

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

令和3年度 実験計画

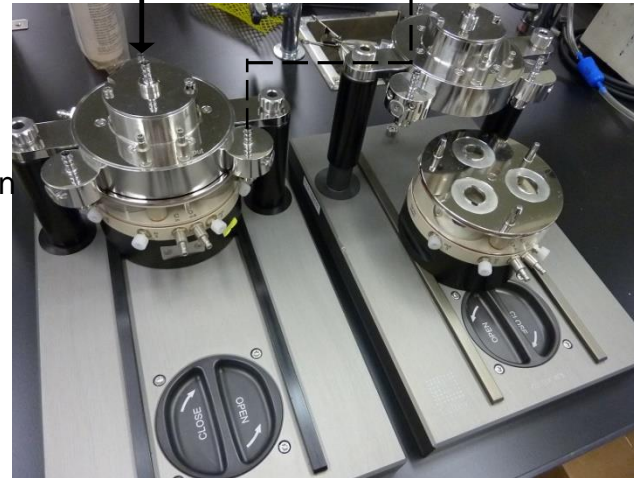
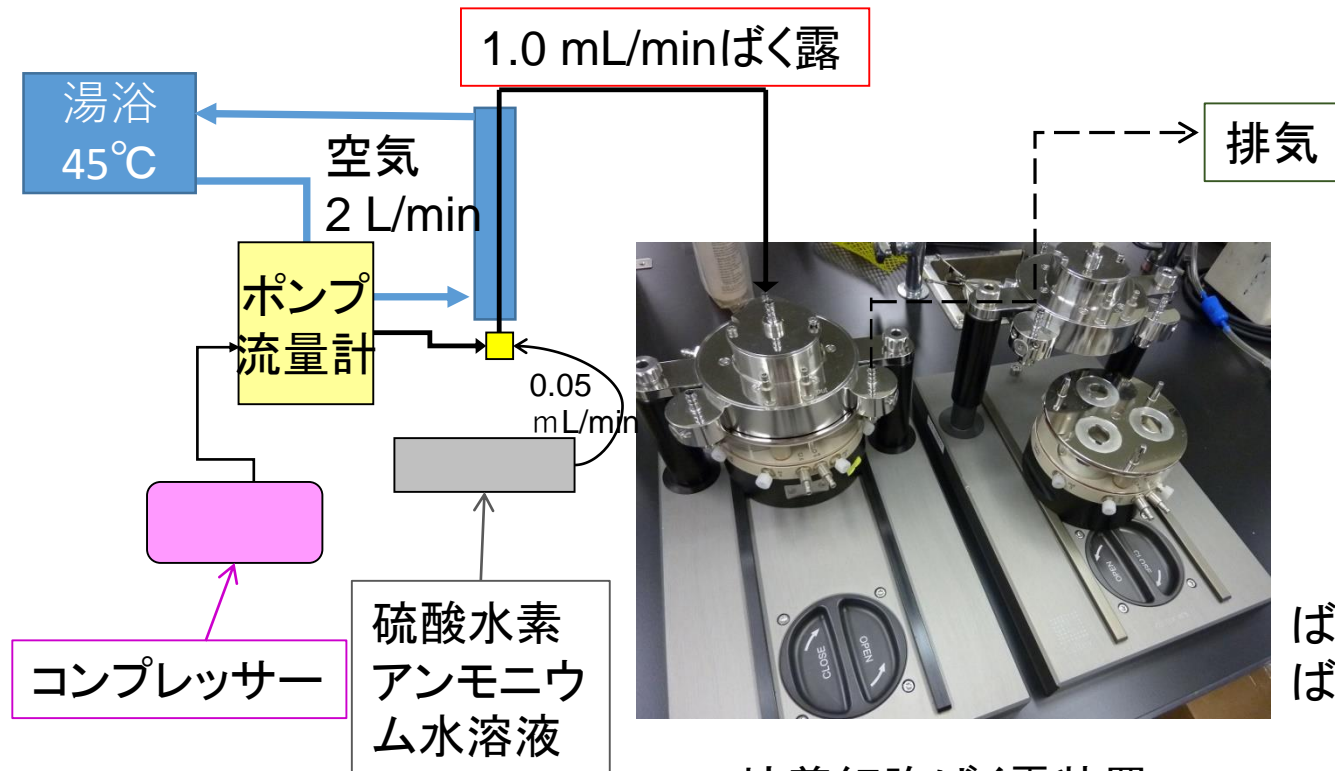
- 1 A549細胞への気相ばく露実験
- 2 感受性を高めた(炎症状態にある)A549細胞への液相ばく露実験
- 3 酸化ストレスを誘導する因子(細胞内ROS*)の測定
- 4 Calu-3細胞への液相ばく露実験
- 5 Calu-3細胞の細胞膜間結合力に関する測定
(予備実験)

1 A549細胞への気相ばく露実験

目的:

A549細胞へ硫酸水素アンモニウムを気相ばく露し、影響を調べる。

気相ばく露装置模式図



ばく露温度; 25.1°C
ばく露湿度; 69%

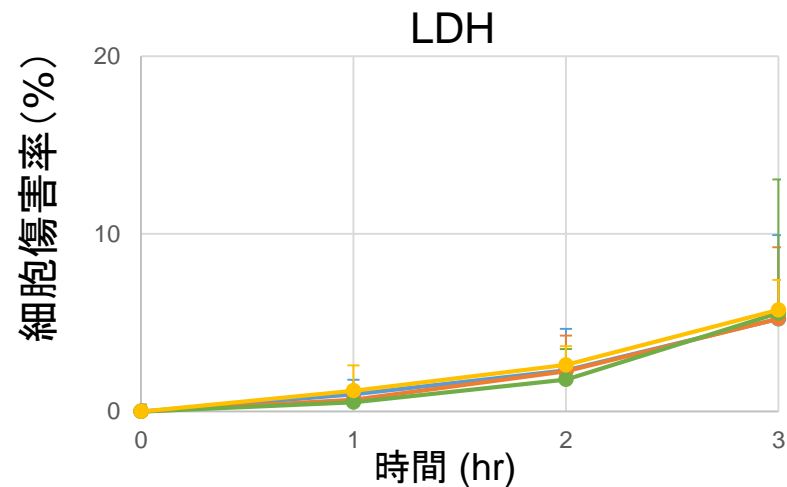
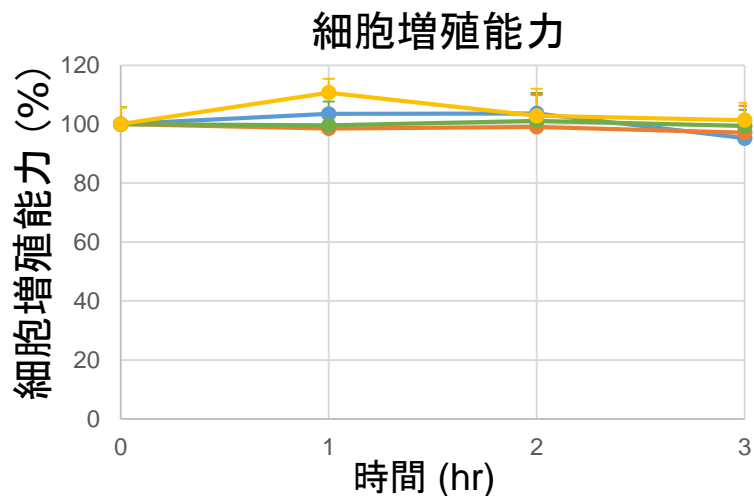
培養細胞ばく露装置
Cultex® RFS

