

アスリートの健康に影響しない新型消毒システムの開発 (肺由来ヒト線維芽細胞に対する異なる pH 値の影響 - 細胞生存率、生/死細胞割合の検討)

Development of a new disinfection system that does not affect the health of athletes (Effect of different pH values on Pulmonary-Derived Human Fibroblasts Cell- examination of cell viability and live/dead cell ratio)

櫻井 勝^{*,**,*}, 蔡 承 達^{*,**,*}
羽田 克彦^{*,**,*}, 金子 雅希^{*,**,*}

Masaru SAKURAI^{*,**,*}, Chengta TSAI^{*,**,*}
Katsuhiko HATA^{*,**,*} and Masaki KANEKO^{*,**,*}

I. 背景と目的

我々はアスリートのアスリートの健康に影響しない新型消毒システムの開発を行っている。その際、肺由来ヒト線維芽細胞の適切な培養方法を用いて、それぞれの細胞に対して異なる濃度の HClO₂ への暴露を行い、細胞の生存率を計測し、細胞の活性酸素、酸化ストレスの変化及び細胞代謝の影響を精査している。

pH は水溶液が酸性やアルカリ性を表す尺度であって「水素イオン指数」或は「水素指数」と訳す¹⁾。通常には 1 から 14 までの値となり、真ん中では「中性」という。pH 7.2~7.4 はほぼすべての細胞にとって理想的であり、細胞種類によって pH 値は異なる場合もある。厚生労働省消費者庁の食品添加物公定書により、強酸性 (pH 3.0 未満)、弱酸性 (pH 3.0 以上 5.0 未満)、微酸性 (pH 5.0 以上 6.5 未満)、微アルカリ性 (pH 7.5 以上 9.0 未満)、弱アルカリ性 (pH 9.0 以上 11.0 未満)、強アルカリ性 (pH 11.0 以上) を定義した²⁾。本研

究はヒト線維芽細胞を用いて、異なる pH の 1×HBSS (-) バッファを暴露された際のヒト線維芽細胞の生存率、生細胞と死細胞割合を検討する。

II. 方 法

バッファの調製：強酸性 (pH 2)、弱酸性 (pH 4)、微酸性 (pH 6)、中性 (pH 7.2)、微アルカリ性 (pH 8)、弱アルカリ性 (pH 10)、強アルカリ性 (pH 12) の 1×HBSS (-) バッファ調製方法について、中性の 1×HBSS (-) を用いて、塩酸或は水酸化ナトリウムを追加し、目的な pH 値の 1×HBSS (-) バッファを調製した。

生/死細胞割合の検討：生/死細胞割合の計算はまず、ヒト線維芽細胞は目的な pH 値の 1×HBSS (-) バッファを暴露されて、同仁化学の Cellstain®- Double Staining Kit を用いて染色して写真を撮った。その後、画像は ImageJ bundled with 64-bit Java 8 を処理して、Calcein-AM (緑色) と PI (赤色) を染色された細胞画像を抽出

* 国士館大学体育研究所 (The Institute of Physical Education, Kokushikan University)

** 数理医学研究センター (Department of Neuroscience, Research Center for Mathematical Medicine)

*** 株式会社分子栄養学研究所 (Orthomolecular Nutrition Laboratory, Inc.)

**** 国士館大学救急システム研究科 (Department of Emergency Medical System, Kokushikan University)

***** 国士館大学体育学部スポーツ医科学科 (Department of Sport and Medical Science, Kokushikan University)

して、目的な pH 値の生細胞数或は死細胞を目的な pH 値の総細胞数で割って、生/死の細胞割合を計算した。

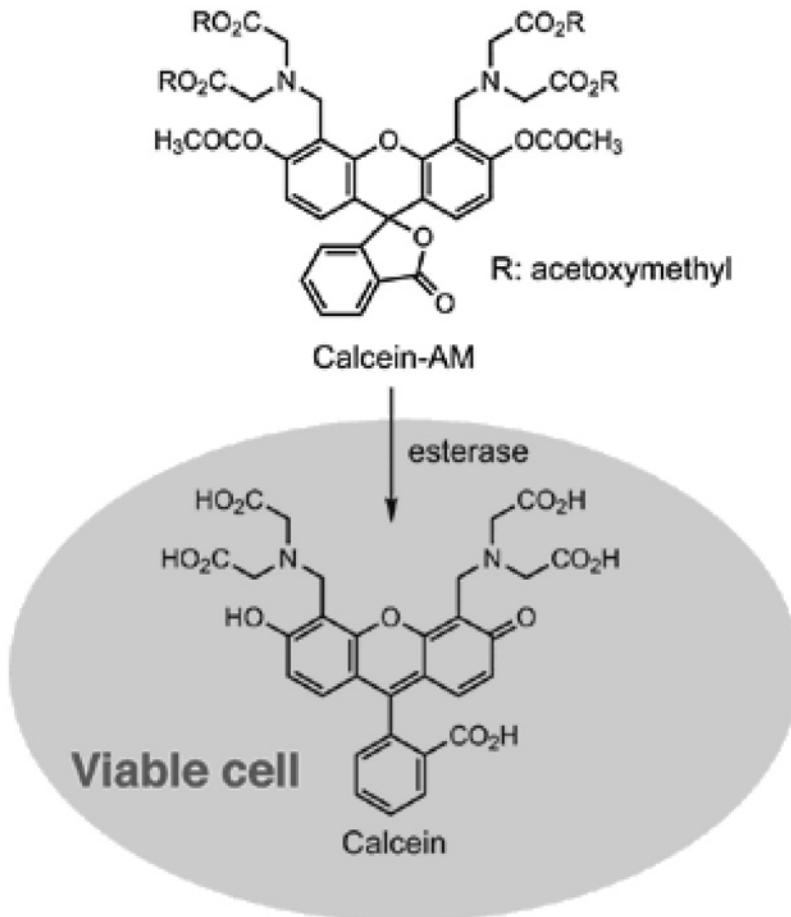
Ⅲ. 結果と考察

Calcein-AMは脂溶性を高め細胞膜透過しやすいものである。自体蛍光を示さないが、生細胞の細胞内に浸透したと、各種エステラーゼにより加水分解され強い黄緑色蛍光を示す(図1)。また、PIは核酸染料であり、死細胞内に入り込み、DNAの二重らせん構造にintercalateして強い赤

