

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)

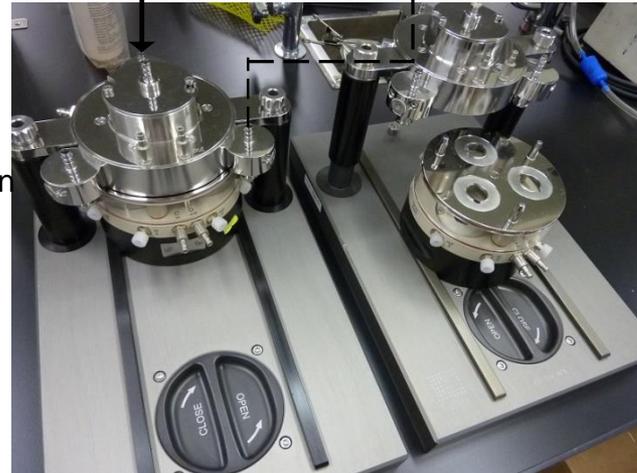
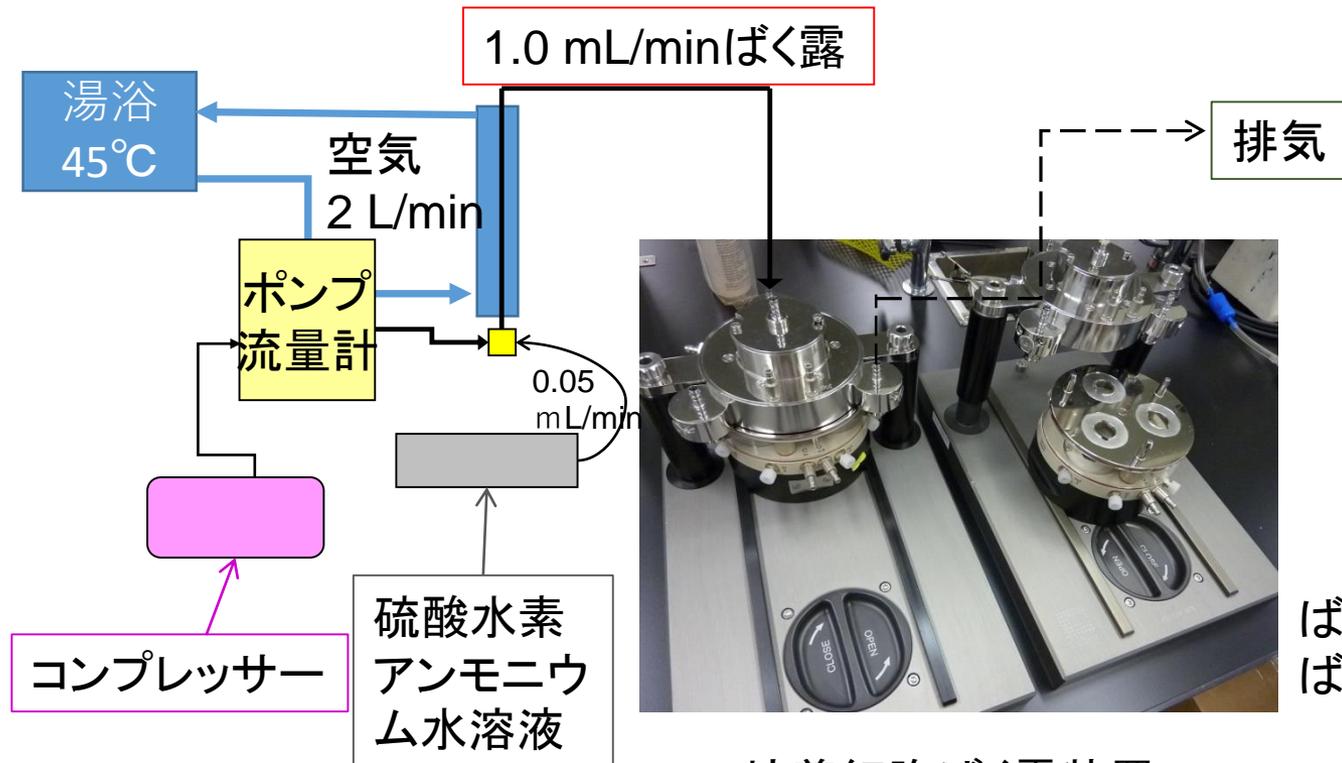
*ROS: 活性酸素種
(Reactive Oxygen Species)

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)

気相ばく露実験を実施中
ばく露終了後、データを解析

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

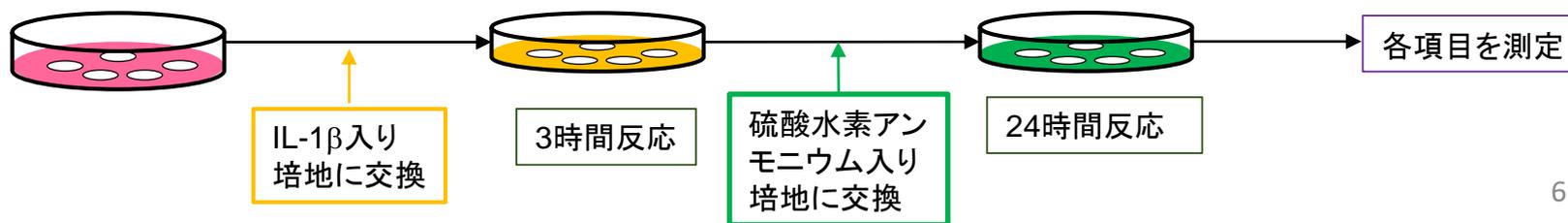
A549細胞へ炎症性サイトカインIL-1 β を反応させると、炎症因子(IL-8、MCP-1等)の産生が増強し、A549細胞が炎症状態になる(令和2年度予備実験にて確認)。