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

* 令和2年度の「気相ばく露条件の検討」結果から、目標ばく露濃度が発生することを確認

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)

A549細胞への気相ばく露結果(1)



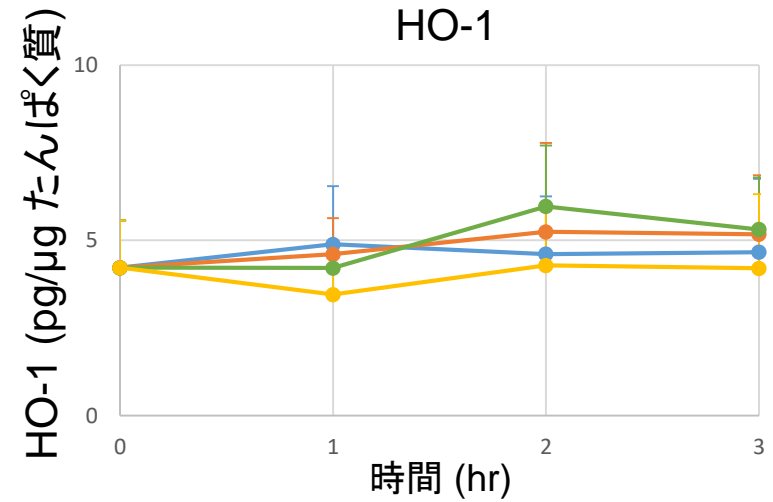
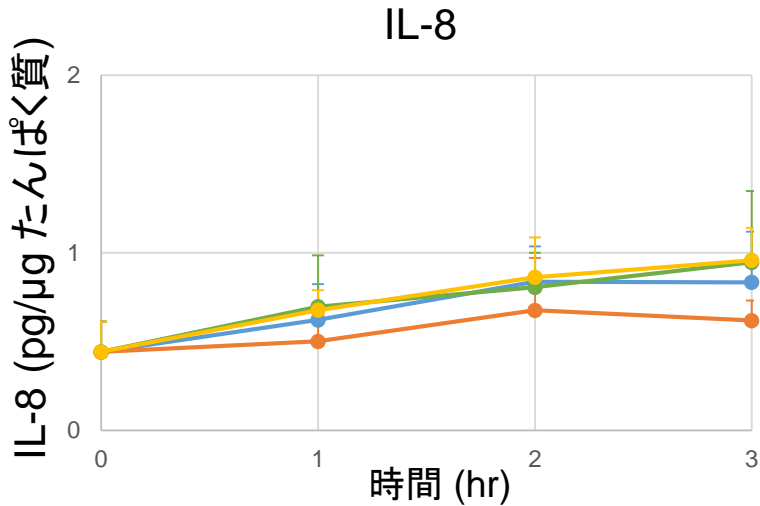
●; 対照群、●; 低濃度群(1 mg/m³)、
●; 中濃度群(10 mg/m³)、●; 高濃度群(100 mg/m³)

(n=9)

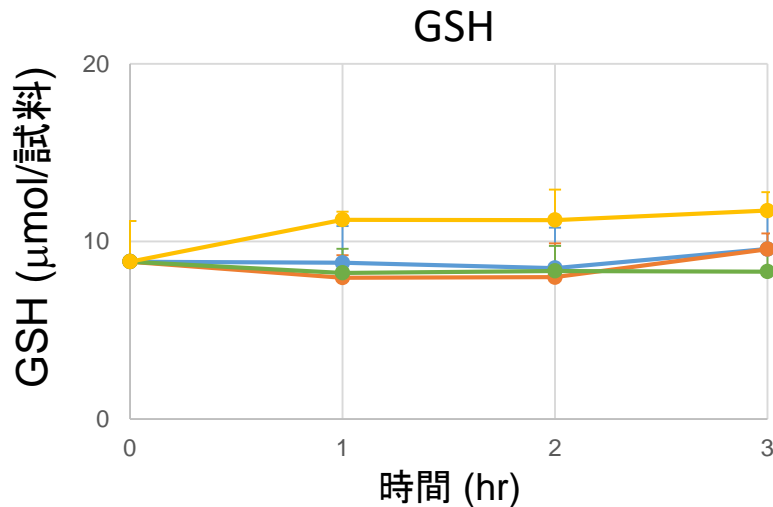
細胞障害性はLDHを用いて表現した。

- 細胞増殖能力: 変化なし。
- LDH: 変化なし。

A549細胞への気相ばく露結果(2)



(n=9)



● ; 対照群、● ; 低濃度群(1 mg/m³)、
● ; 中濃度群(10 mg/m³)、● ; 高濃度群(100 mg/m³)

- IL-8: 変化なし。
- IL-6: 不検出。
- HO-1: 変化なし。
- GSH: 変化なし。

2. 感受性を高めた(炎症状態にある) 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(IL-8、IL-6、他)等の変化を調べ、炎症等が増悪するかを調べる。

*感受性を高めた(炎症状態にある)A549細胞

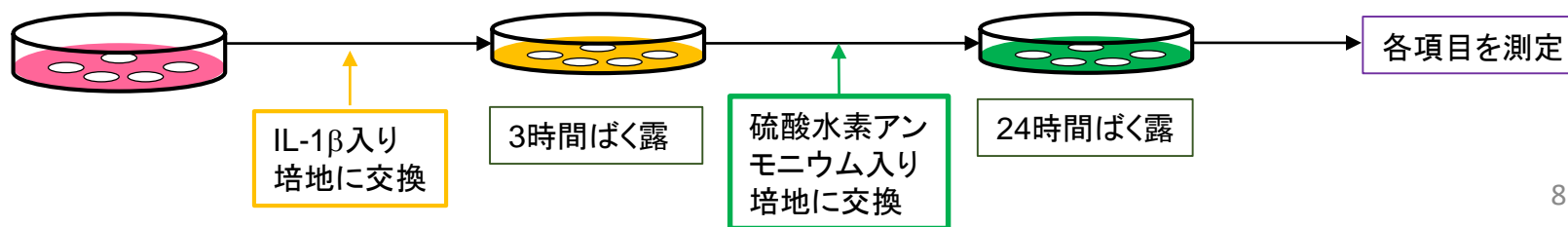
A549細胞へ炎症性サイトカインIL-1 β をばく露させると、炎症因子(IL-8、MCP-1等)の産生が増強し、A549細胞が炎症状態になる(令和2年度予備実験にて確認)。

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

* 令和2年度の予備実験で、実験条件を検討済み

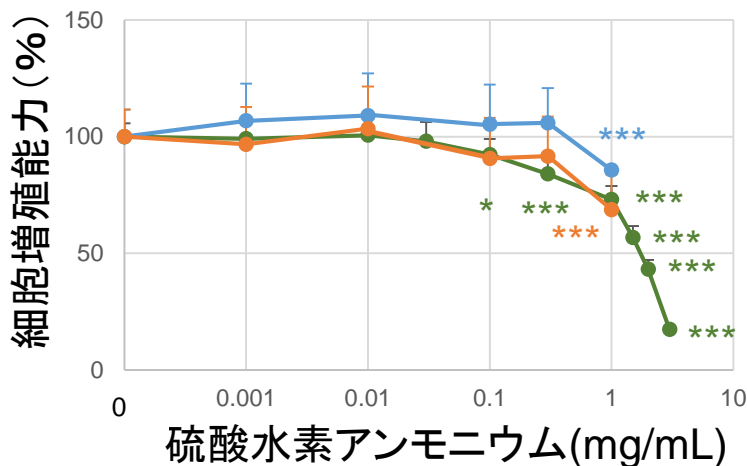
測定項目	
細胞障害作用	細胞増殖、乳酸脱水素酵素 (LDH)
炎症因子	IL-8、IL-6、TNF- α 、MCP-1
遺伝子発現	IL-8、CCL-2(MCP-1)、MUC5AC(粘液形成関連)

