

労災疾病臨床研究事業費補助金

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の粉体を取り扱う労働者に発生した呼吸器疾患に関する研究

令和元年度総括・分担研究報告書

研究代表者 須賀 万智

令和 2 (2020) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の粉体を取り扱う労働者に発生した呼吸器疾患に関する研究
 研究代表者 須賀万智 ----- 2

II. 分担研究報告

1. 組織中の架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の検出
 研究協力者 木戸尊將、吉岡 亘 ----- 5
2. 架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の単回気管内投与における肺組織の線維化の機序解明
 研究協力者 蜂須賀英梨、木戸尊將 ----- 8
3. 架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物と類似する化学物質の肺有害性の比較評価
 研究分担者 木戸尊將 ----- 13
4. 架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物と類似する化学物質の肺有害性の比較評価
 研究分担者 岡野 孝 ----- 19
5. 架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物と煙草主流煙抽出液の複合曝露の影響
 研究分担者 吉岡 亘 ----- 21
6. チャイニーズハムスター肺由来CHL細胞およびヒト肺由来A549細胞を用いた遺伝毒性評価
 研究分担者 与五沢真吾 ----- 26
7. 抗架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物抗体の間接蛍光抗体法による細胞染色
 研究分担者 与五沢真吾 ----- 32

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 35

令和元年度労災疾病臨床研究事業費補助金
「架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の粉体を取り扱う労働者に発生した
呼吸器疾患に関する研究（190301-01）」
総括研究報告書

研究代表者	須賀万智	(東京慈恵会医科大学・環境保健医学講座)
研究分担者	木戸尊將	(東京慈恵会医科大学・環境保健医学講座)
	吉岡 亘	(東京慈恵会医科大学・環境保健医学講座)
	与五沢真吾	(東京慈恵会医科大学・環境保健医学講座)
	岡野 孝	(東京慈恵会医科大学・化学研究室)
研究協力者	柳澤裕之	(東京慈恵会医科大学・環境保健医学講座)
	羽野 寛	(東京慈恵会医科大学・病理学講座)
	横山昌幸	(東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター)
	関 良子	(東京慈恵会医科大学・環境保健医学講座)
	菅谷ちえ美	(東京慈恵会医科大学・環境保健医学講座)
	蜂須賀英梨	(東京慈恵会医科大学大学院)
	大越裕人	(東京慈恵会医科大学大学院)

【研究要旨】

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物を製造する工場で発生した肺障害について、昨年度、労災疾病臨床研究事業費補助金を受けて、業務起因性を実験と疫学の両面から検証する研究を進めた。本研究では、昨年度の研究で明らかにできなかった 1) 組織中の物質の検出、2) 毒性発現機序、3) 喫煙の関与、4) 発癌リスクを検討するため、ラットを用いた気管内投与試験と培養細胞を用いた変異原性試験を実施した。試験結果から、架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物は TGF- β 1 を介した線維芽細胞の誘導によって肺に線維化を生じることが明らかになった。また、COOH 基を多く含むポリアクリル酸は生体反応を誘発しやすい性質を持ち、更に架橋構造を得たことで、ヒドロゲルとして組織中に長く止まり、その性質が増強されると推察された。

A. 研究目的

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（以下、架ア水ポリマー）を製造する工場で発生した肺障害について、当該物質曝露と肺障害発生の因果関係を裏付けるエビデンスが全くなかったことから、昨年度、労災疾病臨床研究事業費補助金を受けて、業務起因性を実験と疫学の両面から検証する研究を進めた。本研究では、昨年度の研究で明らかにできなかった 1) 組織中の物質の検出、2) 毒性発現機序、3) 喫煙の関与、4) 発癌リスクを検討した。

B. 研究方法

本研究の流れ図を別紙に示す。当該工場との研究協力協定に基づき、当該工場より資料提供を受け、ラットを用いた気管内投与試験と培養細胞を用いた変異原性試験を実施した。

1) 組織中の架ア水ポリマーの検出

架ア水ポリマーをウサギに投与し、抗血清（ポリクローナル抗体）を作成した。血清から精製した抗体を用いて、曝露試験のラットの肺組織の免疫組織染色を行った。（木戸、吉岡）

2) 肺線維化に至る分子生物学的機序

架ア水ポリマーを雄F344ラットに単回気管内投与し、肺組織内の病理学的変化を免疫組織染色で観察した。（木戸、羽野、蜂須賀、菅谷）

3) 架ア水ポリマーと類似する化学物質の肺有害性の比較評価

架ア水ポリマーの比較対象として、増粘剤として使用され、架橋構造を持たない水溶性高分子化合物3種類（ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルアルコール、ヒドロキシセルロース）を選定し、雄F344ラ

ットに単回気管内投与し、気管支肺胞洗浄液と肺組織の変化を経時的に観察した。
(木戸、岡野、羽野、横山、菅谷)

4) 架ア水ポリマーと喫煙の混合影響

架ア水ポリマー、煙草主流煙抽出物、両者の混合液を雄F344ラットに単回気管内投与し、気管支肺胞洗浄液と肺組織の変化を経時的に観察した。(吉岡、与五沢、羽野、大越、関)

5) 架ア水ポリマーの発癌性評価

チャイニーズハムスター肺由来CHL細胞とヒト肺由来A549細胞を用いて *in vitro* 小核試験とリン酸化ヒストンH2AXアッセイを実施した。(与五沢、関)

(倫理面での配慮)

本研究を実施するにあたり東京慈恵会医科大学の動物実験委員会の審査承認を受けた。動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年文部科学省告示第71号)を遵守して、科学的観点と動物の愛護の観点から動物実験等を適正に実施した。

C. 研究結果

1) 組織中の架ア水ポリマーの検出

抗血清から精製した抗体を用いて曝露試験のラット肺組織の免疫組織染色を行った結果、肺胞腔内に架ア水ポリマーを検出した。(木戸、吉岡)

2) 肺線維化に至る分子生物学的機序

傷害部位で1週間後にM1、M2マクロファージの集簇と、線維化に関わるTGF- β 1、fibronectin、collagen type 1の増加を認めた。M2マクロファージは1、3、6ヶ月後も増加状態が持続し、collagen type 1は1ヶ月後以降に減少した。いずれも変化の程度は投与量に依存した。架ア水ポリマーが線維化を生じる機序はTGF- β 1を介した線維芽細胞の誘導によることが明らかにされた。(木戸、羽野、蜂須賀、菅谷)

3) 架ア水ポリマーと類似する化学物質の肺有害性の比較評価

被験物質3種類のうちポリアクリル酸ナトリウムで1、3ヶ月後に炎症反応を認めた。ただし、炎症性変化は架ア水ポリマーよりもずっと穏やかで、線維化は認められなかった。化学構造の相違から検討した結果、COOH基を多く含むポリアクリル酸は生体反応を誘発しやすい性質を持ち、更に架橋構造を得たことでヒドロゲルとして組織中に長く止まり、その性質が増強されると推察された。(木戸、岡野、羽野、横山、菅谷)

4) 架ア水ポリマーと喫煙の混合影響

架ア水ポリマーを投与された2群(架ア水ポリマー単独曝露群、複合曝露群)で肺組織の炎症・線維化を認め、薬物代謝酵素Cyp1a1とCyp1b1の発現が低下した。煙草主流煙抽出物の単回投与によって炎症・線維化を相乗的に高める効果は認められなかった。(吉岡、与五沢、羽野、大越、関)

5) 架ア水ポリマーの発癌性評価

CHL細胞、A549細胞とも試験結果はいずれも陰性で、架ア水ポリマー自体の変異原性は認められなかった。(与五沢、関)

D. 考察

架ア水ポリマーはTGF- β 1を介した線維芽細胞の誘導によって肺に線維化を生じることが明らかになった。また、COOH基を多く含むポリアクリル酸は生体反応を誘発しやすい性質を持ち、更に架橋構造を得たことでヒドロゲルとして組織中に長く止まり、その性質が増強されると推察された。

