

空気中の化学物質が培養細胞の細胞数・生存率・形態・遺伝子発現に与える影響 —培養環境の実態調査と遺伝子発現解析による環境が細胞に与える影響の基礎的調査—

阿部 公揮 柿本 隆志 藤田 智治 田中 勲

(技術研究所)

(技術研究所)

(技術研究所)

(技術研究所)

Effect of Chemical Substances in the Air Environment on Morphology and Gene Expression of Cultured Cells

—Air analysis of cell culture environment and basic investigation of environmental effect on cultured cells by gene analysis—

Koki Abe, Takashi Kakimoto, Tomoharu Fujita and Isao Tanaka

再生医療の治療には細胞を利用する。その細胞を、安全かつ迅速に患者に提供するためには安全性が高く、細胞の増殖を阻害しない最適な細胞培養環境の構築が重要である。本研究では、細胞培養を実施する室内の空気中に含まれるガス状物質の成分と濃度分布を調査した。次に、検出された物質を除去するケミカルフィルタ(CF)ユニットと、細胞培養チャンバーを連結して清浄環境をつくり、血管内皮細胞を48時間培養した。通常の空気を供給した環境(CFなし)で同時培養した細胞と比較を行った結果、顕微鏡による形態観察では変化が認められなかった。リアルタイムPCR法により酸化ストレス関連遺伝子84種の発現解析をしたところ、33種の遺伝子で発現量に変化が認められた。より広範囲の発現量変化を確認するため網羅的遺伝子発現解析を実施し、発現量に変化が大きかった上位、下位の各5遺伝子を確認したところ、酸化ストレス関連遺伝子以外の遺伝子発現に変化が認められた。

In regenerative medicine, cells from patient or third person are used for treatment. To apply regenerative medicine to patients, it is very important to build an optimized facility for culturing cells safely and promptly. In this study, we have analyzed the air of cell culturing room to obtain gaseous chemical components by sampling several places in the room. Secondly, we prepared chemical filtering (CF) unit which filters gaseous chemicals from air. The CF unit was connected to a cell culture chamber for providing clean air, and human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC) were cultured in the chamber for 48hours. Although morphological study showed there were no significant change, realtime PCR data showed 33 genes varies from control. Transcriptome analysis was performed to analyze total genetic expressions. The result showed that genes that are not related to oxidative stress were observed. Our results showed that some gene expression including oxidative stress was altered by air cleaning with chemical filter.

1. はじめに

再生医療の治療には患者自身、もしくは他者の細胞が原料として利用される。原料となる細胞は、培養により治療に必要な数になるまで増やし、組織やシート状にするなど、治療に最適な状態にして患者に移植される。再生医療に関する法律が整備され、再生医療の産業化は急速に進んでいる。今後は工業化が必要で、実現には培養環境の最適化と精密制御による安定生産が望まれる。

現在の再生医療における細胞培養は、HEPAフィルタを用いて微粒子や微生物の濃度が一定量以下に保たれたクリーンルーム内で作業が行われる。培地交換や継代作業など、細胞が直接空気に

触れる作業は、バイオハザード対策キャビネットやアイソレータ内など、清浄度のより高い環境で実施される。これは主に空気中に存在する細菌やマイコプラズマ等の生物汚染を防止するためである。細胞の品質確保には、作業習熟度の高い作業員を配置している。しかしながら、取違い、ロット、作業員による作製細胞のばらつきなどが課題となっている。

これまで筆者らは、空気中の微量な化学物質がさまざまな化学反応に影響を与えたり、生体物質を劣化させることの知見を得ている¹⁾。細胞の品質安定化においてもクリーンルーム内の化学物質が関与する可能性が考えられた。

化学物質が細胞やタンパク質に与える影響は、アンモニアやオゾンが原因となる事例が報告されている²⁶⁾が、これらの物質について、細胞培養を行うクリーンルーム内での調査報告はこれまでない。再生医療の早期実現のためには、細胞培養環境の最適化の必要性の確認と、必要に応じた制御や最適化の検討が必要である。

そこで本研究では、培養環境の空気質測定を行い、培養環境中の化学物質を分析した。それらをケミカルフィルタ(CF)で除去した環境をつくり、空気質の違いによる培養細胞の影響の検討を培養細胞の評価(細胞形態観察、遺伝子発現解析)により実施した。

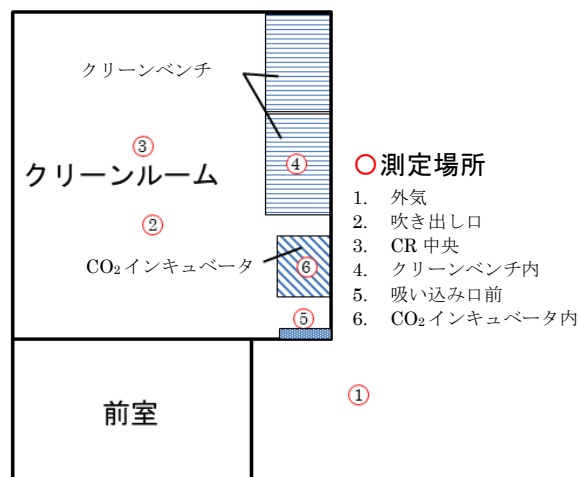


図-1 クリーンルーム測定ポイント

2. 培養環境における空気質の実態調査

2.1 調査方法

2.1.1 対象施設設備

実際に細胞培養に使用している培養室の空気質を測定した。調査を行ったクリーンルームの測定ポイントを図-1に示す。また、測定したクリーンルームの仕様を表-1に示す。

2.1.2 空気サンプリング・分析方法

有機化合物の測定は、吸引流量 0.5L/min で Tenax-GR 捕集管に室内空気 10L をサンプリングし、ガスクロマトグラフ(島津製作所)、およびガスクロマトグラフ質量分析装置(島津製作所)を使用して行った。酸性および塩基性ガスは、吸引流量 1L/min で超純水 75mL に 140 分バブリングして捕集し、イオンクロマトグラフ(アニオン成分: ICS-5000:Dionex、カチオン成分: ICS-2000:Dionex)を使用して分析を行った。ガスクロマトグラフの測定条件を表-2、イオンクロマトグラフの測定条件を表-3に示す。

