

令和 3 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 3 年度 実験計画

1. A549細胞への気相ばく露実験
2. 感受性を高めたA549細胞への液相ばく露実験
3. Calu-3細胞への液相ばく露実験
4. Calu-3細胞の細胞膜間結合力に関する測定（予備実験）
5. 酸化ストレスを誘導する因子（細胞内ROS*）の測定

*ROS: 活性酸素種
(Reactive Oxygen Species)

2

1. A549細胞への気相ばく露実験

目的：気相状態の硫酸水素アンモニウムによるA549細胞への影響を調べる。

実験条件	
ばく露方法	気相ばく露 1.0 mL/min
培養細胞	ヒト肺胞上皮由来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

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	H0-1、還元型グルタチオン (GSH)

3

2. 感受性を高めたA549細胞への液相ばく露実験

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、炎症因子等の変化を調べ、炎症等が増悪するかを調べる。

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
IL-1 β ばく露濃度	0.03、0.1 ng/mL
IL-1 β ばく露時間	3時間
硫酸水素アンモニウムばく露濃度	0.001~1 mg/mL、超純水
硫酸水素アンモニウムばく露時間	24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、TNF- α 、MCP-1

4

3. Calu-3細胞への液相ばく露実験

目的：Calu-3細胞へ硫酸水素アンモニウムをばく露し、その影響を調べる。

実験条件	
培養細胞	ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞
ばく露濃度	0.0001~3 mg/mL、超純水
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 (タンパク質)	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)
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

5

4. Calu-3細胞の細胞膜間結合力の測定 (予備実験)

目的：硫酸水素アンモニウムが細胞膜間結合力へ及ぼす影響を調べる。

方法：液相ばく露によるCalu-3細胞の細胞膜間結合力の変化を電気抵抗値で測定する。

Calu-3細胞は細胞膜間結合力 (タイトジャンクション) が強い特徴を持つ。

細胞膜間結合力が弱まると、化合物が細胞間を通過し、基底膜、結合組織まで浸透し、より深部までダメージを及ぼす。

電気抵抗値を測定することにより、細胞への傷害性が測定可能。

令和3年度の実験計画：
 インサートのメンブレン膜上に隙間なくCalu-3細胞が生える、実験に最適な細胞の播種数、培養日数を調べる。
 測定項目は、電気抵抗値。

電気抵抗値測定システム



細胞膜間の模式図

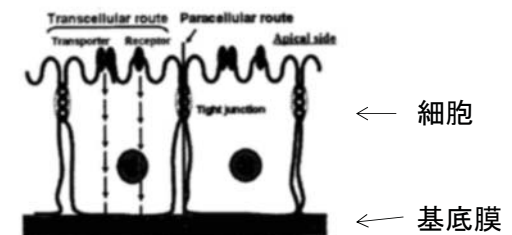


Fig. 1. Schematic Scheme of Transport Route in Epithelia

YAKUGAKU ZASSHI
 126(9) 711-721 (2006)

6

5. 酸化ストレスを誘導する因子 (細胞内ROS) の測定

目的：A549細胞へ硫酸水素アンモニウムを液相ばく露し、細胞内にROSが産生されるかを調べる。

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
硫酸水素アンモニウム濃度	0.001～1 mg/mL
陰性コントロール	リン酸緩衝生理食塩水
陽性コントロール	メナジオン
ばく露時間	短時間 (30分～3時間) 長時間 (22時間～24時間)

測定項目	
Total ROS	過酸化水素、ヒドロキシラジカル、 t-ブチルヒドロペルオキシド