

[L-6-A]

哺乳類培養細胞の超微構造と機能に及ぼす無重力の影響に関する研究

代表研究者： 佐藤 温重 (東京医科歯科大学歯学部)
協同研究者： 桑井 康宏 (東京医科歯科大学歯学部)
本郷 敏雄 (東京医科歯科大学歯学部)
佐藤 和子 (東京医科歯科大学歯学部)
浜崎 辰夫 (東京医科歯科大学歯学部)
中島 亨 (東京医科歯科大学歯学部)
増田 一郎 (東京医科歯科大学歯学部)
大村 武雄 (東京医科歯科大学歯学部)
海保 正義 (山之内製薬安全性研究所)
佐藤 哲二 (東京医科歯科大学医学部)
和氣健二郎 (東京医科歯科大学医学部)

要旨

微小重力は個体レベルでは骨・筋肉その他臓器に影響するが、細胞に対して直接的作用を及ぼすかどうか不明である。そこで培養細胞を用い、トリプシン処理により解離された細胞内骨格の再配列過程を観察することによって、細胞内骨格に及ぼす微小重力の直接作用を明らかにするとともに、細胞の形態、増殖、ウロキナーゼ産生、ブドウ糖消費に及ぼす微小重力の影響についても検索することを目的として実験を行った。この研究は、個体レベルで生ずる微小重力の影響のメカニズムを解明する上で重要であるばかりでなく、宇宙実験室における生物科学の基本技術の1つである細胞培養技法を確立する上で大きな意義を有する。

飛行実験には、4個の培養容器で培養したサル腎由来培養細胞 JTC-12 が使用された。搭乗科学者は予定のスケジュール通りに実験を実施した。培養容器1及び2の細胞について、位相差顕微鏡観察と写真撮影及びトリプシン処理と細胞固定を行い、冷蔵保存した。培養容器3の細胞については顕微鏡写真を撮影した。培養容器4の細胞については無血清培地に変換し、1日培養したのち、培地を採取し、冷蔵保存した。飛行延長にともない、顕微鏡写真撮影が1回追加実施された。

軌道上撮影した顕微鏡写真観察から培養初期においては培養細胞の形態、増殖は地上対照群と差がないことが明らかとなった。しかし生きたまま帰還した細胞では細胞周期のS期頻度の減少とG₂+M期頻度の増加が認められた。トリプシン処理により浮遊した細胞の基材への再付着は飛行群では地上対照群に比して少なかった。固定し帰還した細胞についての透過型及び走査型電子顕微鏡観察から、トリプシン処理後の飛行群細胞は基材上でわずかに伸展するにすぎなかった。また、細胞辺縁におけるマイクロフィラメントの束状の再配列はわずかであり、地上対照群と著し

く異なっていた。また、採取した培地中のブドウ糖量及びウロキナーゼ量はいずれも地上対照群と差が認められなかった。

本研究の結果は、8日間の飛行では哺乳動物細胞の形態、増殖、生理活性物質の産生には宇宙実験室環境はほとんど影響しないが、トリプシンを用いた継代操作においては微小重力のもとでは沈降がない、あるいは膜機能の変化のため、浮遊した細胞の基材への付着が遅延し、細胞の継代が困難であることが示唆された。宇宙実験室における細胞培養技術の確立のための基礎的技術に関して情報が得られた。

序論

微小重力は個体レベルでは骨・筋肉その他臓器に影響を及ぼすと考えられているが、細胞に対する直接的な作用については不明な点が多い。これまで、微小重力の直接作用を調べるため、培養細胞を用いた宇宙飛行実験が多数行われてきた(1-5)。Montgomeryら(2)は59日間飛行でヒト胎児肺細胞WI-38の細胞増殖、細胞形態は地上対照と差がないが、ブドウ糖の消費量が減少すると報告している。しかし、Zhukov-Verezhnikovら(3)はHeLa細胞の増殖が宇宙飛行により増加すると報告し、微小重力の細胞に対する作用については一定の結論に達していない。

哺乳類培養細胞の細胞質内には細胞骨格(微小管、インターメディアエイトフィラメント及びマイクロフィラメント)が存在し、細胞の形状、細胞質の流動、収縮、細胞運動などに関与し、また、細胞の微小重力などの機械的刺激応答においても重要な役割を果たしていると推定されている。

Kaiho and Sato(6, 7)は単層培養したJTC-12腎細胞がトリプシン処理により単離したとき、細胞の形は球状となり、マイクロフィラメント束は分散するが、細胞が再び基材に付着し伸展するとマイクロフィラメントは再配列し、束状構造を示すことを明らかにしている。

一方、細胞培養は細胞生物学の基本技術の1つであり、宇宙実験室における細胞培養技法の確立は重要である。特に機能を有する細胞を用い、機能に及ぼす微小重力の直接作用を明らかにすることは個体レベルで生ずる微小重力の影響のメカニズムを解明する上で重要である。また、細胞の生理活性物質の産生におよぼす微小重力の影響の解明は宇宙環境のバイオテクノロジーへの応用の可能性を知る上でも重要である。

本研究はトリプシン処理により解離された細胞内骨格の再配列過程を電子顕微鏡で観察することによって、細胞内骨格に及ぼす微小重力の直接作用を明らかにするとともに、その他細胞の動態、ウロキナーゼ産生、糖消費についても検索し、さらに生命科学の分野において基本的な実験手法である細胞培養法の宇宙での確立をめざして行われた。

実験試料及び方法

培養キット

我々が開発した細胞培養容器(8)他が使用された。培養容器は伸縮性構造で部分的

に通気性材料からつくられている。また、メンブランフィルターで上室と下室に分割され、下室に細胞を培養する（図 1 a）。下室の基材面は細胞の接着を容易にするため、あらかじめフィブロネクチンをコーティングしてある。メンブランフィルターは遊離細胞の流出を防ぐためのものである。下室には培地注入口、上室には培地排出口が各 2 個ある。金属フレーム裏面の溝には保湿のため保湿剤（SUMIKAGEL、住友化学）が充填されている。

