

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5年 2月

# 令和4年度 実験計画

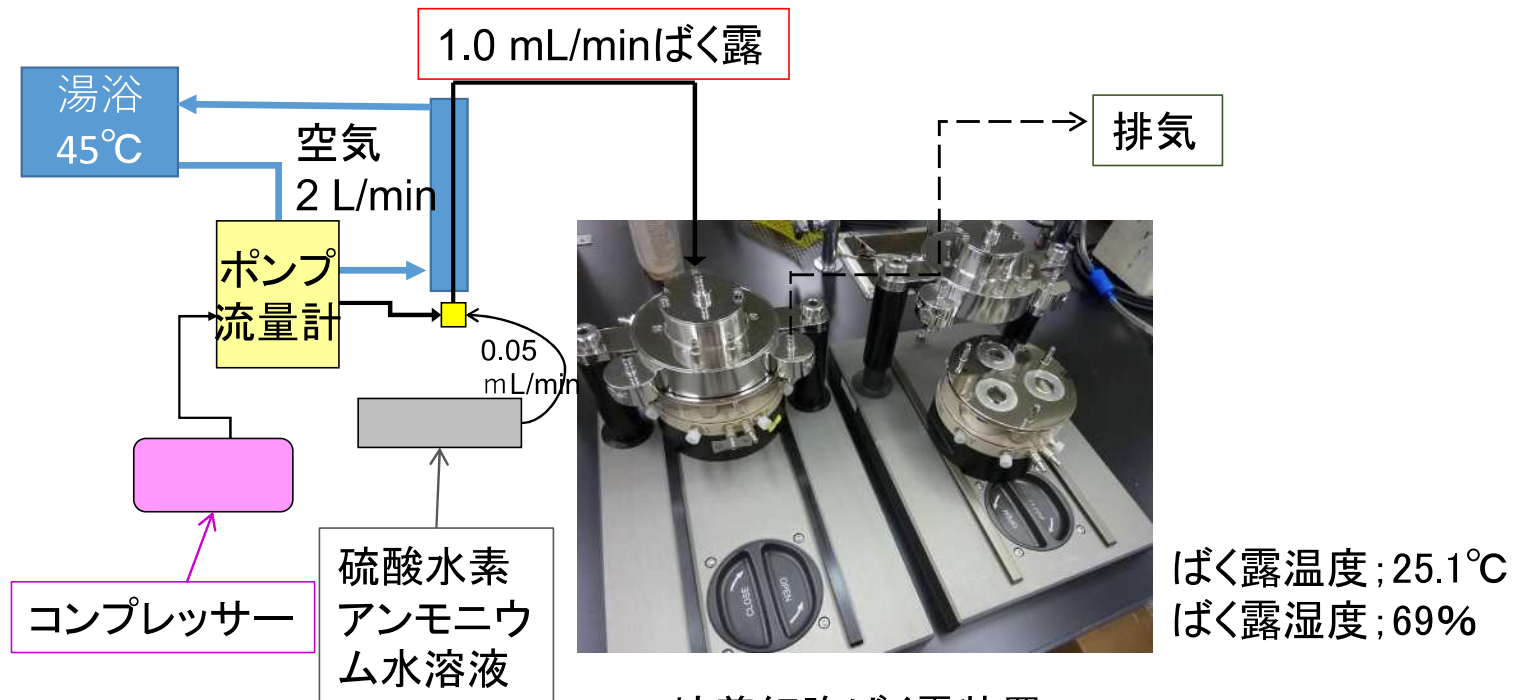
- 1 Calu-3細胞への気相ばく露実験
- 2 Calu-3細胞の細胞膜間結合力に関する測定

