

令和4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4年 8月

令和4年度 実験計画

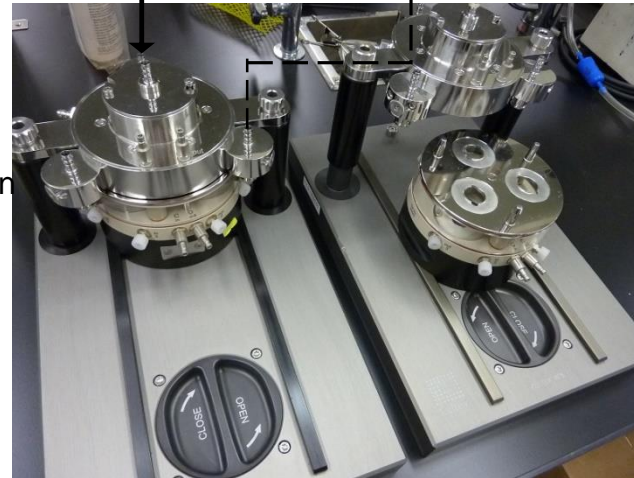
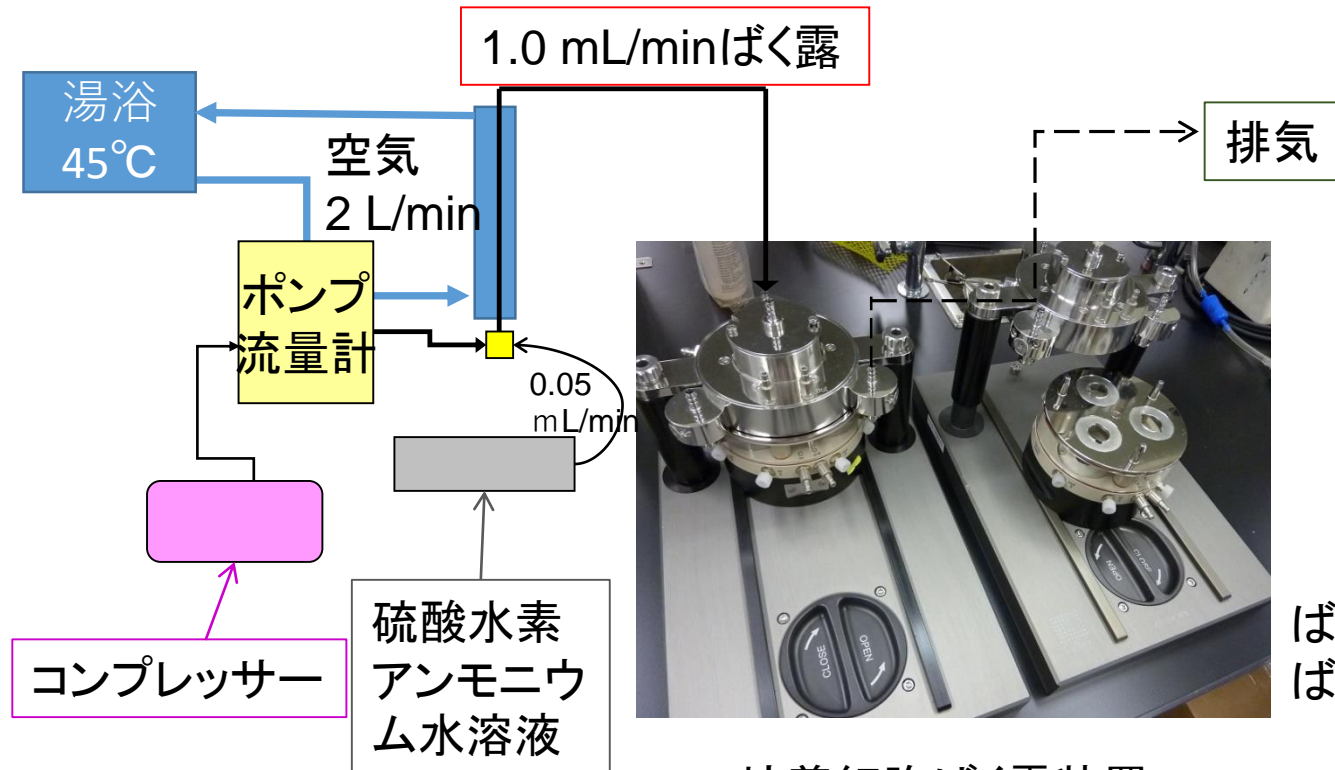
- 1 Calu-3細胞への気相ばく露実験
- 2 Calu-3細胞の細胞膜間結合力に関する測定