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

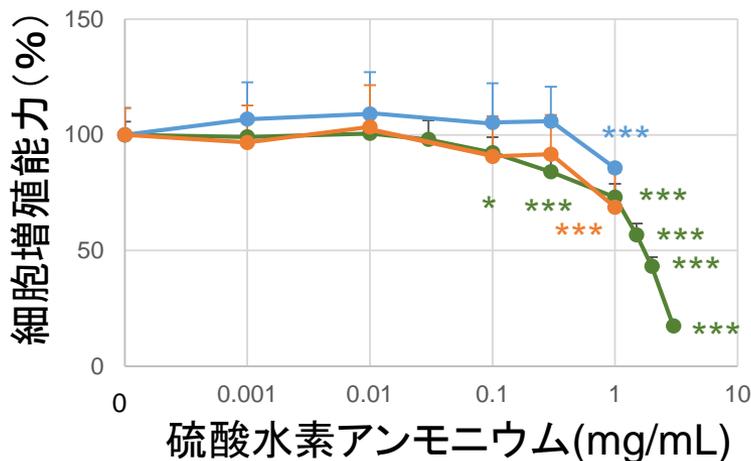
測定項目	
細胞障害作用	細胞増殖、乳酸脱水素酵素 (LDH)
炎症因子	IL-8、IL-6、TNF- α 、MCP-1
遺伝子発現	IL-8、CCL-2 (MCP-1)、MUC5AC (粘液形成関連)

A549細胞

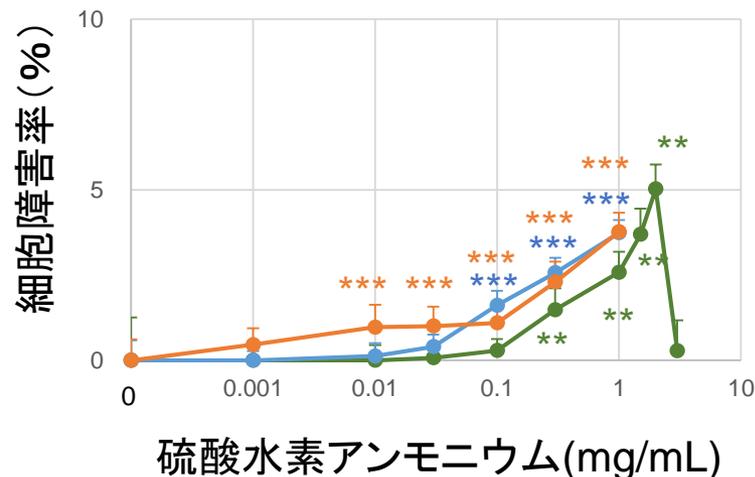


感受性を高めた(炎症状態にある) A549細胞 への液相ばく露実験結果(1)

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)