本研究は単年度の研究であり、線維化を母地とした発癌の可能性を *in vivo* 実験によって評価できなかった。また、架橋構造が肺有害性を決定づけることが明らかになったが、どの程度の架橋度から問題になるかを追究できなかった。架ア水ポリマーの肺有害性については、今後も研究を継続し、課題解決に取り組む必要がある。

E. 結論

架ア水ポリマーは TGF- β 1 を介した線維芽細胞の誘導によって肺に線維化を生じることが明らかになった。また、COOH 基を多く含むポリアクリル酸は生体反応を誘発しやすい性質を持ち、更に架橋構造を得たことでヒドロゲルとして組織中に長く止まり、その性質が増強されると推察された。

F. 健康危険情報

架ア水ポリマーの取り扱いに関して、厚生労働省より関係各者に注意喚起を呼びかける文書（平成 29 年 4 月 28 日付）が発出されたところであるが、本研究結果を受けて、架ア水ポリマーならびに有機合成高分子化合物の吸入曝露に関して、より一層の対策強化が求められる。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 須賀万智、山内貴史、柳澤裕之. 架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物を取

り扱う労働者に発生した呼吸器疾患に関する疫学的検討. 第 30 回日本疫学会（2020 年 2 月、京都）

2) 須賀万智、木戸尊將、山内貴史、森本泰夫、望月慎一、村田 克、柳澤裕之. 架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物を取り扱う労働者に発生した呼吸器疾患に関する検討. 第 90 回日本衛生学会（2020 年 3 月、盛岡）

※新型コロナウイルス感染症流行につき誌上開催のみ

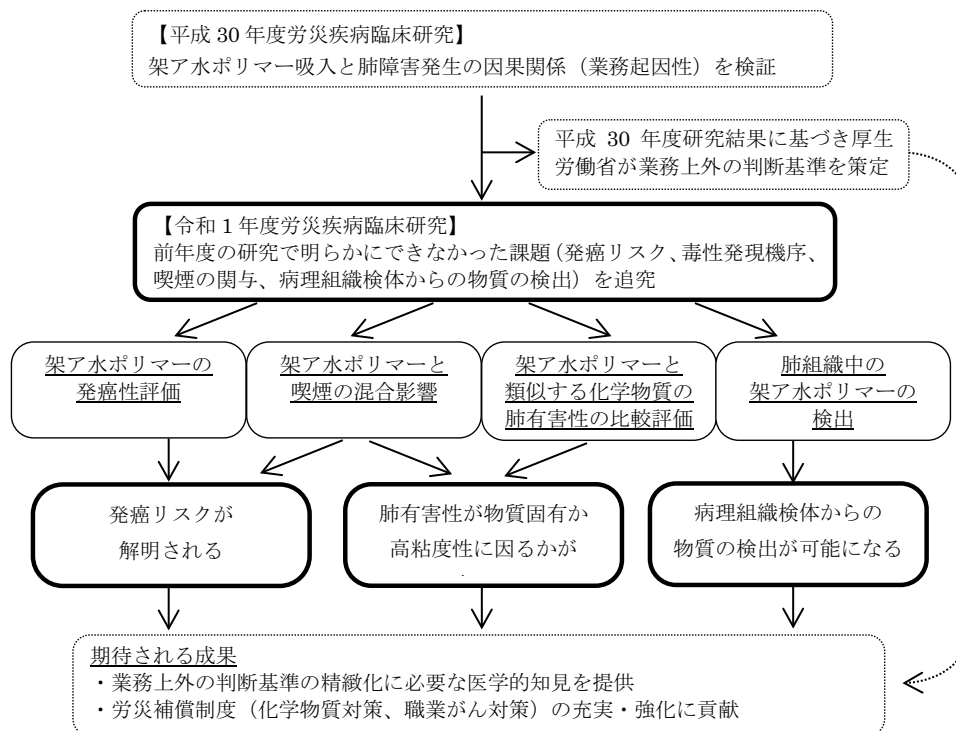
3) Suka M, Kido T, Yamauchi T, Morimoto Y, Mochizuki S, Murata M, Yoshioka W, Yanagisawa H. Epidemiological and experimental studies on a new incident of lung diseases in Japanese workers handling cross-linked water-soluble acrylic acid polymer (CWAAP) powders. SOT2020（2020 年 3 月、アナハイム）

※新型コロナウイルス感染症流行につき誌上開催のみ

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

【本研究の流れ図】



令和元年度労災疾病臨床研究事業費補助金
「架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の粉体を取り扱う労働者に発生した
呼吸器疾患に関する研究（190301-01）」
分担研究報告書

組織中の架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の検出

研究分担者 木戸尊將（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座 助教）
吉岡 亘（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座 講師）

【研究要旨】

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（以下、架ア水ポリマー）を生体試料中で検出できるようにするために、抗架ア水ポリマーウサギ抗体を作成した。この抗体を利用して免疫組織化学染色法を行ったところ、架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物を投与したラットの肺胞腔内で陽性となった。投与後経過期間別の比較ならびに類似化合物との比較から、作成した抗体は架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物に結合していると考えられた。

A. 研究目的

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（以下、架ア水ポリマー）の生体への影響を検証および推定するために、生体試料中で架ア水ポリマーを検出することが重要である。架ア水ポリマーに対する抗体が得られれば、免疫組織化学染色法によって肺組織試料中の架ア水ポリマーが検出できると考えられた。そこで本研究では、架ア水ポリマーに対する抗体を作成し、抗原とした架ア水ポリマーならびに類似の物質をそれぞれ投与したラットの肺組織試料に対する免疫組織化学染色法における染色性を検証した。

B. 研究方法

1) 抗架ア水ポリマー抗体の作製

ウサギに対して架ア水ポリマーを第0日に0.4 mg、第14日、28日、42日にそれぞれ0.2 mg投与し、第49日に抗血清を得た。抗血清はプロテインAカラムによる精製とラット肺組織による前吸収を経て抗架ア水ポリマー抗体とした。

2) 曝露物質の気管内投与

F344/Nslc ラット(雄:180～200g)(N = 72)をPBS、PBSで溶解した架ア水ポリマー、ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウムを0.5 mg/ratになるように200μlずつイソフルラン麻酔下で気管内投与を施した。投与終了後1週間、1ヵ月後に解剖し、肺を摘出した。

3) 抗架ア水ポリマー抗体を用いた免疫組織化学染色

パラフィン包埋した肺を6μmで薄切し、キシレン×3、99.5%エタノール×2、80%エタノール×1、70%エタノール×1で脱パラフィン処理を行い、蒸留水とトリス緩衝液(TBS)で洗浄したのち、3%過酸化水素で処理し、トリプシン(Nacalai Tesque, inc, Tokyo, Japan)で37℃35分間の賦活化を施した。Blocking One (Nacalai Tesque, Tokyo, Japan)で1時間ブロッキングを行い、ポリマー抗体(1:20)を載せ、4℃でover nightした。TBSで洗浄したのち、Envision™ + polymer (Dako, Tokyo, Japan)で1時間反

応させてジアミノベンジジンで発色させた。その後、ヘマトキシリンで核染色を行い、エタノールによる脱水とキシレンによる透徹を経て、EntellanNeu (Merck-Millipore, Tokyo, Japan) で封入した。

(倫理面での配慮)

本研究を実施するにあたり東京慈恵会医科大学の動物実験委員会の審査承認を受けた。動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年文部科学省告示第71号)を遵守して、科学的観点と動物の愛護の観点から動物実験等を適正に実施した。