培養液容器、緩衝液容器および廃液容器はシリンジ型で先端は培養容器の注入口及び排出口に適合した構造で注入口または排出口にさしこみシステムで溶液を注入、或いは廃液を排出する（図 1 b）。培養液容器は 24 ml の容量を持ち、培養液 [DMEM/F12 (1:1) 培地 (Gibco)、10% 胎児血清 (Flow Laboratories)、10 mM HEPES (Gibco)、0.0825% NaHCO₃] が培養容器に約 22 ml 充填された。緩衝液容器にはリン酸緩衝 Ca²⁺、Mg²⁺ 不含塩類溶液 (PBS, Sigma) が 24 ml 充填された。

トリプシン容器は（図 1 c）二重の袋が注入器に取り付けられた構造で、内袋にトリプシン結晶（持田製薬製）を真空封入し、外袋には 10 ml リン酸緩衝 Ca²⁺、Mg²⁺ 不含塩類溶液を入れる。内袋と外袋の境界は弱くシールされており、外袋のフィンを引くことによって内袋と外袋は一体となり、10 ml トリプシン溶液（500 IU/ml）が使用時に作成される。トリプシン溶液は、容器カバーを反転することによって加圧・注入される。

グルタルアルデヒド容器（図 1 d）は二重容器で内容器に 2.5% のグルタルアルデヒド（Sigma）が封入されている。グルタルアルデヒド容器は培地容器と同様に培養容器の注入口に取り付け、ステムを用いてグルタルアルデヒドを注入する。

細胞培養

サル腎由来 JTC-12 細胞 (9) が用いられた。KSC の Hanger L 実験室で凍結細胞を解凍して、上述した培養液に浮遊させ、フラスコ中に播種した後、37°C のインキュベーター中で前培養した。飛行 3 日前に細胞を 0.05% トリプシン / 0.53 mM EDTA Na 処理で単離し、フィブロネクチンをコーティングした培養容器に播種した。培養容器 ACC1, ACC2 および ACC3 には 5×10^4 個/容器、ACC4 には 1×10^5 個/容器の細胞を播種し、ソフトケースに入れ、37°C で 2 日培養したのち良好に増殖している容器を選び、4 個を飛行群、他の 4 個を地上対照群とした。実験のプロトコールの詳細は文献 (10) に示すごとくであり、MET 0 日に activate した。ACC1 と ACC2 の細胞は MET 2 日に位相差顕微鏡で観察後、使用直前に調製した 10 ml トリプシン溶液（500 IU/ml）による処理により単離してのちトリプシン溶液を除去し、培養液を注入し再培養した。ACC1 は 2 時間後、ACC2 は 24 時間後に細胞を 24 ml の緩衝液で洗ってから 2.5% グルタルアルデヒドで固定した。固定した細胞は、冷蔵庫に保存した。ACC4 は MET 2 日に培養液を無血清培養液に交換して 24 時間培養後に培養液を採取した。採取した培養液は冷蔵保存した。ACC3 はそのまま培養を続け、帰還した。地上対照群の ACC1 ~ 4 容器の細胞は飛行群より 2 時間遅れで実験を開始し、飛行群と同様の観察と処理を行った。

位相差顕微鏡観察

MET 2, 3 及び 5 日に、搭乗科学者が位相差顕微鏡観察を行い顕微鏡写真 (Kodak T-MAX) 撮影を行った。帰還後、顕微鏡写真について細胞形態、細胞分裂指数 (Mitotic Index) について解析した。

透過型および走査型電子顕微鏡観察

地上に帰還した飛行群 ACC1 と ACC2 及び地上対照群の同容器の固定細胞は冷蔵して日本に送り 1% の 4 酸化オスミウムで後固定したのち、常法に従いアルコールシリーズで脱水し、一部はエポキシ樹脂中に包埋し、超薄切片を作成し透過型電子顕微鏡 (日本電子 JEOL 100CX) で観察した。他の一部は臨界点乾燥後プラチナを蒸着し、走査電子顕微鏡 (日立 S-2400 及び S-700) で観察した。

ウロキナーゼ活性およびグルコース量の定量

地上対照及び飛行群の ACC4 から採取した培養液は KSC で凍結後に日本に送り、本研究室で培養液中のウロキナーゼを Fibrin Plate 法 (11) で計測した。また、培養液中のグルコース量をグルコースオキシダーゼ法 (GOD) によって定量した。

細胞周期の解析

未固定で帰還した ACC3 細胞及び地上対照群の ACC3 細胞は帰還後 24 時間培養し、その後、常法で凍結保存し日本に送付した。これらの細胞を当研究室で解凍後 CycleTEST (Becton Dickinson 社製) を用いてプロピジウムヨードイトで DNA を染色し、核 DNA の相対量をフローサイトメーター (Becton Dickinson 社製) で計測し、その細胞周期頻度を CellFIT (Becton Dickinson 社製) を用いて解析した。

実験結果

全体進行

搭乗科学者は培養細胞の顕微鏡観察および写真撮影、培地交換、トリプシン溶液の調製と同処理、細胞固定を予定のスケジュール通りに実験を実施した。飛行延長にともない、顕微鏡写真撮影が 1 回追加実施された。搭載した培養液容器用のステムが正規のステムでなかったため、軌道上での細胞固定、培地採取が不完全となった。

生時の細胞形態及び分裂指数

軌道上で MET 2 日、MET 3 日及び MET 5 日に撮影した顕微鏡写真の分析から飛行群の細胞は、紡錘形及び多角形の形態を示し、地上対照群と変わらない形態を示した (図 2)。MET 2 日における細胞分裂指数は、飛行実験群が 3.1%、また地上対照群は 3.4% であり若干飛行群で低い値を示したが、両者の間に有意な差は認められなかった (図 3)。MET 7 日については地上対照群の細胞は重層していたが、飛行群では重層を示す部分が少なかった。

