

平成30年度

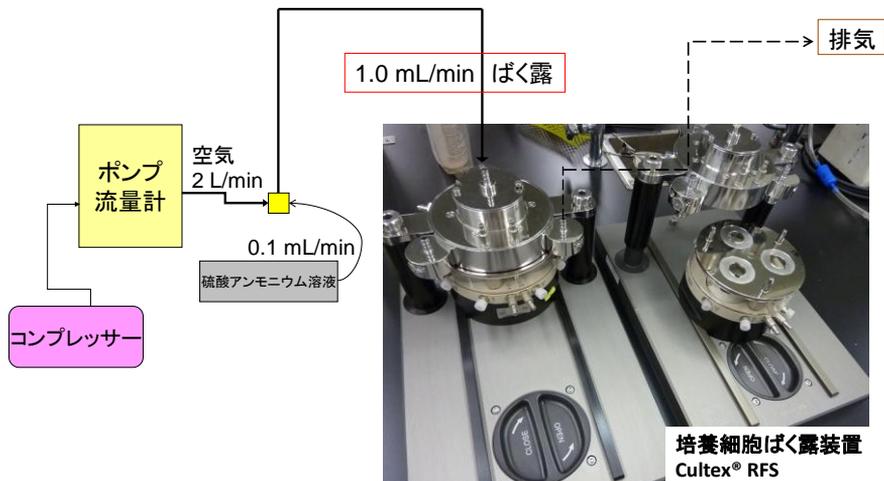
培養細胞への  
硫酸アンモニウムばく露実験

東京都健康安全研究センター  
環境衛生研究科

平成30年度実験計画

- ヒト肺上皮由来A549細胞を用いた  
硫酸アンモニウムばく露実験  
ばく露方法
  - ・気相ばく露
  - ・液相ばく露
  
- ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞を用いた  
硫酸アンモニウムばく露(予備)実験  
ばく露方法
  - ・液相ばく露

## ヒト肺上皮由来A549細胞を用いた 硫酸アンモニウム気相ばく露実験



気相ばく露装置模式図

## 気相ばく露方法

- ・ばく露濃度： 低濃度 ( $1 \text{ mg/m}^3$ )、中濃度 ( $10 \text{ mg/m}^3$ )、  
高濃度 ( $100 \text{ mg/m}^3$ )、対照群 (清浄空気)
- ・ばく露時間： 1、2、3時間  
ばく露後、3時間 (HO-1測定用) もしくは24時間 (HO-1以外) 培養し、培地、細胞を回収。
- ・測定項目： 細胞増殖能力、細胞障害性 (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、GSH)
- ・使用培地： 1%FBS含有RPMI1640培地

### ※ 気相ばく露濃度の測定

精製水を10 mL入れたインピュージャーを用いて、気相化された硫酸アンモニウムを速度1.0 L/minで、10分間採取 (合計10 L採取)。

ばく露濃度は、ばく露を行った全ての実験について、イオンクロマトグラフを用いて測定し、平均した。

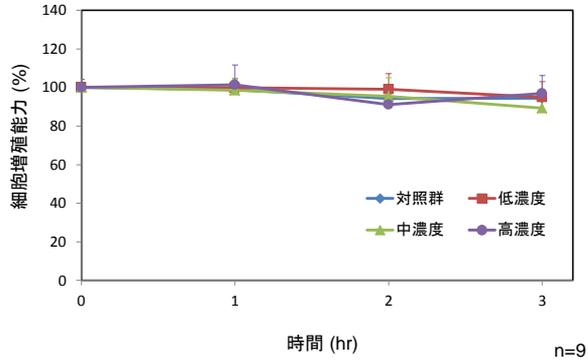
気相ばく露の設定濃度および平均濃度

	低濃度	中濃度	高濃度
設定濃度	$1.0 \text{ mg/m}^3$	$10 \text{ mg/m}^3$	$100 \text{ mg/m}^3$
ばく露濃度 ( $\text{mg/m}^3$ )	$0.78 \pm 0.75$	$6.9 \pm 4.0$	$139 \pm 51$

平均値±標準偏差 (n=15)

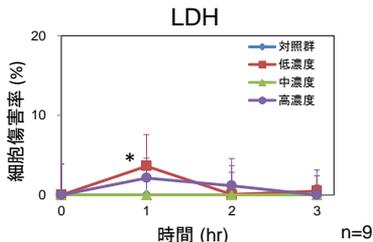
## A549細胞への気相ばく露結果

### 細胞増殖能力

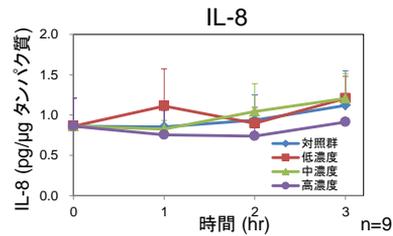


・1～3時間のばく露では、細胞増殖能力に影響はみられなかった。

## A549細胞への気相ばく露結果



・低濃度1時間ばく露でLDH増加。

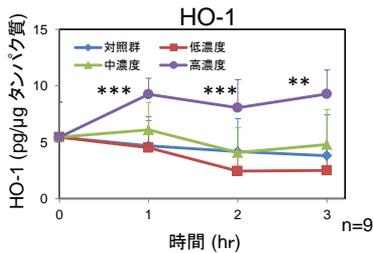


・IL-8産生に影響なし。

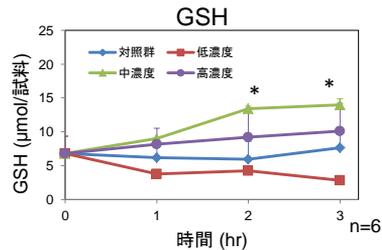
\*; p<0.05

\*\*; p<0.01

\*\*\*; p<0.001



・高濃度ばく露でHO-1産生が増強。



・中濃度 2、3時間ばく露でGSH産生が増強。

※ IL-6は、全ての実験条件で不検出であった。

## A549細胞への気相ばく露結果のまとめ

硫酸アンモニウムを気相ばく露したA549細胞は、

- 細胞増殖能力に影響なし
- LDHは、低濃度 1時間ばく露で増加
- IL-8産生に影響なし
- IL-6は検出されず
- HO-1産生は、高濃度 全てのばく露時間で増強
- GSHは、中濃度 2、3時間ばく露で増強

	細胞増殖	LDH	IL-8	IL-6	HO-1	GSH
A549細胞	影響なし	低濃度1時間のみ増加	影響なし	不検出	増強	中濃度2、3時間で増強

硫酸アンモニウムの気相ばく露により、酸化ストレスマーカーが増強した。炎症への作用はみられず。

## ヒト肺上皮由来A549細胞を用いた液相ばく露実験 及び ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞を用いた 液相ばく露(予備)実験

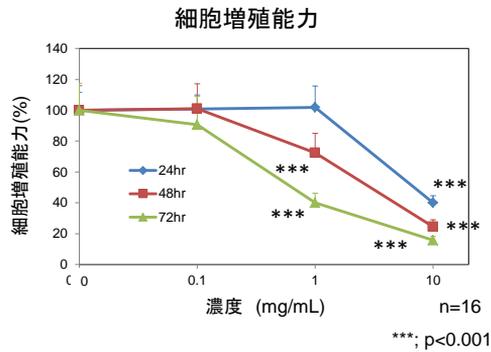
### 液相ばく露方法

硫酸アンモニウムは水溶液として培地に添加(培地の1/10量)し、各細胞へばく露。対照群は、硫酸アンモニウム水溶液の代わりに水を培地へ添加してばく露。

- ① ・ ばく露時間: 24、48、72時間  
・ ばく露濃度: 0~10 mg/mL  
・ 測定項目: 細胞増殖能力
- ② ・ ばく露時間: 24時間または3時間\* (\*HO-1のみ3時間ばく露)  
・ ばく露濃度: 0.1 mg/mL、1 mg/mL、10 mg/mL  
・ 測定項目: 細胞傷害性(LDH)、炎症因子(IL-8、IL-6)、酸化ストレスマーカー(HO-1、GSH)