表-1 クリーンルームの仕様

クリーンルーム外寸	3600(W)×4940(D)×2400(H)mm
前室外寸	2700(W)×2890(D)×2400(H)mm
建屋構造 壁・天井 床 材	カラー鋼板断熱パネル 40mm 以上 長尺塩ビシート
室内清浄度 ※前室は除外	クラス 1000(U.S. Fed.209D)
集塵	HEPA フィルタ (集塵効率 0.3μm 粒子にて 99.97%以上)
空調設備 処理風量	40m ³ /min
フィルタユニット	CA-30×2 台 (ダルトン社製)
一般空調 冷房能力 暖房能力 圧縮機	5.6kW 6.3kW 3.0kW

2.2 測定結果と考察

2.2.1 空気質分析結果

総揮発性有機化合物(TVOC)の測定結果を、図-2に示す。TVOC 濃度は外気に比べてクリーンルーム内で高い数値を示していた。クリーンルーム内では、CO₂ インキュベータ内が最も高い濃度(869.5μg・C/m³)^{注1)}であった。

測定ポイント別の酸性・塩基性ガス濃度分析結果を図-3に示す。CH₃COOH、NO_x、NH₃の濃度が室内で高い傾向にあった。HCl は、ほかの物質に比べて濃度は低く、外気に多く存在していた。

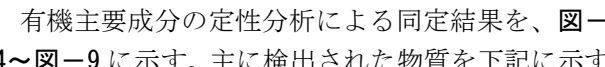
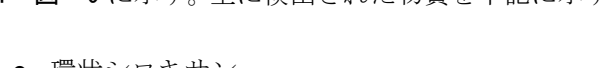
表-2 ガスクロマトグラフ測定条件

	ガスクロマトグラフ GC2010 Plus	ガスクロマトグラフ -質量 QP2010 Plus
加熱脱離装置	TD20 型	TD20 型
分離カラム	DB-1 (J&W)	DB-1 (J&W)
GC 温度条件	40°C 5min ⇒ 300°C 10min	40°C 5min ⇒ 300°C 10min
キャリアガス	He 78.1mL/min	He 50.3mL/min
加熱脱離条件	280°C	280°C
検出器	FID	EI 四重極質量分析

表-3 イオンクロマトグラフ測定条件

	アニオン成分 ICS-5000 型	カチオン成分 ICS-2000 型
試料注入量	50 μ L (濃縮量)	10 μ L (濃縮量)
分離液	KOH 1~40mmol	CH ₃ SO ₃ H 30mmol
溶解液	IonPacAS20	IonPacCS16
検出器	電気伝導度計	電気伝導度計

2.2.2 主な成分と由来

有機主要成分の定性分析による同定結果を、 4~ 9に示す。主に検出された物質を下記に示す。

● 環状シロキサン

Cyclotrisiroxiane	(D3)
Cyclotetrasiloxane	(D4)
Cyclopentasiloxane	(D5)
Cyclohexasiloxane	(D6)
Cycloheptasiloxane	(D7)
Cyclooctasiloxane	(D8)

● アルコール

Ethanol	(エタノール)
Isopropanol	(イソプロパノール)

● アルデヒド

Nonanal	(ノナナル)
---------	--------

CO₂ インキュベータ内は、ほかの測定ポイントよりも環状シロキサンの種類(D3, D4, D5, D6, D7, D8)および濃度が顕著に高いが、これはシール材やパッキンに由来すると考えられる。この CO₂ インキュベータから発生する環状シロキサン(D5, D6)は、室内に拡散していると考えられる。アルコール類に関しては、手指の消毒に使用しているエタノール、イソプロパノールの混合剤由来と考えられる。ノナナルはヒトの皮脂の酸化分解によって発生することが知られている⁷⁾。濃度も低いことから、測定した作業員由来と考えられる。

酸性・塩基性ガスの測定からは、下記物質が検出された。

● 酸性ガス

CH ₃ COOH	(酢酸)
HCOOH	(ギ酸)
HCl	(塩酸)
NO _x	(窒素酸化物)

塩基性ガス

NH ₃	(アンモニア)
-----------------	---------

測定の結果、塩酸は濃度が高い外気由来と考えられる。酢酸、窒素酸化物、アンモニアはクリーンルーム内で濃度が高くなっているが、室外から供給される空調の吹き出し口で濃度が高いため、外気からクリーンルームまでの経路に使用しているダクトなどの建材や接着剤などが発生源であると考えられる。ギ酸は室内で多く発生しているが、空調吹き出し口よりも室内各所の濃度の方が高いため、室内に発生源があると考えられる。これらの物質は CO₂ インキュベータ内で濃度が下がっているが、CO₂ インキュベータ内の加湿用の水に溶解していることが考えられる。気中や培地に溶解する可能性があるため、培養細胞による影響評価の実施が必要と考えられる。

2.3 まとめ

空気質測定結果より、培養環境中に存在する化学物質に関する知見を得た。TVOC 濃度の結果から、CO₂ インキュベータ内で環状シロキサンが多く発生していることが明らかとなった。有機成分の同定結果から、装置や建材由来、作業に使用する物品由来、作業員等の由来の物質があることが分かった。

これらの物質は、人体において高濃度に存在すると悪影響を及ぼす物質が含まれている。例えば TVOC 濃度は、高濃度に存在するとシックハウス症候群を発症することが懸念されており、厚労省は室内の暫定目標値を 400 μ g/m³と定めている。今回の測定で CO₂ インキュベータ内は、TVOC が 953.8 μ g/m³(測定値 869.5 μ gC/m³)となっており、暫定目標値よりも高い濃度で存在していた。TVOC 濃度だけでなく確認された酸性・塩基性成分には、人体に有害な物質も含まれており、これらが細胞に悪影響を及ぼす可能性が懸念される。

現在の、国内の再生医療は主に自家移植であり、細胞の状態も大きく異なる患者自身の細胞を用いる。そのため、成長に個体差があることが知られている⁸⁾。再生医療では個体差のある細胞をいかに安全で迅速に必要な数まで増やすかが重要である。これら物質が培養細胞に与える影響の確認とその対策が必要と考えている。

