



食用天然色素による非侵襲で安価な細胞の生死判定法

「細胞の生死判別方法及び細胞の生死判別用キット」
特願2018-241789 (2018.12.25)

東京理科大学 理学部第一部 物理学科

助教 山下恭平

2020年10月29日

背景・目的

- 創薬における効能、毒性評価のために生死判定試薬が主として用いられ、合成色素であるトリパンブルー、メチレンブルーがその代表である。
- ただし、従来の合成色素は細胞や人体に対して有毒なため、死細胞を判定できるが、**生細胞も殺してしまう**ため、試験後の培地は使用できない。
- 長期間の経時観測には、経過時間ごとの判定用に、多数サンプルが必要
- 多数サンプルを同じ条件に保つことは難しい → 信頼性低下
- 多数のサンプル作成にコストがかかる。
- **食品混入は厳禁**

→ **安全**で**安価**な**食用色素**による代替

生死判定法

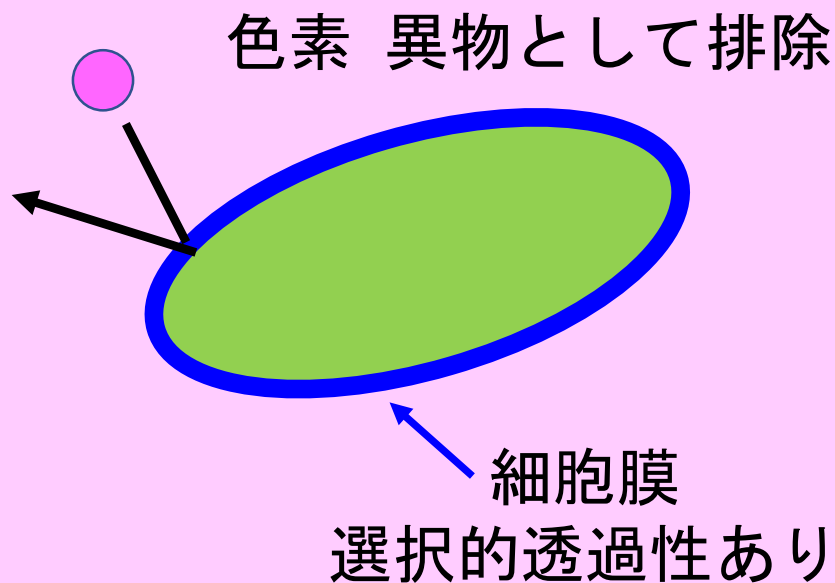
- **色素排除試験法**：色素に染まる細胞を死細胞と判定
- **コロニー形成法**：一個の細胞を寒天培地上で増殖
(コロニー形成するものを生きていると判定)
- 生 or 死細胞から漏出する酵素の**酵素反応**に基づく方法
- **蛍光色素**で細胞標識
→ フローサイトメトリーで個々の細胞の生死を検出

毒性

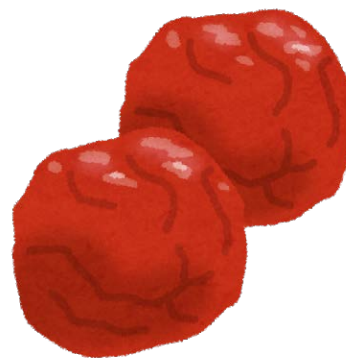
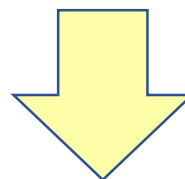
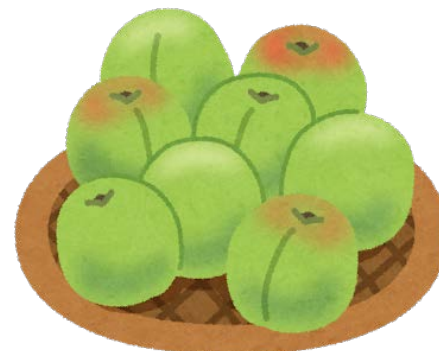
細胞毒性、試薬や装置コスト、熟練技術、長時間

色素排除試験法 : Dye Exclusion Test (DET)

生細胞

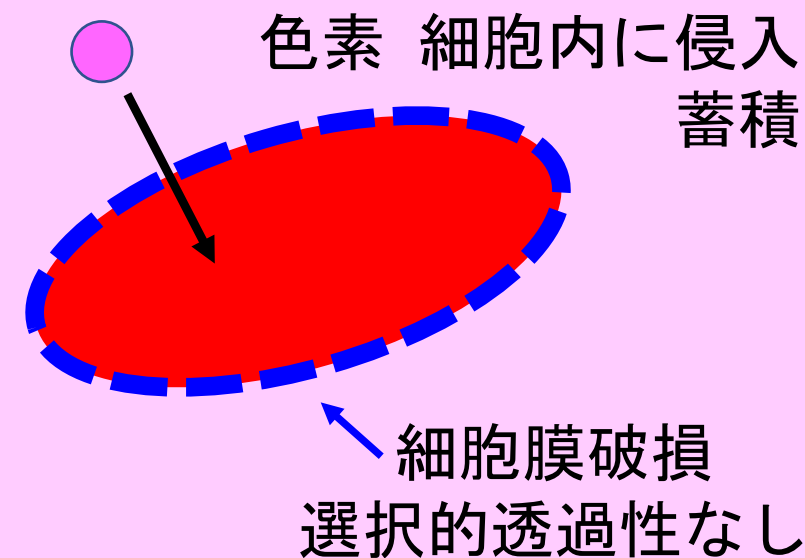


20 μ m



梅干し

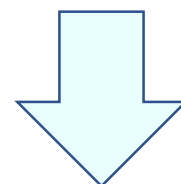
死細胞



20 μ m

本発明 生死判定法

従来：合成色素 … 高毒性、高価、危険
(トリパンブルー、メチレンブルーなど)



本発明：天然色素 … 低毒性、安価、安全
(紅麴、紫芋、赤キャベツなど)





想定される用途

非侵襲な生死判定：細胞培養、再生医療、遺伝子工学、保存株の生存確認

生死判定後に同じ細胞を使用する

→ 生死判定用サンプルのコストカット & サンプル間のばらつきなし※
(信頼性向上)

※ 初期条件が同じ培養サンプルでも、各サンプルに含まれる細胞(数、分布、遺伝子)は必ずしも同一ではない



想定される用途

長期の生死判定：密閉、嫌気環境での培養、リアルタイム判定

一度サンプルを密閉したら開けられない試験

例) 嫌気条件を要する持続的なバイオマス・エネルギー生産

食品加工(嫌気発酵)※

※天然色素による**高次栄養機能の付加**効果が期待できる

(抗酸化、抗がん作用、コレステロール値低下など)



想定される用途

微生物検出：衛生管理で高い安全性を要する
(食品加工工場、食堂、病院、一般家庭など)

色素が残留しても**安全**

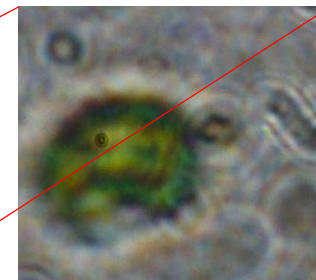
色素自体に**静菌作用**有り (紅麹、アントシアニン系色素)

細胞標識：セルカウンターを用いた生or死細胞の判別や計数

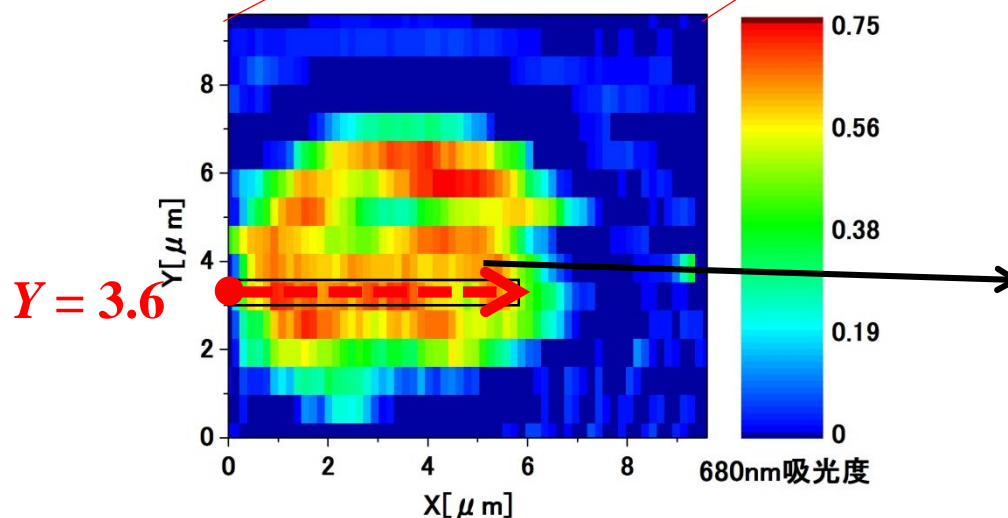
食用合成着色料を利用した先行文献あり

細胞レベルの染色確認 (単一細胞分光イメージング法)

