

in vitro 細胞曝露装置における最適な培養環境の探索

Exploring an Optimal Culture Environment in an *in vitro* Cell Exposure System

田中 睦美 *1
Mutsumi TANAKA

佐々木 左宇介 *2
Sousuke SASAKI

伊藤 剛 *3
Tsuyoshi ITO

Abstract

In vitro exposure systems using an air-liquid interface have been developed to assess responses of respiratory cells to air pollutants including automobile exhaust. Direct exposure to dry gas can physically damage cells independently of any toxicity. Indeed, exposure of human alveolar epithelial cells (A549) to clean dry air decreased cell viability in a time-dependent manner. Two treatments to reduce this reduction in cell viability were tested: cell cultivation on collagen gel, and humidifying the air by bubbling. A time-dependent reduction in cell viability was still detected in cells cultivated on collagen gel, though it was greatly attenuated. Exposure to humidified air (85%RH) caused less cell damage, and cell viability was maintained at similar levels after short (1hr) or long (6hr) exposure times. These results suggest that humidifying the test gas may be the most effective tool to maintain a stable cell environment during exposure.

1. はじめに

自動車排気ガスの健康影響はこれまで動物曝露実験を中心に評価されてきた。この手法では生体への影響を直接評価できるため、重要かつ説得力のある情報を得ることができる。しかしながら、多大な費用と時間がかかること、実験動物使用に関する倫理的な問題などから、動物曝露実験は欧州を中心に減少傾向にある。

このような背景の中、「試験管内で」を語源とする *in vitro* 試験に対する関心が高まってきている。健康影響評価の *in vitro* 試験では培養細胞を使用することが多いが、細胞単位の評価となり、得られた結果をヒトの健康影響に直接反映させることは困難である。しかしながら、その簡便性により、化学物質などの安全性、有害性評価には優れた試験法として認識されており、様々な分野で適用されつつある。したがって、*in vitro* 評価法

は排気ガスの影響評価においても、有効なスクリーニング法として期待されている。

排気ガスは主に呼吸により体内に取り込まれる。そのため、排気ガスの健康影響に関する報告では、最初の標的器官である呼吸器(鼻、気管、気管支、肺など)への影響に関するものが多く占めている。*in vitro* での曝露評価においても、ヒト呼吸器系細胞(特に上皮細胞)を使用したものが多い。呼吸器系上皮細胞は呼吸器表面を構成する細胞であり、外気と接触している。そのため、呼吸により取り込まれた排気ガスは上皮細胞に直接影響を与えると考えられる。これまでの *in vitro* での曝露評価には液体培地に評価物質を添加する方法が取られていたが、生体により近い環境を提供可能な気液界面培養下での細胞曝露評価が近年増加している。

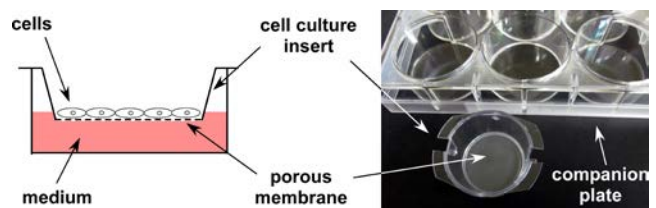


Fig. 1 air-liquid interface cultivation

*1 一般財団法人日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部 博士(保健学)

*2 一般財団法人日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部

*3 一般財団法人日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部 博士(医学)

気液界面培養とはセルカルチャーインサートの多孔メンブレン上に細胞を播種し、上側を気相とし、下側よりメンブレンを介して培地を供給する培養法であり、呼吸器系や皮膚、角膜など、外気と接触している器官の細胞などに活用されている (Fig. 1). 培養と同時に、気相を介しての曝露が可能であり、ガス成分や揮発性物質、粒子状物質の細胞曝露に適していると考えられる. CULTEX® などの気液界面培養を活用した *in vitro* 細胞曝露装置も開発されており (Fig. 2)^{1,2)}, それらを活用した有害性評価の報告数も増加している.

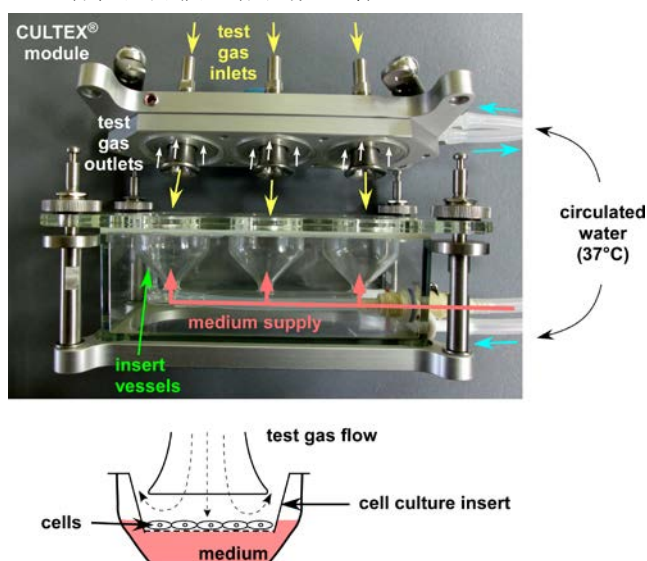


Fig. 2 CULTEX® module

しかし、ここで留意しなければいけない点は曝露時の気相の湿度である. 通常、ヒトが自然呼吸する場合、吸入された空気は上部気道を通っていくうちに気道粘膜から加湿され、気道分岐付近では相対湿度 100%になる³⁾. したがって、曝露時の気相の湿度が低い場合は、乾燥による時間依存性の細胞傷害が生じ、評価物質に有害性がない場合でも見かけ上、有害性があるように見誤ってしまう可能性がある. 実際に、気液界面培養下での細胞曝露試験では2時間以内の短時間曝露のものが多くみられるが、この乾燥による細胞傷害の限界を考慮しているのかもしれない. 一方、評価物質によっては、長時間の曝露評価が重要になると考えられる. しかしながら、上記のような細胞表面の乾燥が課題となり、長時間の曝露評価法はいまだ確立されていない現状である.

そこで本研究の目的は、気液界面培養下での細胞への長時間での曝露を実現するための乾燥対策として、1)水分を直接細胞に供給可能な、組織培養用コラーゲン培地上での細胞培養、2)試料ガスの加湿、を実施した. 上記の乾燥対策を施すことにより、*in vitro* 細胞曝露装置において培養細胞を安定して維持可能であるかを観察し、乾燥対策の有効性を検討した.

2. 方法

2.1 培養細胞の準備

ヒト肺上皮細胞株であるA549細胞 (ATCC No. CCL-185) を使用した. 液体培地にはDMEM/F12培地 (Gibco) を使用し、抗生物質である硫酸ゲンタマイシン (Sigma-Aldrich) と栄養分としてウシ胎児血清 (HyClone) をそれぞれ0.1%, 10%となるように添加した.

細胞培養用プレート (Becton Dickinson and Company) の各ウェルに培地を3 mL満たし、細胞培養インサート (Becton Dickinson and Company) を設置した. セルカルチャーインサートのメンブレン上にA549細胞を 0.375×10^6 cells/mL, 2mL播種した. 細胞の至適環境 (37°C, 5%CO₂) で培養し、翌日実験に使用した.

2.2 CULTEX®装置

細胞曝露装置としてCULTEX®装置 (柴田科学株式会社, Model AP-525) を、試料ガスとしてResearch Air (高千穂商事) を使用した (Fig. 3). また、試料ガスを調湿するために、バブリング法を利用した加湿装置⁴⁾を導入した (Fig. 3).

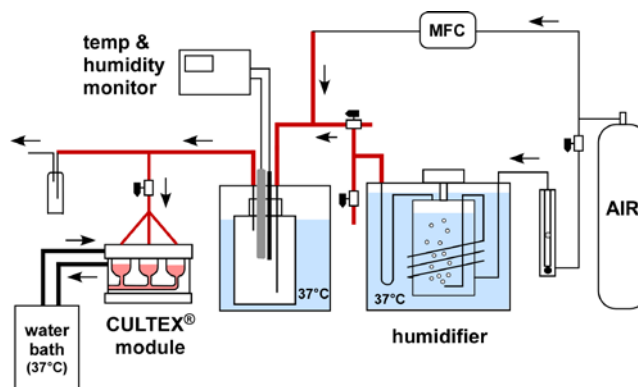


Fig. 3 CULTEX® exposure system with a humidifier

細胞を播種したセルカルチャーインサートの上部から実験開始直前に培地を除去し、メンブレンの底面が培地に浸るようにセルカルチャーインサートをCULTEX®装置内にセットした。温水をCULTEX®装置へ循環することにより、培地の温度を37°Cに維持した。セルカルチャーインサートをCULTEX®装置にセットした後に、速やかに調湿した空気を送気した。送気流量を8.3 cc/min/insert⁵⁾、調湿した空気の温度を37°Cに設定した。また、曝露時間は1, 3, 6時間のいずれかに設定した。

曝露条件としては、a) 乾燥空気、乾燥対策として b) 組織培養用コラーゲンゲルCellmatrix Type I-A(新田ゼラチン株式会社)、c) 加湿装置にて加湿した空気(設定湿度 85%RH)の検討を行なった(Fig. 4)。

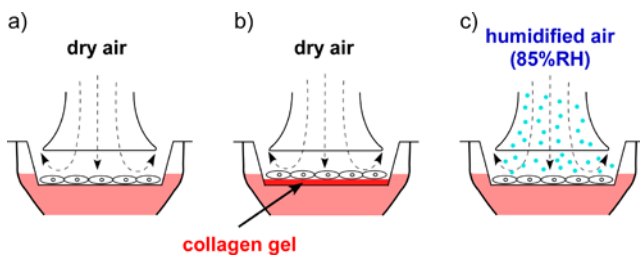


Fig. 4 Exposure conditions

いずれの条件下において、6インサート/1実験とし、3インサートをCULTEX®での曝露実験に、残りの3インサートをコントロール(曝露なし(0時間))として使用した。

2.3 細胞毒性試験

トリプシン・EDTA 溶液(0.25% trypsin, 1mM EDTA, Gibco)処理により細胞をインサートから回収し、全自動セルカウンター(TC10™, Bio-Rad)により生存細胞数を計測した。コントロール群(0時間)、曝露群(1, 3, 6時間)それぞれ3インサートから得られた細胞数の平均値を使用した。また、コントロールに対する比率として細胞生存率を算出した。

3. 結果および考察

a) 乾燥空気

低湿度条件で細胞が傷害されることを確認する目的で、CULTEX®装置を用いて乾燥空気(平均相対湿度 1.8±0.4%)を細胞に曝露し、細胞生存率を検討した。乾燥空気の曝露により1時間で約50%(44, 52%, n=2)まで細胞生存率が低下し、3時間後には細胞はほぼ死滅した(0.1, 1.9%, n=2, Fig. 5)。以上より、CULTEX®装置を用いて細胞曝露を実施する際に、乾燥による細胞傷害性を軽減するための対策が必要であることが再確認された。

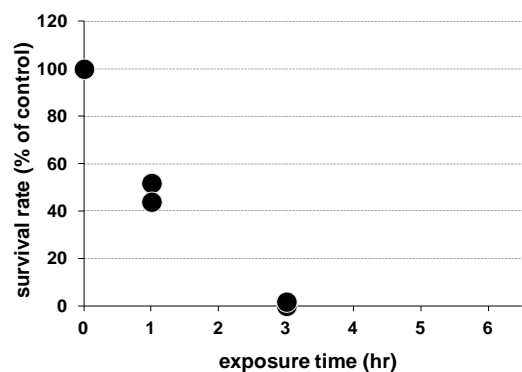


Fig. 5 Effect of dry air exposure on cell viability of A549 cells

b) 乾燥空気 + コラーゲンゲル

1つ目の乾燥対策として、組織培養用コラーゲンゲルの効果を検討した。コラーゲンゲル上に細胞を播種し、CULTEX®装置にて乾燥空気(平均相対湿度 1.2±0.2%)を曝露した。その結果、細胞生存率は1時間で81, 94%(n=2)、3時間で72, 76%(n=2)、6時間では43, 47%(n=2)であった(Fig. 6)。

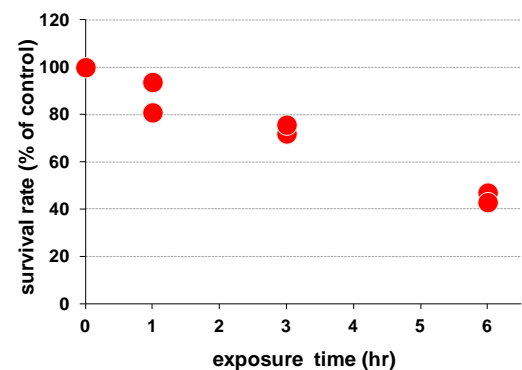


Fig. 6 Effect of dry air exposure on cell viability of A549 cells cultivated on a collagen gel

コラーゲンゲル処置により、乾燥による細胞傷害性は大きく軽減したが、時間依存性の細胞生存率の低下は依然として観察された。細胞培養なし、低湿度条件下でのコラーゲンゲルの重量変化を観察したところ、インサートのメンブレン下に液体培地があるにもかかわらず、その重量は時間経過とともに減少した (Fig. 7)。この重量低下はコラーゲンゲルからの水分の蒸発に起因するものと考えられる。したがって、コラーゲンゲルから細胞への水分供給が時間経過とともに減少し、結果として時間経過とともに細胞生存率が低下したと示唆される。

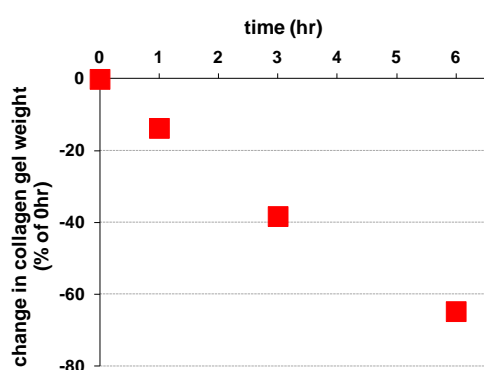


Fig. 7 Reduction in collagen gel weight at the air-liquid interface

c) 加湿空気 (相対湿度 85%)

2つ目の乾燥対策として、加湿装置を用いて加湿した空気 (平均相対湿度 $86 \pm 3\%$) の効果を検討した。高湿度条件下での細胞生存率は1時間で $82 \pm 7\%$ ($n=3$)、3時間で $78 \pm 6\%$ ($n=3$)、6時間では $75 \pm 5\%$ ($n=3$) であった (Fig. 8)。以上より、加湿装置による試料ガスの加湿により、細胞を6時間まで安定して維持することができた。

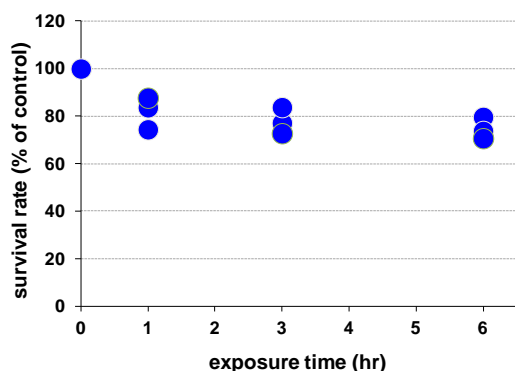


Fig. 8 Effect of humidified air exposure (85% RH) on cell viability of A549 cells

4. まとめ

本研究の主な結果を以下にまとめた。

- 1) 気液界面培養下においても乾燥による細胞傷害性が観察された。
- 2) コラーゲンゲル上での細胞培養は乾燥による細胞傷害性を軽減したが、時間依存性の細胞生存率の低下は依然として観察された。
- 3) CULTEX®への加湿空気の送気により、細胞を6時間まで維持できることを確認した。

以上のことから、CULTEX®を使用した細胞曝露実験を実施する際に細胞を安定して維持するためには、加湿装置を用いて高湿度環境下で曝露する手法が有効であることが示された。ただし、試料ガスの加湿だけでは細胞生存率が100%近くに維持できなかったため、今後の課題としてさらなる改善を検討していく予定である。

参考文献

- 1) Aufderheide, M. and Mohr, U.: CULTEX-a new system and technique for the cultivation and exposure of cells at the air/liquid interface, *Exp. Toxic. Pathol.*, Vol. 51, p.489-490(1999)
- Aufderheide, M.: An efficient approach to study the toxicological effects of complex mixtures, *Exp. Toxic. Pathol.*, Vol. 60, p.163-180(2008)
- 2) 磨田裕: 気道の給湿療法, 呼吸療法テキスト, 三学会合同呼吸療法士委員会編, 東京, 克誠堂出版, p.139-146(1992)
- 3) 田中睦美, 佐々木左宇介: in vitro細胞曝露装置における試料ガス加湿方法の検討, *JARI Research Journal*, 20150605
- 4) Ritter, D. et al.: In vitro exposure of isolated cells to native gaseous compounds - Development and validation of an optimized system for human lung cells, *Exp. Toxic. Pathol.*, Vol. 53, p.373-386(2001)