基材への細胞の再付着及び伸展

軌道上 MET 2 日にトリプシン処理により浮遊した細胞の再培養後の培養容器基材への再付着は、飛行群では地上対照群に比してかなり少ないことがわかった (図 4、表 1)。トリプシンによって単離された直後の細胞は、球形をして培養液中に浮かんでいた (図 4 a, d) が、再培養 2 時間後には地上対照群では基材上に再付着し伸展し始め (図 4 e)、24 時間後には、殆どの細胞が伸展していた (図 4 f)。一方、飛行群の細胞は 24 時間経過した後においても浮遊のままか、あるいは基材に付着しても球形のままか、わずかに伸展した細胞が多く認められた (図 4 c)。

走査顕微鏡による観察

トリプシン処理により単離したのち再培養し、グルタルアルデヒド固定して帰還した細胞についての走査型電子顕微鏡観察から、再培養 2 時間後の飛行群細胞は基材上でわずかに伸展するにすぎず (図 5 a)、24 時間経過した後でも地上対照群 (図 5 c, d) のように基材上に伸展しているものは認められなかった (図 5 b)。また飛行群の細胞では微絨毛が十分に観察されなかった。一部に培地中の血清蛋白の残存を示す像が認められた。

透過型電子顕微鏡による観察

トリプシン処理により単離し再培養した飛行群の細胞は、基材に付着しているものが少なく超微構造の観察が困難であった。観察できた少数の再培養 2 時間後の細胞では、細胞膜が異常像を示した。また細胞質に多数の空胞が存在した。核、ミトコンドリアは正常であった。地上対照群では、再培養 2 時間後の細胞の細胞辺縁にマイクロフィラメントの束状の再配列が認められたが、飛行実験群ではこのマイクロフィラメントの再配列が殆ど認められなかった (図 6)。

細胞周期の分析

未固定で帰還し凍結保存した細胞を解凍しフローサイトメトリーで核 DNA の相対量を計測し、核 DNA の相対量に対する細胞の出現頻度 (DNA ヒストグラム) を求めた (図 7)。飛行群の細胞では S 期及び G₂+M 期の頻度がそれぞれ 16.2% 及び 18.5% であった。一方、地上対照群のそれらは、21.0% 及び 11.5% であり (表 2) 若干違いが認められた。

培地の生化学的分析

細胞を MET 2 日から 24 時間培養したのち採取した無血清培地中のウロキナーゼ量及びブドウ糖量を測定した (表 3)。ウロキナーゼ活性は飛行実験群では 0.038 IU/ml、また地上対照群では 0.047 IU/ml であった。飛行実験群、地上対照群の両者ともに測定限界に近い値であった。また培地中のブドウ糖量は、飛行群が 2.57 mg/ml、地上対照群は 2.61 mg/ml であり両者の間に差を認めなかった (表 3)。

考察

これまで多くの宇宙実験に培養細胞が搭載されてきたが、本研究のように生時の細胞の形態が経時的に搭乗科学者により観察され、また鮮明な位相差顕微鏡写真が撮影された例は少ない。飛行群の JTC-12 細胞の形態と増殖は培養 3 日迄は地上対照群と差が認められなかった。これに対し、培養 7 日では地上対照群の細胞は重層していたが、飛行群では重層を示す部分が少なかった。このことは微小重力は細胞の増殖に影響する可能性を示している。8 日間の宇宙飛行後、生きたまま帰還した細胞を地上で後培養後分散し、凍結して日本に送付して細胞周期の各期の出現頻度を測定した結果、宇宙飛行群の細胞で S 期出現頻度の減少、G₂+M 期頻度の増加が認められたことから 8 日間宇宙飛行は、細胞周期の回転に影響しているものと考えられる。

細胞内骨格は細胞の形状、基材への接着、また細胞の運動に関与する (12)。地上においてはトリプシン処理により浮遊状態とした JTC-12 細胞ではマイクロフィラメントは解離しているが、細胞が基材に再付着し、伸展するとマイクロフィラメントの束が細胞質の辺縁に形成される。一方、宇宙飛行群の細胞では、浮遊した JTC-12 細胞の基材への付着が、遅延することが明らかにされた。このときの細胞内骨格の一つであるマイクロフィラメントの再構成は地上対照群と比較して、著しく阻害されていることがわかった。また細胞質には空胞が多数存在していた。地上において JTC-12 細胞を攪拌子を用いて浮遊培養したとき、細胞は球状のままであり、また細胞質に空胞が形成されること、マイクロフィラメントの束の再形成が認められないことが明らかにされている (13)。宇宙において単離された JTC-12 細胞は、重力に依存する沈降がないため上述の構造的変化を生じた可能性がある。しかし細胞の基材への付着は細胞の接着因子との関連がある。Spacelab D-1 の実験で、ヒトリンパ球の集塊形成の頻度が地上対照に比して少なく細胞と細胞の接着が微小重力下で抑制されることが報告されている (14)。細胞と基材の付着については STS-8 においてヒト胎児腎細胞のマイクロキャリアへの付着が検討され本研究の結果とは異なり、地上対照と同様にマイクロビーズ上に細胞が付着、伸展し増殖することが報告されている (15)。この違いは、更に詳細に研究する余地を残していると思われる。

我々は、これまでに JTC-12 細胞がウロキナーゼを 0.24 IU/mg protein/day 分泌することを報告している (13)。今回の実験では JTC-12 細胞を無血清培養液中で 24 時間培養したが、培養液中に検出されたウロキナーゼは、飛行実験群では 0.038 IU/ml、また地上対照群では 0.047 IU/ml であった。これらの値は、測定限界に近い値であることも含めて両者の間に有意な差は検出できなかった。この結果は STS-8 に搭載されたヒト腎細胞におけるウロキナーゼ産生が宇宙飛行の影響を受けなかった Cogoli らの報告と一致する (16)。これまで宇宙環境のバイオテクノロジー領域への応用という観点から培養細胞の物質産性に及ぼす微小重力の影響についての研究が行われているが一致した結果は得られていない。ヒトリンパ球のインターフェロン産生が Salyut 6 及び Spacelab 1 で研究され、いずれも飛行群で産生量が増加する事が明らかにされた (5, 17)。SL-J に搭載されたヒト抗体を産生するヒト B リンパ球ハイ