C. 研究結果

肺組織中の架ア水ポリマー抗体陽性写真を図1に示した。肺胞腔内に残存している架ア水ポリマーに対して陽性反応を示した(黒矢印)。ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコールでは陽性反応を認めず、ポリアクリル酸ナトリウムではわずかに陽性反応を認めたが、架ア水ポリマーに比べて明らかに弱かった。

D. 考察

抗原とした架ア水ポリマーを投与したラットの肺組織において、投与後1週間に比して1ヶ月は染色性が低下した。このことから、肺組織から架ア水ポリマーが排出もしくは分解されるに従って染色性が低下したのではないかと考えられた。抗原とは別種の高分子化合物を投与したラットの肺組織では染色性が弱かったことから、得られた抗体は抗原とした架ア水ポリマーに選択性があると考えられた。

E. 結論

架ア水ポリマーを抗原としてウサギ抗架ア水ポリマー抗体を得た。本抗体を用いて免疫染色を行い架ア水ポリマーが残存すると

想定した肺胞腔内が陽性となることを確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

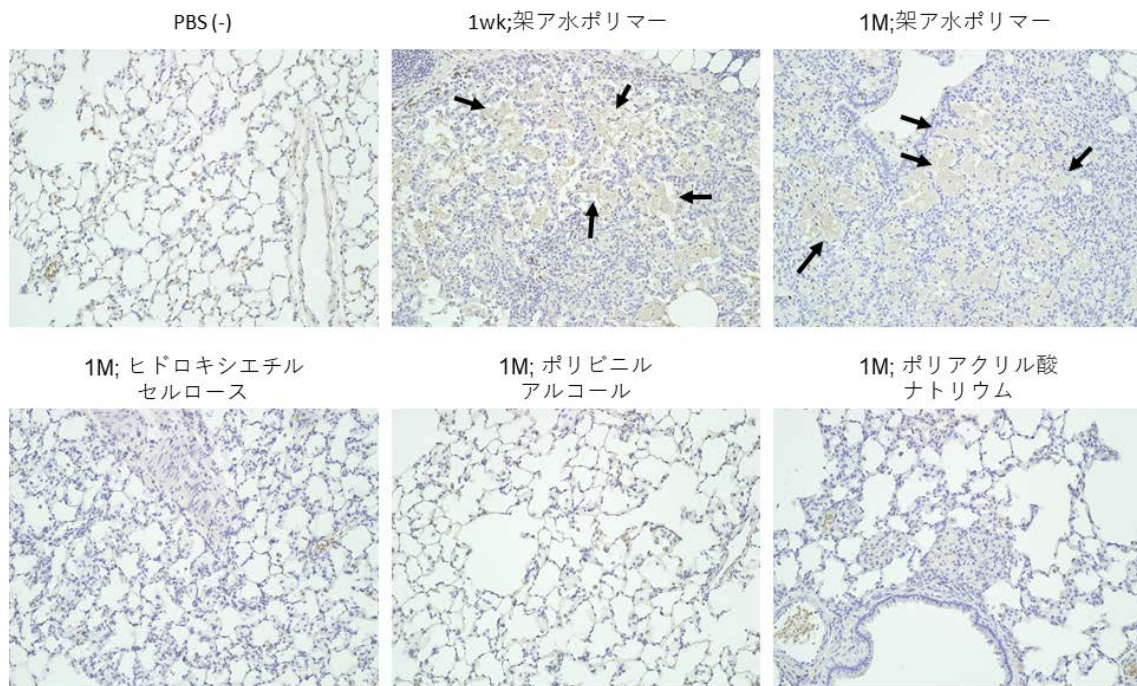


図1. ポリマー抗体を用いた免疫組織化学染色の写真

令和元年度労災疾病臨床研究事業費補助金
「架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の粉体を取り扱う労働者に発生した
呼吸器疾患に関する研究（190301-01）」
分担研究報告書

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の
単回気管内投与における肺組織の線維化の機序解明

研究協力者 蜂須賀英梨（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座 大学院生）
研究分担者：木戸尊将（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座 助教）

【研究要旨】

架ア水ポリマーが肺に線維化を起こす機序を追究した。雄 F344 ラットに架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物を気管内投与し、免疫組織染色を用いてマクロファージサブタイプ（M1、M2）、TGF- β 1、Fibronectin、Collagen type 1、リアルタイム PCR を用いて IL-1 β 、インフラマソーム、Toll 様受容体、Caspase-1 の mRNA 発現を測定した。M2 マクロファージ、TGF- β 1、Fibronectin、Collagen type 1 は投与後 1 週間、1 ヶ月で濃度依存的に上昇し、3 ヶ月以降も維持する傾向にあった。M1 マクロファージ、IL-1 β 、Caspase-1 の mRNA 発現は投与後 1 週間で濃度依存的に上昇したが、1 ヶ月以降は低下し、有意差を認めなかった。以上より、架ア水ポリマー投与直後の炎症反応は 1 ヶ月以降に減弱するが、M2 マクロファージの浸潤が持続するため、産生された TGF- β 1 によって線維芽細胞が誘導され、Collagen が産生され、線維化に至ると考えられた。

研究協力者：羽野 寛
（東京慈恵会医科大学 名誉教授）

研究協力者：菅谷ちえ美
（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座
研究補助員）

A. 研究目的

平成 30 年度労災疾病臨床研究において、ラットを用いて架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（以下、架ア水ポリマー）の単回気管内投与試験を行い、肺に炎症と線維化を起こすことを明らかにした。本研究では、ラットを用いて線維化の機序を追究した。

B. 研究方法

1) 被験物質の調整

架ア水ポリマー 0.1、0.5 mg/rat を PBS に懸濁し、超音波破碎機で 3 分間照射した。水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に補正し、被験物質とした。

2) 被験物質の気管内投与

雄 F344/Nslc ラット（180～200g）（n = 48）に①PBS、②架ア水ポリマー 0.1 mg/rat、③架ア水ポリマー 0.5 mg/rat をイソフルラン麻酔下で気管内投与（投与量 200 μ l）を施した。なお、動物の飼育は、東京慈恵会医科大学の動物飼育室（22 $^{\circ}$ C）で 12 時間明/暗サイクルで飼育した。

3) 観察期間終了後の処理

投与終了後 1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月観察した後、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血して安楽死させた。気管から肺までを摘出し、右気管支を動脈クレメンで閉塞し、気管から 10%リン酸緩衝ホルムアルデヒド 600 μ l を注入した。左肺を病理検査用サンプルとして、ホルマリンで拡張し、パラフィンに包埋した。右肺第 4 葉を遺伝子検査用サンプルとして、TRIzol 試薬（Invitrogen, Tokyo, Japan）で処理し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

4) 免疫組織染色と陽性細胞数および陽性面積の計測

パラフィン包埋した肺を 6 μ m で薄切し、キシレン \times 3、99.5%エタノール \times 2、80%エタノール \times 1、70%エタノール \times 1 で脱パラフィン処理を行い、蒸留水とトリス緩衝液 (TBS) で洗浄したのち、3%過酸化水素で処理し、オートクレーブで加熱 (M1、M2 マクロファージ: 107 $^{\circ}$ C / 9 分、TGF- β 1、Fibronectin、Collage type I: 110 $^{\circ}$ C / 9 分) して賦活化した。Blocking One (Nacalai Tesque, Tokyo, Japan) で 1 時間ブロッキングを行い、CD169 (M1 マクロファージマーカー)、CD163 (M2 マクロファージマーカー)、TGF- β 1、EP5 (Fibronectin マーカー)、Collage type I 抗体を載せ、4 $^{\circ}$ C で over night した。TBS で洗浄したのち、EnvisionTM + polymer (Dako, Tokyo, Japan) で 1 時間反応させてジアミノベンジジンで発色させた。その後、ヘマトキシリンで核染色を行い、エタノールによる脱水とキシレンによる透徹を経て、EntellanNeu (Merck-Millipore, Tokyo, Japan) で封入した。