色蛍光を示す³⁾。本研究はその二つ染料を用いて、細胞の生/死細胞割合を検討した。

図2の生細胞割合結果によると、中性 (pH 7.2) と比較して強酸性 (pH 2.0)、弱酸性 (pH 4.0)、弱アルカリ性 (pH 10.0) は有意に低くなった。また、中性 (pH 7.2) と比較して微酸性 (6.0) と微アルカリ性 (8.0) 有意な減少は見られなかった。ただし、強アルカリ性 (pH 12.0) の場合、細胞は溶けしまったので、測定不能となった。

図3の死細胞割合結果によると、中性 (pH 7.2) と比較して強酸性 (pH 2.0)、弱酸性 (pH 4.0)、弱アルカリ性 (pH 10.0) は有意に高くなった。



出典：同仁化学、Cell Counting Kit-F取扱説明書

図1. Calcein-AM染色の原理

生細胞割合の変化

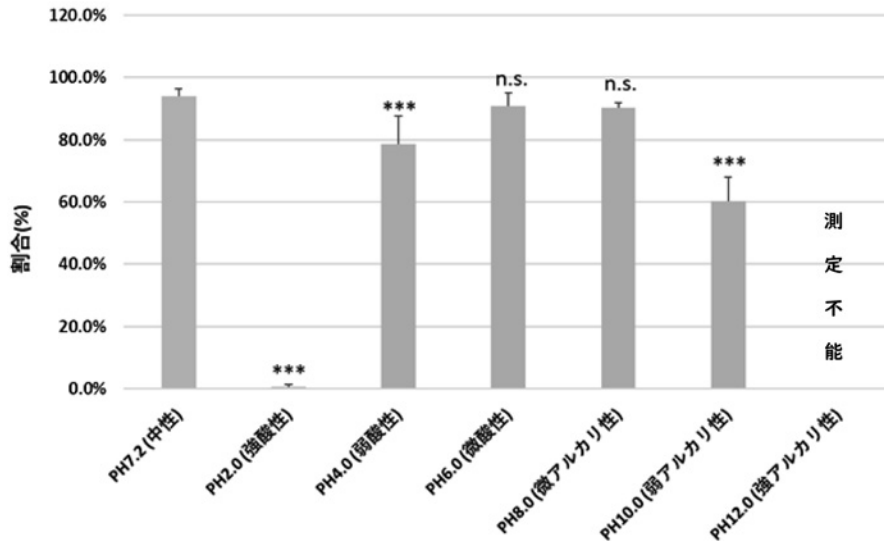


図2. 生細胞割合の結果

死細胞割合の変化

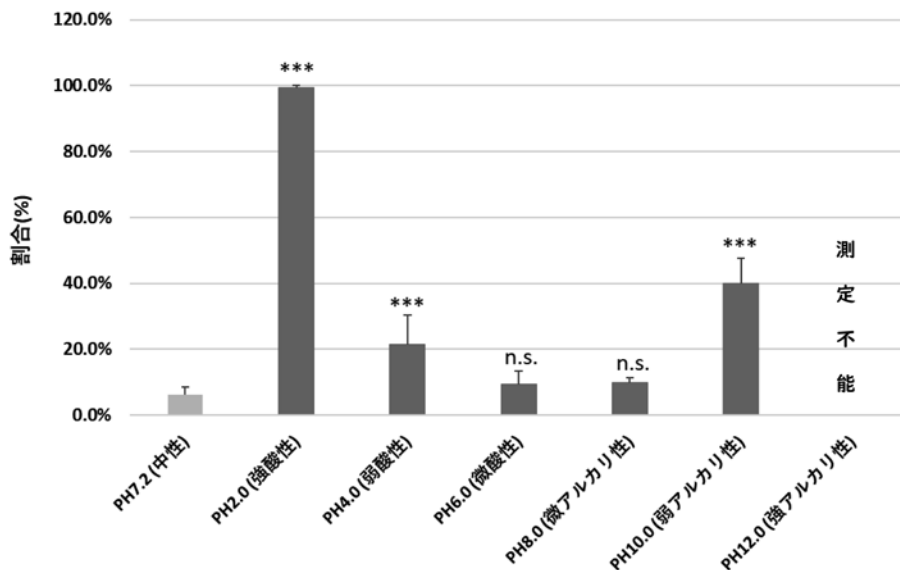


図3. 死細胞割合の結果

また、中性 (pH 7.2) と比較して微酸性 (6.0) と微アルカリ性 (8.0) 有意な増加は見られなかつ

た。ただし、強アルカリ性 (pH 12.0) の場合、細胞は溶けしまったので、測定不能となった。

参考資料

1. Jensen, William B. (2004). "The Symbol for pH".
Journal of Chemical Education. 81 (1) : 21.
2. 消費者庁 (2018). 食品添加物公定書 (第9版). 厚生労働省.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuten/kouteisho9e.html, (参照 2022-12-19).
3. - Cellstain - Double Staining Kit取扱説明書 (2013). 同仁化学.
<https://www.dojindo.co.jp/manual/CS01.pdf> (参照 2022-12-19).