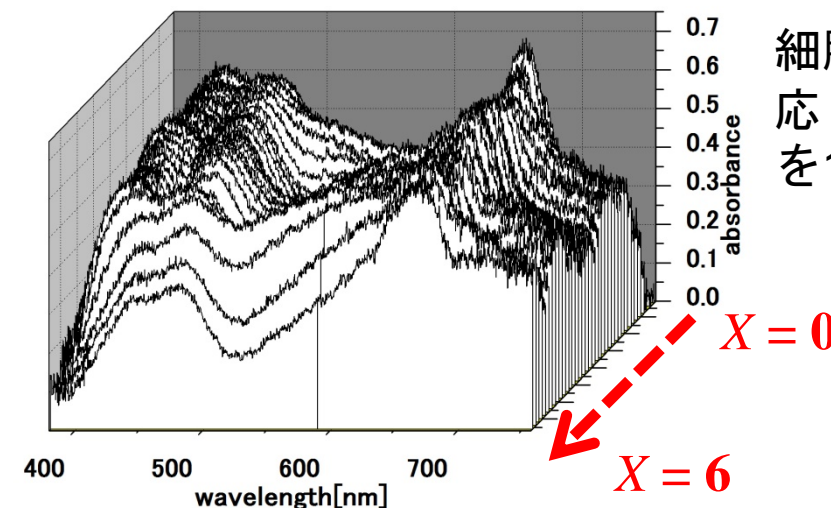
- $9.6\mu\text{m} \times 9.6\mu\text{m}$ の領域の吸光度イメージ $Abs(X, Y, \lambda)$
- 空間分解能 $1\mu\text{m}$ 程度
- 測定所要時間**0.05秒**

9.6 μm

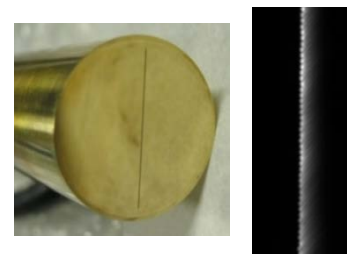
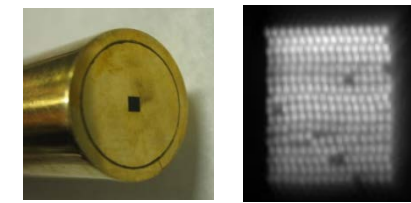
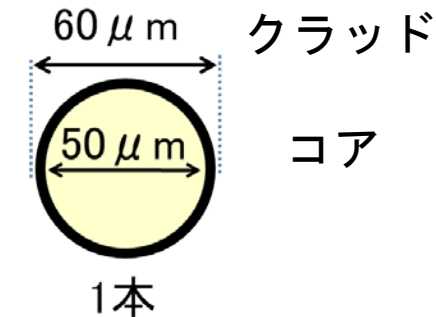
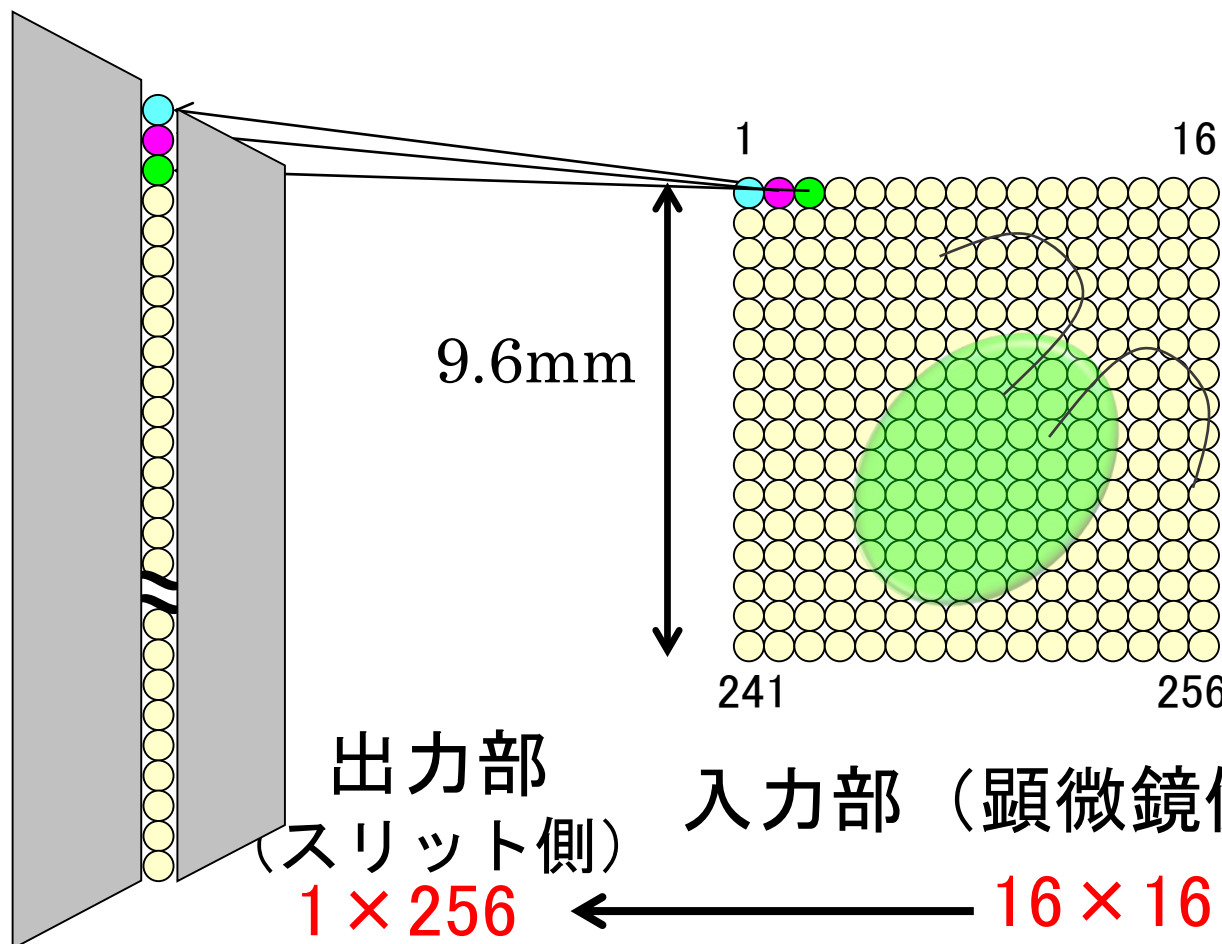
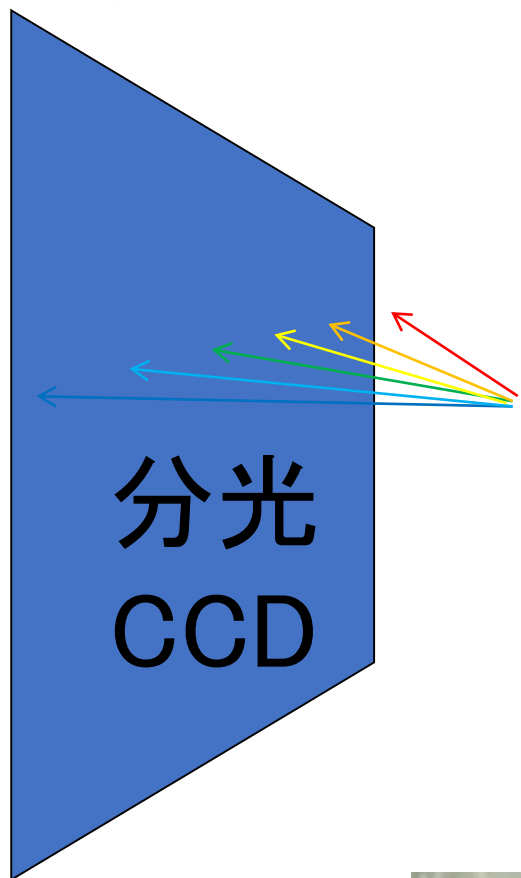
顕微鏡画像

Absorbance ($X, Y, \lambda = 680\text{ nm}$)

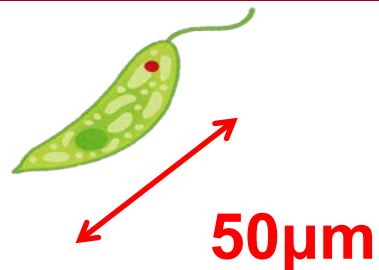
単一細胞の680nm吸収イメージ

Absorbance ($X, Y = 3.6, \lambda = 680\text{ nm}$)細胞の異なる位置に
応じた吸収スペクトル
を1回の測定で取得Y=3.6 μm の吸収スペクトル

細胞レベルの染色確認 (単一細胞分光イメージング法)

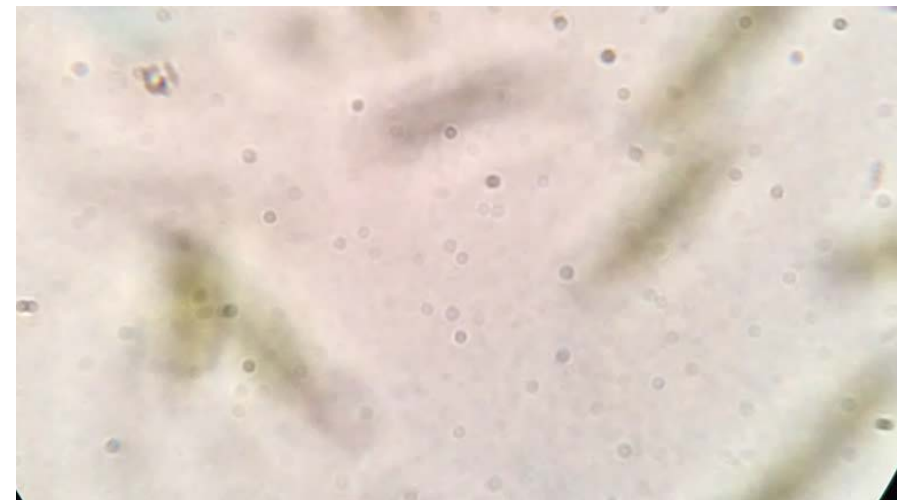


- 16回のラインスキャン測定を1回に短縮
ラインスキャン方式: $A(x, y, \lambda)$ で $A(y, \lambda)$ を x 方向、
または $A(x, \lambda)$ を y 方向にscan
- 測定時間0.05秒(無走査)