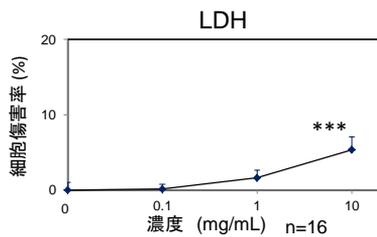
- ・ 使用培地: A549細胞 : 1%FBS含有RPMI1640培地  
Calu-3細胞 : 1%FBS含有MEM培地
- ・ 播種後、実験に供するまでの培養時間: A549細胞 1日 Calu-3細胞 3日

## A549細胞への液相ばく露結果

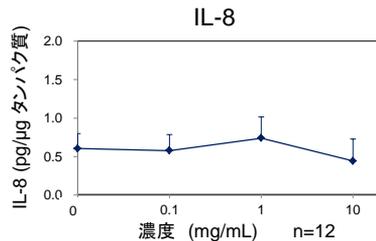


- ・24時間ばく露では、10 mg/mLで細胞増殖能力が抑制された。
  - ・48、72時間ばく露では、1 mg/mL以上で、細胞増殖能力が抑制された。
  - ・ばく露時間に依存し、細胞増殖能力が抑制された。
- 液相ばく露時間は、24時間に設定した。

## A549細胞への液相ばく露結果

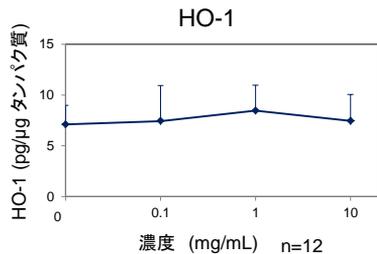


- ・10 mg/mLで増加した。

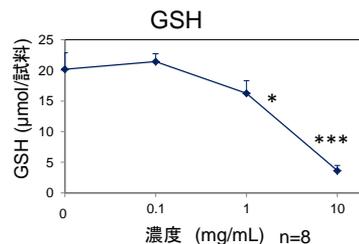


- ・IL-8産生に影響なし。

\*, p<0.05,  
\*\*\*, p<0.001



- ・HO-1産生に影響なし。



- ・1 mg/mL以上でGSH減弱。

※ IL-6は、全ての実験条件で不検出であった。

## A549細胞への液相ばく露結果のまとめ

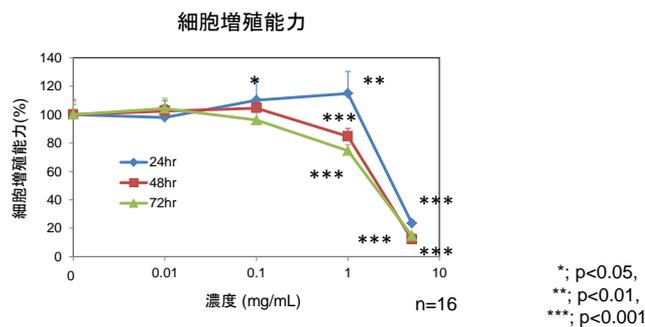
硫酸アンモニウムを液相ばく露したA549細胞は、

- 細胞増殖能力は、ばく露の時間および濃度に依存して抑制
- LDHは、10 mg/mLで増加
- IL-8産生に影響なし
- IL-6は検出されず
- HO-1産生に影響なし
- GSHは、濃度依存的に減弱