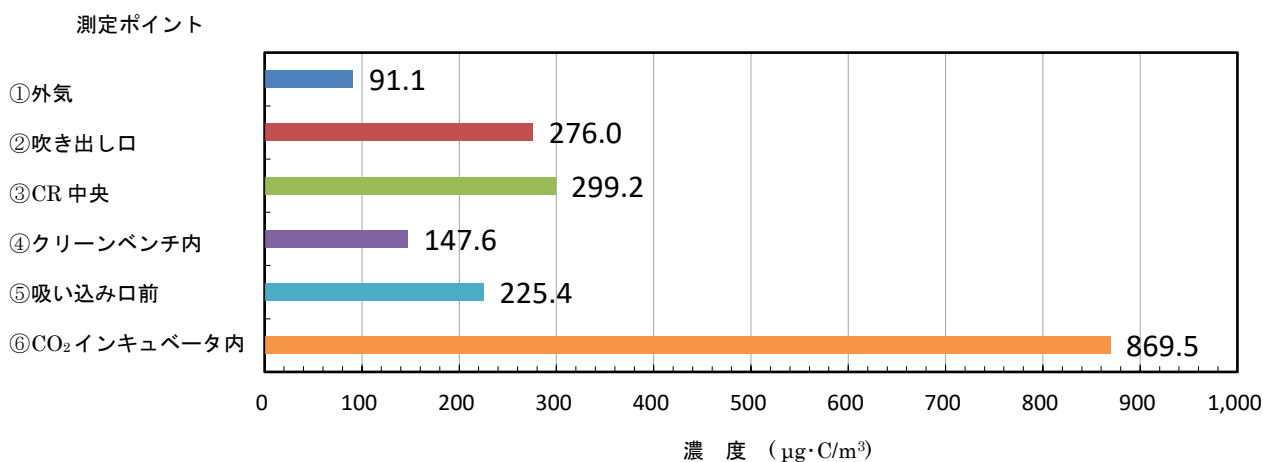


図-2 TVOC 濃度

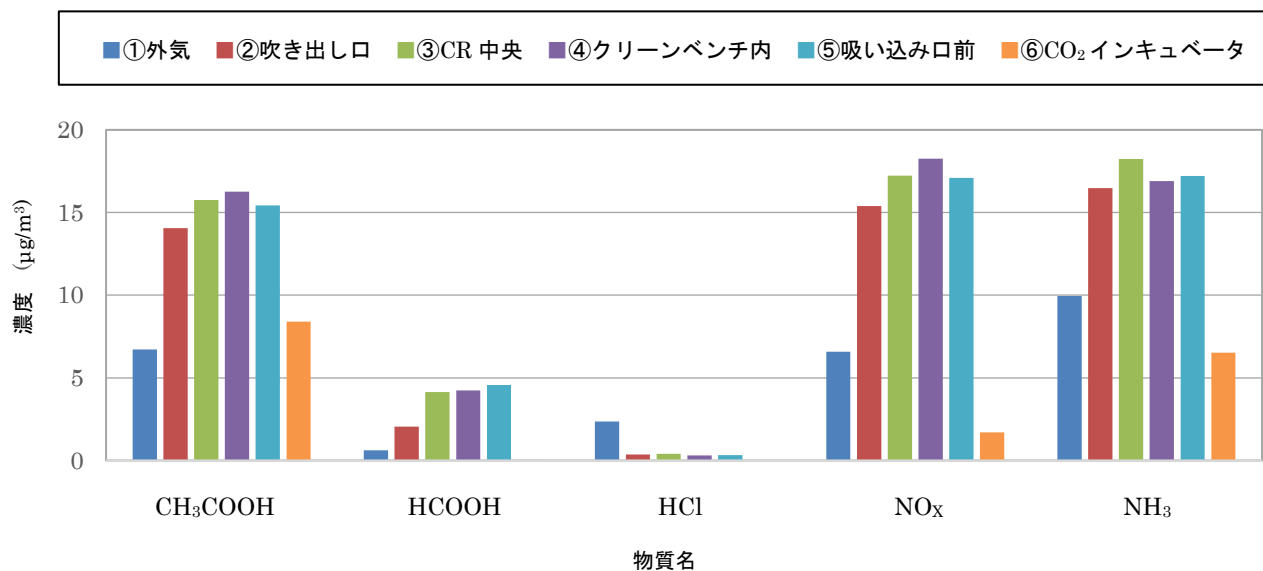


図-3 酸性・塩基性ガス成分濃度

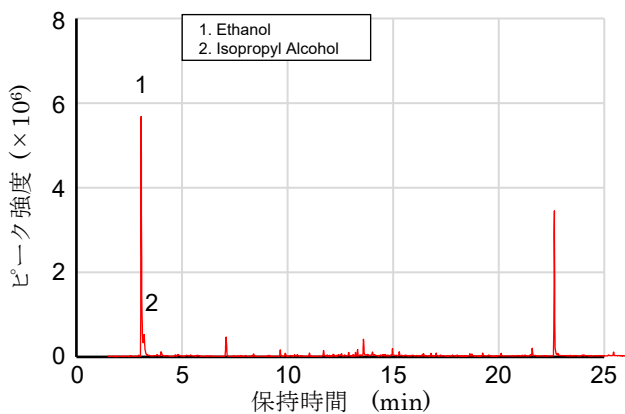


図-4 有機成分分析結果(外気)

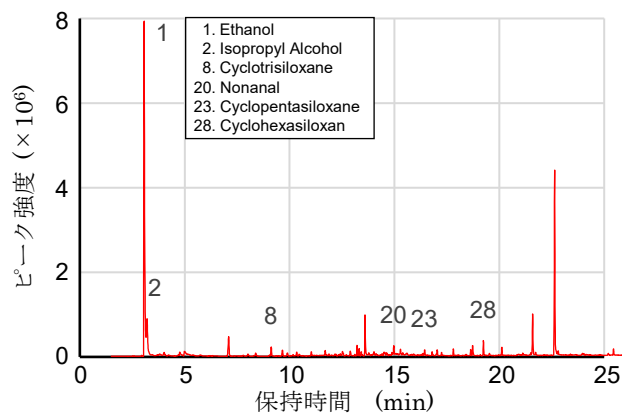


図-5 有機成分分析結果(CR吹き出し口)

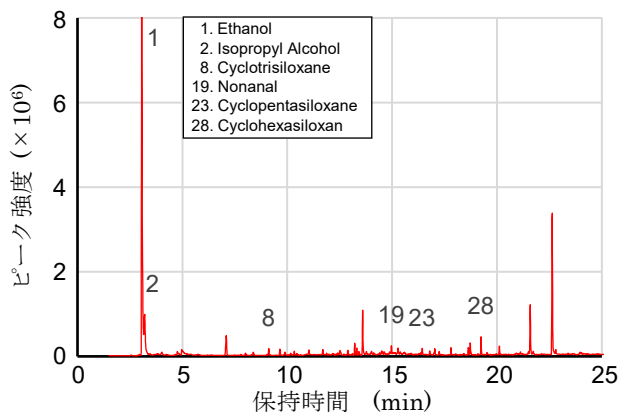


図-6 有機成分分析結果 (CR中央)