ユーグレナとは？

Euglena gracilis



- 和名：ミドリムシ
- 単細胞微細藻類の一種
- 鞭毛やユーグレナ運動による運動性を示す
- 細胞壁がない → 消化吸収効率が低い（90%以上）
- 59種の豊富な栄養素
（ビタミン、ミネラル、アミノ酸等）
- 光合成によるバイオジェット燃料の生産

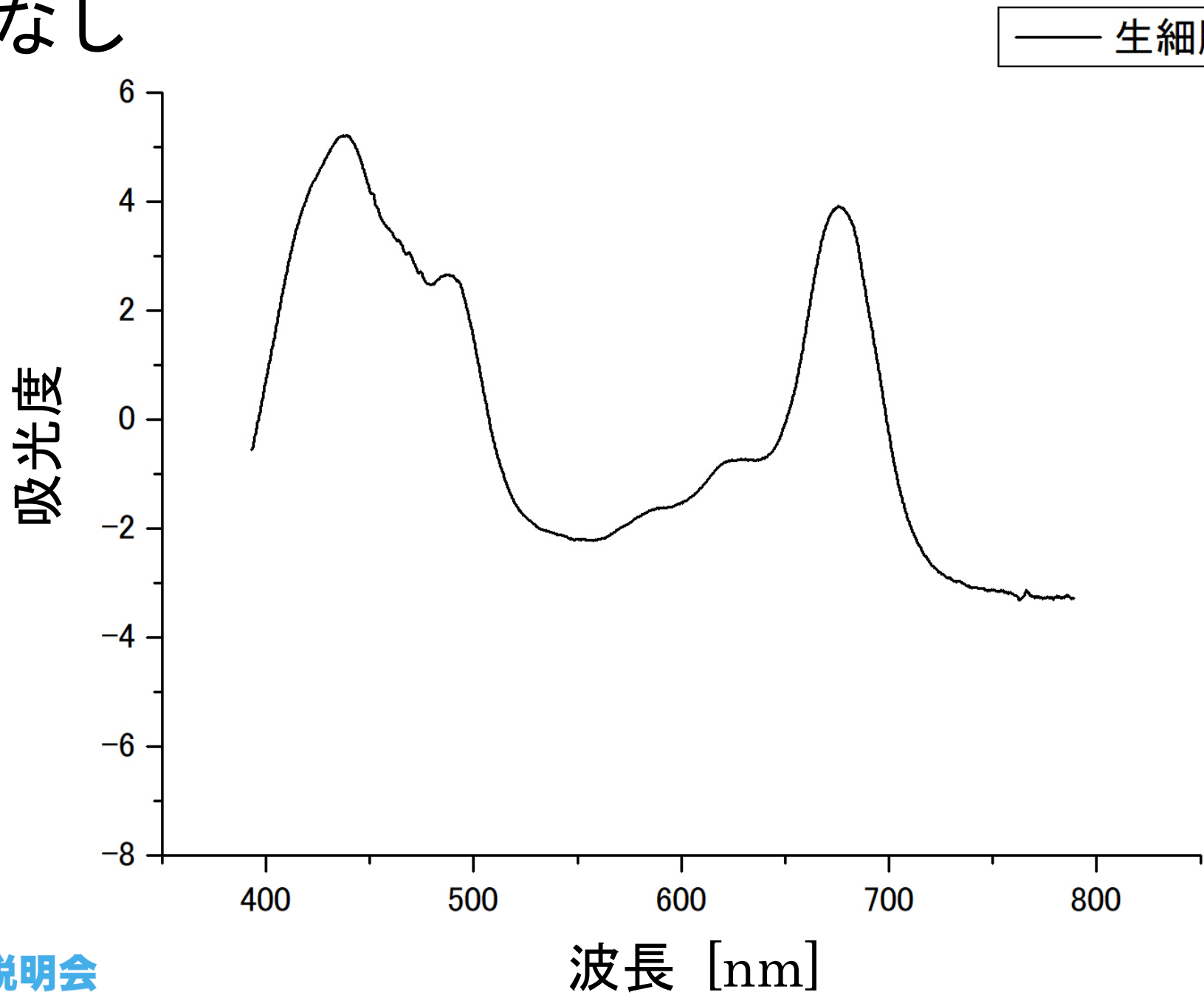




色素なし・通常培地

細胞の染色と単一細胞吸収測定

色素なし

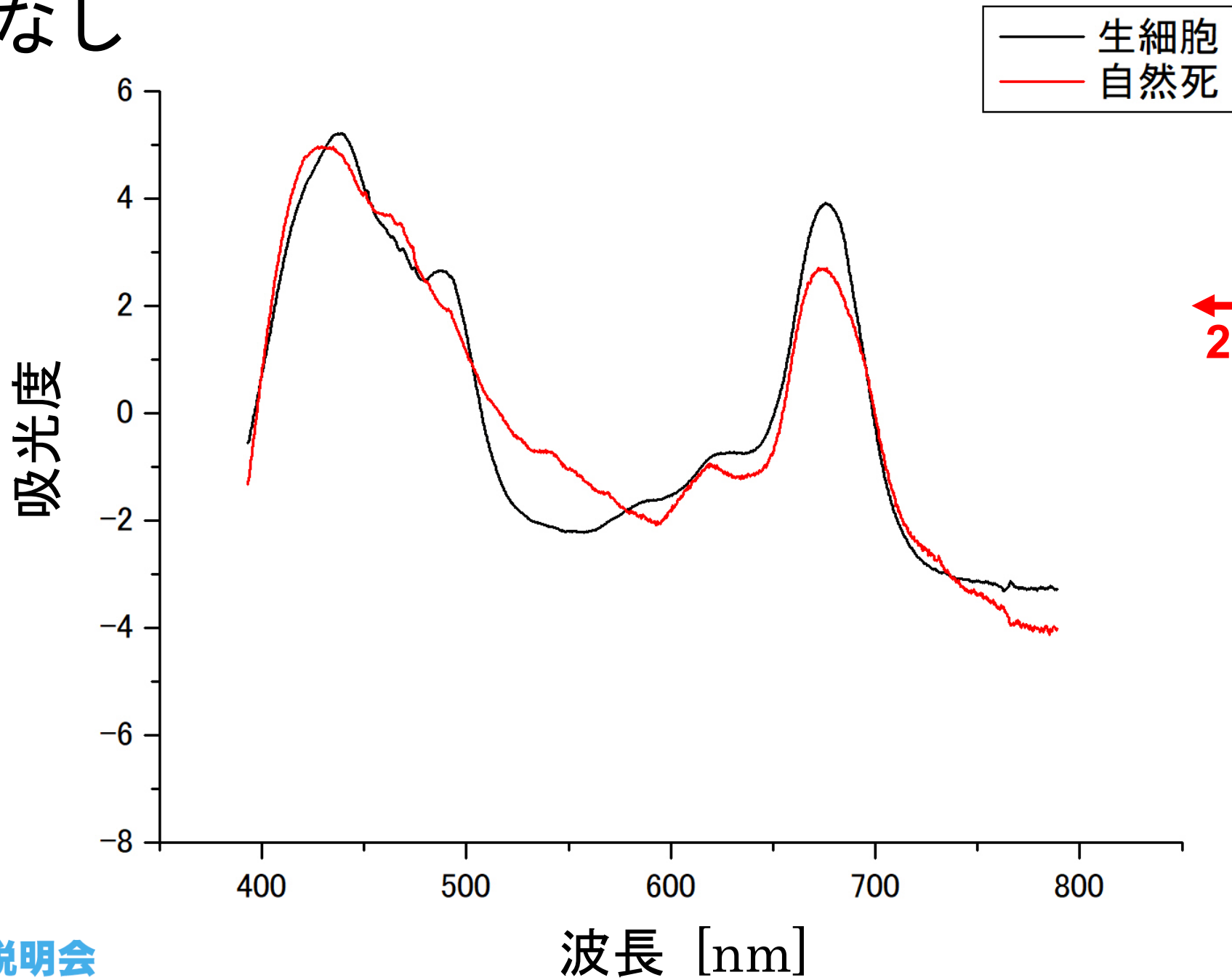


20 μ m