1 Calu-3細胞への気相ばく露実験

目的:

Calu-3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



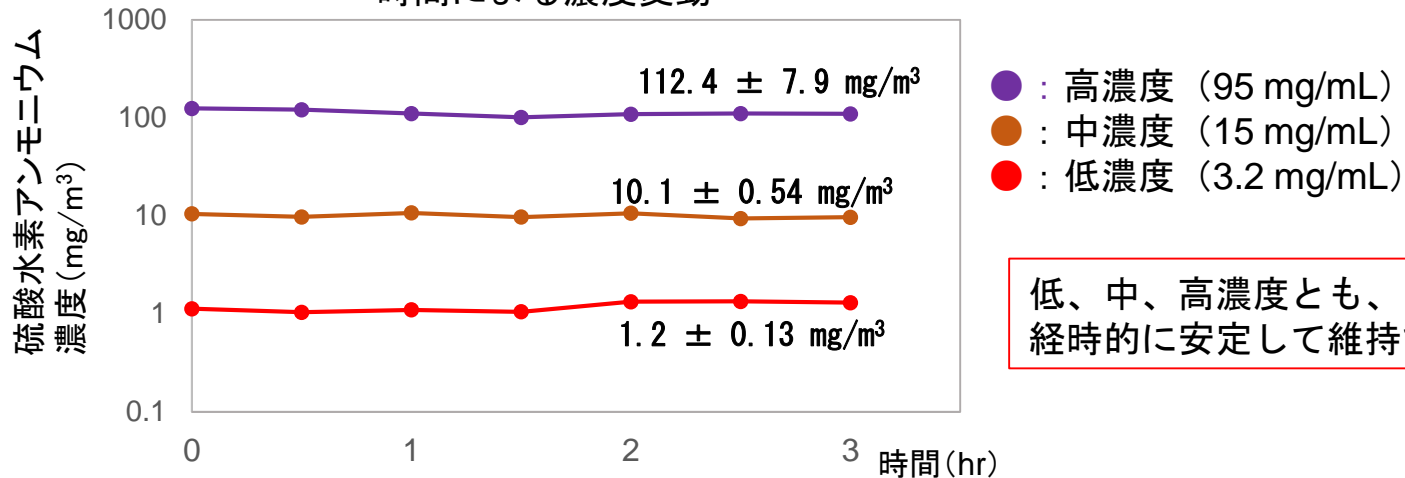
ばく露温度; 25.1°C
ばく露湿度; 69%

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

気相ばく露条件検討結果 (令和2年度報告済)

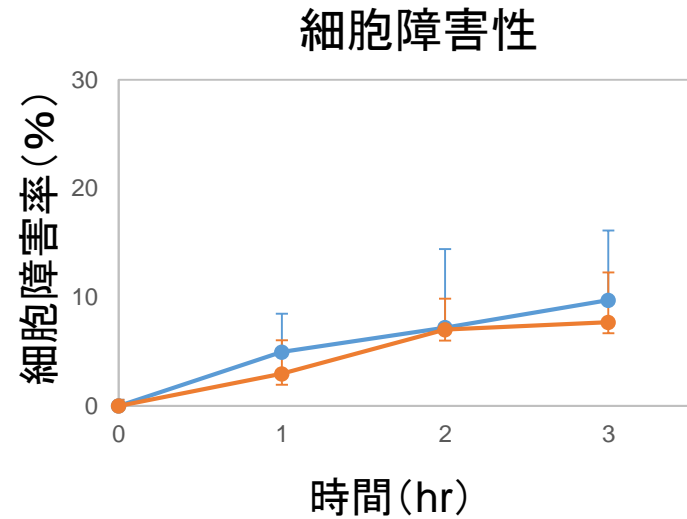
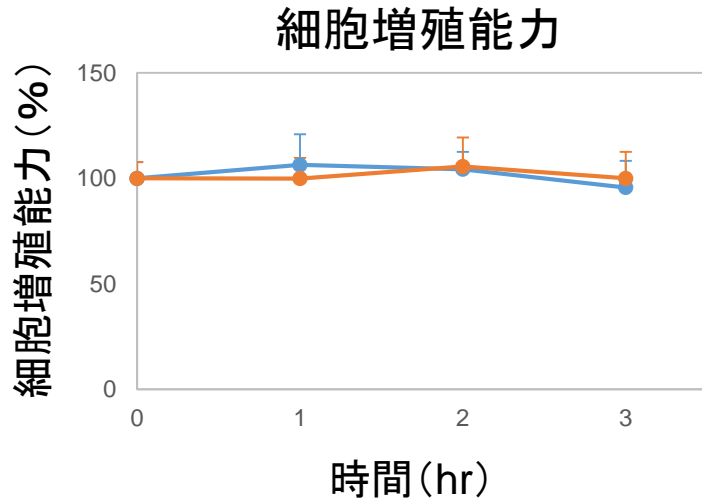
時間による濃度変動