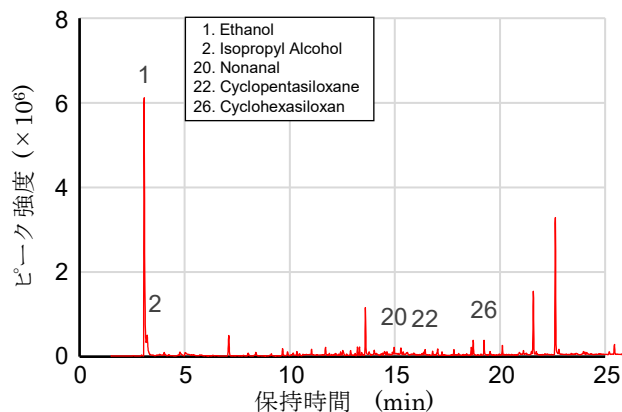


図-7 有機成分分析結果 (クリーンベンチ内)

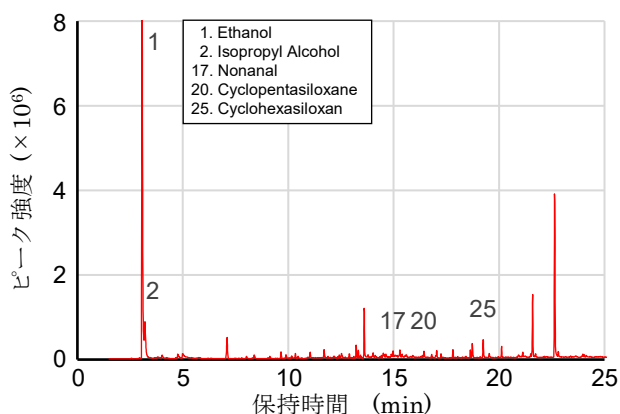


図-8 有機成分分析結果 (CR吸い込み口)

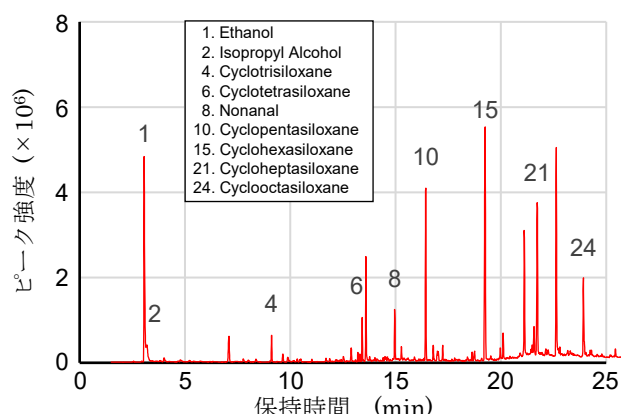


図-9 有機成分分析結果 (CO₂インキュベータ内)

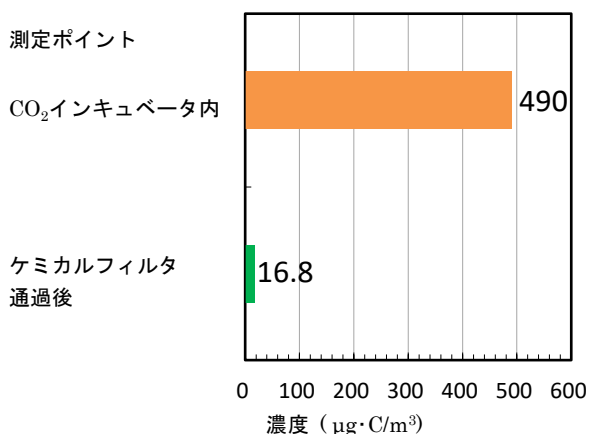


図-10 CFユニット前後のTVOC濃度

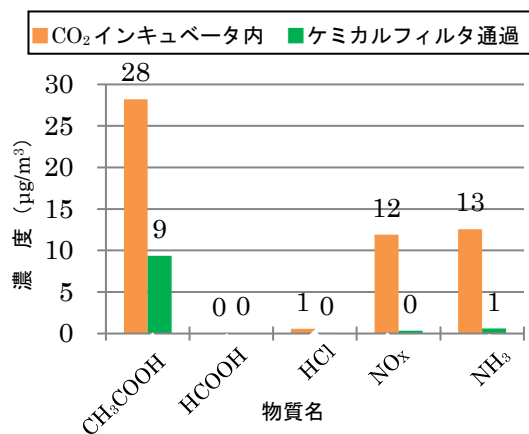


図-11 CFユニット前後の酸性・塩基性ガス成分濃度

3. 培養空気の清浄化対策とその効果

3.1 ケミカルフィルタユニットの製作

空気清浄化のために、ケミカルフィルタ(CF)ユニットを作製した。ユニットはアニオン活性炭(NO_x等の酸性ガスを吸着)、HC活性炭(有機成分を吸着)、カチオン活性炭(アンモニア等塩基性ガスを吸着)を、プラスチック製チューブにそれぞれ充填し、直列に連結し

たCFユニットを製作した。効果確認のために、CO₂インキュベータ内の空気をCFユニットに供給し、通過後の空気をサンプリングし、その除去効果を確認した(図-10)。その結果、CO₂インキュベータ内では490µg·C/m³であったがCF通過後は16.8µg·C/m³となり96.6%除去できていることが確認された。酸性・塩基性成分の測定結果を図-11に示す。すべての物質が効果的に除去できていることを確認した。

3.2 培養実験

3.2.1 使用した細胞と培養方法

細胞は HUVEC(IFO50271:ヒト臍帯由来血管内皮細胞:JCRB 細胞バンク)を用いた。HUVEC は内皮細胞増殖培地(C22110:タカラバイオ社)を用い、3回継代して実験に用いた。細胞濃度は 0.8×10^5 cells/well で、6well プレートに 3well ずつ播種した。

