SWOT 分析は、「目標を達成するために意思決定を必要としている組織や個人のプロジェクト、ベンチャービジネスなどにおいて、外部環境や内部環境を強み (Strengths)、弱み (Weaknesses)、機会 (Opportunities)、脅威 (Threats) の 4 つのカテゴリーで要因分析し、事業環境変化に対応した経営資源の最適活用を図る経営戦略策定方法の一つ」 [11]であり、図 5-5 に示したようなマトリクスを用いたフレームワークである。

内部環境 × 強み：自社の持つ強み、得意なこと（技術、品質、資産、ブランド力）

内部環境 × 弱み：自社の持つ弱み、苦手なこと

外部環境 × 機会：社会や市場の変化等で有利に働くこと、法律等

外部環境 × 脅威：社会や市場の変化等で不利に働くこと、競合

本事業について、マトリクスに其々当てはめて強み、弱み、機会、脅威について分析し、整理した（図 5-5）。

SWOT	目標達成の助けになる	目標達成の妨げになる
<b>内部の要因</b> <small>自社の資源（技術力・人材・立地）や顧客との関係</small>	<b>Strengths</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>所属企業のブランド力</li> <li>高度な微弱光検出技術による唯一の手法（特許取得済）・科学的エビデンス</li> <li>本手法に関するノウハウの蓄積</li> <li>業界に多くの人脈（キーパーソン含む）</li> </ul>	<b>Weaknesses</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>実績が少ない</li> <li>採血（ランセットでOK）が必要＝微侵襲</li> <li>高額</li> <li>多検体測定ができない（測定時間30分）（スループットが低い）</li> </ul>
<b>外部の要因</b> <small>市場トレンド、経済状況、技術革新、競合の動き等</small>	<b>Opportunities</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>ヘルスケアブームで成長市場</li> <li>医療費削減を狙った複数の国策</li> <li>COVID-19禍（自然免疫力強化の動き）</li> <li>機能性表示で免疫機能表示解禁</li> </ul>	<b>Threats</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>ヒト臨床研究の厳格化</li> <li>ヘルスケア領域の評価法を規制する法律がない（玉石混交で差別化が困難）</li> <li>好中球活性がマイナーで指標が曖昧</li> </ul>

図 5-5 SWOT 分析

次に、クロス SWOT を実施して、明確化された強み、弱み、機会、脅威について、どのように対策する、戦略をとるべきかを検討した（図 5-6）。

TOWS マトリクス	Strengths <ul style="list-style-type: none"> <li>所属企業のブランド力</li> <li>高度な技術による唯一の手法</li> <li>手法に関するノウハウの蓄積</li> <li>業界に多くの人脈キーパーソン</li> </ul>	Weaknesses <ul style="list-style-type: none"> <li>実績が少ない</li> <li>微侵襲だが、採血が必要</li> <li>高額</li> <li>スルーポットが低い</li> </ul>
<b>Opportunities</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>ヘルスケアブームで成長市場</li> <li>医療費削減を狙った複数の国策</li> <li>COVID-19禍（自然免疫強化）</li> <li>免疫機能表示解禁</li> </ul>	<b>強みの最大化</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>キーパーソンを最大限活用（顧客の紹介等）</li> <li>人脈を活用して、自然免疫強化のエビデンスを蓄積</li> </ul>	<b>弱点を補完</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>装置レンタルでハードル下げて実績作り</li> <li>AI技術を活用、測定時間短縮</li> <li>採血を伴う他評価とタイアップ</li> </ul>
<b>Threats</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>ヒト臨床研究の厳格化</li> <li>ヘルスケア領域の評価法の規制がない（差別化が困難）</li> <li>好中球活性:マイナー、指標曖昧</li> </ul>	<b>脅威に対処</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>臨床研究経験機関に優先的に導入、エビデンス強化</li> <li>医学的エビデンス蓄積による指標の明確化及び差別化を図る</li> </ul>	<b>弱みを最小化</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>作用機序解明ツール（細胞試験）としてのアカデミアへの普及を促進</li> </ul>

図 5-6 クロス SWOT 分析

強み×機会では、自社の強みをどのように機会（ビジネスチャンス）の中で最大限に活かしていくかを検討した。コロナ禍で自然免疫力に注目が集まっている今、本システムで自然免疫力が評価できることを早急に示していくことが重要と考える。そのために、特に1stStepにおいては人脈を活用して顧客を選別し、限られたリソースを効果的に投入することが必要となる。

強み×脅威では、外部環境の脅威に対して自社の強みを使ってどう対処するかを検討した。臨床研究実施のハードルが低い顧客を選別すること、長期間良好な関係を築いている受託臨床機関との連携を更に強化して、導入数を増やすことが重要と考える。それにより、医学的エビデンスが蓄積され、好中球活性のメジャー化、指標の明確化が進み、他の評価系との差別化を図ることができる。

弱み×機会では、ビジネスチャンスを活かすために、どのように弱点を補強、改善するかを検討した。価格が高いことは、特にアカデミアの研究者にとっては大きな障害となるため、レンタル制度を導入することとした。また、一般ユーザーの体調管理ツールとしての2ndStepにおいては、測定時間が長いことがネックとなる可能性が高い。AI技術を使い、測定時間短縮を図ることにチャレンジする。また、必要な血液量は3μLとかなり少ないため、他の採血を伴う評価系とタイアップすることで採血のハードルを下げる事が可能と思われる。

弱み×脅威では、脅威の影響を最小限に抑えることが求められる。臨床研究ではない細胞試験で、機能性成分の作用機序解明ツールとしてアカデミアへの普及を図ることで、脅威に対処できるだけでなく、エビデンス強化にも繋がる。

## 5-4 所属企業における本事業の位置づけ

先述したように、筆者は、社内ベンチャー制度を利用して、本事業を実践することを考えている。筆者の所属する企業が社内ベンチャー制度を整備した目的は、「企業家精神を持った次世代のリーダーとなる人材育成はもとより、持続的な成長を目指して光応用産業を大きく広げるための既存事業の枠にとらわれない新たなアプローチの発掘」である。

そこで、本事業を推進するにあたって、筆者の所属企業のベンチャー制度の枠組みにおける本事業の位置づけをアンソフの成長マトリクスを用いて検討した。

アンソフの成長マトリクスとは、「戦略経営論の父」と尊称されるイゴール・アンソフによって提唱されたフレームワークである [12]。経営を取り巻く環境が大きく変わるなかで、成長を続けるためにはどのような成長戦略をとれば良いのかを考える際に、有効なツールとなる [13]。成長戦略を「製品」と「市場」の2軸において、「既存」か「新規」かに区別することで図 5-7 に示した4つに分類される [12, 13]。



図 5-7 アンソフの成長マトリクス [13]

4つの分類の特徴について、以下に記載する [12, 13]。

### 市場浸透戦略

現状の市場に既存の製品やサービスを投入して売上高や市場シェアの拡大を目指す。製品の認知を上げること、購入意欲を高めることが戦略の主な目的となる。

### 新製品開発戦略

いままでの市場に、新しい製品やサービスを投入して、売上を拡大しようとする戦略。競合との差別化を図ることができる製品やサービスを開発することが重要。

### 新市場開拓戦略

既存の製品やサービスを新しい市場に投入して、勝負する。

営業力・販売ネットワーク等の「売る力」が勝負を左右することとなる。

### 多角化戦略



新しい市場に新しい製品やサービスを投入する戦略。

リスクがあっても新たな収益源を求める時に選択するハイリスク・ハイリターン戦略。

筆者が所属する企業は、光センサーや光源等のデバイスや専用回路を付加したモジュールやユニット、これらを組み込んだ光計測システム、画像解析システム等を製造販売している。一方、本事業で想定している商材は、検出器は自社製の高感度光電子増倍管（PMT）を使用した光計測システムではあるが、1stStep のラボ用機器 CFL-H2200/H2400 は 2 種類の光を同時に経時的にモニター可能とした、特許で保護された技術を搭載した新しいシステムである。また、2ndStep の普及型廉価版 FLP-H4200 は、検出器は同様に自社製のフォトダイオード（PD）を使用した蛍光計測システムであるが、希釈血液の好中球活性評価に特化した独自のシステムである。更に、1stStep では専用容器、2ndStep では専用計測キットの販売も予定しており、附属消耗品販売は所属企業においては初の試みである。市場に関しては、食品機能性評価関連、未病評価関連に関わる製品はこれまで例がない。以上より、本事業は、多角化戦略に位置付けられる。

先述したように、筆者の所属企業が求める目的の一つに「持続的な成長を目指して光応用産業を大きく広げるための既存事業の枠にとらわれない新たなアプローチ」がある。新たな市場に新たな製品を投入する本事業は、この目的に合致している。また、リスクが伴う戦略であること、筆者が投入を目指す市場がまさに筆者の研究の主戦場であり市場における知識と人脈を持ち合わせていることも、本事業を社内ベンチャーで実施する意義の大きな裏付けとなる。

更に、多角化戦略に関して、アンソフは以下の 4 つのパターンに分類している [12] [13]。

水平型多角化：既存技術と関連性の高い新製品を、既存と類似した市場に投入

垂直型多角化：既存技術と関連性の低い新製品を、既存と類似した市場に投入

集中型多角化：既存技術と関連性の高い新製品を、異なった市場に投入

集成型多角化：既存の技術や市場とは、全く異なった事業に進出

本事業では、光計測システムを商材とするため、既存技術と関連性の高い新製品ということになる。それを異なった市場に投入することになるので、の集中型多角化に近いと思われる。アンソフは、戦略的意思決定にはシナジー概念も重要だと述べている [12]。シナジー効果とは、「企業の資源から、その部分的なものの総計よりも大きな一種の結合利益を生み出す効果」のことであり、販売シナジー：流通チャネル多重利用、生産シナジー：一括仕入れ、習熟効果、投資シナジー：研究成果の多重利用、経営管理シナジー：経営ノウハウ・スキルの多重利用、の 4 つがある [12]。の集中型多角化では、生産と投資シナジーが特に関係すると考えられる。所属企業が持っている光検出技術に関する強みを最大限活かして競争優位性を確保し、筆者の持つ人脈をフルに活用して新しい流通チャネルを産み出すことが、所属企業の事業拡大への貢献につながると思われる。

## 5-5 ビジネスプランの立案

これまでの分析を踏まえて、ビジネスプランを立案した。

### 5-5-1 事業コンセプト

事業コンセプトを図 5-8 に示した。

➤事業コンセプト

**未病**を見える化するシステムを提供して、  
**健康長寿社会**実現をサポートする事業

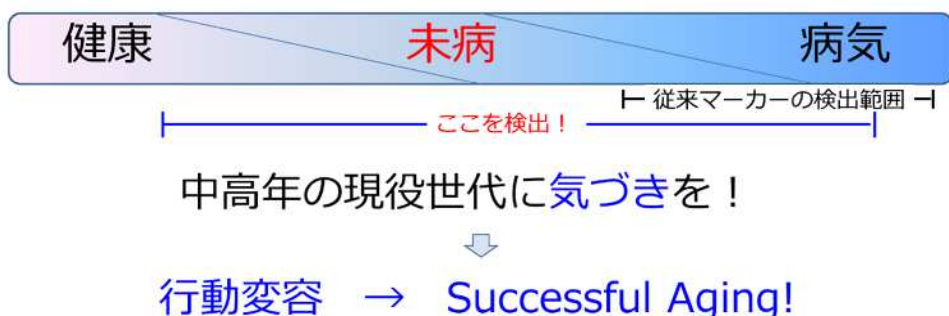


図 5-8 事業コンセプト

健康長寿社会の実現への貢献を目指すためには、健康に対する意識が低下しがちな中高年の現役世代にアプローチして普及を図ることが重要と考える。気づきを与えて行動変容を促すだけでなく、それを継続させるためのモチベーション維持に有効なツールとなりえる。

### 5-5-2 ビジネスロードマップ

まずは 1stStep で、これまでの研究成果を活かし、研究ツールとして研究者を中心に投入し、その中で未病の診断、体調管理ツールとしての仮説検証とエビデンス積上げにより、実績と信頼性を高め、未病の解決策を蓄積してヘルスケア市場へと展開を図る（2ndStep）プランとした。