# 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



培養細胞ばく露装置  
Cultex® RFS

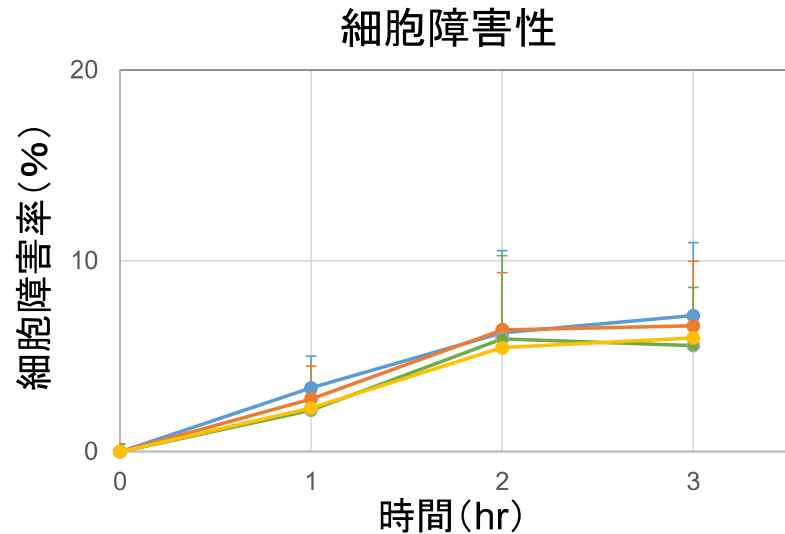
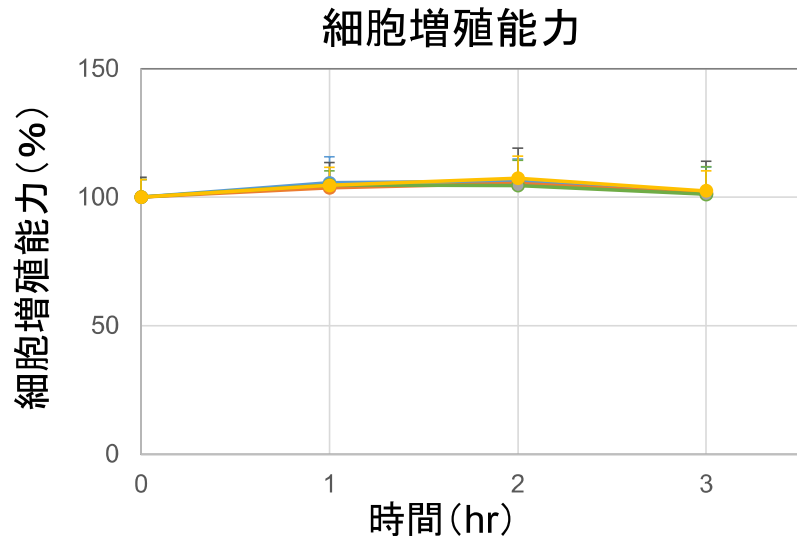
実験条件	
ばく露方法	気相ばく露 1.0 mL/min
培養細胞	ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞
ばく露濃度	1、10、100 mg/m <sup>3</sup> 、清浄空気
ばく露時間	1、2、3時間

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)

ばく露群	ばく露濃度 (mg/m <sup>3</sup> )
低濃度	1.0 ± 0.2
中濃度	10.3 ± 3.9
高濃度	102 ± 17

(n=24)

# Calu-3細胞への気相ばく露実験結果(1)



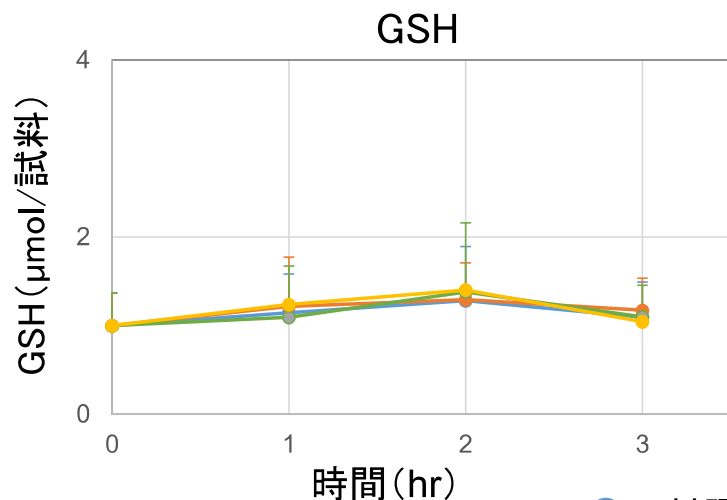
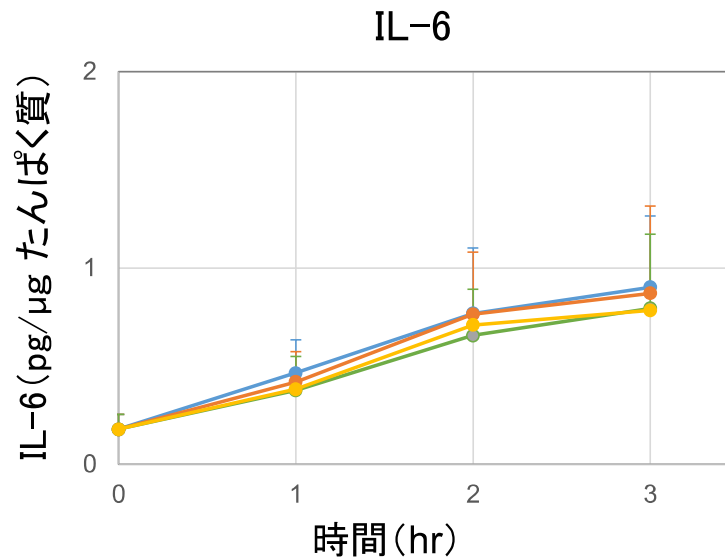
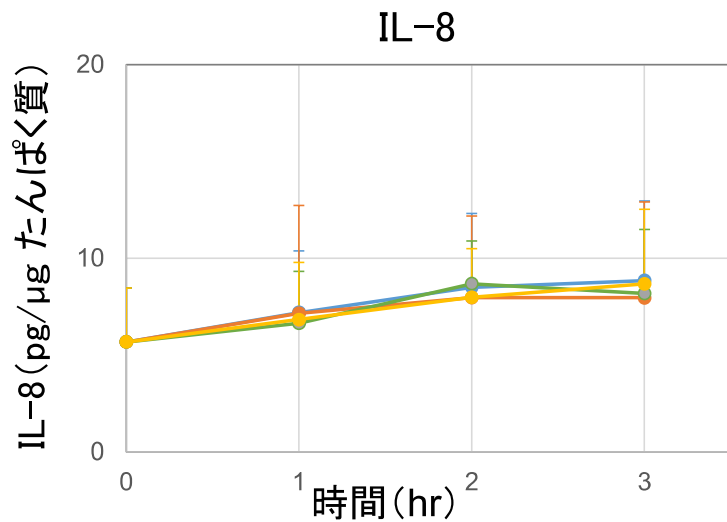
● ; 対照群、● ; 低濃度群(1 mg/m<sup>3</sup>)、  
● ; 中濃度群(10 mg/m<sup>3</sup>)、● ; 高濃度群(100 mg/m<sup>3</sup>)

(n=12)

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みられなかった。

# 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産生に影響はみられなかった。
- HO-1は検出されなかった。

(n=12)

● ; 対照群、● ; 低濃度群(1 mg/m<sup>3</sup>)、  
● ; 中濃度群(10 mg/m<sup>3</sup>)、● ; 高濃度群(100 mg/m<sup>3</sup>)

## 2 Calu-3細胞の細胞膜間結合力に関する測定

### 背景:

- ・ヒト気管支上皮由来である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

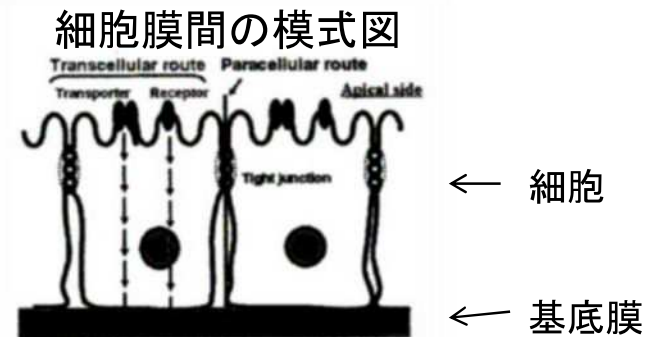


Fig. 1. Schematic Scheme of Transport Route in Epithelia

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

## 【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: $5.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>程度

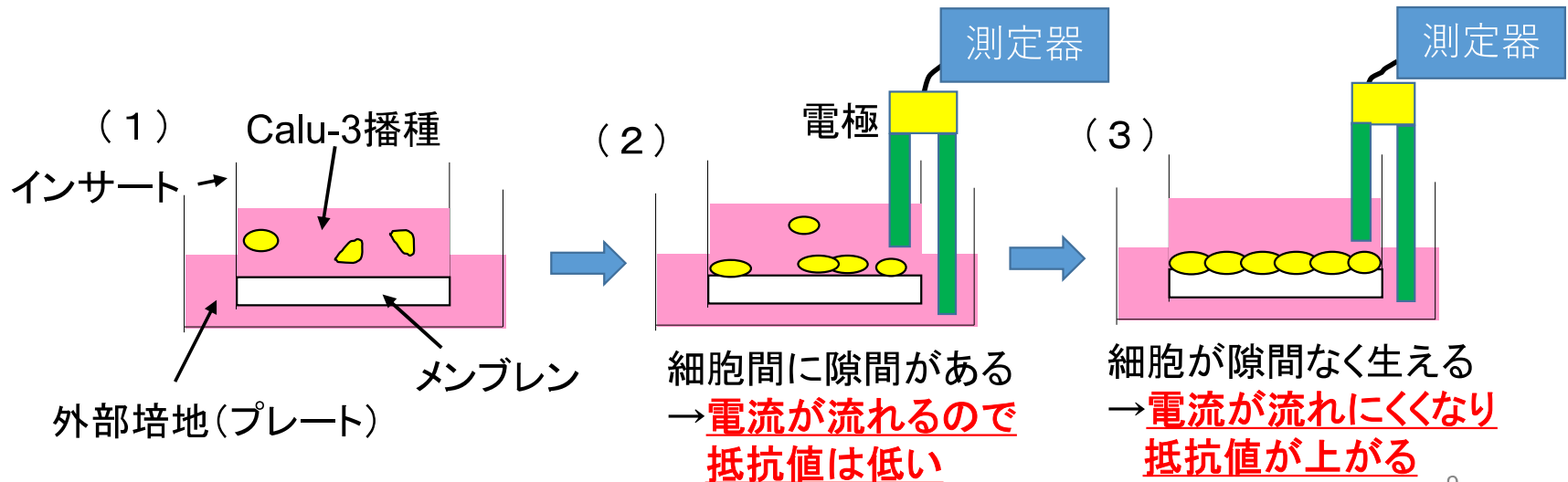
②培養日数:約1週間

③TEER値:約3000 Ωcm<sup>2</sup>以上

- ・細胞は複数well播種
- ・TEER値が3000 Ωcm<sup>2</sup>を超過したものをばく露実験に使用
- ・酸化チタンがTEERを低下させる陽性コントロールとして使用可能

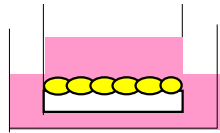


実験条件	
培養細胞	ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞
ばく露濃度(液相ばく露)	0(非ばく露), 0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/mL
ばく露時間	24時間(1, 3, 6, 24時間後に計測)
陽性コントロール	酸化チタン 50 $\mu$ g/mL
測定項目	TEER(経上皮電気抵抗)

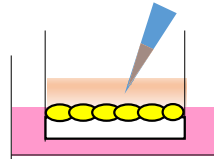


## 硫酸水素アンモニウムばく露方法

- ・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



インサート内に  
細胞が隙間無く  
生育した状態



終濃度がばく露濃度となるよう  
培地に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

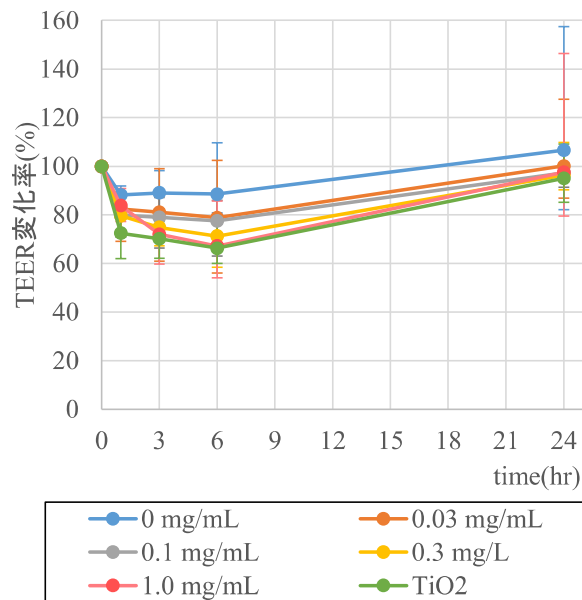


1、3、6、24時間後に測定

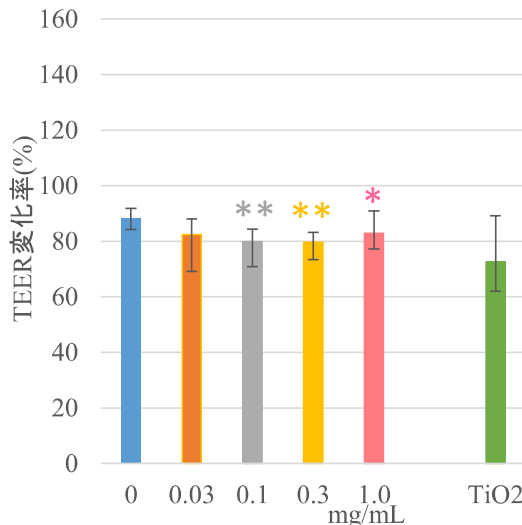
## ばく露までの細胞の増殖及び維持

- ・2～4日ごとにインサート内の培地を交換  
(代謝物による培地の黄変等、細胞の生育に影響が生じるため)
- ・ばく露実験に使用可能な状態(TEERが約3000  $\Omega\text{cm}^2$ 程度)になるまで培養

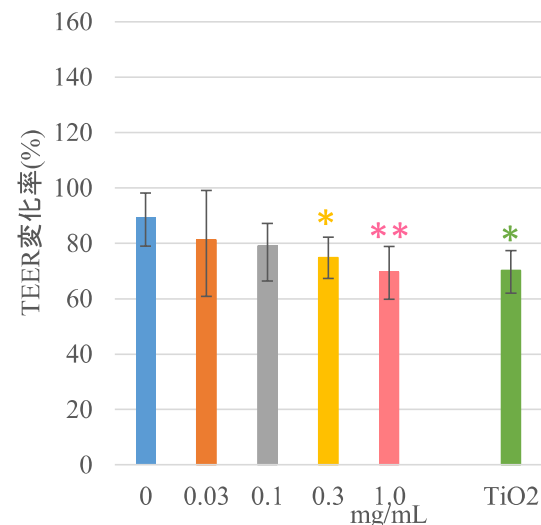
# ★結果



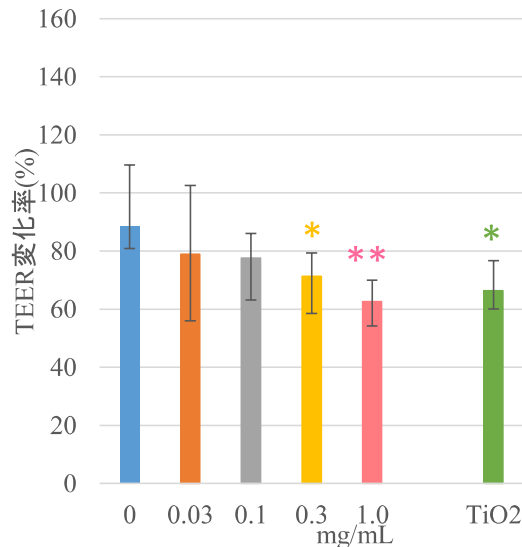
ばく露1時間



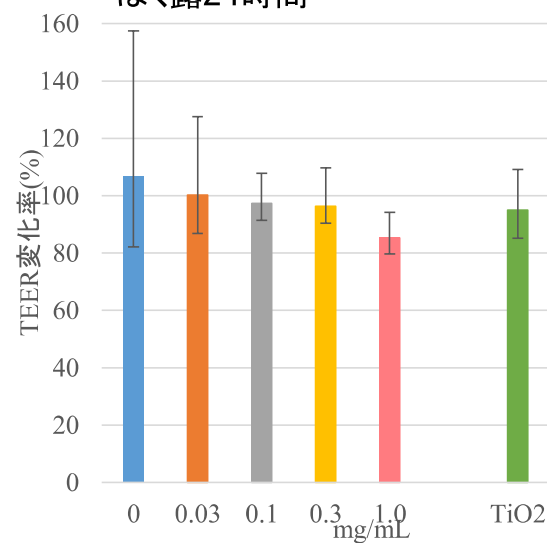
ばく露3時間



ばく露6時間



ばく露24時間



- ・時間経過により一過性にTEER低下
  - ・低下割合は濃度依存傾向
  - ・24時間後には回復(90~100%超)
- ↓
- ・細胞膜間結合力に即時的な影響を及ぼす可能性

\*;p<0.05、\*\*;p<0.01 (n=5)

## 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、各測定項目（細胞障害性、炎症因子、酸化ストレス）に影響はみられなかった。Calu-3細胞は硫酸水素アンモニウムによる影響はないことが示唆された。
2. 細胞膜間結合力については、硫酸水素アンモニウム液相ばく露により、一過性のTEER低下が見られ、即時的な影響を及ぼす可能性が示唆された。また、TEERの低下は、ばく露濃度に依存する傾向があった。