

ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞を用いた細胞膜間結合力の測定方法の検討

角田 徳子^a, 大久保 智子^a, 大貫 文^a, 中嶋 順一^a, 猪又 明子^b

東京都では、大気汚染保健対策の一環として、大気中汚染物質の健康影響を調べる基礎的実験的研究を行っている。令和2年度から硫酸水素アンモニウムを対象物質としており、硫酸水素アンモニウムが培養細胞に及ぼす影響を調査するため、経上皮電気抵抗 (TEER) を指標としたCalu-3細胞の細胞膜間結合力の測定を行う予定である。そこで今回、細胞膜間結合力の測定方法及び実験に使用可能となる細胞の培養条件について検討を行った。その結果、TEER測定時は電極を固定して測定することで、より安定した測定値を得ることができた。インサートへの細胞播種数 5.0×10^5 cells/cm²、培養期間約1週間、TEER約3000 Ωcm²を超過したものを、細胞膜間結合力の測定に使用可能であると判断した。また、TEERを低下させる陽性対照物質として、酸化チタンが使用可能であることがわかった。

キーワード : 大気汚染物質, Calu-3細胞, 細胞膜間結合力, 経上皮電気抵抗 (TEER)

はじめに

東京都では大気汚染保健対策の一環として、昭和53年度から、都内の大気中汚染物質の健康影響を調べる基礎的実験的研究を行っている。ディーゼル排出ガス中の粒子状物質等の社会問題となった大気汚染物質について、削減の取り組みが行われるなど、都内の大気環境は大きく変化してきた^{1,2,3}。これまでの基礎的実験的研究では、その時代の汚染状況に合わせ、NO₂やディーゼル排出ガス等の大気汚染物質を研究対象とし、その結果を報告してきた⁴。

平成28年度から令和元年度までは、大気中の微小粒子状物質 (PM_{2.5}) に着目し、PM_{2.5}中の主要な塩の一種と考えられる硫酸アンモニウムについて、測定方法の検討、培養細胞への影響調査及び動物へのばく露実験を行い、結果を報告した¹。令和2年度からは、PM_{2.5}中の硫酸水素アンモニウムを調査対象とし、研究を継続している。このうち、培養細胞への影響調査では、硫酸水素アンモニウムの吸入が気管支のバリア機能を弱め、健康影響を誘発する可能性の有無を調査するため、培養細胞としてヒト気管支由来Calu-3細胞を用いた硫酸水素アンモニウムのばく露実験を行う計画である。

隣接する細胞は膜を介して密接して結合しており、外側に面する細胞上部と、細胞の内部である基底膜間の物質の通過を制御することで、アレルギー及び病原体等の異物が体内へ侵入するのを防ぐバリア機能を持つ⁵。ヒト気管支上皮由来であるCalu-3細胞は、細胞膜間の結合力が強いとされ^{6,7}、異物侵入時の気管上皮におけるバリア機能の挙動の評価モデルとして使用されている⁸。細胞膜間の結合力が弱まると、異物が細胞膜間を通過しやすくなることで

基底膜まで浸透し、体内のより深部までダメージを及ぼす可能性が考えられる。この細胞膜間の結合力の変化は、細胞が生育しているメンブレン側と基底側の培地間で生じる経上皮電気抵抗 (Trans-epithelial electrical resistance, 以下TEERと略す) の測定で確認可能とされている^{9,10}。

今回は、硫酸水素アンモニウムが気管支上皮の細胞膜間結合力に及ぼす影響調査を行うための予備実験として、Calu-3細胞の細胞膜間結合力の測定方法及びばく露実験に使用可能となる条件について検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 使用細胞及び培養方法

ヒト気管支上皮由来Calu-3細胞 (American Type Culture Collection, No. HTB-55) は、25 mLフラスコ (ファルコン社製) を用い、10%ウシ胎児血清 (以下FBS) 含有MEM培地で培養した。実験使用時に0.25%トリプシン-EDTAを用いフラスコから剥がし、計数して実験に供した。試薬及び培地は全て、GIBCO (Thermo Fisher Scientific Inc.) 製を用いた。

2. TEERの測定条件の検討

Calu-3細胞は、FALCON Cell Culture Inserts 12well (メンブレン膜有効表面積0.9 cm²) (ファルコン社製) (以下インサートと記載) に播種した。既報¹¹を参照し、1%FBS含有MEM培地で希釈した 2.0×10^5 cells/cm²及び 5.0×10^5 cells/cm²の2種の細胞数で播種した。播種後培養し、播種24時間後から経時的にTEERを測定した。測定には、抵抗値測定システムMillicell ERS-2及び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) を用いた。電極は、測定前に70%エタノールで消毒して使用した。インサート内外の培地は2~3日に1度交

