

ルシフェラーゼ発現乳酸菌および近赤外発光基質を用いた
嚥下動態評価システムの構築

武庫川女子大学 薬学部 臨床製剤学研究室 教授

よしだ みやこ
吉田 都

ルシフェラーゼ発現乳酸菌および近赤外発光基質を用いた 嚥下動態評価システムの構築

武庫川女子大学薬学部 調査・研究 実施者氏名 吉田 都

【要旨】

1、調査・研究目的

2、調査・研究方法

2-1 キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」を用いた
Lactobacillus gasseri の化学発光に関する検討

2-2 キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」を用いた
緩和冷凍した Lactobacillus gasseri の化学発光に関する検討

2-3 TokeOni、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン、Lactobacillus gasseri による
化学発光に関する検討

3、調査・研究成果

3-1 キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」を用いた
Lactobacillus gasseri の化学発光に関する検討

3-2 キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」を用いた
緩和冷凍した Lactobacillus gasseri の化学発光に関する検討

3-3 TokeOni、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン、Lactobacillus gasseri による
化学発光に関する検討

4、考察

5、まとめ

6、引用文献

1、調査・研究目的

現在、嚥下評価の簡易システムとしては、嚥下運動モニタ（センサで嚥下時の喉頭の動きを捉え可視化する）や筋電図センサ（前頸部に電極を配置し、嚥下時の筋電図測定を行う）が開発

されているが、嚥下物の動態評価は不可能である。嚥下物の動態評価として医療現場では、X線検査や内視鏡検査等が行われているが、被験者にとって身体的負担が大きいため、負担の少ない非侵襲的な嚥下物の動態評価システムの開発が望まれる。医療用医薬品の ICG（インドシアニングリーン）を用いることにより、嚥下物の動態評価を行った報告があるが、体外から ICG を励起するための励起光源が多数必要となる。ICG の発光受容器（発光センサ）の設置数が制限され、嚥下物の動態を 3 次元で精度良く捉えることが困難となることが予想される。

本研究では、当初、ルシフェラーゼによる化学発光を用いた嚥下動態評価システムの構築を目指し、ヨーグルト由来の乳酸菌を用いて発光乳酸菌（遺伝子組み換えによるルシフェラーゼ発現乳酸菌）を作製することを目標としていた。乳酸菌を使用した新しいタンパク質発現システムとして、NICE タンパク質発現システムがフナコシより販売されていたため、本ベクターシステムと宿主乳酸菌を用いての、受託会社でのプラスミド構築と乳酸菌への形質転換を委託することがライセンス上可能かどうか確認を行った。NICE システムは、NIZO food research 社が特許を保有しており、Biozol 社は販売を受け持つ立場となっている。Biozol 社が NIZO 社に確認したところ、本システムのライセンス契約条件が最近変更になり、企業ユーザーだけでなく、大学ユーザーも購入に先立ってライセンス契約が必要、との回答があった。以前は、大学ユーザーは連絡先を伝えるだけで購入可能であったが、今回から大学ユーザーもライセンス契約が必要になるとのことであった。ライセンス料が年間 3,500EUR になり、毎年更新が必要とのことであった。更に、受託会社様にプラスミドを提供し、委託作業をするとなると更に年間 700EUR のライセンス料が発生するとのこと、ルシフェラーゼ発現乳酸菌の作製の遂行は事実上不可能となり、断念せざるを得ない状況となった。

遺伝子組み換え体の乳酸菌の作製はできないが、ATP、マグネシウムイオン、ルシフェラーゼおよび発光物質が反応することにより、理論上化学発光する。

発光物質については、D-ルシフェリン（ λ max = 560 nm）、TokeOni（ λ max = 677nm）が存在しているが、発光物質として近赤外発光物質である TokeOni を用いることによって、生体内の発光反応を生体外で感光できる可能性が示唆される。

ルシフェラーゼの発光反応を利用して菌体内の ATP を定量する既存の測定方法を応用して、乳酸菌由来 ATP、ルシフェラーゼおよび近赤外発光物質（TokeOni）を反応させることで、体外から感光可能となる近赤外光を化学発光するシステムを原理とした嚥下動態評価システムの開発を目指すこととした。化学発光体を作製することによって励起光源は不要となり、発光センサの設置数の制限がなくなるため、嚥下物の動態を 3 次元で精度良く捉えることができる嚥下動態評価システムの構築が可能となる。

