

## 第3章 培養細胞への硫酸アンモニウムばく露実験

### 1 目的

大気中微小粒子状物質（以下  $PM_{2.5}$  と略す）は、粒径が極めて小さいことから、肺の奥深くまで到達する可能性がある。硫酸アンモニウムは、 $PM_{2.5}$  の主要な成分の一つで、培養細胞への影響については、マスト細胞を用いたばく露実験で、硫酸アンモニウムがマスト細胞の脱顆粒を引き起こすとの報告<sup>1)</sup>があるが、それ以外の情報は少ない。そこで、大気汚染保健対策に係る調査・研究として、 $PM_{2.5}$  中の硫酸アンモニウムの生体への影響に関する情報を得るため、A549細胞及びCalu-3細胞の2種の培養細胞を用い、硫酸アンモニウムの気相ばく露及び液相ばく露実験を行った。

### 2 方法

#### (1) 気相ばく露

##### ア 培養細胞

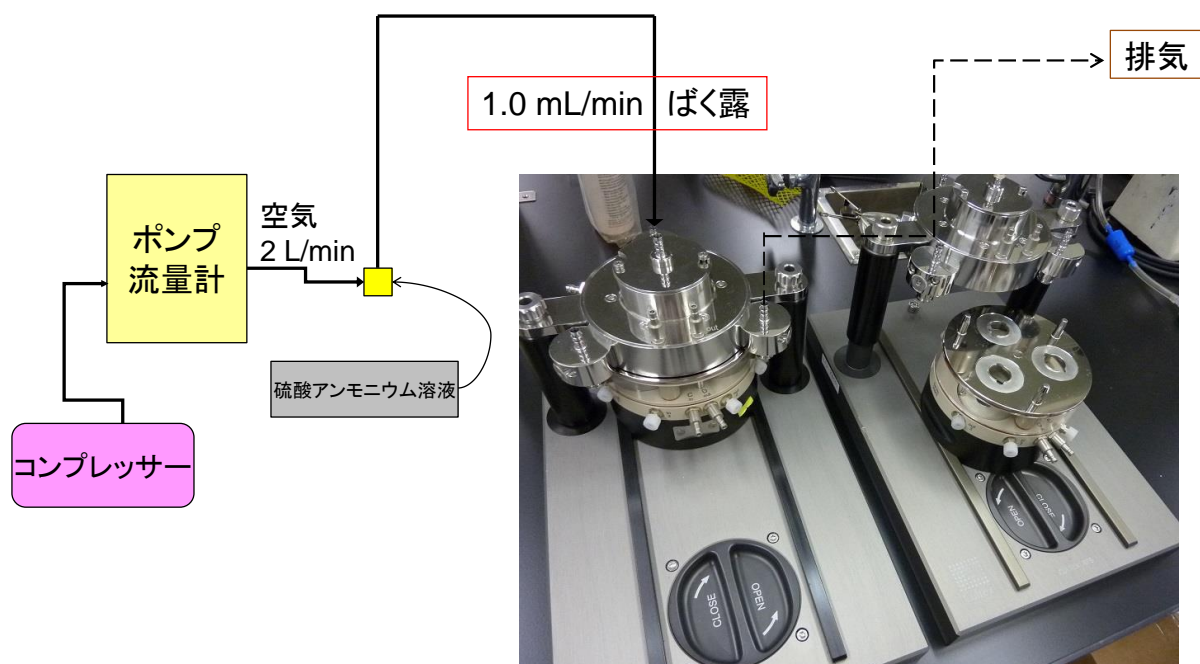
培養細胞は、A549細胞（American Type Culture Collection、No. CCL-185）及びCalu-3細胞（American Type Culture Collection、No. HTB-55）を用いた。なおA549細胞は、ヒト肺胞上皮腺がん細胞から樹立した培養細胞である。肺胞上皮には、I型及びII型肺胞上皮細胞があり、A549細胞はII型細胞である。Calu-3細胞は、ヒト気管支上皮腺がん細胞から樹立した培養細胞である。

##### イ 試薬

硫酸アンモニウム（分子生物学用）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）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 Inc.）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。

## ウ 培養細胞気相ばく露装置

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



培養細胞ばく露装置 Cultex<sup>®</sup> RFS

図 1. 培養細胞気相ばく露装置模式図

## エ 硫酸アンモニウムの気相化

硫酸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 A549 細胞へのばく露では 0.1 mL/min の速度で、Calu-3 細胞へのばく露では 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アンモニウムを 1.0 mL/min の流速で Cultex<sup>®</sup> RFS へ導入し、硫酸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、A549 細胞の対照群は、実験室内空気を活性炭に通過させた清浄空気をばく露した群とした。一方、Calu-3 細胞の対照群は、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アンモニウムばく露群と対照群を比較した。