3.2.2 細胞培養装置

CO₂ インキュベータ内に、CF ユニットを接続可能な細胞培養チャンバーを新規に設置した (CF あり)。装置概要と写真を図-12、図-13 に示す。

3.2.3 実験方法および細胞評価方法

上記チャンバーと、CF ユニットを接続しないチャンバー (CF なし) において、血管内皮細胞を 48 時間培養後、形態観察^{注3)}および細胞数計測を行った。形態観察後、6well プレートから剥離した細胞をトリパンブルー染色し、セルカウンター (オリンパス) で細胞数を計測した。トリパンブルー染色により死細胞が染色されるため、生細胞と死細胞を別々にカウントした。各 9 サンプルの測定結果をもとに式(1)、(2)より、細胞数と細胞生存率を計算し、平均を算出した。

$$\text{細胞数(cells)} = \text{live cells (cells/mL)} \times \text{溶液量(mL)} \quad (1)$$

$$\text{生存率(\%)} = \text{live cells} / \text{total cells} \times 100 \quad (2)$$

3.3 結果と考察

細胞数、生存率の結果を図-14、図-15 に示す。顕微鏡撮影画像を図-16 に示す。細胞数、生存率に差は認められなかった。形態観察の結果から、細胞の異型性は観察されなかった。このことより、今回の 48 時間の培養において、空気の清浄化は、血管内皮細胞の細胞数、生存率、形態の変化には影響を与えていないと考えている。

3.4 まとめ

培養環境中の化学物質は CF ユニットにより清浄化することができた。CF 細胞培養チャンバーで血管内皮細胞を 48 時間培養し、細胞数、生存率、細胞形態を評価したところ、細胞数、生存率、形態的影響は認められなかった。次項にて、遺伝子発現レベルでの検討を行い、より詳細に検討することとした。

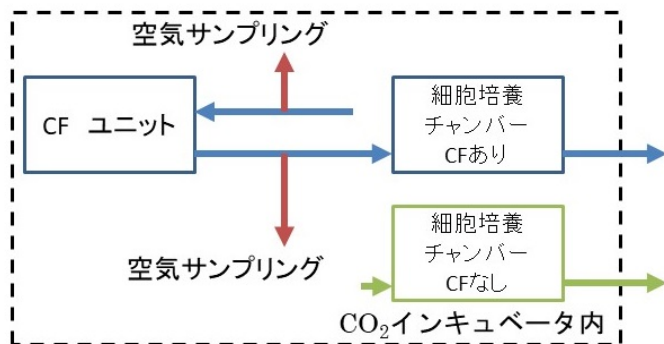


図-12 実験装置概略図

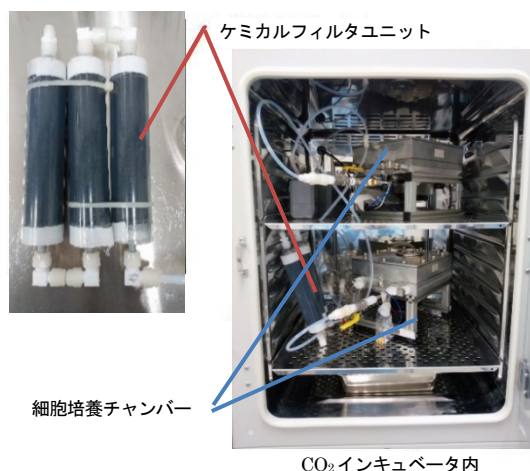


図-13 新規細胞培養チャンバー(右)と CF(左)写真

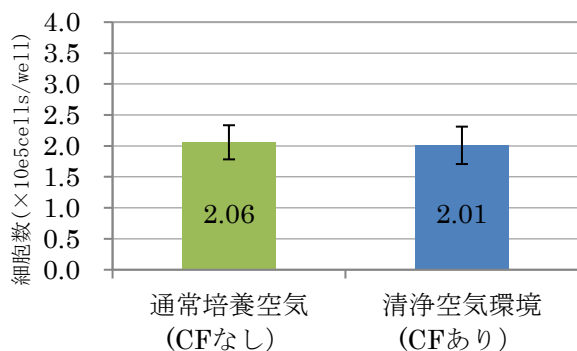


図-14 48 時間培養後の細胞数

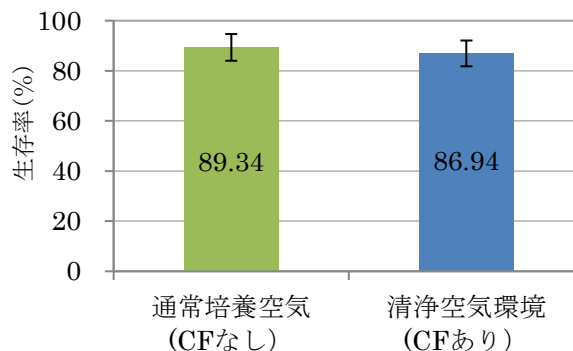


図-15 48 時間培養後の生存率

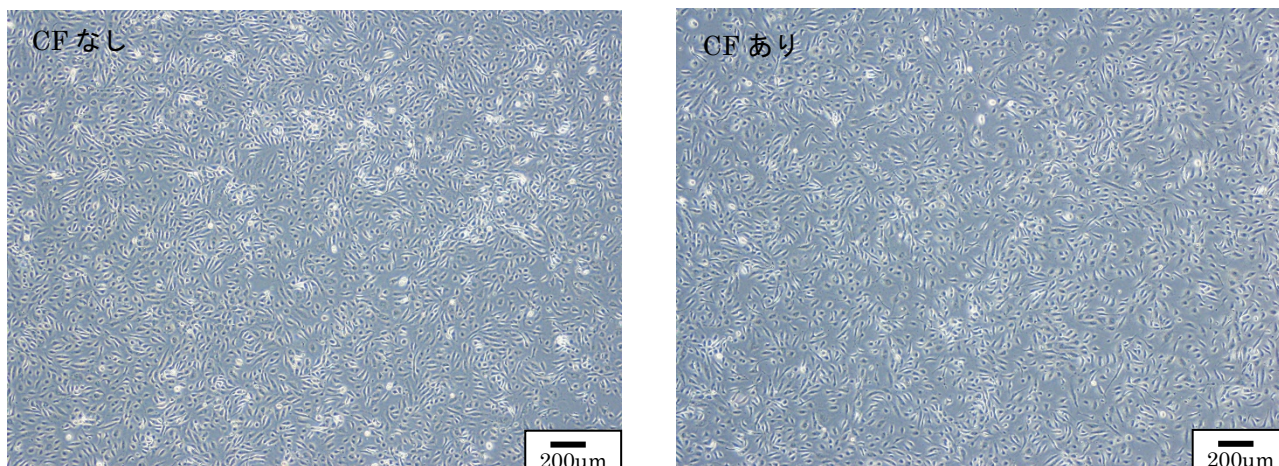


図-16 48時間培養後の顕微鏡写真

4. 細胞への影響調査

4.1 測定方法と評価

4.1.1 リアルタイムPCR法

① 特徴

リアルタイムPCR (Polymerase Chain Reaction) 法^{注4)}は、cDNA^{注5)}に蛍光色素を含む反応液を混ぜ、PCRにより増幅産物をリアルタイムでモニタリングし、解析する方法である。本測定では、PCRサイクルを45サイクル行い、設定した閾値に達した点がCt値(Threshold Cycle)となる。PCR1サイクルで2倍に増幅するので、早く閾値に達するほど遺伝子の量が多い。この方法は、目的のmRNAに精度よく蛍光物質を結合させることができるため、測定精度が高いことが特徴である。