2、調査・研究方法

2-1 キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」¹⁾ を用いた *Lactobacillus gasseri* の化学発光に関する検討

Lactobacillus gasseri は JCM1131 を用いた。ヨーグルトにも存在していることが知られているが、腸内細菌としても知られている。測定は、キットの取り扱い説明書の中の測定方法の 3. 微生物測定に準じて行った。即ち、生理食塩水で調製した *L. gasseri* の菌溶液 (2.5×10^6 CFU/mL) 100 μ L に ATP 抽出試薬溶液 (成分：界面活性剤) 100 μ L 添加した。添加してから 20 秒後に発光試薬溶液 (成分：ルシフェリン、ルシフェラーゼ、酢酸マグネシウム) 100 μ L を添加し、20 秒後にルミテスターにて発光量を測定した。

2-2 キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」を用いた

緩和冷凍した *Lactobacillus gasseri* の化学発光に関する検討

Lactobacillus gasseri は JCM1131 を用いた。測定は、キットの取り扱い説明書の中の測定方法の 3. 微生物測定に準じて行った。ATP については、界面活性剤を用いずに *Lactobacillus gasseri* から菌体外へ ATP を溶出する方法として、緩和冷凍法を検討した。即ち、精製水で調製した *L. gasseri* の菌溶液 (2.5×10^6 CFU/mL) 100 μ L を -20°C の冷凍庫に 4 時間留置し、緩和冷凍した。緩和冷凍後の *Lactobacillus gasseri* の菌溶液は、自然解凍した。自然解凍後直ちに発光試薬溶液 (成分：ルシフェリン、ルシフェラーゼ、酢酸マグネシウム) 100 μ L を添加し、20 秒後にルミテスターにて発光量を測定した。

2-3 TokeOni、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン、*Lactobacillus gasseri* による

化学発光に関する検討

Lactobacillus gasseri は JCM1131 を用いた。試薬溶液として、1 mM 酢酸マグネシウム Tricine 緩衝液を調製した。ルシフェラーゼ溶液はホタルルシフェラーゼ酵素セット (東洋ビーネット株式会社)²⁾ を利用し調製した。TokeOni 濃度が 10mM となるように、精製水を用いて調製した。1 mM 酢酸マグネシウム溶液：ルシフェラーゼ溶液：TokeOni 溶液 (TokeOni 濃度は最終濃度 0.125 mM となるように生理食塩水で調製した) = 10 μ L : 10 μ L : 20 μ L となるように混合し、氷上でしばらく静置した。生理食塩水で調製した *Lactobacillus gasseri* の菌溶液 (2.5×10^6 CFU/mL) 40 μ L に ATP 抽出試薬溶液 (成分：界面活性剤) 40 μ L を混合した。全ての溶液を混合した後にマルチモード マイクロプレートリーダー Nivo (パーキンエルマー) にて発光量を測定した。

3、調査・研究成果

3-1 キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」を用いた

Lactobacillus gasseri の化学発光に関する検討

ルミテスターにて発光量を測定したところ、 9×10^3 RLU(Relative Light Unit) となり、キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」を用いて *Lactobacillus gasseri*

の ATP を用いてルシフェラーゼの化学発光が可能となることが明らかになった。

3-2 キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」を用いた

緩和冷凍した *Lactobacillus gasseri* の化学発光に関する検討

ルミテスターにて発光量を測定したところ、 7×10^3 RLU(Relative Light Unit) となり、緩和冷凍しその後自然解凍することによって得られた緩和冷凍後の *Lactobacillus gasseri* の菌溶液を用いても、化学発光を確認できた。界面活性剤の添加に比べると発光量は少ないが、緩和冷凍後の *Lactobacillus gasseri* の ATP を用いてルシフェラーゼの化学発光が可能となることが明らかになった。

3-3 TokeOni、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン、*Lactobacillus gasseri* による