## オ 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 ウェルプレート内のウェル内に置いたインサート（面積  $0.9 \text{ cm}^2$ ）に  $17 \times 10^4$  個を播種し、インサートのメンブラン上で  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2 \cdot 95\% \text{ air}$  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、 $1\% \text{ FBS}$  含有 RPMI1640 培地を入れた Cultex<sup>®</sup> RFS に設置し、気相化した硫酸アンモニウム又は清浄空気を  $1.0 \text{ mL/min}$  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  $1\% \text{ FBS}$  含有 RPMI1640 培地  $0.6 \text{ mL}$  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  $0.5 \text{ mL}$  加え、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2 \cdot 95\% \text{ air}$  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  $10\% \text{ FBS}$  含有 MEM 培地もしくは  $1\% \text{ FBS}$  含有 MEM 培地とし、インサートへは  $25 \times 10^4$  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。

## カ 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、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>。各測定項目の試験方法は以下のとおりである。

### (ア) 細胞増殖能力試験

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 Inc.) により波長  $450 \text{ nm}$  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) 細胞傷害性試験

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  $550 \text{ nm}$  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。

#### キ 総ばく露量の推計

高濃度（100mg/m<sup>3</sup>）の硫酸アンモニウムを A549 細胞へばく露し、ばく露後のインサートに超純水を加え、洗浄した液を試料溶液として、硫酸アンモニウム濃度をイオンクロマトグラフで測定した。また対照群についても同様の実験を行った。

## (2) 液相ばく露

### ア 培養細胞

培養細胞は、(1)アと同じものを使用した。

### イ 試薬

試薬は、(1)イと同じものを使用した。

### ウ 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 ウエルプレートに  $2 \times 10^4$  cells/well 若しくは 24 ウエルプレートに  $20 \times 10^4$  cells/well 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アンモニウムを 1/10 量加えた実験用培地を用いた。硫酸アンモニウムばく露濃度は、0.001 mg/mL、0.01 mg/mL、0.1 mg/mL、1 mg/mL 及び 10 mg/mL とした。細胞増殖能力試験及び細胞傷害性試験は、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 濃度測定試験は、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、細胞増殖能力試験及び細胞傷害性試験では n=24、IL-8、IL-6、HO-1 及び GSH 濃度測定試験では 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  $4 \times 10^4$  cells/well、もしくは 24 ウエルプレートに  $20 \times 10^4$  cells/well 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。なお、硫酸アンモニウムばく露最高濃度は 5 mg/mL とした。

### エ 測定項目

細胞増殖能力、細胞傷害性、IL-8、IL-6、HO-1 及び GSH について測定した。各測定項目の試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) 細胞増殖能力試験

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) 細胞傷害性試験

24 時間ばく露した A549 細胞又は Calu-3 細胞の培地を回収し、気相ばく露実験と同様に細胞傷害性を算出した。細胞傷害性は、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 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、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、気相ばく露実験と同様に 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、気相ばく露実験と同様に 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、気相ばく露実験と同様に 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、気相ばく露実験と同様に GSH 濃度を定量した。

### (3) 統計学的解析

各試験項目については、Dunnet 法を用いて統計学的検定を行った。なお、気相ばく露では、同じばく露時間の対照群と比較し、液相ばく露では、硫酸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。

### 3 結果

#### (1) A549 細胞への気相ばく露

A549 細胞への硫酸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 2 に示す。細胞増殖能力は、全てのばく露群、ばく露時間で、有意差は見られなかった。LDH は、低濃度 1 時間ばく露で対照群に比べ増強したが、中濃度群、高濃度群では有意差は見られなかった。IL-8 産生については、有意差は見られなかった。IL-6 は検出されなかった (図には示していない)。HO-1 産生は、高濃度群では全てのばく露時間において、対照群に比べ有意に増強された。GSH 産生は、中濃度 2、3 時間ばく露で、対照群に比べ増強された。酸化ストレスマーカーの HO-1 産生及び GSH 産生は、いずれも対照群に比べ 2 倍程度増強した。