肺組織を無作為に各 15 視野を撮影 (20 倍) し、各抗体に反応した陽性細胞数または陽性面積をイメージングソフト winroof 2018 で計測した。

5) cDNA の合成およびサイトカイン mRNA 発現測定と評価

凍結保存した肺からフェノールとクロロホルムで RNA を抽出し、Transcriptor First Standard cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を用いて cDNA を合成した。cDNA をリアルタイム PCR Light Cycler Nano (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を用いて IL-1 β 、インフラマソーム (NLRP-3)、Toll 様受容体 4 (TLR-4)、Caspase-1 の mRNA 発現を測定した。

6) 統計学的解析

IBM SPSS ver.24 (IBM, Maryland, US) を用いて一元配置分散分析と Tukey 法による post hoc test で比較検定した。

(倫理面での配慮)

本研究を実施するにあたり東京慈恵会医科大学の動物実験委員会の審査承認を受けた。動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年法律第 105 号)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年環境省告示第 88 号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年文部科学省告示第 71 号) を遵守した。

C. 研究結果

1) 肺組織中のマクロファージサブタイプの経時推移

肺組織中の M1、M2 マクロファージ数を図 1(A), (B) と別紙 1 に示した。投与後 1 週間では、M1、M2 マクロファージともに陽性細胞数が濃度依存的に増加した。M1 マクロファージは投与後 1 ヶ月以降、陽性細胞数が減少した。M2 マクロファージは投与後 1 ヶ月以降でも陽性細胞数が濃度依存的に増加した。

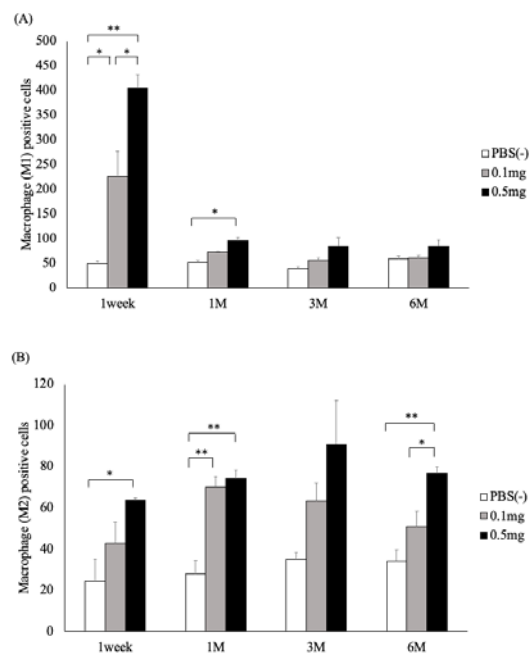


図1 肺組織中のマクロファージサブタイプの経時推移
Mean value \pm standard errors of (A) M1 positive cells, (B) M2 positive cells are indicated.
* p<0.05, ** P<0.01 by ANOVA followed by Tukey test. N=3/group.

2) 肺組織中の TGF- β 1, Fibronectin, Collagen type I の経時推移

TGF- β 1、Fibronectin 陽性細胞数および Collagen type 1 の陽性面積を図 2(A), (B),

(C)と別紙2に示した。投与後1週間、1ヶ月では、TGF-β1、Fibronectin 陽性細胞数と Collagen type 1 陽性面積は濃度依存的に増加した。投与後3ヶ月では、Collagen type 1 陽性面積のみ有意に増加した。TGF-β1、Fibronectin 陽性細胞数は有意差を認めなかったが、Collagen type 1 陽性面積と同様な傾向を示した。投与後6ヶ月では、いずれも有意差を認めなかった。

3) 肺細胞における炎症系サイトカインの mRNA 発現の経時推移

IL-1β, caspase-1 の mRNA 発現は投与後1週間で濃度依存的に上昇したが、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月では有意差を認めなかった。NLRP-3、TLR-4 はいずれの時期でも有意差を認めなかった。

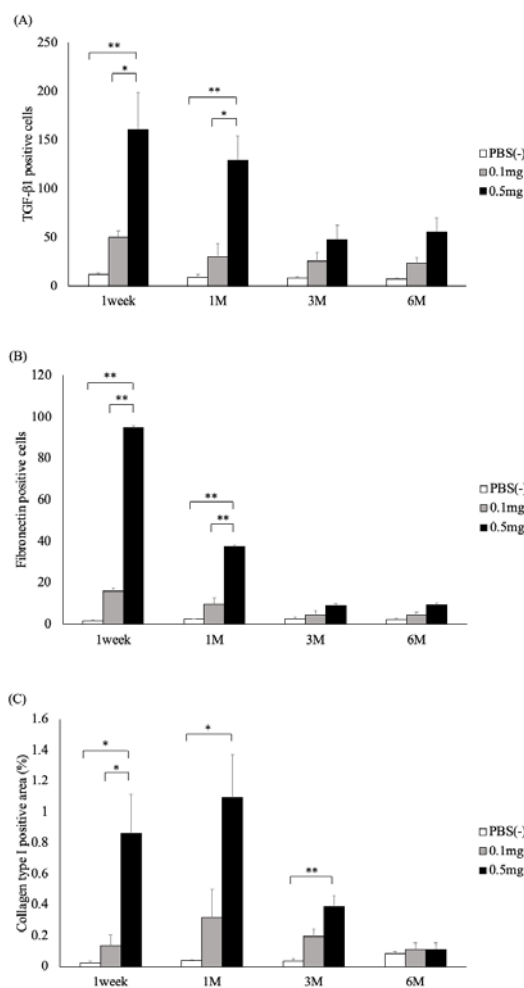


図2 肺組織中のTGF-β1, Fibronectin, Collagen type I の経時推移
Mean value ± standard errors of (A) TGF-β1 positive cells, (B) Fibronectin positive cells, (C) Collagen type I positive area are indicated. * p<0.05, ** P<0.01 by ANOVA followed by Tukey test. N=3/group.

D. 考察

架ア水ポリマーによる肺組織の線維化の機序を明らかにするため、雄 F344 ラットに架ア水ポリマーを気管内単回投与し、免疫組織染色とリアルタイム PCR で検討した。リアルタイム PCR において、IL-1β と Caspase-1 は投与後1週間で濃度依存的に上昇したが、1ヶ月以降は有意差を認めなかった。免疫組織染色において、炎症型の M1 マクロファージは投与後1週間で濃度依存的に増加したが、1ヶ月以降は減少した。一方、抗炎症型の M2 マクロファージは投与後1週間から6ヶ月まで濃度依的に増加した状態が持続した。このことから、投与直後の炎症反応は1週間以降に減弱するが、組織修復のため、M2 マクロファージの浸潤が持続すると考えられた。

免疫組織染色において、TGF-β1、Fibronectin 陽性細胞数、Collagen type I 陽性面積が投与後1週間、1ヶ月で濃度依的に上昇し、3ヶ月以降も維持する傾向にあった。M2 マクロファージから産生された TGF-β1 によって線維芽細胞が誘導され、Collagen が産生され、線維化に至ると考えられた。

E. 結論

架ア水ポリマー投与直後の炎症反応は1週間以降に減弱するが、M2 マクロファージの浸潤は少なくとも6ヶ月間は持続する。このため、M2 マクロファージから産生された TGF-β1 によって線維芽細胞が誘導され、Collagen が産生され、線維化に至ると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