^a 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

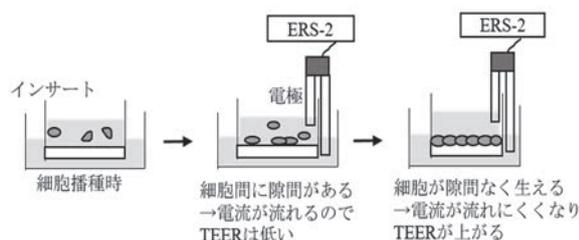


図1 TEERの測定模式図

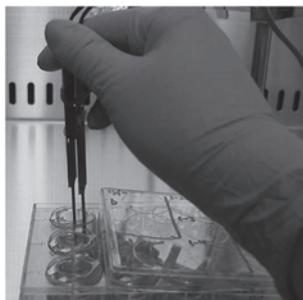


写真1 TEER測定時



写真2 電極の固定

換した。TEER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、インサートの有効膜面積である0.9を乗じた単位膜面積抵抗 (Ωcm^2) として示した。測定の様式図及びTEER値の解釈について、図1に示した。

アジャスタブル電極は手で持ち使用した（写真1）。その際、既報¹²⁾でも報告がある通り、手指のわずかな振動により測定値が安定しなかったことから、電極を固定して測定を行う方法を検討した。また、同一インサートにつき2回以上測定を行い、その平均値を採用した。

3. 陽性対照物質の確認

細胞膜間の結合力を低下させるという報告¹³⁾のある酸化チタンを用い、TEERの低下が確認できる陽性対照物質として使用可能かを調べるべく露実験を行った。使用する細胞は、TEERが $3000\Omega\text{cm}^2$ を超過（後述する結果より判断）したものであり、酸化チタンはTitanium(IV)oxide（シグマ・アルドリッチ社製）を使用した。酸化チタン濃度は、既報¹²⁾を参考に、各インサートで終濃度 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように調整し添加した。ばく露時間は24時間とし、その間、1,3,6,24時間時点でTEERを測定した。ばく露前（0時間）のTEERを100%とし、各々の測定時間におけるばく露前の測定値に対する比率を算出した。

結果及び考察

1. TEER測定条件の検討結果

アジャスタブル電極をスタンドとクランプで固定したところ（写真2）、より安定した測定値を得ることができたため、この方法を採用してTEERの測定を行った。

細胞播種数 $2.0 \times 10^5\text{ cells}/\text{cm}^2$ 及び $5.0 \times 10^5\text{ cells}/\text{cm}^2$ におけるTEERの経時変化を図2及び3に示した。TEERは、一部

の日数を除きn=4での平均値を採用した。

各々の細胞数で培養した時のTEERの最大平均値（培養日数）は、 $2.0 \times 10^5\text{ cells}/\text{cm}^2$ で $2600\Omega\text{cm}^2$ （11日目）、 $5.0 \times 10^5\text{ cells}/\text{cm}^2$ で $3030\Omega\text{cm}^2$ （6日目）であった。

以上の結果から、ばく露実験に使用可能な細胞の条件（メンブレン上に隙間無く細胞が生育している状態）は、インサートへの細胞播種数 $5.0 \times 10^5\text{ cells}/\text{cm}^2$ の場合、培養日数は約1週間、TEERは約 $3000\Omega\text{cm}^2$ 以上（最大値）であると判断した。また、インサートごとに細胞の生育状況に差があるため、細胞を複数のインサートに播種し、TEERが $3000\Omega\text{cm}^2$ を超過したものをばく露実験に使用することとした。

2. 陽性対照物質としての酸化チタンばく露結果

結果を図4に示す。ばく露前のTEER値に対し、ばく露後3時間で約70%、6時間で約65%まで減少したが、24時間後には約80%に上昇していた。この結果は既報¹³⁾の結果とほぼ同様の傾向を示しており、酸化チタンによる細胞膜間結合力の低下は一過性のものであると考へた。また、数値の回復は見られたものの、TEERの低下を確認できたことから、今回の条件において、酸化チタンを陽性対照物質と

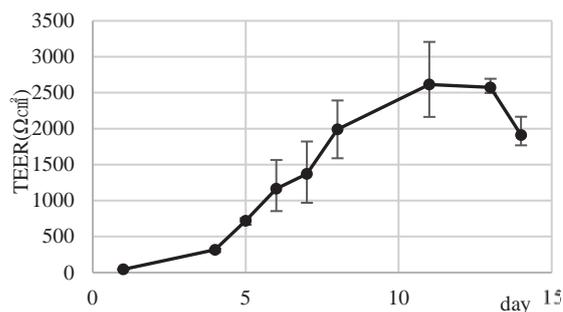
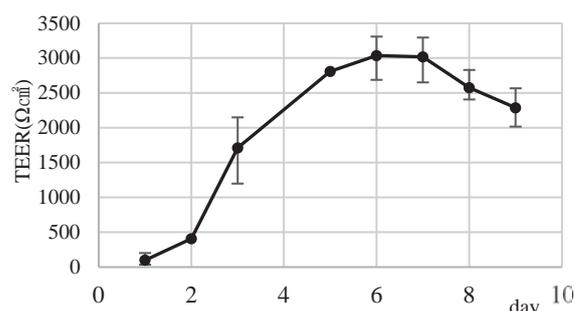
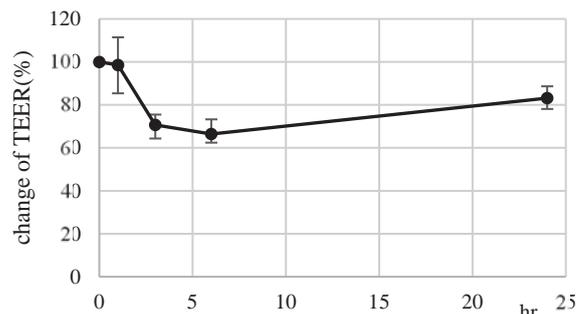
図2 $2.0 \times 10^5\text{ cells}/\text{cm}^2$ 播種時のTEERの経時変化図3 $5.0 \times 10^5\text{ cells}/\text{cm}^2$ 播種時のTEERの経時変化

