

培養細胞への 硫酸アンモニウムばく露実験

東京都健康安全研究センター
環境衛生研究科

平成30年度実験概要

- ヒト肺上皮由来A549細胞を用いた
硫酸アンモニウムばく露実験

ばく露方法

- ・気相ばく露
- ・液相ばく露

- ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞を用いた
硫酸アンモニウムばく露(予備)実験

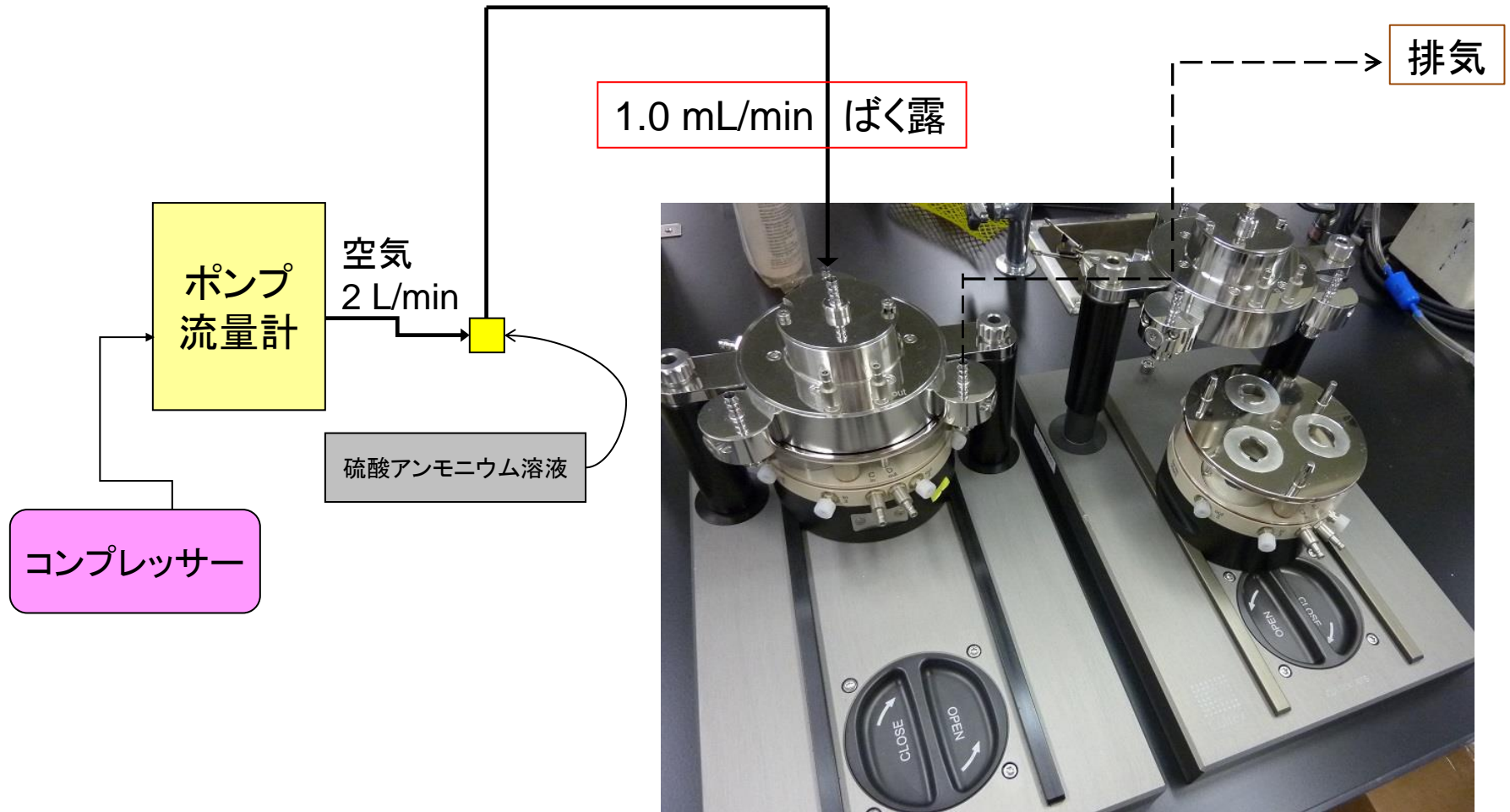
ばく露方法

- ・液相ばく露

ばく露実験の概要

実験条件-1	
ばく露方法	気相ばく露 1.0 mL/min
培養細胞	ヒト肺上皮由来A549細胞
ばく露濃度	1、10、100 mg/m ³ 、清浄空気
ばく露時間	1、2、3時間
実験条件-2	
ばく露方法	液相ばく露
培養細胞	ヒト肺上皮由来A549細胞 ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞(予備実験)
ばく露濃度	0.1、1、10 mg/mL、精製水 (ただし、Calu-3細胞を用いた細胞増殖試験は 0.01、0.1、1、5 mg/mLとした)
ばく露時間	24時間(HO-1は3時間)
測定項目	
細胞障害作用	細胞増殖、乳酸脱水素酵素(LDH)
炎症因子	IL-8、IL-6
酸化ストレスマーカー	HO-1、還元型グルタチオン(GSH)