ブリドーマ JC-1 の抗体産生量が飛行細胞群で地上対照群の2倍以上多いことが明らかにされた(18)。脳下垂体細胞の成長ホルモン放出に及ぼす微小重力の影響が STS-8 で実験され、成長ホルモンの放出が微小重力下で減少することが明らかにされた(19)。生理活性物質の分泌に対する宇宙環境の影響は生体の調節機能の研究にとって重要であるばかりでなく、宇宙環境の生物学への応用にとって重要であり、今後詳細な検討が必要であろう。

本研究において宇宙における細胞培養実験のための伸縮性を持つ培養容器、トリプシン容器、培養液容器等が開発された。培養容器は、顕微鏡観察が可能であり、かつ培養液の更新なしに1週間程度の培養が可能ないように通気性膜を使用し、また無重力下での培養液更新等が可能ないように収縮構造であった。今回の宇宙実験により本容器は培養液の更新、トリプシン処理による細胞の分散が可能であることが検証された。しかし、培養液中に次第に気泡が発生することは避けられなかった。これは、恒温器の湿度が低いことが原因であると考えられた。細胞の固定操作や培養液の更新において培養液の完全な除去が容器の構造上困難であったが、とくに今回搭載したシステムは長さが不適合であったため、細胞の固定は不良となり、培養液の化学分析の妨げとなった。しかし基本的に、この形式の培養容器の有用性は確認されたものとする。

宇宙実験室における細胞培養法の応用は、今後拡大することが確実である。今回の実験で継代における単離細胞の基材への再付着が不良であることが明らかになったが、今後基材表面への再付着技術などの開発が必要である。

本研究は、培養細胞に及ぼす微小重力の影響に関する今後の研究に基礎的技術と情報を与えるものと考えている。

結論

本研究において8日間の宇宙飛行は、単層培養した培養サル腎細胞の形態・細胞増殖などに重要な影響を及ぼさないことが解明された。しかし、トリプシンによって解離された細胞は微小重力下では培地中に浮遊した状態となり、これによって細胞の基材上への付着が遅延した。本研究から、宇宙における生命科学実験の基礎的な技術である細胞培養法の確立に有意義な情報が得られた。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、たゆまぬご指導とご協力をいただいた宇宙開発事業団(NASDA)並びに米国航空宇宙局(NASA)に感謝いたします。また、宇宙用培養容器は科学技術庁 科学技術振興調整費により開発され、地上予備実験は文部省宇宙科学研究所 宇宙基地基礎実験費、培養容器のキットの設計・作成には、三菱重工(株)、エフニック(株)、大日本印刷(株)の助言を受けた。試料の電子顕微鏡観察には日立製作所(株)及び日製産業(株)のご協力をいただいた。これら各機関に感謝申し上げます。

文献

- 1) Dickson, K. Summary of biological spaceflight experiments with cell. ASGSB Bull., 4, 151-260, 1991.
- 2) Montgomery, P.O'B., Cook, J.E., Reynolds, R.C., Paul, J.S., Hayflick, L., Stock, D., Schultz, W.W., Kimzey, S., Thirolf, R.G., Rogers, T., Campbell, D., and Murrell, J. The response of single human cells to zero-gravity. In: "Biochemical Results from Skylab." (Johnson, R.S. and Dietlein, L.F., eds.) National Aeronautics and Space Administration / Washington, D.C., pp. 221-234, 1978.
- 3) Zhukov-Verezhnikov, N.N., Rybakov, N.I., Kozlov, V.A., Saksonov, P.P., Dobrov, N.N., Antipov, V.V., Podoplelov, I.I., and Parfenov, G.P. Result of microbiological and cytological investigations conducted during the flights of "Vostok" type vehicles. In: "Problemy Kosmicheskoy Biologii, vol. IV (Sisakyan, N.M., ed.). Izd-vo Akademii Nauk SSSR / Moscow, pp. 261-269.
- 4) Talás, M., Bátokai, L., Stöger, I., Nagy, K., Hiros, L., Konstantinova, I., Rykova, M., Mozgovaya, I., Guseva, O., and Kozharinov, V. Results of space experiment program "Interferon". Acta Astronautica, 11, 379-386, 1984.
- 5) Cogoli, A., Rschopp, A., and Fuchs-Bislin, P. Cell sensitivity to gravity. Science, 225, 228-230, 1984.
- 6) Kaiho, M., and Sato, A. Circular distribution of microfilaments in cells spreading *in vitro*. Exp. Cell Res., 113, 222-227, 1978.
- 7) Kaiho, M., and Sato, A. Rearrangement of tonofilament-like intermediate filaments in the spreading process of JTC-12 cells as studied by electron microscopy. Cell Struct. Funct., 3, 191-198, 1978.
- 8) Sato, A., Kumei, Y., Ozawa, K., Nakajima, T. Studies on the effects of microgravity on the ultrastructure and function of cultured mammalian cells. Report on Research on New Material Processing in a Microgravity Environment. Science and Technology Agency of Japanese Government, 1991.
- 9) Takaoka, T., Katsuta, H., Endo, M., Sato, K., and Okumura, H. Establishment of a cell strain, JTC-12, from cynomolgus monkey kidney tissue. Jpn. J. Exp. Med., 32, 351-368, 1962.
- 10) Payload Flight Data File, FMPT-LS, vol. 2 (Nominals), SL-J., 1992.
- 11) Astrip, T., and Müllertz, S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. Biophys., 40, 546, 1952.
- 12) Ben-Zéev, A. The cytoskeleton in cancer cells. Biochim. Biophys. Acta, 780, 197-212, 1985.
- 13) Sato, A., Kumei, Y., Ozawa, K., Yamamoto, I., and Nakajima, T. Space-stimulated preparatory study on the rearrangement of fiber systems and bioactivities of cultured mammalian cells. 2nd Joint Japan-Germany-ESA Symposium on Microgravity Research, pp. 579-592, 1985.
- 14) Bechler, B., Cogoli, A., and Mesland, D. Lymphozyten sind Schwerkraft empfindlich. Naturwissenschaften, 73, 400-403, 1986.
- 15) Tschopp, A., Cogoli, A., Lewis, M.L., and Morrison, D.R. Bioprocessing in space: Human cells attach to beads in microgravity. J. Biotechnol., 1, 287-293, 1984.
- 16) Cogoli, A., Bechler, B., Lorenzi, G., Gmuender, F.K., and Cogoli, M. Cell culture in space: From basic research to biotechnology. In "Biological Science in Space 1986: International Symposium on Biological Sciences in Space". (Watanabe, S., Mitarai, G., Mori, S. eds.), MYU Research / Tokyo, pp. 225-232, 1987.