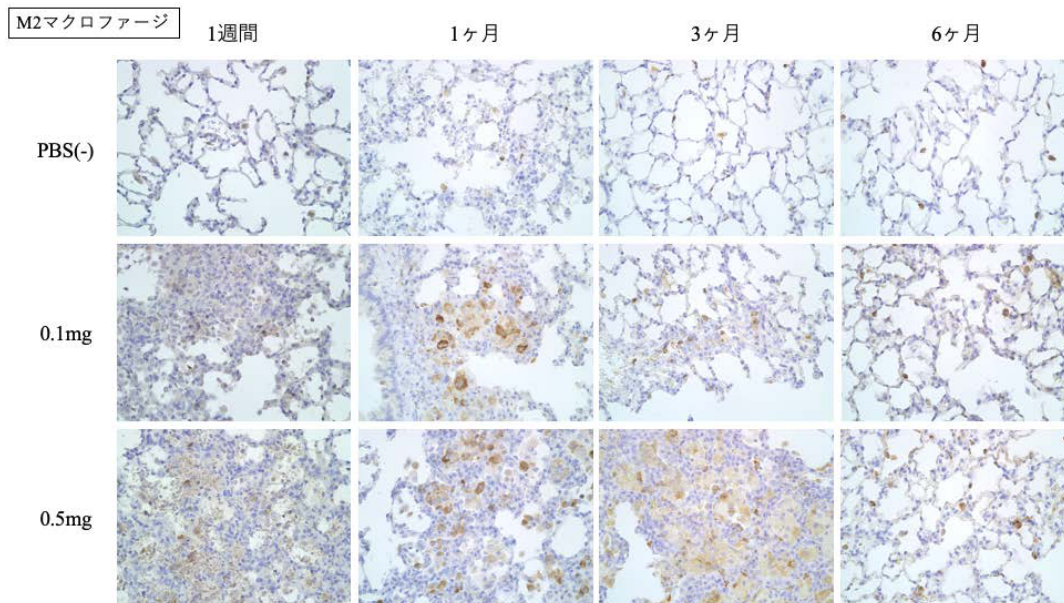
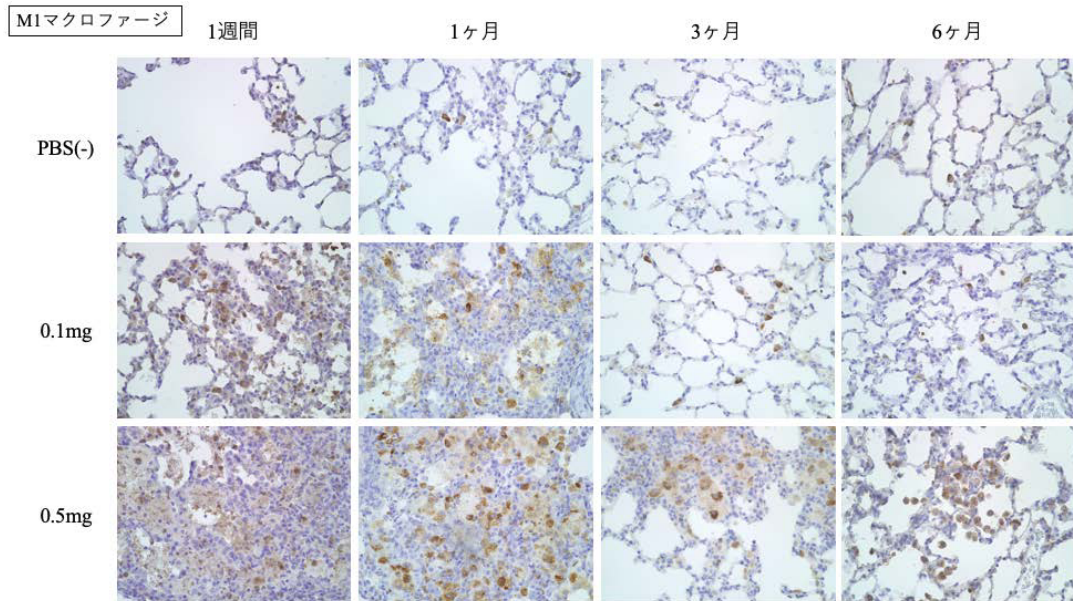
2. 学会発表

なし

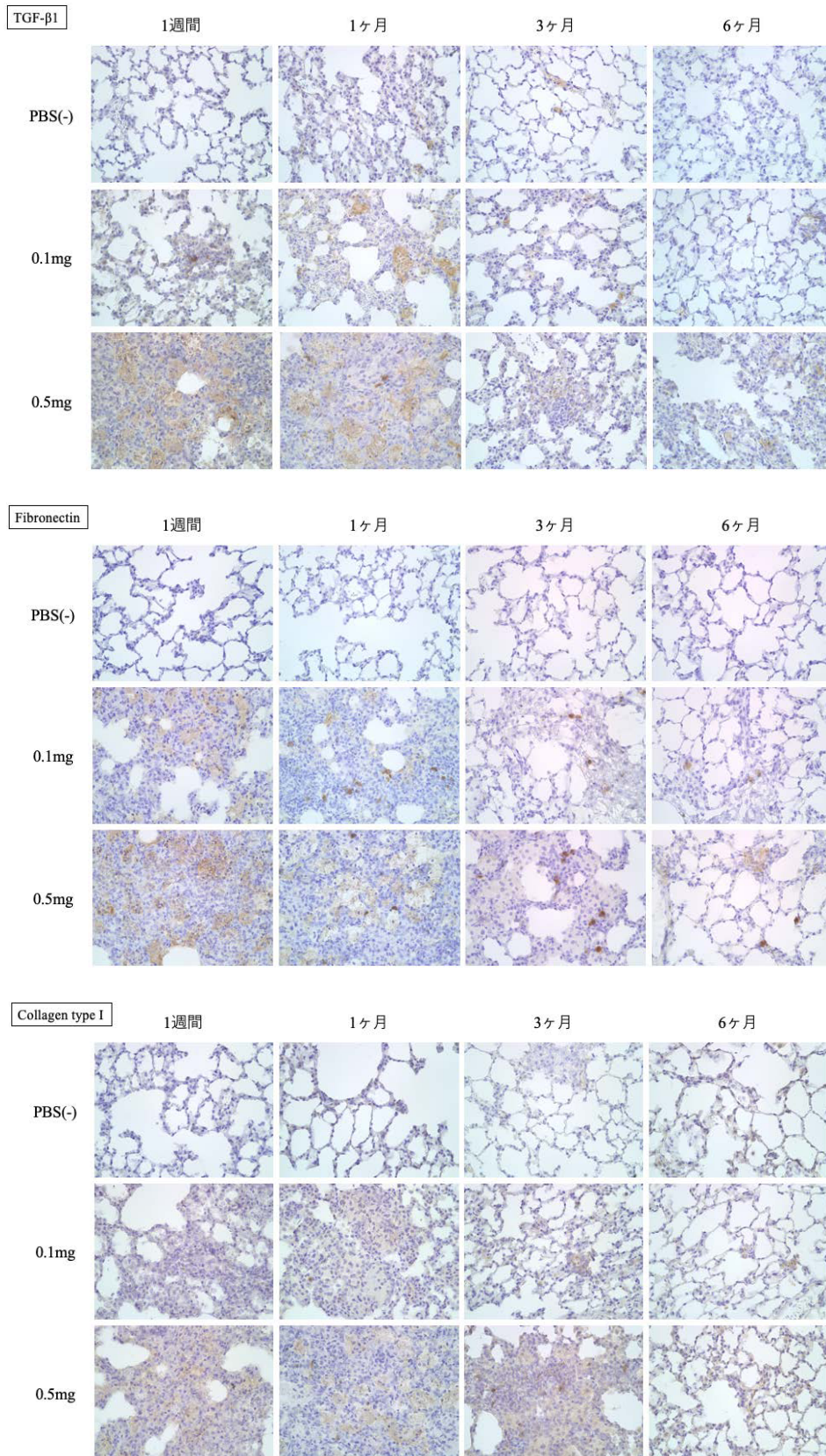
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

別紙1：肺組織中のマクロファージサブタイプの経時推移（茶色が陽性を示す）



別紙 2 : 肺組織中の TGF- β 1、Fibronectin、Collagen type I の経時推移 (茶色が陽性を示す)