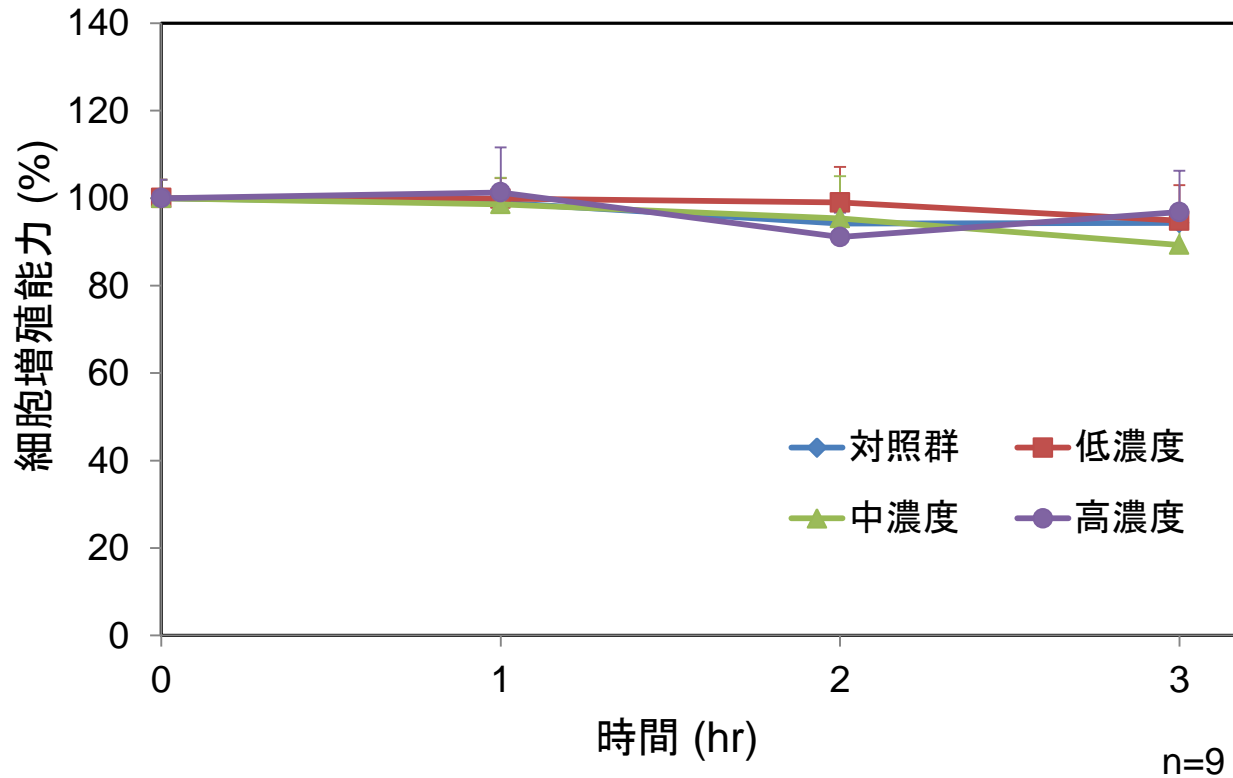
気相ばく露装置模式図



培養細胞ばく露装置 Cultex® RFS

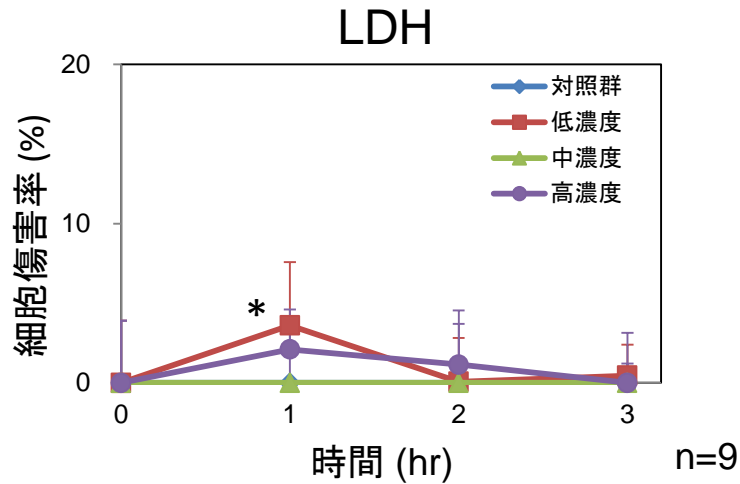
A549細胞への気相ばく露結果

細胞増殖能力

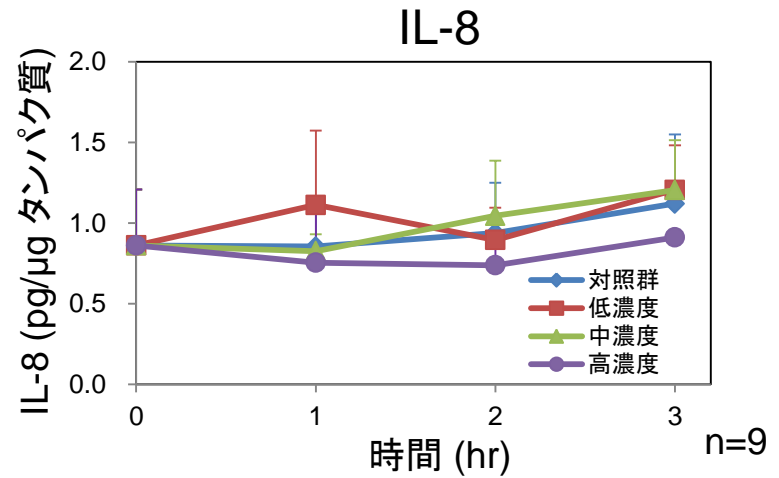


・各濃度群とも、1～3時間のばく露で、細胞増殖能力に影響は見られなかった。

A549細胞への気相ばく露結果

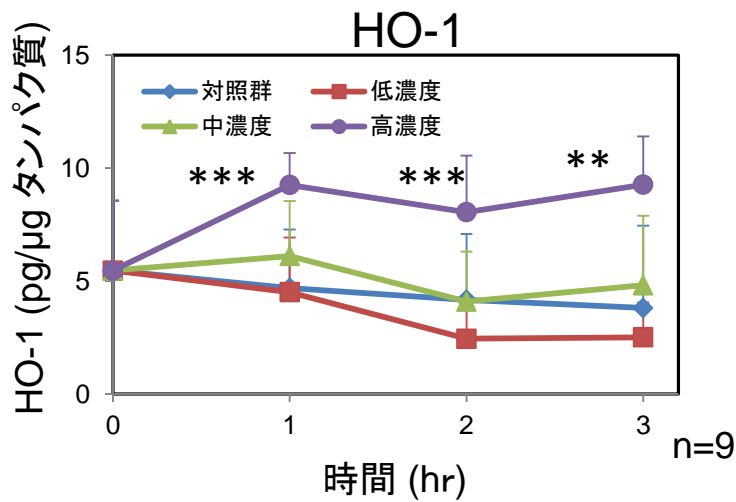


・低濃度1時間ばく露でLDHが増加した。

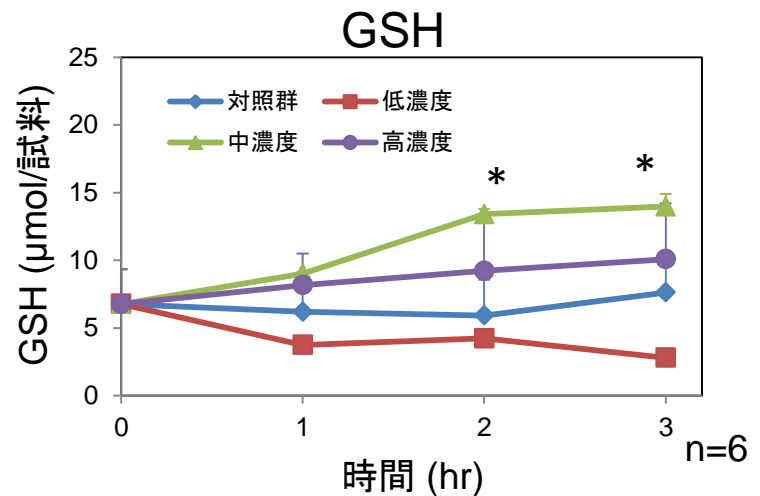


・IL-8産生に影響はなかった。

*; p<0.05
 **; p<0.01
 ***; p<0.001



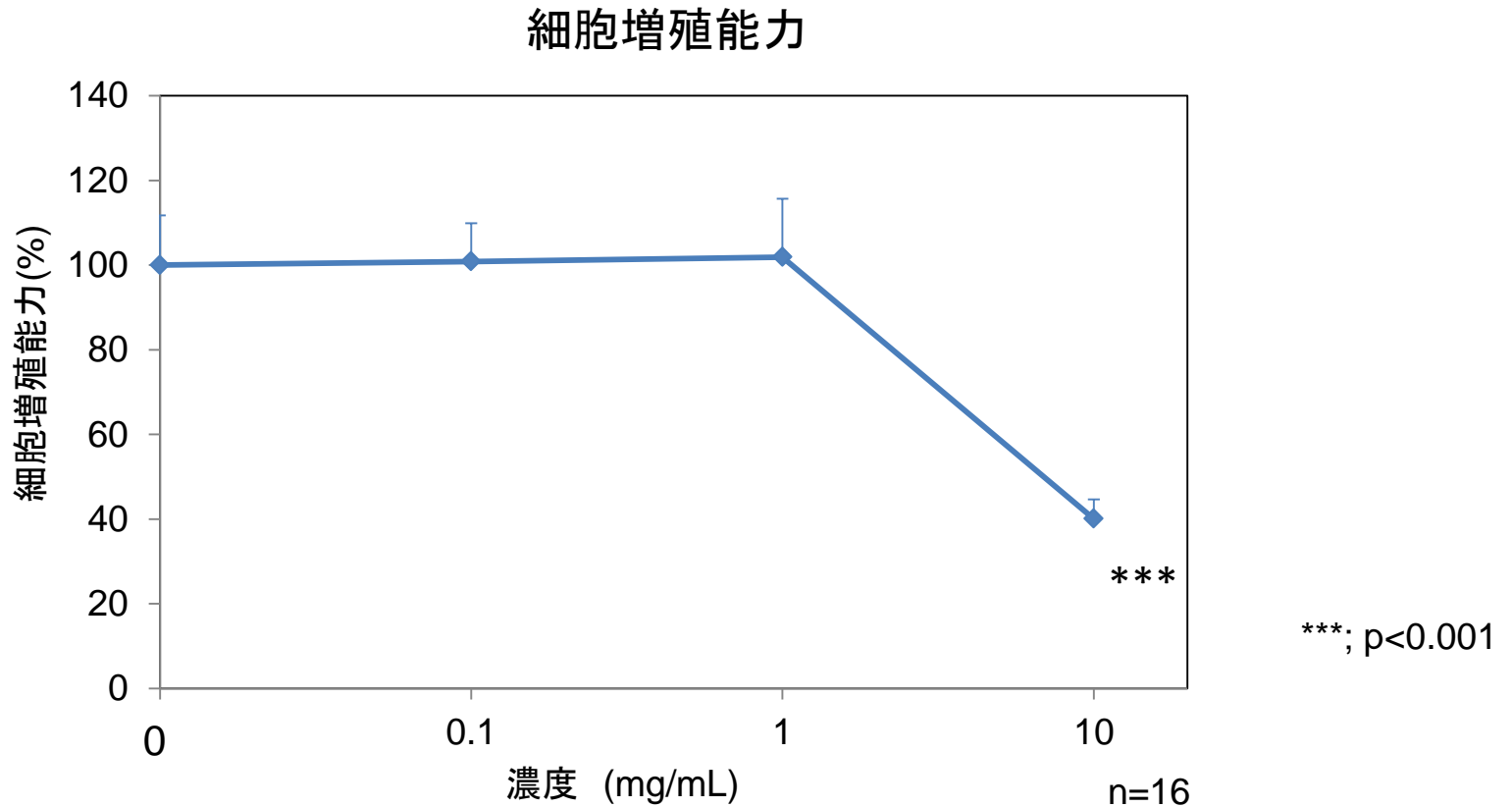
・高濃度(100 mg/m³)ばく露群でHO-1が約2倍増強した。



・中濃度 2、3時間ばく露でGSH産生が増強した。

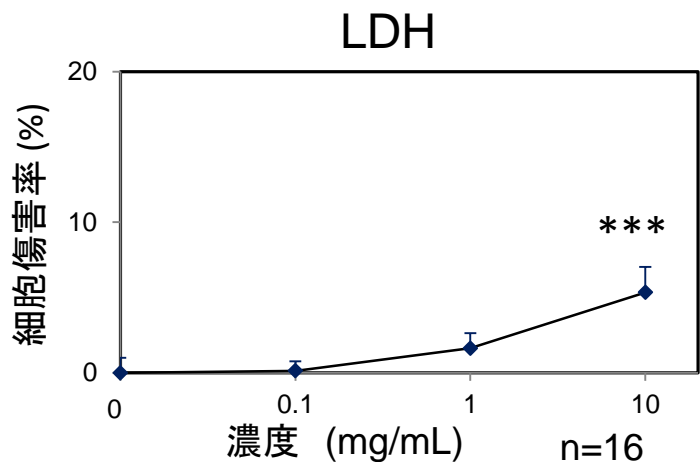
※ IL-6は、全ての実験条件で不検出であった。

A549細胞への液相ばく露結果

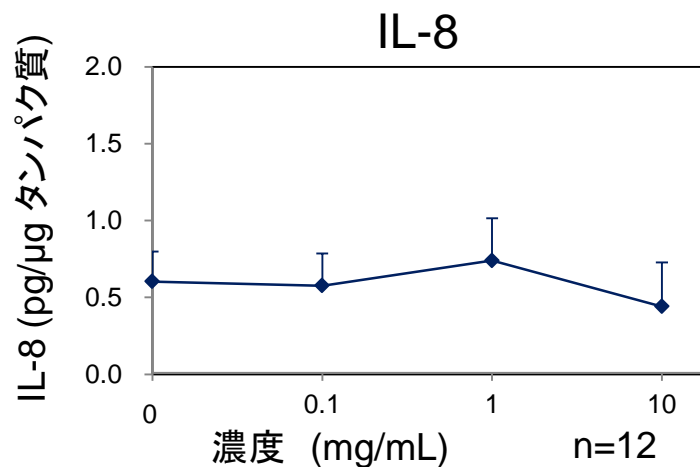


・液相ばく露では、ばく露濃度10 mg/mLで、細胞増殖を抑制し、細胞障害性を示した。

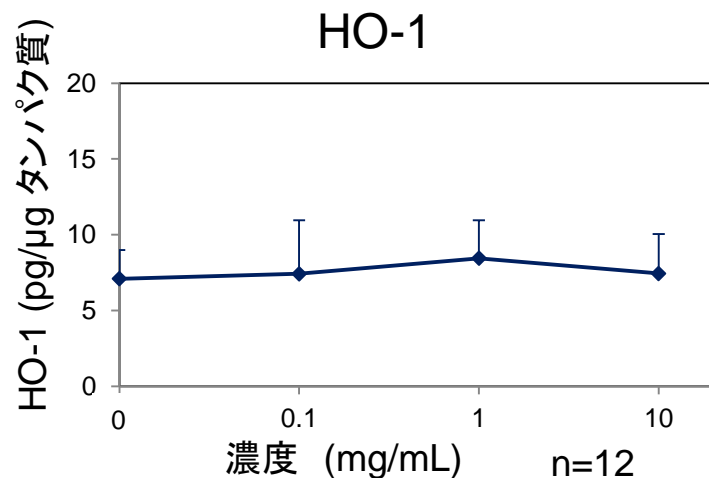
A549細胞への液相ばく露結果



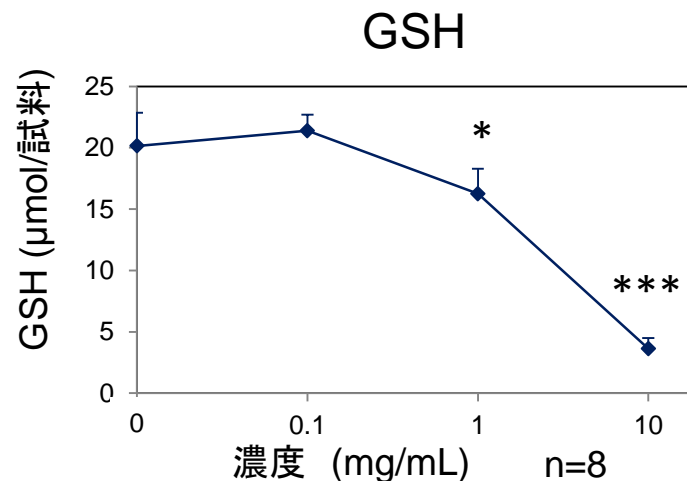
・10 mg/mLでLDHが増加した。



・IL-8産生に影響はなかった。



・HO-1産生に影響はなかった。



・1 mg/mL以上でGSHが減弱した。

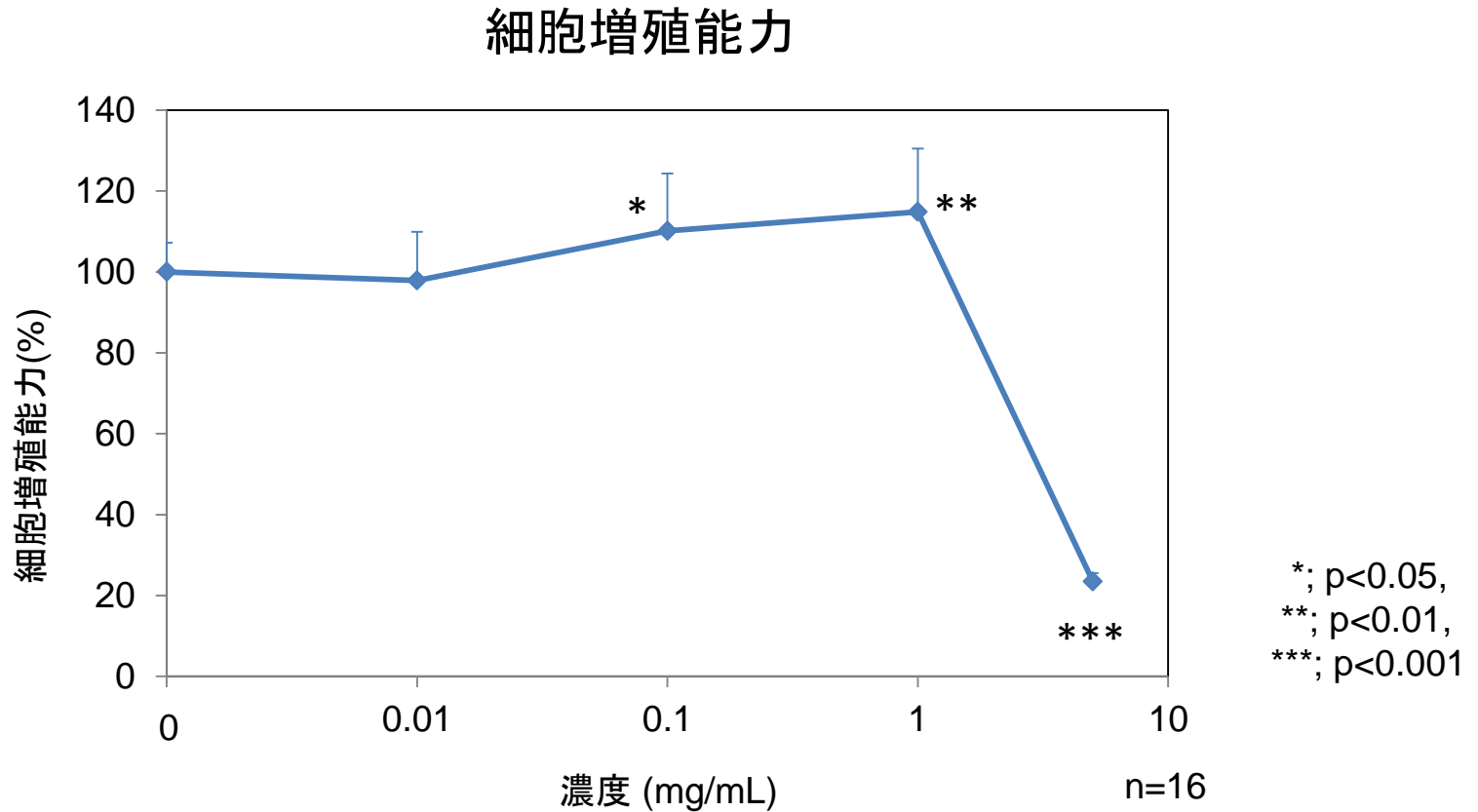
*; $p < 0.05$,
***; $p < 0.001$

※ IL-6は、全ての実験条件で不検出であった。

考 察

- A549細胞への気相ばく露では、高濃度(100 mg/m³)で、HO-1の2倍程度の増強が見られ、中濃度(10 mg/m³)で、GSHの2倍程度の増強が見られた。これらの濃度は、平成29年度に実施した大気中硫酸アンモニウム濃度調査結果(一般局2.2±1.1 µg/m³、自排局2.3±1.1 µg/m³)の5千倍又は5万倍となっており、通常的环境では見られない濃度であった。一方、気相ばく露の低濃度(1 mg/m³)は、大気濃度に比べて500倍という高濃度であったが、影響は見られなかった。したがって、大気中の濃度レベルでは影響は極めて少ないと考えられる。
- A549細胞への気相、液相ばく露では、炎症マーカー(IL-8、IL-6)に変化がなく、炎症への作用は見られなかった。今後、IL-8、IL-6以外の炎症因子についても調べ、炎症への作用を確認する必要があると考えられた。

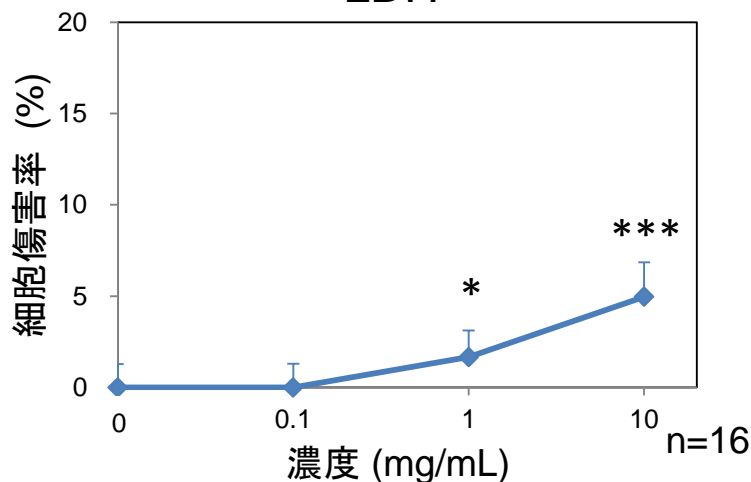
Calu-3細胞への液相ばく露(予備実験)結果



・液相ばく露では、0.1、1 mg/mLで細胞増殖能力がやや促進された。

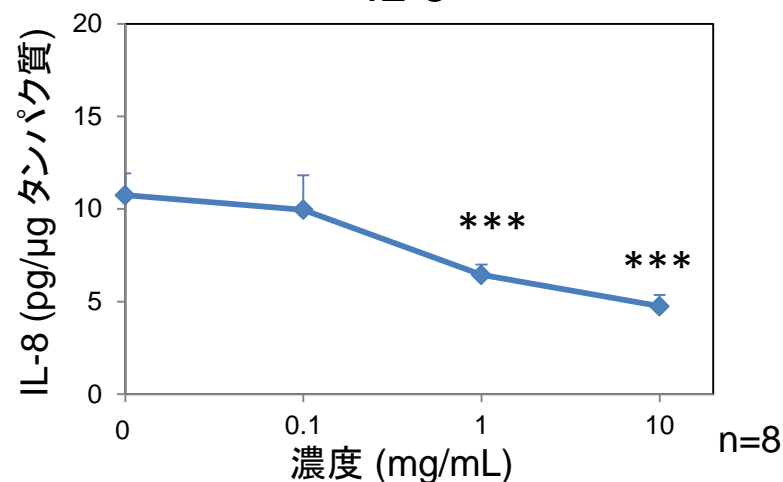
Calu-3細胞への液相ばく露(予備実験)結果

LDH



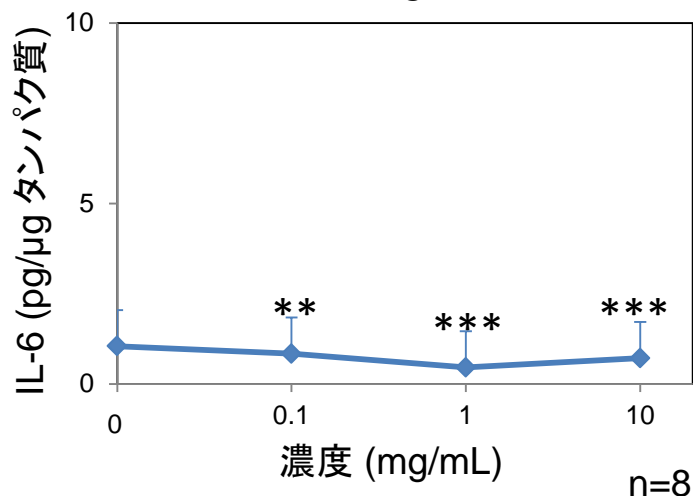
・1 mg/mL以上でLDHが増加した。

IL-8



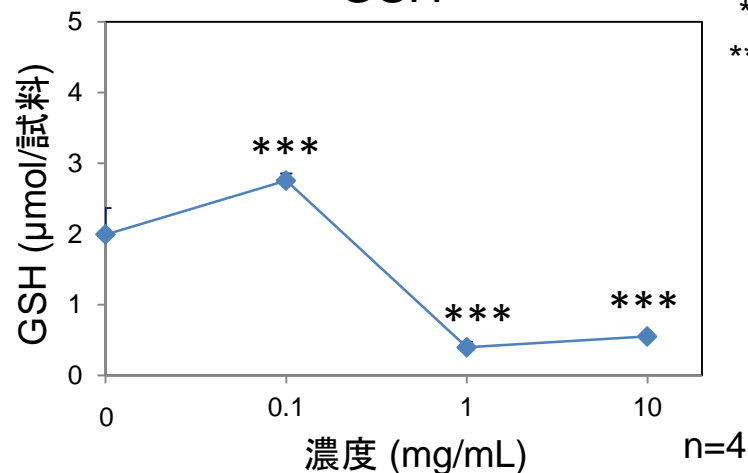
・IL-8産生は1 mg/mL以上で減弱した。

IL-6



・IL-6産生は0.1 mg/mL以上で減弱した。

GSH



・GSH産生は0.1 mg/mLで増強、1 mg/mL以上で減弱した。

*; p<0.05,
**; p<0.01,
***; p<0.001

※ HO-1は、全ての実験条件で不検出であった。

考 察

- Calu-3細胞への液相ばく露では、炎症マーカー IL-8、IL-6ともに減弱が見られた。IL-8、IL-6以外の炎症因子についても調べ、炎症への作用を確認する必要があると考えられた。
- Calu-3細胞への液相ばく露で、酸化ストレスマーカー(GSH)が0.1 mg/mLで増強したことから、より低濃度のばく露を行い、詳細に検討する必要性が認められた。
- Calu-3細胞へのばく露は予備実験の段階ではあるが、培養細胞実験では、ばく露方法、培養細胞の種類によって、硫酸アンモニウムが及ぼす影響は異なると考えられた。

課題（検討すべき事項）

● 実験精度

気相ばく露時の湿度はどの程度か

気相ばく露濃度の変動が大きい

（A549細胞気相ばく露 n=15 の濃度変動係数37～96%）

→ 気相ばく露条件（湿度、濃度の安定性）の確認実験を実施

● 気相ばく露量がトータルでどのくらいなのか

→ 気相ばく露量の推計

● 炎症作用はIL-8、IL-6以外にも検討すべき

→ 炎症関連因子の遺伝子発現（A549細胞）を調べる

● 液相ばく露実験について、0.1 mg/mL以下の濃度による影響を調べる

→ 低濃度液相ばく露（A549細胞、Calu-3細胞）により実施

令和元年度実験計画

- 1 気相ばく露条件(湿度、濃度の安定性)の確認実験
- 2 気相ばく露量の推計
- 3 炎症関連因子の遺伝子発現実験(A549細胞)
- 4 ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞を用いた硫酸アンモニウム気相ばく露実験
- 5 ヒト肺上皮由来A549細胞及びヒト気管支上皮由来Calu-3細胞を用いた硫酸アンモニウム低濃度液相ばく露実験

気相ばく露時の湿度条件

A549細胞等を用いた気相ばく露に関する文献調査

参考文献	被験物質	培養細胞	湿度(%)
Anderson <i>et al</i> , 2013	リモネン、O ₃	A549、MucilAir™	50
Elihn <i>et al</i> , 2013	銅ナノ粒子	A549	記載なし
Panas <i>et al</i> , 2014	シリカナノ粒子	A549	37.5
Mulhopt <i>et al</i> , 2016	燃焼生成エアロゾル	A549	37
Kooter <i>et al</i> , 2016	酸化セリウム粒子	A549、BEAS-2B、MucilAir™	記載なし
Zavala <i>et al</i> , 2017	精製水	BEAS-2B	18 55 >75

- ・ 記載のある論文では、湿度18 ~ >75%であった。
- ・ 湿度75%以上であれば、培養細胞への影響はなかったとの報告あり (Zavala *et al*, 2017)。

1 気相ばく露条件(湿度)の確認

★これまでの方法

対照群: 実験室内空気を使用

→ 湿度は室内と同じ。日変動が大きい。

ばく露群: 硫酸アンモニウム0.1 mL/minを乾燥空気
2 L/minで気相化 → 湿度85%

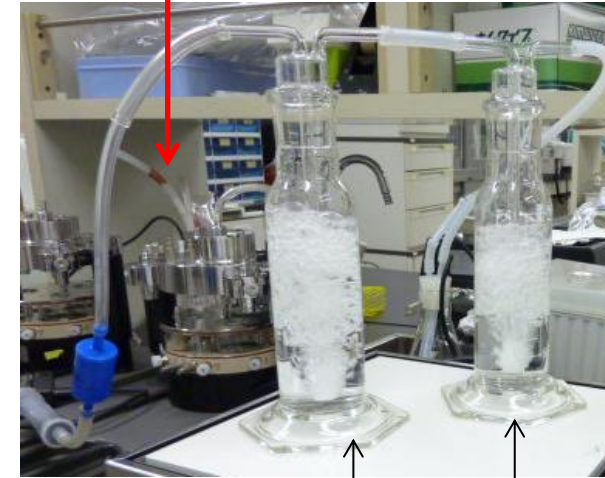
★改良法

対照群: 乾燥空気2 L/minを150 mL精製水の入った
インピンジャー2本に通過させ、加湿した。

ばく露群: 硫酸アンモニウム水溶液 0.05 mL/minを乾燥空気2 L/minで気相化した(精製水を0.05 mL/min、乾燥空気2 L/minに気相化し湿度を測定した)。

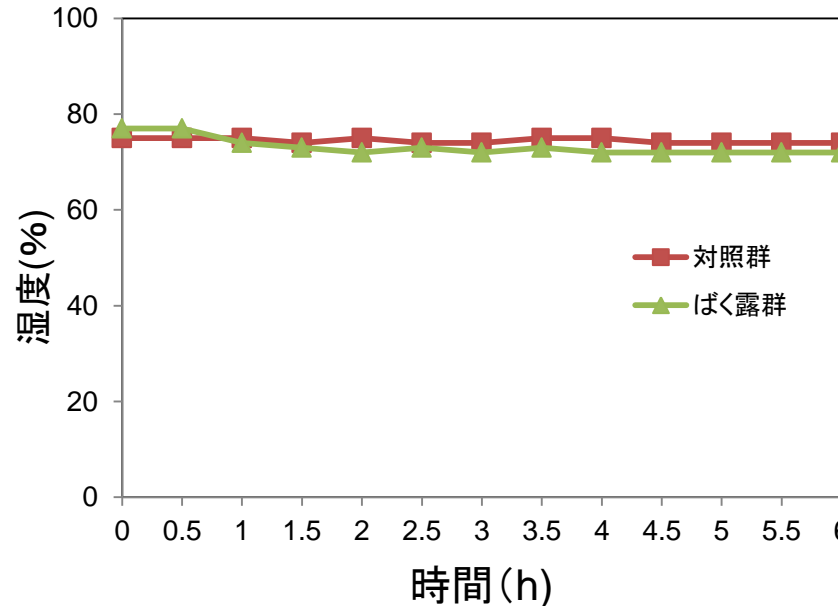
対照群とばく露群
で同じ湿度を維持

細胞ばく露装置



インピンジャー

湿度の経時変化



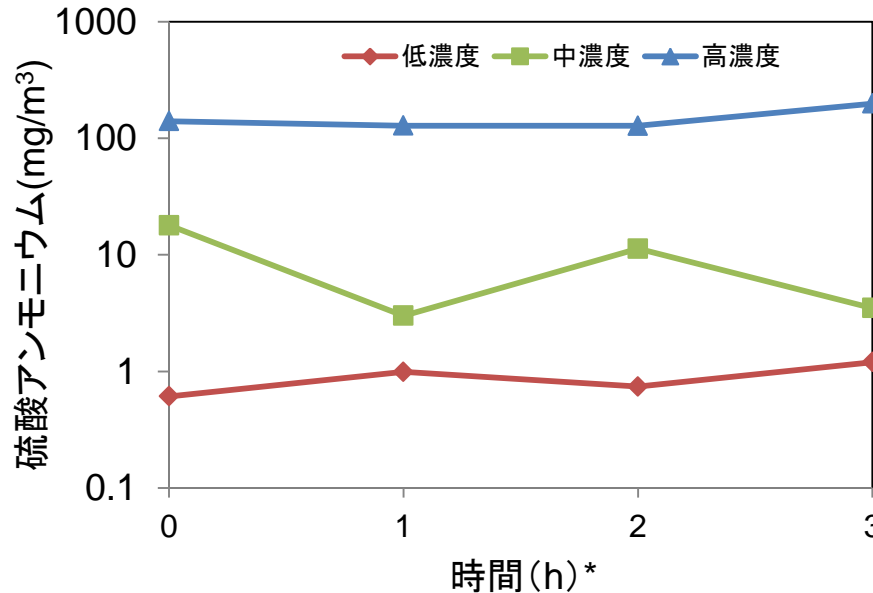
対照群
74 ± 0.5%
ばく露群
73 ± 1.8%

1 気相ばく露条件(濃度の安定性)の確認

★これまでの方法

硫酸アンモニウム濃度の日変動が大きかった。

(硫酸アンモニウム溶液0.1 mL/minを乾燥空気2 L/minで気相化)



148.7 ± 33.6 mg/m³
変動係数22.6%

8.9 ± 7.1 mg/m³
変動係数79.8%

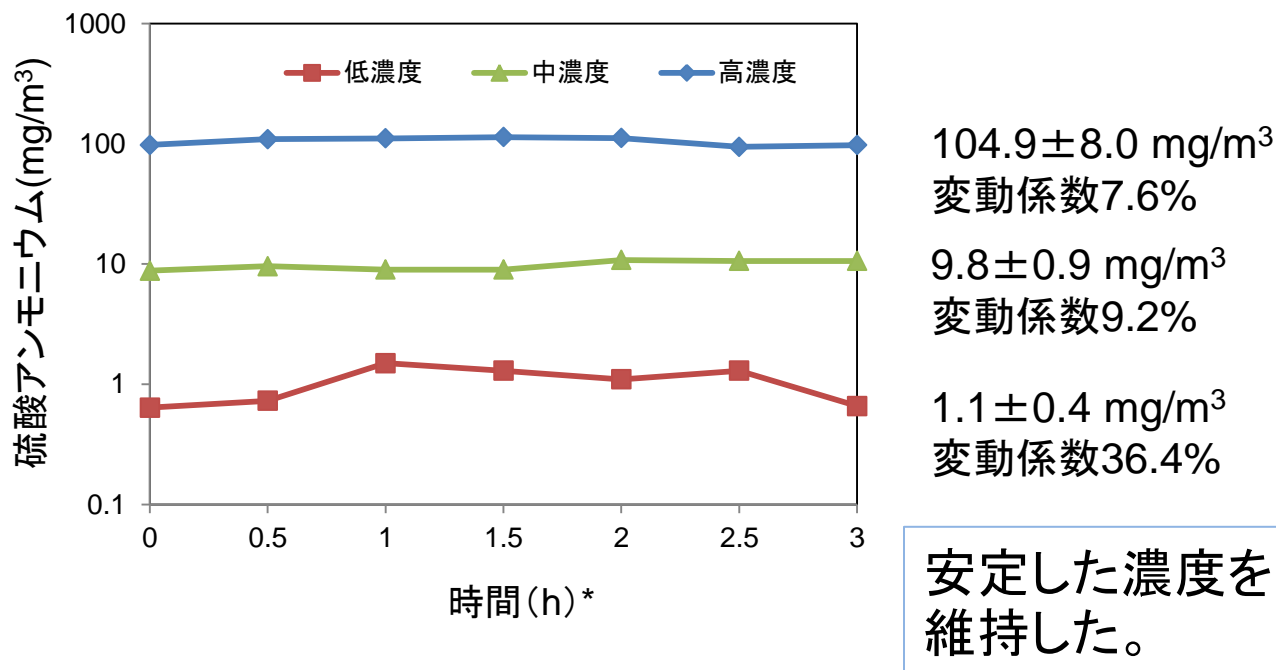
0.9 ± 0.3 mg/m³
変動係数33.3%

濃度変動が
大きかった。

* ばく露開始30分後を0として、濃度を測定。

★改良法

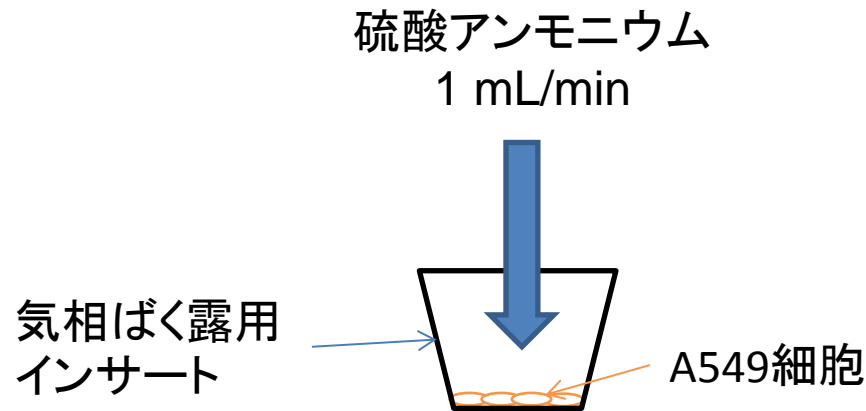
硫酸アンモニウム水溶液0.05 mL/minを乾燥空気2 L/minで気相化した。



* ばく露開始30分後を0として、濃度を測定。

* 硫酸アンモニウム水溶液を0.1 mL/minから0.05 mL/minに変更するため、硫酸アンモニウム水溶液の濃度は2倍とした。

2 気相ばく露量の推計



- 100mg/m³の硫酸アンモニウムで気相ばく露実験を行った。
- ばく露後のインサートに精製水を200μL入れ、3回洗浄した試料溶液について、硫酸アンモニウム濃度を測定(n=2)。
- 対照群についても同様の実験を行い、値を差し引いて求めた。

細胞へのばく露量及び推計した溶液濃度

ばく露時間	1時間	2時間	3時間
細胞へのばく露量(μg)	1.7	2.4	5.6
ばく露終了時の細胞表面上の溶液濃度(mg/mL)	0.57	0.80	1.9

細胞表面上の水分の容量を3μLと仮定して計算した。

3 炎症関連因子の遺伝子発現実験

目的

液相ばく露によるA549細胞での炎症への作用を詳細に検証するため、炎症に関連する因子の遺伝子発現を網羅的に測定する

実験条件

硫酸アンモニウムを液相ばく露したA549細胞

ばく露時間: 1~24時間の範囲

ばく露濃度: 0.1、1 mg/mL

対象因子

IL-4、5、13、25、33、IFN- γ 、

TSLP (Thymic stromal lymphopoietin)、MCP-1

変化が見られた因子については、さらに詳しく調べる。

4 Calu-3細胞を用いた硫酸アンモニウム 気相ばく露実験

Calu-3細胞へ硫酸アンモニウムを気相ばく露し、影響を調べる。

実験条件	
ばく露方法	気相ばく露 1.0 mL/min
培養細胞	ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞
ばく露濃度	1、10、100 mg/m ³ 、清浄空気
ばく露時間	1、2、3時間

測定項目	
細胞障害作用	細胞増殖、乳酸脱水素酵素 (LDH)
炎症因子	IL-8、IL-6 その他
酸化ストレスマーカー	HO-1、還元型グルタチオン(GSH)

5 A549細胞及びCalu-3細胞を用いた硫酸アンモニウム低濃度液相ばく露実験

目的: 液相ばく露実験では、A549細胞、Calu-3細胞とも高濃度ばく露(10 mg/mL)で細胞増殖能力に影響が見られたため、より低濃度でのばく露実験を追加で行う。

方法: 低濃度の硫酸アンモニウム水溶液を培地に添加(培地の1/10量)して、各細胞へばく露する。

実験条件	
ばく露方法	液相ばく露
培養細胞	ヒト肺上皮由来A549細胞、 ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞
ばく露濃度	0.001、0.01、0.1、1 mg/mL、精製水
ばく露時間	24時間(HO-1は3時間)
測定項目	
細胞障害作用	細胞増殖、乳酸脱水素酵素(LDH)
炎症因子	IL-8、IL-6 その他
酸化ストレスマーカー	HO-1、還元型グルタチオン(GSH)