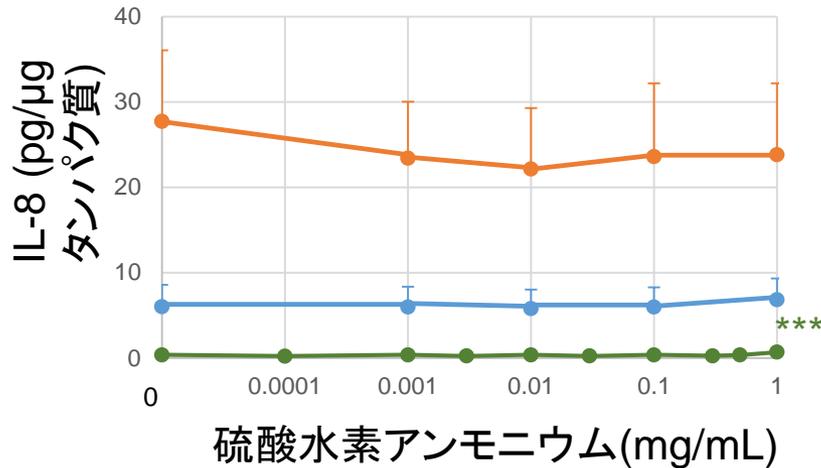
*; p<0.05、**; p<0.01、***; p<0.001

細胞障害性はLDHを用いて表現した。

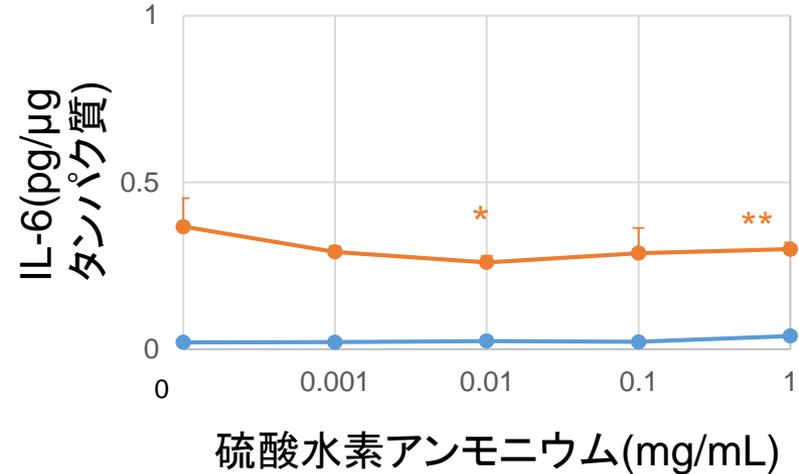
- IL-1βを0.03 ng/mL、0.1 ng/mL反応させたA549細胞において、硫酸水素アンモニウム 1 mg/mLで細胞増殖能力が減弱した。
- IL-1βを0.03 ng/mL反応させたA549細胞では硫酸水素アンモニウム0.1 mg/mL以上で、IL-1βを0.1 ng/mL反応させたA549細胞では硫酸水素アンモニウム0.01 mg/mL以上で細胞障害性が認められたが、その作用は5%以下と強くなかった。

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-8



IL-6

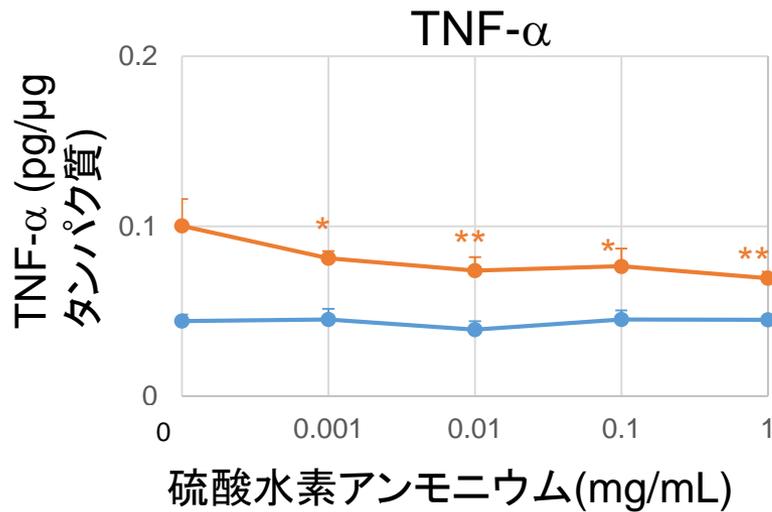


● ; IL-1β 0 ng/mL、● ; IL-1β 0.03 ng/mL、● ; IL-1β 0.1 ng/mL (n=8)

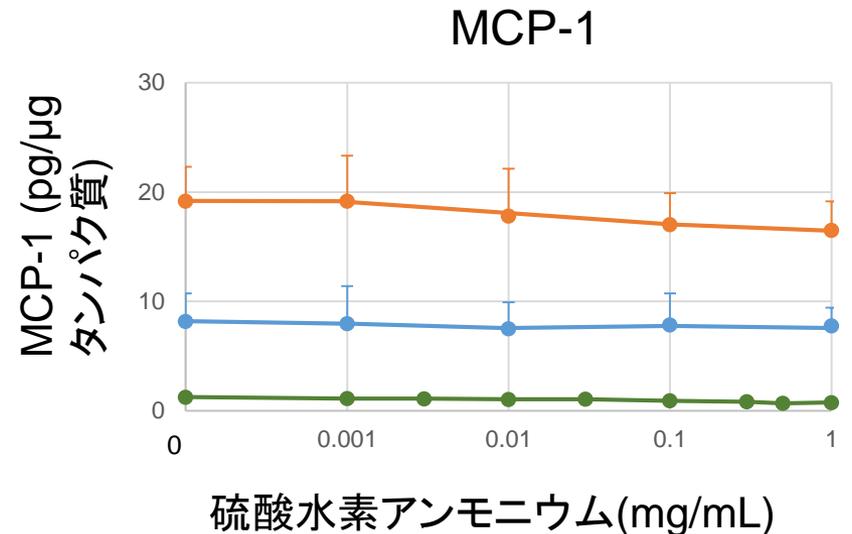
*; p<0.05、**; p<0.01、***; p<0.001

- A549細胞へIL-1βを反応させた後、硫酸水素アンモニウムを1 mg/mLまでばく露しても、IL-8産生に影響を与えなかった。
- IL-1βを0.1 ng/mL反応させたA549細胞において、硫酸水素アンモニウム0.01 mg/mL及び1 mg/mLでIL-6産生が有意に減弱したが、その変化は極めて小さかった。IL-1β 0.03 ng/mLでは、IL-6産生に影響を与えなかった。A549細胞へIL-1βを反応させないと、IL-6は検出されなかった。

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)