また、このツールによる好中球活性計測結果の医学的根拠を明確にすることができれば、より大きな市場、医療分野への展開も可能なのではと考えた。最終ステップとして、より大きな市場、医療分野へ、2ndStep の商材、FLP-H4200 と計測キットを薬事対応してチャレンジすることとした（3rdStep）。

この医療展開に関して、製薬メーカーや医師等を対象として 15 件以上のヒアリングを行い、製薬メーカーや医師が注目しているニーズや本技術に対するコメントを得た。

以下がヒアリングで得られたコメントである。

- ・ ベッドサイドで簡単に患者の状態を評価できるものを探している、適用できる？
- ・ ウイルス感染症をベッドサイドで簡便に確度高く検査できる方法に適用できそう？
- ・ 採血できる量が少ない動物実験で活用できる
- ・ 動物モデルの確認に手軽に活用できる
- ・ 病者食の機能性付与に適用できる
- ・ アトピー性皮膚炎の重症度判定に適用できるのでは？
- ・ 主婦湿疹の日々のモニタリングへの適用（ヘルスケア領域）
- ・ 難治症疾患で薬の効き方がヒトによって違う、炎症度合いが影響している可能性大、その層別化ができるのでは？
- ・ 甲状腺と自己免疫疾患は関連がある、薬の効果の確認に適用できそう？
- ・ ER で予後の把握ができると医療としてメリットがかなり高い
- ・ ベンチレーターをいつつけるべきかが判断できるとよい（確率は高くなくてもよい）
- ・ ネットーシスは今一番ホット、これが早い段階で予測できれば、大ヒット
- ・ ストレスファクターが予測できる可能性が高い
- ・ 免疫力の見える化を探している、適用できる
- ・ 早くわかる！という特徴を最大限に活かすのが良い

これらのコメントを参考にして、好中球活性評価システムの特長を最大限に活かせる疾患について調査と絞り込みを行った。第1章で述べた通り、好中球の過剰活性状態、ネットーシスが疾患の発症や重症化に大きく関与していることから、医療費削減のもう一つのキーとなる重症化予防への貢献、重症化予測ツールとしての展開を図ることとした。

設定したロードマップを、図 5-9 に示した。

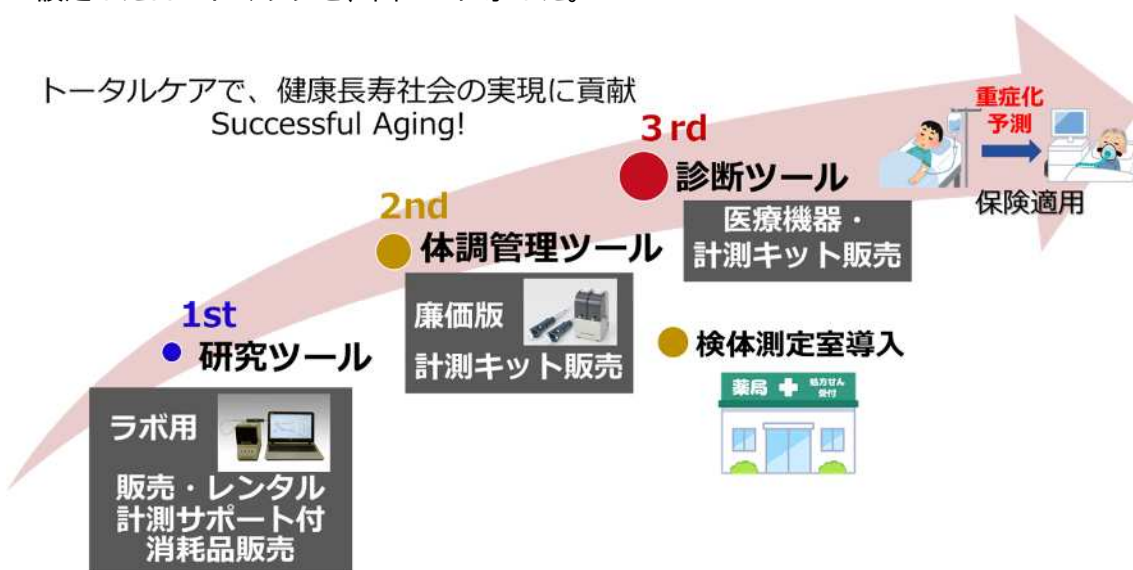


図 5-9 ビジネスロードマップ

### 5-5-3 ビジネスモデル

1stStep のビジネスモデルを図 5-10 に示した。

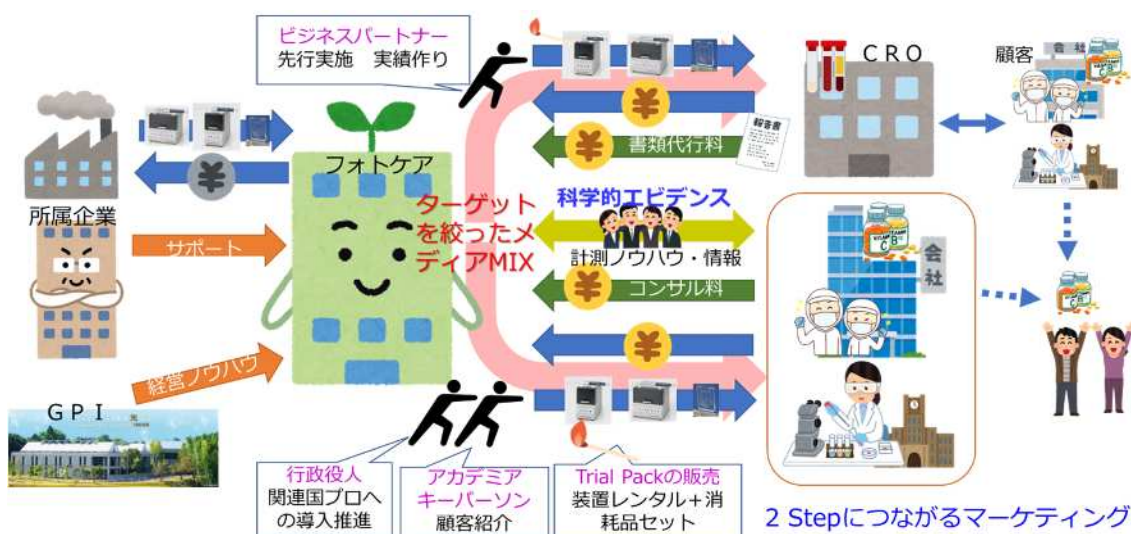


図 5-10 1stStep ビジネスモデル

社内ベンチャー及び社内ベンチャーの管理部署では、製造部門は持たないため、ファブレスとなる。更に、間接業務は所属企業のサポートが受けられるため、マーケティング及び2ndStep以降の商材開発等に注力できる。クロスSWOT分析より、普及の障害となる高価格に対する対策として、Trial Pack（装置レンタル+消耗品セット）の仕組みを取り入れることとし、主にアカデミアへの投入を促進することとした。装置レンタルの金額設定に関して、アカデミア研究者を中心に15名にメールアンケートを実施して、12名から回答を得た。表5-3にその一部を示した。測定サポート付きで10~30万円が妥当と思われた。機器レンタルのプロメガは、機器販売価格の200分の1が1日分、アズワンでは、機器販売価格の10分の1を1月分として設定していた。これらの情報を基にして、消耗品とセットで金額設定した（図5-11）。アンケートの回答でも記載があったが、装置に対する抵抗感や結果解釈の難解さ等によるハードルを下げるため、本システムの1番のヘビーユーザーでもある筆者のサポート付きとすることとした。これにより、顧客と密な関係を維持することができるだけでなく、研究のスムーズな進捗も期待され科学的エビデンスの蓄積に繋がると思われる。SIPプロジェクト時代に得た人脈、食品機能性研究分野の第一人者や、農水省、経産省の役人との関係を利用して、顧客紹介や国プロ参画機関への導入を促進する。第2章で述べたライセンス契約により細胞試験の受託計測を実施いただいているCROとも良好な関係を引き続き維持して、先行実施等の便宜を図り実績作りに協力いただく。マーケティングは、主に研究者が顧客であるため、各種関連学会を利用して展示会やランチョンセミナー等を活用する。業界新聞や学会誌等への広告掲載も効果的と考えられる。

表 5-3 レンタル価格のアンケート結果

薬科大 教授	基本データ取りや条件検討のためですと、1試料あたり数千円以内で測定（試薬代や解析も含めて）できたら良いですね。1か月で50検体測定できて、10~20万円とか？予算が潤沢なアカデミアのつボなら100万円くらい出せるかもしれませんがね？
生活科学部 教授	当然研究費の横具合次第ですが・・・当研究室のような弱小研究室では、月数万円、最大10万円程度かと思います。いったんレンタルすれば、1か月で実験が終了することではなく、数か月とすると数十万円となります。
農学部 准教授	すごく魅力的なサービスですね。私は人の評価サービスをあまりつかったことがないのでお値段的なことが全く見当たらないのですが、50万円以下だと手が出しやすいのではないかと思います。ヒト対象なので、医学部や病院などに需要があるとしたら、もっと高くてもいいのかもしれません
環境人間学部 教授	我がつボは、ずっとボチボチの貧乏で、外注とか、あまりしてこなかったのですが、あまり、参考にならないかもです。個人的には、予算が余ってる。たっぷり有ると仮定して、1ヶ月あたり、3.0から5.0回分の測定可能物品付き、として、2.5万~3.0万円くらいでしょうか。その中に、測定トレーニング（ミニ講習）付き、だと更に良いですね
研究組合	装置レンタルはしたことが無いので、よくわかりません。主項目が副がでお財布のヒモが大きく変わります。経験として、睡眠測定装置を相談したときには、解析費がすごく高くヒト試験を10人1週間すると100万円を優に超えていたように思います（消耗品は比較的安かった）。逆に企業でヒト試験の場合はこのくらいが普通なのかもしれません。大学の場合は、データを御社にバックできる場合には10万円とか。しない場合は1サンプル1万円で30万円でしょうか。
農学部 講師	数十万単位でしたら割と簡単に出来ると思います。10万、20万でしたら、若手の先生方でも、躊躇なく支払うでしょう。だいたい回数×万円（30回なら30万円）を超えてくると、全体的な予算をどのくらいとっているかで、気軽に出来る先生と、出せない先生が出てくると思います。農学部は100万の研究費をとっている人が多いので、総額に対する50%を超えるレンタル費用は支払えません。超高性能MRIQを10万円で借りている先生がいらっしゃいます。リアルタイムPCRも10万円で借りていたと思います（6か月契約、1か月10万円）。購入するつもりでレンタル（&リース）する場合は、手持ちの総額も大きいのでもっと出ます。後は、その装置でどのくらいの論文が出ているか、消耗品が別途かかるのか、などによって変わると思います。
農学部 教授	医学研究関係には大変有用と思われる。今すぐ私のところにあっても直ちに使う物ではありませんが、実験によってはフローサイトメトリーより使えるかもしれませんね。レンタル料金ですが、結論から言うとよくわかりません。ご参考にはならないと思いますが私のところは貧乏なので、¥2,000/月~出しても¥5,000/月で短期間となります。
農学部 准教授	機器レンタルで思い出したのが、プロメガのサービスです。https://www.promega.co.jp/rentamax/「MAXれんたる」のタブのところに料金表がありますが、機器のレンタルで¥6,000-¥35,000/日ですね。機器販売価格の200分の1で設定しているようです。1日で考えると結構高いかなとも思いますが、一時期だけ必要な機器だとこれくらいで使えたらありがたいかもしれません。1ヶ月固定だと半値くらいに割り引いてくれるとありがたいでしょうか。一方、生化学分析と考えると、ELISA、EIAなどと似ていると考えられて、これだと96 well分（3連で20-30検体）で10-30万円というところですね。これより上位の試験と考えると30-50万円というところですかね。ヒト試験と考えると、簡単なヒト試験でも数百万したりするので、数十万円ぐらいはハードルが低いと思います。総合的には、50万円ぐらいまでなら気軽に試せると思います。ただし、企業の研究者などは、競合他社の動向に敏感なので、企業のヒト試験でこの機器を使ったデータが論文になったりすると、興味を持ち、もっと高くても使ってくれたいと思います。
健康医療科学部 教授	支払うことが可能な金額で考えると私なら消耗品費で払える金額になります。消耗品費の上限は予算の出どころで異なりますが、5万~10万円です。測定回数を10回分などにして一式あたり消耗品費の上限内で購入できると助かります。