令和元年度労災疾病臨床研究事業費補助金
「架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の粉体を取り扱う労働者に発生した
呼吸器疾患に関する研究（190301-01）」
分担研究報告書

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物と類似する化学物質の肺有害性の比較評価

研究分担者 木戸 尊将（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座 助教）

【研究要旨】

本研究では、安全性が担保されている増粘剤（ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウム）を F344 ラットに単回気管内投与を施し、相対肺重量、BALF 中の総細胞数、タンパク濃度、肺組織中のマクロファージ（CD68）数、線維化面積(Masson 染色)を観察した。ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール群では、BALF 中の総細胞数、タンパク濃度はいずれも有意差を認めず、好中球が増加する急性期の炎症反応の期間は短いと考えられた。ポリアクリル酸ナトリウム投与群では、相対肺重量、肺組織中のマクロファージ数、線維化面積が有意に増加し、肺毒性を持つことが示唆された。

研究分担者：岡野 孝
（東京慈恵会医科大学 化学研究室 教授）
研究協力者：羽野 寛
（東京慈恵会医科大学 名誉教授）
研究協力者：菅谷ちえ美
（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座
研究補助員）
研究協力者：蜂須賀英梨
（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座
大学院生）

込まれておらず、架ア水ポリマーのように安全性試験の基準を合格しても、間質性肺炎を引き起こす増粘剤が存在する危険性がある。そこで、本研究では化学物質の安全性試験において安全性が担保されている増粘剤（ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウム）の気管内投与を施し、投与後 1、3 カ月の肺組織を観察し、肺毒性を検討した。

A. 研究目的

平成 30 年度労災疾病臨床研究事業費補助金の「架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の粉体を取り扱う労働者に発生した呼吸器疾患に関する研究において、架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（以下、架ア水ポリマー）を F344 ラットに気管内投与を施し、肺毒性（炎症反応、線維化面積の拡大）を評価して報告した。

架ア水ポリマーのような増粘剤は、化粧品、食品、医療現場など様々な場所や用途で使用されている。しかし、化学物質の安全性試験には、気管内投与における肺毒性試験は組み

B. 研究方法

1) 被験物質：増粘剤の調整

被験物質 3 種類—ヒドロキシエチルセルロース(085-01935)、ポリビニルアルコール(160-11485)、ポリアクリル酸ナトリウム(195-10765)（すべて Wako, Tokyo, Japan）を溶媒(PBS)に 0.5mg/ml で懸濁し、超音波破碎機で 3 分間照射した。なお、ヒドロキシエチルセルロースのみ 37℃で 30 分間攪拌した。その後、pH メーターで pH6.8 になるように補正し、気管内投与用の曝露サンプルとした。

2) 増粘剤の気管内投与

F344/Nslc ラット(雄:180~200g)(N = 72)を PBS、PBS で溶解したヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウムを 0.5 mg/rat になるように 200 μ l ずつイソフルラン麻酔下で気管内投与を施した。投与終了後 1、3 ヶ月間観察した後に解剖し、肺を摘出もしくは気管に栄養カテーテルを挿入して肺洗浄液を回収した。なお、動物の飼育は東京慈恵会医科大学の動物飼育室(22°C)で 12 時間明/暗サイクルで飼育した。

3) 観察期間終了後の取り扱い

観察期間終了後に F344 ラットをイソフルラン麻酔で腹部大動脈から採血によって安楽死させた。

A) 病理検査用(N = 4/群)

気管から肺までを摘出し、右肺の細気管支を 9mm の動脈クレメンで閉塞し、気管から 10%リン酸緩衝ホルムアルデヒドを 1ml 注入し、左肺のみホルマリンで拡張させた。その後、パラフィン包埋を行い、病理検査用のサンプルとした。

B) 肺洗浄液(BALF)(N = 5/群)

気管を切開し、栄養カテーテルを挿入し、5ml の PBS を 10ml シリンジで注入し、肺が膨張したところで注入した PBS を回収した。その後、250 G で遠心分離を行い、上清を回収した。沈殿した細胞に 10ml の PBS を入れ攪拌した後に総細胞数を計測した。

4) 免疫組織染色と陽性細胞数の計測

パラフィン包埋した肺を 3 μ m の厚さで薄切し、キシレン \times 3, 99.5%エタノール \times 2, 80%エタノール \times 1, 70%エタノール \times 1 で脱パラフィン処理を行った。その後、水道水で 5 分間洗い、Masson 染色を施した。免疫組織化学染色については、肺を 6 μ m で薄切し、上記と同様の方法で脱パラフィン処理を行った後、蒸留水とトリス緩衝液(TBS)で洗浄し、3%過酸化水素に浸した後にオートクレーブ(108°C、10 分)で賦活化処

理を施した。賦活化処理後はブロッキングワロン(Nacalai Tesque, Tokyo, Japan)で 1 時間ブロッキングを行い、一次抗体として ED-1(CD68, マクロファージマーカー)を切片に載せ、冷蔵庫で over night した。Over night 後はトリス緩衝液(TBS)で洗浄を行い、二次抗体として EnvisionTM+ polymer (Dako, Tokyo, Japan)で 1 時間反応させ、ジアミノベンジジン(DAB) で陽性細胞の発色を行った。その後、ヘマトキシリンで核染色を施し、エタノールによる脱水とキシレンによる透徹を経て EntellanNeu (Merck-Millipore, Tokyo, Japan)で封入した。封入後は、肺を無作為に撮影(15 視野/20 倍レンズ)し、各抗体に反応した陽性細胞数をイメージングソフト(winroof 2018)で計測した。

5) 統計処理

統計ソフトには JMP 11.2(SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いて、一元配置分散分析(ANOVA)で比較し、post hoc test として Tukey 法で検定した。

(倫理面での配慮)

本研究を実施するにあたり東京慈恵会医科大学の動物実験委員会の審査承認を受けた。動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年法律第 105 号)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年環境省告示第 88 号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)を遵守した。

C. 結果

1) 気管内投与後の体重と肺相対重量の経時推移

1、3 ヶ月後の体重と相対肺重量(右肺)の結果を図 1 に示す。ポリアクリル酸ナトリウム投与群において、最終体重および相対肺重量に有意な増加を認めた。

2) 気管内投与後の BALF 中の総細胞数とタンパク濃度

1、3 ヶ月後の BALF 中の総細胞数とタンパ

ク濃度の結果を図2に示す。全ての群で有意な変化を認めなかった。

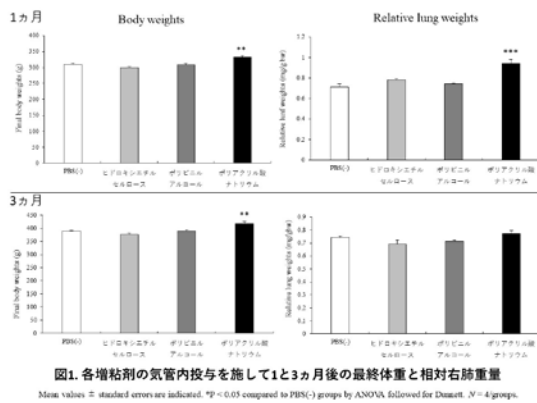


図1. 各増粘剤の気管内投与を施して1と3ヵ月後の最終体重と相対右肺重量

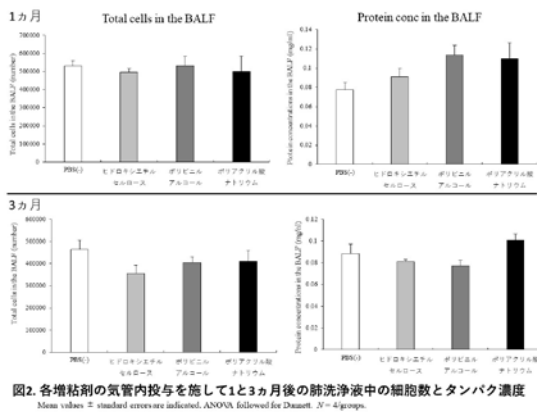


図2. 各増粘剤の気管内投与を施して1と3ヵ月後の肺洗浄液中の細胞数とタンパク濃度

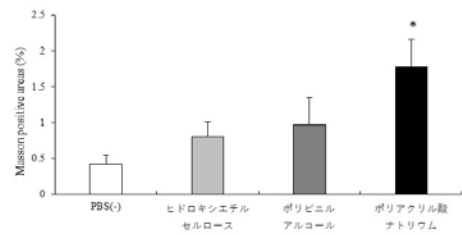
3) 気管内投与後の左肺組織の H-E 染色と Masson 染色を用いた組織検査