生細胞

色素なし



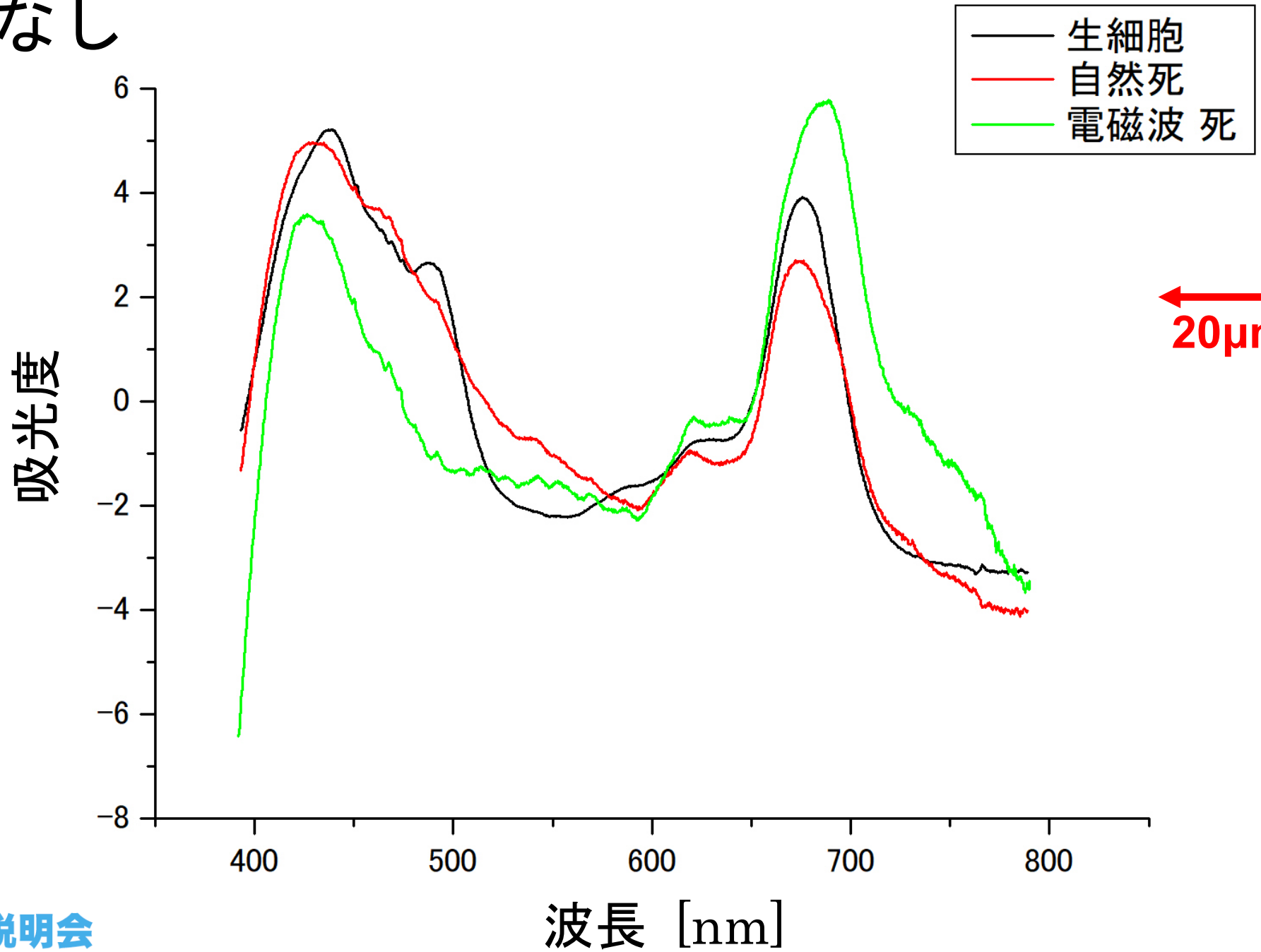
生細胞



自然死

20μm

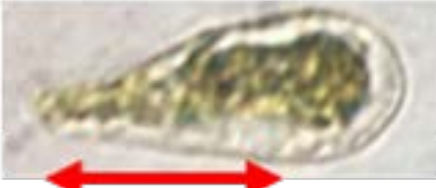
色素なし



— 生細胞
— 自然死
— 電磁波死



生細胞



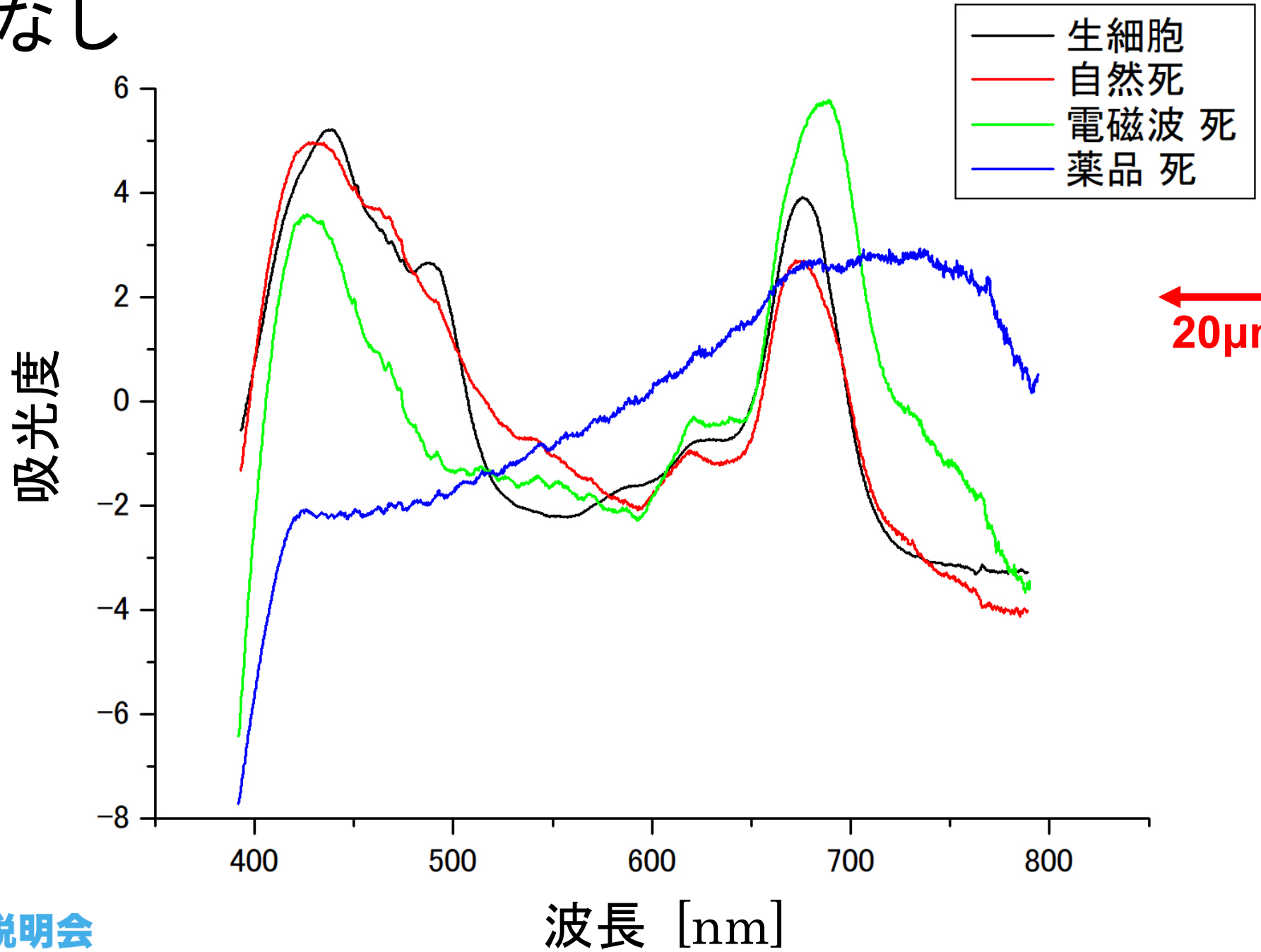
自然死



電磁波死

20μm

色素なし



生細胞



自然死



電磁波死



薬品死



紅麴色素

細胞の染色と単一細胞吸収測定

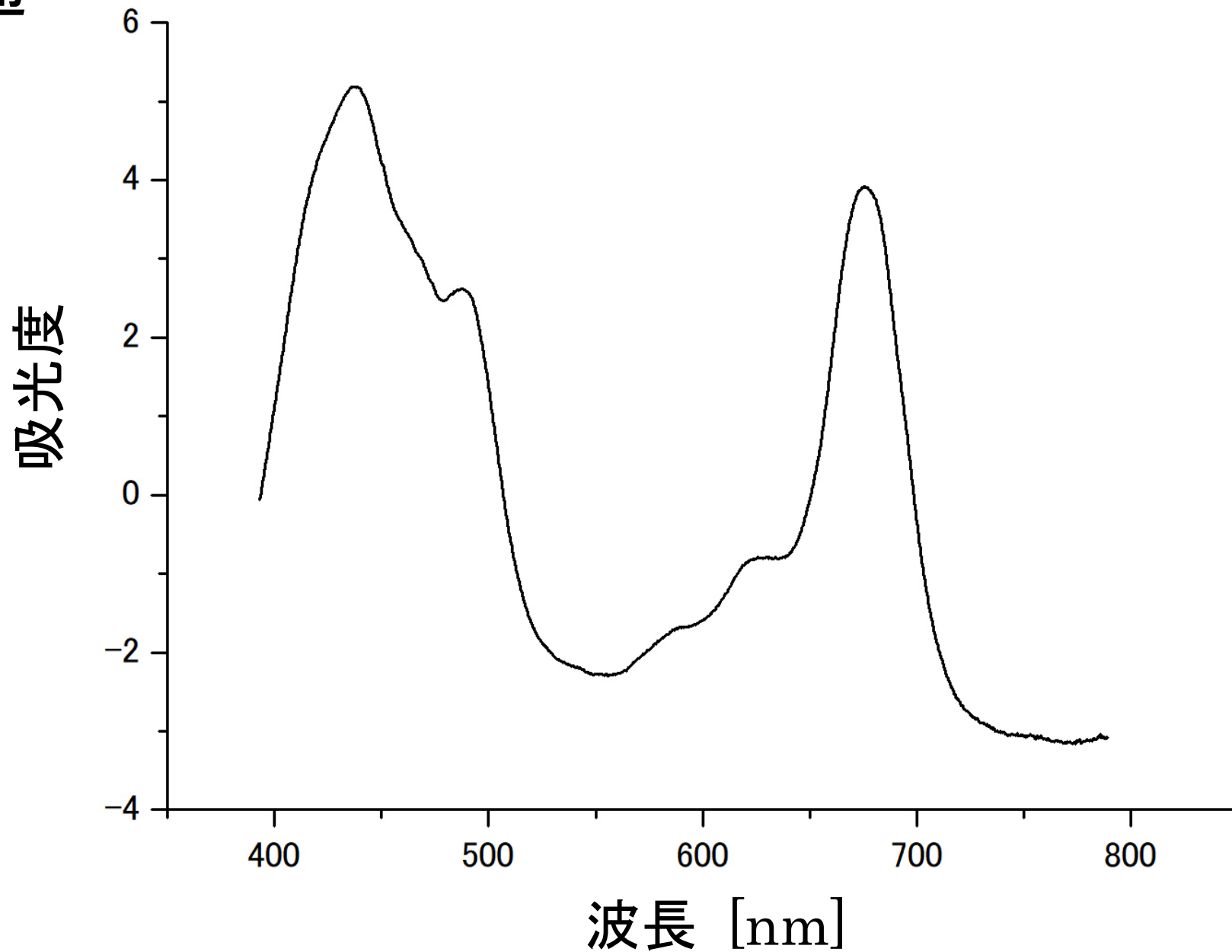