<p><b>CFL-H2200 (2連型 : 3000千円+PC100千円)</b></p> <p><b>A) 259千円</b> (装置+容器60個+計測/解析ソフト入PC)          装置 : 3100 * 0.07 = 217千円      30日間          容器 : 0.7 * 60 = 42千円            30検体 (2連)</p> <p><b>B) 145千円</b> (装置+容器30個+計測/解析ソフト入PC)          装置 : 3100 * 0.04 = 124千円      2週間          容器 : 0.7 * 30 = 21千円            15検体 (2連)</p>	<p><b>CFL-H2400 (4連型 : 4500千円+PC100千円)</b></p> <p><b>C) 452千円</b> (装置+容器120個+計測/解析ソフト入PC)          装置 : 4600 * 0.08 = 368千円      30日間          容器 : 0.7 * 120 = 84千円            60検体 (2連)</p> <p><b>D) 226千円</b> (装置+容器60個+計測/解析ソフト入PC)          装置 : 4600 * 0.04 = 184千円      2週間          容器 : 0.7 * 60 = 42千円            30検体 (2連)</p>
---	---

図 5-11 Trial Pack の金額設定

次に、2ndStep のビジネスモデルを図 5-12 に示した。



図 5-12 2ndStep ビジネスモデル

基本的には 1stStep と同様のファブレスとなる。顧客のセグメントが変わるため、新たなマーケティング戦略として、1stStep ユーザーのサプライメーカーと薬局等の検体測定室とのタイアップを考えた。ある展示会でサプライメーカーの展示スタッフから、サプリメントは新たな顧客を増やすよりもリピーターを多くする方が利益につながりやすい、リピーターを増やすためにはサプリメントの効果が早い段階で視覚的にわかるような評価法が欲しいとのコメントがあった。薬局の立場では、未病ケアの普及と店内商品の販売につながる可能性があり、3者間で win-win の関係が成立すると考えられる。生命保険会社でも未病改善を促進する保険商品等の販売を行っている例が最近増えている。1stStep ユーザーのサプライメーカーとの連携としてもう一点、計測結果を蓄積するスマホアプリの中で、推奨するサプリの広告を表示して広告料を収入として得る仕組みも考えている。また未病の領域は、まだまだ発展途上であることから、積極的に促進を図っていく必要がある。そのために、まずは地元の企業等を集めて主体的に勉強会や事業説明会を開催したり、関連団体と連携してイベント参加や開催を進めていくことも計画した。

3rdStep に関して、対象とする疾患について調査を進めて、協力いただける複数の機関を選定し、アプローチした。臨床研究の遂行について強力な開発パートナーにも巡り合うことができ、複数の医療機関で連携した協力体制を構築できた。すでに臨床研究による医学的エビデンスの蓄積を開始し、薬事対応の準備も進めているところである。

## 5-6 ビジネスプランのブラッシュアップ

前項で考案したビジネスプランについて、光産業創成大学院大学や所属企業で多くの方々から以下のようなコメントを頂いた。

### 1stStep

- ・ サプライメーカー等が本当にこの技術を必要としているのかが見えない
- ・ 想定するステークホルダーへのインタビューなど、適切かつ集中的なマーケティングを行って、実現可能性を高める必要がある
- ・ 十分な収益を得るためには海外展開にかかる比率が高くなる。国内とは異なる可能性があるため、海外の市場調査が必要
- ・ 装置の質を高める（QMS：Quality Management System（品質管理監督システム）適合等）必要があるが、2連型と4連型両方を商材にするのは時間がかかりすぎる。2連型一本に絞って4連型を望むユーザーには2台購入を進めるのが良い
- ・ サポート付きの有料レンタルをどこまで引っ張るかがポイント。未病領域へのマーケティングや医療展開の臨床研究等を進めていくのにリソースが限られている中、足枷になる可能性がある。

### 2ndStep

- ・ 健康診断の検査項目に加えるだけの費用対効果を言えるかがポイント 現状、指標

の持つ意味が明確化されていない

- ・ 薬局の検体測定室で、なにがわかれば顧客が利用するか、が不明瞭、結局面白いだけで終わってしまう可能性がある
- ・ あれもこれもと総花的。まずは一つの業種に集中して投入する方が効率的。
- ・ 市場調査が、ニーズ探索が不十分
- ・ 1stStep と並行して行っていくのは、リソース的に難しい ターゲットを明確にして集中すべき
- ・ 1stStep で測定サポートやレンタルをこなしながら、2ndStep で主体的に勉強会や事業説明会などを開催していくプランは、現実的ではない。顧客が明確に決まっていない場合の営業は、かなり難しい。経験がある人材が必要

全体を通して

- ・ 1stStep から 2ndStep のつながりが見えない。一体感がない
- ・ リソース不足、チームメンバー探しが重要
- ・ 他に真似されない仕組みづくりが必要
- ・ 製造パートナーの選別も重要

いただいたコメントを基に、ビジネスプランのブラッシュアップ及び事業体制の構築に取り組んだ。







1stStep に関して、商材の装置を 2 連型 (CFL-H2200) 1 種類に絞ることとした。また、SWOT 分析等から導き出された 1stStep の目的は、未病評価のエビデンスを得ること (他の評価系との比較検証による論文化)、機能性表示の取得実績を得ること、未病解決策を蓄積すること、新たな価値を見出すことである。そのためには研究実績のある顧客を選別し、密な連携、サポートによりユーザーと良好な関係を築くこと、そしてビジネスパートナーを有効活用することが重要である。リソースの面からも国内市場に絞るべきと判断した。同時並行で取り組んでいる商材の製品化 (QMS 適合) の観点からも、輸出対応はかなりの時間と労力が必要とされる。国内市場の規模を改めて調査 [14] し、これまでに展示会出展等で得られた業種ごとのニーズを整理した (表 5-4)。臨床検査受託業以外は、社員 150 名以上の企業のみを抽出した。機能性食材開発企業と食品製造企業等、重複している部分はあるが、市場規模としては十分と思われる。ニーズに関しても、いずれも本システムで対応できる可能性が高い。

表 5-4 1stStep ターゲット顧客及びニーズ（国内のみ）

ターゲット顧客	顧客数	ニーズ（展示会ヒアリングより）
機能性食材開発企業	214社	摂食の影響、摂取効果を早期に数値化できるマーカーが欲しい
臨床検査受託業	21社	論文でオーソライズされていて、健常者介入試験にマッチしたマーカーが欲しい
食品製造企業	932社	商材の高付加価値化 廃棄物を資源として活用するための簡便な評価法が欲しい
食品機能性研究者	869名	新規成分探索、機序解明に使える科学的根拠が明確なマーカーが欲しい
OTC医薬品製造企業	295社	「免疫が見える化」できる技術、ストレスファクターを見出せる技術が欲しい 消費者にアピールできる機能の付加
化粧品製造企業	124社	ユーザーの関心事の抗老化、抗酸化効果の簡便な評価法が欲しい

次に、過去の展示会等引き合い情報から産業界を中心に、ヒアリングを行った（表 5-5）。

表 5-5 1stStep ターゲット顧客ヒアリング結果

企業名	導入可能性	ヒアリング結果要旨
大手食品（サプリメント）素材メーカー		<ul style="list-style-type: none"> <li>介入試験は年に2, 3回実施、多くのマーカーを使用、好中球活性も導入したい</li> <li>採血を伴わない臨床研究にも利用できることも良い</li> <li>東京本社1階の自社サプリ販売ショップで簡単な検査ができる。そこに設置？</li> </ul>
大手食品メーカー サプリメントも販売		<ul style="list-style-type: none"> <li>自社開発の機能性成分全てが好中球活性に影響を与えるとき期待される。着目点を絞り込んで具体的に使える場面が設定でき次第、購入orレンタルで導入したい。</li> </ul>
自治体		<ul style="list-style-type: none"> <li>実施中の健幸プロジェクト「健康・食・スポーツで地域貢献」を実務展開するための産学官連携プロジェクトにレンタルで取り入れたい。</li> </ul>
ICT農業実施企業		<ul style="list-style-type: none"> <li>磐田市共同のプロジェクトや、県の補助金プロジェクトを実施中。「健康の見える化できる場所」の設置構想やジュビロ育成選手等を対象とした健康食イノベーションプログラム等いろいろ利用できる場面がある。是非導入を考えたい。</li> </ul>
大手サプリメントメーカー		<ul style="list-style-type: none"> <li>“老化を科学する”がモットー、抗酸化に高い関心。</li> <li>100名規模の介入試験を年に複数回実施。条件をそろえるために一度に測る必要があるので、複数台（5,6台）のレンタルで是非導入したい。</li> </ul>
食品専門の受託検査機関		<ul style="list-style-type: none"> <li>機能性表示の新たな免疫クレーム取得を要望している大手食品メーカーからの引合に是非紹介したい。</li> <li>B to Cのビジネスに関して、郵送検査ではなしえないその場ですぐに身体状態がわかるという強みを活かしていくのが良い。</li> </ul>

13社にアプローチしたが、担当者の異動や方針転換等があり、結局6社と面談を行うことができた。しかし面談まで至れば、最低レンタルでの導入の可能性がえられたことから、サプリメーカー等の本技術に対する関心の高さが示され、実現可能性を高めることができ



た。アカデミアにはまだアプローチはしていないが、これまでの細胞試験等も含めた連携先から4件の打診をいただき、その内訳は、購入希望1件、補助金申請のための見積依頼1件、レンタル希望2件である。これらの結果より、コロナ禍が落ち着いて学会展示に出展できるようになれば、アカデミアの引き合いはある程度見込められると思われる。

2ndStep に関して、過去に引き合いのあった全国展開している介護施設（サ高住：サービス付き高齢者向け住宅）にアプローチした（表5-6）。

表 5-6 2stStep ターゲット顧客ヒアリング結果

企業名	ヒアリング結果要旨
高齢者施設経営 (サ高住が中心)	<ul style="list-style-type: none"> <li>入院させないための健康促進サービスを提供。その効果検証や健康管理として有効。</li> <li>業界初の試みとして消費者への訴求力向上にもつながる。</li> <li>年金生活者の場合、1測定1000円（人件費、初期導入コスト等で3000円が負担額）以下なら可能性はあるが、回数を増やすためには低価格化が必要。</li> </ul>

担当者とのヒアリングでは、導入にかなり前向きな姿勢であり、問題となる価格に関して十分に今後の検討で対応可能と思われた。廉価版先行機を無償貸与して、製品版のための仕様情報収集に協力いただきながら、先行実施していただく方向で話を進めた。しかし、先方内での協議の結果、たとえ微量であっても採血を伴うことから医療色が強く活用が難しいとのことで実施までには至らなかった。自立した生活が可能な高齢者が対象であり、医療スタッフの配置義務がないサ高住ではなく、看護師が常駐する介護付き老人ホーム等であれば導入は難しいことがわかった。

次に、筆者の講演を聴講して問合せいただいたアカデミア研究者とコンタクトを図った。疾患との関連性が多数報告されている腸内細菌叢の著名な研究者であり、ヒトのみならず家畜等の腸内細菌叢を幅広く精力的に研究している。体質の状態を反映するが変化は緩やかな腸内細菌叢と、急激な体調変化を反映できる好中球活性とを比較検証することで、ヒトや家畜等の体調管理ツールとしての有効性が証明できる可能性があると考えたからである。また家畜の飼育環境では、伝染病のダメージはかなり大きいいため、不顕性感染発見ツールとしても有効と考えられる。すでに連携を開始して、家畜での予備検討により良好な結果が得られている（日本畜産学会発表予定、論文投稿準備中）。2ndStep として、まずは家畜の体調管理ツールにターゲットを絞ることとし、1stStep のアーリーアダプターとして優先実施すると共に、廉価版普及機プロトタイプを先行貸与して仕様情報の収集に協力いただくことで話を進めているところである。これにより、1stStep の目的が達成できるだけでなく、2ndStep への道筋も明確にできる。

最後に、薬局の検体測定室の実態調査インタビューについて概説する。静岡県内に展開するドラッグチェーンと、全国展開しているドラッグチェーン2企業にインタビューした（図5-13参照）。ユーザーへのサービス提供価格について、其々金額には多少違いがある