図4 酸化チタンばく露によるTEERの経時変化

して使用可能であると判断した。以上の結果から、本実験の際には、酸化チタンばく露群を並行して用意する予定である。

ま と め

東京都では、大気中汚染物質の健康影響について調査研究を行っており、令和2年度からは、硫酸水素アンモニウムが培養細胞へ及ぼす影響を調査している。今回は、Calu-3細胞を用いた細胞膜間結合力を測定するための、細胞膜間結合力の指標となるTEERの測定方法の検討を行った。測定にあたっては、電極を固定した上で、同一インサートを複数回測定し、その平均値を採用した。試行の結果、インサートへの細胞播種数、培養日数及びTEERの値の経時変化及び最大値について確認することができた。また、TEERを低下させる陽性対照物質として、酸化チタンが使用可能であることがわかった。

謝 辞

本研究は、東京都福祉保健局における大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究の一環として行いました。この場をお借りいたしまして、東京都福祉保健局健康安全部環境保健衛生課調査担当及び関係者各位に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 東京都福祉保健局：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），2020年3月。
- 2) 高橋克行，箕浦宏明，國見 均，他：大気環境学会誌，**43**, 315–322, 2008.
- 3) 石井康一郎，月川憲次：国際交通安全学会誌，**29**, 117–123, 2004.
- 4) 東京都福祉保健局：大気汚染物質と健康影響に関する実験・研究報告書。
https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/kankyo/kankyo_eisei/taikityousa/jikken_kenkyu.html（2022年10月30日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 5) Harcourt, J. L., Haynes, L. M.: *JoVE*, **72**, e50157, 2013. doi: 10.3791/50157（2022年10月30日現在）
- 6) Min, K. A., Rosania, G. R., Kim, C. K., et al.: *Arch. Pharm. Res.*, **39**, 359–369, 2016.
- 7) Dekali, S., Gamez, C., Kortulewski, T., et al.: *Toxicol. Rep.*, **1**, 157–171, 2014.
- 8) Grainger, C. I., Greenwell, L. L., Lockley, D. J., et al.: *Toxicol. Rep.*, **23**, 1482–1490, 2006.
- 9) Blume, C., Swindle, E. J., Gilles, S., et al.: *Tissue barriers*, **3**, e1062316, 2015. doi: 10.1080/15476286.2015.1062316（2022年10月30日現在）
- 10) Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., et al.: *J Lab Autom.*, **20**, 107–126, 2015.
- 11) Florea, B. I., Cassara, M. L., Junginger, H. E., et al.: *J Control Release*, **87**, 131–138, 2003.
- 12) 山口宏之：ケミカルタイムス，**241**, 22–27, 2016.
- 13) 細谷純一，伊藤 剛：*JARI Research Journal*, JRJ2016 0503研究速報, 2016.

Examination of Measuring Method of Cell-Cell Adhesion Using Calu-3 Cells

Tokuko TSUNODA^a, Tomoko OKUBO^a, Aya ONUKI^a, Jun'ichi NAKAJIMA^a, and Akiko INOMATA^a

The Tokyo Metropolitan Government has been investigating air pollutants as part of its air pollution control measures, and targeting ammonium hydrogen sulfate since 2022. In 2022, the Tokyo Metropolitan Government plans to measure the binding strength of cell membrane for Calu-3 cells using trans-epithelial electrical resistance (TEER) as an indicator to investigate the effects of ammonium hydrogen sulfate on the cultured cells. In 2021, we investigated methods for measuring cell membrane binding strength and assessing cell culture conditions that can be used in the experiment. The result showed that more stable measurement values were obtained by fixing the electrode and performing measurements several times during the TEER measurement. We determined that TEER values exceeding approximately $3000 \Omega\text{cm}^2$ at a cell seeding number of 5.0×10^5 cells/cm² and a culture period of approximately 1 week could be used for measuring cell membrane binding force. Titanium dioxide was used as a positive target substance to decrease TEER.

Keywords: air pollutant, Calu-3 cells, cell-cell adhesion, trans-epithelial electrical resistance

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan