

令和2年度

培養細胞への 硫酸水素アンモニウムばく露実験

健康安全研究センター
薬事環境科学部 環境衛生研究科

1

令和2年度 実験計画

1. 気相ばく露条件の検討
2. A549細胞への硫酸水素アンモニウム液相ばく露実験
3. 感受性を高めたA549細胞への液相ばく露（予備実験）
4. 酸化ストレスを誘導する因子（細胞内ROS*）の測定
（予備実験）

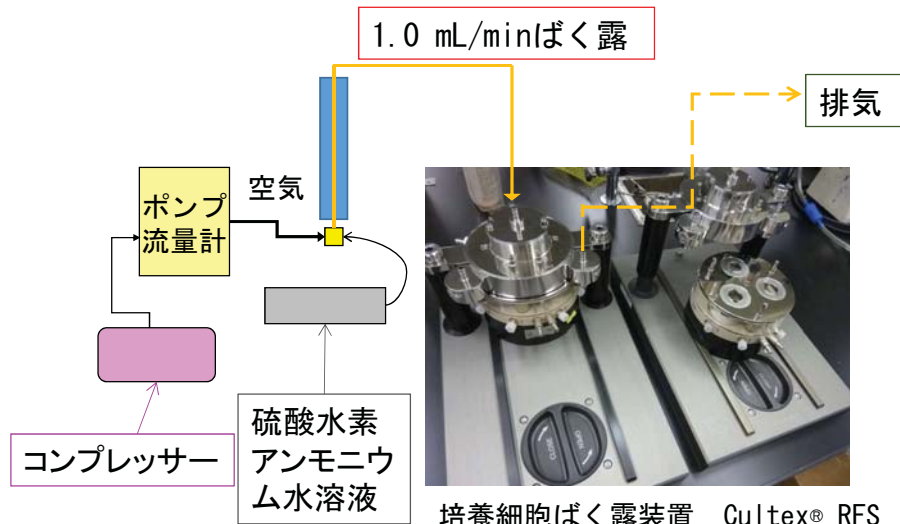
*ROS: 活性酸素種
(Reactive Oxygen Species)

2

1 気相ばく露条件の検討

目的：硫酸水素アンモニウムの気相濃度設定等、安定したばく露条件を検討する。

検討事項：気相ばく露の目標濃度を発生できる条件（硫酸水素アンモニウム水溶液濃度等）、ばく露濃度の経時的安定性について検討する。



気相ばく露装置模式図

3

硫酸水素アンモニウム (NH_4HSO_4)

分子量 115.11

水への溶解度 100 g/100 mL (20°C)

吸湿性がある

酸性度 pH 1 (100 g/L、20°C)

硫酸水素アンモニウム水溶液の濃度等を変化させ、目標濃度 (1、10、100 mg/m³) を安定的に発生する。

<気相化>

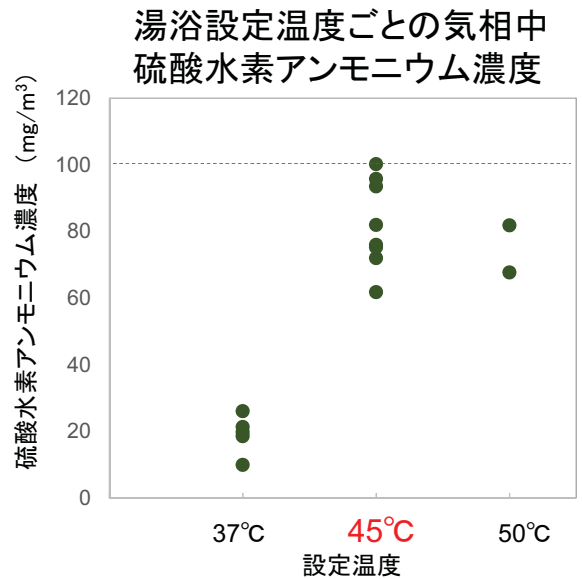
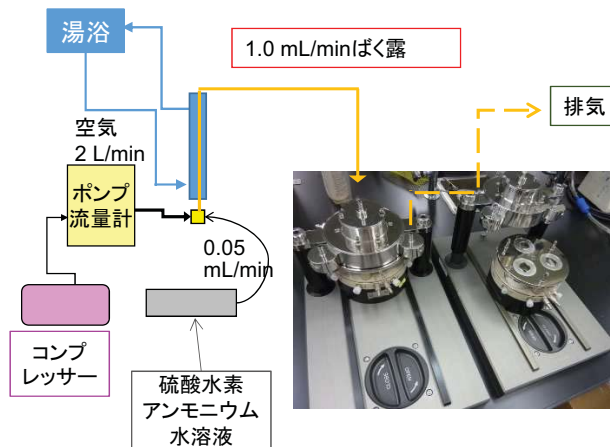
硫酸水素アンモニウム水溶液 0.05 mL/minを2 L・air/minに分散させ、気相化させる。

<濃度測定>

超純水10 mLが入ったインピンジャーを用いて、気相を0.5 L/min、10分間採取し、イオンクロマトグラフで硫酸イオンを測定して、硫酸水素アンモニウムの濃度を定量