紅麴

— 生細胞

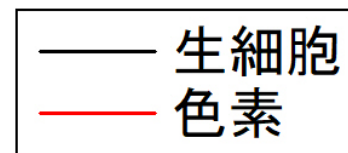


生細胞

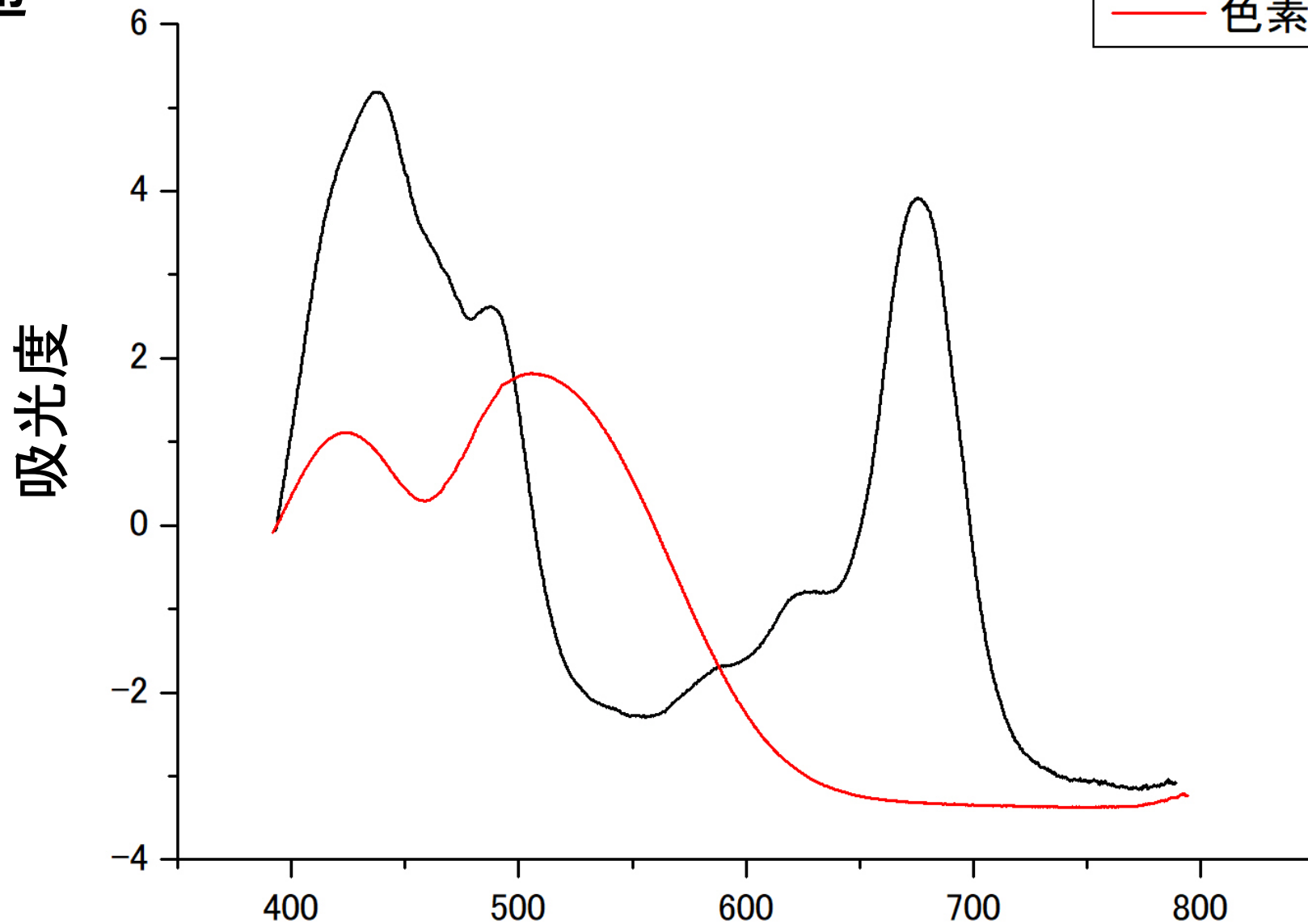
20μm



紅麴



生細胞

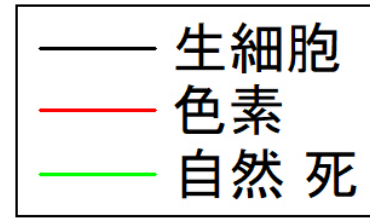


20μm

(株) 私の台所

波長 [nm]

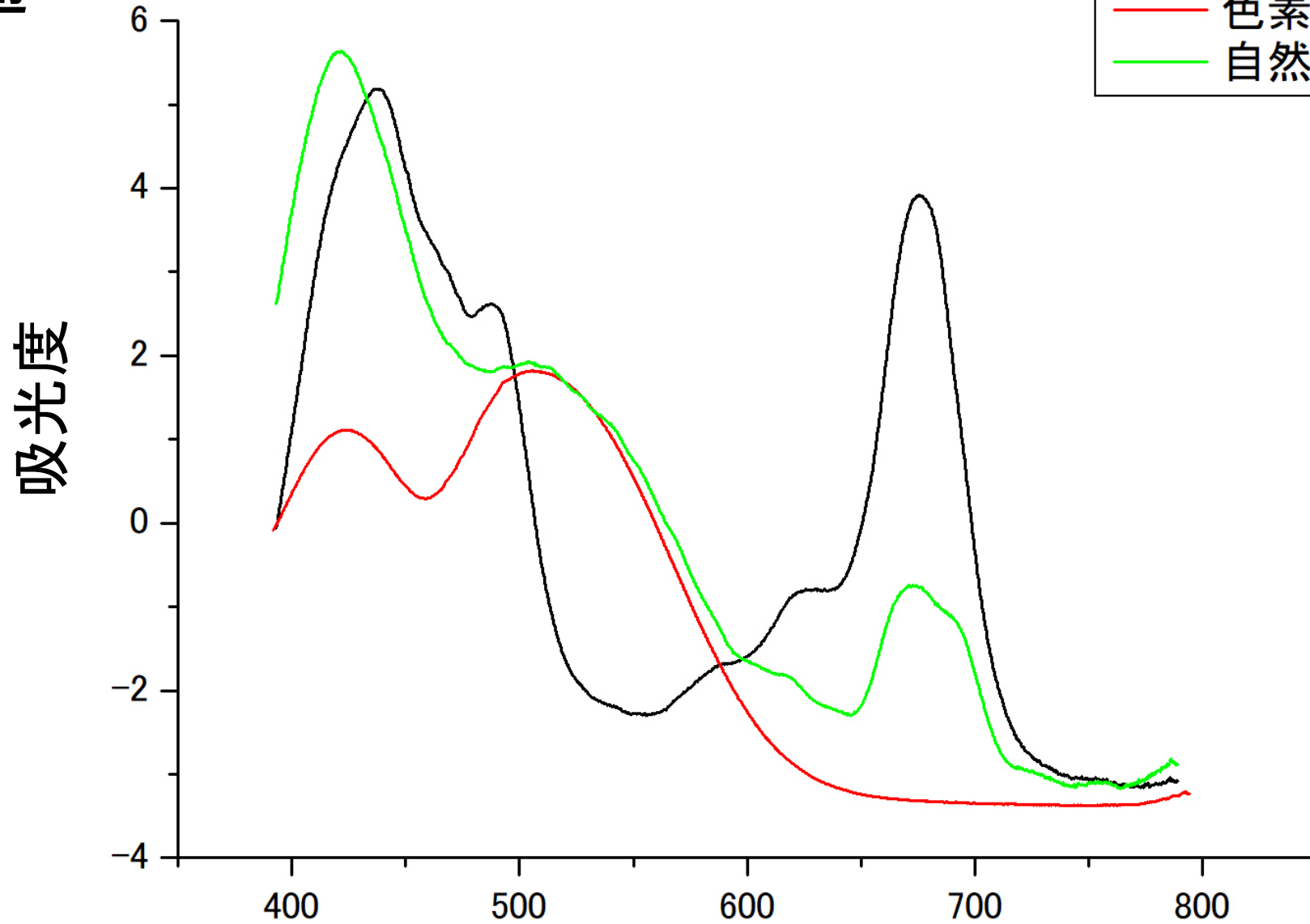
紅麴



生細胞



自然死



20µm

(株) 私の台所

波長 [nm]