② 測定方法

空気質の分析結果より、酸性物質(酢酸、窒素化合物)が検出された。動物細胞の活性酸素放出と共通の挙動を示す酵母の研究では、酢酸が、活性酸素産生を促進する⁹⁾ことが報告されている。また、ウサギの肝臓を使った実験では、活性酸素を産出することが報告されている¹⁰⁾。細胞は、通常の状態でも活性酸素を産生するが、スーパーオキシドディスムターゼなどの抗酸化酵素の働きにより、

活性酸素を除去し、恒常性を維持する¹¹⁾。しかし、細胞内に酸化性物質が導入されると、活性酸素が過剰に産生されると、酸化ストレスとなり、アポトーシス、細胞増殖、がん化などに影響をことが報告されている¹²⁾。従って、測定対象遺伝子は、酸化ストレス関連遺伝子とした。細胞から抽出したRNAはRNeasy Mini Kit(QIAGEN)を使用して精製し、RT2 Profiler PCR Arrays(QIAGEN)を用いて酸化ストレス関連遺伝子84種の発現量を測定し、解析を行った。リアルタイムPCRは、LightCycler 480 System2 (Roche)を使用し、CFあり、CFなしで9サンプルを、表-4の条件で測定した。

③ 遺伝子発現量の比較

リアルタイムPCRの結果を比較Ct法によりサンプル間比較をした。この方法は細胞内で一定量発現する遺伝子(ハウスキーピング遺伝子)^{注6)}を基準とし、異なるサンプル間での発現量を比較する手法である。今回の実験のように、複数の遺伝子の発現量を1度に比較するのに適している手法である。まず、Ct値が35以上もしくはN/Aの場合は、発現していないものとした。下式(3)に示す目的遺伝子のCt値からハウスキーピング遺伝子のCt平均値を引き、 ΔCt を算出した。

$$\Delta Ct = Ct(\text{gene of interest}) - Ct(\text{average of housekeeping genes}) \quad (3)$$

Gene of interest...目的遺伝子 (84 遺伝子)

Average of housekeeping genes...

ハウスキーピング遺伝子の平均値 (5 遺伝子)

式(4)に示すようにCF環境下で培養したCFありグループの ΔCt 平均値からCFなしグループの ΔCt 平均値を引いて $\Delta \Delta Ct$ を計算し、 $2^{(-\Delta \Delta Ct)}$ をCFなしグループを基準としたCFなしグループの発現量比とした。

表-4 リアルタイムPCR測定条件

Pre-incubation(1回)	95°C 5分 4.4°C/秒
Amplification(45回)	95°C 10秒 4.4°C/秒
	60°C 10秒 2.2°C/秒
	72°C 10秒 4.4°C/秒
Melting Curve(1回)	95°C 5秒 4.4°C/秒
	65°C 1分 2.2°C/秒
	97°C 0.11°C/秒
Cooling(1回)	40°C 30秒 2.2°C/秒

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{CFあり}) - \Delta Ct(\text{CFなし}) \quad (4)$$

$$\text{発現量比} \cdots \frac{\text{CFなし}}{\text{CFあり}} = \frac{1}{2^{-\Delta\Delta Ct}}$$

既往の研究を参考¹³⁾に基準となるサンプルの発現量に対し、遺伝子発現量が2倍以上、或いは半分以下になっている遺伝子を変化ありと定義した。

4.1.2 次世代シーケンス

① 次世代シーケンス法の特徴

本方法は、細胞内の mRNA^{注7)}を対象とした測定法である。リアルタイム PCR 法はターゲットとする遺伝子のみを検出対象としている。一方、次世代シーケンス法では cDNA 断片から既知の配列へのマッピングを行うために、ターゲット遺伝子を定めずに測定し、特定することができる。発現するすべての遺伝子が測定対象であるため、リアルタイム PCR 法に比べ個々の遺伝子発現の精度は劣るが、未知の遺伝子を、網羅的に解析ができることが特徴である。

② 測定方法

細胞から抽出した mRNA から、KAPA Stranded mRNA-Seq Kit(KAPA BISYSTEMS)を用いてライブラリを作製した。アダプターは Fast Gene Adapter Kit(Fast Gene)を使用し、NextSeq 500 を使用してシーケンス解析を行った。解析されたデータは hisat2 を用いて参照配列にマッピングを行った。それぞれの条件で 3 サンプル測定した。

③ 評価方法

シーケンス解析で得たカウント数から、式(5)より RPKM^{注8)} (reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads)を算出し、全てのサンプルでカウント数が 10 以上の遺伝子を対象とした。さらに RPKM 値で 0 を含む遺伝子をカットし、各遺伝子の発現量比計算をした。既往の研究を参考¹⁴⁾に、t 検定 (Welch's t-test)で p 値を算出し、有意水準 (p<0.05) で絞り、発現変動比 1.5 倍以上、または 1/1.5 (約 0.67 倍)以下の条件で絞り込みを行った。

$$\text{RPKM} = \text{raw counts} * 10^9 / (\text{all reads} * \text{gene length}) \quad (5)$$

4.2 結果及び考察

HUVEC 細胞を CF あり、CF なしの環境下で培養し、細胞の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。発現した遺伝子量は比較 CT 法に評価した。酸化