が、ほとんど利益は出ない設定となっていることがわかった。3企業共に、収益目的ではなく、地域貢献とサービスで実施しているとのことだった。全ての店舗に導入しているわけではなく、実施スペースについてガイドラインで定められた規定の広さが確保できることはもちろんだが、地域の拠点になる店舗を選別して導入していることがわかった。これは、5-3-1で述べた2025年に予定されている薬局再編を見据えて、地域ごとに健康サポート薬局として生き残るための戦略と思われる。検体測定室設置店舗を積極的に増やすことは考えていないが、検体測定室自体を充実させていきたいとのコメントからも推測される。本システムの導入の可能性については、装置100万円以下、消耗品原価600~700円以下であること、指標がわかりやすいこと、ポピュラーな表現であることがクリアされれば、初期導入としてまずは数店舗に導入を検討したいとの回答が得られた。本システムで判定可能と考えている酸化ストレス度や免疫力は、かなり注目度が高く、また変化も早いので、検体測定室での評価項目にマッチしていると言っていた。

➤ A (静岡県内68店舗 内15店舗に設置)

血糖値	300円
HbA1C	1000円
脂質関連 (TG, LDL-C, HDL-C)	1000円
HbA1C+脂質関連	1500円

約49万円

地域毎に拠点となる店舗に設置

薬剤師が対応 20~30分 (予約制)  
50代、60代女性リピーター多い  
6月実績: 62件/15店舗 (約70件/月)  
イベント (2ヶ月に1回) では無償実施 (コロナ禍前約450件/年)

導入検討レベル (初期導入)  
装置100万円↓、消耗品600~700円↓  
指標がわかりやすいこと  
ポピュラーな表現であること

➤ B (全国1,980店舗)

HbA1C	500円
脂質関連 (TG, LDL-C, HDL-C)	500円

500~600円/回

ロシュ・タイアクノスティックス(株)  
: コバス b 101プラス

➤ C (全国1,400店舗超114店舗に設置)

血糖値	550円
HbA1C	1100円
脂質関連 (TG, LDL-C, HDL-C)	1650円
トータルセット	2200円

約55万円

450~490円/回

アリアAfinionアナライザー

・ 高頻度の検査が有用となる項目が必要  
免疫力、酸化ストレスは注目度高い  
= 検体測定室項目にマッチ

**収益目的ではなく、地域貢献、サービスで実施**

図 5-13 薬局の検体測定室の実態調査

現在、PET 検診受診者の協力を得て実施している横断・縦断臨床研究や、5-5-3に記載した今後実施する予定の疾患患者対象の臨床研究等により、医学的見地からの検証を十分に行って、わかりやすい明確な指標を提示できるシステムとすることを目指していく。また、装置及び消耗品共に、顧客要求価格を満足できるものに仕上げ、2025年の薬局再編前に導入を打診できるよう準備を進めていく。

以上、市場の再検討やステークホルダーへのヒアリングを行い、全体像は当初考案した3つのStepでビジネス展開していくプランで基本的に同じではあるが、各Stepにおいてパートナーと連携した個別戦略を検討したことにより、実現可能性を大幅に高めることができた。

また人材リソース不足について、社内リクルート制度を利用して、筆者の専門外で不得

手な部分を補っていただける人材（事業部での QMS 経験者）を確保した。チーム内にエンジニアが確保できたことにより、チーム外の 10 名以上の開発協力メンバーの役割分担の明確化も進み、装置及び消耗品類の高品質化がなされ、商材の準備が加速できた。商材の検証やデータ蓄積に必要となる人材は、引き続き 2 名の派遣社員で対応する予定である。営業事務等は社内インフラが利用できる仕組みのため、社内ベンチャー立上げの初期としては十分と考えられる体制が構築できた。

## 5-7 まとめ

本章では、第 2 章から第 4 章で開発を行ってきた好中球活性評価システムを、社内ベンチャー制度を利用して「未病ケア」「疾病予防」市場で事業実践することを目指して、事業計画を立案した取組みについて述べた。

ビジネスに携わった経験が全くない筆者は、光産業創成大学院大学で経営学や企業会計等ビジネスの基礎から学び、所属企業が求める目的、「持続的な成長を目指して光応用産業を大きく広げるための既存事業の枠にとらわれない新たなアプローチ」に合致していて、自らの研究者時代の経験が最大限活かせるビジネスプランの考案にチャレンジした。考案したビジネスプランは、次の 3 段階で構成されている。1stStep として筆者のこれまでの研究成果を活かし、研究ツールとして研究者を中心にラボ用機器と専用消耗品を投入して、その中で未病の診断、体調管理ツールとしての仮説検証とエビデンス積上げにより、実績と信頼性を高め、未病の解決策を蓄積する。2ndStep では、一般ユーザーの体調管理ツールとして廉価版普及機と専用計測用キットをヘルスケア市場へ展開を図る。3rdStep として、1stStep ユーザーや連携先の医療機関等で得られた医学的エビデンスを基に薬事対応をして、廉価版普及機を医療機器として医療分野に展開を図る。

当初考案したビジネスプランでは、其々の Step における個別戦略が不明瞭で実現可能性が低く、実用化を図ることは難しい状態であった。先生方の助言に従い、前項で述べたような市場の再検討やステークホルダーへのヒアリング等から導き出された強力なパートナーとの連携やターゲットを絞る戦略設計により、指摘された項目の大半をクリアすることができた。社内ベンチャーの初期の運営には十分な事業体制も構築でき、商材の高品質化がなされ、製品化の目途を立てることができた。

以上を反映したビジネスプラン改良版を考案し、社内の枠組みの中で社内ベンチャーの立上げが承認され、事業実践の第 1 歩を踏み出すことができた。本章の目的は、ほぼ達成できたことにはなるが、収益の流れなどでまだまだ問題点が多く残っている。今後更に情報を吸収しながら、都度プランをブラッシュアップして、本来の目的、医療費の削減及び健康長寿社会の実現に貢献できるよう頑張っていきたい。

## 第 5 章引用文献

- [1] 小西徹也, “健康寿命延伸における未病ケアと未病ケア食品,” *日本未病学会雑誌*, 第巻 28, 第 1, pp. 63-68, 2022.
- [2] “食品研究者等データベース,” 一般社団法人 食品需給研究センター, [オンライン]. Available: <http://www.fmric.or.jp/cgi-bin/ffd/search/index.cgi>. [アクセス日: 20 5 2022].
- [3] N. VALUESEARCH, “健康・機能性食品,” NIKKEI Inc., 2019 年 6 月 28 日.
- [4] 厚生労働省医政局長, “検体測定室に関するガイドラインについて,” 4 2014. [オンライン]. Available: <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10800000-lseikyoku/0000098574.pdf>. [アクセス日: 15 4 2022].
- [5] 厚生労働省, “検体測定室と類似するサービスについて,” 厚生労働省, [オンライン]. Available: <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000098582.html>. [アクセス日: 26 5 2022].
- [6] 検体測定室連携協議会, “ゆびさきから、健康チェック,” 9 5 2022. [オンライン]. Available: [https://www.yubisaki.org/common/item/release\\_1\\_20220430.pdf](https://www.yubisaki.org/common/item/release_1_20220430.pdf). [アクセス日: 20 5 2022].
- [7] 医薬・生活衛生局総務課, “「患者のための薬局ビジョン」～「門前」から「かかりつけ」、そして「地域」へ～,” 23 10 2015. [オンライン]. Available: [https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/vision\\_1.pdf](https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/vision_1.pdf). [アクセス日: 20 5 2022].
- [8] 厚生労働省, “患者のための薬局ビジョン,” 23 10 2015. [オンライン]. Available: <https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka>. [アクセス日: 20 5 2022].
- [9] 社保審 - 介護給付費分科会, “施設・居住系サービスについて,” 28 4 2014. [オンライン]. Available: [https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12601000-Seisakutoukatsukan-Sanjikanshitsu\\_Shakaihoshoutantou/0000044903.pdf](https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12601000-Seisakutoukatsukan-Sanjikanshitsu_Shakaihoshoutantou/0000044903.pdf). [アクセス日: 20 5 2022].
- [10] 厚生労働省, “我が国の医療保険について,” 厚生労働省, [オンライン]. Available: [https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/iryuuohoken/iryuuohoken01/index.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iryuuohoken/iryuuohoken01/index.html). [アクセス日: 20 5 2022].
- [11] 朴 壽永, 安江 紘幸, 中尾 宏, “アイディア発想促し機能を備えたウェブ型 SWOT と TOWS 分析ツールの開発,” *農業情報学会*, 第巻 27, 第 1, pp. 1-13, 2018.
- [12] 庭本佳和編著, *経営学史叢書 : 経営学史学会創立 20 周年記念 9 アンソフ*, 文眞堂,

2012.

- [13] 経済産業省 中小企業庁, “アンゾフの成長マトリクス,” [オンライン]. Available: <https://mirasapo-plus.go.jp/hint/15043/>. [アクセス日: 26 5 2022].
- [14] “製造業界の会社・企業一覧（全国）,” Baseconnect Inc., [オンライン]. Available: <https://baseconnect.in/companies/category/56ae3b2a-c8a3-4d47-bcbf-953e6dce505a>. [アクセス日: 10 9 2021].

## 第6章 本論文の総括と今後の展開

### 6-1 総括

本論文では、「健康長寿社会実現と医療費削減に貢献するために、所属企業の強みである微弱光検出技術を最大限活かし、細胞機能を利用した「食」の機能性評価から未病評価までの一連の好中球活性評価システムを開発すること、そしてこれらのシステムを「未病ケア」「疾病予防」市場に広く普及させるための実現性高い事業計画を立案し、事業化に挑戦する」という目的を達成するための取組みについて記載した。

本研究で得られた成果について、以下にまとめる。

第2章で述べた通り、蛍光・発光同時計測技術を基盤技術として、好中球の自然免疫反応時の細胞応答（ $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と  $O_2^{\cdot-}$ 産生）を利用した *in vitro* 食品機能性評価法として「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」を確立し、実に多くの利用実績を得ただけでなく、平成25年度飯島藤十郎食品技術賞を受賞することができた。それにより、信頼性と人脈が高まったことで複数のユーザーの直接の声を聴く機会が増え、より利便性の高い *in vivo* 食品機能性評価システムの開発への道筋が得られた。更に、食品機能性分野のみならず薬学や医学の研究者にも本技術（ $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と  $O_2^{\cdot-}$ 産生の同時計測技術）が波及し、薬剤の作用機序解明ツールや、脳神経保護活性物質のスクリーニング法、血管内皮細胞保護作用を有する生理活性物質のスクリーニング法の確立に至った。*in vitro*ではあるが、より *in vivo*に近い評価系として、新たな機能性食材等生理活性物質の探索に貢献することができた。

第3章では、ユーザーの要望に沿って、体調変化や疾患発症に、より関連性が高いミエロペルオキシダーゼ活性、即ち OCl<sup>-</sup>産生を蛍光で、従来通り  $O_2^{\cdot-}$ 産生を化学発光で、同時に検出する技術を確立した。更に、極微量血液を希釈するのみの簡便な操作で、その中に含まれる好中球の活性、 $O_2^{\cdot-}$ 産生と OCl<sup>-</sup>産生の同時検出を可能とした。これは、世界初の快挙である。しかし、本システムはユーザビリティの観点から多くの問題を抱えていることが、ユーザーのフィードバックより判明した。

第4章において、これらの問題を解決できる新しいシステムの開発に取り組んだ。開発者の知恵を結集した流体チップ型の専用容器を開発し、その容器に既存の高感度光学系をマッチさせたシステムを開発したことで、全ての問題を解決することができた。更に、高感度化と安定性、再現性の向上にもつながり、多くのヒト臨床研究に利用されている。本論では、システムの検証として実施した縦断研究と横断研究について記載したが、目的の一つであった機能性食材の介入研究にも複数利用され、機能性表示取得に向けた論文準備がなされているところである。

ここまでの取組みは、中央研究所で研究者として実施してきた。開発したこのシステムの、「未病ケア」「疾病予防」市場での事業実践を目指して部署異動し、光産業創成大学院

大学でビジネスについて学びながら、事業計画立案に取り組んだ。第 5 章に記載した取り組みである。発足したばかりの社内ベンチャー制度を利用することとし、これまでのアクティブな研究活動で得た関連分野の情報や、商材のシステムに最も詳しい開発者だからこそ可能となる独自のビジネスプランの考案を目指した。市場調査と SWOT 分析から始めて、顧客ヒアリング等の実施によりブラッシュアップを繰り返し立案した実現可能性を高めた事業計画にて、事業実践の第 1 歩を踏み出すことができた。

