

## 第3章 培養細胞への硫酸水素アンモニウムばく露実験

### I 目的

PM<sub>2.5</sub>は、粒径が小さいことから、体内に取り込まれた際、PM<sub>2.5</sub>中に含まれる化学物質が肺の奥深くまで到達する懸念がある。平成28年度から令和元年度までの調査<sup>1)</sup>で、都内大気PM<sub>2.5</sub>中から、微量ではあるが、硫酸水素アンモニウムが検出されたが、硫酸水素アンモニウムの生体及び培養細胞への影響についての報告は少ない。そこで本研究では、硫酸水素アンモニウムのばく露による培養細胞への影響を調べるため、A549細胞及びCalu-3細胞への気相又は液相ばく露実験を行った。さらに、IL-1βをばく露して感受性を高めた（炎症状態にある）A549細胞を作製し、液相ばく露実験を行い、炎症の増悪作用についても調査した。測定項目は、炎症因子、遺伝子発現、活性酸素種ROS（Reactive Oxygen Species）及び細胞膜間結合力であり、これらの結果から、生体への影響について考察を行った。

### II 方法

#### 1 気相ばく露

##### (1) 培養細胞

培養細胞は、A549細胞（American Type Culture Collection、No. CCL-185）及びCalu-3細胞（American Type Culture Collection、No. HTB-55）を用いた。肺胞上皮にはI型及びII型が存在するが、A549細胞はII型のヒト肺胞上皮由来細胞である。Calu-3細胞は、ヒト気管支上皮腺がん由来の培養細胞である。

##### (2) 試薬

硫酸水素アンモニウム（1級）及び細胞傷害能力測定用試薬〔乳酸脱水素酵素（以下LDHと略す）—細胞毒性テスト〕は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。RPMI1640液体培地、MEM液体培地、0.25%トリプシン-EDTA及び牛胎児血清（以下FBSと略す）はGIBCO<sup>®</sup>（Thermo Fisher Scientific）製を用い、細胞増殖アッセイキット（cell counting kit-8、WST-8/1-Methoxy PMS混合液）及びGSSG/GSH Quantification KitはDOJINDOから購入した。DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development kit human CXCL8/IL-8、DuoSet<sup>®</sup> ELISA Human IL-6及びELISA DuoSet<sup>®</sup> IC Human Total HO-1/HMOX1 ELISAはR&D SYSTEMS製を用いた。

##### (3) 気相ばく露装置

培養細胞気相ばく露は、Cultex<sup>®</sup> RFSシステム（Cultex<sup>®</sup> Laboratories GmbH）を用いた。ばく露装置の写真及び模式図を図1に示す。

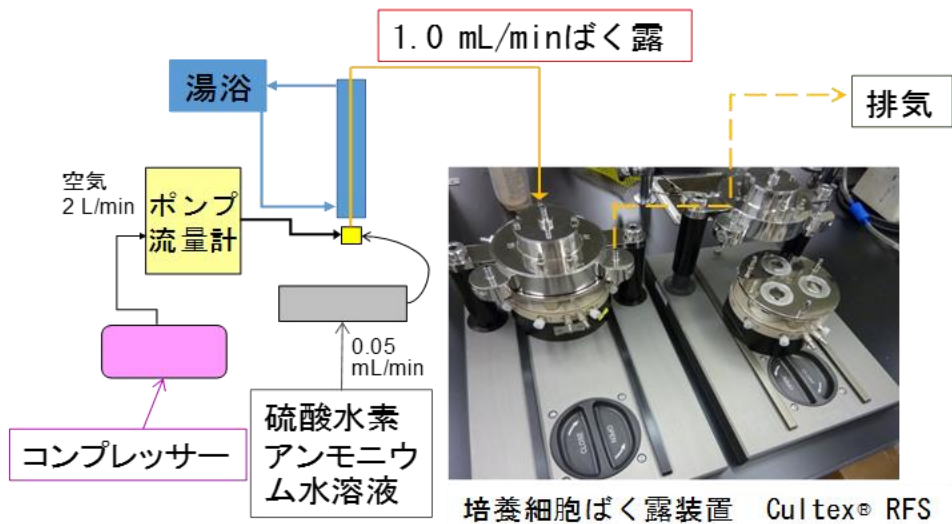


図1. 培養細胞気相ばく露装置模式図

#### (4) 硫酸水素アンモニウム気相化

硫酸水素アンモニウムを超純水に溶解して3段階の濃度の水溶液とし、この水溶液を0.05 mL/minの速度で、流速2 L/minの空気中へ分散させて気相化した。各濃度の気相化した硫酸水素アンモニウムを1.0 mL/minの流速でCultex® RFSへ導入し、硫酸水素アンモニウムばく露濃度が設定した濃度になるようにした。硫酸水素アンモニウムばく露濃度は、低濃度(1 mg/m<sup>3</sup>)、中濃度(10 mg/m<sup>3</sup>)及び高濃度(100 mg/m<sup>3</sup>)に設定した。また、対照群は、乾燥空気を活性炭に通過させた後、超純水の入ったインピンジャーを通過させて加湿した空気をばく露した群とし、ばく露中の湿度は、湿度計を用いて測定した。実験データは、同一ばく露時間の硫酸水素アンモニウムばく露群と対照群を比較した。

#### (5) 細胞の処理

A549細胞は、トリプシン-EDTAを用いてフラスコから剥がし、10%FBS含有RPMI1640培地を入れた12ウェルプレートのウェル内に置いたインサート(面積0.9 cm<sup>2</sup>)に $1.7 \times 10^5$ 個を播種し、インサートのメンブラン上で37°C、5%CO<sub>2</sub>・95%airの条件下で3日間培養した。A549細胞を培養したインサートは、1%FBS含有RPMI1640培地を入れたCultex® RFSに設置し、気相化した硫酸水素アンモニウム又は清浄空気を1.0 mL/minの流速で、1、2及び3時間ばく露した。ばく露後は、インサートを新しい1%FBS含有RPMI1640培地0.6 mLの入ったプレートのウェルに入れ、さらにLDH、IL-8、IL-6測定用インサート内には同培地を0.5 mL加え、37°C、5%CO<sub>2</sub>・95%airの条件下で培養した。

Calu-3細胞は、A549細胞と同様の方法で処理を行ったが、用いた培地は10%FBS含有MEM培地、又は1%FBS含有MEM培地とし、インサートへは $2.5 \times 10^5$ 個を播種した。

実験は、1回に3個のインサートを使用し (n=3)、同じばく露条件の実験を3回繰り返した。したがって、ばく露時間ごとの検体数は n=9 である。

## (6) 測定項目

細胞増殖能力、細胞傷害性、炎症因子の IL-8 及び IL-6、酸化ストレスマーカーのヘムオキシゲナーゼ-1 (以下 HO-1 と略す) 及び還元型グルタチオン (以下 GSH と略す) について測定した。なお、細胞傷害性は培地中の LDH 濃度を用いて表現した。LDH は、外因性の細胞膜損傷によって放出される酵素である。IL-8 及び IL-6 は、気管支ぜん息等の気道の炎症性疾患において、肺胞上皮細胞や気道上皮細胞から産生される炎症性サイトカインである<sup>2,3)</sup>。また、活性酸素は、呼吸で取り込まれた酸素が体内で変化したものであり、紫外線や大気汚染物質、たばこ煙によって、生成が促進されることが知られている<sup>4)</sup>。活性酸素による酸化ストレスは、炎症性疾患のぜん息等の悪化に関与しており、HO-1 及び GSH は、酸化ストレスに対して生体を防御する作用を有する因子である<sup>5,6)</sup>。

### ア 細胞増殖能力

ばく露後 24 時間培養した A549 細胞又は Calu-3 細胞に WST-8/1-Methoxy PMS 混合液を 1/10 量加えた培地を入れ、更に 1 時間培養してからマイクロプレートリーダー (Multiskan FC、Thermo Fisher Scientific) により波長 450 nm における培地の吸光度を測定した。細胞増殖能力は、気相ばく露をしていない (ばく露時間 0 時間) 培養細胞の培地の吸光度を 100% として算出した。

### イ 細胞傷害性

ばく露後 24 時間培養した A549 細胞又は Calu-3 細胞の培地を回収し、LDH-細胞毒性テストを用いて、マイクロプレートリーダーにより波長 550 nm における吸光度を測定した。細胞傷害性は、気相ばく露をしていない A549 細胞又は Calu-3 細胞を 24 時間培養した培地の吸光度を 0% (陰性対照群) とし、0.1% Tween20 含有 1% FBS 含有 RPMI1640 培地で 24 時間培養した A549 細胞の培地、又は 0.1% Tween20 含有 1% FBS 含有 MEM 培地で 24 時間培養した Calu-3 細胞の吸光度を 100% (陽性対照群) として、細胞傷害率を算出した。

### ウ IL-8 濃度

ばく露後 24 時間培養した A549 細胞又は Calu-3 細胞の培地を回収し、DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development kit human CXCL8/IL-8 を用いて、マイクロプレートリーダーにより波長 450 nm における吸光度を測定し、IL-8 濃度を定量した。また、培地回収後の細胞をトリプシンで剥がし、リン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS と略す) で 2 回洗浄した後、細胞溶解用液 (1mM EDTA、0.5% Triton X-100、たんぱく質分解酵素阻害剤含有 PBS) を用いて作製した細胞溶解液のたんぱく質濃度を測定した。さらに、この値を用いて IL-8 濃度をたんぱく質