1、3ヵ月後の肺組織の H-E 染色と Masson 染色の組織を参考資料 1、2 に示す。Masson 染色による線維化陽性面積(青色)を算出した結果を図3に示す。増粘剤投与群において対照群よりも増加する傾向がみられ、特にポリアクリル酸ナトリウム投与群で、1ヵ月に有意な増加を認めた。

4) 気管内投与後の肺組織中のマクロファージ数

1、3ヵ月後の肺組織中のマクロファージ (CD68 陽性細胞：茶色)の免疫組織染色を参考資料 3 に示す。細胞数を図4に示す。増粘剤投与群においてマクロファージ数は有意に増加した。

1ヵ月



3ヵ月

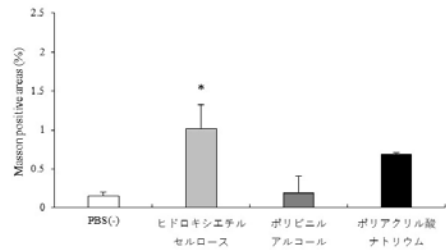
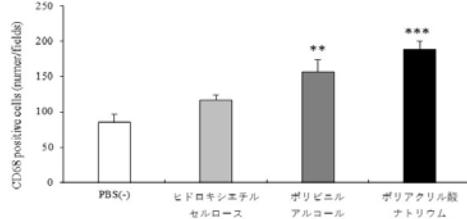


図3. 増粘剤の気管内投与後 1と3ヵ月後の肺組織の線維化面積の算出
Mean values ± standard errors are indicated. *P < 0.05 compared to PBS(-) groups by ANOVA followed for Dunnett. N = 4/groups.

1ヵ月



3ヵ月

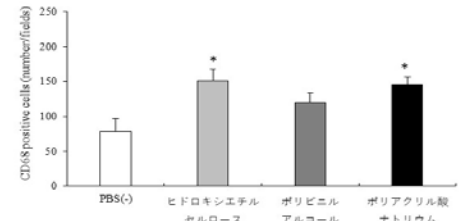


図4. 増粘剤の気管内投与後1と3ヵ月後の肺組織のマクロファージの陽性細胞数の算出

Mean values ± standard errors are indicated. *P < 0.05 compared to PBS(-) groups by ANOVA followed by Dunnett. N = 4/groups.

D. 考察

本研究では化学物質の安全性試験において安全性が担保されている増粘剤(ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウム)を F344 ラットに単回気管内投与を施し、肺毒性を検討した。

BALF 中の総細胞数とタンパク濃度に有意な変化は観察されなかったことから、恐らく、好中球が増加するような急性期の炎症反応は期間が短いと考えられる。一方、肺組織中のマクロファージ数と線維化面積は増粘剤投与群において対照群よりもする傾向が

みられた。特に架ア水ポリマーの単鎖構造であるポリアクリル酸ナトリウムでは、病理組織上で有意な変化が観察され、肺毒性を持つことが示唆された。このことから、架ア水ポリマーの肺毒性は、ポリアクリル酸の毒性影響が架橋構造によってさらに増強されたものと推察された。

E. 結論

安全性が担保されている増粘剤(ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、アクリル酸ナトリウム)でも気管内投与により肺への影響が観察された。ポリアクリル酸ナトリウム投与群では、相対肺重量、肺組織中のマクロファージ数、線維化面積が有意に増加し、肺毒性を持つことが示唆された。

参考文献

Ohnishi M; Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung. J Occup Med Toxicol 2016