- 17) Talás, M., Bátokai, L., Stöger, I., Nagy, K., Hiros, L., Konstantinova, I., and Kozharinov, V. Results of space experiment program "Interferon". II. Influence of spaceflight conditions on the activity of interferon preparations and interferon inducers ("Interferon II"). *Acta Microbiologia Hungarica*, 30, 63-67, 1983.
- 18) 菅沼俊夫、大岡久芳、福田保 ヒト抗体産生細胞の細胞増殖と抗体産生に及ぼす無重力の影響、ふわっと'92 宇宙実験成果報告会予稿集、pp. 120-133、1983
- 19) Hymer, W.C., Salada, T., Grindeland, R., and Morrison, D. A pituitary cell culture experiment in microgravity. *ASGSB Bulletin*, 2, 34, 1989.

表1. 解離したサル腎細胞 JTC-12 細胞の基材への再付着・伸展にあたる微小重力の効果
数字は細胞数/面積で示してある。

	飛行実験群	地上対照群
未伸展の細胞数	146	180
伸展した細胞数	10	59
再付着細胞数 (総数)	156	239

表 2. サル腎細胞 JTC-12 細胞の飛行実験群と地上対照群の細胞周期分析

細胞周期	飛行実験群		地上対照群	
	%	%SD	%	%SD
G ₁ :	65.4	0.04	67.5	0.05
S :	16.2		21.0	
G ₂ +M :	18.5	0.06	11.5	0.13