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。

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)

Calu-3細胞への気相ばく露実験結果(1)



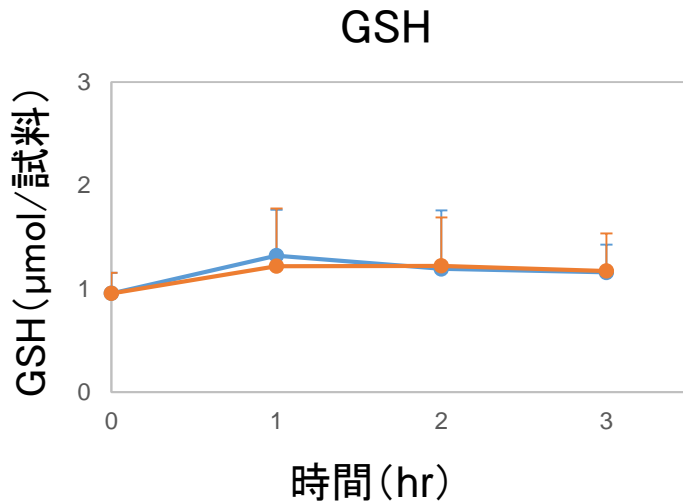
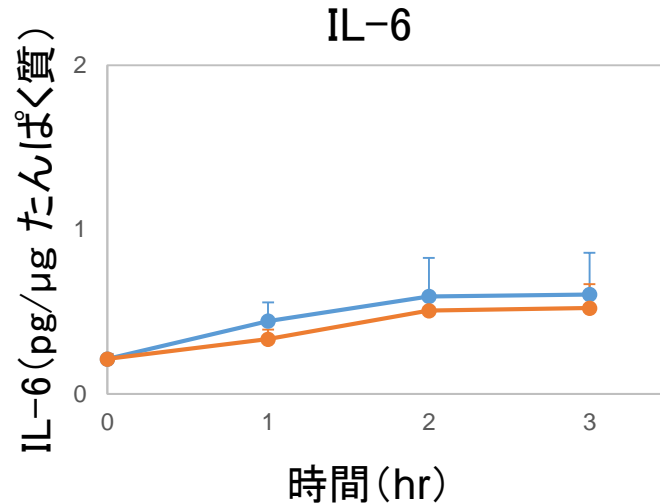
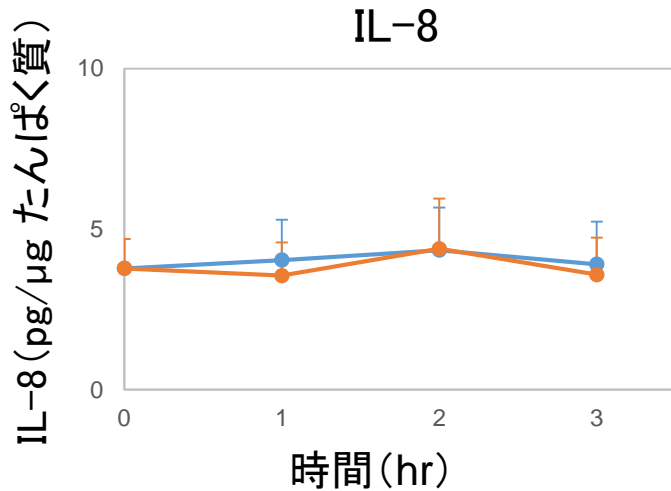
● ; 対照群、● ; 高濃度群(100 mg/m³)

(n=9)

細胞障害性はLDHを用いて表現した。

- 硫酸水素アンモニウムをばく露したCalu-3細胞では、細胞増殖能力、細胞障害性に影響はなかった。

Calu-3細胞への気相ばく露実験結果(2)



- 硫酸水素アンモニウムを気相ばく露したCalu-3細胞では、IL-8、IL-6、GSH産生に影響はなかった。
- HO-1は検出されなかった。

● ; 対照群、● ; 高濃度群(100 mg/m³)

(n=9)

2 Calu-3細胞の細胞膜間結合力に関する測定

背景:

- ・ヒト気管支腺由来である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(TEER)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4年度の実験計画:

令和3年度に検討及び確立した手法を用いて硫酸水素アンモニウムを液相ばく露したCalu-3細胞の細胞膜間結合力を測定する

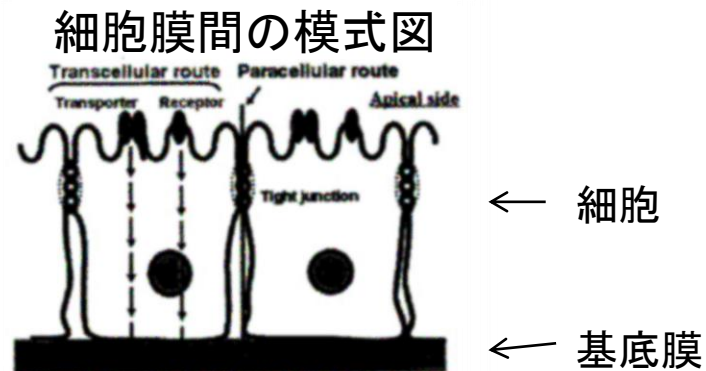


Fig. 1. Schematic Scheme of Transport Route in Epithelia

【昨年度の検討結果】

インサートのメンブレン膜上に隙間なくCalu-3細胞が生える条件及びその際のTEER (Trans-epithelial electrical resistance、経上皮電気抵抗) 値は以下の通り