TNF- α ; 炎症反応を惹起する



MCP-1; IL-1及びIL-6の産生誘導等をする

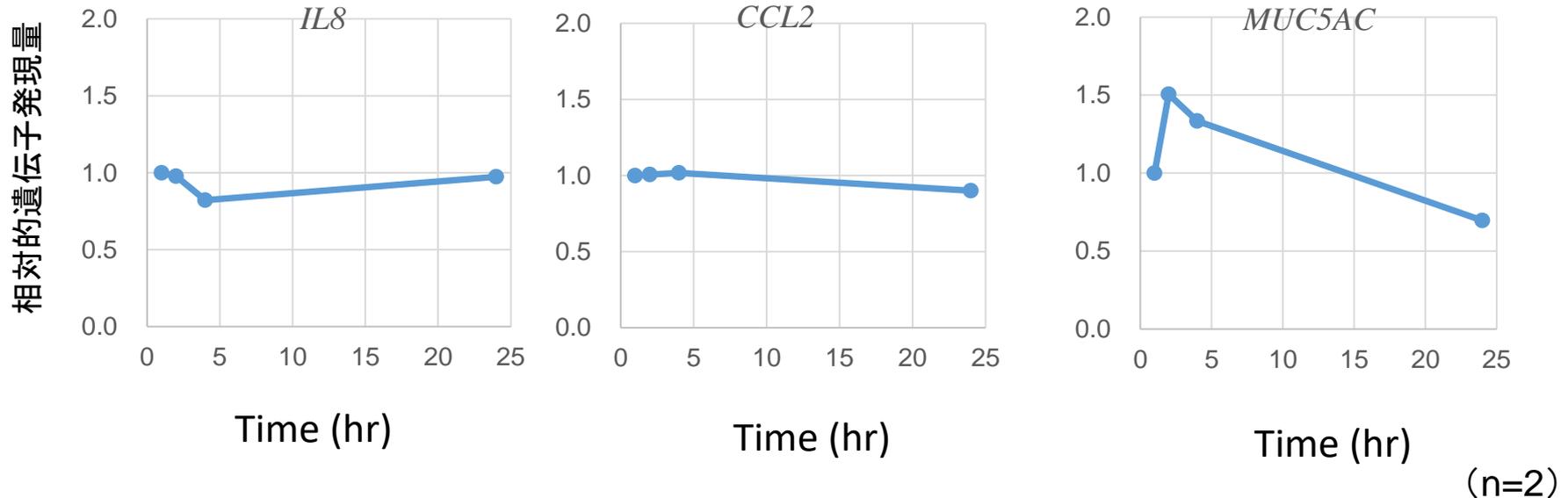
● ; IL-1 β 0 ng/mL、● ; IL-1 β 0.03 ng/mL、● ; IL-1 β 0.1 ng/mL (n=8)

*; p<0.05、**; p<0.01

- IL-1 β を0.1 ng/mL反応させたA549細胞において、硫酸水素アンモニウム0.001 mg/mL以上でTNF- α 産生が有意に減弱したが、その変化は極めて小さかった。IL-1 β 0.03 ng/mLでは、TNF- α 産生に影響を与えなかった。A549細胞へIL-1 β を反応させないと、TNF- α は検出されなかった。
- IL-1 β を0.03 ng/mL、0.1 ng/mL反応させたA549細胞において、硫酸水素アンモニウムを1 mg/mLまでばく露しても、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。

- IL8: ばく露による発現量の変化がほぼなし
- CCL2 (MCP-1): ばく露による発現量の変化がほぼなし
- MUC5AC(粘液形成関連): 1時間ばく露で増強したが、その後経時的な減弱傾向

今後

- 試験回数を増やすとともに、詳細な解析を継続

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。

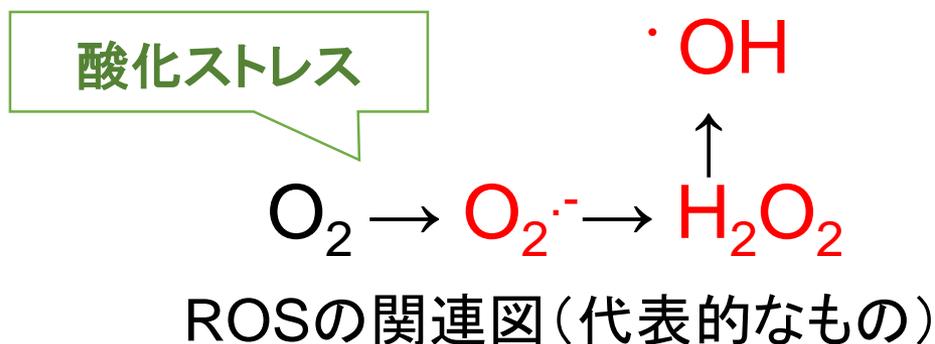
実験条件	
ばく露方法	液相ばく露
培養細胞	ヒト肺胞上皮由来A549細胞
硫酸水素アンモニウム濃度	0.001~1 mg/mL
陰性コントロール	リン酸緩衝生理食塩水
陽性コントロール	メナジオン*
ばく露時間	短時間(30分~3時間) 長時間(22時間~24時間)

*令和2年度の予備実験により検討済

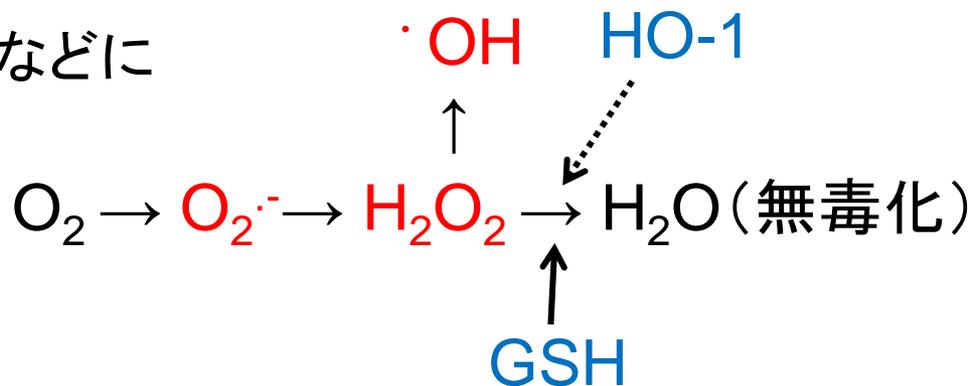
測定項目	
Total ROS	過酸化水素、ヒドロキシラジカル、t-ブチルヒドロペルオキシド