紅麴

- 生細胞
- 色素
- 自然死
- 電磁波死



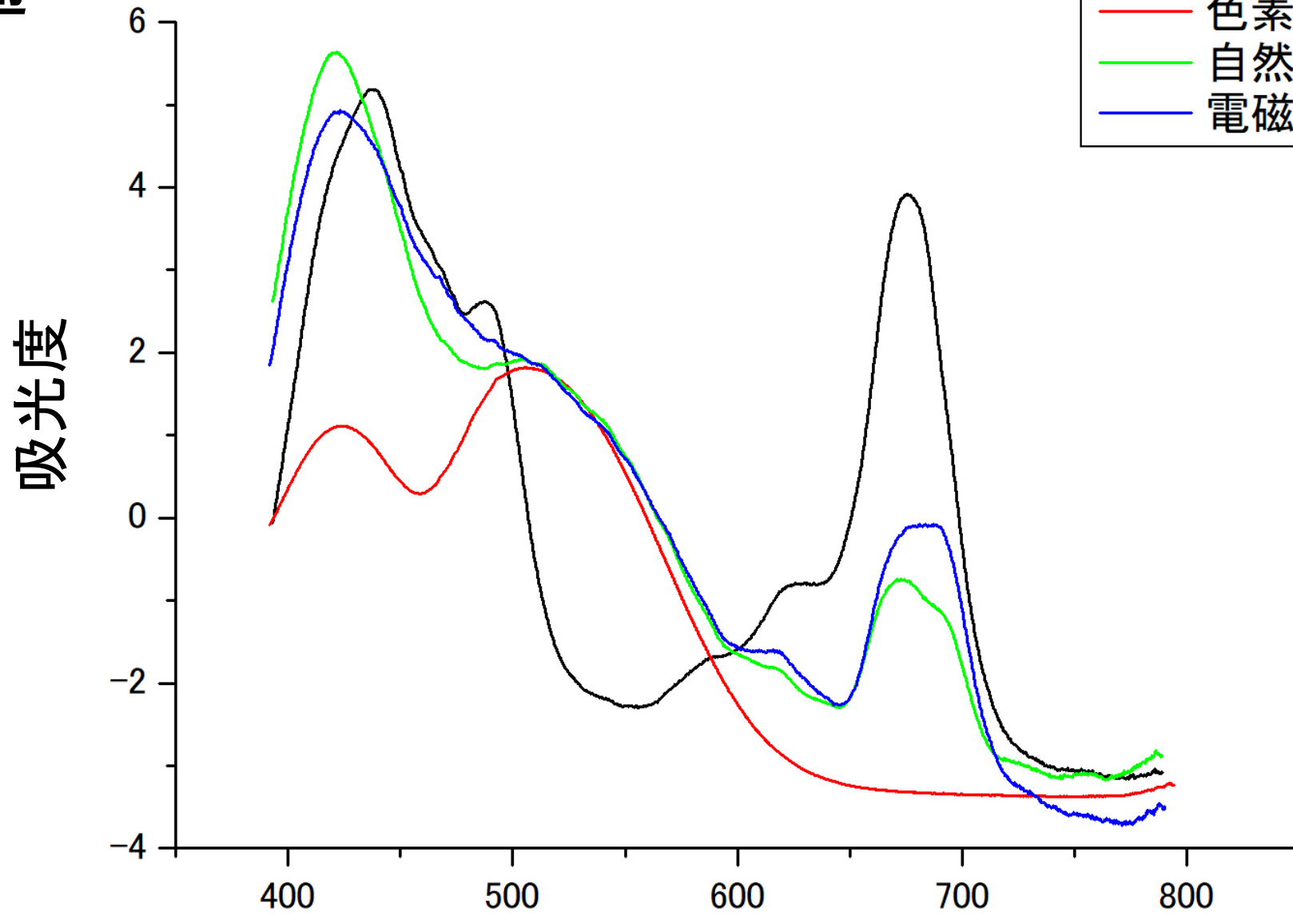
生細胞



自然死



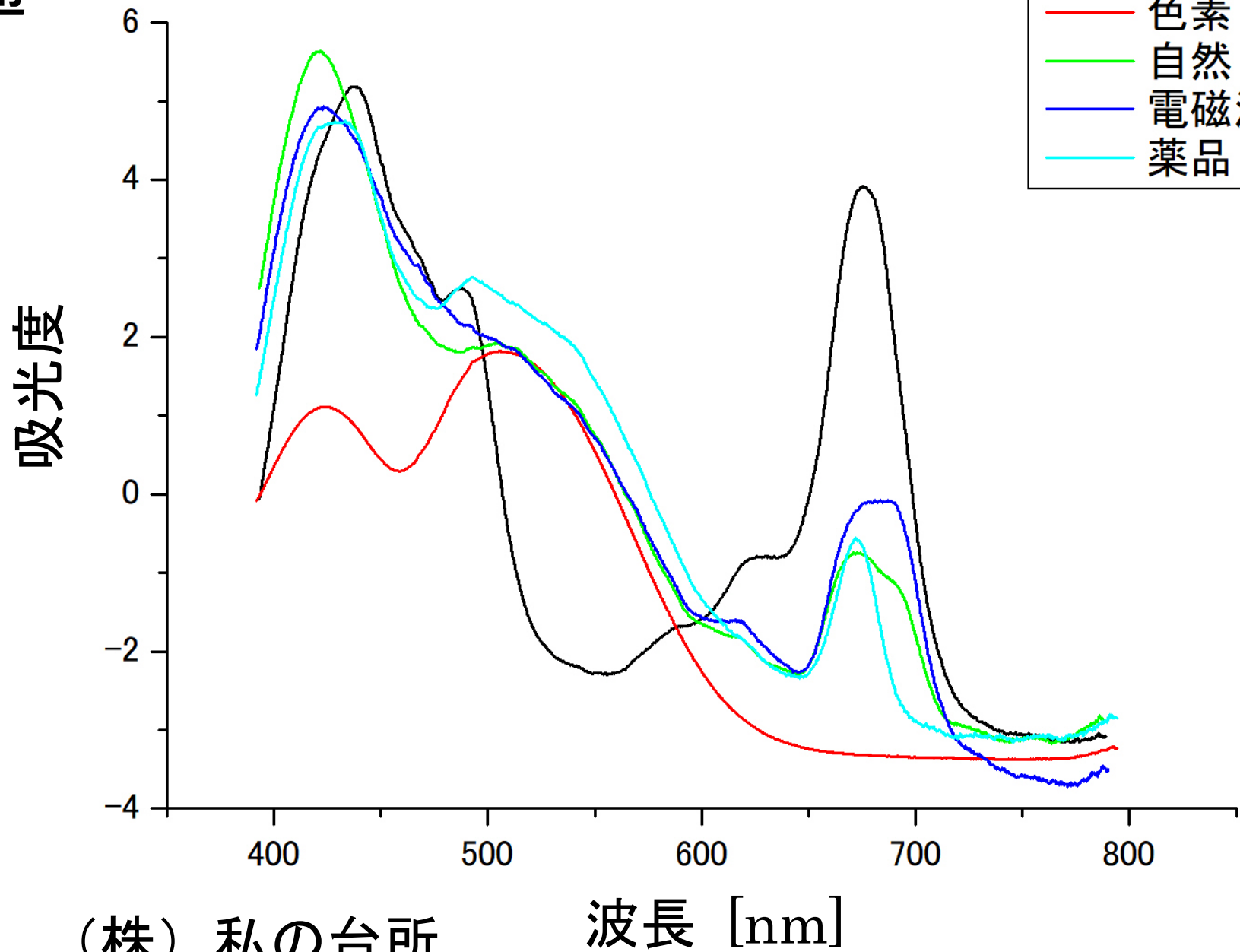
電磁波死



(株) 私の台所

波長 [nm]