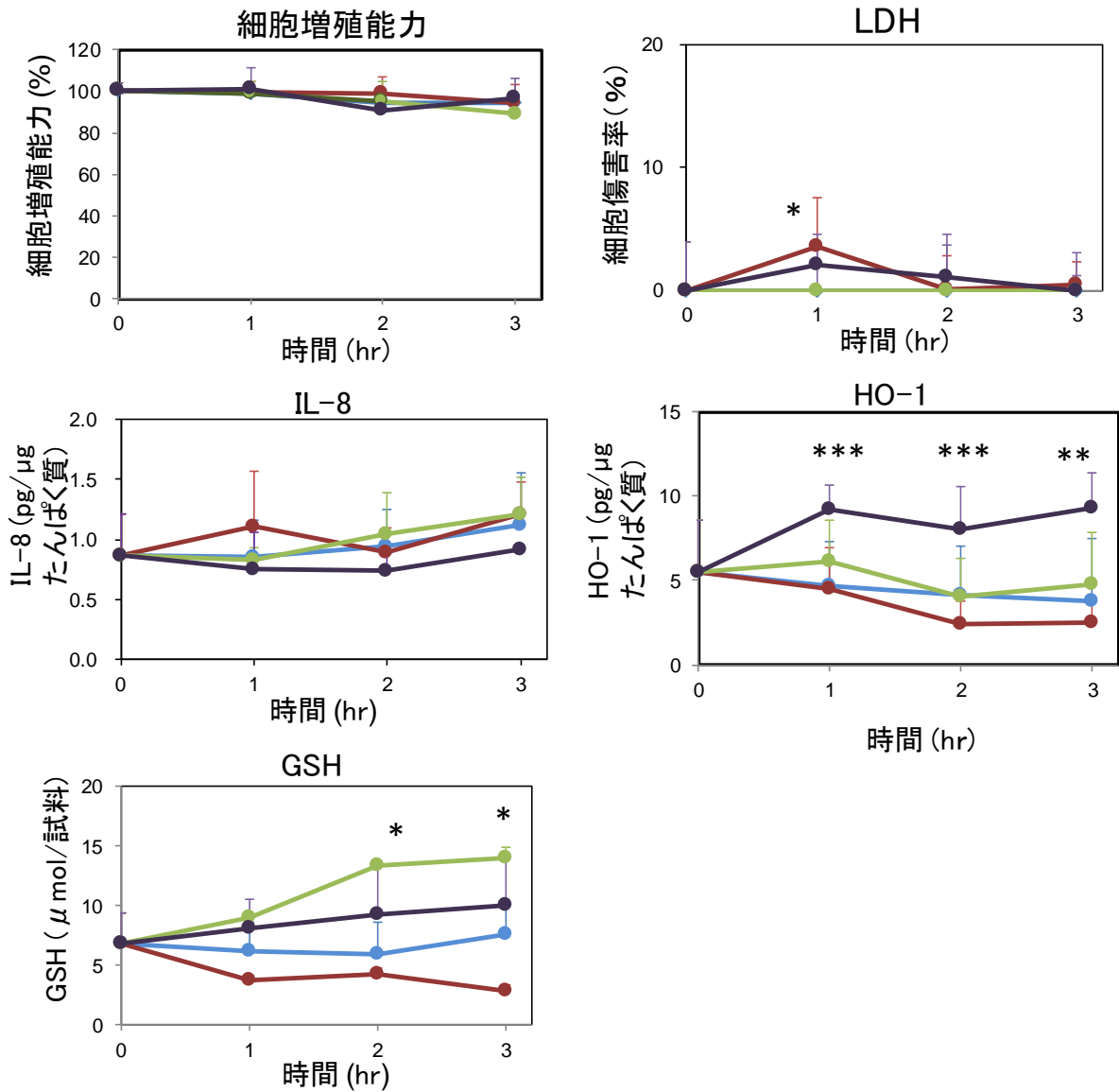


図 2. A549 細胞への気相ばく露結果

○ ; 対照群、● ; 低濃度群、■ ; 中濃度群、▲ ; 高濃度群

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

硫酸アンモニウムの総気相ばく露量を推計した結果を表 1 に示す。高濃度(100 mg/m<sup>3</sup>) の硫酸アンモニウムをばく露した場合、細胞へのばく露量は 1 時間ばく露で 1.7 μg、2 時間で 2.4 μg、3 時間で 5.6 μg であった。細胞表面上の水分量を 3μL と仮定した場合、表面上の溶液濃度は 1 時間後 0.57 mg/mL、2 時間後 0.80 mg/mL、3 時間後 1.9 mg/mL と推測された。

表 1. 培養細胞へのばく露量及び推計した溶液濃度

ばく露時間	1時間	2時間	3時間
細胞へのばく露量(μg)	1.7	2.4	5.6
ばく露終了時の細胞表面上の溶液濃度(mg/mL)	0.57	0.80	1.9

細胞表面上の水分の容量を 3 μL と仮定して計算した



## (2) Calu-3 細胞への気相ばく露

Calu-3 細胞への硫酸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。気相ばく露では、細胞増殖能力及び LDH は全てのばく露群、ばく露時間で有意な差はなかった。IL-8 産生は、中濃度群は 2、3 時間ばく露で対照群に比べ増強したが、低濃度 3 時間ばく露で対照群に比べ減弱した。高濃度群では有意な差は見られなかった。IL-6 産生は、中濃度 3 時間ばく露で対照群に比べ増強し、高濃度 3 時間ばく露で対照群に比べ減弱したが、低濃度群では有意な差はなかった。HO-1 は検出されなかった (図には示していない)。GSH 産生は高濃度群で全てのばく露時間で対照群に比べ有意に増強した。

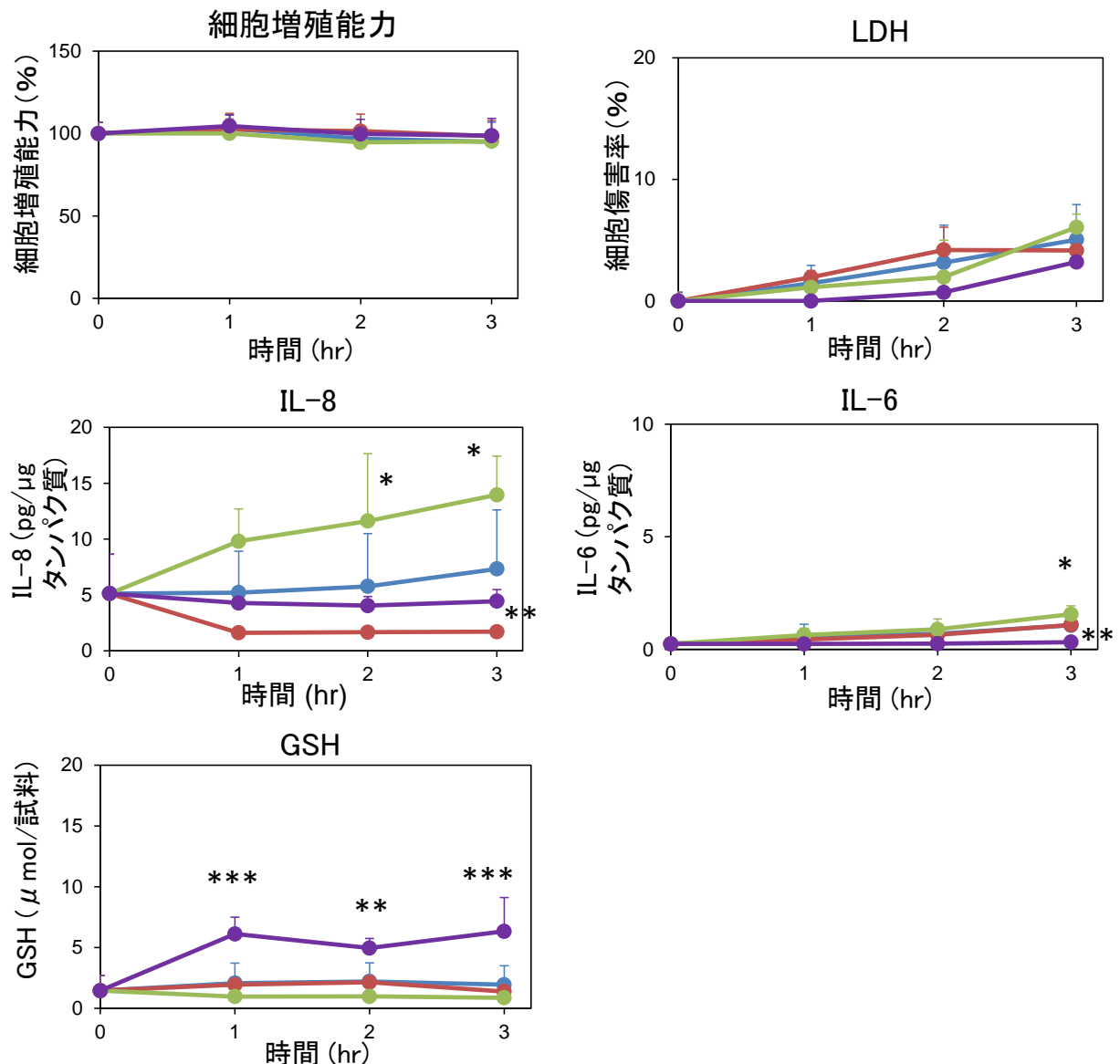


図 3. Calu-3 細胞への気相ばく露結果

● ; 対照群、● ; 低濃度群、● ; 中濃度群、● ; 高濃度群

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

### (3) A549 細胞への液相ばく露

A549 細胞への硫酸アンモニウム液相ばく露では、細胞増殖能力は 1 mg/mL までは有意な差はなかったが、10 mg/mL では有意に抑制された (図 4)。硫酸アンモニウムをばく露した A549 細胞を顕微鏡で観察すると細胞の膨張が見られ、そのまま放置すれば細胞が壊死する状態であった。したがって 10 mg/mL までばく露すると、A549 細胞自体への硫酸アンモニウムの影響が強いと考えられた。

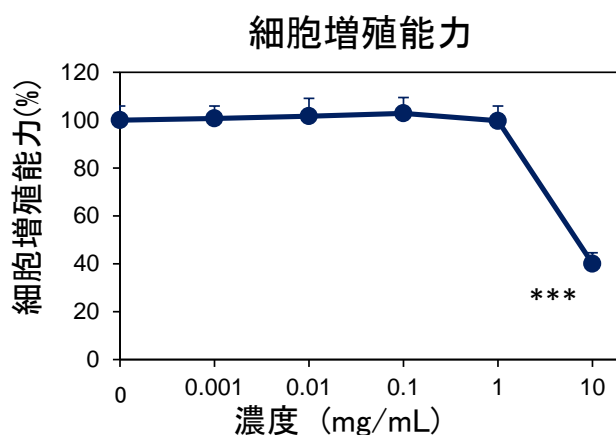


図 4. A549 細胞への液相ばく露結果 (1)

\*\*\*;  $p < 0.001$

10 mg/mL で細胞増殖能力が抑制されたことから、炎症因子等の測定項目については、1 mg/mL を最高濃度として実験を行うこととした (図 5)。LDH では、0.001 mg/mL から 1 mg/mL まで細胞傷害率は増加したが、最大でも 3.3 % の増加であった。IL-8 産生は、1 mg/mL の濃度では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 産生及び GSH 産生は、対照群と比較して有意な差はなかった。

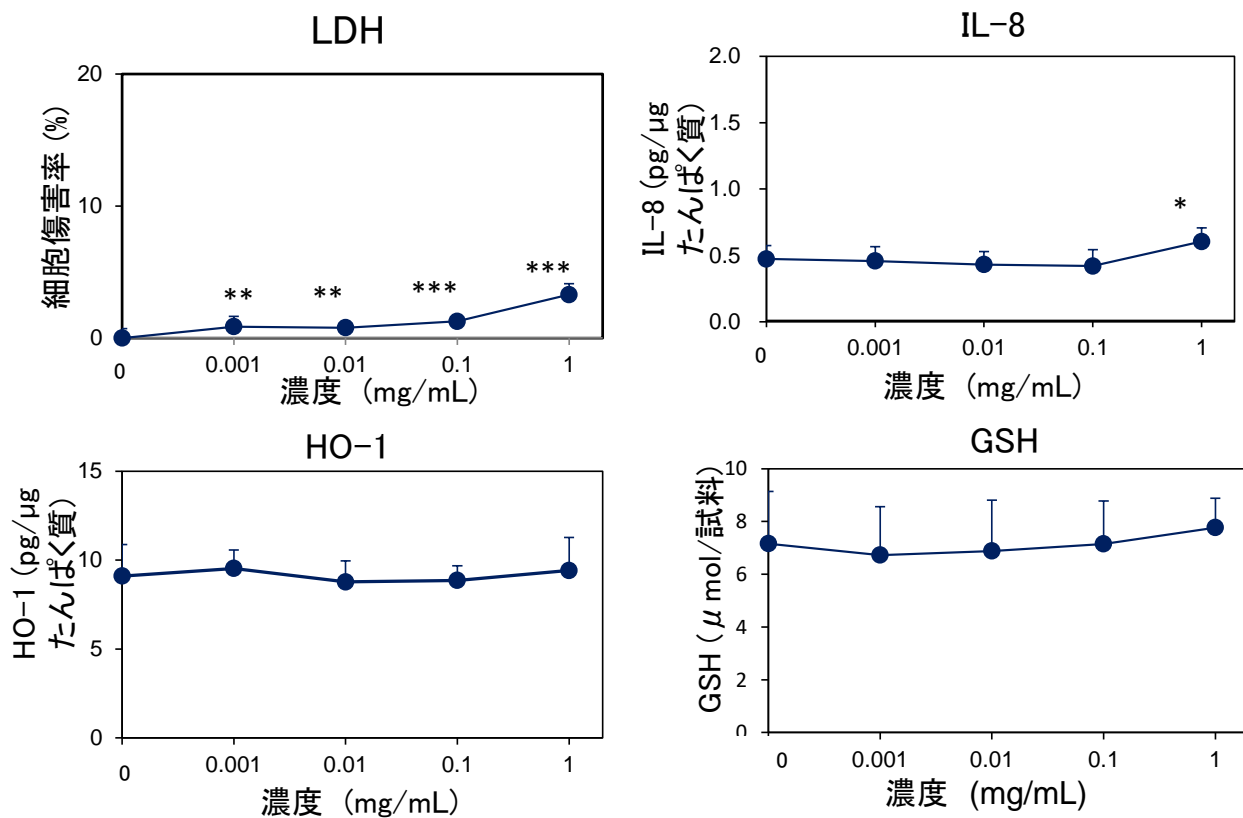


図 5. A549 細胞への液相ばく露結果 (2)

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

#### (4) Calu-3 細胞への液相ばく露

Calu-3 細胞への硫酸アンモニウム液相ばく露では、細胞増殖能力は 0.1 mg/mL 及び 1 mg/mL では有意に増強されたが、5 mg/mL では細胞増殖能力が有意に抑制された (図 6)。5 mg/mL 硫酸アンモニウムをばく露した Calu-3 細胞を顕微鏡で観察すると細胞の膨張が見られ、そのまま放置すれば細胞が壊死する状態であった。したがって 5 mg/mL まではく露すると、Calu-3 細胞自体への硫酸アンモニウムの影響が強いと考えられた。

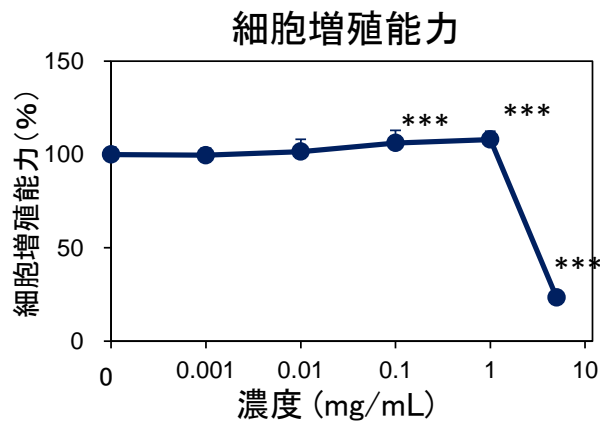


図 6. Calu-3 細胞への液相ばく露結果 (1)

\*\*\*;  $p < 0.001$

5 mg/mL で細胞増殖能力が抑制されたことから、炎症因子等の測定項目については、1 mg/mL を最高濃度としてばく露実験を行うこととした (図 7)。LDH は、1 mg/mL ばく露で 0.7%増加した。IL-8 産生及び IL-6 産生は、1 mg/mL の濃度では対照群に比べ有意に減弱した。HO-1 は検出されなかった (図には示していない)。GSH 産生は、1 mg/mL の濃度では対照群に比べ有意に減弱した。

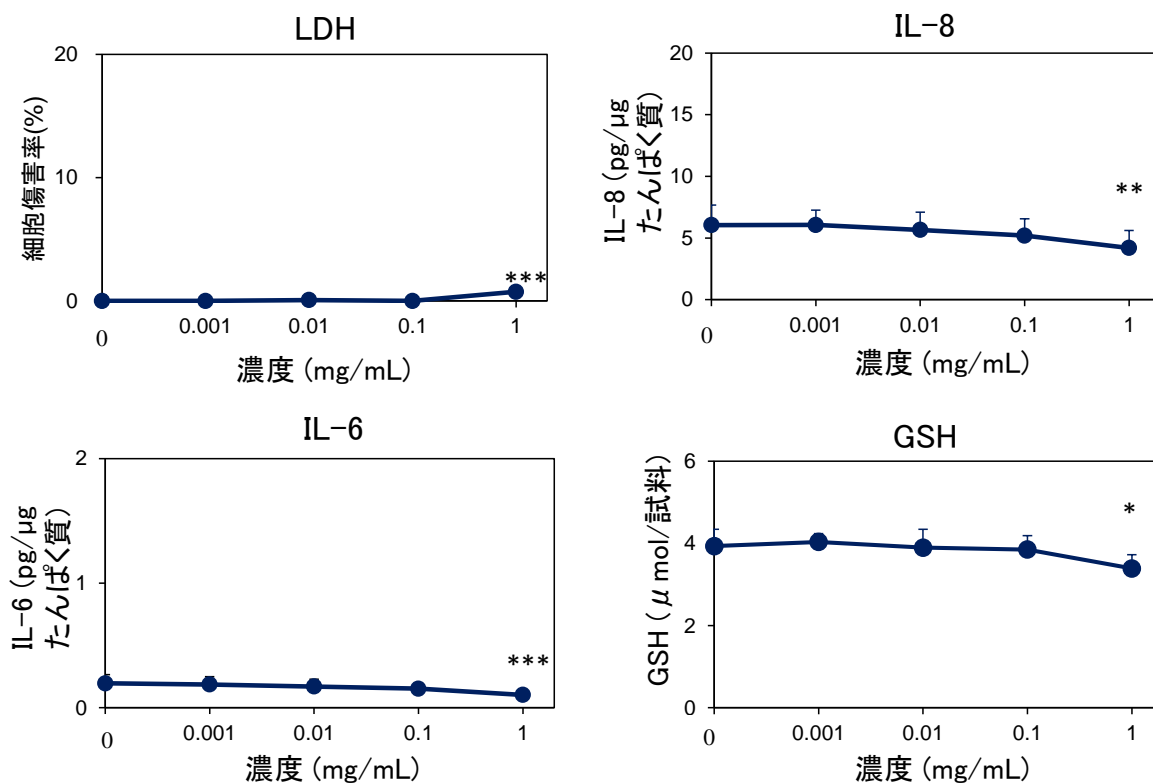


図 7. Calu-3 細胞への液相ばく露結果 (2)

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

#### 4 考 察

硫酸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による各因子の増減について、表 2 及び表 3 にまとめた。A549 細胞では、酸化ストレスマーカーは、高濃度群 ( $100 \text{ mg/m}^3$ ) で HO-1 産生が 2 倍程度増強し、中濃度群 ( $10 \text{ mg/m}^3$ ) では GSH 産生が 2 倍程度増強したが、炎症因子 IL-8 に影響は見られなかった。この結果について、A549 細胞は、硫酸アンモニウムばく露により HO-1 や GSH 産生が増強し、酸化ストレスから細胞を防御した結果、IL-8 の産生増強にまでは至らなかったと考えられる。Calu-3 細胞では、高濃度群で GSH 産生は 3 倍程度増強が見られ、IL-6 産生は 1/3 程度の減弱が見られた。中濃度群では、GSH に影響はなかったが、IL-8 産生は 2 倍程度の増強、IL-6 産生は 3 時間ばく露で 1.5 倍程度の増強が見られた。また低

濃度群（1 mg/m<sup>3</sup>）では、IL-8 産生が 1 時間ばく露で 1/4 程度の減弱が見られた。この結果について、高濃度群では酸化ストレスにより GSH 産生が増強したことで、炎症因子産生が抑制されたが、中濃度群では酸化ストレス防御作用が起動せず、炎症因子産生が増強された可能性が考えられる。

A549 細胞はⅡ型肺胞上皮細胞由来の細胞であり、Calu-3 細胞は気管支上皮由来細胞である。Ⅱ型肺胞上皮細胞は肺の末梢の肺胞領域に存在し、肺サーファクタントの分泌及びⅠ型肺胞上皮細胞への分化を担っているのに対し、気管支上皮細胞は外部からの侵入物に対して生体を保護するために、細胞間結合が強く、粘液等でバリアを形成する<sup>8)</sup>。A549 細胞及び Calu-3 細胞は、こうした異なる性質を持つ細胞が由来となっていることから、炎症因子及び酸化ストレスマーカーにおいて、反応性の違いを生じた可能性も考えられる。

表 2. A549 細胞への気相ばく露による因子の増減

	ばく露濃度	低濃度群	中濃度群	高濃度群
細胞傷害性	LDH	→	→	1時間 ↗
酸化ストレスマーカー	HO-1	→	→	1、2、3時間 ↗
	GSH	→	2、3時間 ↗	→
炎症因子	IL-8	→	→	→
	IL-6	-	-	-

→ ; 変化なし、↗ ; 増強、- ; 不検出

表 3. Calu-3 細胞への気相ばく露による因子の増減

	ばく露濃度	低濃度群	中濃度群	高濃度群
細胞傷害性	LDH	→	→	→
酸化ストレスマーカー	HO-1	-	-	-
	GSH	→	→	1、2、3時間 ↗
炎症因子	IL-8	1時間 ↘	2、3時間 ↗	→
	IL-6	→	3時間 ↗	3時間 ↘

→ ; 変化なし、↗ ; 増強、↘ ; 減弱、- ; 不検出

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 4 及び表 5 にまとめた。A549 細胞で LDH が全濃度域で増加し、HO-1 及び GSH 産生は変化が見られなかったが、1 mg/mL ばく露で IL-8 産生が 1.3 倍程度増強した。また、Calu-3 細胞では、1 mg/mL ばく露により LDH が増加し、GSH 産生が減弱、IL-8 及び IL-6 産生が減弱した。しかし、いずれも統計的有意差はあったものの、変動幅は数%であり、大きな変動ではなかった。

表 4. A549 細胞への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 5. Calu-3 細胞への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	→	→	→	↘

気相ばく露と液相ばく露ではばく露方法が異なることから、それぞれの結果の違いを考察するにあたり、総ばく露量を推計し、気相ばく露での細胞表面上の硫酸アンモニウム濃度を求めた。その結果、気相ばく露時の総ばく露量は、高濃度群 (100 mg/m<sup>3</sup>) 3 時間ばく露で 5.6 µg と推計され、細胞表面の水分量を 3 µL とした場合、濃度は 1.9 mg/mL となった。この濃度は、液相ばく露の最高濃度 1 mg/mL に近い濃度であり、最大濃度の差は 2 倍以内であった。ばく露実験の結果では、気相ばく露で、炎症因子及び酸化ストレスに影響が見られたが、液相ばく露ではそれらの影響は明らかではなかった。粉末吸入剤を用いた気相ばく露実験の報告<sup>9,10)</sup>によれば、同程度の濃度では液相ばく露より気相ばく露の方が影響は強く表れ、それは、気相ばく露では細胞層上に局所的に薬物の高濃度溶液が形成され、細胞生存率が低下することが原因と指摘している。このことから、本研究においても同様の事象が発生した可能性が考えられる。

本研究では、硫酸アンモニウムの気相ばく露実験で炎症を起こす可能性が推察されたが、影響が見られたばく露濃度は、第2章で報告した大気中硫酸アンモニウム濃度調査結果（一般局  $2.2 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、自排局  $2.3 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ）の5,000倍（中濃度群）または50,000倍（高濃度群）であり、通常的环境では見られない濃度である。一方、低濃度群（ $1 \text{ mg}/\text{m}^3$ ）は、大気濃度に比べて500倍に相当する高濃度であるが、A549細胞への影響は見られず、Calu-3細胞でIL-8産生がわずかに減弱したが、他の測定項目には変化がなく、限局的なものであった。

A549細胞へ5 ppm 二酸化窒素を3時間ばく露した実験では、IL-8遺伝子の20倍以上の発現亢進が認められたとの報告がある<sup>11)</sup>。また、ヒト気道上皮を再構築した培養モデルMucilAirを用いてたばこ煙を直接ばく露した実験では、用量依存的なIL-8産生増強が認められ、最大70倍程度に増強した<sup>12)</sup>。一方、A549細胞へディーゼル排出ガスをばく露した実験では、HO-1遺伝子が2倍程度増強したとの報告がある<sup>13)</sup>。本研究で、Calu-3細胞の気相ばく露中濃度群で見られたIL-8産生の増強は2倍程度であり、これらの報告と比べるとわずかな増強であったと言える。

今回、2種の培養細胞を用いて硫酸アンモニウムの気相及び液相ばく露実験を行った結果、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。

## 5 文 献

- 1) 片岡裕美, 中村智美, 田鶴谷(村山)恵子, 他: 大気環境学会誌, **52**(1), 12-18, 2017.
- 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) 玉田 勉, 佐々木 司: 日呼吸会誌, **39**(3), 157-165, 2001.
- 9) Asai, A., Okuda, T., Sonoda, E., et al.: *Pharm. Res.*, **33**, 497-497, 2016.
- 10) Asai, A., Okuda, T., Sonoda, E., et al.: *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 368-377, 2016.
- 11) 伊藤 剛, 村木直美, 田村久美子, 他: JARI Research Journal, 20170604.
- 12) 石川晋吉, 松村一史, 喜多村延政, 他: 第45回日本毒性学会学術年会, 2018.
- 13) 机 直美, 奥村弘樹, 中島 徹: JARI Research Journal, **30**(5), 229-232, 2008.