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。



細胞内ROSの測定 短時間ばく露

実験方法

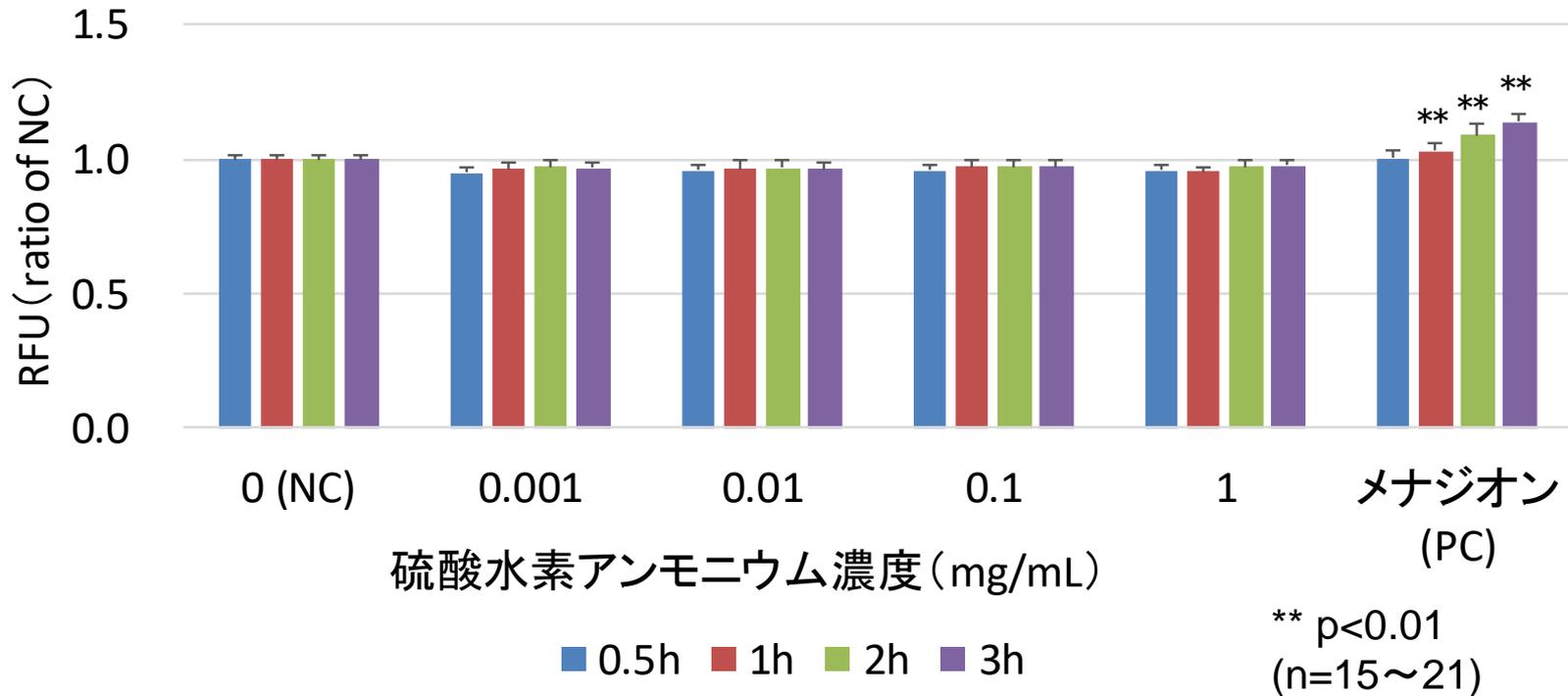
実験条件	
ばく露方法	液相ばく露
培養細胞	ヒト肺胞上皮由来A549細胞
硫酸水素アンモニウム濃度 (富士フィルム和光純薬一級98%)	0.001~1 mg/mL
陰性コントロール(NC)	リン酸緩衝生理食塩水
陽性コントロール(PC)	メナジオン
ばく露時間	短時間(30分~3時間)

解析方法

➤ 細胞ありの相対蛍光強度(RFU)を用いたNCに対する比を利用
利点: 測定日間のばらつきが小さければ、n数を増やして解析できる。
欠点: ばく露物質による非生物的反応の影響を除去できない。

➤ 細胞ありから細胞なしのRFUを減算した値を利用(令和2年度報告)
利点: ばく露物質による非生物的反応の影響を除去できる。
欠点: 測定日間のばらつきが大きいため、n数が同日測定数に限られる。