## 6-2 結論

本研究において、自然免疫の最大の担い手である好中球の免疫反応を微弱光検出技術を駆使してモニターする技術を確立し、食の機能性評価及び、未病評価を可能とする好中球活性評価システムとして確立した。特に、数  $\mu\text{L}$  の血液を希釈のみの簡便な操作でその中に含まれる好中球の活性を安定してモニターできる技術は、世界初の成果である。

開発したシステムを、「未病ケア」「疾病予防」市場でビジネス展開するためのノウハウを学び実践したことにより、実現可能性高い事業計画が考案でき、事業実践をスタートさせることができた。当初の目的である、食による未病ケアの普及を促進し、健康長寿社会実現と医療費削減への貢献に向けて、第 1 歩を踏み出すことができた。

また、事業化を検討する中で、好中球活性評価の医療分野での重要性に気づかされ、新たな価値を見出すことができた。ヒトの疾患診断に用いられている好中球機能評価は、煩雑な操作と長い時間が必要とされ、正確性にも欠けるため、あまり普及していないのが現状である。簡便で再現性、安定性高い本システムであれば、ベッドサイドでの評価も可能となる。現在取り組んでいる疾患患者対象の臨床研究により、医学的エビデンスが蓄積できれば、今後重症化予防の治療法選択のための有効な指標として、医療費削減に大きく貢献できる可能性を秘めている。当初の目的を上回る成果が得られた。

## 6-3 今後の展開

まだ始めたばかりで、課題は山積みであるが、まずは関連学会参加や展示会出展等によりコロナ禍で希薄になった人間関係、特にキーパーソンとの関係復活から始めて、1stStep の目的である未病評価のエビデンスを得ること（他の評価系との比較検証による論文化）、機能性表示の取得実績を得ること、未病解決策を蓄積すること、新たな価値を見出すことが達成できるよう、アクティブにマーケティング活動を行っていく。また、すでに連携を始めている 5 章に記載した 1stStep のアーリーアダプターとの関係も、2ndStep への展開を確実なものにできるよう、密なサポートを行っていく予定である。

更に、本事業が発展していくためには、2ndStep 以降の海外展開が必須であると考えている。第 1 章で述べた通り、公的医療保険制度のない米国では未病ケアに対する意識が日

本より高い。まずは、米国の法制度の確認及び市場調査から始める予定である。国内の医療機器登録と共に、FDA 認証取得も視野に入れて、廉価版普及機の開発やエビデンス蓄積のための臨床研究に、パートナーとコンサルを有効利用しながらメンバーと協力して引き続き取り組んでいく予定である。

今後の活動の中で更に情報を吸収しながら、都度プランをブラッシュアップして、本来の目的、医療費の削減及び健康長寿社会の実現に貢献できるよう頑張っていきたい。



## 謝辞

本論文を纏めるにあたり、ご指導賜りました指導教官の光産業創成大学院大学横田浩章准教授、主査をお受けくださった長谷川和男教授、バイオフォトニクスデザイン学科の内藤康秀准教授、葺島伸生特任教授、水野誠一郎特任教授に深く感謝申し上げます。

また、ビジネスを全く知らない筆者に、入学当初から本論文執筆まで長期に渡りご指導賜りました増田靖教授に深く感謝申し上げます。

ご多忙の中、何度もメンタリングにお付き合いいただいた八木雅和非常勤教授に深く感謝申し上げます。

所属企業の時から、上司としてご指導、ご助言下さり、また自ら事業化する挑戦への後押しをしてくださった伊藤博康副学長に、深く感謝申し上げます。

光産業創成大学院大学在学中のご指導とご厚誼に対して、瀧口義浩学長並びに教員の皆さま、及び事務局の皆さま、共に学び分野ゼミでは有益なアドバイスを下さったバイオフォトニクスデザイン学科の皆さま、岡田晃行氏、一緒に入学し励ましあいながら学生生活を送った石井彬史氏にも感謝申し上げます。

博士研究の機会を与えてくださいました所属企業の、晝馬明代表取締役社長、原勉元中央研究所長、岡田裕之 GSCC センター長に心よりお礼申し上げます。

また、本研究にご協力いただきました SIP プロジェクト「ホメオスタシス多視点評価システム開発グループ」コンソーシアム代表機関の自然免疫制御技術研究組合様、参画機関の研究者の皆さま、所属企業の被検者としてご協力いただいた皆さま、SIP プロジェクト登録メンバーの皆さま、GSCC サポートメンバーの皆さま、第 8、第 9 研究室の皆さま、契約や事務処理等にご協力いただいた関連部署の皆さまに厚くお礼申し上げます。

最後に、筆者の無謀とも言える挑戦を温かく見守り、一番の応援者、理解者でいてくれた夫に心から感謝申し上げます。

## 業績目録

本論文に関連するもののみ、以下に示した

### 1. 論文等

- (1) Kimiko Kazumura, Kozo Takeuchi, Yukiko Hatano, Akiko Hara, Toshiyuki Miwa, Masaki Hattori, Fusanori Kondo, Naokazu Morishita, Hiroshi Tsuchiya, Toshihiko Osawa 「Correlation between human health and reactive oxygen species produced in blood: a long-term chemiluminescence and fluorescence analysis」 *scientific reports*, 11(1), 14545, 2021 (査読有 第4章)
- (2) 數村公子 「未病検出システムの開発と予防医療への応用」 *COSMETIC STAGE*, 15(3), 48-56, 2021 (第3, 4章)
- (3) Tomomi Kanno, Kimiko Kazumura, Toshio Niwa, Etsuko Harada, Yoshiaki Miyake, Toshihiko Osawa 「Evaluation of anti-Inflammatory properties of hot water extract from *Coprinus comatus* using HL-60 and 3T3-L1 Cells」 *Japanese journal of Food Chemistry and Safety*, 27(2), 53-59, 2020 (査読有 第2章)
- (4) 數村公子 「光センシングによる簡便な健康(未病)チェックマーカーの開発」 *アレルギーの臨床* 1月号、40(1), 76-79, 2020 (第3, 4章)
- (5) 數村公子 「光センシングによる簡便な健康(未病)チェックマーカーの開発」 *アレルギーの臨床* 9月臨時増刊号、39(10), 42-25, 2019 (第3, 4章)
- (6) 數村公子 「光センシングによる簡便な健康(未病)チェックマーカーの開発」 *月刊「アグリバイオ」*、3(9), 44-47, 2019 (第3, 4章)
- (7) Kimiko Kazumura, Kozo Takeuchi, Akiko Hara, Toshiyuki Miwa, Masaki Hattori, Yuqiu Wu, Naokazu Morishita, Hiroshi Tsuchiya, Toshihiko Osawa 「Rapid on-site dual optical system to measure specific reactive oxygen species ( $O_2^{\cdot-}$  and  $OCI^-$ ) in a tiny droplet of whole blood」 *PLOS ONE*, 13(8):e0200573, 2018 (査読有 第3章)
- (8) Rei Kuroda, Kimiko Kazumura, Miki Ushikata, Yuji Minami, Katsuko Kajiji 「Elucidating the Improvement in Vascular Endothelial Function from Sakurajima Daikon and Its Mechanism of Action: A Comparative Study with *Raphanus sativus*」 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(33), 8714-8721, 2018 (査読有 第2章)
- (9) Ran Zhang, Hiroyuki Inagawa, Kimiko Kazumura, Hiroshi Tsuchiya, Toshiyuki Miwa, Naokazu Morishita, Sachiko Uchibori, Jun Hanashiro, Tsutomu Masaki, Hideki Kobara, Gen-ichiro Soma 「Study of the Evaluation of Hypertensive Model Rats Using Peripheral Blood Neutrophil Activity and Phagocytic Activity and Oxidized LDL Evaluation」 *Anticancer Research*, 38(7), 4289-4294, 2018 (査読有 第3章)
- (10) 數村公子 「光センシングによる抗酸化・抗炎症評価法の開発」 書籍：血流改善

成分の開発と応用、CMC 出版（東京都）.80-88, 2018（第2, 3, 4章）

- (11) Yutaro Kobayashi, Hiroyuki Inagawa, Chie Kohchi, Kimiko Kazumura, Hiroshi Tsuchiya, Toshiyuki Miwa, Katsuichiro Okazaki, Gen-ichiro Soma 「Oral administration of Pantoea agglomerans-derived lipopolysaccharide prevents metabolic dysfunction and Alzheimer's disease-related memory loss in senescence accelerated prone 8 (SAMP8) mice fed a high-fat diet」 *PLOS ONE*, 13(6):e0198493, 2018（**査読有** 第3章）
- (12) Yutaro Kobayashi, Hiroyuki Inagawa, Chie Kohchi, Kimiko Kazumura, Hiroshi Tsuchiya, Toshiyuki Miwa, Katsuichiro Okazaki, Gen-ichiro Soma 「Oral administration of Pantoea agglomerans-derived lipopolysaccharide prevents development of atherosclerosis in high-fat diet-fed apoE-deficient mice via ameliorating hyperlipidemia, pro-inflammatory mediators and oxidative responses」 *PLOS ONE*, 13(3):e0195008, 2018（**査読有** 第3章）
- (13) 数村公子 「光センシングによる食品機能性評価法の開発 ~ *in vitro* から *in vivo* へ~」 月刊「細胞」, 49(13), 625-627, 2017（第2, 3章）.
- (14) Ran Zhang, Hiroyuki Inagawa, Masaru Takahashi, Hisami Kawanishi, Kimiko Kazumura, Hiroshi Tsuchiya, Naokazu Morishita, Yutaro Kobayashi, Tsutomu Masaki, Hideki Kobara, Gen-ichiro Soma 「Measurement of the Phagocytic Activity of Human Peripheral Blood Using a Highly Sensitive Fluorometric Detection Device Without Hemolysis」 *Anticancer Research*, 37, 3897-3903, 2017（**査読有** 第3章）
- (15) 数村公子 「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」 *生物工学会誌*, 95(6), 324-326, 2017（第3章）
- (16) Ran Zhang, Yutaro Kobayashi, Kimiko Kazumura, Hiroshi Tsuchiya, Naokazu Morishita, Hiroyuki Inagawa, Gen-ichiro Soma 「Development of an evaluation device for phagocytic activity of new phagocytes using simple and pH-sensitive particles that do not require pre-treatment」 *Anticancer Research*, 36(7), 3613-3618, 2016（**査読有** 第3章）
- (17) Kimiko Kazumura, Lucia Satiko Yoshida, Akiko Hara, Hiroshi Tsuchiya, Naokazu Morishita, Hirokazu Kawagishi, Tomohito Kakegawa, Yasukatsu Yuda, Hiromi Takano-Ohmuro 「Inhibition of neutrophil superoxide generation by shikonin is associated with suppression of cellular  $Ca^{2+}$  fluxes」 *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 59(1), 1-9, 2016（**査読有** 第2章）
- (18) Yoshiaki Miyake, Mika Mochizuki, Chihiro Ito, Kimiko Kazumura, Masataka Itoigawa 「Estimation of bioactivity of seven aromatic compounds isolated from nihiime fruit by simultaneously monitoring superoxide generation and intracellular calcium ion levels of neutrophils」 *Food Science and Technology Research*, 22(5), 713-718, 2016

( 査読有 第 2 章 )