4

気相ばく露条件検討結果 (1)

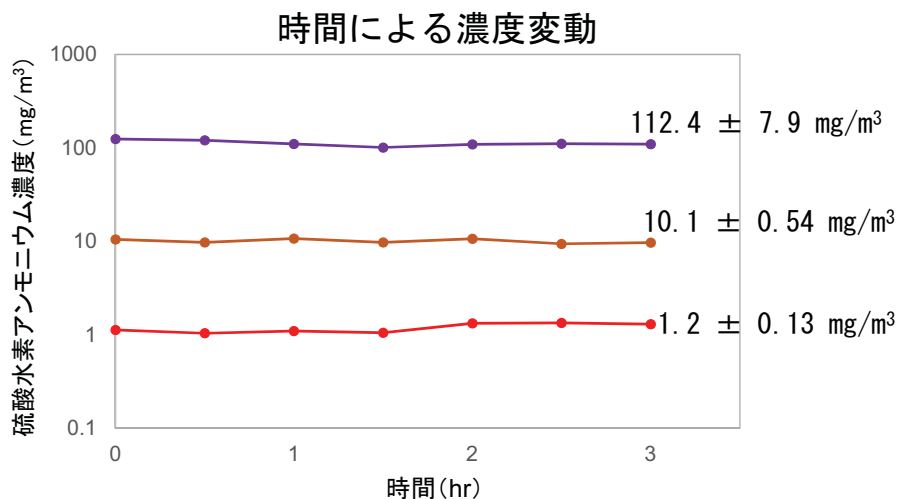


100 mg/mL硫酸水素アンモニウム水溶液を使用

- ・湯浴を使用して温度を上げることにより、気相濃度が上昇することがわかった（温度上昇による結露の抑制）。
- ・湯浴の温度を45°Cにすることで、ばく露の目標濃度を発生させることができた。

5

気相ばく露条件検討結果 (2)



● ; 低濃度 (3.2 mg/mL) 、 ● ; 中濃度 (15 mg/mL) 、 ● ; 高濃度 (95 mg/mL)
湯浴は45°Cに設定
気相化を開始して、30分後を0時間として、30分ごとにサンプリングした。

低、中、高濃度とも、目標濃度を経時的に安定して維持することができた。

6

2 A549細胞への硫酸水素アンモニウム液相ばく露実験

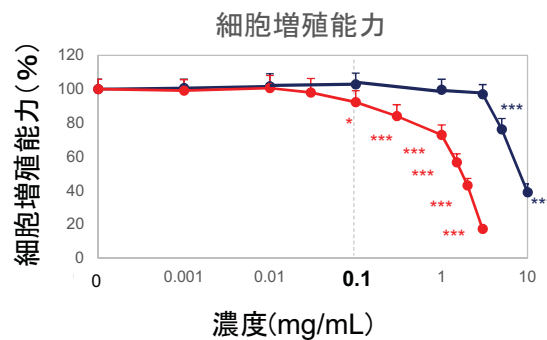
目的：A549細胞に硫酸水素アンモニウムを液相ばく露し、影響を調べる。

実験条件	
ばく露方法	液相ばく露
培養細胞	ヒト肺胞上皮由来A549細胞
ばく露濃度	0.0001 ~ 3 mg/mL、超純水
ばく露時間	24時間 (H0-1は3時間)

測定項目	
細胞傷害作用	細胞増殖、乳酸脱水素酵素 (LDH)
炎症因子 (タンパク質)	IL-8、IL-6
酸化ストレスマーカー	H0-1、還元型グルタチオン (GSH)
遺伝子発現	<i>IL-8</i> 、 <i>MUC5AC</i> (粘液関連)、 <i>CCL-2</i> (<i>MCP-1</i>) 等

7

A549細胞への液相ばく露結果 (1)



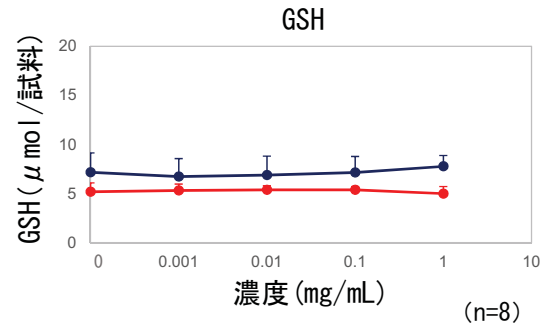
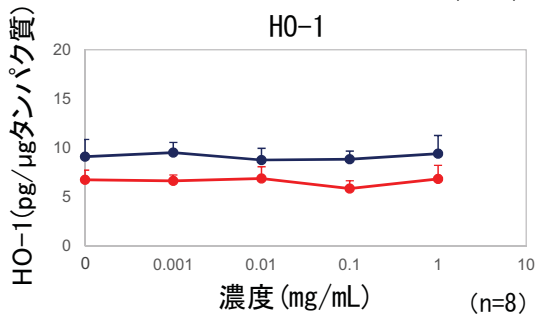
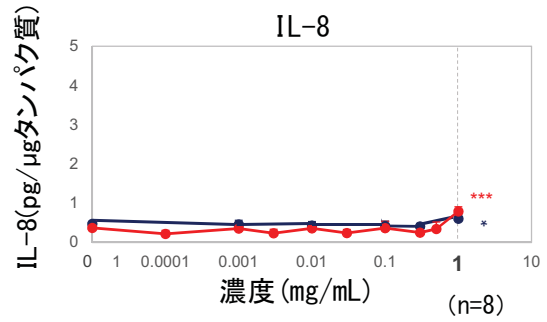
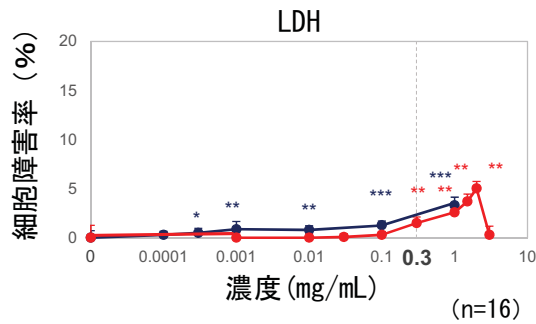
● ; 硫酸水素アンモニウム、● ; 硫酸アンモニウム
 * ; $p < 0.05$ 、** ; $p < 0.01$ 、*** ; $p < 0.001$ (n=16)

- 1 mg/mL 硫酸水素アンモニウム in RPMI1640培地 pH : 7
- 2 mg/mL 硫酸水素アンモニウム in RPMI1640培地 pH : 6.5
- 3 mg/mL 硫酸水素アンモニウム in RPMI1640培地 pH : 6

- ・ 硫酸水素アンモニウム0.1mg/mL以上で細胞増殖能力が抑制された。
- ・ 硫酸アンモニウムに比べ、細胞増殖能力への影響が強い。

8

A549細胞への液相ばく露結果 (2)



● ; 硫酸水素アンモニウム、● ; 硫酸アンモニウム
 * ; p<0.05、** ; p<0.01、*** ; p<0.001、IL-6は不検出

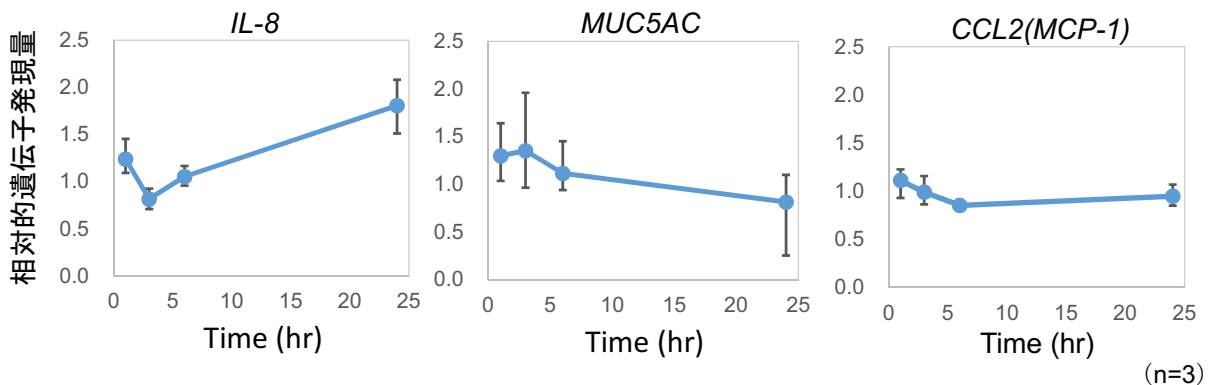
- ・ 硫酸水素アンモニウム0.3mg/mL以上で細胞障害性、1 mg/mLでIL-8増強が見られた。
- ・ 酸化ストレスマーカー (HO-1、GSH) には影響が見られなかった。

9

A549細胞への液相ばく露結果 (3)

(遺伝子発現について)

目的:いくつかの炎症関連因子、粘液関連因子等の遺伝子発現を調べ、硫酸水素アンモニウムによる影響を検索する。



A549細胞へ0.3 mg/mL硫酸水素アンモニウム (培養細胞への影響があまり強くない濃度)を1、3、6、24時間ばく露
 縦軸は対照群の遺伝子発現量を1とした相対的遺伝子発現量

- ・ IL-8 : 24時間ばく露で発現量が約2倍に増強。
- ・ MUC5AC : ばらつきが大きい。
- ・ CCL2(MCP-1) : 概ね1倍(ばく露による発現量の増減がほぼ見られない)で推移。
- ・ これら以外の遺伝子 (IL-4、IL-5、IL-6、IL-13、IL-25、IL-33、インターフェロンγ、TSLP) は変化なし。

10

3 感受性を高めたA549細胞への液相ばく露（予備実験）

令和3年度 本実験の目的

感受性を高めた（炎症状態にある）A549細胞を作製し、その細胞へ硫酸水素アンモニウムを液相ばく露して炎症因子（IL-8、IL-6、他）等の変化を調べ、炎症等が増悪するか調べる。

令和2年度 予備実験の目的

A549細胞へIL-1 β を反応させ、炎症への感受性を高める至適条件（ばく露濃度、時間等）を得る。

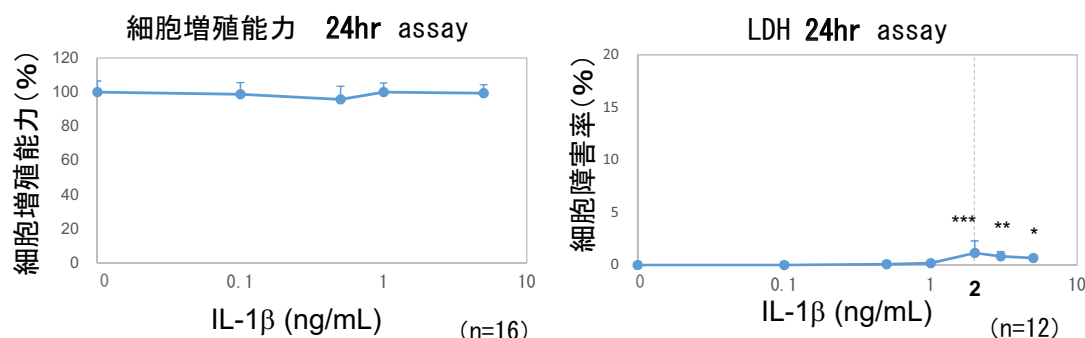
検討項目

細胞増殖能力、細胞傷害性（LDH）、炎症因子（IL-8、IL-6、TNF- α 、MCP-1）、酸化ストレスマーカー（HO-1）

IL-1 β のばく露濃度や時間を変化させ、A549細胞のIL-8等の産生増強を調べ、感受性が高まる条件を検討する。

11

感受性を高めたA549細胞への液相ばく露 予備実験結果(1)

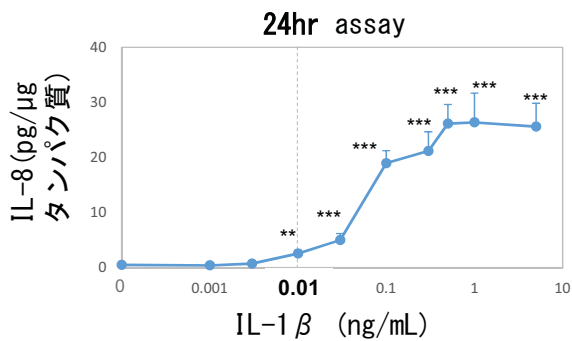
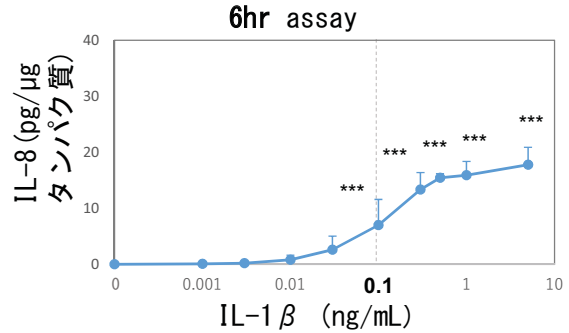
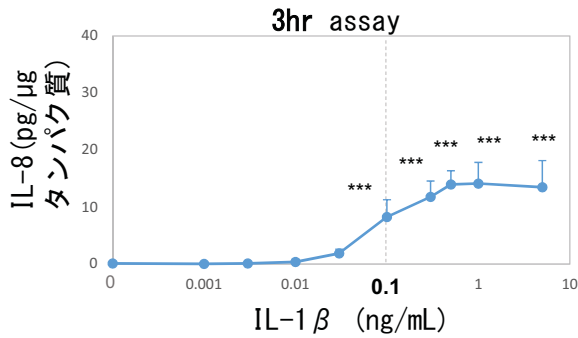


*; p<0.05、**; p<0.01、***; p<0.001

A549細胞へIL-1 β を反応させた結果、細胞増殖能力には影響を与えず、2 ng/mL以上で細胞障害率に影響を与えた。

12

感受性を高めたA549細胞への液相ばく露 予備実験結果(2) IL-8



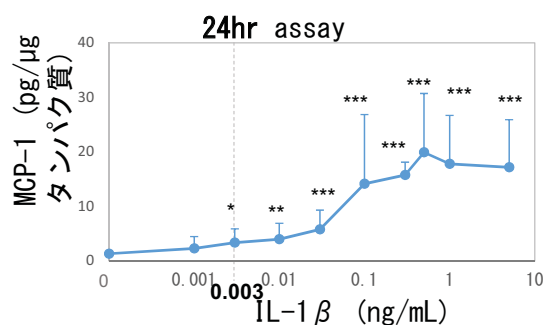
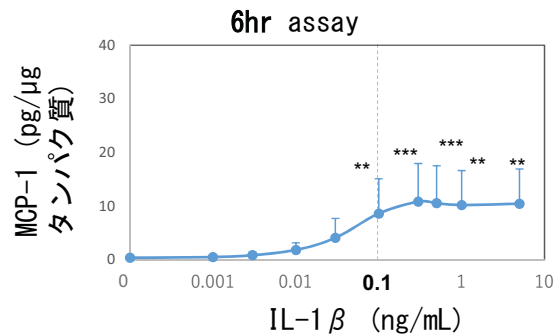
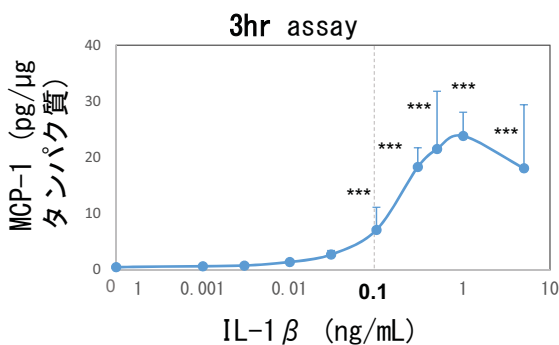
** ; p<0.01、*** ; p<0.001

(n=8)

A549細胞へIL-1βを反応させると、IL-8産生は、3、6時間で0.1 ng/mL以上、24時間反応では0.01 ng/mL以上の濃度で増強した。

13

感受性を高めたA549細胞への液相ばく露 予備実験結果(3) MCP-1



* ; p<0.05、** ; p<0.01、*** ; p<0.001

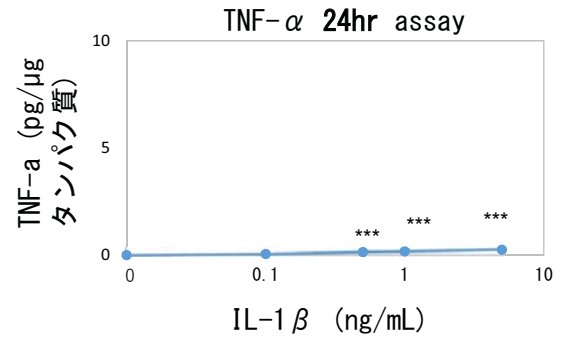
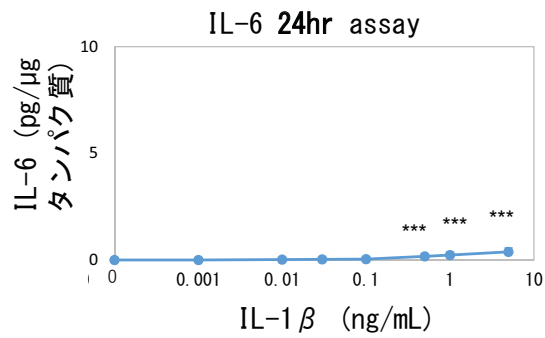
(n=8)

A549細胞へIL-1βを反応させると、MCP-1産生は、3、6時間で0.1 ng/mL以上、24時間では0.003 ng/mL以上の濃度で増強した。

MCP-1 ; IL-1及びIL-6の産生誘導等をする。

14

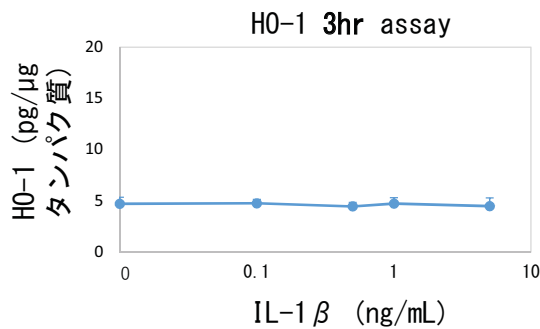
感受性を高めたA549細胞への液相ばく露 予備実験結果(4)



TNF-α ; 炎症反応を惹起する

*** ; p < 0.001

(n=8)



- ・ A549細胞へIL-1βを反応させると、IL-6、TNF-αが産生されたが、顕著な増強ではなかった。
- ・ H0-1産生に影響を与えなかった。

15

以上の結果から、

硫酸水素アンモニウムによる炎症の増悪を 調べる実験条件

A549細胞へ0.03もしくは0.1 ng/mLのIL-1βを
3時間反応させる。



硫酸水素アンモニウムを反応させる。

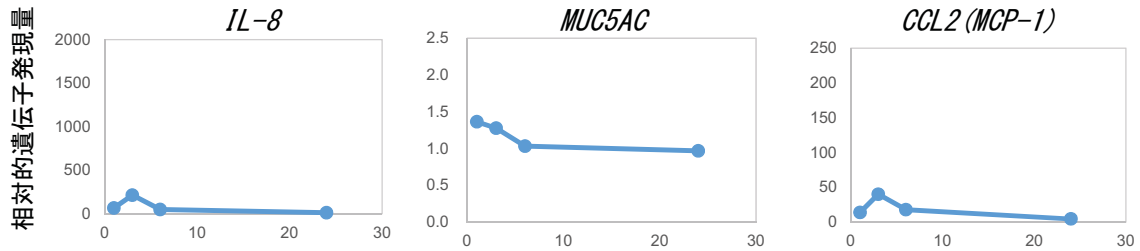
測定項目は、炎症因子 (IL-8及びMCP-1) 産生を
中心に測定することとした。