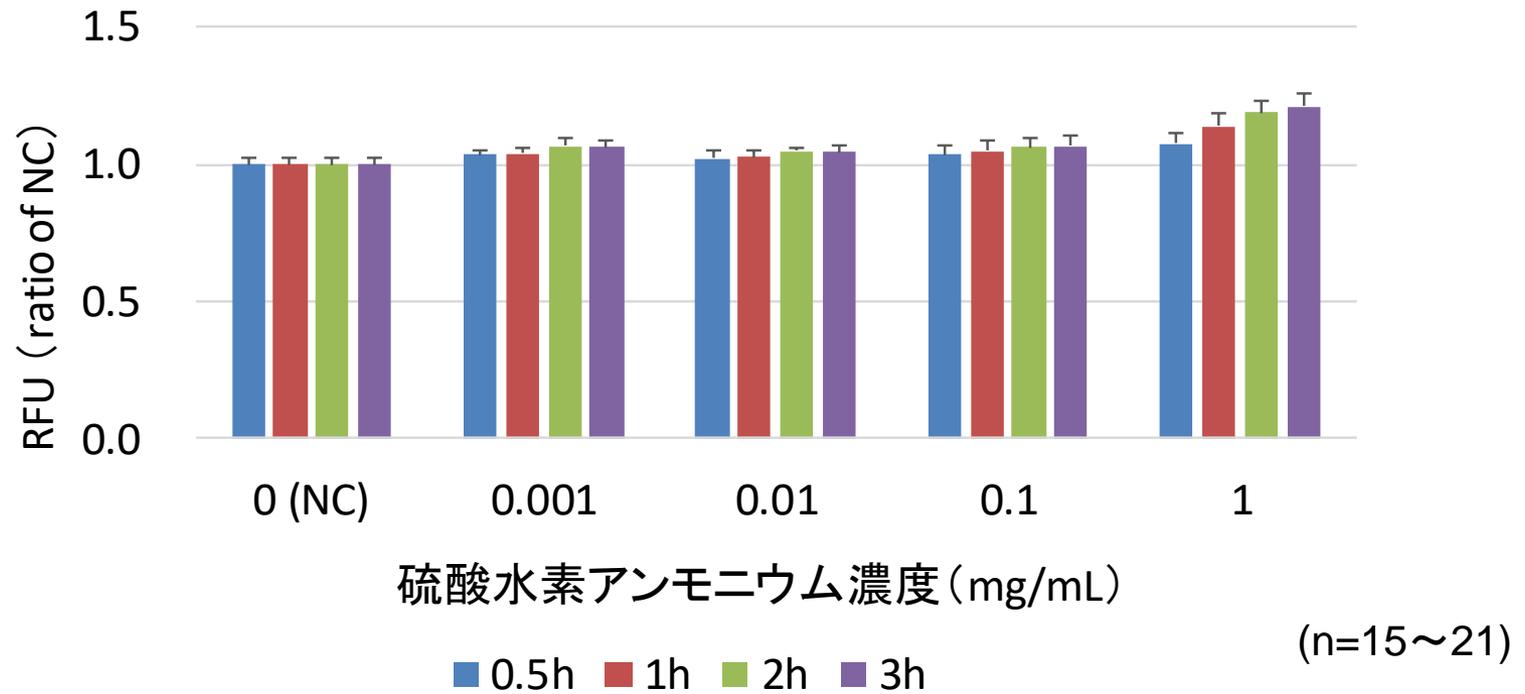
A549細胞への液相ばく露 解析方法について



培地のみ(細胞なし)に硫酸水素アンモニウムをばく露した。

- メナジオン(PC)のような非生物的反応は見られなかった。
- A549細胞へのばく露結果を用い、NCに対する比を算出して解析することとした。

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0.5~3時間ばく露した。

硫酸水素アンモニウム 1 mg/mLでわずかな増強傾向が見られ、3時間ばく露でNCの1.2倍であった(有意差はなし)。

今後の計画と変更点

➤ 長時間ばく露を実施する。

➤ ばく露時間は24時間とする。

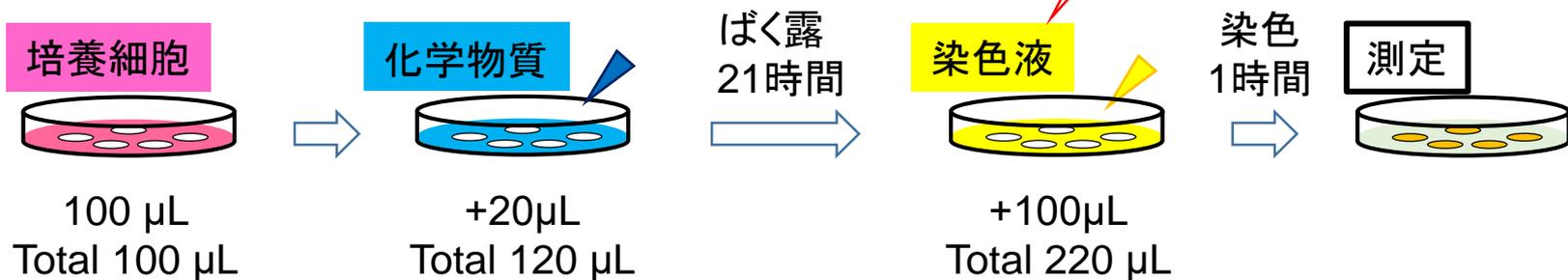
※令和2年度報告では「ばく露後22時間から24時間まで経時的にROSを測定する」

変更理由(1)

測定キットの特性上、染色液を添加すると**ばく露濃度が約55%に減少**するため、設定濃度を24時間ばく露したとは言えない。

$$\frac{120}{220} \doteq 55\%$$

長時間用測定方法



※短時間用測定方法は先に染色液を入れるので、濃度変化はない。



変更理由(2)

長時間ばく露における細かい経時測定は不要と考えられる。
文献では、長時間ばく露は24時間のみとする報告がある。

文献	対象細胞	ばく露時間
K. P. E. 2011 ⁽¹¹⁾	Calu-3	0.5, 24h
J. H. K. 2016 ⁽¹²⁾	A549	0.5, 1, 2, 3, 8, 16, 24h
C. H. H. 2019 ⁽¹³⁾	NSC-34	24h
S. S. 2015 ⁽¹⁴⁾	A549	24h
Promega protocol ⁽¹⁵⁾	HepG2	2h
K. R. 2010	A549	1h
T. J. 2018	A549	24h
C. W. L. 2018	A549	24h
Z. H. 2016	A549	4h
P. C. R. 2017	A549	0.5, 1, 2, 4, 12, 24h
Y. Y. 2017	A549, BEAS-2B	0.5, 1, 3, 6, 12, 24h

*) 令和2年度報告書の文献

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

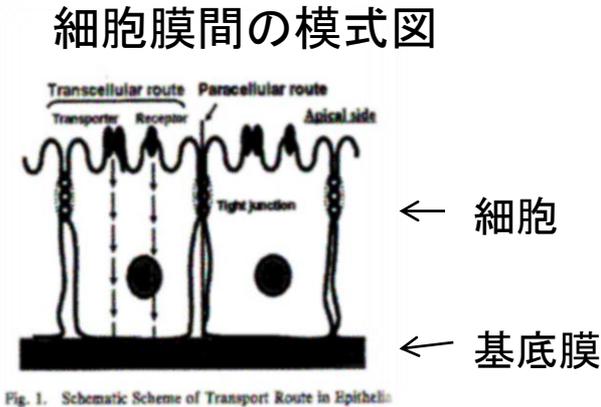
今後、実施予定

5. Calu-3細胞の細胞膜間結合力に関する測定(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

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

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。

今後、実施予定

まとめ(1)

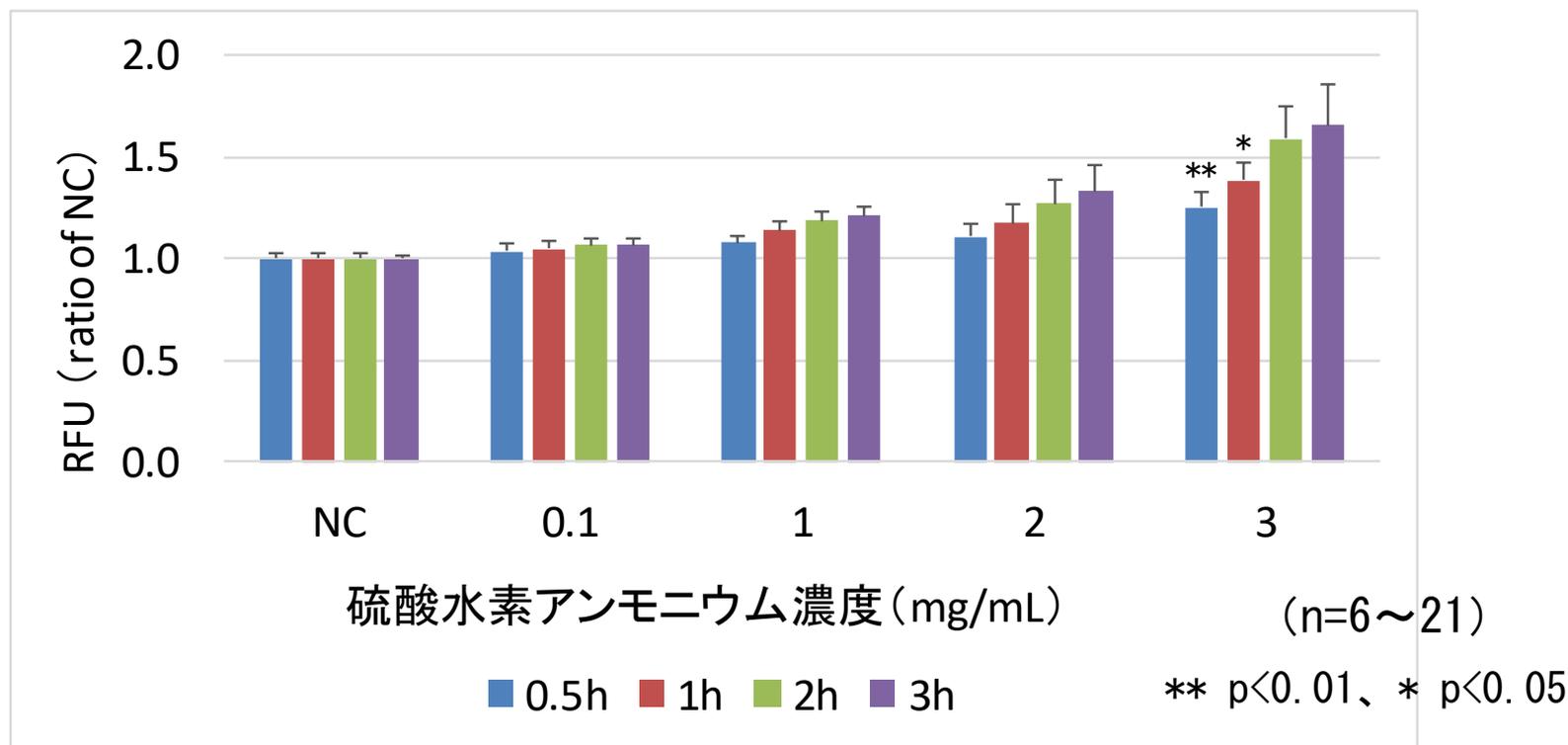
1. A549細胞への硫酸水素アンモニウム気相ばく露実験は、現在実施中である。
2. IL-1 β により感受性が高まった(炎症状態にある)A549細胞へ硫酸水素アンモニウムをばく露させると、
 - 1 mg/mL硫酸水素アンモニウムにより細胞増殖能力が減弱した。
 - 細胞障害性がみられたが、その作用は強くなかった。
 - 0.1 ng/mL IL-1 β を反応させたA549細胞では、硫酸水素アンモニウムにより、IL-6及びTNF- α が有意に減弱したが、その変化は極めて小さかった。
 - IL-8及びMCP-1産生には、影響を与えなかった。