紅麴



生細胞



自然死



電磁波死

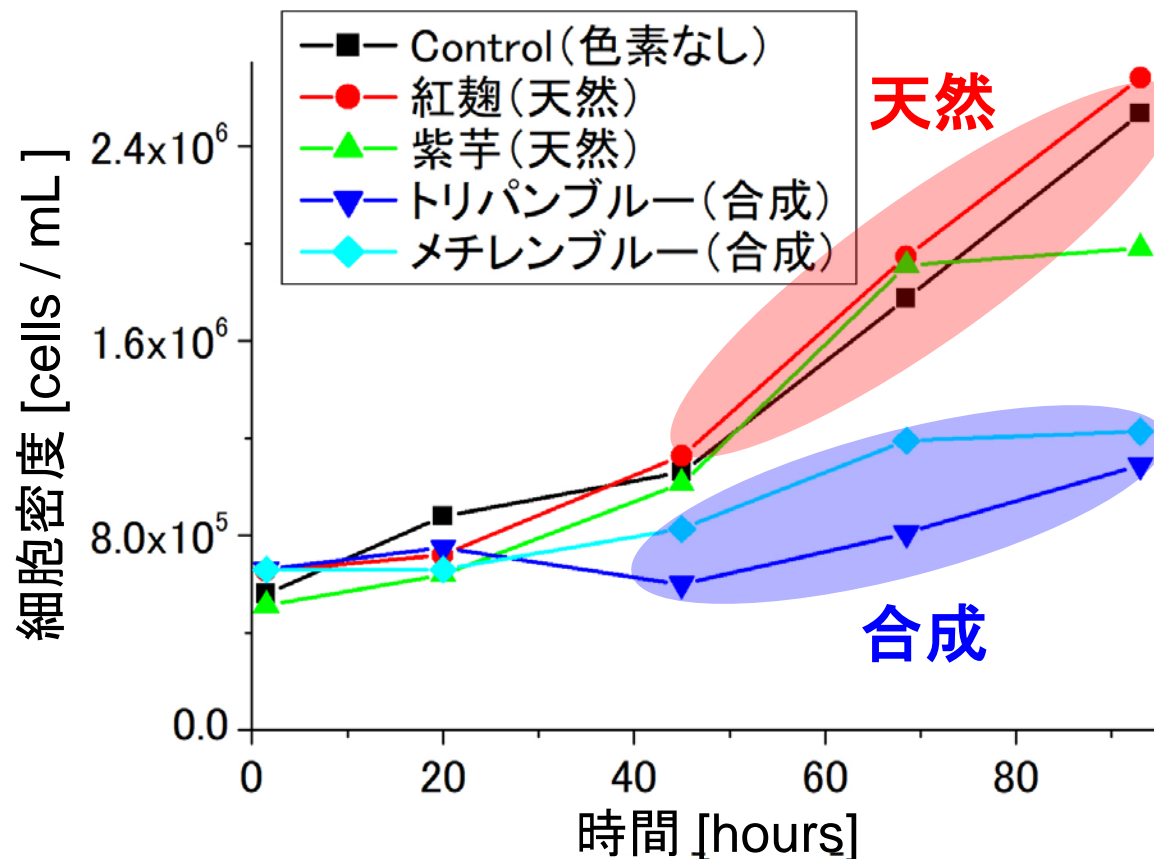


薬品死

(株) 私の台所

波長 [nm]

天然・合成色素混合培地における生育曲線



細胞密度：天然色素 > 合成色素

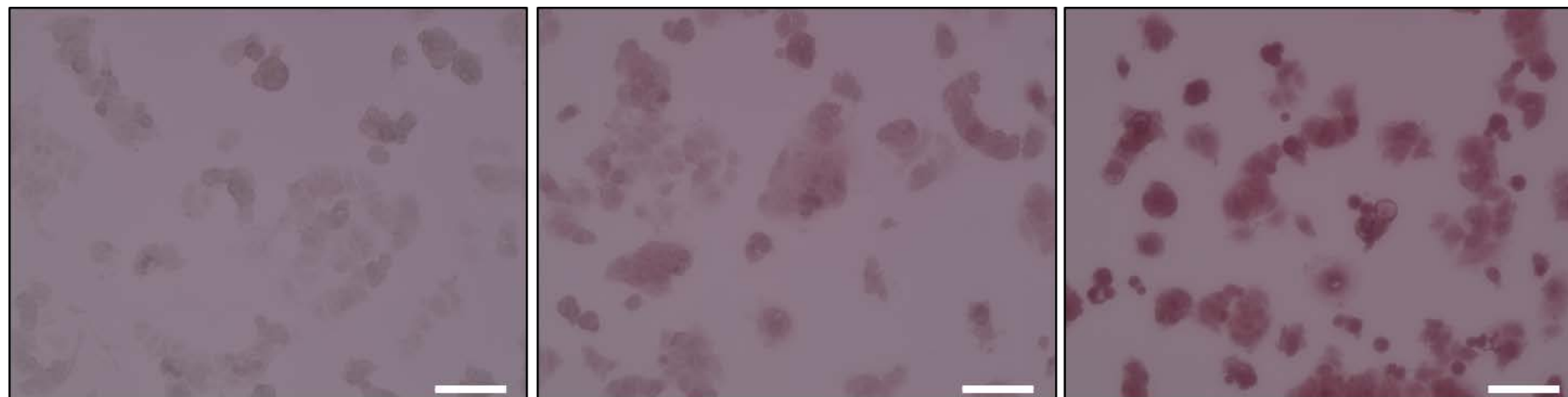
ヒト乳がん細胞の生死判定への応用

ヒト乳癌細胞：MCF-7（下図はマイクロ波処理した死細胞）

紅麴色素：1%

死細胞が染色

20 ×
Objective
lens



Control

1 % MP

5 % MP

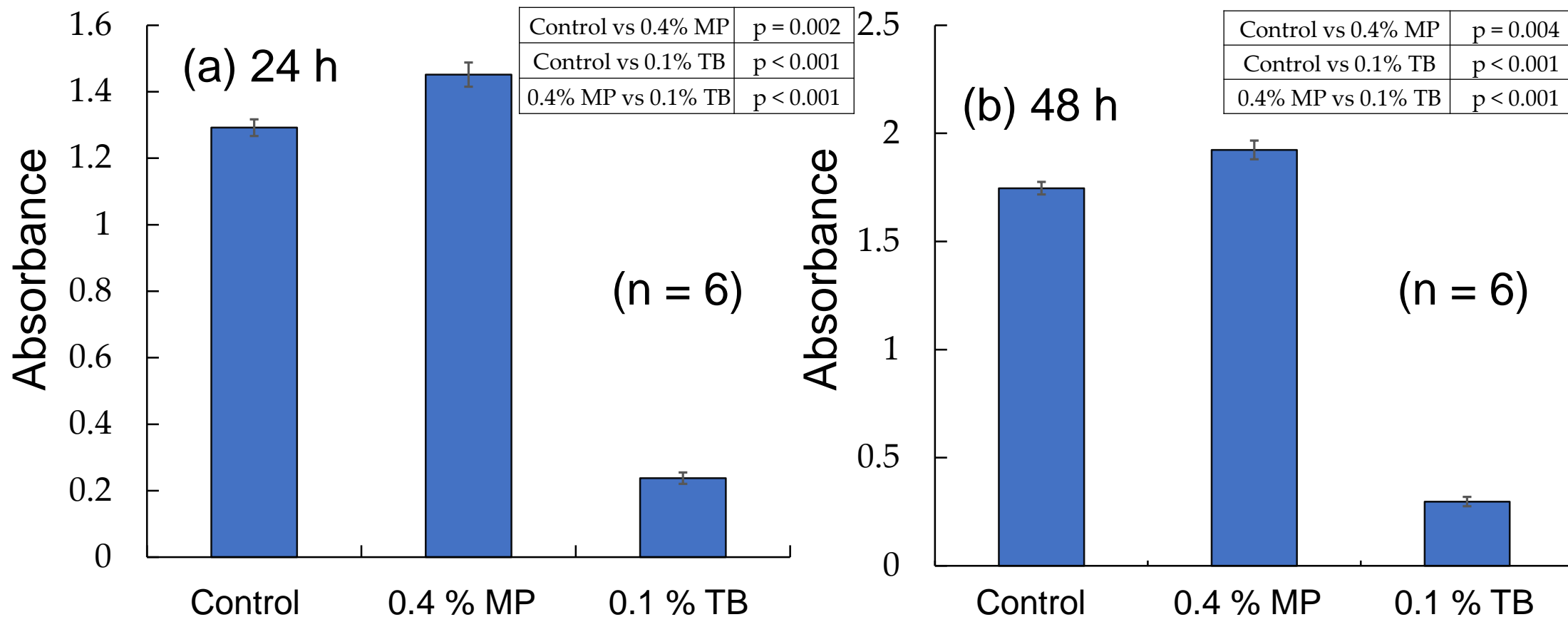
紅麴色素で染色効果を確認

東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科

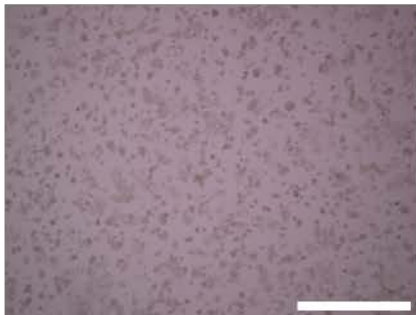
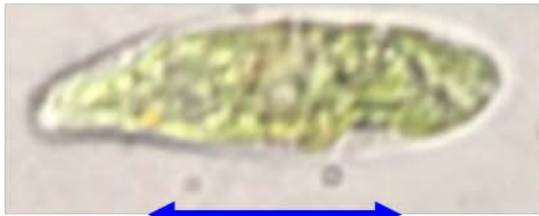

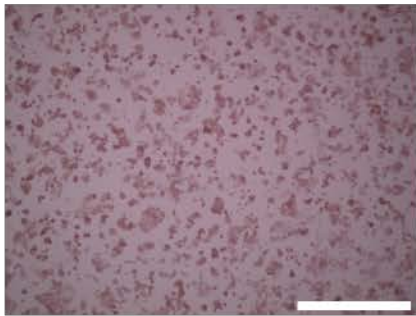


樋上賀一教授 田川亮真助教との共同研究

紅麴色素添加による乳がん細胞の毒性アッセイ

Absorbanceが大きいほど、細胞の酵素活性が高い → 元気 (WST-8 assay)



乳がん細胞に対して、トリパンブルー(TB)は細胞の酵素活性を抑制したが、紅麴色素(MP)は抑制しなかった → **紅麴色素(MP)は非侵襲**

細胞の種類	動物	原生生物	
	ヒト	緑藻	原生動物
	乳がん細胞	ミドリムシ (ユーグレナ)	ゾウリムシ
非染色 (生細胞)			
染色 (死細胞) マイクロ波処理 紅麴色素濃度 1% (W/V)	 スケールバー (白) : 1000 μm	 20 μm	 100 μm



天然色素による死細胞の染色確認

色	赤	赤紫	赤紫	ピンク	黄	緑	青	茶	黒
食品	紅麴	紫芋	紫キャベツ	赤ビート	クチナシ	クチナシ 黄&青	スピルリナ	コウリヤン 色素	竹炭
ユーグレナ	○	○	○	×	×	×	×	×	×
ゾウリムシ	○	○	○	×	×	×	×	×	×
クラミドモナス	○	○	○	×	×	×	×	×	×
ヒト乳がん細胞	○	×	未実施	×	×	×	×	未実施	未実施
ヒト赤血球	○	○	○	×	×	×	×	×	×
ボルボックス	○	○	○	×	×	×	×	×	×

○死細胞の染色あり ×死細胞の染色なし

- ・ 細胞懸濁液をマイクロ波（MW）処理
- ・ 天然色素を添加し10mg/mLに調整
- ・ 明視野顕微鏡により、細胞の染色を目視判定

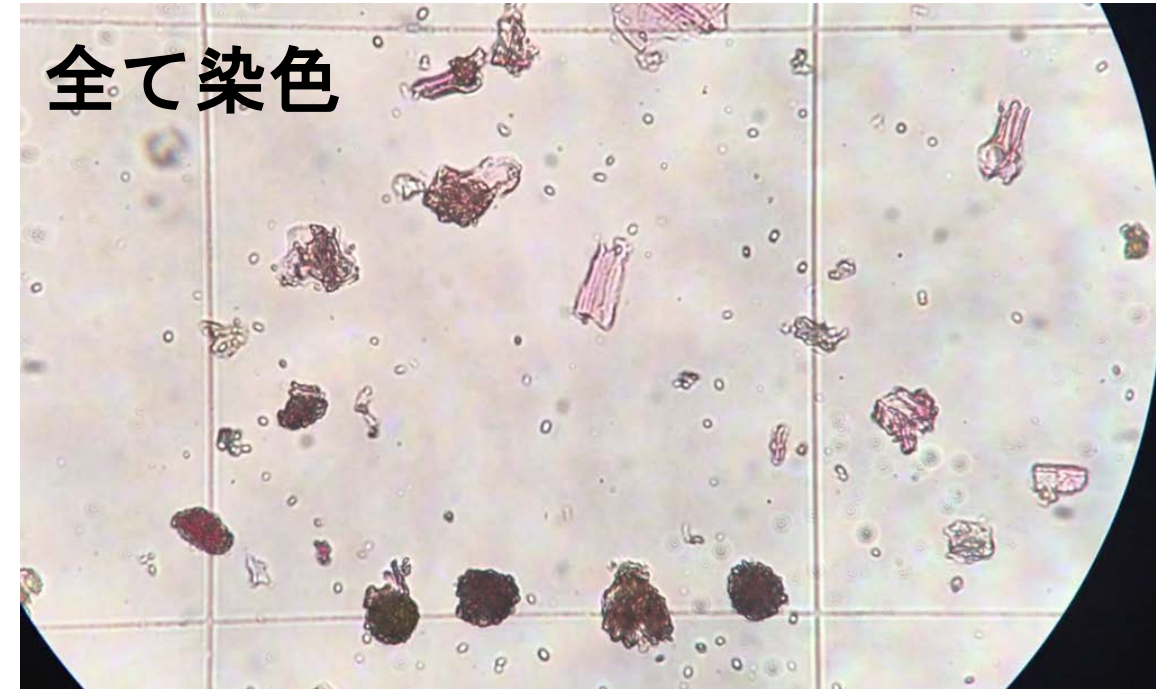
生死判定試薬としての実用が可能な色素

紅麴（*monascus*色素） **紫芋、紫キャベツ**（アントシアニン系色素）

紅麴色素によるタンパク質の選択的染色



紅麴



紫芋

- 紅麴はユーグレナのみ選択的に染色
- 紫芋は夾雑物も全て染色

→色素の性質と標的の性質の組合せに応じて、染め分けが可能
(紅麴は選択性が高く、紫芋は汎用性が高い)

サンプル：緑汁（株式会社ユーグレナ：有形成分
大麦若葉、ユーグレナグラシリス、有機明日葉粉、
クロレラ乾燥粉末）

まとめ

- 低コスト：従来合成色素（トリパンブルー）の**1/10 価格**（1円/1mL）
- 高感度検出：従来合成色素と同等の**高い視認性**
- 短時間検出：3分以内
- 耐薬品性：0.2%塩化ベンザルコニウム溶液中で合成色素よりも**安定した染着性**
- 長期の生死判定モニタリング：**3日間**（紅麴）
- 高汎用性：ユーグレナ、ヒト乳がん細胞、ヒト赤血球、
原生動物ゾウリムシ、単細胞緑藻クラミドモナスで確認
- 選択的染色：紅麴色素は**タンパク質**への染着性が特に高く、
含有率の高い細胞を**選択的に染色**可能

食用色素は食品に混入しても安全な生死判定試薬

想定される用途

- 色素排除法に基づく生死判定試験全般
- 非侵襲な生死判定：再生医療、遺伝子工学、
保存株（特に凍結の解凍後）の生存確認など
- 長期の生死判定：密閉、嫌気環境での生死判定
- 微生物検出：衛生管理
（高い安全性を要する食品加工現場、食堂、一般家庭など）
- 細胞標識：セルカウンター

企業様への期待

- 試薬のキット化技術を持ち、本手法の**キット化**の開発
 - **バイオ関連分野**研究用途向け
 - 食品、医療介護施設等の**衛生管理**用途向け例) 汚染細菌の最適染色条件を見つけ、衛生検査キット化
- 様々な細胞を提供、もしくは本手法を実施いただける企業様
- **精製技術**を持ち、染色に関わる**色素単体**の構造を解明
(染色効率の改善→コストダウン)
- **フローサイトメトリー技術**を持ち、生死判定試薬としての**性能検証**
- 上記に限らず、本発明に関心を持たれた企業様とのコラボ

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞の生死判別方法及び細胞の生死判別用キット
- 出願番号 : 特願2018-241789
- 出願人 : 学校法人東京理科大学
- 発明者 : 山下恭平、徳永英司（計2名）



お問い合わせ先

東京理科大学

研究戦略・産学連携センター

担当URA 名久井 恒司

TEL 03-5228-7431

FAX 03-5228-7442

E-mail ura@admin.tus.ac.jp



天然色素生死判定

参考文献

K. Yamashita, R. Tagawa, Y. Higami, and E. Tokunaga, “Noninvasive and Safe Cell Viability Assay for Breast Cancer MCF-7 Cells Using Natural Food Pigment,” *Biology*, vol. 9, no. 8, Art. no. 8 (2020) doi: 10.3390/biology9080227.

<https://www.mdpi.com/2079-7737/9/8/227>

K. Yamashita and E. Tokunaga, “Noninvasive and safe cell viability assay for *Paramecium* using natural pigment extracted from food,” *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, Art. no. 1(2020), doi: 10.1038/s41598-020-67712-0.

<https://www.nature.com/articles/s41598-020-67712-0>

K. Yamashita, K. Yamada, K. Suzuki, and E. Tokunaga, “Noninvasive and safe cell viability assay for *Euglena gracilis* using natural food pigment,” *PeerJ*, vol. 7, p. e6636,(2019), doi: 10.7717/peerj.6636.

<https://peerj.com/articles/6636/>

アグリビジネス創出フェア2019「天然食用色素による低コスト・非侵襲な細胞の生死判定法」

<https://www.tus.ac.jp/ura/seeds/pa/C1906.pdf>

吸収分光イメージング

T. Isono et al., “Scan-Free Absorbance Spectral Imaging $A(x, y, \lambda)$ of Single Live Algal Cells for Quantifying Absorbance of Cell Suspensions,” *PLOS ONE*, vol. 10, no. 6, p. e0128002(2015), doi: 10.1371/journal.pone.0128002.

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0128002>

K. Yamashita et al., “Absorbance spectra of the hematochrome-like granules and eyespot of *Euglena gracilis* by scan-free absorbance spectral imaging $A(x, y, \lambda)$ within the live cells,” *Journal of plant research*, vol. 132, no. 3, pp. 431–438(2019).

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10265-019-01102-0>