- (19) 數村公子 「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」 生物工学会誌、93(6), 356-358, 2015 ( 第 2 章 )
- (20) Yuqiu Wu, Kimiko Kazumura, Wakako Maruyama, Toshihiko Osawa, Makoto Naoi 「Rasagiline and selegiline suppress calcium efflux from mitochondria by PK11195-induced opening of mitochondrial permeability transition pore: a novel anti-apoptotic function for neuroprotection」 *Journal of Neural Transmission*, 122(10), 1399-1407, 2015 ( 査読有 第 2 章 )
- (21) 秋草文、數村公子 「自然免疫応答を利用した食品機能性評価法」 JATAFF ジャーナル, 2015 ( 第 2 章 )
- (22) 原田和樹、數村公子 「調理科学における抗酸化能研究 後編」 日本調理科学会誌、46(6), 395-398, 2013 ( 第 2 章 )
- (23) Kimiko Kazumura, Yukiko Sato, Hiroshi Satozono, Takashi Koike, Hiroshi Tsuchiya, Mitsuo Hiramatsu, Masakazu Katsumata, Shigetoshi Okazaki 「 Simultaneous monitoring of superoxides and intracellular calcium ions in neutrophils by chemiluminescence and fluorescence: Evaluation of action mechanisms of bioactive compounds in foods」 *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 84, 90-96, 2013 ( 査読有 第 2 章 )
- (24) Kazuki Harada, Ritsuko Wada, Shigenori Yaguchi, Toshimichi Maeda, Rie Date, Takushi Tokunaga, Kimiko Kazumura, Kazuko Shimada, Misato Matsumoto, Tadayuki Wako, Naoki Yamauchi, Masayoshi Shigyo 「 Supplementation with Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.) expressing a single alien chromosome from shallot increases the antioxidant activity of Kamaboko fish jelly paste *in vitro*」 *Biomedical Report*, (3), 355-358, 2013 ( 査読有 第 2 章 )
- (25) 瀧本陽介、數村公子 「抗酸化・抗炎症・免疫賦活作用の同時評価」 *Food Style* 21, 16(8), 55-58, 2012 ( 第 2 章 )
- (26) 西郷勝康、橋本誠、浄慶幸江、炬口真理子、杉本健、數村公子、土屋広司、井本しおん、熊谷俊一 「ヘミンによるヒト好中球の活性化」 臨床病理 (日本臨床検査医学会誌) 56(11), 967-972, 2008 ( 査読有 第 2 章 )
- (27) Yingbao Yang, Jinghui Luo, Kimiko Kazumura, Kazuhiko Takeuchi, Naoki Inui, Hideharu Hayashi, Kyoichi Ohashi, Hiroshi Watanabe 「 Cilostazol suppresses adhesion of human neutrophils to HUVECs stimulated by FMLP and its mechanisms」 *Life Sciences*, 79(7), 629-636, 2006 ( 査読有 第 2 章 )
- (28) Hiroshi Satozono, Kimiko Kazumura, Shigetoshi Okazaki, Mitsuo Hiramatsu 「 Simultaneous measurement of superoxide generation and intracellular calcium ion of neutrophil-like culture cells」 *Luminescence*, 21(2), 69-71, 2005 ( 査読有 第 2 章 )

## 2. 学会等発表

- (1) 日本畜産学会第 130 回大会 2022/9/14-17 予定 「植物性発酵混合飼料給与による短鎖脂肪酸を介した肉豚の全身免疫修飾効果」 塚原隆充、山本知里、木本清嗣、數村公子、小田真知、井上亮（第 4 章）
- (2) 園芸学会令和 4 年度春季大会 2022/3/17 「生および黒ニンニクにおける炭水化物組成ならびに抗酸化成分含量に関する比較研究」 松瀬可菜子、平田翔、井内良仁、上林聡之、奥田優、數村公子、執行正義（第 2 章）
- (3) 食品ニューテクノロジー研究会 2021 年 10 月例会 2021/10/19 「食品の効果を評価する「光センシングによる好中球活性評価技術」～ *in vitro* から *in vivo* へ～」數村公子（第 2, 3, 4 章）
- (4) 園芸学会令和 3 年度秋季大会 2021/9/8 「ニンニクの青果と加工品における食品機能性の比較」 松瀬可菜子、牧野日名子、平田翔、井内良仁、上林聡之、奥田優、數村公子、c
- (5) 日本農芸化学会 2021 年度大会 2021/3/20 「脂肪接種による一過性酸化ストレスの検出」 數村公子、竹内康造、九澤香織、波多野薫子、永井雅、美和登志幸、服部将貴、内藤通孝、大澤俊彦（第 4 章）
- (6) 第 73 回日本酸化ストレス学会学術集会 2020/6/3 「「昆虫食」の食品機能性評価」井内良仁、竜口雅、宮本実奈、俵積田晃成、橋本麻奈美、數村公子（第 2 章）
- (7) 第 73 回日本酸化ストレス学会学術集会 2020/6/3 「光センシングによる簡便な未病検出システムの開発」 數村公子、波多野薫子、竹内康造、松下悦史、吉田晃浩、阿部新、朝倉富子、斎藤芳和、美和登志幸、服部将貴、大澤俊彦（第 4 章）
- (8) 第 45 回脳卒中学会学術集会 2020/3/26 「脳梗塞患者の全血を用いた急性期脳梗塞バイオマーカー miRNA の探索および同時測定した好中球活性との関連性の検討」阿部新、斎藤芳和、安岡顕人、數村公子、阿部啓子、上田雅之、太田貴裕、朝倉富子（第 4 章）
- (9) 日本農芸化学会 2020 年度大会 2020/3/25 「光センシングによる簡便な未病マーカーの開発」 數村公子、波多野薫子、竹内康造、松下悦史、吉田晃浩、阿部新、朝倉富子、斎藤芳和、美和登志幸、服部将貴、大澤俊彦（第 4 章）
- (10) 園芸学会令和 2 年度春季大会 2020/3/21 「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験によるネギ類野菜の機能性評価」 平田翔、吉岡恵理、牧野日名子、數村公子、大澤俊彦（第 4 章）
- (11) (一財) バイオインダストリー協会主催「未来へのバイオ技術」勉強会 2020/1/28 「光センシングによる簡便な未病検出システムの開発と予防医療への応用」 數村公子（第 2, 3, 4 章）
- (12) the 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) シンポジウム

- 2019/12/3 「Health effects of adlay tea intake in healthy adults.」 石川博仁、中野真宏、篠原裕枝、増田隆昌、永井雅、數村公子、望月美佳、大澤俊彦（第4章）
- (13) the 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) シンポジウム  
2019/12/3 「Development of a pre-symptomatic marker and its detection for Point of Care Testing. (POCT)」 數村公子（第4章）
- (14) 第26回日本未病システム学会学術総会 シンポジウム 2019/11/17 「光センシングによる簡便な未病マーカーの開発」 數村公子（第4章）
- (15) BioJapan2019 2019/10/9-11 「POCT 対象の未病マーカーの開発」 數村公子（第4章）
- (16) 第59回日本臨床化学会年次学術集会 シンポジウム 2019/9/28 「光センシングによる簡便な未病マーカーの開発」 數村公子（第4章）
- (17) 園芸学会令和元年度秋季大会 2019/9/16 「オミクス統合解析によるニンニク遺伝資源・コアコレクションの構築とその機能性評価」 執行正義、平田翔、山田朋宏、佐藤修正、澤田有司、數村公子、小林誠（第2章）
- (18) 第72回日本酸化ストレス学会学術集会 2019/6/28 「光センシングによる簡便な生体内抗酸化能評価システムの開発」 數村公子、波多野薫子、竹内康造、美和登志幸、服部将貴、土屋広司、伊藤博康、大澤俊彦（第4章）
- (19) 第8回日本栄養改善学会東海支部学術総会 2019/6/9 「ワイルドライスの機能性に関する研究」 望月美佳、岡部知恵子、數村公子、大澤俊彦（第2章）
- (20) 第60回日本神経学会学術大会 2019/5/22 「重症筋無力症の好中球活性の評価-リアルタイム化学発光・蛍光発光モニタリングシステムを用いて」 阿部新、朝倉富子、斎藤芳和、酒巻雅典、數村公子、田熊彩子、三品雅洋、木村和美（第4章）
- (21) 第73回日本栄養食糧学会 2019/5/17 「桜島大根成分による血管内皮機能改善効果の作用メカニズム」 若松美里、仲榮眞優理、佐々木真歩、黒田怜、數村公子、南雄二、加治屋勝子（第2章）
- (22) 第73回日本栄養食糧学会 2019/5/17 「ホメオスタシス多視点評価システムを用いた機能性農産物（脱口ウ玄米）摂取の機能評価」 稲川裕之、坂名城隼、川西寿美、張燃、山下雅史、上延麻耶、雑賀俊幸、數村公子、波多野薫子、美和登志幸、森下直計、西本尚樹、杣源一郎（第3,4章）
- (23) 第105回日本消化器病学会総会 2019/5/9 「新規に開発した食細胞貪食能・好中球活性評価システムを用いた食道癌および胃癌患者での評価」 小原英幹、坂名城隼、稲川裕之、森宏仁、西山典子、小林伸也、千代大翔、谷内田達夫、數村公子、杣源一郎、正木勉（第4章）
- (24) 第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会 (The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress: FAOPS2019) 2019/3/28 「Stimulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by Raphanus

- sativus extract.」 若松美里、黒田怜、數村公子、南雄二、加治屋勝子（第2章）
- (25)日本農芸化学会 2019 年度大会 2019/3/24 「光センシングによる簡便な未病マーカーの開発」 數村公子、波多野薫子、坂名城隼、川西寿美、美和登志幸、服部将貴、竹内康造、稲川裕之、柚源一郎、大澤俊彦（第4章）
- (26)第8回シンポジウム「未来志向の次世代食品機能性と自然免疫」 2019/3/15 「光センシングによるホメオスタシス多視点評価オンサイトシステム」 數村公子（第4章）
- (27)科学技術振興機構 未来社会創造事業「世界一の安全・安心社会の実現」領域重点公募テーマ策定のためのワークショップ 2019/1/17 「光センシングによる簡便な未病マーカーの開発」 數村公子（第4章）
- (28)2018 年度日本食品科学工学会中部支部大会 2018/12/15 「カカオポリフェノールの脳内老化抑制機構における役割に関する研究」 三輪茉那美、望月美佳、上野有紀、呉煜秋、岡部知恵子、數村公子、土屋広司、夏目みどり、大澤俊彦（第2章）
- (29)第22回バイオ治療法研究会 2018/12/8 「ホメオスタシス多視点評価システムの暫定基準範囲の設定とその評価」 坂名城隼、稲川裕之、張燃、川西寿美、山下雅史、中本尊、數村公子、波多野薫子、土屋広司、西本尚樹、小原英幹、正木勉、柚源一郎（第4章）
- (30)第22回バイオ治療法研究会 2018/12/8 「新規に開発した食細胞貪食能・好中球活性評価システムを用いた食道癌および胃癌患者での評価」 小原英幹、坂名城隼、稲川裕之、森宏仁、西山典子、千代大翔、川西寿美、山下雅史、數村公子、美和登志幸、森下直計、上里裕樹、梶山康憲、柚源一郎、正木勉（第4章）
- (31)BioJapan2018 スポンサーセミナー 2018/10/11 「光センシングによるホメオスタシス多視点評価オンサイトシステム」 數村公子（第3,4章）
- (32)小山市主催「第2回健康長寿はとむぎ100歳プロジェクト」 2018/10/5 「光センシングによる食品機能性評価」 數村公子（第2,3,4章）
- (33)ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」主催シンポジウム 2018/9/18 「光センシングによる簡便な生体内抗酸化能評価システムの開発」 數村公子（第4章）
- (34)日本フードファクター学会第23回大会 2018/9/7 「カカオポリフェノールの脳内老化抑制機構における役割に関する研究」 三輪茉那美、望月美佳、上野有紀、呉煜秋、岡部知恵子、數村公子、土屋広司、夏目みどり、大澤俊彦（第2章）
- (35)日本食品科学工学会第65回大会 2018/8/22 「光センシングによる簡便な生体内抗酸化能評価システムの開発」 數村公子、竹内康造、九澤香織、波多野薫子、永井雅、土屋広司、森下直計、服部将貴、内藤通孝、大澤俊彦（第4章）
- (36)日本酸化ストレス学会フリーラジカルスクール 2018/8/5 「光センシングによる生体内抗酸化能評価法の開発」 數村公子