表 3. 無血清培地中のウロキナーゼ活性とブドウ糖含有量

	飛行実験群	地上対照群
ウロキナーゼ活性 (IU/ml)	0.038	0.047
ブドウ糖含有量 (mg/ml)	2.75	2.61

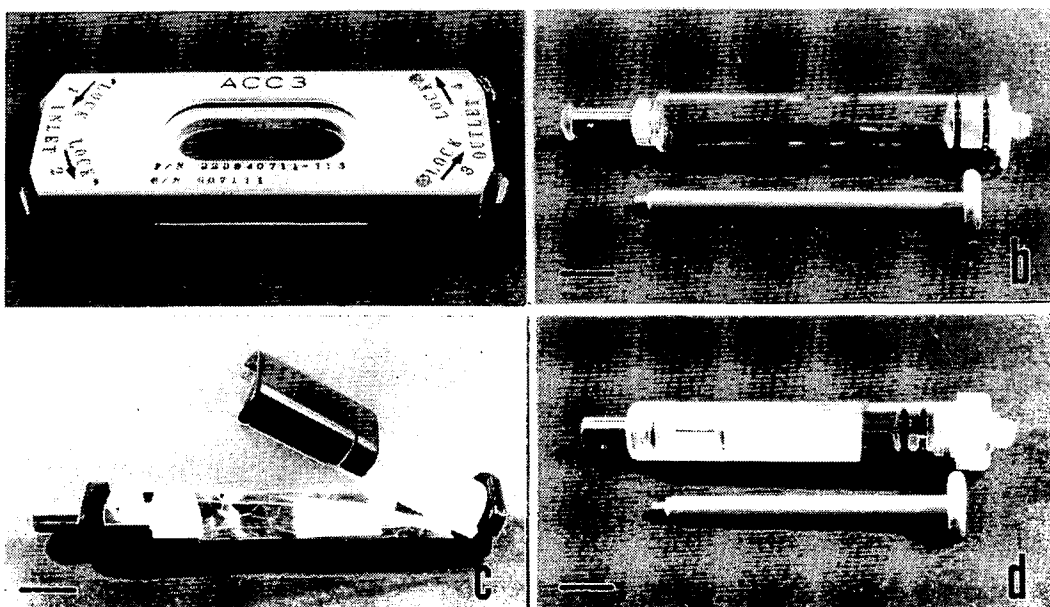


図1. 細胞培養キット

a) 培養容器、b) 培養液、緩衝液、無血清培養液及び培養液採取用容器、c) トリプシン容器、d) グルタルアルデヒド容器

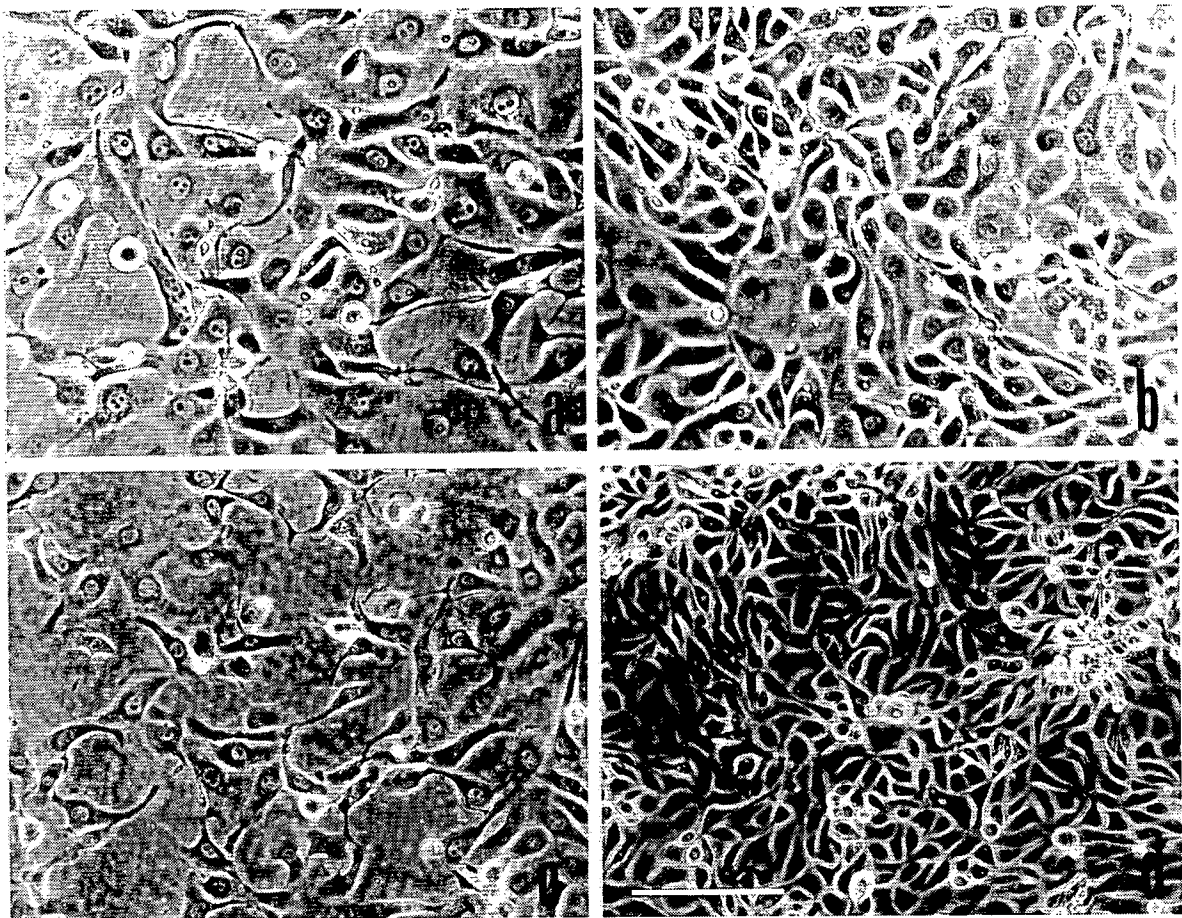


図2. スペースラブ (a,b) または地上実験室 (c,d) で培養したサル腎細胞 JTC-12 の位相差顕微鏡写真

a), c) 3日間培養 (MET 2日)、 b), d) 6日間培養 (MET 5日)、
 (スケールバー: 50 μm)

写真 a, b) は毛利 PS (NASDA) が撮影

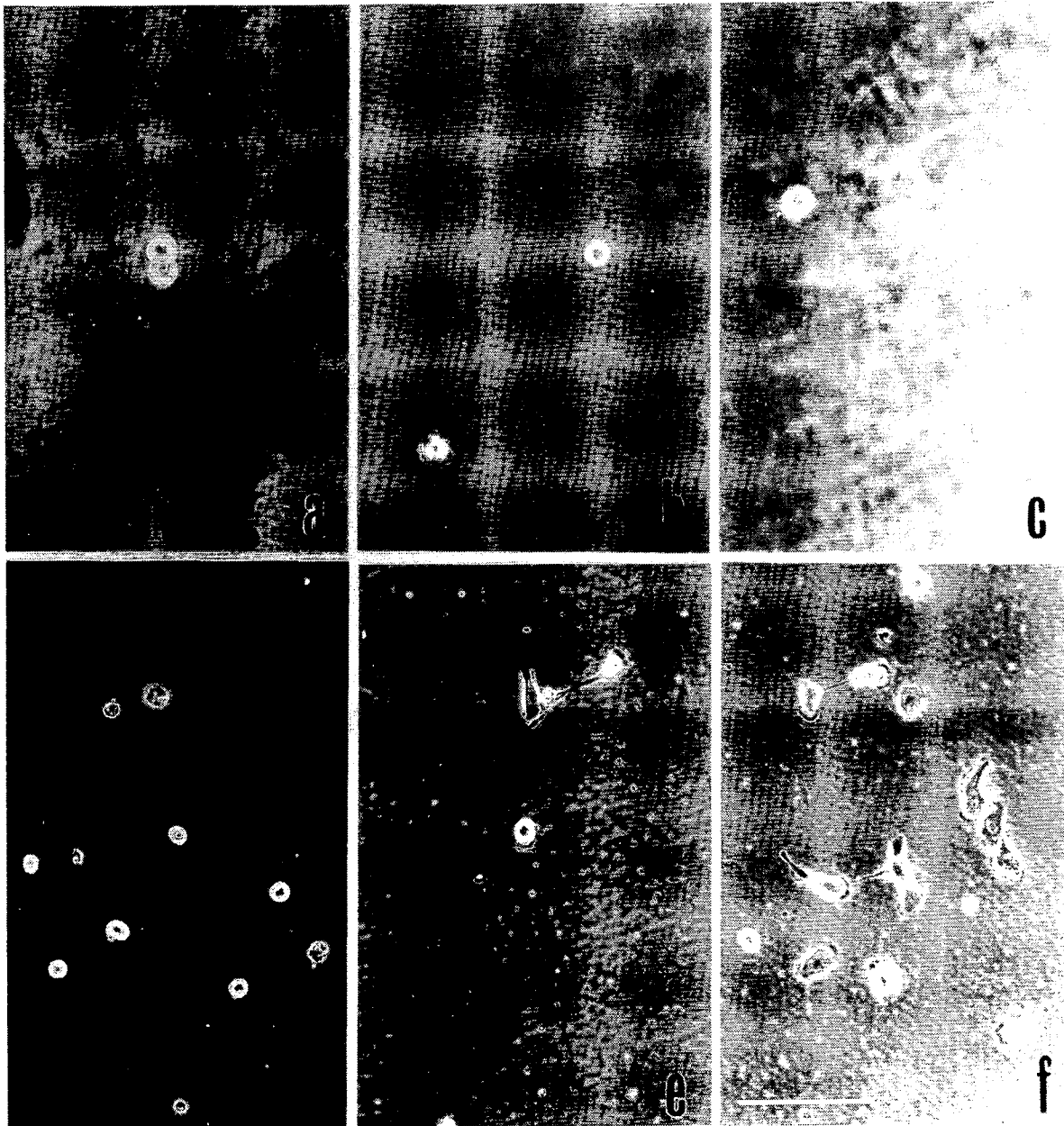


図3. トリプシン処理サル腎細胞 JTC-12 の位相差顕微鏡写真の飛行群 (a, b, c) と地上対照群 (d, e, f) a, d) トリプシン処理で単離した細胞、b, e) 単離後2時間培養した細胞、c, f) 単離後24時間培養した細胞 (スケールバー: 50 μm)