濃度当たりの値として標準化した。細胞溶解液のたんぱく質濃度は、Lowry 法<sup>7)</sup>を用いて定量した。

## エ IL-6 濃度

ばく露後 24 時間培養した A549 細胞又は Calu-3 細胞の培地を回収し、DuoSet<sup>®</sup> ELISA Human IL-6 を使用して、波長 450 nm における吸光度を測定して定量した。IL-6 濃度は、細胞溶解液のたんぱく質濃度当たりの値として標準化した。

## オ HO-1 濃度

ばく露後 3 時間培養した A549 細胞又は Calu-3 細胞を細胞溶解用液で溶かし、細胞溶解液を調製した。DuoSet<sup>®</sup> IC Human Total HO-1/HMOX1 ELISA を使用して、波長 450 nm における吸光度を測定して HO-1 濃度を定量した。HO-1 濃度は、細胞溶解液のたんぱく質濃度当たりの値として標準化した。

## カ GSH 濃度

ばく露後 24 時間培養した A549 細胞又は Calu-3 細胞を 10 mmol/L 塩酸で溶かした試験液を用い、GSSG/GSH Quantification Kit を使用して、波長 405 nm における吸光度を測定して GSH 濃度を定量した。

## 2 液相ばく露

### (1) 培養細胞

培養細胞は、1 (1) と同じものを使用した。

### (2) 試薬

細胞増殖能力、細胞傷害性、IL-8 濃度、IL-6 濃度、HO-1 濃度及び GSH 濃度には、1 (2) と同じ試薬を使用した。

A549 細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析において、RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用い、cDNA への逆転写反応は RT<sup>2</sup> First Strand Kit (QIAGEN) を用いた。遺伝子プライマーの配置を行ったカスタムプレートは Custom RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assay (96) plate (QIAGEN、Cat.No:CLAH33859) を、PCR は RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix (QIAGEN) を用いた。網羅的遺伝子解析カスタムプレートに配置されていない炎症関連因子の個別遺伝子発現解析は、プローブ及びプライマーセットとして、TaqMan<sup>™</sup> Gene Expression Master Mix 及び TaqMan<sup>™</sup> Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

### (3) 細胞の処理

A549 細胞は、必要時にトリプシン-EDTA を用いてフラスコから剥がし、10%FBS 含有 RPMI1640 培地を用いて 96 ウェルプレートに  $2 \times 10^4$  個/ウェ

ル、又は 24 ウエルプレートに  $2 \times 10^5$  個/ウエルを播種し、1 日間培養した後、実験に供した。ばく露実験には、1%FBS 含有 RPMI1640 培地に超純水で所定の濃度に希釈した硫酸水素アンモニウムを 1/10 量加えた実験用培地を用いた。硫酸水素アンモニウムばく露濃度は、0.001 mg/mL から 3 mg/mL の範囲とした。細胞増殖能力及び細胞傷害性は、96 ウエルプレートを用いて、1 濃度につき 8 ウエルを使用し、ばく露実験を行った (n=8)。IL-8、IL-6、HO-1 及び GSH 濃度測定は、24 ウエルプレートを用いて、1 濃度につき 4 ウエルを使用し、ばく露実験を行った (n=4)。同じばく露濃度の実験は 3 回繰り返した。したがって、ばく露濃度ごとの検体数は、細胞増殖能力及び細胞傷害性では n=24、IL-8、IL-6、HO-1 及び GSH 濃度測定では n=12 である。実験データは、1%FBS 含有 RPMI1640 培地に超純水を 1/10 量加えた実験用培地でばく露した A549 細胞を対照群とし、硫酸水素アンモニウムばく露群と比較した。

Calu-3 細胞は、必要時にトリプシン-EDTA を用いてフラスコから剥がし、10%FBS 含有 MEM 培地を用いて、96 ウエルプレートに  $4 \times 10^4$  個/ウエル、又は 24 ウエルプレートに  $2 \times 10^5$  個/ウエルを播種し、3 日間培養した後、実験に供した。液相ばく露は A549 細胞と同様の方法で行い、培地は 1%FBS 含有 MEM 培地を用いた。

#### (4) 測定項目

細胞増殖能力、細胞傷害性、IL-8、IL-6、HO-1、GSH 及び網羅的遺伝子発現について測定した。各測定項目の実験方法は以下のとおりである。なお、細胞傷害性は培地中の LDH 濃度を用いて表現した。

##### ア 細胞増殖能力

24 時間ばく露した A549 細胞又は Calu-3 細胞に WST-8/1-Methoxy PMS 混合液を培地の 1/10 量加えて更に 1 時間培養し、マイクロプレートリーダーを用いて波長 450 nm における培地の吸光度を測定した。細胞増殖能力は、対照群の培地の吸光度を 100%として算出した。

##### イ 細胞傷害性

24 時間ばく露した A549 細胞又は Calu-3 細胞の培地を回収し、気相ばく露と同様に細胞傷害性を算出した。A549 細胞は 1%FBS 含有 RPMI1640 培地、Calu-3 細胞は 1%FBS 含有 MEM 培地を用い、超純水を 1/10 量加えた実験用培地で 24 時間ばく露した対照群の培地の吸光度を 0% (陰性対照群) とし、0.1% Tween20 を含有するそれぞれの培地で 24 時間培養した A549 細胞又は Calu-3 細胞の培地の吸光度を 100% (陽性対照群) として、細胞傷害率を算出した。

##### ウ IL-8 濃度

24 時間ばく露した A549 細胞又は Calu-3 細胞の培地を回収し、気相ばく露と

同様に IL-8 濃度を算出した。

#### エ IL-6 濃度

24 時間ばく露した A549 細胞又は Calu-3 細胞の培地を回収し、気相ばく露と同様に IL-6 濃度を算出した。

#### オ HO-1 濃度

3 時間ばく露した A549 細胞又は Calu-3 細胞を細胞溶解用液で溶かした細胞溶解液を用い、気相ばく露と同様に HO-1 濃度を算出した。

#### カ GSH 濃度

24 時間ばく露した A549 細胞又は Calu-3 細胞を 10 mmol/L 塩酸で溶かした試験液を用い、気相ばく露と同様に GSH 濃度を定量した。

#### キ 遺伝子発現

A549 細胞又は Calu-3 細胞へ硫酸水素アンモニウムを液相ばく露した。ばく露方法は、24 ウェルプレートに A549 細胞又は Calu-3 細胞を  $2 \times 10^5$  個/ウェル播種し、A549 細胞は 1 日間、Calu-3 細胞は 3 日間培養した後、実験に供した。硫酸水素アンモニウムのばく露濃度は 0.3 mg/mL、ばく露時間は 1、3、6、24 時間で、ばく露後、細胞をトリプシンで剥がし、PBS で 2 回洗浄して回収した。回収した細胞から RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA を得た。

網羅的遺伝子発現解析用の対象遺伝子は、*IL-4*、*IL-5*、*IL-13*、*IL-25*、*IL-33*、インターフェロン (*INF*)  $\gamma$ 、*TSLP* (*Thymic stromal lymphopoietin*)、*CCL2* (*MCP-1*) 及び  $\beta$ -*actin* である。遺伝子プライマーの配置を行ったカスタムプレートに、1 ウェル当たり RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix (QIAGEN) 12.5  $\mu$ L、cDNA サンプル 1  $\mu$ L 及び RNase-free water 11.5  $\mu$ L を加え PCR 反応を行った。リアルタイム PCR 装置は、ABI 7500 Standard、PCR サイクル反応条件は 95°C、10 分を 1 回、95°C、15 秒、60°C、1 分を 40 回繰り返した。

網羅的遺伝子解析用カスタムプレートに配置されていない *IL-6*、*IL-8*、*CCL2*、*MUC5AC* 及び  $\beta$ -*actin* 遺伝子については、プローブ及びプライマーセットを用いて、50  $\mu$ L 反応系にて PCR を行った。PCR サイクル反応条件は 50°C、2 分を 1 回、95°C、10 分を 1 回、95°C、15 秒、60°C、1 分を 40 回繰り返した。

得られた結果の解析は、比較 Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) 法で行った。リファレンス遺伝子として、A549 細胞及び Calu-3 細胞で安定的な発現が確認されている  $\beta$ -*actin* を選択した。各試料の遺伝子発現量は  $\beta$ -*actin* の発現量で補正し、各々のばく露時間の対照群における遺伝子発現量を 1 として、ばく露群での発現量を算出した。

### 3 感受性を高めた（炎症状態にある）A549 細胞への液相ばく露

### (1) 培養細胞

培養細胞は、1 (1) と同じ A549 細胞 (American Type Culture Collection、No. CCL-185) を使用した。

### (2) 試薬

試薬は、2 (2) と同じものを使用した。ELISA DuoSet<sup>®</sup> IC Human CCL2/MCP-1 及び DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development kit human TNF- $\alpha$ /TNFSF1A ELISA は R&D SYSTEMS 製を用いた。ヒト由来 IL-1 $\beta$  は Sigma-Aldrich 製を用いた。