- (37)日本学術振興会 先導的研究開発委員会 「食による生体恒常性維持の指標となる未病マーカーの探索戦略」 公開シンポジウム 2018/7/20 「光センシングによるホメオスタシス多視点評価オンサイトシステム」 數村公子 (第2,3,4章)
- (38)第151回日本循環器学会東海地方会 2018/6/30 「下肢虚血に対する血行再建後のミエロペルオキシダーゼ活性の変化 3例の検討」 松下悦史、吉田晃浩、古田竜平、林和徳、數村公子、竹内康造 (第4章)
- (39)第16回日本予防医学会学術総会 2018/6/16 「高血圧モデルラットを用いたホメオスタシス多視点評価システムの評価」 張燃、稲川裕之、内堀幸子、數村公子、土屋広司、美和登志幸、杣源一郎 (第3章)
- (40)日本農芸化学会 2018年度大会 2018/3/15-18 「桜島大根抽出成分による血管内皮機能改善効果及び作用機序の解明」 黒田怜、數村公子、南雄二、加治屋勝子 (第2章)
- (41)日本農芸化学会 2018年度大会 2018/3/15-18 「光センシングによる簡便な生体内抗酸化能評価システムの開発」 數村公子、竹内康造、波多野薫子、土屋広司、美和登志幸、服部将貴、森下直計、近藤房宣、大澤俊彦 (第4章)
- (42)日本酸化ストレス学会東海支部第6回学術集会 2018/2/10 「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験によるカカオポリフェノールの機能評価」 三輪茉那美、望月美佳、岡部知恵子、數村公子、土屋広司、竹内康造、夏目みどり、大澤俊彦 (第2章)
- (43)第21回バイオ治療法研究会学術集会 2017/12/2 「前処理なしのヒト末梢血の食細胞貪食能活性測定についての予備的検討」 張燃、山下雅史、稲川裕之、坂名城隼、數村公子、土屋広司、竹内康造、美和登志幸、杣源一郎 (第3章)
- (44)SIP「次世代機能性農林水産物・食品の開発」シンポジウム～1億総活躍社会の実現に夢を馳せて 2017/11/30 「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検証 ～バリデーションとヒト試験結果～」 數村公子、稲川裕之 (第3,4章)
- (45)日本食品科学工学会第64回大会 2017/8/28-30 「熊野産カンキツ「新姫」に含まれる芳香族化合物の機能性評価」 三宅義明、望月美佳、井藤千裕、數村公子、糸魚川政孝 (第2章)
- (46)日本食品科学工学会第64回大会 2017/8/28-30 「光センシングによる簡便な生体内抗酸化能評価システムの開発」 數村公子、竹内康造、土屋広司、美和登志幸、波多野薫子、原顕子、服部将貴、森下直計、大澤俊彦 (第3,4章)
- (47)第28回日本生体防御学会学術総会 2017/6/30-7/1 「簡便・短時間・微量血液で測定可能な食細胞貪食能評価システムの開発」 張燃、稲川裕之、川西寿美、山下雅史、數村公子、土屋広司、森下直計、杣源一郎 (第3章)
- (48)日本農芸化学会 2017年度大会 2017/3/18-20 「光センシングによる簡便な生体



- 内抗酸化能評価システムの開発」 數村公子、土屋広司、原顕子、竹内康造、美和登志幸、服部将貴、森下直計、大澤俊彦（第3,4章）
- (49) JSPS「食による生体恒常性維持の指標となる未病マーカーの探索戦略」委員会第1回研究会 2017/3/7 「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（第3,4章）
- (50) 日本酸化ストレス学会東海支部第5回学術集会 2017/2/18 「自然免疫応答を用いた新規食品機能性評価法による柑橘類等フラボノイドの機能性」 望月美佳、山田洋美、數村公子、土屋広司、森下直計、坂本祥子、大澤俊彦（第2章）
- (51) 第20回バイオ治療法研究会学術集会 2016/12/10 「簡便・短時間・少量な試料で測定可能なヒト末梢血を用いた食能評価システムの開発」 張燃、稲川裕之、數村公子、川西寿美、高橋賢、土屋広司、森下直計、小林優多郎、杉源一郎（第3章）
- (52) 内閣府 SIP「次世代機能性農林水産物・食品の開発」公開シンポジウム～夢の進展と社会実装～ 2016/12/5 「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疾患動物モデル及び健常人での有用性検証」 數村公子、稲川裕之（第3章）
- (53) BioJapan2016 2016/10/14 「光センシングによるホメオスタシス多視点評価システムの開発」 數村公子（第3章）
- (54) 6th Indo-Japanese International Symposium 2016/9/23-24 「Development of an easy-to-use device for measuring phagocytic activity in a few microliters of blood and future perspective on prevention of infectious diseases」 稲川裕之、張燃、小林優多郎、數村公子、土屋広司、森下直計、寺田弘、杉源一郎（第3章）
- (55) 日本水産学会秋季大会 2016/9/8-11 「ゼブラフィッシュ胚膜における物質輸送経路」 大山結香、下岡千尋、小川智久、村本光二、鈴木徹、數村公子（第2章）
- (56) 日本水産学会秋季大会 2016/9/8-11 「ゼブラフィッシュ胚におけるポリアミン類の抗酸化特性」 下岡千尋、大山結香、小川智久、村本光二、鈴木徹、數村公子（第2章）
- (57) 日本食品科学工学会第63回大会 2016/8/25-27 「プラミール由来β1,4-マンノピオースの抗酸化特性」 大山結香、下岡千尋、西東恵梨、小川智久、村本光二、福井健介、數村公子（第2章）
- (58) 日本食品科学工学会第63回大会 2016/8/25-27 「光センシングによる簡便な生体内抗酸化能評価システムの開発」 數村公子、原顕子、竹内康造、吳煜秋、土屋広司、美和登志幸、服部将貴、森下直計、大澤俊彦（第3章）
- (59) 日本食品科学工学会第63回大会シンポジウム 2016/8/25-27 「光センシングによる食品機能性評価～*in vitro*から*in vivo*へ～」 數村公子（第2,3章）
- (60)(47) 日本農芸化学会 2016年度大会 2016/3/27-30 「光センシングによる簡便な

- 生体内抗酸化能評価システムの開発」 數村公子、原顕子、呉煜秋、土屋広司、美和登志幸、森下直計、大澤俊彦（第3章）
- (61)(46) 日本農芸化学会 2016 年度大会 2016/3/27-30 「ゼブラフィッシュにおける酸化ストレス応答とヒスチジン含有ペプチドの抗酸化特性」 下岡千尋、大山結香、小川智久、村本光二、鈴木徹、數村公子（第2章）
- (62)第 89 回日本薬理学会年会 2016/3/9-11 「生薬シコンの有効成分シコニンによる fMLP 刺激時の好中球の細胞内カルシウム濃度上昇及び活性酸素産生を抑制する」 吉田ルシア幸子、數村公子、原顕子、懸川友人、大室弘美（第2章）
- (63)第 5 回バイオ・メディカル・フォーラム / 第 2 回産学連携ヘルスケアナレッジセミナー 2016/2/19 「光センシングによる食品機能性評価 ~ *in vitro* から *in vivo* へ ~」 數村公子（第2, 3章）
- (64)「次世代機能性農林水産物・食品の開発」公開シンポジウム 2015/12/16 「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（第2, 3章）
- (65)第 19 回バイオ治療法研究会学術集会 2015/12/5 「簡便・短時間・少量な試料で測定可能な食細胞貪食能評価装置の開発について」 張燃、稲川裕之、數村公子、土屋広司、森下直計、小林優多郎、柚源一郎（第3章）
- (66)The 6th International Conference on Food Factors (ICoFF2015) 2015/11/22-25 「Antioxidant and anti-inflammatory effects of various tea extracts by the simultaneous measurement of chemiluminescence and fluorescence.」 望月美佳、數村公子、山田洋美、呉煜秋、原顕子、森下直計、土屋広司、大澤俊彦（第2章）
- (67)The 6th International Conference on Food Factors (ICoFF2015) 2015/11/22-25 「New *in vivo* evaluating system for the antioxidant capacity: Simultaneous monitoring of superoxide generation and myeloperoxidase activity in neutrophils.」 數村公子、原顕子、呉煜秋、土屋広司、森下直計、美和登志幸、山中武志、望月美佳、大澤俊彦（第3章）
- (68)The 6th International Conference on Food Factors (ICoFF2015) 2015/11/22-25 「Anti-inflammatory properties of extract from *Coprinus comatus*.」 菅野友美、數村公子、原田栄津子、呉煜秋、大澤俊彦（第2章）
- (69)The 6th International Conference on Food Factors (ICoFF2015) 2015/11/22-25 「Evaluation of myeloperoxidase enzymatic activity in minor volume blood samples.」 呉煜秋、永井雅、數村公子、望月美佳、原顕子、石川博仁、瀧本陽介、土屋広司、大澤俊彦（第3章）
- (70)BioJapan2015 2015/10/16 「光センシングによるホメオスタシス多視点評価システムの開発」 數村公子（第3章）
- (71)日本食品科学工学会第 62 回大会 2015/8/25-27 「光センシングによる脳神経変

- 性疾患予防効果評価法の開発」 數村公子、吳焯秋、土屋広司、丸山和佳子、大澤俊彦、直井信（第2章）
- (72)第12回アジア栄養学会議（ACN2015） 2015/4/12 「A study on health promoting power in Astaxanthin by using dual-mode observation of innate immune responses in neutrophils.」 數村公子、佐藤由紀子、望月美佳、土屋広司、小池隆、吳焯秋、岡崎茂俊、大澤俊彦（第2章）
- (73)日本農芸化学会 2015 年度大会 2015/3/26-29 「生薬シコンの有効成分シコニンの好中球自然免疫応答への影響とその作用機序の解明」 數村公子、吉田ルシア幸子、土屋広司、小池隆、岡崎茂俊、湯田康勝、大室弘美（第2章）
- (74)Society of Neuroscience 2014/11/15-19 「Rasagiline suppresses calcium release from mitochondria and prevents apoptosis induced by opening mitochondrial permeability transition pore, using a novel simultaneous assay of calcium and superoxide in the cytoplasm.」 吳焯秋、數村公子、丸山和佳子、大澤俊彦、直井信（第2章）
- (75)BioJapan2014 2014/10/15-17 「抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験」の紹介」 數村公子（第2章）
- (76)第10回アスタキサンチン研究会 2014/9/12 「好中球の自然免疫応答を用いた新規食品機能性評価法で判明したアスタキサンチンの機能性」 數村公子、望月美佳、佐藤由紀子、土屋広司、小池隆、吳曉紅、岡崎茂俊、大澤俊彦（第2章）
- (77)日本食品科学工学会第61回大会 2014/8/28-30 「自然免疫応答を用いた新規食品機能性評価法で判明したアスタキサンチンの機能性」 數村公子、望月美佳、佐藤由紀子、土屋広司、小池隆、吳曉紅、岡崎茂俊、大澤俊彦（第2章）
- (78)第68回日本栄養・食糧学会大会 2014/5/30-6/1 「コブリーノ（Coprinus comatus）由来エルゴチオネイン画分の機能性に関する研究」 菅野友美、數村公子、下田博司、原田栄津子、吳曉紅、大澤俊彦（第2章）
- (79)日本農芸化学会 2014 年度大会 2014/3/27-30 「自然免疫応答を用いた新規食品機能性評価法で判明した茶類の機能性」 數村公子、山本（前田）万里、里園浩、吳曉紅、土屋広司、小池隆、岡崎茂俊、大澤俊彦（第2章）
- (80)バイオインダストリー協会「未来へのバイオ技術」勉強会 2014/2/19 「好中球の免疫反応と光検出技術を利用した免疫賦活・抗酸化・抗炎症作用同時評価法の応用と展望」 數村公子（第2,3章）
- (81)AOU 研究会 2013/11/27 「免疫反応を指標とした新規生体内抗酸化機能評価法」 數村公子（第2,3章）
- (82)第18回日本フードファクター学会学術集会 2013/11/27 「マヌカ蜂蜜認証のための Leptosin 及び Methyl Syringate の検出定量」 加藤陽二、藤中里衣、北元憲利、數村公子、瀧本陽介（第2章）