16

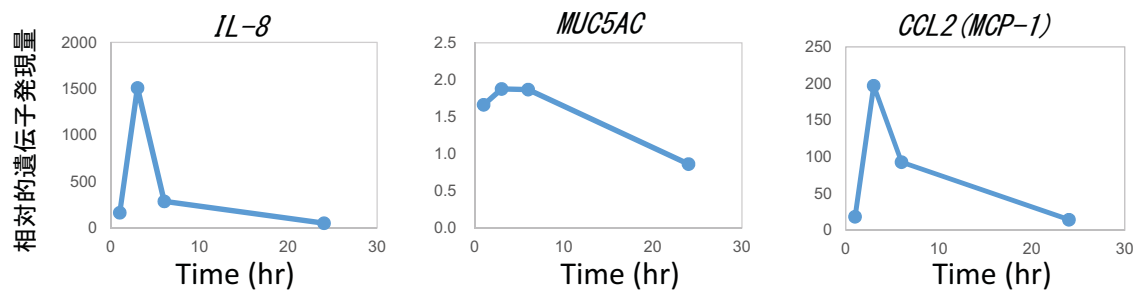
感受性を高めたA549細胞への液相ばく露 予備実験結果 (5)

(遺伝子発現について)

① 0.03 ng/mL IL-1 β



② 0.1 ng/mL IL-1 β



(n=2)

17

感受性を高めたA549細胞への液相ばく露 予備実験結果 (5)

(遺伝子発現について)

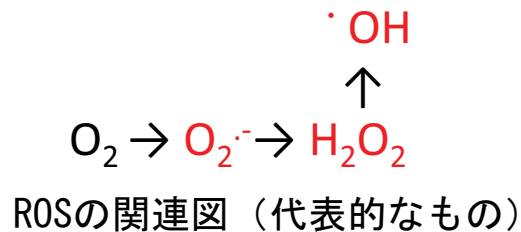
- ・ 0.03 ng/mLばく露では、*IL-8*では**約210倍**、*CCL2*で**約40倍**と発現量が大きく増強した。
- ・ 0.1 ng/mLばく露では、*IL-8*では**約1,500倍**、*CCL2*で**約200倍**と発現量が大きく増強した。
- ・ *MUC5AC* は濃度にかかわらず大きな変化はなく（最大で2倍弱）IL-1 β の影響受けない。
- ・ その他の遺伝子（*IL-4*、*IL-5*、*IL-6*、*IL-13*、*IL-25*、*IL-33*、インターフェロン γ 、*TSLP*）は変化なし。

18

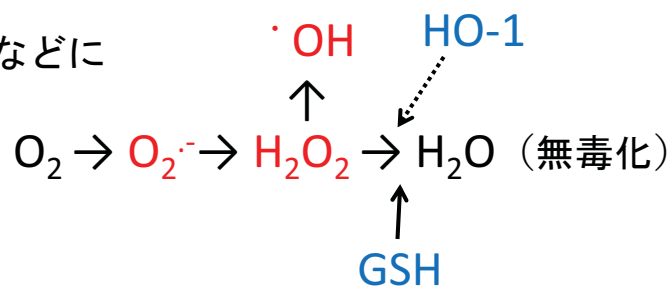
4 酸化ストレスを誘導する因子（細胞内ROS）の測定（予備実験）

ROSとは

活性酸素種（Reactive Oxygen Species）といわれる、酸素分子に由来する反応性の高い酸素種



ROSは、抗酸化物質などにより無毒化される。



19

令和3年度 本実験の目的

A549細胞に硫酸水素アンモニウムを液相ばく露し、細胞内ROSの産生を調べる。

令和2年度 予備実験の目的

ROS検出方法の検討及び陽性対照物質の探索

検討項目

- 短時間（3時間以内）及び長時間（24時間まで）ばく露に適した検出方法の検討
- 短時間及び長時間ばく露に適した陽性対照物質の探索

20

1. 検出方法の検討

- ・ 過酸化水素 (H₂O₂) を測定できること
 - ・ 短時間及び長時間ばく露に適用できること
- 以上を満たす3種類のキットについて検討した。

測定キット	キットA	キットB	キットC
検出の原理	細胞内ROSと蛍光試薬が反応し、蛍光物質が生成される。		
検出法	蛍光法		
励起波長 (nm)	520	490	650
測定波長 (nm)	605	525	675
測定対象ROSと感度			
過酸化水素 (H ₂ O ₂)	+++	+++	+
ヒドロキシラジカル	+	+	++
tert-ブチルヒドロペルオキシド (TBHP)	+	+	+
スーパーオキシドアニオン	—	—	++