ストレス関連遺伝子(84 遺伝子)の比較結果を図-17 に示す。また、発現が 2 倍以上、0.5 倍以下になった遺伝子のうち、発現が多かった 4 遺伝子と発現が少なくなった 2 遺伝子を表-5 に示す。酸化ストレス関連遺伝子のリアルタイム PCR の結果から、CF あり下で培養した細胞で発現が増加した遺伝子が 31 遺伝子、発現が低減した遺伝子は 2 遺伝子であった。具体的には、清浄環境で培養した細胞は、CF なしの条件に比べて、EPX(約 3.1 倍)、MBL2(約 3.0 倍)、MPO(約 3.0 倍)、GPX2(約 2.9 倍)の発現が増加していた。一方、GCLC の発現量が約 0.5 倍、PRDX3 が約 0.5 倍に低減していた。このことから空気質は HUVEC の酸化ストレス関連遺伝子発現に影響を与えたと考えられる。

次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析結果で、発現量に変化が大きかった遺伝子の上位、下位各 5 遺伝子を表-6 に示す。既往の研究から、最も発現量に変化のあった HBP1 は、活性酸素存在下で発現が上昇し、PIM1 に結合し、BAX、DNMT1、P16 の遺伝子発現を制御し、細胞増殖の抑制やアポトーシスを誘導する¹⁵⁾。しかし、今回の実験結果から、発現に変化のあった遺伝子の中に PIM1 の発現が認められなかった。このことから、CF ありの環境で、培養した HUVEC 中の活性酸素量が増加したが、抗酸化酵素等による活性酸素の除去量とのバランスがとれており、酸化ストレスにならなかったと考えられる。

CMKLR1 は、ケメリンによって発現が促進され、血管内皮細胞の窒素酸化物の産生を促進することが報告されている¹⁶⁾。窒素酸化物は、活性酸素の産生に影響していることが報告されており¹⁰⁾、酸化ストレスとなる可能性がある。しかし、今回の実験結果からは、ケメリンの発現を制御する TIG2 の発現、および細胞数、生存率、形態に変化が認められなかったことから、酸化ストレスになっていないことが考えられる。

これらのことより、CF ありの環境で培養した HUVEC は、CF なしの環境で培養した細胞に比べ、遺伝子発現に変化を与えるが、恒常性の維持に影響を与えるほどの活性酸素が産生されなかったので、細胞の表現型に影響がなかったと考えられる。

今回の HUVEC を用いた実験では、細胞の表現型への影響は確認できなかった。しかしながら、間葉系幹細胞は、線維芽細胞やがん化した細胞に比べ、酸化ストレスにより細胞増殖、形態に変化を受けやすいこと¹⁷⁾や、骨分化を誘導することが報告されている¹⁸⁾。今後は、間葉系幹細胞を使って実験を行い、CF あり、CF なしの環境が与える影響の実験を行い、調査を継続していきたい。

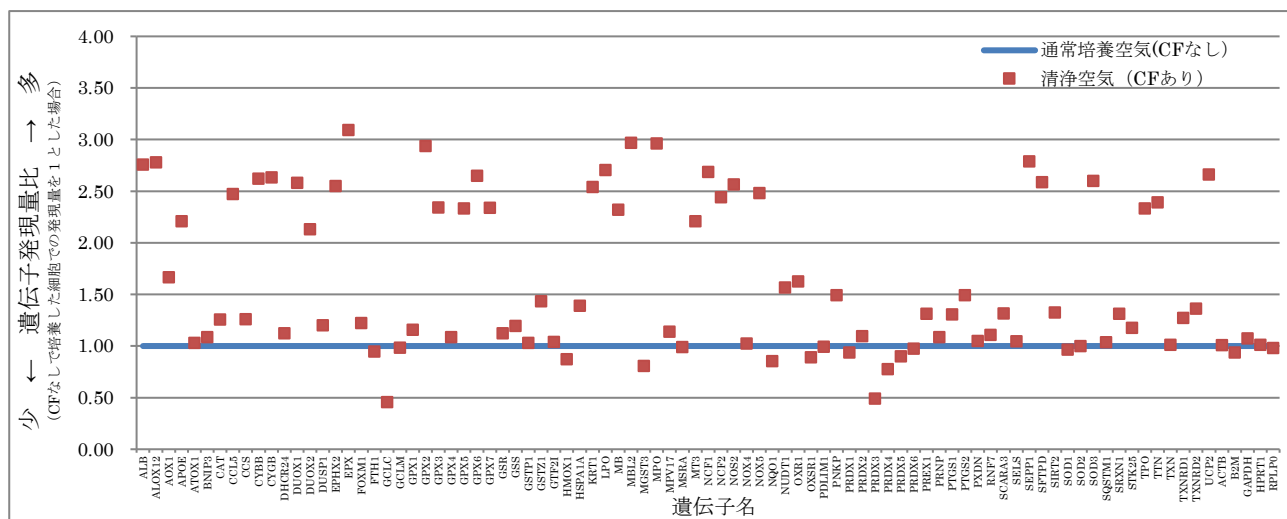


図-17 48時間培養後の遺伝子発現解析結果（リアルタイムPCR法、n=9）

表-5 CFあり環境下で発現量に変化のあった遺伝子（リアルタイムPCR法、n=9）

発現が増加した遺伝子（2倍以上）		発現が低減した遺伝子（0.5倍以下）	
遺伝子名	倍率	遺伝子名	倍率
EPX (Eosinophil Peroxidase)	3.1	GCLC (Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic subunit)	0.5
MBL2 (Mannose Binding Lectin 2)	3.0	PRDX3 (Peroxiredoxin 3)	0.5
MPO (Myeloperoxidase)	3.0		
GPX2 (Glutathione Peroxidase 2)	2.9		

表-6 CFあり環境下で発現量に変化のあった遺伝子（次世代シーケンス法、n=3）

発現増加遺伝子				発現減少遺伝子			
遺伝子名	CFなし RPKM Ave.	CFあり RPKM Ave.	発現量比 FC	遺伝子名	CFなし RPKM Ave.	CFあり RPKM Ave.	発現量比 FC
HBP1	2.7*10 ⁻²	11*10 ⁻¹	5.4	RNA18SN5	79*10 ⁻¹	8.8*10 ⁻¹	-3.2
CMKLR1	4.4*10 ⁻³	0.3*10 ⁻¹	2.8	TRNS1	17*10 ⁻¹	2.8*10 ⁻¹	-2.6
NPR1	1.9*10 ⁻²	1.6*10 ⁻¹	2.5	RNA45SN5	13*10 ⁻¹	2.5*10 ⁻¹	-2.3
ZNF43	4.7*10 ⁻³	2.2*10 ⁻²	2.0	RAB34	9.2*10 ⁻²	2.3*10 ⁻²	-1.8
STON2	5.0*10 ⁻³	1.8*10 ⁻²	1.9	SBNO2	2.1*10 ⁻¹	5.7*10 ⁻²	-1.5