- (83)第 5 回国際 O-CHA 学術会議 (ICOS2013) 2013/11/6-8 「Health promoting power in tea varieties as revealed by optical multimode monitoring of innate immune responses in neutrophils.」 數村公子、山本 (前田) 万里、呉曉紅、大澤俊彦 (第 2 章)
- (84)「日本を健康にする！」研究会第 4 回シンポジウム 2013/7/6 「蛍光・化学発光同時測定装置による機能性食品の識別」 望月美佳、數村公子、伊藤友美 (第 2 章)
- (85)日本農芸化学会 2013 年度大会 2013/3/24-28 「自然免疫応答を用いた新規食品機能性評価法で判明したアントシアン類の機能性」 數村公子、佐藤由紀子、里園浩、望月美佳、呉曉紅、土屋広司、小池隆、岡崎茂俊、大澤俊彦 (第 2 章)
- (86)静岡大学食品・生物産業創出拠点主催 第 30 回研究会 2012/9/14 「好中球の免疫反応を利用した新規食品機能性評価法」 數村公子 (第 2 章)
- (87)22th International Federation for Home Economics World Congress 2012 (IFHE 2012) 2012/7/16 「Multi-analysis of functions on sea materials by using GC/MS, ORAC, ESR, apoptosis induction and next-generation food functional estimation methods.」 原田和樹、數村公子、前田俊道、宮崎泰幸、和田律子、島田和子、松井健二 (第 2 章)
- (88)International Conference on Food Factors 2011 (ICoFF2011) 2011/11/21 「Functions for human health benefits on Japanese fish sauces by GC/MS, ORAC, ESR and new simultaneous measurement for signal transduction methods.」 原田和樹、數村公子、前田俊道、宮崎泰幸、和田律子、島田和子、松井健二 (第 2 章)
- (89)International Conference on Food Factors 2011 (ICoFF2011) 2011/11/21 「Antioxidant and anti-inflammatory effects of anthocyanins by the simultaneous measurement of chemiluminescence and fluorescence.」 望月美佳、數村公子、宮田雅美、大澤俊彦 (第 2 章)
- (90)International Conference on Food Factors 2011 (ICoFF2011) 2011/11/21 「New estimation method of food for health progress by simultaneously monitoring superoxide generation and intracellular calcium ion concentration of neutrophils.」 數村公子、里園浩、岡崎茂俊、土屋広司、小池隆、佐藤由紀子、宮田雅美、原田和樹、大澤俊彦 (第 2 章)
- (91)日本農芸学会 2011 年度大会 2011/3/25 「着色試料の評価を可能にした次世代食品機能性評価法で判明した麹液の機能性の発酵経日変化」 數村公子、里園浩、土屋広司、原田和樹、前田俊道、徳永拓史、岡崎茂俊 (第 2 章)
- (92)2011 年光化学討論会 2011/9 「モンテカルロ積分による化学発光の内部濾光効果の補正と食品機能性評価への応用」 里園浩、數村公子 (第 2 章)
- (93)第 6 回食用ネギ類国際シンポジウム 2011/5/16 「Health Progress Functions of

A.fistulosum Added to Single Alien Chromosome from Shallot Using Method Measured Simultaneously Signal Transduction Systems.」 數村公子、原田和樹、執行正義（第2章）

- (94) 第15回日本フードファクター学会 2010/10/4 「コブリーノ (Copronus comatus) 中の抗酸化成分に関する研究」 伊藤友美、數村公子、宮田雅美、原田栄津子、丹羽利夫、大澤俊彦（第2章）
- (95) 日本食品科学工学会第57回大会 2010/9/1 「次世代食品機能性評価法等で判明したフラボノイド類の機能性」 數村公子、土屋広司、原田和樹、前田俊道、徳永拓史、桑原ひろみ、岡崎茂俊、執行正義（第2章）
- (96) 日本農芸化学会 2010年度大会 2010/3/27 「次世代食品機能性評価法で評価した魚醤の機能性」 數村公子、土屋広司、原田和樹、前田俊道、徳永拓史、梶原景子、岡崎茂俊
- (97) 平成21年度日本水産学会中国・四国支部大会 2009/11/28 「次世代食品機能性評価法を用いた水産食品の機能性の解析の試み」 徳永拓史、梶原景子、數村公子、前田俊道、原田和樹（第2章）
- (98) 第12回日本補完代替医療学学術集会 2009/11/28 「好中球を用いた新規食品機能性評価法によるクルクミン類の評価」 數村公子、岡崎茂俊、土屋広司、大澤俊彦（第2章）
- (99) 日本食品科学工業会第56回大会 2009/9/10 「次世代食品機能性評価法から判明したヒスチジン関連物質の特性」 數村公子、土屋広司、原田和樹、前田俊道、徳永拓史、岡崎茂俊（第2章）
- (100) 日本調理科学会平成21年度大会 2009/8/28 「咀嚼嚥下障害食を想定した水産物由来の調理加工品が持つ抗酸化性の多視点解析」 原田和樹、前田俊道、徳永拓史、長谷川善朗、小川信也、岡村英子、河村幸恵、小俣文登、金谷節子、小泉武夫、永塚規衣、長尾慶子、數村公子（第2章）
- (101) 日本農芸化学会 2009年度大会 2009/3/27 「次世代抗酸化能測定法で判明したペプチド・ホモカルノシンの新しい抗酸化パターン」 數村公子、土屋広司、原田和樹、粟津原理恵、長尾慶子（第2章）
- (102) 日本調理科学会平成20年度大会 2008/8/29 「ORAC法で測定した新しいスローフードのヒラメ魚醤油が持つ抗酸化能の特性」 大方豊、大方美香、菅野昌知、長谷川善朗、前田俊道、原田和樹、北尾悟、安藤真美、數村公子、田村良行（第2章）
- (103) 第9回日本検査血液学会学術集会 2008/7/26 「ヘミン(プロトポルフィリン)によるヒト好中球活性化：細胞内カルシウムイオンとの同時測定」 西郷勝康、橋本誠、淨慶幸江、炬口真理子、杉本健、數村公子、土屋広司、井本しおん、熊谷俊一（第2章）

- (104) 第 4 回好中球研究会 (RAND) 2005/12/2 「好中球における細胞内カルシウムイオン濃度変化とスーパーオキシドの同時測定」 數村公子、平松光夫、里園浩、岡崎茂 (第 2 章)
- (105) 第 8 回補完代替医療学会 2005/11/12 「醤油エタノール沈殿物の自然免疫活性化作用」 數村公子、平松光夫、里園浩、岡崎茂俊 (第 2 章)
- (106) 日本分析化学会第 63 回分析化学討論会 2002/5/25 「蛍光・化学発光を用いた細胞内カルシウムイオン・スーパーオキシド同時測定装置の開発」 數村公子、岡崎茂俊、平松光夫、石橋要 (第 2 章)

### 3. 知的財産

- (1) 算出方法、算出装置及び算出プログラム 発明者：數村公子、服部将貴、波多野薫子 2021/12/1 日本出願 (第 3, 4 章)
- (2) 光学素子、光検出装置、及び蛍光検出装置 発明者：鈴木真澄、土屋広司、數村公子、秋草文 2020/8/7 日本出願 (第 3, 4 章)
- (3) 好中球細胞の活性を評価する方法 発明者：數村公子、竹内康造 2019/6/10 米国出願 (第 3, 4 章)
- (4) 好中球細胞の活性を評価する方法 発明者：數村公子、竹内康造 2019/6/10 中国出願 (第 3, 4 章)
- (5) 特許日本第 7092565 号 好中球細胞の活性を評価する方法 発明者：數村公子、竹内康造 登録日 2022/6/20 (第 3, 4 章)
- (6) アルツハイマー症診断装置及び方法 発明者：杣源一郎、稲川裕之、數村公子、小林優多郎 2018/8/27 日本出願 (第 3, 4 章)
- (7) アルツハイマー症診断装置及び方法 発明者：杣源一郎、稲川裕之、數村公子、小林優多郎 2018/8/27 米国出願 (第 3, 4 章)
- (8) アルツハイマー症診断装置及び方法 発明者：杣源一郎、稲川裕之、數村公子、小林優多郎 2018/8/27 中国出願 (第 3, 4 章)
- (9) 特許中国 ZL201610894378.X 食食能評価方法及び蛍光測定方法 発明者：張燃、稲川裕之、杣源一郎、數村公子、土屋広司、森下直計 登録日：2021/4/6 (第 3, 4 章)
- (10) 特許米国 US10724953 食食能評価方法及び蛍光測定方法 発明者：張燃、稲川裕之、杣源一郎、數村公子、土屋広司、森下直計 登録日：2020/7/28 (第 3, 4 章)
- (11) 特許日本第 6600527 号 食食能評価方法及び蛍光測定方法 発明者：張燃、稲川裕之、杣源一郎、數村公子、土屋広司、森下直計 登録日：2019/10/11 (第 3, 4 章)
- (12) 特許米国 US10702865 測定容器 発明者：數村公子、土屋広司 登録日：2020/7/7 (第 4 章)
- (13) 特許日本第 6735179 号 測定容器 発明者：數村公子、土屋広司 登録日：

2020/7/15 (第4章)

- (14)特許日本第 6285691 号 好中球細胞の活性を評価する方法 発明者：數村公子、土屋広司、大澤俊彦 登録日：2018/2/9 (第3, 4章)
- (15)特許日本第 7016107 号 血管内皮細胞の一酸化窒素産生を亢進する物質のスクリーニング方法 発明者：加治屋勝子、數村公子 登録日：2022/1/27 (第2章)
- (16)特許日本第 6468781 号 ミトコンドリア膜透過性の評価方法、ミトコンドリア膜透過性の亢進を抑制する物質のスクリーニング方法、ミトコンドリア膜透過性を亢進する物質のスクリーニング方法、及びミトコンドリア膜透過性の亢進抑制剤 発明者：直井信、呉煜秋、大澤俊彦、數村公子 登録日：2019/1/25 (第2章)
- (17)特許日本第 5073224 号 分化細胞の調製方法および分化誘導用未分化細胞組成物 発明者：數村公子 登録日：2012/8/31 (第2章)
- (18)特許日本第 6628221 号 「抗炎症物質により抑制される細胞質内への  $Ca^{2+}$ 流入経路の判定方法」 発明者：數村公子、大室弘美 登録日：2019/12/13 (第2章)
- (19)特許日本第 4689329 号 「抗炎症物質と抗酸化物質とを識別する方法及びスーパーオキシドの産生抑制に対する作用部位を同定する方法」 発明者：數村公子 登録日：2011/2/25 (第2章)
- (20)中国 ZL201610675676.X 「測定装置」 発明者：數村公子、土屋広司 登録日：2020/8/18 (第3章)
- (21)アメリカ US9726595 「測定装置」 発明者：數村公子、土屋広司 登録日：2017/8/8 (第3章)
- (22)特許日本第 6438364 号 「測定装置」 発明者：數村公子、土屋広司 登録日：2018/11/22 (第3章)
- (23)特許日本第 5635436 号 化学発光測定装置および化学発光測定方法 発明者：數村公子、里園浩 登録日：2014/10/24 (第2, 3, 4章)

#### 4. 展示会等

- (1) the 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) シンポジウム 2019/12/3-5 装置展示 (第2, 3, 4章)
- (2) BioJapan2019 2019/10/9-11 「好中球活性評価 4 連型・廉価版 2 連型試作機」展示 (第4章)
- (3) BioJapan2018 2018/10/10-12 「好中球活性・食細胞貪食能評価 4 連型・普及タイプ 2 連型試作機」展示 (第4章)
- (4) SIP「次世代機能性農林水産物・食品の開発」シンポジウム～1億総活躍社会の実現に夢を馳せて 2017/11/30 「融合型試作機」展示 (第4章)
- (5) BioJapan2017 2017/10/11-13 「好中球活性・食細胞貪食能評価 4 連型・2 連型試作機」展 (第4章)

- (6) SIP シンポジウム 2017 2017/9/26 「好中球活性・食細胞貪食能評価 4 連型試作機」  
展示 (第 4 章)
- (7) アグリテック・サミット 2017/5/25 「好中球活性・食細胞貪食能評価 4 連型試作機」  
展示 (第 4 章)
- (8) SIP 次世代農林水産業創造技術公開シンポジウム 2017 2017/5/15 「好中球活性・食  
細胞貪食能評価 2 連型試作機」展示 (第 4 章)
- (9) 日本食品科学工学会第 63 回大会シンポジウム 2016/8/25-27 装置展示 (第 2, 3,  
4 章)
- (10) 第 5 回バイオ・メディカル・フォーラム/第 2 回産学連携ヘルスケアナレッジセミナ  
ー 2016/2/19- 装置展示 (第 2, 3, 4 章)
- (11) AOU 研究会 2013/11/27- 装置およびポスター展示 (第 2, 3 章)
- (12) 第 4 回好中球研究会 (RAND) 2005/12/2-3 装置展示 (第 2 章)

## 5. 受賞等

- (1) 飯島藤十郎食品技術賞 2013 年度 「好中球の免疫反応を利用した新規食品機能性評  
価法の開発」