### (3) 培養細胞の処理

A549 細胞は、必要時にトリプシン-EDTA を用いてフラスコから剥がし、10%FBS 含有 RPMI1640 培地を用いて 96 ウェルプレートに  $2 \times 10^4$  個/ウェル、又は 24 ウェルプレートに  $2 \times 10^5$  個/ウェルを播種し、1 日間培養した後、実験に供した。

ばく露実験には、感受性を高めるために超純水で所定の濃度に希釈した IL-1 $\beta$  を加えた 1%FBS 含有 RPMI1640 培地を用いた。IL-1 $\beta$  ばく露濃度は、0.03 ng/mL 及び 0.1 ng/mL とした。IL-1 $\beta$  を 3 時間ばく露後、培地は 1%FBS 含有 RPMI1640 培地に超純水で所定の濃度に希釈した硫酸水素アンモニウムを 1/10 量加えた実験用培地に交換した。

硫酸水素アンモニウムばく露濃度は、0.001 mg/mL から 1 mg/mL の範囲とした。細胞増殖能力及び細胞傷害性は、96 ウェルプレートを用いて、1 濃度につき 8 ウェルを使用し、ばく露実験を行った。IL-8、IL-6、MCP-1 及び TNF- $\alpha$  濃度測定は、24 ウェルプレートを用いて、1 濃度につき 4 ウェルを使用し、ばく露実験を行った。同じばく露濃度の実験を 2 回もしくは 3 回繰り返した。実験データは、IL-1 $\beta$  を 3 時間ばく露後、1%FBS 含有 RPMI1640 培地に超純水を 1/10 量加えた実験用培地でばく露した A549 細胞を対照群とし、硫酸水素アンモニウムばく露群と比較した。

### (4) 測定項目

細胞増殖能力、細胞傷害性、IL-8、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 の測定及び遺伝子解析を行った。各測定項目の実験方法は以下のとおりである。なお、細胞傷害性は培地中の LDH 濃度を用いて表現した。TNF- $\alpha$  は細胞傷害作用や炎症を引き起こす要素を持っているサイトカインである<sup>8)</sup>。MCP-1 は気道炎症性傷害に関与している<sup>9)</sup>とされ、活性酸素の放出亢進、IL-1、IL-6 の産生誘導作用を有するケモカインである。

### (5) 細胞増殖能力

IL-1 $\beta$  を 3 時間ばく露後、硫酸水素アンモニウムを 24 時間ばく露した A549

細胞に WST-8/1-Methoxy PMS 混合液を培地の 1/10 量加えて更に 1 時間培養し、マイクロプレートリーダーを用いて波長 450 nm における培地の吸光度を測定した。細胞増殖能力は、対照群の培地の吸光度を 100% として算出した。

#### (6) 細胞傷害性

IL-1 $\beta$  を 3 時間ばく露後、硫酸水素アンモニウムを 24 時間ばく露した A549 細胞の培地を回収し、2 (4) イと同様に、細胞傷害性を算出した。細胞傷害性は、IL-1 $\beta$  を 3 時間ばく露後、超純水を 1/10 量加えた実験用培地で 24 時間ばく露した対照群の培地の吸光度を 0% (陰性対照群) とし、0.1% Tween20 含有する培地で 24 時間培養した A549 細胞の培地の吸光度を 100% (陽性対照群) として、細胞傷害率を算出した。

#### (7) IL-8 濃度

IL-1 $\beta$  を 3 時間ばく露後、硫酸水素アンモニウムを 24 時間ばく露した A549 細胞の培地を回収し、2 (4) ウと同様に IL-8 濃度を算出した。

#### (8) IL-6 濃度

IL-1 $\beta$  を 3 時間ばく露後、硫酸水素アンモニウムを 24 時間ばく露した A549 細胞の培地を回収し、2 (4) エと同様に IL-6 濃度を算出した。

#### (9) TNF- $\alpha$ 濃度

IL-1 $\beta$  を 3 時間ばく露後、硫酸水素アンモニウムを 24 時間ばく露した A549 細胞の培地を回収し、DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development kit human TNF- $\alpha$  を使用して、波長 450 nm における吸光度を測定して定量した。TNF- $\alpha$  濃度は、細胞溶解液のたんぱく質濃度当たりの値として標準化した。

#### (10) MCP-1 濃度

IL-1 $\beta$  を 3 時間ばく露後、硫酸水素アンモニウムを 24 時間ばく露した A549 細胞の培地を回収し、DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development kit human CCL2/MCP-1 を使用して、波長 450 nm における吸光度を測定して定量した。MCP-1 濃度は、細胞溶解液のたんぱく質濃度当たりの値として標準化した。

#### (11) 遺伝子発現

3 (3) と同様に、24 ウエルプレートに A549 細胞を  $2 \times 10^5$  個/ウエルを播種し、1 日間培養した後、実験に供した。0.03 ng/mL の IL-1 $\beta$  を 3 時間ばく露後、硫酸水素アンモニウムを 0.3 mg/mL の濃度で、ばく露時間を 1、3、24 時間としてばく露した後、A549 細胞をトリプシンで剥がし、PBS で 2 回洗浄して回収した。A549 細胞から RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA を得た。



*IL-8*、*CCL2* (*MCP-1*)、*MUC5AC* 及び  $\beta$ -*actin* 遺伝子は、プローブ及びプライマーセットとして TaqMan™ Gene Expression Master Mix 及び TaqMan™ Gene Expression Assay (共に Thermo Fisher) を用いて、これらの試薬に cDNA を添加し、50  $\mu$ L 反応系にて PCR を行った。反応条件は 50°C、2 分を 1 回、95°C、10 分を 1 回、95°C、15 秒、60°C、1 分を 40 回繰り返した。

得られた結果の解析は、2 (4) キと同様に  $\Delta\Delta$ Ct 法で行った。

#### 4 酸化ストレスを誘導する因子 (ROS) の測定

##### (1) 培養細胞

培養細胞は、1 (1) と同じ A549 細胞 (American Type Culture Collection No. CCL-185) を使用した。

##### (2) 試薬

硫酸水素アンモニウム及び培地は 1 (2) と同じもの、陽性対照物質はメナジオン (富士フイルム和光純薬株)、測定キットは Amplite ROS Red (AAT Bioquest) を用いた。

##### (3) 測定方法

硫酸水素アンモニウムばく露 (3 時間以内) の場合は、①96 ウェルプレートに A549 細胞を一晩培養 ( $1.5 \times 10^4$  個/100  $\mu$ L RPMI1640 培地/ウェル)、②測定キットの蛍光色素 (100  $\mu$ L) を添加後、37°C、5% CO<sub>2</sub>・95% air の条件下で 1 時間反応、③硫酸水素アンモニウム (20  $\mu$ L) を添加後、37°C、5% CO<sub>2</sub>・95% air の条件下で 0.5~3 時間反応、④蛍光物質をマイクロプレートリーダー (Spectra Max Paradigm、Molecular Devices 社製) で測定 (励起波長 Ex 520 nm、蛍光波長 Em 605 nm)、の 4 つの工程で実施した。

ばく露時間が 7 から 24 時間の場合は、上記の①、③、②、④の順で測定し、③の反応時間を 7 から 24 時間とした。なお、蛍光色素の効果が数時間持続することから、0.5 から 3 時間のばく露実験においては、同一試料を経時的に測定した。この時、ばく露時間と染色時間は同じ時間であり、生成された蛍光物質は減少することなく蓄積されると仮定した。

また、工程③における硫酸水素アンモニウムの添加濃度は、添加後の液相濃度がばく露濃度 (0.001 から 1 mg/mL) となるよう、3 時間以内のばく露実験ではばく露濃度の 11 倍、7 時間以上のばく露実験では 6 倍とした。

#### 5 Calu-3 細胞の細胞膜間結合力に関する測定

##### (1) 培養細胞

培養細胞は、1 (1) と同じ Calu-3 細胞 (American Type Culture Collection、No. HTB-55) を使用した。

## (2) 試薬

硫酸水素アンモニウム及び培地は1 (2) と同じもの、陽性対照物質は、酸化チタン Titanium (IV) oxide (Sigma-Aldrich 製) を用いた。

## (3) 測定方法

Calu-3 細胞は、FALCON® Cell Culture Inserts 12 well (メンブレン膜有効表面積  $0.9 \text{ cm}^2$ ) に、細胞数が  $5.0 \times 10^5$  個/ $\text{cm}^2$  となるよう播種した。培養期間中、細胞の増殖及び維持のため、2 から 4 日に 1 度、10%FES 含有 MEM 培地を交換した。経上皮電気抵抗 (TEER) は、経上皮電気抵抗測定装置 Millicell® ERS-2 にアジャスタブル電極 (MERSSTX03) (Millicell® ERS-2 及び電極はともにミリポア社製) を接続して、経時的に TEER を測定した。TEER が概ね  $3000 \Omega\text{cm}^2$  程度 (インサートに隙間無く細胞が生育している状態) となったインサートをばく露実験に用いた。測定方法の模式図を図 2 に示した。TEER の算出法は、細胞を播種したインサートの測定値から、培地のみを播種した (細胞を含まない) インサートの測定値を減算した値に、インサートの面積を乗じた単位膜面積抵抗 ( $\Omega\text{cm}^2$ ) とした。