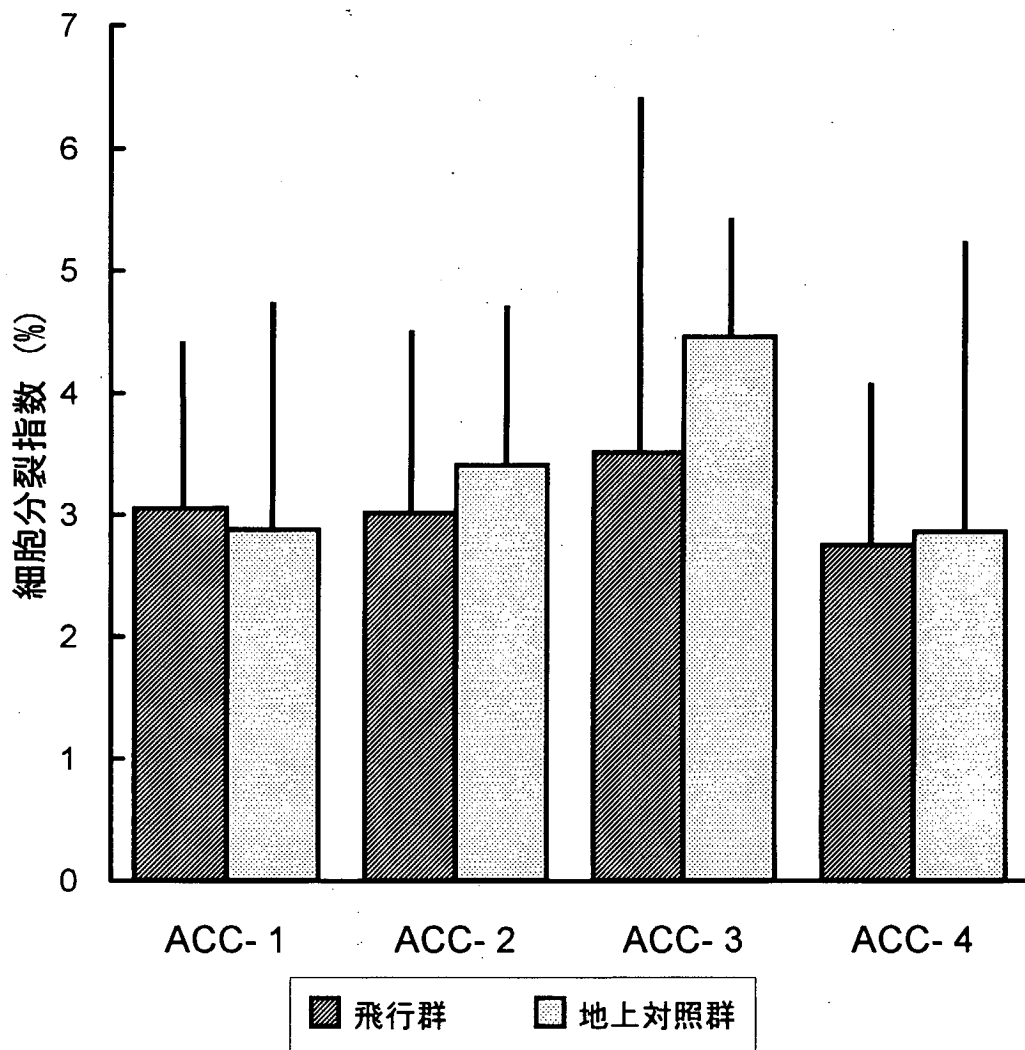


図4. 培養2日目の飛行実験群と地上対照群のサル腎細胞 JTC-12 の細胞分裂指数 (mitotic index)