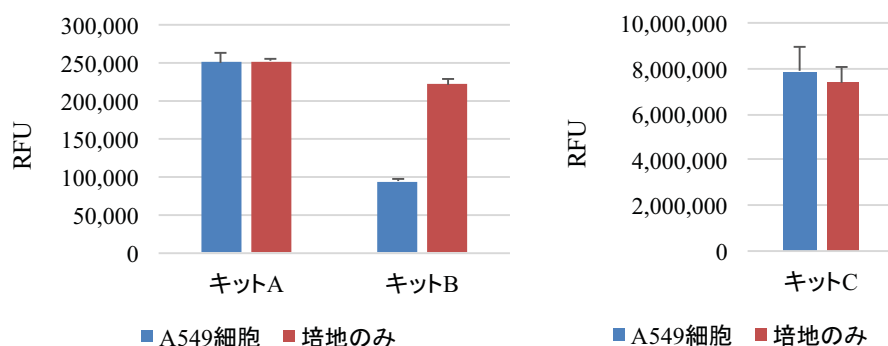
21

1. 検出方法の検討結果

検出方法の確定条件

細胞の測定値が培地のみとの測定値と同程度

測定値 (RFU) のばらつき (CV) が小さい。



リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) をばく露した結果 (n=3)

CV	キットA	キットB	キットC
A549細胞	4.4 %	2.7 %	13.3 %
培地のみ	1.9 %	2.5 %	9.5 %

条件を満たしたキットAを採用

22

2. 陽性対照物質の探索方法

実験条件	
ばく露方法	液相ばく露
ばく露細胞	ヒト肺胞上皮由来A549細胞
ばく露物質	メナジオン、TBHP、 H_2O_2 、ホルムアルデヒド (HCHO)、DMSO (メナジオンの溶媒)、PBS (コントロール)
ばく露濃度	10~1,000 μM 、0.25% (DMSO)
ばく露時間	3時間

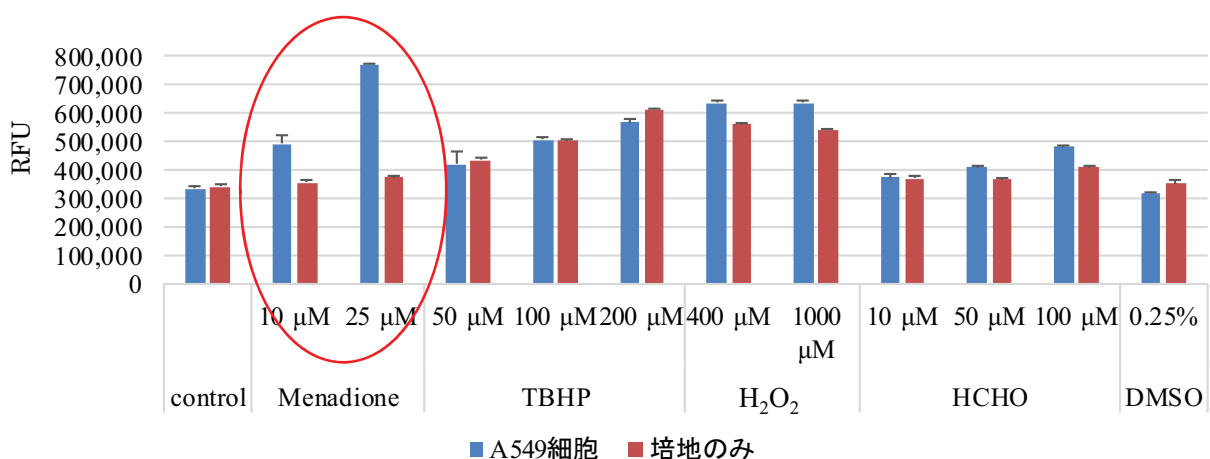
陽性対照物質の必要条件

細胞の測定値 (RFU) について、化学物質添加の値がコントロールより高い。

細胞の測定値が培地のみとの測定値より高い。

23

2. 陽性対照物質の探索結果



化学物質ばく露によるROS産生 (n=3)

最も明確な差がみられたメナジオンを検討

24

3. 短時間ばく露の方法

実験条件	
ばく露方法	液相ばく露
ばく露細胞	ヒト肺胞上皮由来A549細胞
ばく露物質	メナジオン PBS（コントロール）
ばく露濃度	10~25 μM
ばく露時間	30分~3時間