硫酸水素アンモニウムのばく露は、1%FBS 含有 MEM 培地に溶解した硫酸水素アンモニウムを、各インサートにおいて終濃度がばく露濃度となるよう添加し、ピペッティングで混和する方法で行った。ばく露濃度は、0 (非ばく露)、0.03、0.1、0.3、1.0 mg/mL とし、TEER を低下させる陽性コントロールとして、 $50 \mu\text{g/mL}$  酸化チタンばく露を並行して行った。ばく露時間は 24 時間までとし、この間 1、3、6 時間及び 24 時間時点で TEER を測定した。また、ばく露は 1 濃度につき 2 つのインサートを用いて、それぞれのインサートを 5 回測定し、その平均値を採用した。

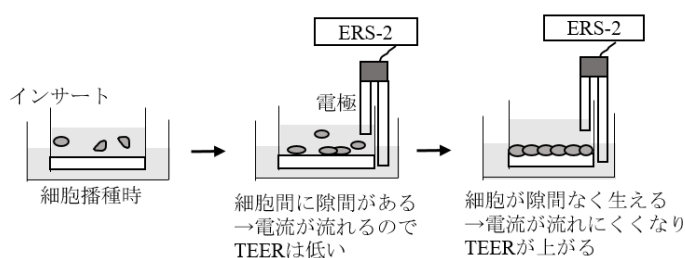


図 2. TEER 測定模式図

## 6 統計学的解析

細胞膜間結合力以外の各測定項目については、Dunnnett 法を用いて統計学的検定を行った。なお、A549 細胞への気相ばく露及び細胞内 ROS 産生量の測定では、同じばく露時間の対照群と比較、液相ばく露では、硫酸水素アンモニウムの代わりに超純水をばく露した対照群と比較、感受性を高めた (炎症状態にある) A549 細胞への液相ばく露では、IL-1 $\beta$  をばく露後、硫酸水素アンモニウムの代わりに

超純水をばく露した対照群と比較して解析した。

細胞膜間結合力については、非ばく露群と各ばく露濃度間の比較に、Shirley-Williams 法を用い、非ばく露群と陽性コントロールばく露群との比較に、マン・ホイットニーの U 検定法を用いて統計学的検定を行い、解析した。

### Ⅲ 結 果

#### 1 気相ばく露濃度

気相ばく露の各濃度群について硫酸アンモニウムばく露濃度を測定した結果、低濃度は  $1.0 \pm 0.3 \text{ mg/m}^3$ 、中濃度は  $10 \pm 2.9 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度は  $93 \pm 20 \text{ mg/m}^3$  であった。温度は  $25.1^\circ\text{C}$ 、湿度 69% であった。

#### 2 A549 細胞への気相ばく露

A549 細胞への硫酸水素アンモニウム気相ばく露実験において得られた各測定項目の結果を図 3 に示す。細胞増殖能力、細胞傷害性、及び IL-8、HO-1、GSH 産生は、全てのばく露条件間で、有意差は見られなかった。また、IL-6 は検出されなかった (図には示していない)。

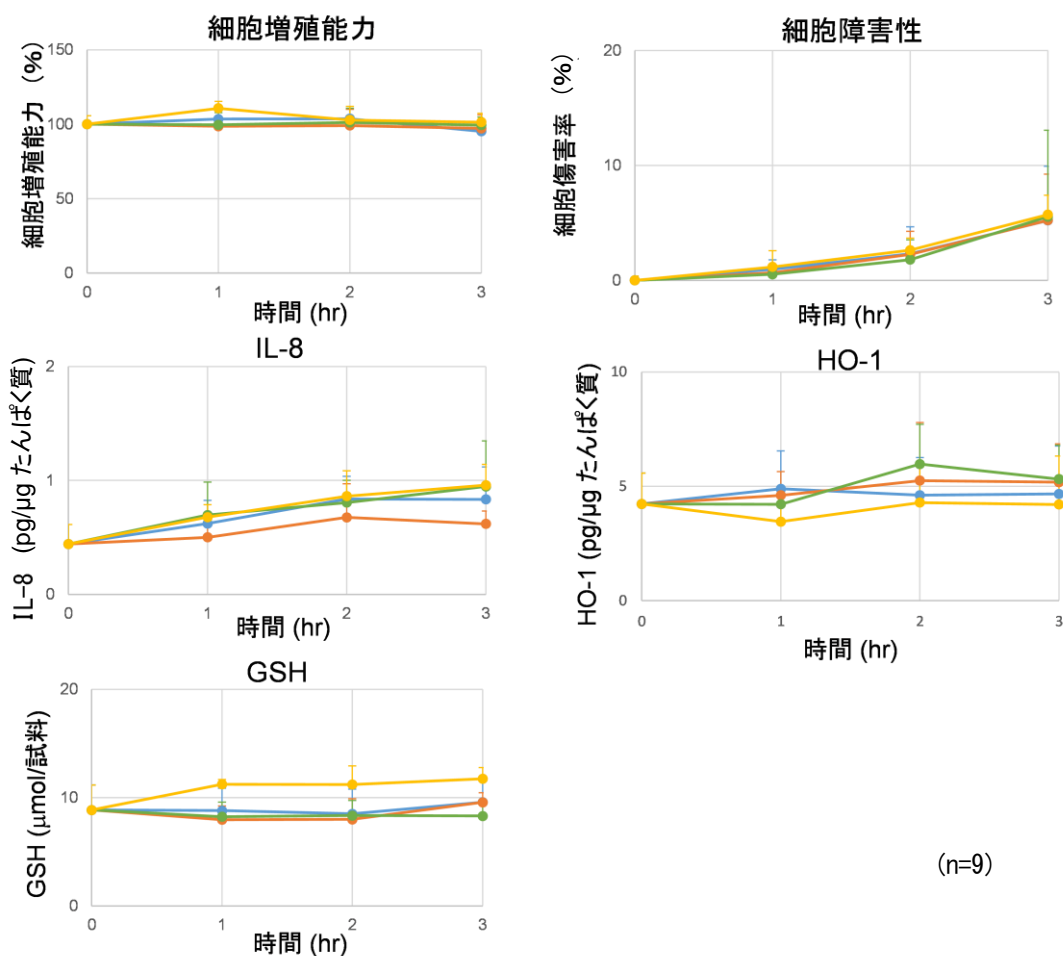


図 3. A549 細胞への硫酸水素アンモニウム気相ばく露実験結果

● ; 対照群、● ; 低濃度群、● ; 中濃度群、● ; 高濃度群

### 3 Calu-3 細胞への気相ばく露

Calu-3 細胞への気相ばく露において得られた各測定項目の結果を図 4 に示す。細胞増殖能力、細胞傷害性、及び IL-8、IL-6、GSH 産生は、全てのばく露群、ばく露時間で、有意差は見られなかった。HO-1 は検出されなかった (図には示していない)。