A549細胞

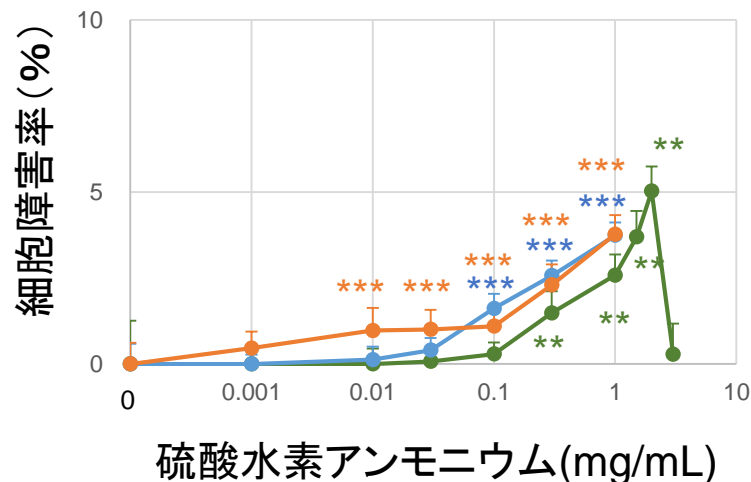


感受性を高めた(炎症状態にある) A549細胞 への液相ばく露実験結果(1)

細胞増殖能力



細胞障害性



● ; IL-1β 0 ng/mL、● ; IL-1β 0.03 ng/mL、● ; IL-1β 0.1 ng/mL

感受性を高めた(炎症状態にある)A549細胞

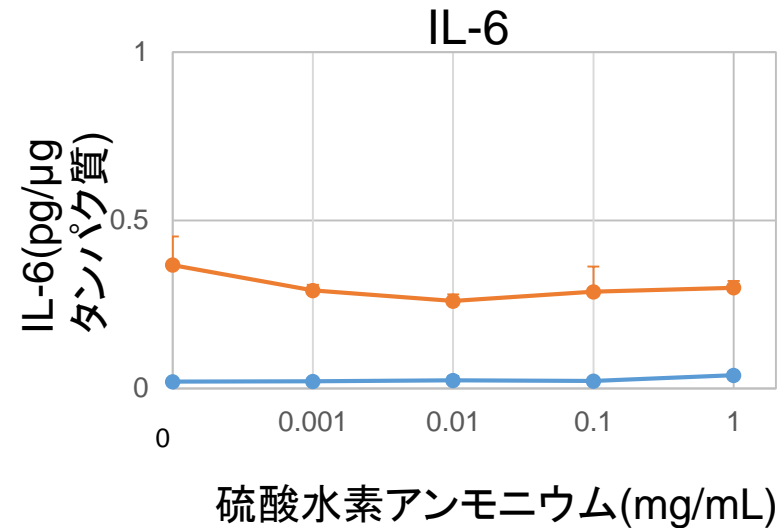
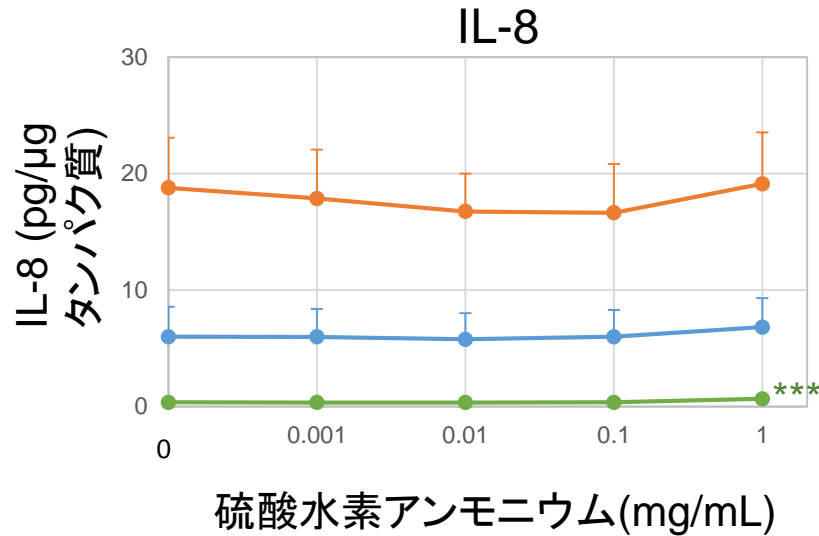
(n=12または16)

*; p<0.05、**; p<0.01、***; p<0.001

細胞障害性はLDHを用いて表現した。

- IL-1βをばく露させたA549細胞において、硫酸水素アンモニウム1 mg/mLにより細胞増殖能力が減弱した。
- IL-1βを0.03 ng/mLばく露させたA549細胞では硫酸水素アンモニウム0.1 mg/mL以上のばく露で、IL-1βを0.1 ng/mLばく露させたA549細胞では硫酸水素アンモニウム0.01 mg/mL以上のばく露で細胞障害性が認められたが、障害率は5%以下と強くなかった。

感受性を高めた(炎症状態にある) A549細胞 への液相ばく露実験結果(2)

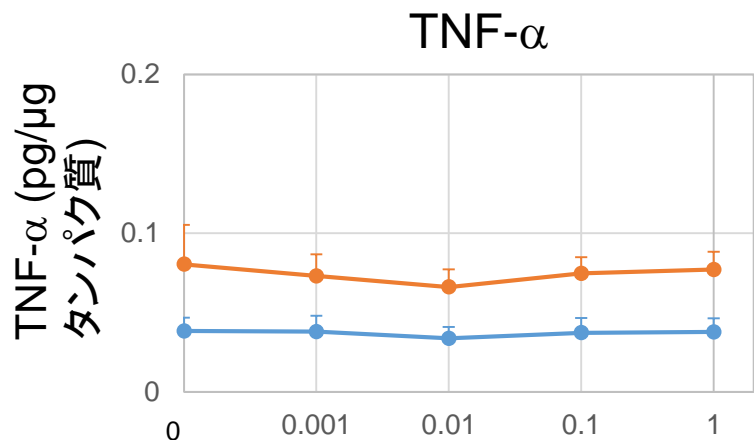


● ; IL-1β 0 ng/mL、● ; IL-1β 0.03 ng/mL、● ; IL-1β 0.1 ng/mL (n=12)

***; p<0.001

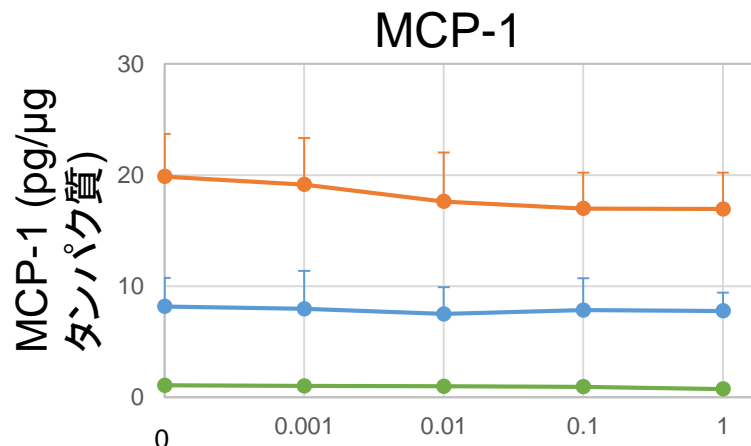
- A549細胞へIL-1βをばく露させた後、硫酸水素アンモニウムを1 mg/mLまでばく露しても、IL-8及びIL-6産生に影響を与えなかった。

感受性を高めた(炎症状態にある) A549細胞への液相ばく露実験結果(3)



硫酸水素アンモニウム(mg/mL)

TNF- α ; 炎症反応を惹起する



硫酸水素アンモニウム(mg/mL)

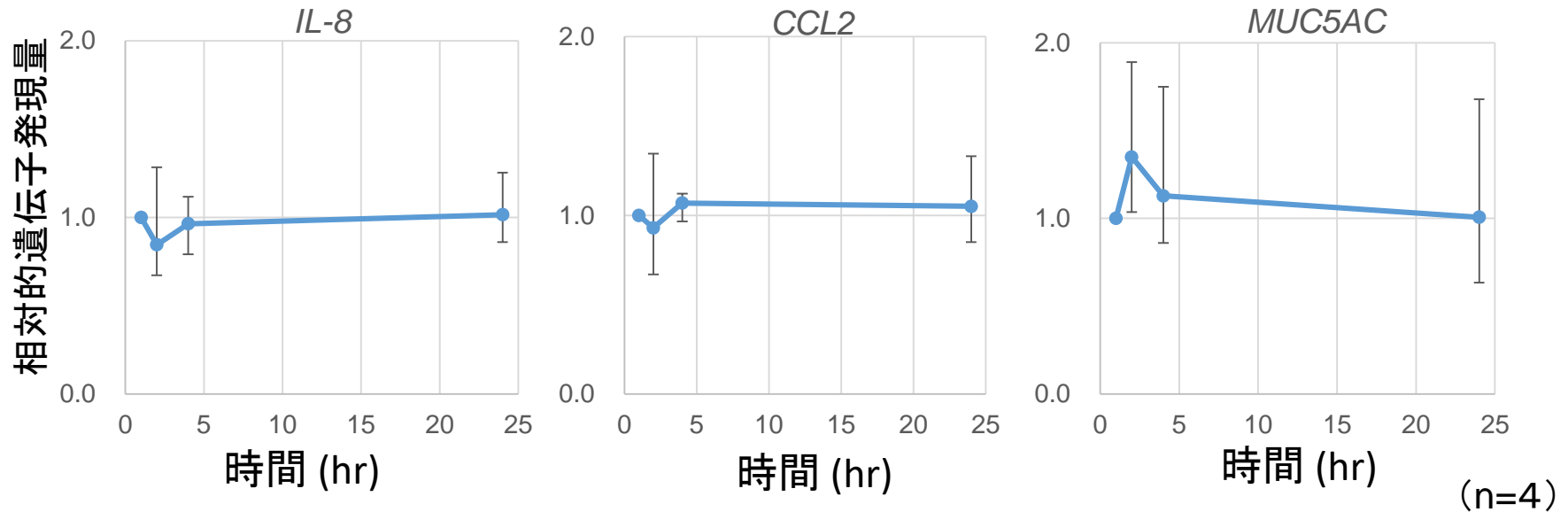
MCP-1; IL-1及びIL-6の産生誘導等をする

● ; IL-1 β 0 ng/mL、● ; IL-1 β 0.03 ng/mL、● ; IL-1 β 0.1 ng/mL (n=12)

- A549細胞へIL-1 β をばく露させた後、硫酸水素アンモニウムを1 mg/mLまでばく露しても、TNF- α 及びMCP-1産生に影響を与えなかった。

感受性を高めた(炎症状態にある) A549細胞 への液相ばく露実験結果(4)

(遺伝子発現について)



0.03 ng/mL IL-1 β を3時間ばく露後、0.3 mg/mL硫酸水素アンモニウムをばく露した。

- IL-8: ばく露による影響を与えなかった。
- CCL2 (MCP-1): ばく露による影響を与えなかった。
- MUC5AC(粘液形成関連): ばく露による影響を与えなかった。

3. 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 (富士フィルム和光純薬一級98%)	0.001~1 mg/mL
陰性対照 (NC)	リン酸緩衝生理食塩水
陽性対照 (PC)	メナジオン (令和2年度の予備実験により検討済)
ばく露時間	30分~3時間、24時間、7、17時間 (追加)
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)

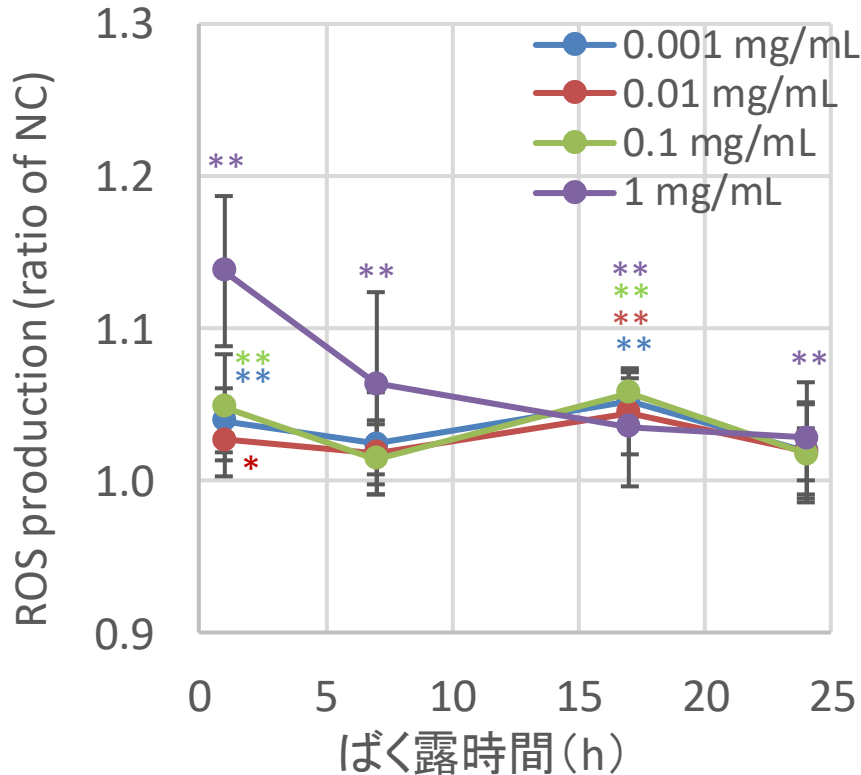
解析方法

硫酸水素アンモニウムを細胞へばく露した時の測定値について、NCの測定値に対する比を算出した。

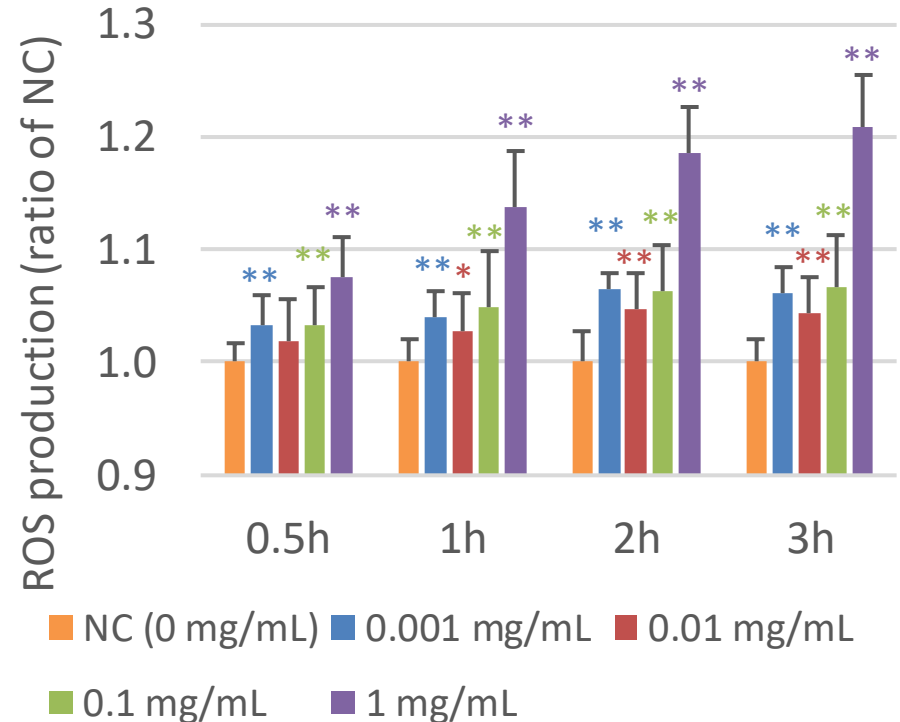
A549細胞への液相ばく露結果

A549細胞に硫酸水素アンモニウムを0.5~24時間ばく露した。

1~24時間ばく露
(染色時間1時間)



0.5~3時間ばく露
(同一試料を経時的に測定)



* ; $p < 0.05$ ** ; $p < 0.01$

(n=9~21)

- いずれの濃度においても、わずかにROS産生量が増加した。
- 低濃度域における濃度依存性は見られなかったが、最もROS産生量が増加したのは高濃度 (1 mg/mL) をばく露した時であった。

4. Calu-3細胞への液相ばく露実験

目的:

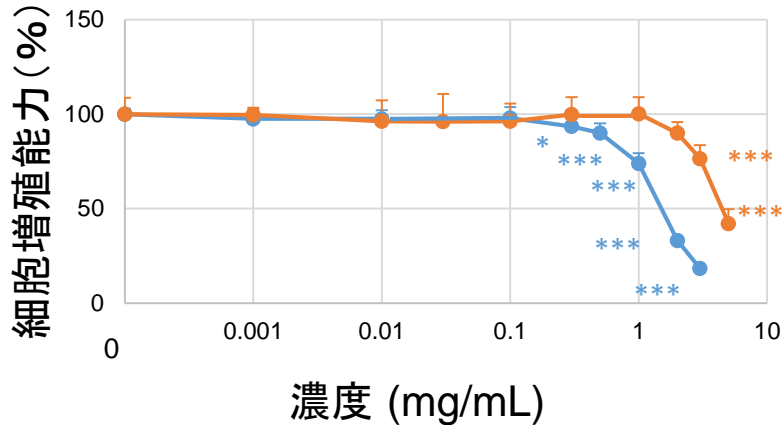
Calu-3細胞へ硫酸水素アンモニウムをばく露し、その影響を調べる。

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	0.001~3 mg/mL、超純水
ばく露時間	24時間(HO-1は3時間)

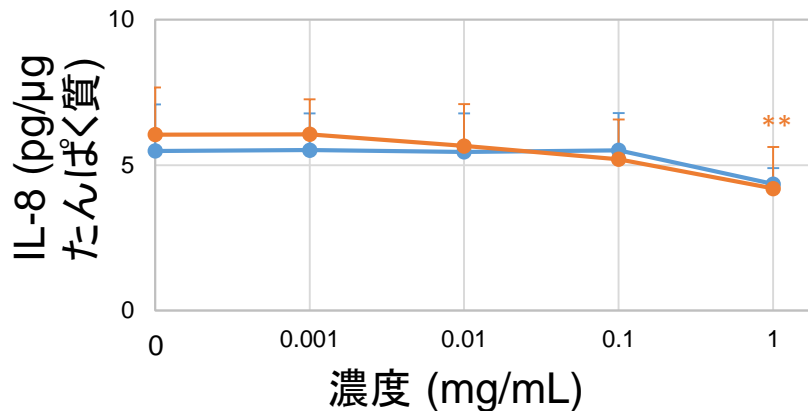
測定項目	
細胞障害作用	細胞増殖、乳酸脱水素酵素 (LDH)
炎症因子	IL-8、IL-6
酸化ストレスマーカー	HO-1、還元型グルタチオン(GSH)
遺伝子発現	IL-8、CCL-2(MCP-1)、MUC5AC(粘液形成関連)等

Calu-3細胞への液相ばく露実験結果(1)

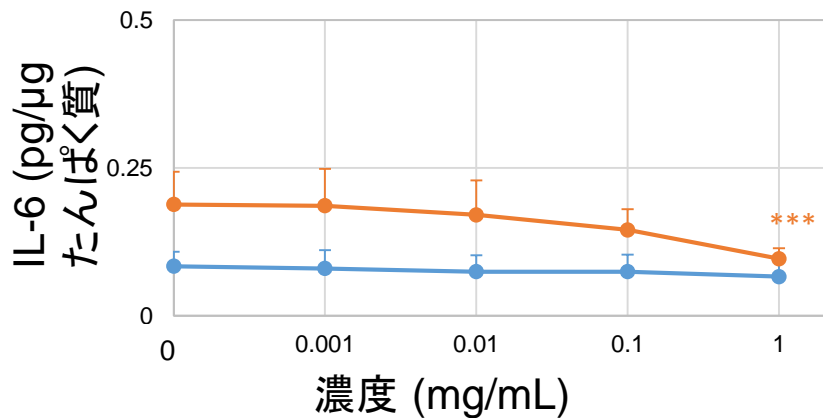
細胞増殖能力



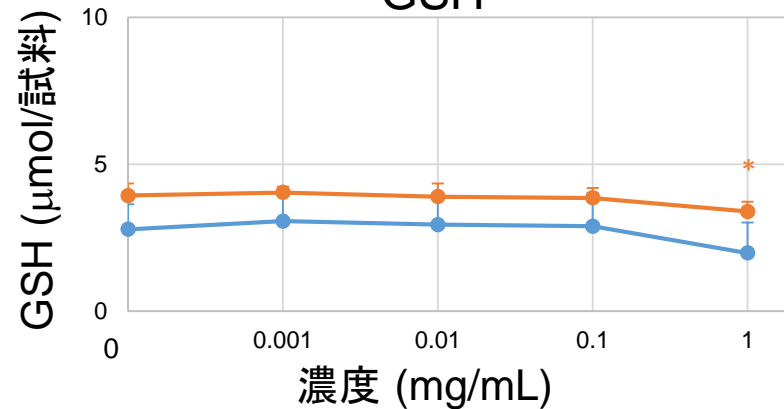
IL-8



IL-6



GSH



● ; 硫酸水素アンモニウム、● ; 硫酸アンモニウム

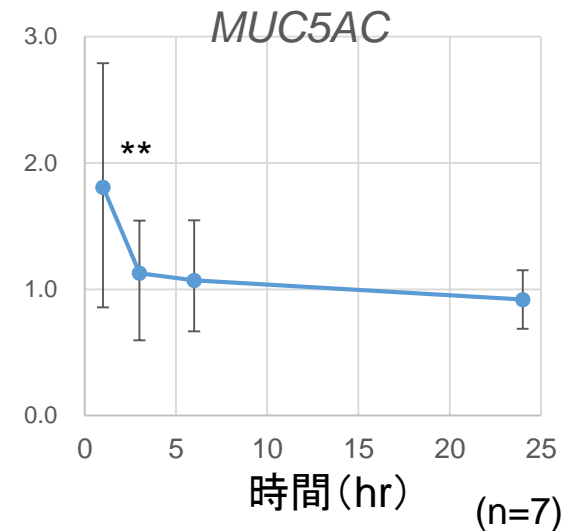
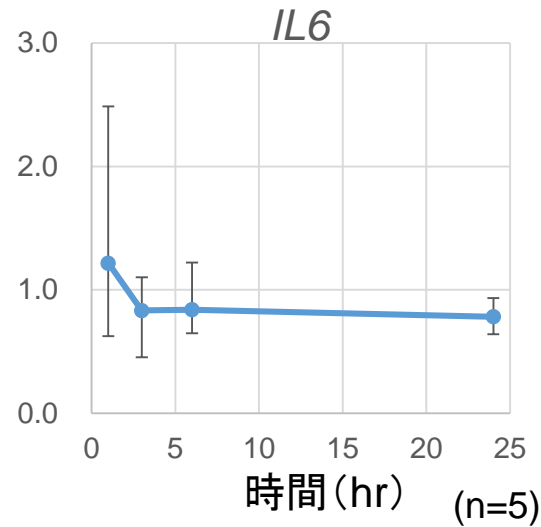
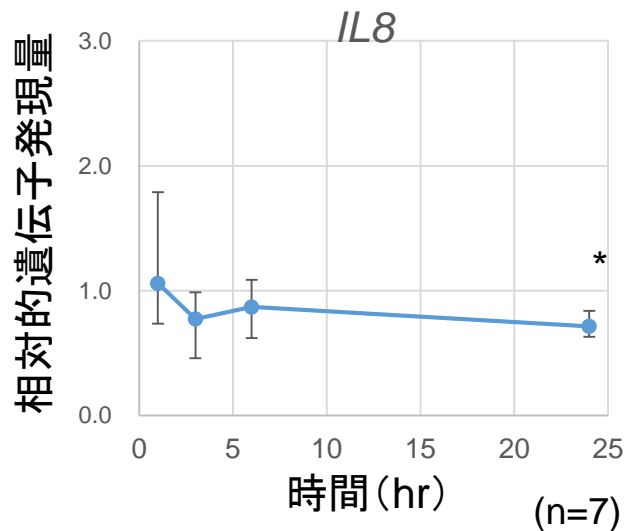
*; p<0.05、**; p<0.01、***; p<0.001

(n=12)

- 細胞増殖能力は0.3 mg/mL以上のばく露で減弱。
- IL-8、IL-6、GSH: 変化なし。
- LDH、HO-1: 不検出。

Calu-3細胞への液相ばく露実験結果(2)

(遺伝子発現について)



*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$

- *IL-8*は、ばく露24時間で発現量が減弱した。
- *IL-6*は、発現量に変化なし。
- *MUC5AC*は、ばく露1時間で発現量が増強した。
- これら以外の遺伝子、*IL-4*、*IL-5*、*IL-13*、*IL-25*、*IL-33*、インターフェロン- γ 、*TSLP* (*thymic stromal lymphopoietin*)、*CCL2* (*MCP-1*) は、変化なし。

5. Calu-3細胞の細胞膜間結合力 に関する測定(予備実験)

背景:

- ・ヒト気管支由来Calu-3細胞は細胞膜間結合力が強いとされる
- ・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

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。

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。

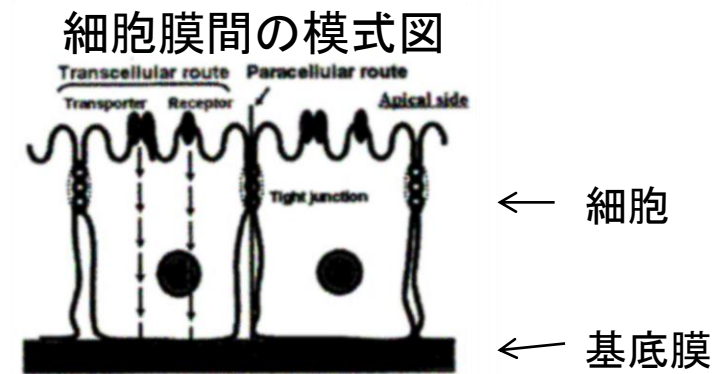


Fig. 1. Schematic Scheme of Transport Route in Epithelia

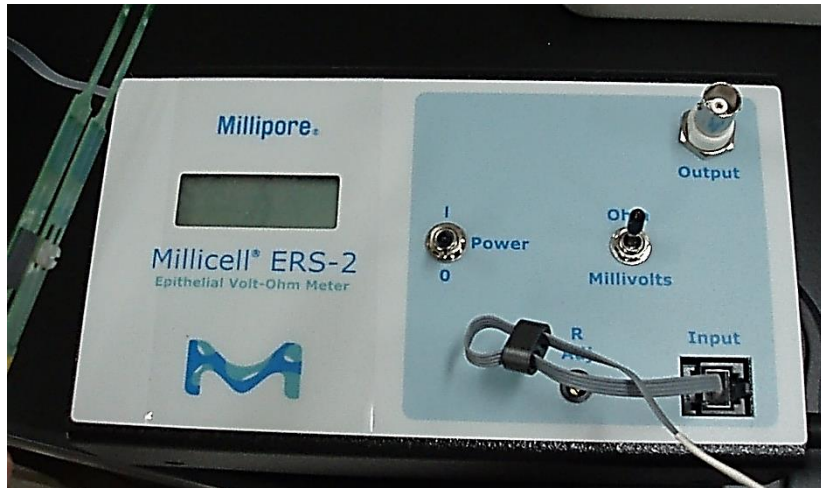
測定に使用する機器・測定項目

インサート: FALCON® Cell Culture Inserts 12Well (メンブレン面積: 0.9 cm²)

使用機器: **Millicell® ERS-2** (epithelial volt-ohm meter) (ミリポア)

測定項目: **TEER** (Trans-epithelial electrical resistance、経上皮電気抵抗)

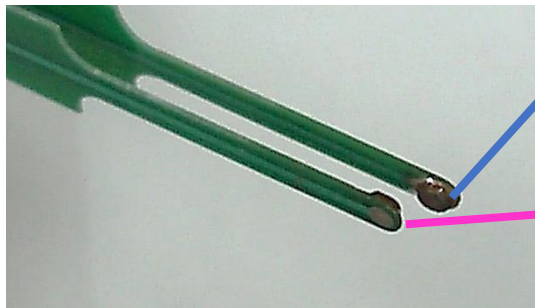
・ 機器本体



・ 電極 (STX3)