	細胞増殖	LDH	IL-8	IL-6	HO-1	GSH
A549細胞	抑制	増加	影響なし	不検出	影響なし	減弱

A549細胞への硫酸アンモニウム液相ばく露は、10 mg/mLで細胞増殖を抑制し、細胞障害性を示したことから、細胞の損傷がGSHの減弱につながったと考えられた。

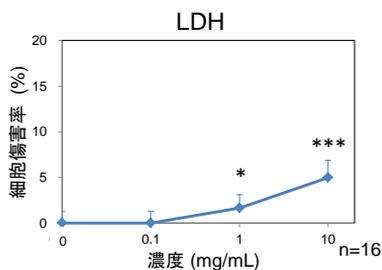
## Calu-3細胞への液相ばく露(予備実験)結果



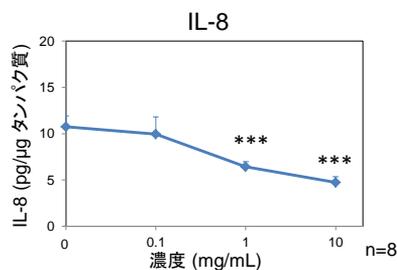
- 24時間ばく露では、0.1、1 mg/mLで細胞増殖能力が促進され、5 mg/mLで増殖能力が抑制された。
- 48、72時間ばく露では、1 mg/mL以上で細胞増殖能力が抑制された。

→ 液相ばく露時間は、24時間に設定した。

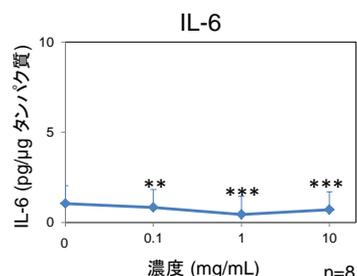
## Calu-3細胞への液相ばく露(予備実験)結果



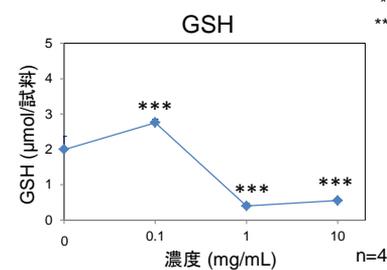
・1 mg/mL以上で細胞傷害率が増加した。



・IL-8産生は1 mg/mL以上で減弱した。 \*; p<0.05, \*\*; p<0.01, \*\*\*; p<0.001



・IL-6産生は0.1 mg/mL以上で減弱した。



・GSHは0.1 mg/mLで増強、1 mg/mL以上で減弱した。

※ HO-1は、全ての実験条件で不検出であった。

## Calu-3細胞への液相ばく露(予備実験)結果のまとめ

硫酸アンモニウムを液相ばく露したCalu-3細胞は、

- 細胞増殖能力は、24時間ばく露すると、0.1、1 mg/mLでは促進、5 mg/mLでは抑制、48、72時間ばく露では、1 mg/mL以上で抑制
- LDHは、1 mg/mL以上で増加
- IL-8産生およびIL-6産生は減弱
- HO-1は不検出
- GSHは、0.1 mg/mLで増強、1 mg/mL以上で減弱

	細胞増殖	LDH	IL-8	IL-6	HO-1	GSH
Calu-3細胞	0.1、1 mg/mL 促進、 5mg/mL抑制	増加	減弱	減弱	不検出	0.1 mg/mL増強、 1、10 mg/mL減弱

Calu-3細胞への硫酸アンモニウム液相ばく露は、1 mg/mL以上で細胞増殖を抑制し、細胞障害性を示した。0.1 mg/mLではGSHの増強がみられた。

## 平成30年度 実験結果のまとめ

2種の培養細胞へ硫酸アンモニウムばく露実験を行った結果、以下のことがわかった。

- A549細胞への気相ばく露により、酸化ストレスマーカーの2倍程度の増強がみられた。
- 液相ばく露により、A549細胞において炎症因子への変化はみられなかったが、Calu-3細胞において炎症因子への作用がみられた。酸化ストレスマーカー(GSH)は、Calu-3細胞において、0.1 mg/mLでは増強作用がみられた。
- 予備実験の段階では、ばく露方法、培養細胞の種類により、及ぼす反応性は異なると考えられた。