

培養細胞を用いた硫酸水素アンモニウム液相ばく露による炎症関連遺伝子の発現挙動

角田 徳子^a, 大久保 智子^a, 小林 乗時^{b,c}, 牧 倫郎^d, 高橋 佳代子^d, 木下 輝昭^a, 猪又 明子^e

東京都では、都内の大気汚染物質の存在実態及び生体への影響を調査する基礎的実験的研究を行っている。平成28年度から令和元年度までの当該事業において、都内大気中PM_{2.5}に含まれる硫酸アンモニウムを測定対象として調査を行ったところ、微量ではあるが硫酸水素アンモニウムが検出された。硫酸水素アンモニウムがヒトの呼吸器へ及ぼす影響に関する報告は少ないことから、ヒト呼吸器由来であるA549細胞及びCalu-3細胞を用いて硫酸水素アンモニウムのばく露実験を行い、炎症関連因子の遺伝子について定量的PCRによる網羅的及び個別の遺伝子発現の解析を行った。その結果、炎症性サイトカインの一種である *interleukin-8* 遺伝子及び気道で産生される分泌型ムチンの一種である *mucin 5ac* 遺伝子の発現量に変動が見られたが、その増減量は小さく、また一過性の変動であったことから、大気環境中濃度レベルの硫酸水素アンモニウムがヒトへの呼吸器影響を惹起する可能性は低いと考える。

キーワード：培養細胞、硫酸水素アンモニウム、遺伝子発現、リアルタイムPCR

はじめに

東京都では、大気汚染等保健対策事業の一環として、昭和53年度から都内の大気汚染物質について調査する基礎的実験的研究を実施している。ディーゼル排出ガス及びディーゼル粒子、さらにディーゼル微粒子捕集フィルター (Diesel Particulate Filter : DPF) を通過させた排出ガス等、その時代の汚染状況を鑑みた都内の大気汚染物質を研究対象とし、その存在実態のほか、培養細胞及び実験動物を用いた健康影響についての調査結果を報告してきた¹⁾。

平成28年度から令和元年度までの当該事業では、微小粒子状物質PM_{2.5}に焦点を当て、PM_{2.5}中の硫酸水素アンモニウムを調査対象とした研究を行った。PM_{2.5}は、粒径2.5 μm以下の粒子の総称であり、吸入することで、肺胞へ到達し沈着する可能性があるため、呼吸器疾患の増悪等の影響が懸念される²⁾。PM_{2.5}の発生源として、工業施設からのばい煙、自動車排出ガス等の人為的な発生のほか、火山等の自然由来の発生も存在するが、人為的な発生の寄与が大きい地域では、PM_{2.5}が死因に及ぼす影響は大きいという報告³⁾がある。都内大気PM_{2.5}中の硫酸アンモニウム濃度を調査したところ、約2.0 μg/m³程度検出され、また、微量ではあるが、硫酸水素アンモニウムが検出された⁴⁾。これを受けて、令和2年度からの当該事業は硫酸水素アンモニウムを調査対象とし、令和5年度はその存在実態を調査するため、都内1か所 (新宿区) での1週間連続大気採取を1年間行った。その結果、都内大気PM_{2.5}中硫酸水素アンモニウムは、最大で1.9 μg/m³検出された⁵⁾。

同じ硫酸塩である硫酸アンモニウムには、呼吸器疾患へ

の影響が示唆されたという報告⁶⁾があり、硫酸水素アンモニウムは硫酸アンモニウムよりも酸性度が高いため、呼吸器の炎症を惹起する可能性が考えられる。しかし、硫酸水素アンモニウム1,000 μg/m³の短時間ばく露でぜん息患者の気道コンダクタンスの減少を引き起こした報告⁷⁾はあるが、作用機序は不明であり、明確な毒性は見られていない。また、炎症反応の及び分子生物学的影響に着目した報告は見当たらない。

そこで、硫酸水素アンモニウムが呼吸器系に及ぼす影響を調べるため、ヒト肺胞上皮由来A549細胞及びヒト気管支上皮由来Calu-3細胞を用いた硫酸水素アンモニウムの液相ばく露実験を行い、気道炎症性疾患で気道上皮細胞から産生される *interleukin* (以下ILと略す)-6及びIL-8^{8,9)}をはじめとした複数の炎症関連因子の遺伝子発現挙動を定量的PCR (以下qPCRと略す) により網羅的に解析した。さらに、炎症誘発性サイトカインの一種であるIL-1βをばく露して、炎症に対する感受性を高めた状態のA549細胞¹⁰⁾に、硫酸水素アンモニウムをばく露することで、炎症の増悪作用を調べた。これらの培養細胞の炎症関連遺伝子発現解析の結果から、硫酸水素アンモニウムが呼吸器系に及ぼす影響について考察したので報告する。

実験方法

1. 培養細胞への硫酸水素アンモニウム液相ばく露

1) 使用細胞

ヒト肺胞基底腺がん上皮由来A549細胞 (American Type Culture Collection, No. CCL-185, 以下A549細胞と略す) 及

^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 当時：東京都保健医療局健康安全部環境保健衛生課
163-8001 東京都新宿区西新宿2-8-1

^c 現所属：東京都健康安全研究センター広域監視部建築物監視指導課

^d 東京都保健医療局健康安全部環境保健衛生課

^e 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

びヒト気管支上皮腺がん由来Calu-3細胞(American Type Culture Collection, No. HTB-55, 以下Calu-3細胞と略す)を用いた。培地等は, 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)で, 全てGIBCO®(Thermo Fisher Scientific社製)製を用いた。

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, A549細胞では10%FBS含有RPMI1640培地を用いて, 96ウェルプレートに 2×10^4 個/ウェル, 又は24ウェルプレートに 2×10^5 個/ウェルを播種した。Calu-3細胞では10%FBS含有MEM培地を用いて, 96ウェルプレートに 4×10^4 個/ウェル, 又は24ウェルプレートに 2×10^5 個/ウェルを播種した。それぞれを培養した後, ばく露実験に供した。

2) ばく露方法

A549細胞へは1%FBS含有RPMI1640培地に, Calu-3細胞へは1%FBS含有MEM培地に, 超純水で所定の濃度に希釈した硫酸水素アンモニウム(1級, 富士フィルム和光純薬社製)を1/10量加えた実験用培地を用いて液相ばく露した。硫酸水素アンモニウムを, 0.001 mg/mLから3 mg/mLの範囲で24時間ばく露したところ, 0.3 mg/mL以上で細胞傷害率の増加が認められたため¹¹⁾, ばく露濃度を0.3 mg/mLとし, 各炎症関連遺伝子の挙動を確認することとした。ばく露時間は1, 3, 6, 24時間で, ばく露後, 細胞をトリプシンで剥がし, phosphate-buffered saline(以下PBSと略す)で2回洗浄して回収した。同量の超純水を実験用培地に添加した細胞を対照群として, 硫酸水素アンモニウムばく露群と比較した。

2. 遺伝子発現解析

1) 遺伝子抽出

細胞からのRNA抽出にはRNeasy Mini Kit, cDNAへの逆転写反応にはRT² First Strand Kit(ともにQIAGEN社)を用いて, RNA及びcDNAを得た。

2) 網羅的遺伝子発現解析

qPCRによる網羅的遺伝子発現解析の対象遺伝子は, ぜん息及びアレルギー反応に関連すると考えられ, 作用機序の異なるサイトカインを選定した。選定したサイトカインの遺伝子は, T helper cell type 2(以下Th2と略す)から産生され, マスト細胞の活性化等に関与するIL-4, IL-5及

びIL-13, T helper cell type 1(Th1)から産生され, アレルギー炎症の制御に関与するinterferon- γ (以下INF- γ と略す)^{12,13)}, 自然免疫に関与し, 樹状細胞を活性化させTh2の反応を増強させるThymic stromal lymphopoietin(TSLP)^{14,15)}, IL-25及びIL-33^{12,13)}, 肺で発現し, アレルギー反応に関与するCCL2(別名MCP-1, 以下CCL2と記載する)^{16,17)}の8種とした。これらの遺伝子を配置した96ウェルのカスタムプレートCustom RT² qPCR Primer Assay(96) plate(Cat.No:CLAH33859)(QIAGEN社)を作製し, 網羅的遺伝子発現解析に供した。Fig.1にプレート上の遺伝子配置を示す。

RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix(QIAGEN社)を用い, カスタムプレートの1ウェルあたりRT² SYBR Green Mastermix 12.5 μ L, cDNAサンプル1 μ L, RNase-free water 11.5 μ Lを加え, 遺伝子発現解析試料とした。リアルタイムPCR機器はABI 7500 Standard(Thermo Fisher Scientific社)を用い, 95°C10分を1回, 95°C 15秒, 60°C 1分のサイクルを40回繰り返した。SYBR Greenは, 蛍光色素が2本鎖DNAに取り込まれて発光することで増幅産物を検出する。この際に非特異的な増幅及びプライマーダイマー等による擬陽性を生じることがあるため, SYBR Greenを用いる際には融解曲線の作成等により, 増幅の特異性を判断する必要がある^{18,19)}。このため, 増幅サイクル終了後に95°C 1分, 65°C 2分, 65°Cから95°C(2°C/1分ずつ上昇)のサイクルを追加し, 融解曲線解析を行った。融解曲線が単一のピーク(増幅産物が一種類)を示したものについて, 特異的な増幅の可能性があると判断した²⁰⁾。

得られた結果の解析は, 比較Ct($\Delta \Delta$ Ct)法²¹⁾を用いた。その際のリファレンス遺伝子として β -actinを選択した。各試料の遺伝子発現量は β -actinの発現量で補正し, 各々のばく露時間の対照群における遺伝子発現量を1として, ばく露群での発現量を算出した。この手順を, A549細胞は3回, Calu-3細胞は4回行った。

3) 標的遺伝子発現解析

個別遺伝子発現の対象遺伝子は, 網羅的遺伝子解析の結果を受けてCCL2を, カスタムプレートに配置していないが, 炎症反応に関与する遺伝子であるIL-6及びIL-8を, さらに, 及び気道で産生されるムチンの一つであるMucin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	IL5	IL33	IL4	IL13	IFNG	TSLP	CCL2	IL25	ACTB	RTC	PPC	HGDC
E												
F												
G												
H												

Fig 1. Gene symbols of custom plate (Custom RT² qPCR Primer Assay (96) plate)

IFNG:Interferon gamma(IFN- γ), ACTB: β -actin, RTC:Reverse Transcription Control, PPC:Positive PCR Control, HGDC:Human Genomic DNA Contamination

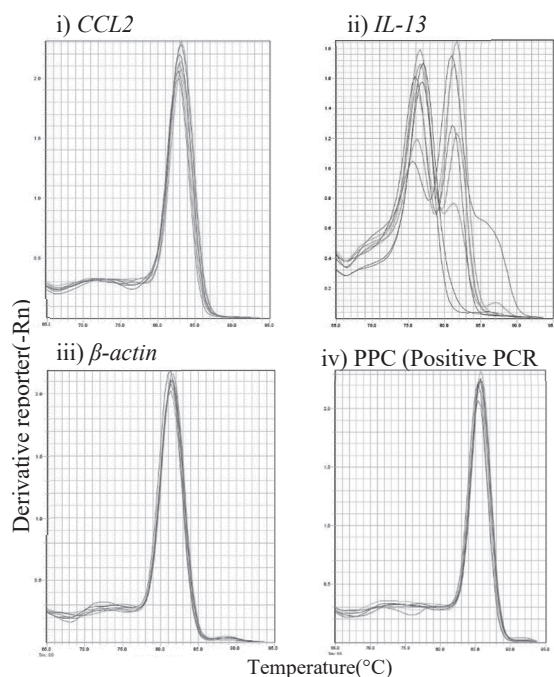


Fig 2. Melting curves analysis of each gene after RT-PCR (A549 cells)

5ac (以下MUC5ACとする)²²⁾を選択し、合計4遺伝子とした。

標的遺伝子発現解析におけるプローブ及びプライマーセットにはTaqMan™ Gene Expression Master Mix及びTaqMan™ Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific社)を用いた。各遺伝子に使用したTaqMan™ Gene Expression Assayは、IL-6 : Hs00174141_m1, IL-8 : Hs00174103_m1, MUC5AC : Hs01365616_m1, 及びCCL2 : Hs00234140_m1である。機器は網羅的遺伝子発現解析と同様にABI 7500 Standardを使用し、95°C15秒, 60°C1分のサイクルを40回繰り返した。各サンプルはduplicateで反応を行い、平均値を算出した。この実験を3回行った (n=3)。

得られた結果の解析は、2.2)網羅的遺伝子解析と同様に、リファレンス遺伝子として β -actinを用いて比較Ct ($\Delta \Delta$ Ct)法で行った。

3.炎症に対する感受性を高めた細胞への硫酸水素アンモニウムばく露

1) 培養細胞及びIL-1 β 処理

液相ばく露と同じA549細胞を実験に使用した。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24ウェルプレートに 2×10^5 個/ウェルを播種して培養した後、実験に供した。

IL-1 β の添加濃度は、既報¹⁰⁾を参考に、0.03 ng/mLをばく露した後、0.3 mg/mLの硫酸水素アンモニウムを1, 3, 24時間ばく露した。その後、A549細胞をトリプシンで剥がし、PBSで2回洗浄して回収した。

2) 個別遺伝子発現解析

A549細胞への硫酸水素アンモニウムばく露の結果(後述)から、IL-6, IL-8, CCL2及びMUC5ACを選択し、標的遺伝子解析発現を行った。実験方法及び解析は、2.3)標的遺伝子発現解析と同様に行った。

4. 統計学的解析

各測定項目については、Dunnnett法を用いて統計学的検定を行った。液相ばく露では、硫酸水素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。また、感受性を高めたA549細胞への液相ばく露では、IL-1 β を添加後、硫酸水素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。

結果

1. 培養細胞への硫酸水素アンモニウム液相ばく露

1) A549細胞への液相ばく露実験

A549細胞での網羅的遺伝子解析の結果、いくつかの遺伝子で変動が見られたが、融解曲線解析の結果、その多くは非特異的な増幅であったと判断した。Fig.2に、特異的な増幅の可能性があると判断したCCL2, 非特異的な増幅と考えられるIL-13, 及び特異的な増幅を示す融解曲線として、リファレンス遺伝子の β -actin及びキットに添付された陽性コントロールPPCの増幅曲線を示す。変動が見られた遺伝子のうち、CCL2が特異的な増幅と考えられる融解曲線を示したため、個別に遺伝子解析を行った。Fig.3にCCL2の挙動を示した。各ばく露時間において、対照群(超純水ばく露)の遺伝子発現量を1として、各ばく露時間での相対的な発現量を算出した。CCL2の発現量はばく露24時間を通じて約1倍で推移しており、ばく露群と対照群間で発現量に変化は見られなかった。

また、炎症関連因子のIL-8及び粘液産生に関与するMUC5ACの遺伝子発現解析結果をFig.4に示す。IL-8については、0.3 mg/mL硫酸水素アンモニウムの24時間ばく露で、発現量が対照群の約1.8倍となる発現増強が見られた。また、MUC5ACについては、短時間ばく露で発現増強傾向

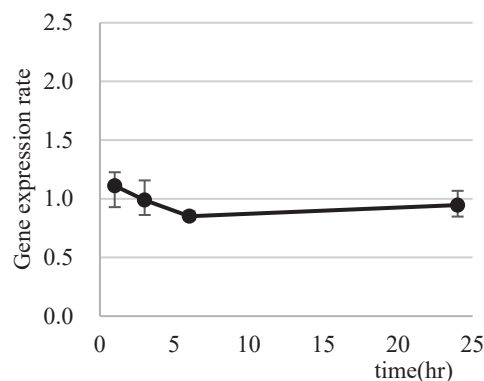


Fig 3. Gene expression rate of CCL2 (A549 cells)

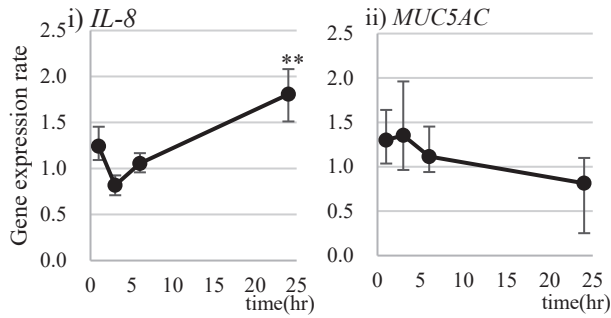


Fig. 4. Gene expression rate of *IL-8* and *MUC5AC* (A549 cells)

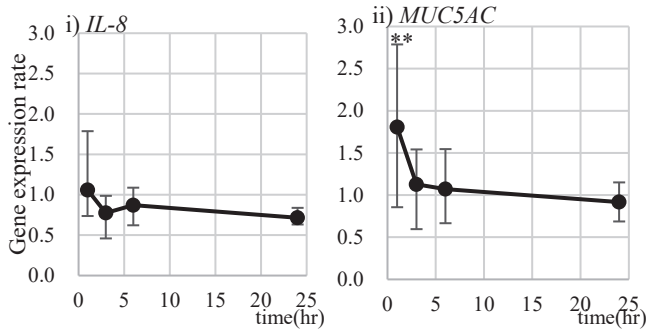


Fig. 5. Gene expression rate of *IL-8* and *MUC5AC* (Calu-3 cells)

Data are expressed as mean \pm standard error. (n=4); **p<0.01, *p<0.05. Statistical analysis results compared to control group.

が見られたが、バラつきが大きく、有意差は認められなかった。その他の遺伝子 (*IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-13*, *IL-25*, *IL-33*, *INF- γ* 及び*TSLP*) では、発現量に変化は見られなかった (図には示していない)。

2) Calu-3細胞への液相ばく露実験

検出された炎症関連因子等の遺伝子発現解析結果を Fig. 5に示す。*IL-8*発現量は24時間ばく露でわずかに減弱した。*MUC5AC*発現量は1時間ばく露で約2.8倍に増強したが、検体間のバラつきが大きかった。また、3、6及び24時間では対照群と同程度の発現量であった。それ以外の遺伝子 (*IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-13*, *IL-25*, *IL-33*, *INF- γ* , *TSLP*及び*CCL2*) では、発現量に変化は見られなかった (図には示していない)。

2. 炎症に対する感受性を高めた細胞への硫酸水素アンモニウムばく露実験

IL-1 β を0.03 ng/mLばく露した後、硫酸水素アンモニウムをばく露したA549細胞の遺伝子発現解析結果をFig. 6に示す。*IL-8*, *MUC5AC*及び*CCL2*の発現量は約1倍で推移しており、発現量に有意な変化は見られなかった。また、*IL-6*は不検出であった。

考察

網羅的遺伝子解析の結果から、*CCL2*が特異的な増幅であったと判断した一方、*IL-13*のような非特異的増幅の発見が見られた。これは、標的とする遺伝子の発現量が十分ではなく、バラつきが大きかった可能性及びプライマーダイマーが生じた可能性が考えられる。

標的遺伝子解析では、硫酸水素アンモニウムを0.3 mg/mLばく露したA549細胞及びCalu-3細胞の双方で*IL-8*の発現量の変化が見られた。細胞ストレス等に応答した炎症状態では、*IL-8*の発現量は数十倍から数百倍に急速に上昇したという報告²³⁾のほか、A549細胞への5 ppm NO_2 の3時間ばく露で*IL-8*の発現量が20倍に増加したという報告²⁴⁾があるものの、今回ばく露した硫酸水素アンモニウム濃度では、*IL-8*の発現量に及ばず影響は小さいと推察する。*CCL2*においては、発現量に変動は見られなかったが、A549細胞で検出された一方、Calu-3細胞では不検出であった。既報^{16,17)}では*CCL2*は肺で発現するとされ、今回の検出状況と同様の結果であったことから、由来する器官の違いによる差異と考える。Calu-3細胞では、*MUC5AC*の発現量がばく露1時間で増加した。Calu-3細胞は気管支上皮由来細胞であり、気管支は、外部からの異物侵入に対し粘液を分泌することで、気道の粘度調整及び異物排除を行う器官²⁵⁾である。硫酸水素アンモニウムは酸性度が高く、ばく露により一時的に低pH環境になったことが想定され、それに応答したことにより*MUC5AC*の発現が増強した可能性が考えられるが、知見は少ない。また、A549細胞においても、有意な差ではないが、短時間ばく露で*MUC5AC*の発現量が増加する傾向が見られた。肺胞上皮由来であるA549細胞も*MUC5AC*を発現するという報告²⁶⁾

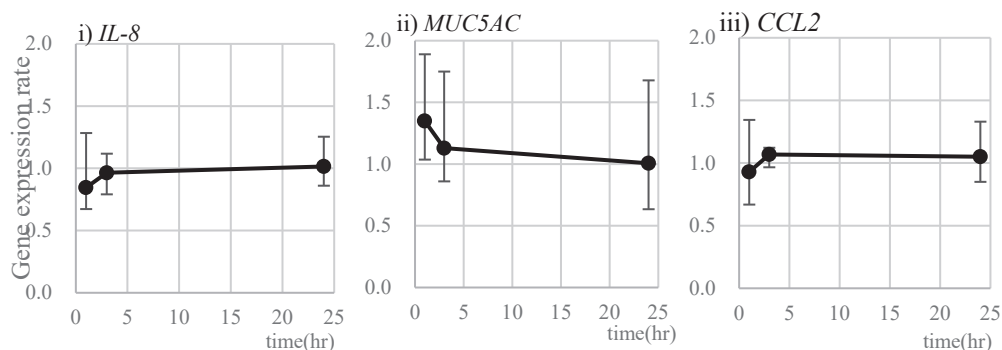


Fig. 6. Gene expression rate of *IL-8*, *MUC5AC* and *CCL2* (A549 cells exposed to *IL-1 β*)

があり、今回の実験からは、一過性ではあるが、硫酸水素アンモニウムのばく露が双方の細胞の粘液産生を増強した可能性が考えられる。これらの結果から、高濃度の硫酸水素アンモニウムのばく露が呼吸機能への影響を与えうる⁷⁾作用機序のひとつが、粘液の産生増加によることが示唆された。

A549細胞において、IL-8の24時間ばく露で、MUC5AC発現量が約4倍に増加したという報告²⁷⁾があるが、今回の結果では、A549細胞でIL-8遺伝子発現量の増加傾向は見られたものの、数値としては1.8倍程度であり、MUC5ACの発現量に大きな影響を及ぼすレベルではなかったと考えられる。また、IL-1 β をばく露し、炎症に対する感受性をめたA549細胞では、IL-8の発現増強及びその他の炎症関連遺伝子発現に影響を与えなかったことから、IL-1 β による処理は、硫酸水素アンモニウムばく露による炎症反応に関連しないものと推察される。

今回、硫酸水素アンモニウムの液相ばく露濃度(0.3 mg/mL)は、既報²⁸⁾におけるエアロゾルばく露濃度の5 mg/m³に概ね相当する濃度であった。これは都内大気中の硫酸水素アンモニウム濃度(1.9 μ g/m³)の約2,600倍という高濃度であり、今回挙動を観察した遺伝子の発現量の変化は一過性かつ増加量が小さいため、硫酸水素アンモニウムのばく露によるヒト呼吸器系への影響は小さいと結論される。

ま と め

都では、大気汚染等保健対策事業の一環として都内の大気汚染物質について調査する基礎的実験的研究を行っている。この事業において、東京都内大気PM_{2.5}から硫酸水素アンモニウムが検出されたことから、硫酸水素アンモニウムが生体に及ぼす影響を調べるために、ヒト由来細胞であるA549細胞及びCalu-3細胞に硫酸水素アンモニウムを液相ばく露し、細胞の遺伝子発現解析を行った。その結果、A549細胞及びCalu-3細胞の双方で炎症性サイトカインの一種であるIL-8遺伝子の発現量の変化が見られたが、増加の程度は小さかった。また、Calu-3細胞では、短時間ばく露において粘液産生に関与するMUC5AC遺伝子の発現増強が見られた。このことから、硫酸水素アンモニウムが細胞の粘液産生を増強した可能性があるが、その影響は一過性であると考えた。今回の液相ばく露濃度は、実際の都内大気環境濃度を考慮すると、硫酸水素アンモニウムがヒトの呼吸器に及ぼす影響は非常に小さいと考える。

文 献

- 1) 東京都保健医療局：大気汚染物質と健康影響に関する実験・研究報告書。
https://www.hokeniryo.metro.tokyo.lg.jp/kankyo/kankyo_eisei/taikityousa/jikken_kenkyu (2025年12月1日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 2) 余田佳子, 高木 洋, 若松純子, 他：アレルギー,

64(2), 128–135, 2015.

- 3) McDuffie E. E., Martin V. R., Spadaro V. S., et al.: *Nat. Commun.*, **12**(3594), 2021.
- 4) 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—第2章 都内大気中 PM_{2.5} 中の硫酸アンモニウムの実態調査。
<https://www.hokeniryo.metro.tokyo.lg.jp/documents/d/hokeniryo/houkoku2> (2025年8月26日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) 大貫 文, 大久保智子, 五十嵐 剛, 他：大気環境学会誌, **60**(3), 47–53, 2025.
- 6) 環境省：C-1005 大気中粒子状物質の成分組成及びオゾンが気管支喘息発作に及ぼす影響に関する疫学研究。
https://www.env.go.jp/policy/kenkyu/suishin/kadai/syuryo_report/pdf/C-1005.pdf (2025年8月26日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 7) Utell M. J., Morrow P. E., Speers M. D., et al.: *Am. Rev. Respir. Dis.*, **128**, 444–450, 1983.
- 8) 滝沢 始, 大田隆行, 竹内直信, 他：日気食会報, **47**(2), 185–188, 1996.
- 9) 井上博雅：日呼吸会誌, **37**(9), 673–679, 1999.
- 10) Jedrzkiewicz S., Nakamura H., Silverman S. E., et al.: *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, **279**, L1058–1065, 2000.
- 11) 大久保 智子, 角田 徳子, 五十嵐 剛, 他：大気環境学会誌, 投稿受理済 (印刷中)。
- 12) 町田健太郎, 井上博雅：アレルギー, **62**(12), 1565–1574, 2013.
- 13) Kips C. J.: *Eur. Respir. J. Suppl.*, **34**, 24s–33s, 2001.
- 14) Allakhverdi Z., Comeau R. M., Jessup K. H., et al.: *J. Exp. Med.*, **204**(2), 253–258, 2007.
- 15) Al-Shami A., Spolski R., Kelly J., et al.: *J. Exp. Med.*, **202**(6), 829–839, 2005.
- 16) 有馬雅史：アレルギー, **60**(5), 566–574, 2011.
- 17) Baay-Guzman J. G., Bebenek G. I., Zeidler M., et al.: *Respir. Res.*, **13**(60), 2012.
- 18) Tajadini M., Panjehpour M., Javanmard H. S.: *Adv. Biomed. Res.*, Feb 28:3:85. doi: 10.4103/2277-9175.127998. eCollection 2014.
- 19) 有賀博文：日本水産学会誌. **73**(2), 292–295, 2007.
- 20) 小島夫美子, 岩谷良則, 藤本秀士：九州大学医学部保健学科紀要, **2**, 95–102, 2003.
- 21) Ayfer Y.: *Acta. Biochim. Pol.*, **51**(4), 1059–1065, 2004.
- 22) Bonser R. L., Erle J. D.: *J. Clin. Med.*, **6**, 112, 2017.
- 23) Hoffmann E., Dittrich-Breiholz O., Holtmann H., et al.: *J. Leukoc. Biol.*, **72**(5), 847–855, 2002.
- 24) 伊藤 剛, 村木直美, 田村久美子, 他：JARI Research Journal, 20170604, 2017.
- 25) 田中宏幸, 永井博式：日薬理誌, **120**, 13–19, 2002.

26) Voynow A. J., Young R. L., Wang Y., *et al.*: *Am. J. Physiol.*, **276**(5), L835–843 (1999).

27) Bautista V. M., Chen Y., Ivanova S. V., *et al.*: *J. Immunol.*, **183**(3), 2159–2166, 2009.

28) 雑賀 絢, 北條 幹, 角田徳子, 他 : 大気環境学会誌, **60**(1), 1–10, 2024.

Profile of Inflammation-related Genes in Human Cultured Cells Exposed to Ammonium Hydrogen Sulfate in Liquid

Tokuko TSUNODA^a, Tomoko OKUBO^a, Noritoki KOBAYASHI^{b,c}, Michiro MAKI^d, Kayoko TAKAHASHI^d, Teruaki KINOSHITA^a
and Akiko INOMATA^a

A series of projects involving basic environmental and toxicological studies for airborne pollutants have been conducted by the Tokyo Metropolitan Government. In previous studies, ammonium hydrogen sulfate was detected at the particulate matter <2.5- μm diameter (PM2.5) level in Tokyo, but few studies have investigated its effects on the human respiratory tract. We conducted submerged exposure experiments using A549 cells and Calu-3 cells derived from human respiratory organs and then performed quantitative polymerase chain reaction analysis of the gene expression of inflammation-related factors. Although the expression levels of *interleukin-8*, a proinflammatory cytokine, and *MUC5AC*, the gene for a type of mucin produced in the airway, were significantly changed in the ammonium hydrogen-exposed cells, the degree of the changes appeared to be small and temporary. Overall, the results suggest that ammonium hydrogen sulfate is unlikely to induce a substantial inflammatory response in human respiratory epithelial cells.

Keywords: cultured cell, ammonium hydrogen sulfate, gene expression, real-time PCR

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

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out

^c Present division: Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

^d Tokyo Metropolitan bureau of Public Health,
2-8-1, Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-8001, Japan