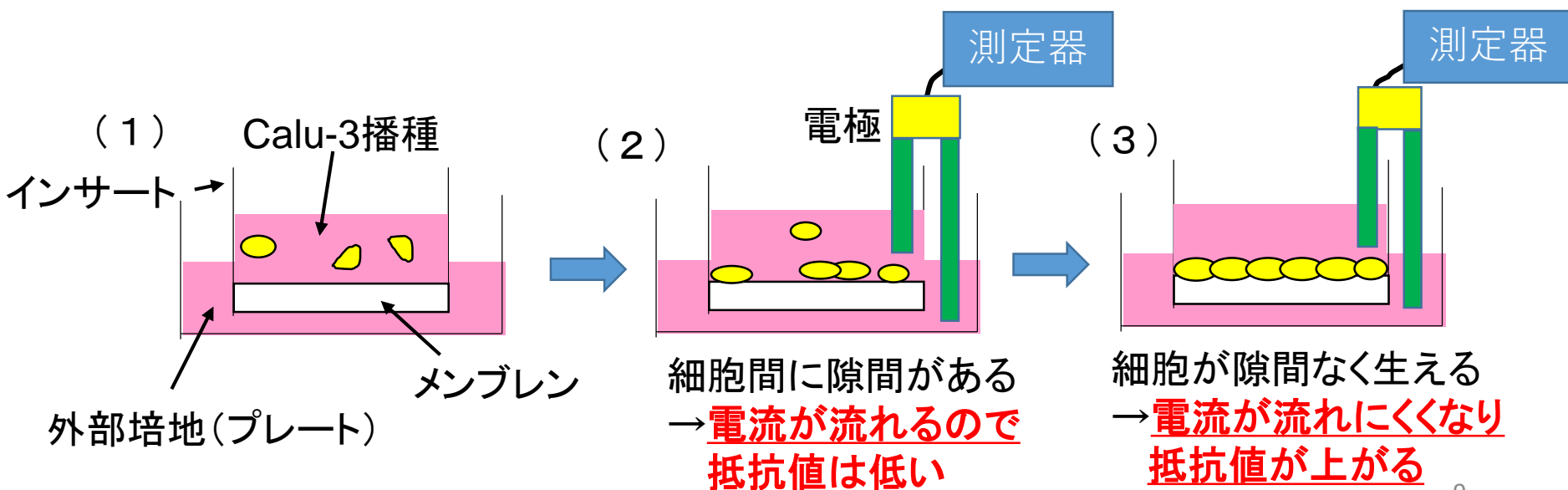
①細胞播種数： 5.0×10^5 cells/cm²

②培養日数：約7日間

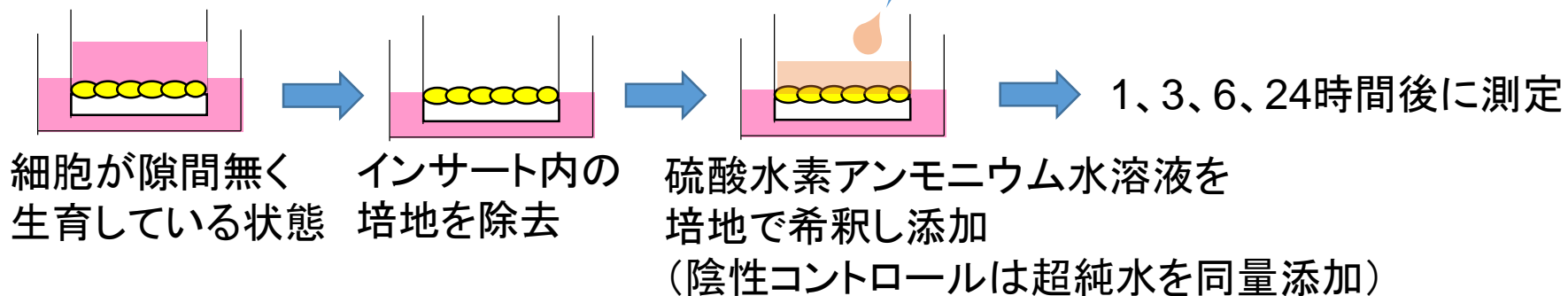
③TEER値：約3000 Ωcm²以上

- ・細胞は複数well播種
- ・TEER値が約3000 Ωcm²を超過したものをばく露実験に使用
- ・酸化チタンはTEERを低下させる陽性コントロールとして使用可能

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(液相ばく露)	0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/mL、超純水
ばく露時間	24時間(1,3,6,24時間後に計測)
陽性コントロール	酸化チタン 50 μ g/mL
測定項目	TEER(経上皮電気抵抗)



当初検討したばく露方法

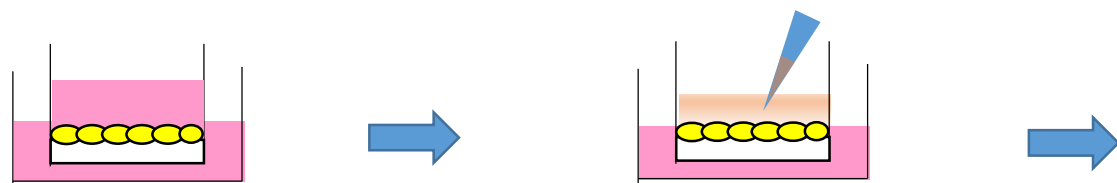


- 培地除去直後はTEERが安定しない
- 超純水(陰性コントロール)でもTEER低下

- 陰性コントロール及び硫酸水素アンモニウムの添加方法等について再検討

再検討したばく露方法(現在実験継続中)

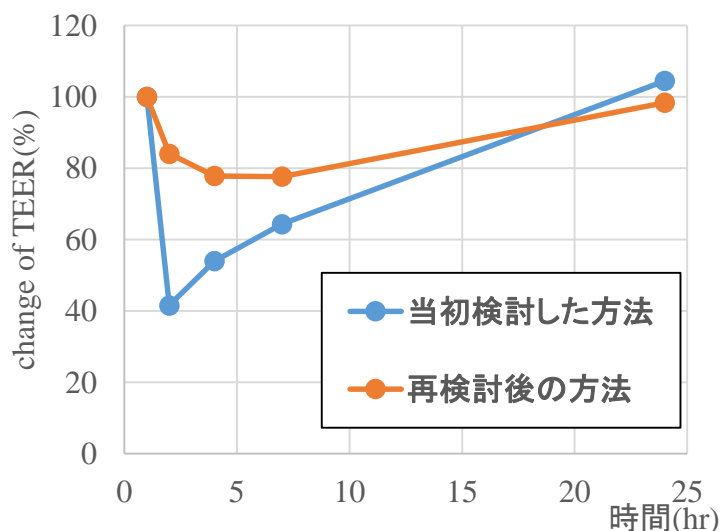
- ・陰性コントロールは培地(硫酸アンモニウムと等量添加)
- ・硫酸水素アンモニウムを培地に溶解し以下の方法で添加



1、3、6、24時間後に測定

培地を交換し
数時間～1日培養

終濃度がばく露濃度となるよう
溶解した硫酸水素アンモニウムを
添加しピペティングで混和



【参考】

硫酸水素アンモニウム0.03 mg/mLばく露(n=2)

- ・培地除去直後ばく露→1時間で40%程度に低下
- ・培地交換翌日ばく露→80%程度で推移

培地除去により一時的にTEERが低下した可能性

まとめ

1. Calu-3細胞への硫酸水素アンモニウム気相ばく露実験は、高濃度では、各測定項目に影響はみられなかった。現在、気相ばく露実験を継続中である。
2. 細胞膜間結合力の測定については、硫酸水素アンモニウムのばく露方法を再検討し、試行中である。現在、細胞の増殖及びばく露実験を継続中である。