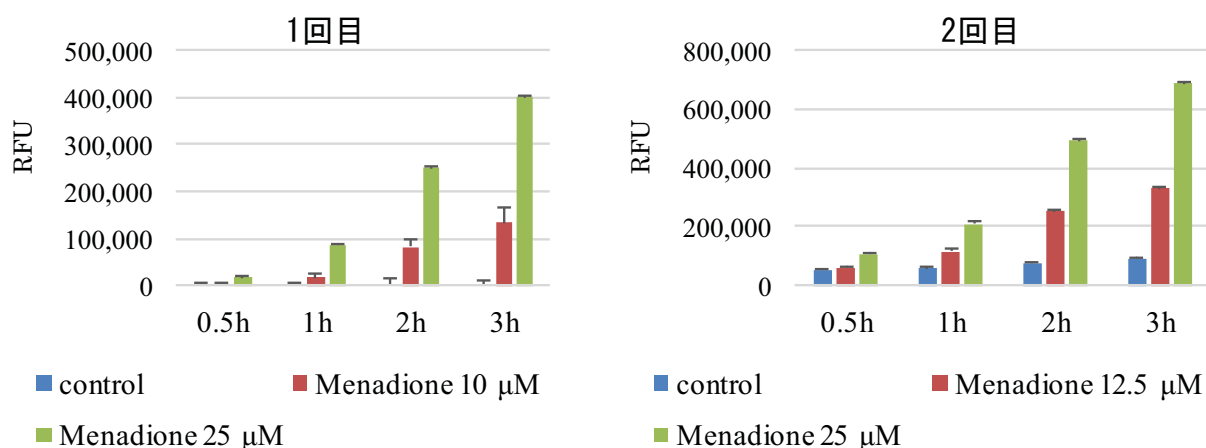
操作手順：染色液を添加後、化学物質を添加して測定した。



25

3. 短時間ばく露結果

- メナジオンばく露後、30分から3時間まで陽性を示し、濃度依存性も確認された。



メナジオンばく露によるROS産生 (n=3)
A549細胞の測定値から培地の測定値を減算

短時間ばく露においては、10~25 μM メナジオンを陽性対照物質に用い、ばく露後30分から3時間まで、経時的に測定することとした。

26

4. 長時間ばく露の方法

実験条件	
ばく露方法	液相ばく露
ばく露細胞	ヒト肺胞上皮由来A549細胞
ばく露物質	メナジオン PBS（コントロール）
ばく露濃度	0.1、1 μM
ばく露時間	22~24時間

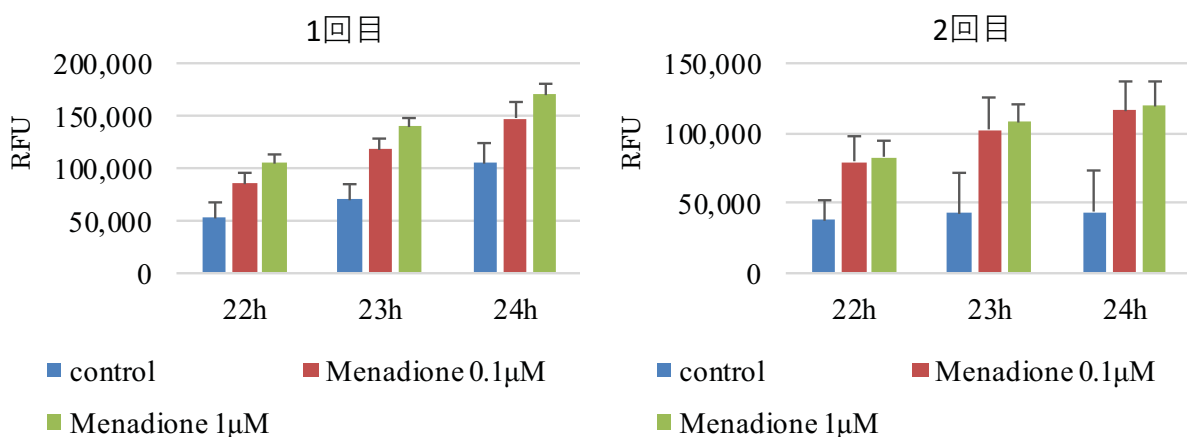
操作手順：染色液の効果が数時間のため、染色液を測定の直前に添加して測定した。



27

4. 長時間ばく露結果

- メナジオンばく露後、22時間から24時間まで陽性を示した。



メナジオンばく露によるROS産生 (n=3)
A549細胞の測定値から培地の測定値を減算

長時間ばく露においては、0.1~1 μM メナジオンを陽性対照物質に用い、ばく露後22時間から24時間まで、経時的に測定することとした。

28

まとめ(1)

1. 気相ばく露では、目標濃度で安定したばく露が可能となった。
2. A549細胞への硫酸水素アンモニウム液相ばく露では、0.1 mg/mL以上で細胞増殖能力が抑制され、0.3 mg/mL以上で細胞障害性があった。IL-8産生は1 mg/mLで増強した。酸化ストレスマーカー（HO-1、GSH）に影響を与えなかった。

29

まとめ(2)

3. A549細胞へIL-1 β を反応させると、炎症因子（IL-8、MCP-1等）産生が増強した。令和3年度に実施する感受性を高めた（炎症状態にある）A549細胞を用いる実験では、IL-1 β を0.03もしくは0.1 ng/mLで3時間反応後、硫酸水素アンモニウムを24時間反応させることとした。
4. ROSの測定条件検討では、メナジオンを陽性対照物質に選定した。令和3年度の液相ばく露実験では、短時間ばく露には、10~25 μ Mメナジオンを用い、ばく露後30分から3時間まで、長時間ばく露には、0.1~1 μ Mメナジオンを用い、ばく露後22時間から24時間まで、経時的に測定することとした。

30