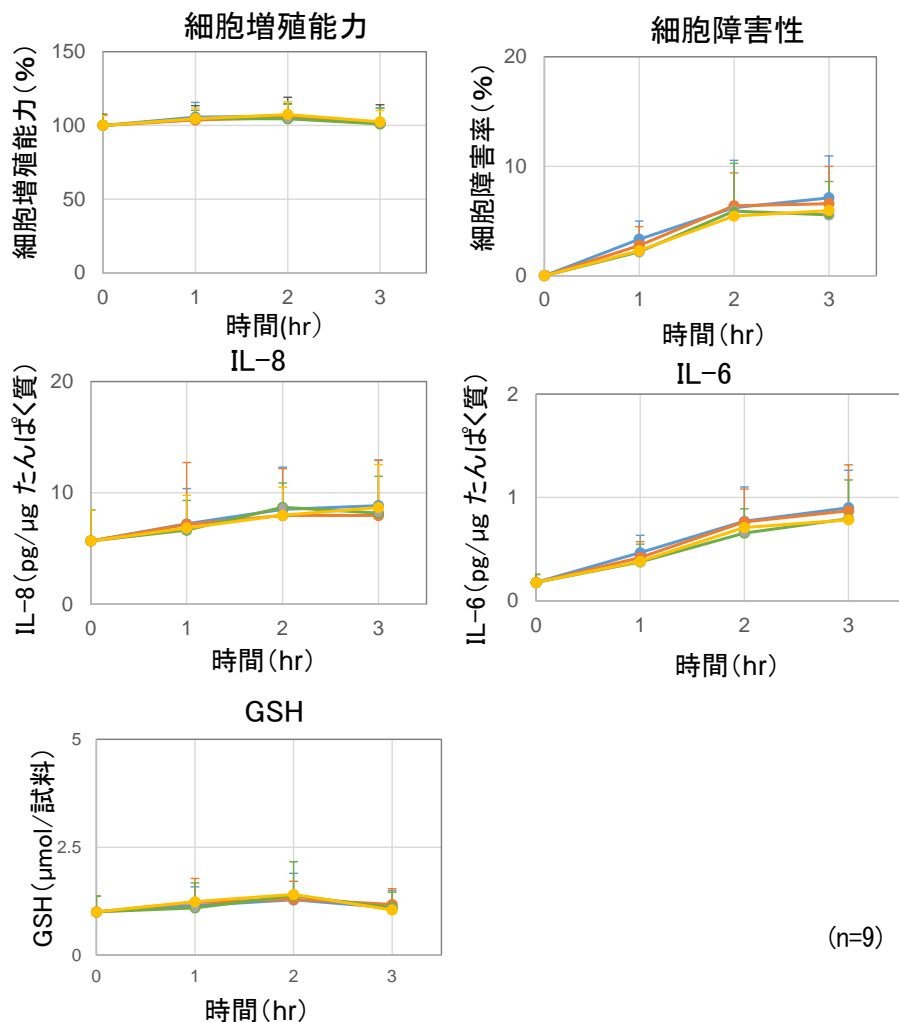


図 4. Calu-3 細胞への硫酸水素アンモニウム気相ばく露実験結果

● ; 対照群、● ; 低濃度群、● ; 中濃度群、● ; 高濃度群

### 4 A549 細胞への液相ばく露

A549 細胞への液相ばく露の結果を図 5 に示す。細胞増殖能力は 0.1 mg/mL 以上の濃度で有意に減弱された。細胞傷害性は、0.3 mg/mL から 2 mg/mL まで細胞傷害率は増加したが、最大でも 5% の増強であった。3 mg/mL では細胞傷害率は減弱した。IL-8 産生は、1 mg/mL で対照群に比べて有意に増強した。IL-6 は検出されなかった (図には示していない)。HO-1 及び GSH 産生は、対照群と比較して有意な差はなかった。

炎症関連因子の遺伝子発現解析結果を図 6 に示す。0.3 mg/mL 硫酸水素アンモニウムの 24 時間ばく露では、対照群と比較すると IL-8 発現量が約 2 倍となる増

強傾向がみられた。これは IL-8 たんぱく質の結果と同様な傾向であった。その他の遺伝子 (*CCL-2*、*MUC5AC*、*INF-γ*、*IL-4*、*IL-5*、*IL-6*、*IL-13*、*IL-25*、*IL-33* 及び *TLSP*) については発現量に変化はみられなかった。

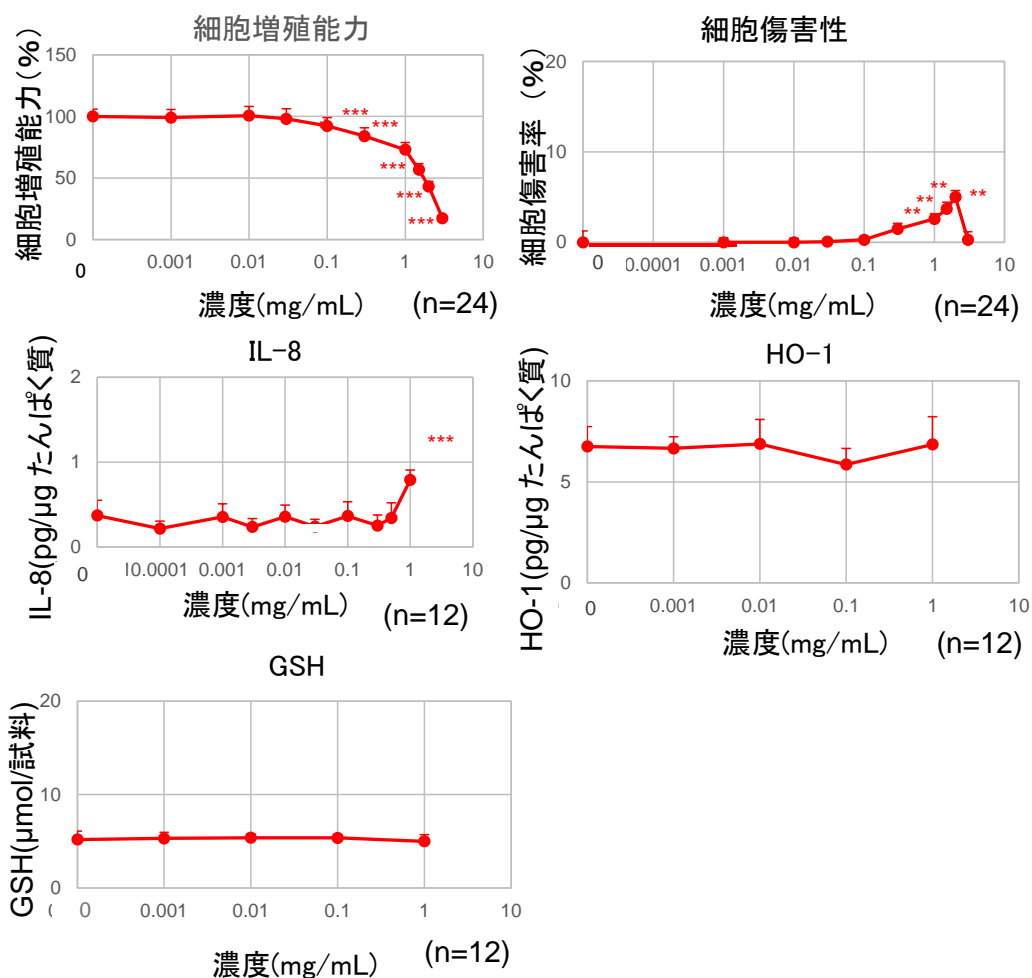


図 5. A549 細胞への硫酸水素アンモニウム液相ばく露実験結果 (1)

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

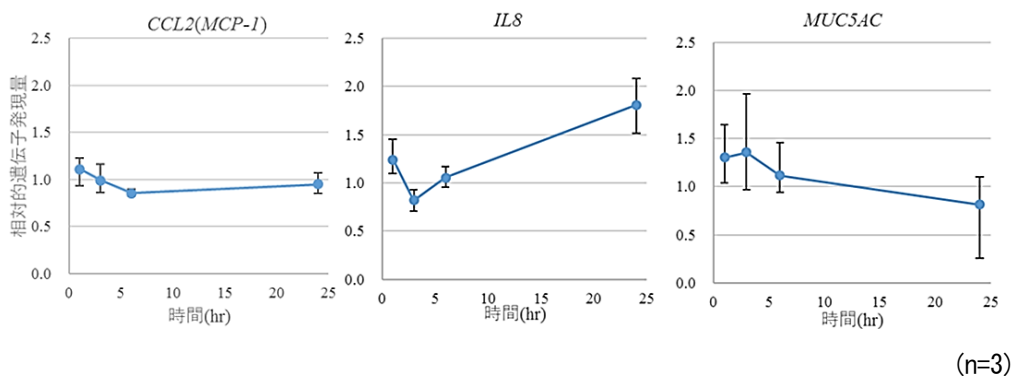


図 6. A549 細胞への硫酸水素アンモニウム液相ばく露実験結果 (2)

## 5 Calu-3 細胞への液相ばく露

Calu-3 細胞への液相ばく露の結果を図 7 に示す。細胞増殖能力は 0.3 mg/mL 以上で減弱された。IL-8、IL-6 及び GSH 産生は対照群に比べ、変化がなかった。細胞傷害性及び HO-1 産生はなかった。

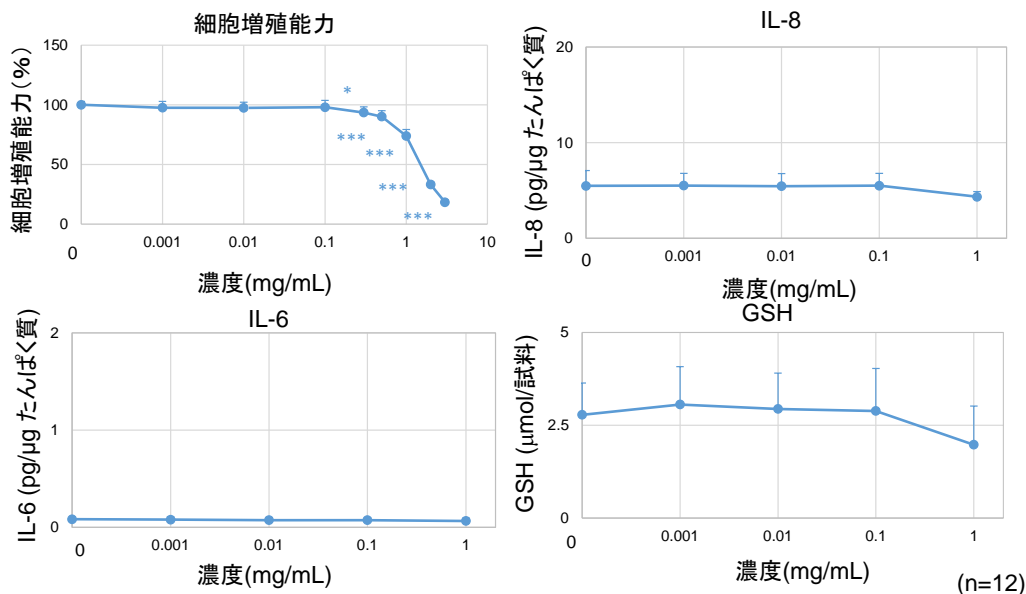


図 7. Calu-3 細胞への液相ばく露実験結果 (1)

\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

0.3 mg/mL 硫酸水素アンモニウムを 24 時間ばく露した炎症関連因子等の遺伝子発現解析結果を図 8 に示す。IL-8 発現量は対照群に比べ 24 時間ばく露で減弱した。IL-6 発現に変化は見られなかった。MUC5AC 発現量は、1 時間のばく露で対照群に比べ増強したが、3、6 及び 24 時間では対照群と同程度の発現量であった。それ以外の遺伝子 (IL-4、IL-5、IL-13、IL-25、IL-33、INF- $\gamma$ 、TSLP 及び CCL2) については発現量に変化は見られなかった。

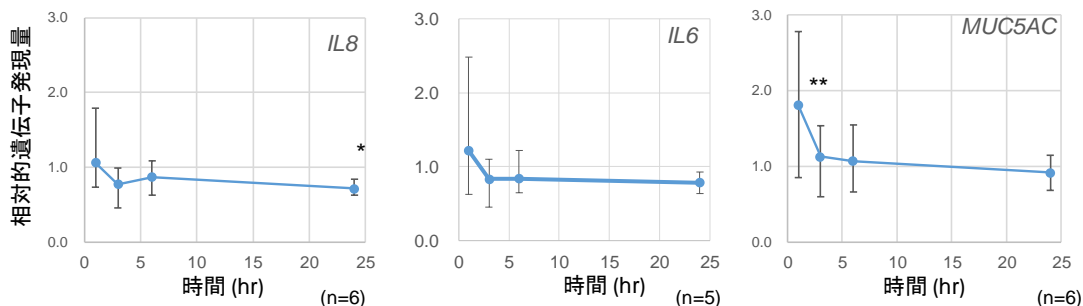


図 8. Calu-3 細胞への液相ばく露実験結果 (2)

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

## 6 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

A549 細胞へ IL-1 $\beta$  を、0.03 ng/mL（炎症状態になり始める濃度）及び 0.1 ng/mL（炎症状態になる濃度）ばく露したのち、硫酸水素アンモニウムをばく露した結果を図 9 に示す。硫酸水素アンモニウム 1 mg/mL ばく露では、IL-1 $\beta$  の濃度に関わらず細胞増殖能力は減弱した。細胞傷害性は、IL-1 $\beta$  の 0.03 ng/mL ばく露では硫酸水素アンモニウム 0.1 mg/mL 以上で、0.1 ng/mL ばく露では、硫酸水素アンモニウム 0.01 mg/mL 以上で減弱したが、5%以下の傷害率であった。IL-1 $\beta$  ばく露により IL-8 及び MCP-1 産生が増強され、並びに IL-6 及び TNF- $\alpha$  の産生が確認された A549 細胞へ硫酸水素アンモニウムを 1 mg/mL までばく露したが、それらの産生量に影響を与えなかった。

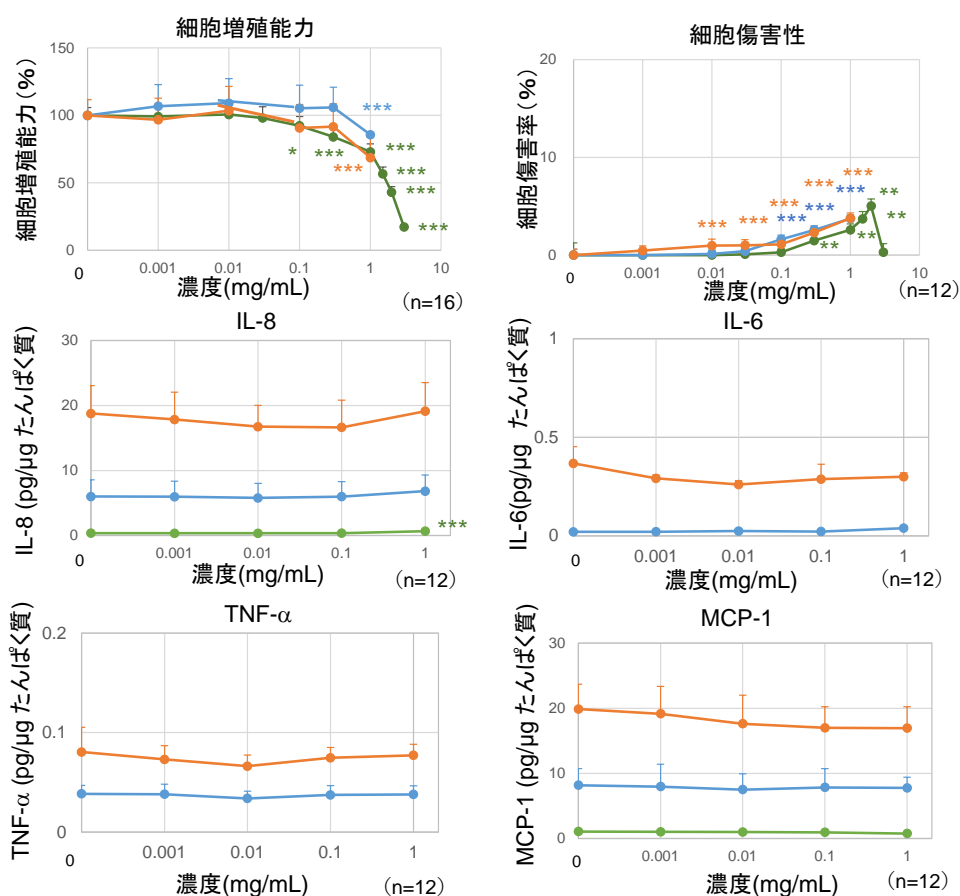


図 9. 感受性を高めた（炎症状態にある）A549 細胞への液相ばく露実験結果（1）

● ; IL-1 $\beta$  0 ng/mL、● ; IL-1 $\beta$  0.03 ng/mL、● ; IL-1 $\beta$  0.1 ng/mL

\*; p<0.05、\*\*; p<0.01、\*\*\*; p<0.001

IL-1 $\beta$  をばく露後、硫酸水素アンモニウムをばく露した A549 細胞の炎症関連因子等の遺伝子発現を調べた結果を図 10 に示す。炎症関連遺伝子 IL-8 及び CCL2、粘液関連遺伝子 MUC5AC の発現量に変化は見られなかった。

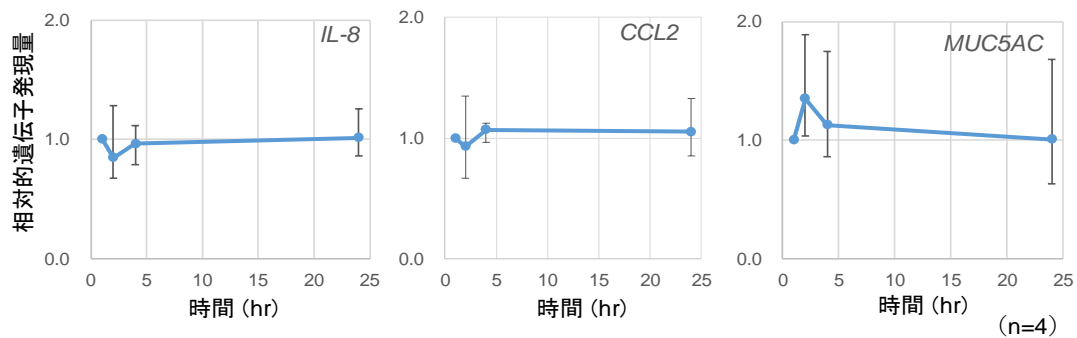


図 10. 感受性を高めた（炎症状態にある）A549 細胞への液相ばく露実験結果（2）

## 7 酸化ストレスを誘導する因子（ROS）の測定

細胞内 ROS 産生量について、ばく露 1 から 24 時間の結果を図 11(a)に示す (n=9 から 21)。硫酸水素アンモニウム濃度 0.001 から 1 mg/mL のいずれにおいても、ROS 産生量のわずかな増加が見られた ( $p < 0.01$  又は  $p < 0.05$ )。濃度依存性については、低濃度域間 (0.001 から 0.1 mg/mL) では見られなかったが、ばく露濃度 1 mg/mL については、1 時間ばく露及び 7 時間ばく露において、陰性対照 (NC) との間だけでなく低濃度域との間に有意な増加 ( $p < 0.01$  又は  $p < 0.05$ ) が確認された (図には示していない)。

そこで、短時間ばく露における産生量の変化を見るため、同一試料における産生量を経時的に測定した (n=18、図 11(b))。なお、ばく露後 0 時間では NC と同等の蛍光強度と仮定し、産生量は 1 とした。1 mg/mL をばく露した結果、ばく露後 0 から 1 時間での産生量は 1.0 から 1.14、1 から 2 時間では 1.14 から 1.19、2 から 3 時間では 1.19 から 1.21 に変化した。このことから、ばく露後 2 時間以降も ROS 産生が継続すること、特にばく露直後 (1 時間以内) に産生量が多いことがわかった。

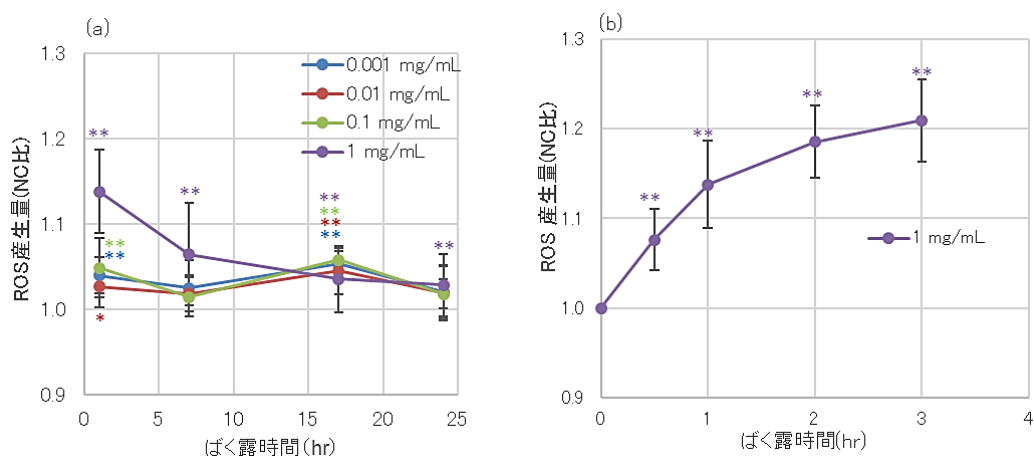


図 11. A549 細胞の細胞内 ROS の産生

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



## 8 Calu-3 細胞の細胞膜間結合力に関する測定

測定結果を図 12 に示す。酸化チタンをばく露した細胞で TEER の低下が見られたため、陽性対照物質として使用可能であることを確認した。硫酸水素アンモニウムの各ばく露濃度において、ばく露前 (0 時間) の TEER の値を 100% とし、各ばく露時間の TEER の値をパーセントで示した。ばく露 1、3、6 時間で経時的な低下傾向が見られたことから、各ばく露時間における TEER の変化率を確認した。その結果を図 13 から図 16 に示す。ばく露 3 時間及び 6 時間において、ばく露した硫酸水素アンモニウムの濃度に依存して TEER が低下する傾向が見られたが、ばく露 24 時間後には TEER は概ね回復した。

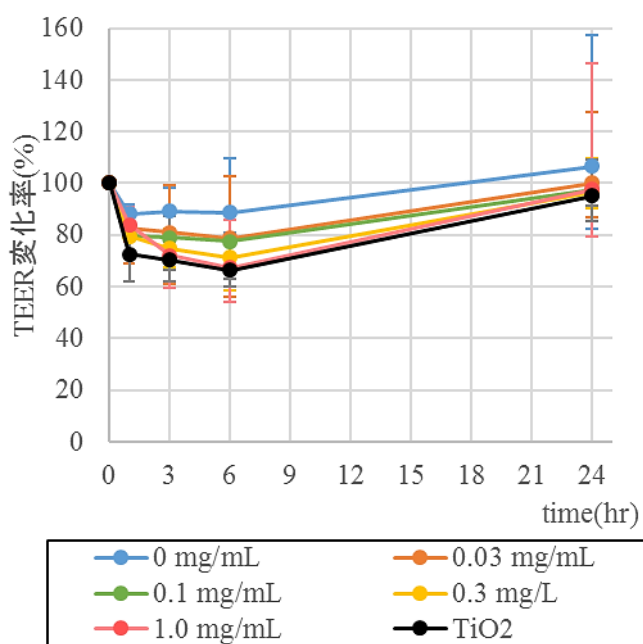


図 12. 硫酸水素アンモニウム液相ばく露による Calu-3 細胞 TEER 変化率

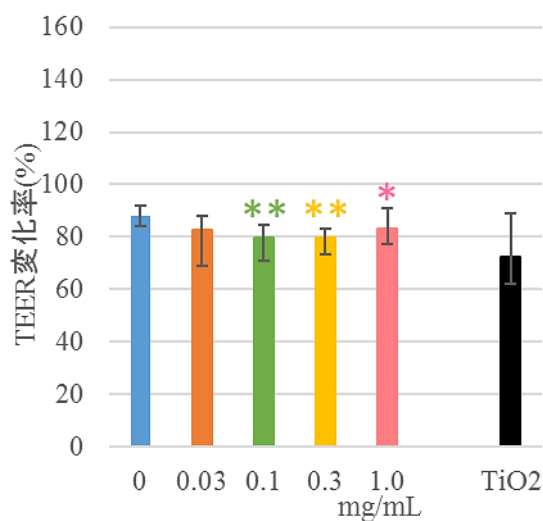


図 13. ばく露 1 時間における各濃度の TEER 変化率

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

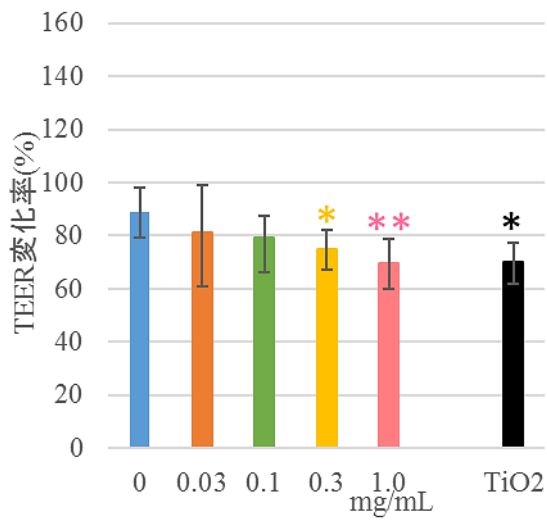


図 14. ばく露 3 時間における各濃度の TEER 変化率

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

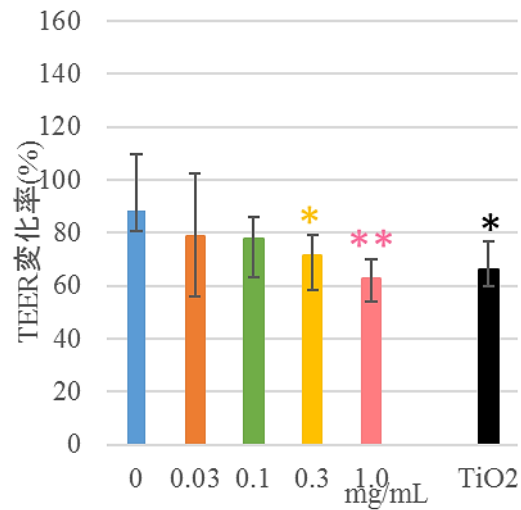


図 15. ばく露 6 時間における各濃度の TEER 変化率

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

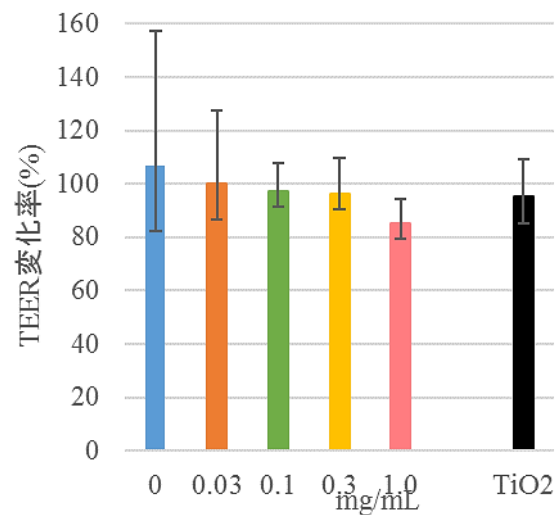


図 16. ばく露 24 時間における各濃度の TEER 変化率

## IV 考察

硫酸水素アンモニウムによる生体への影響を調べるため、肺末梢のヒト肺胞上皮由来 A549 細胞及び肺上部のヒト気管支上皮由来 Calu-3 細胞の 2 種の培養細胞を用いて、気相及び液相ばく露実験を行った。

A549 細胞及び Calu-3 細胞への気相ばく露では、設定した高濃度 (100 mg/m<sup>3</sup>) は第 2 章で得られた都内大気中 PM 中の最大濃度 (1.9 µg/m<sup>3</sup>) に比べ約 53,000 倍であり、この濃度まで気相ばく露しても、細胞増殖及び細胞傷害性、炎症、酸化ストレスに関する全ての測定項目で変化がなかったことから、気相ばく露では、A549 細胞及び Calu-3 細胞への影響はないと示唆された。

A549 細胞への液相ばく露では、0.1 mg/mL 以上の濃度で細胞増殖能力の減弱、0.3 mg/mL 以上の濃度で細胞傷害性、1 mg/mL で IL-8 産生が増強したが、あまり強い作用ではないと考えられた。Calu-3 細胞への液相ばく露では、0.3 mg/mL 以上の濃度で細胞増殖能力の減弱があったが、炎症因子や酸化ストレスマーカーでは影響はないと示唆された。Calu-3 細胞の IL-8 遺伝子発現量は 24 時間ばく露で減弱したが、たんぱく質の発現量に変化が見られなかったことから、炎症因子への影響は弱いと考えられる。また、粘液関連遺伝子 MUC5AC の発現量が 1 時間ばく露のみで増強したことから、硫酸水素アンモニウムによる粘液形成の増強は一過性であった可能性が考えられる。

液相ばく露において、A549 細胞 0.1 mg/mL、Calu-3 細胞 0.3 mg/mL 以上で細胞増殖能力が減弱された。硫酸水素アンモニウムを 1%FBS 含有 RPMI1640 培地に溶解すると 1 mg/mL で pH 7、3 mg/mL で pH 6 となり、1%FBS 含有 MEM 培地に溶解すると 1 mg/mL で pH 7、3 mg/mL で pH 3 となり、培養細胞の生育に対して酸性度がかなり高い。したがって、硫酸水素アンモニウムばく露による細胞増殖能力の減弱、細胞傷害性の増強は、この酸性度が一因である可能性が考えられる。

A549 細胞及び Calu-3 細胞への液相ばく露による各因子の増減について、表 1 及び表 2 にまとめた。平成 28 年度から令和元年度に実施した、培養細胞への硫酸アンモニウムばく露実験結果<sup>1)</sup>と比較すると、気相ばく露では、硫酸アンモニウムは A549 細胞で細胞傷害性、酸化ストレスマーカーの増強、Calu-3 細胞で酸化ストレスマーカーの増強、炎症因子の増強及び減弱が見られたのに対し、硫酸水素アンモニウムは全ての項目で影響が見られなかった。液相ばく露では、硫酸アンモニウムでは A549 細胞で細胞傷害性、炎症因子の増強、Calu-3 細胞で細胞傷害性の増強、炎症因子の減弱が見られた。一方、硫酸水素アンモニウムでは A549 細胞で細胞傷害性、炎症因子の増強が見られ、Calu-3 細胞では影響は見られなかった。硫酸水素アンモニウムは、硫酸イオンにアンモニウムイオン及び水素イオンが 1 つずつ付いた化合物であるのに対し、硫酸アンモニウムは、硫酸イオンにアンモニウムイオンが 2 個付いた化合物である。水に溶けたアンモニアは pH が低いほどアンモニウムイオンになり、pH が高いほどアンモニアになり

やすい<sup>10)</sup>。硫酸アンモニウム水溶液は、硫酸水素アンモニウム水溶液と比較して酸性度は低い（pHが高い）ことから、ばく露実験において、毒性の強いアンモニアが少量存在している可能性が考えられる。このことが、A549細胞及びCalu-3細胞へのばく露実験において、硫酸アンモニウムと比較して、硫酸水素アンモニウムの影響が弱い要因の1つと考えられる。

表 1. A549 細胞への硫酸水素アンモニウム液相ばく露による因子の増減

		ばく露濃度 (mg/mL)			
		0.001	0.01	0.1	1
細胞傷害性	LDH	→	→	→	↗
酸化ストレスマーカー	HO-1	→	→	→	→
	GSH	→	→	→	→
炎症因子	IL-8	→	→	→	↗
	IL-6	-	-	-	-

→; 変化なし、↗; 増強、-; 不検出

表 2. Calu-3 細胞への硫酸水素アンモニウム液相ばく露による因子の増減

		ばく露濃度 (mg/mL)			
		0.001	0.01	0.1	1
細胞傷害性	LDH	-	-	-	-
酸化ストレスマーカー	HO-1	-	-	-	-
	GSH	→	→	→	→
炎症因子	IL-8	→	→	→	→
	IL-6	→	→	→	→

→; 変化なし、-; 不検出

今回の実験では、A549細胞へIL-1 $\beta$ をばく露し、感受性を高めた（炎症状態にある）A549細胞を作成し<sup>11,12)</sup>、硫酸水素アンモニウムのばく露実験を行った。これにより、硫酸水素アンモニウムの影響をより明確にできるのではないかと考えた。A549細胞へ0.03 ng/mL又は0.1 ng/mLのIL-1 $\beta$ を反応させることで、IL-8、MCP-1産生増強、IL-6、TNF- $\alpha$ の発現を確認できた、感受性を高めた（炎症状態にある）A549細胞<sup>11,12)</sup>を用い、硫酸水素アンモニウムの影響を調べた。このA549細胞へ硫酸水素アンモニウムを液相ばく露したが、炎症因子のタンパク質及び遺伝子発現に影響は見られなかった。このことから、炎症状態でも細胞増殖能力や細胞傷害性、炎症因子を増悪させる作用は強くはないと考えられる。A549細胞に化学物質をばく露した時、細胞内ROS産生量が増加するばく露時

間については、1 時間 (多環芳香族炭化水素) や 8~24 時間 (硫酸アンモニウム、過酸化水素、cigarette mainstream smoke) などが報告<sup>13-16)</sup>されており、ばく露する化学物質により産生量が増加するばく露時間は変化する可能性が考えられる。今回の実験では、硫酸水素アンモニウムの短時間ばく露で ROS の増加が見られたが、酸化ストレスマーカーである HO-1 及び GSH の上昇は見られなかった。このため、今回測定していないカタラーゼ等の酵素及び他の抗酸化物質が関与する経路<sup>17,18)</sup>により、ROS が消去されたと考えられる。

細胞内 ROS の恒常的な増加は細胞死の促進につながるという報告<sup>19)</sup>があるが、今回の硫酸水素アンモニウムばく露実験の結果では、ROS の増加が見られたのは短時間 (主に 1 時間以内) ばく露であり、細胞の生存に関与するレベルの増加ではないと推察する。

TEER の測定においては、硫酸水素アンモニウムばく露 1 から 6 時間で濃度依存的に低下する傾向が見られた。Calu-3 細胞に化学物質 (線香の煙等) をばく露させた研究では、ばく露 6 時間で TEER が 50%程度まで低下し、細胞膜透過性が上昇したという報告<sup>20)</sup>があるが、今回の研究では細胞膜に関連した他の項目の測定は行っていない。TEER の低下傾向は確認されたが、細胞膜への詳細な影響を調べるためには、電子顕微鏡を用いた検鏡による形態観察<sup>21,22)</sup>の他、TEER の低下と関連があるとされる膜タンパク質である claudin 等の発現を確認する<sup>22,23)</sup>といった手法が考えられる。

今回の研究結果から、A549 細胞における ROS の一時的な上昇及び Calu-3 細胞における TEER の一過性の低下等を認めたが、細胞増殖能力及び細胞傷害性試験等の結果を考慮し、大気濃度レベルでの培養細胞への影響は極めて少ないと考えられる。

## V 文 献

- 1) 大気汚染物質と健康影響に関する調査研究報告書—基礎的実験的研究— (平成 28 年度から令和元年度まで)、東京都福祉保健局, 2020.
- 2) 井上博雅: 日呼吸会誌, **37(9)**, 673-679, 1999.
- 3) 滝沢 始, 大利隆行, 竹内直信, 他: 日気食会報, **47(2)**, 185-188, 1996.
- 4) 中野 稔, 浅田浩二, 大柳善彦: 活性酸素, 7-12, 1990. 共立出版, 東京.
- 5) 桐野洋平, 岳野光洋, 小林秀郎, 他: *Inflammation and Regeneration*, **25**, 2005.
- 6) 望月博之: 日本小児アレルギー学会誌, **22(5)**, 745-754, 2008.
- 7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr A. L., et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
- 8) Baud, V., Karin, M.: *Trends Cell Biol.*, **11(9)**, 372-377, 2001.
- 9) Wang, H., Yi, T., Zheng, Y., et al. : *Eur. J. Cell Biol.*, **84**, 233-242, 2007.
- 10) 大河内直彦: 科学, **87(12)**, 1081-1082, 2017.
- 11) Boost, K.A., Sadik, C.D., Backmann, M., et al. : *BMC Cancer*, **8**, 265, 2008.
- 12) Liou, C.J., Huang, W. C.: *Oncotarget*, **8(6)**, 101175-101188, 2017

- 13) Kim, J. H., Park, E. Y., Ha, H. K., *et al.*: *Asian-Australas J. Anim. Sci.*, **29(2)**, 288-298, 2016.
- 14) Stefanie, S., Hauke, D., Olaf, K., *et al.*: *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **12**, 12466-12474, 2015.
- 15) 木津良一, 眞田法子, 後藤由佳 : 同志社女子大学 総合文化研究所紀要, **27**, 149-155, 2010.
- 16) Yang, Y., Rui, G., Huifeng, Y., *et al.*: *Environ., Sci. Technol.*, **51(19)**, 11401-11411, 2017.
- 17) 江口裕伸, 藤原範子, 大河原知水, 他 : 生物試料分析, **32(4)**, 247-256, 2009.
- 18) 樋口雅司, 加藤幸雄 : 明治大学農芸学部研究報告, **62(1)**, 11-19, 2012.
- 19) Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., *et al.*: *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019:6175804, 2019.
- 20) Yamamoto, N., Kan-O, K., Tatsuta, M., *et al.*: *Sci. Rep.*, **11(1)**:7222, 2021.
- 21) Dekali, S. Gamez, C., Kortulewski, T., *et al.*: *Toxicol. Rep.*, **1**, 151-171, 2014.
- 22) Otani, M., Furuse, M.: *Trends Cell Biol.*, **30(10)**, 805-817, 2020.
- 23) 池田栄二 : 山口医学, **58(4)**, 137-142, 2009.