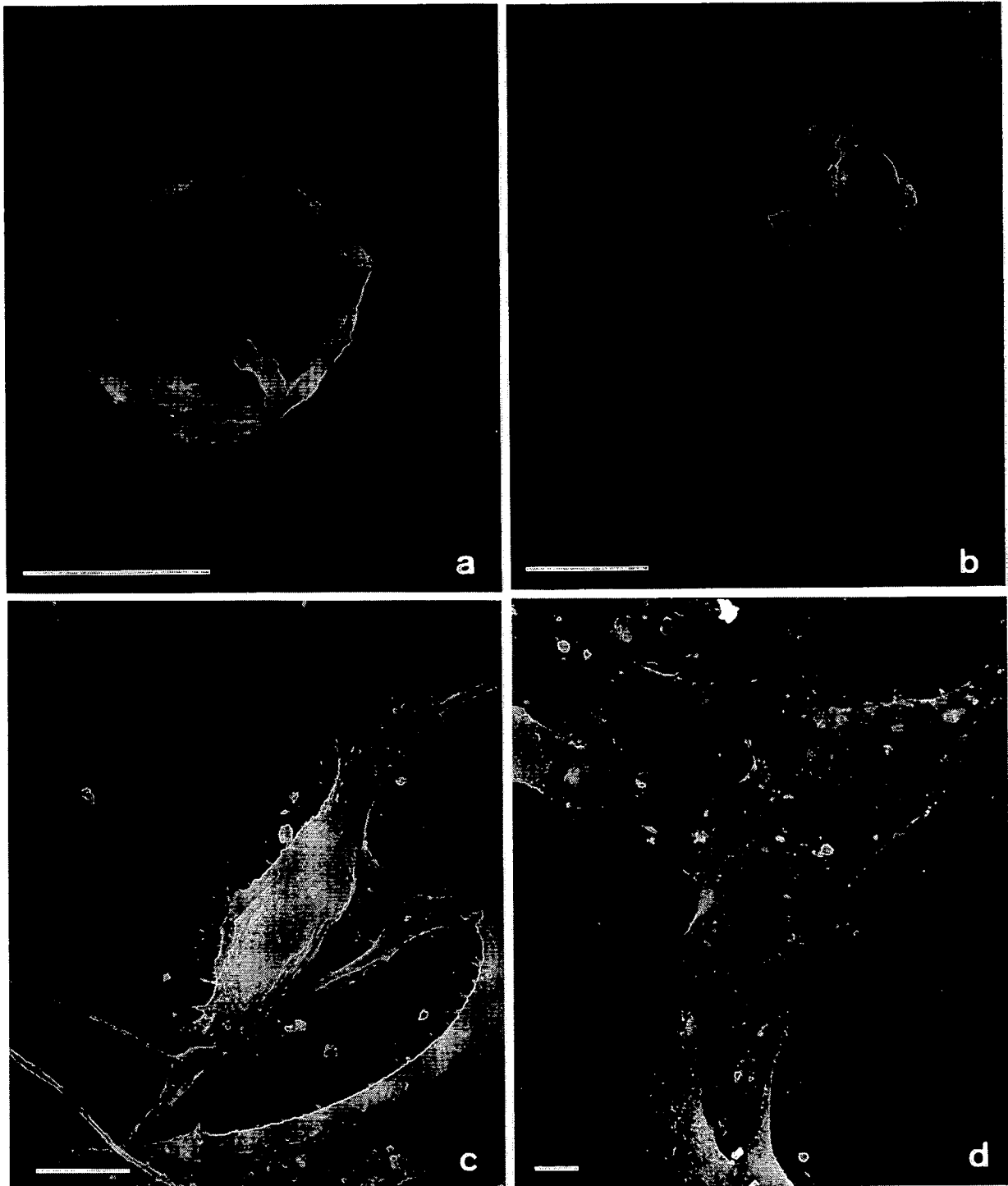


図5. 飛行実験群 (a, b) と地上対照群 (c, d) のサル腎細胞 JTC-12 の走査電子顕微鏡写真

a, c) トリプシン処理で細胞解離後2時間培養した細胞、b, d) トリプシン処理で細胞解離後24時間培養した細胞

(スケールバー：10 μm)



図6. サル腎細胞 JTC-12 の透過電子顕微鏡写真
細胞は宇宙でトリプシン処理によって解離後、2時間培養した細胞
(スケールバー：5 μm)

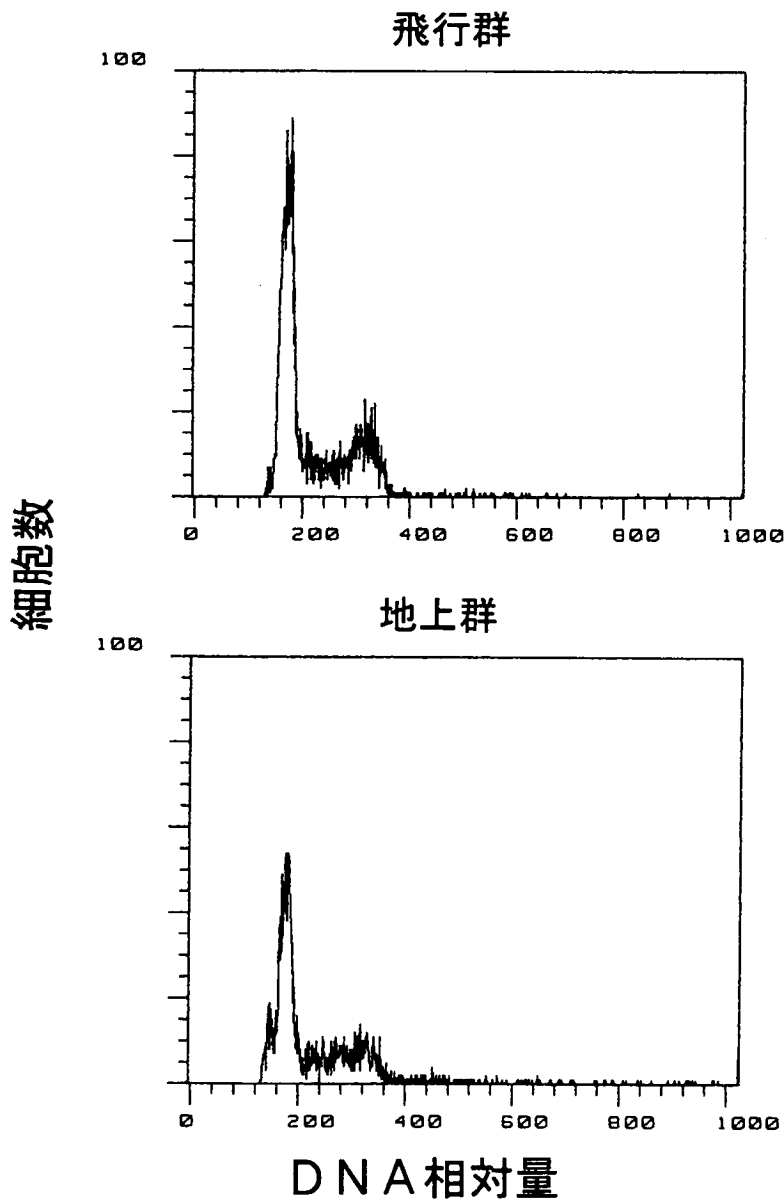


図7. 8日間宇宙で培養された後、地上に帰還したサル腎細胞 JTC-12 の細胞周期
 a) 飛行実験群と b) 地上対照群