化学発光に関する検討

マルチモード マイクロプレートリーダー Nivo (パーキンエルマー) にて発光量を測定したところ、27 RLU となり、ほとんど発光が認められなかった。この原因として、TokeOni の最終濃度を 0.125 mM と濃度を希釈し過ぎたことが原因の一つと考えられる。また、測定時間が全部混合後、20 秒を経過してしまっており、発光が終了してしまっていた可能性もかんがえられる。

4、考察

本調査・研究結果より、キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」を用いることにより、*Lactobacillus gasseri* の ATP が抽出され、ルシフェリンとルシフェラーゼによる化学発光が確認できた。

ホタルの光が生じる原理であるルシフェラーゼ発光反応は、ルシフェラーゼによるルシフェリンの酸化反応を通して光を生じる反応のことである。ルシフェリンは、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオンの存在下において ATP と反応した後、酸素と反応して励起状態のオキシルシフェリンを生成し、基底状態に戻る際に光 ($\lambda \text{ max} = 560 \text{ nm}$) を発することが知られている。キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」の中には ATP 抽出試薬として、界面活性剤を成分とした試薬溶液が添付されている。界面活性剤により、菌体の表面構造が破壊されることによって、菌体内に存在する ATP が菌体外に流出し、ルシフェラーゼ発光反応の反応物質となる。菌体内の他、菌体外にも ATP が存在するため、菌体内 ATP のみを測定したい場合には、菌体外 ATP を除去する操作が必要になるが、本研究の目的は、ルシフェラーゼ発光反応を起こすことが必要であるため、菌体内および菌体外に存在する ATP の総和で発光反応を評価するという実験条件で問題無い。

キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」の取り扱い説明書の取扱い上の注意の項目の中で、ATP 抽出試薬にはアルカリ性の試薬 (pH12.0) が用いられているこ

とから注意喚起がなされている。一方で、本研究の目的は、非侵襲的な嚥下物の動態評価システムの開発であるため、強アルカリ性物質を用いて嚥下機能を評価しようとする、口腔内および消化器が化学火傷を起こすため、決して使用できない。そこで、緩和冷凍および自然解凍による菌体の破壊の結果、菌体外へ流出した ATP を利用することを考案し、実験を行った。この場合、菌を溶解するのは精製水であり、精製水による生体粘膜への障害は無い。本調査・研究の結果より、界面活性剤を用いて菌体を破壊する場合と比較すると緩和冷凍および自然解凍による菌体の破壊の結果得られた ATP 量は少なくはなるが、充分発光は生じているため、非侵襲的な嚥下物の動態評価システムにおいては、緩和冷凍および自然解凍による菌体の破壊の結果、菌体外へ流出した ATP を活用するこの方法を採用し、更に冷凍時間などの条件検討を行う必要があると考えている。

TokeOni、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン、*Lactobacillus gasseri* による化学発光に関する検討においては、残念ながら今のところ、十分な発光量が得られていない。検討課題としては、TokeOni の最終濃度、含まれる試薬のそれぞれの反応時間および発光測定時間の検討が今後の課題と考えている。キッコーマン ATP 測定用試薬キット「ルシフェール 250 プラス」のルシフェリンおよびルシフェラーゼによる発光反応においては、20 秒の混合時間や反応時間を基準としている。TokeOni およびルシフェラーゼによる発光反応においても 20 秒前後での混合時間や反応時間を検討し、20 秒前後で発光反応が確認できたら、非侵襲的な嚥下物の動態評価システムに応用可能と考えられる。

5、まとめ

本調査・研究において、ルシフェラーゼの発光反応を利用して菌体内の ATP を定量する既存の測定方法を応用して、乳酸菌由来 ATP、ルシフェラーゼおよび近赤外発光物質 (TokeOni) を反応させることで、体外から感光可能となる近赤外光を化学発光するシステムを原理とした非侵襲的嚥下動態評価システムの開発を目指す。今後の検討課題として、TokeOni の最終濃度、含まれる試薬のそれぞれの反応時間および発光測定時間の検討がある。

6、引用文献

- 1) <https://biochemifa.kikkoman.co.jp/products/detail/?id=11100>,
最終アクセス日：2025 年 4 月 20 日
- 2) https://www.artiencegroup.com/ja/products/medical-bio/manual_fl-50.pdf,
最終アクセス日：2025 年 4 月 20 日