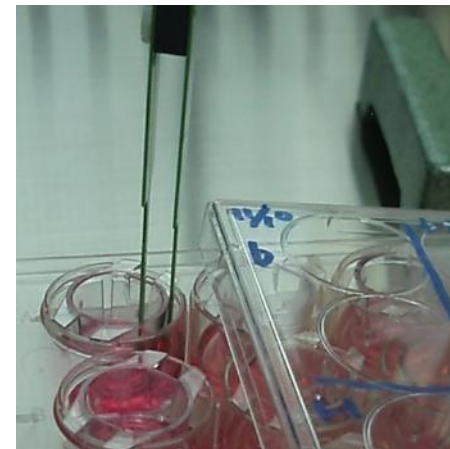


・ 電極の先端



インサート外側 (長端)
サンプルを通過する電流を流す

インサート内側 (短端)
電圧センサー



TEER測定方法及び原理

細胞を播種したインサートと外部培地に電極を挿入する



細胞が隙間なく生え、細胞膜間の結合力が高まると電流の透過が制限

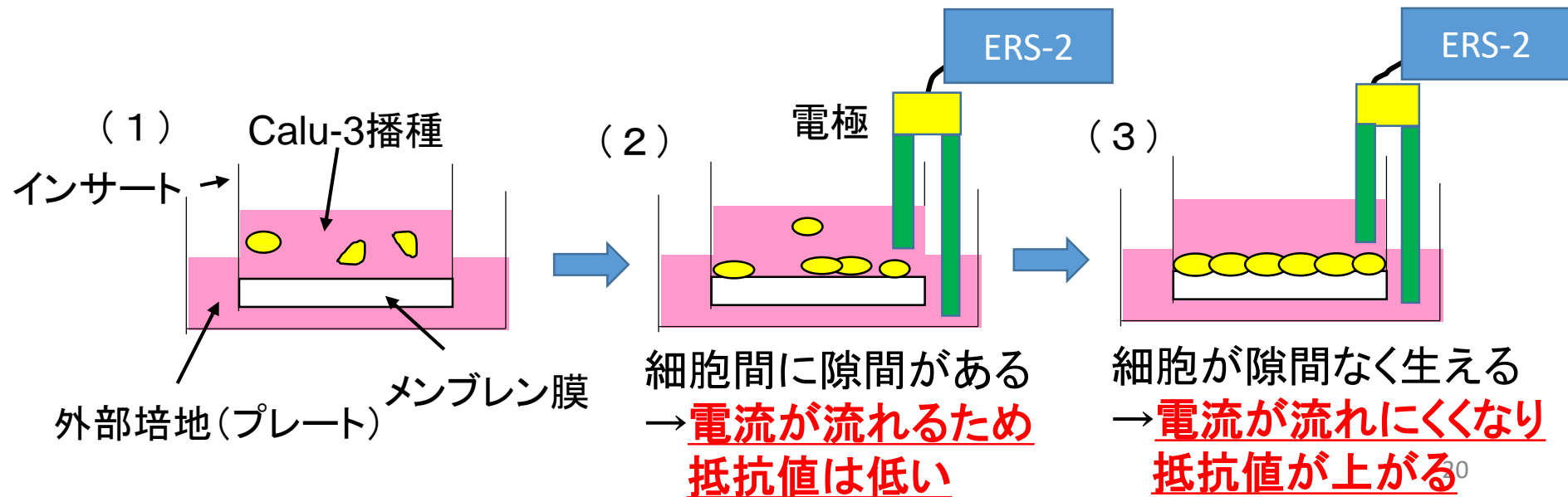


抵抗が生じる(測定値の単位: Ωcm^2)

・今年度: **TEER値が最大値に達する(=細胞が隙間なく生える)条件検討**

細胞播種数: ① 2.0×10^5 cells/cm²
② 5.0×10^5 cells/cm²*] → 経時的にTEER測定

※B.I. Florea et al.: J CONTR REL., 87, 131-138, 2003.



測定時の注意・改善点

注意点:測定中に電極がわずかでも動くと、数値が変動する

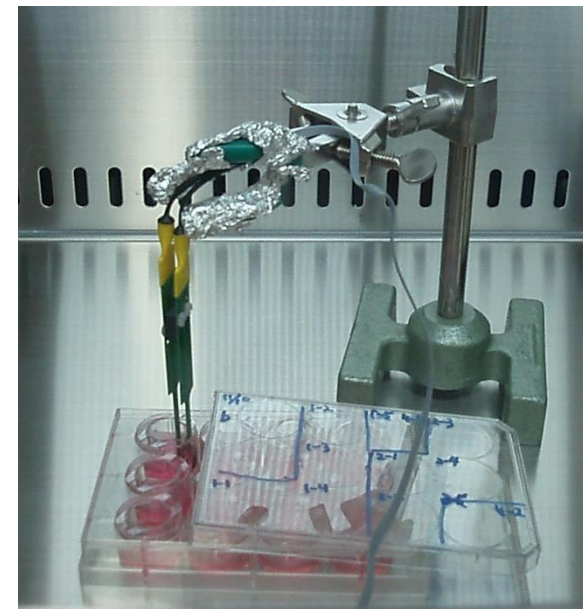
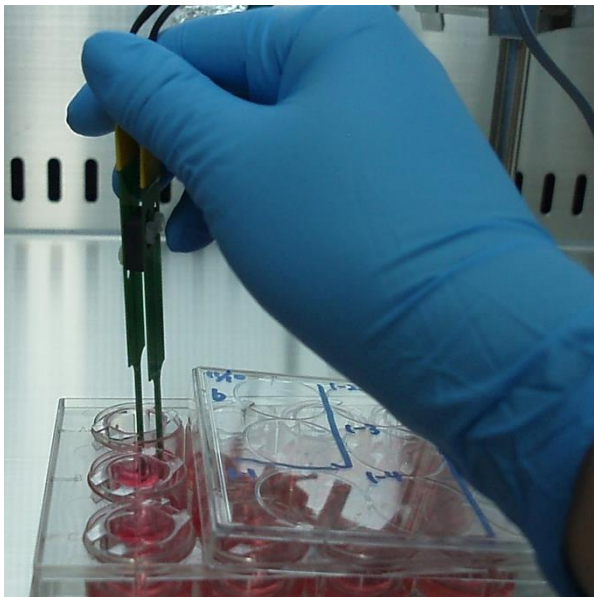
- ・手の微細な動きが数値に影響。
- ・より低抵抗で精密な検査の場合、別種の電極が使用されることもあり。