まとめ(2)

3. A549細胞に硫酸水素アンモニウムを短時間ばく露した結果、1 mg/mLでROSはわずかな増強傾向が見られ、3時間ばく露では陰性コントロールの1.2倍であった（有意差なし）。
4. Calu-3細胞への液相ばく露実験、及びCalu-3細胞の細胞膜間結合力に関する測定（予備実験）については、今後、実施予定である。

A549細胞への液相ばく露結果 1 mg/mL以上

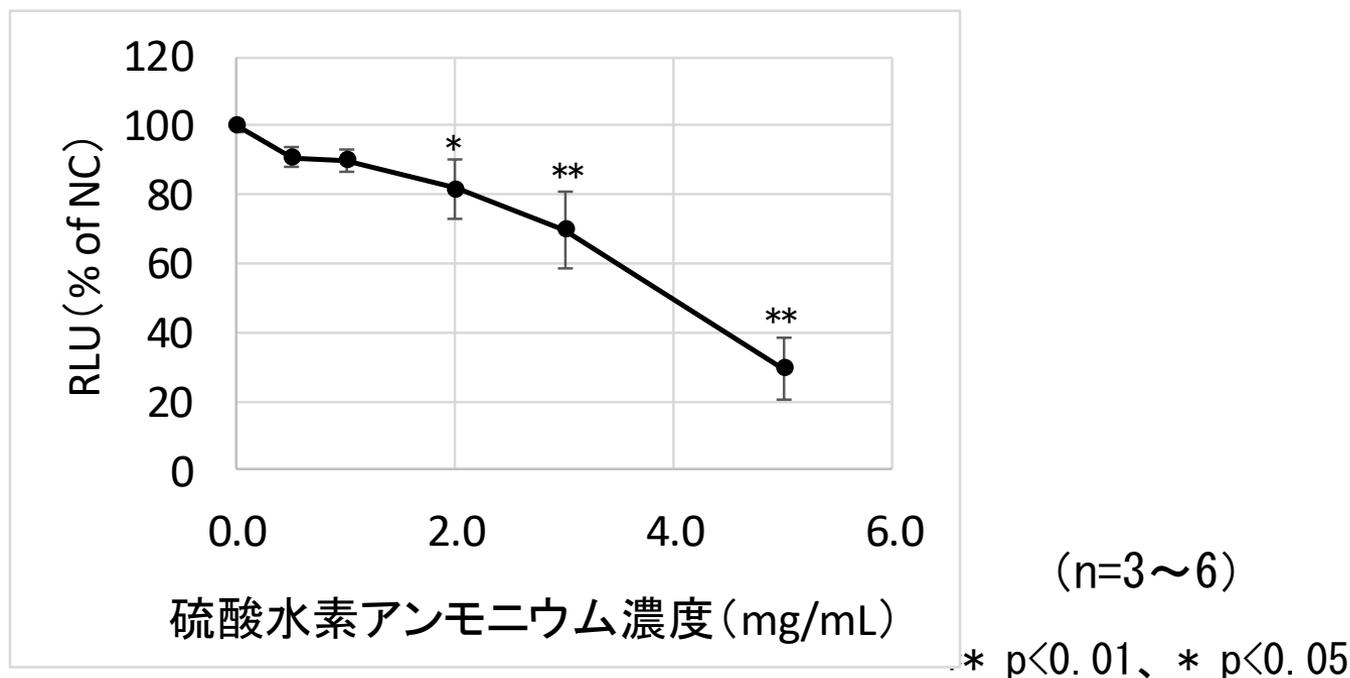
A549細胞に硫酸水素アンモニウムを0.5~3時間ばく露した



1 mg/mL以上の硫酸水素アンモニウムをA549細胞へばく露した結果、濃度に依存した増加が見られた

A549細胞への液相ばく露結果 1 mg/mL以上の生存率

A549細胞に硫酸水素アンモニウムを3時間ばく露した



硫酸水素アンモニウムを2 mg/mL以上ばく露すると、A549細胞の生存率が低下したため、ばく露濃度は1 mg/mL以下で評価する