4.3 まとめ

リアルタイムPCRの結果から、空気環境の違いが酸化ストレス関連遺伝子の発現に影響を与えることが分かった。網羅的遺伝子発現解析結果から、酸化ストレス関連遺伝子以外の遺伝子発現に影響を与えることが確認された。しかしながら、細胞の表現型への影響がなかったことから、酸化ストレスとなっていない可能性が示唆された。

5. おわりに

培養室の実態調査により、CO₂インキュベータ内にTVOCが高濃度に存在していることを明らかにした。空気質の定性分析結果より、細胞培養中の環境には環状シロキサン類、アルコール類、アルデヒド類が存在しており、それらは室内を構成する材料や装置、作業由来成分であることが考えられる。培養環境中には、様々な化学物質が認められたが、これらはCFユニットでの処

理によって容易に濃度が低減され、清浄化することができた。CFユニットを用いてCFあり環境中で血管内皮細胞を48時間培養したところ、CFなしと比べて細胞数、生存率、形態変化は観察されなかった。

空気清浄化の影響をさらに詳細に検討するために、リアルタイムPCR法で遺伝子発現解析を行ったところ、酸化ストレス関連遺伝子84遺伝子中33遺伝子で発現量に変化が認められた。そのため、広範囲な遺伝子発現を確認するために、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、酸化ストレス以外の遺伝子発現にも変化が生じていた。

再生医療施設では、高度な管理が要求される幹細胞など、様々な細胞が培養されているが、今回の実験では体細胞に対する影響を確認している。今後の治療の原材料として注目されている幹細胞について、空気環境の影響を明らかにすることで、最適な細胞培養環境と制御方法の提案を図っていきたくと考えている。

謝辞

本実験は桐蔭横浜大学萩原啓実教授、徳岡由一教授、吉田薫准教授にご協力をいただいた。また、細胞培養実験、遺伝子発現解析では、八木美里氏にご協力をいただいた。ここに記し、お礼を申し上げます。

<注>

- 1) ガスクロマトグラフで使用したFID検出器は、有機化合物の検出感度が高い。トルエン換算すると、トルエンと組成の違う物質は濃度に乖離が生じるため、測定結果を炭素換算して表記した。算出方法は、ガスクロマトグラフ測定で得られたクロマトグラムから全ピーク面積を求め、予め既知の有機ガスによって検出されたピーク面積と有機ガス中の炭素数との関係を求めておき、これよりピーク面積を μgC に換算する。
- 2) 細胞死の一種である。あらかじめ決まった場所で決まった時期に起こる細胞死である。アポトーシスが発生すると細胞が収縮する。次に、細胞や核に突起を生じ、断片化する。断片化した細胞は小胞となり、周囲の細胞に取り込まれる。
- 3) 細胞の形、および外観で判断する。細胞が影響を受けると、細胞が培養容器表面から剥離したり、複数核の巨大細胞が観察される。細胞観察の際に細胞の形、大きさを観察する。
- 4) PCRは、二本鎖DNAが、高温環境下で解かれた一本鎖DNAを鋳型として、DNAポリメラーゼ(合成酵素)により新たなDNAが完成する。このDNA複製を人工的に繰り返すことで、目的とする塩基配列のみを効率的に増やせる技術である。
- 5) 相補的DNA (complementary DNA) は、逆転写反応により一本鎖RNA [メッセンジャーRNA (mRNA) やマイクロRNA (miRNA)] を鋳型として合成されるDNAである。

- 6) 細胞中に共通して一定量発現する遺伝子のこと。常に発現され、細胞の維持、増殖に不可欠な遺伝子である。GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase)、 β -アクチン、 β 2-マイクログロブリン、HPRT 1(Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1)などがある。
- 7) メッセンジャーRNA (mRNA) は、DNA上にあるタンパク質のアミノ酸配列をコードしている部分から転写されるRNAである。タンパク質はmRNAの配列を元にリボソームで合成される。
- 8) 次世代シーケンサーで得られたデータ(リードカウント)は転写産物が長いほど、多くの断片となるのでリードカウント数も多くなる。そのため遺伝子間の発現量を比較するには、この影響を取り除く必要がある。データを総リード数による補正後、転写産物長による補正を行ったデータがRPKM値である。

<参考文献>

- 1) 鈴木令,田中勲,坂本禎志,化学工学会 81年大会(2016), 要旨集 H-318
- 2) Agnieszka K. et al. : J. of Neurochemistry 109 (2009), Suppl. 1, P246-251
- 3) Kakulavarapu V. Rama Rao et al. : Journal of Neuroinflammation, vol. 7 (2010) P66
- 4) Zhanxia Xue et al. : Neurochemistry International, vol. 57 (2010), P395-403
- 5) Michael, R. Hyman, Charlotte Y. Kim et al. : J of Bacteriology. Sept (1990), 4775-4782
- 6) Meeks, R.G., Stump, D.G., Siddiqui, W.H., Holson, J.F., Plotzke, K.P., Reynolds, V.L., Reprod. Toxicol. 23 (2007), P192-201
- 7) Mochalski P, King J et al., J Chromatogr B 959 (2014) P62-70,
- 8) Jessica S et al., Forensic Science International 226(2013), P173-182
- 9) Nicoletta G. et al., Frontiers in Oncology, July(2012), Vol. 2, Article 70
- 10) Sakuma S et al., Biochem. And Biophys. Res. Comm 230, Article RC965983 (1997), P476-479
- 11) 江口 裕伸 ほか, 生物試料分析 Vol32 (2009), No4, P247-256
- 12) 榮長 裕晴 ほか, 生物試料分析 Vol.32(2009), No 4, P265-272
- 13) Suthesh Sivapalaratnam et al.: PLOS ONE Vol 7(2012), Issue 2, e32216
- 14) Damien N, Barnette et al.: PLOS ONE Vol 9 (2014), Issue 7, e101425
- 15) Shuya Wang et al. J Biol Chem 292 (2017), P8207-8222
- 16) 山脇 英之, Folia Pharmacol. Jpn, 137 (2011), P131-135
- 17) Kaur J, et al. Biochem Biophys Res Commun. (2010), 391, P1762-1768.
- 18) Ko E et al., Stemcells And Development, Vol 21, No. 11(2012), P1877-1885