注意点:電極を固定する方法の検討

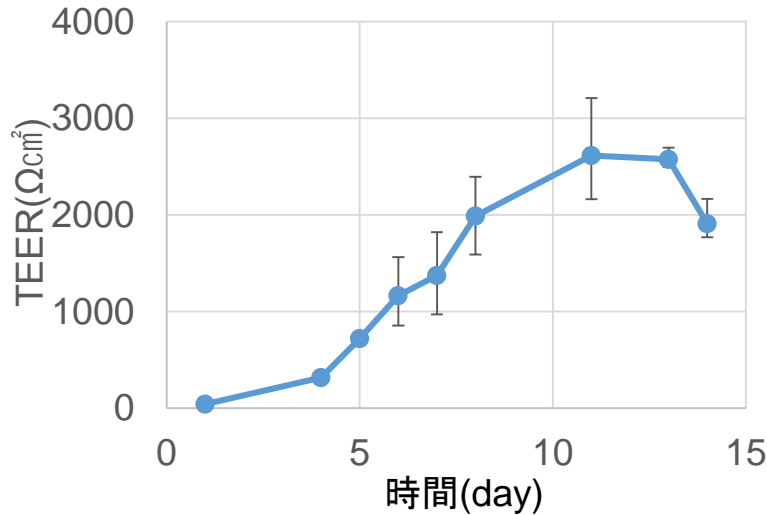
- ・電極短端がメンブレン膜に触れると細胞が剥がれるため、角度調整が必要。

改善点:スタンドとクランプで電極固定

- ・動きが軽減され、比較的安定した測定が可能。
- ・同一サンプルを複数回測定し、平均値を採用。



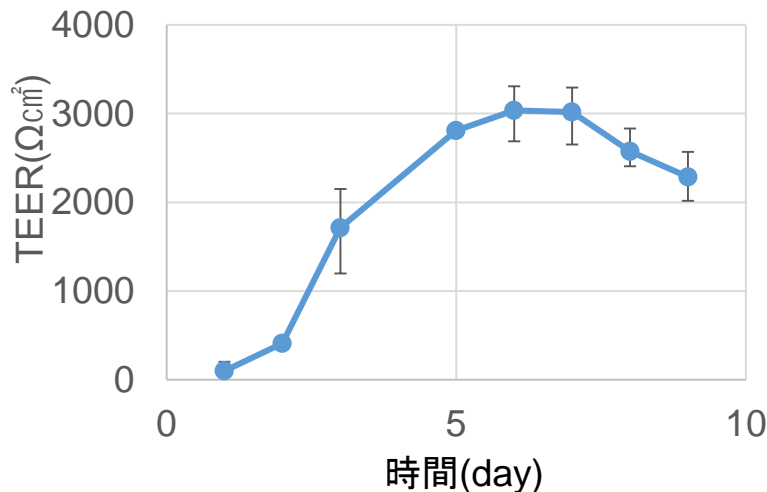
結果



① 2.0×10^5 cells/cm²

- ・ 検鏡により細胞増殖確認
- ・ 最大TEER (平均)

→ 11日目・約2600 Ωcm²
(個別の最大値は約3200 Ωcm²)



② 5.0×10^5 cells/cm²

- ・ 検鏡により細胞増殖確認
- ・ 最大TEER (平均)

→ 6日目・約3030 Ωcm²
(個別の最大値は約3300 Ωcm²)

(n=4、一部n=1~2)

- ・ 最大TEER値はともに約3000 Ωcm²以上。
- ・ 検鏡で隙間無く細胞が生えていることを確認。

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
実験条件及びTEER値は

- ① 播種数: 5.0×10^5 cells/cm²
- ② 培養日数: 約1週間
- ③ TEER値: 約3000 Ωcm²

である。

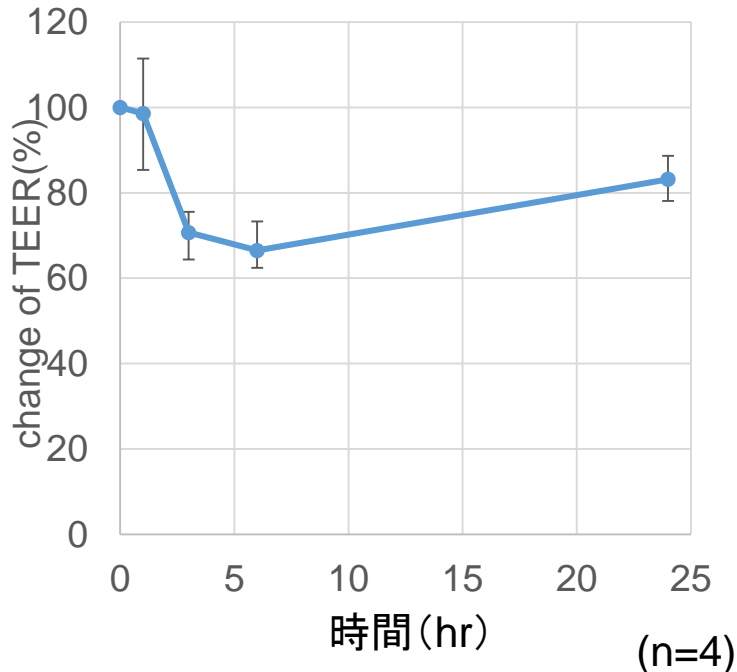
- 実験用細胞は複数準備。
- TEER値が3000 Ωcm²以上の細胞ばく露実験に使用。

酸化チタンばく露実験

目的：酸化チタンが陽性対照として使用可能か調べる。

- ・ 使用細胞：TEERが3000 Ωcm^2 を超過したCalu-3細胞
- ・ ばく露濃度：50 $\mu\text{g/mL}$ （既報参照）
- ・ ばく露時間：1、3、6、24時間

★結果



・ 3時間ばく露で約70%、6時間ばく露で約65%まで低下。24時間ばく露では約80%に上昇（酸化チタンによる結合力の低下は一過性）。

↓

今回の条件において、陽性対照として使用可能と判断。

考察及びまとめ(1)

1. A549細胞へのばく露結果について

- 液相ばく露では、0.1 mg/mL以上で細胞増殖能力の減弱、1 mg/mLで炎症因子の増強が見られた(令和2年度実験結果)。
- 気相ばく露では、高濃度(100 mg/m³)までばく露しても、影響は見られなかった。
- 感受性が高まった(炎症状態にある)A549細胞では、炎症因子へ影響は見られなかった。
- 以上の結果から、A549細胞への硫酸水素アンモニウムばく露の影響は強くないと考えられる。

考察及びまとめ(2)

- 酸化ストレスについて、マーカーであるHO-1及びGSHの有意な変化は見られなかった(令和2年度実験結果)が、細胞内ROS産生量は有意な増加が見られた(令和3年度実験結果)。
- このことから、産生されたROSは、細胞内に存在している抗酸化物質によって、あるいはHO-1やGSHを介さない経路で消去された可能性が考えられる。
- 細胞内ROSについて、硫酸アンモニウムを液相ばく露した報告*と比較したところ、同レベルの産生量であった。

* 硫酸アンモニウム30~100 μ M (0.004~0.013 mg/mL)をA549細胞に12~24時間ばく露した時、対照群に対して約1.2倍の有意なROS産生量が見られたことが報告されている(Yang Yun, 2017)。

考察及びまとめ(3)

2. Calu-3細胞へ液相ばく露について

- 細胞増殖能力は0.3 mg/mL以上のばく露で減弱した。
- IL-8、IL-6及びGSH産生に変化は見られなかった。
- *IL-8*は24時間ばく露で減弱した。*MUC5AC*は、1時間ばく露で増強した。

3. A549細胞とCalu-3細胞への液相ばく露結果を比較すると、炎症因子IL-8産生がA549細胞で増強、Calu-3細胞で減弱傾向にあった。このことから、培養細胞への作用の違いが示唆されたが、影響は強くないと考えられる。

4. Calu-3細胞の細胞膜間結合力に関する測定の予備実験を行った。来年度実施する本実験に向け、Calu-3細胞が隙間なく生える条件(播種数、培養日数)及びTEER値を確認できた。