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

1. 論文発表

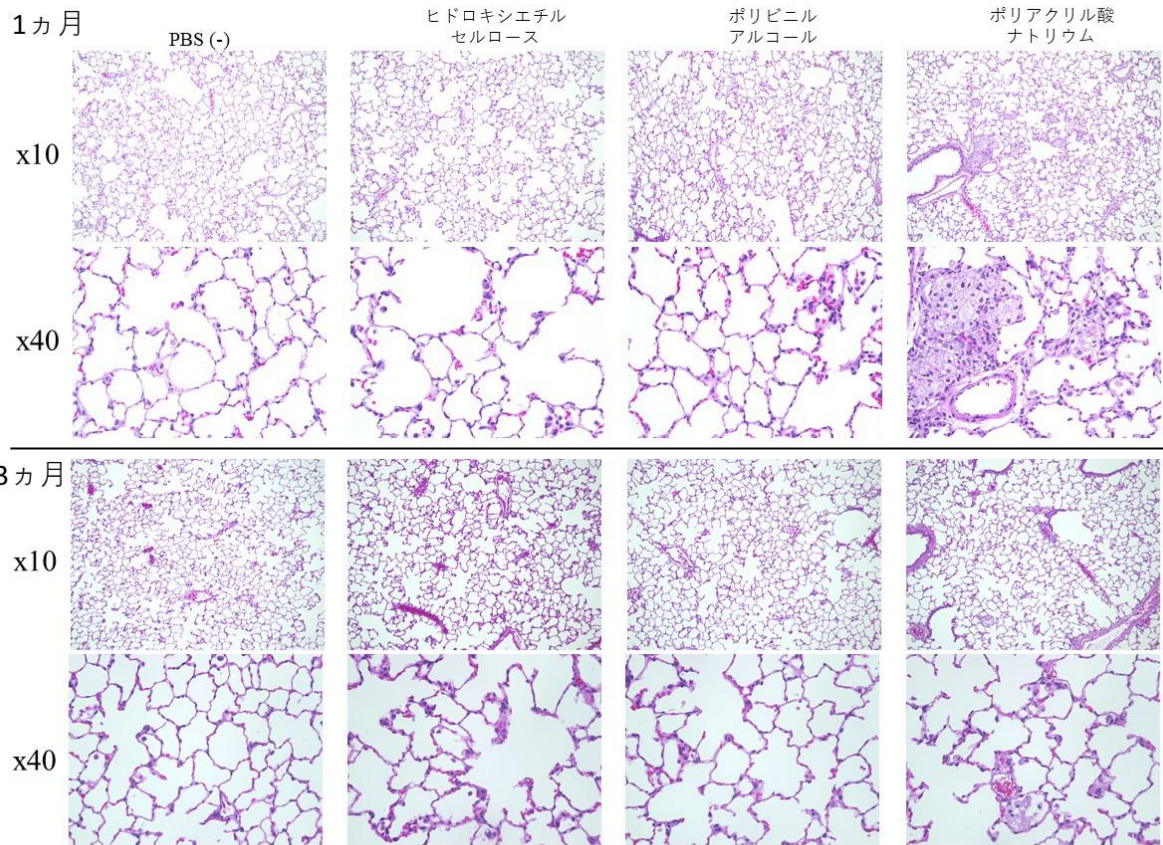
なし

2. 学会発表

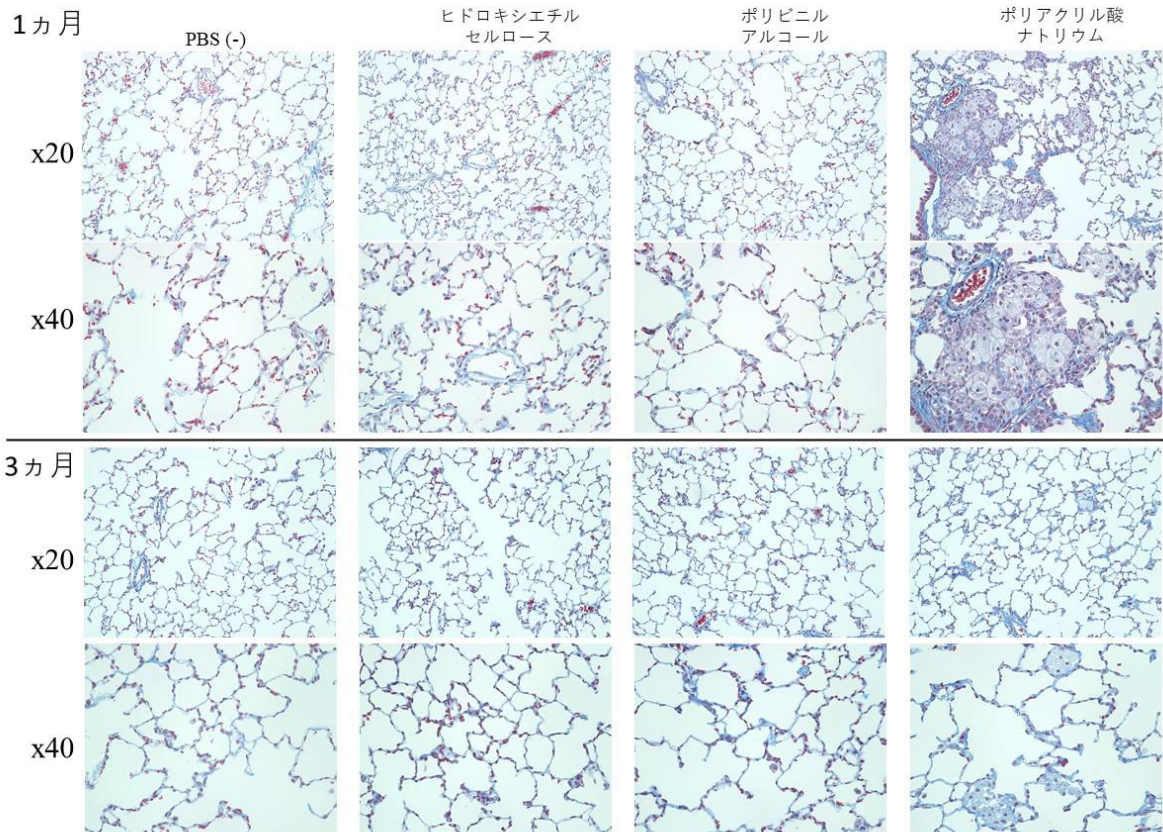
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

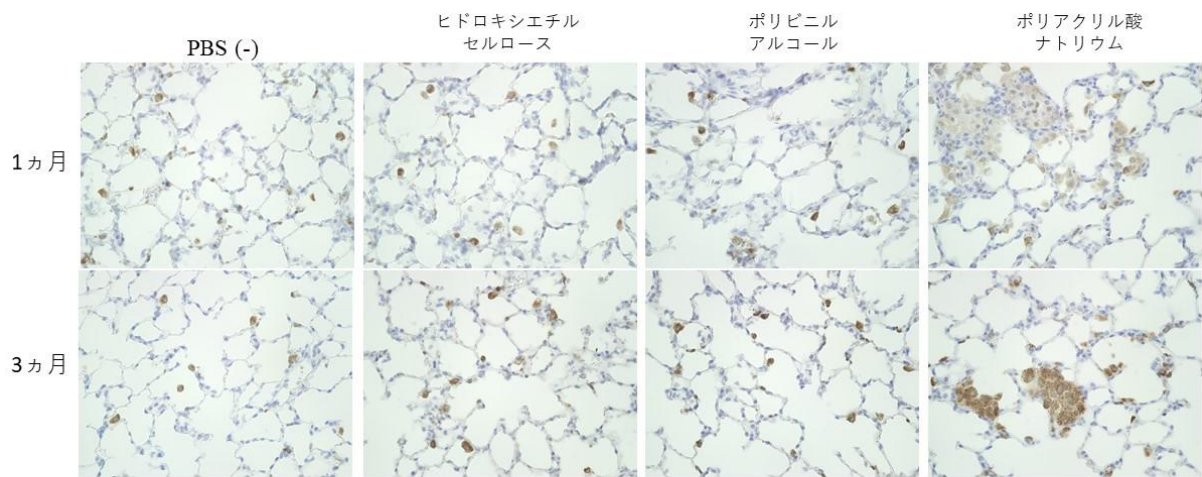
なし



参考資料1. 増粘剤の気管内投与後 1と3ヵ月の肺組織のH-E染色写真



参考資料2. 増粘剤の気管内投与後 1と3ヵ月の肺組織のMasson染色写真



参考資料3. 増粘剤の気管内投与後1と3ヵ月の免疫組織化学染色を用いた肺組織中のマクロファージ写真

令和元年度労災疾病臨床研究事業費補助金
「架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の粉体を取り扱う労働者に発生した
呼吸器疾患に関する研究（190301-01）」
分担研究報告書

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物と類似する化学物質の肺有害性の比較評価

研究分担者 岡野 孝（東京慈恵会医科大学 化学研究室 教授）

【研究要旨】

動物曝露試験を実施するにあたり、架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の比較対象として、架橋構造を持たない水溶性高分子化合物 3 種類を選定した。曝露試験結果を比較したところ、明らかに架橋構造が肺有害性に影響していることが確認された。

研究協力者：横山昌幸

（東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 教授）

A. 研究目的

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（以下、架ア水ポリマー）の肺有害性について更なるエビデンスを得るため、化学構造が異なる水溶性高分子化合物を動物曝露試験により比較評価することになった（動物曝露試験は研究分担者 木戸尊将が実施）。本研究では、架ア水ポリマーの比較対象として、増粘の目的で一般的に用いられている水溶性高分子化合物 3 種類を選定し、得られた曝露試験結果を化学構造の相違の観点から考察した。

B. 研究方法

1) 増粘剤として用いられている水溶性高分子化合物の調査検討

本研究で対象とした架ア水ポリマーと構造類似性あるいは非類似性を持つような水溶性高分子化合物 3 種類を選定した。

2) 曝露試験結果と分子構造の関係の評価

動物曝露試験で得られた肺有害性の評価結果について、架ア水ポリマーと比較対象物質の化学構造の相違の観点から考察した。

（倫理面での配慮）

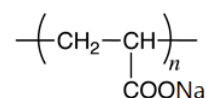
該当しない。

C. 研究結果

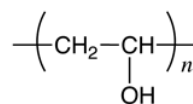
1) 増粘剤として用いられている水溶性高分子化合物の調査検討

本研究で対象とした架ア水ポリマーの特徴である架橋構造を持たない水溶性高分子化合物で、増粘の目的で一般的に用いられているポリアクリル酸ナトリウム(A)、ポリビニルアルコール(B)、ポリヒドロキシエチルセルロース(C)を選定した。

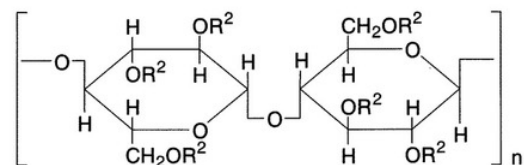
(A)



(B)



(C)



2) 動物実験結果と分子構造の関係の評価

架ア水ポリマーの曝露試験結果では、激しい炎症反応と線維化を認めた。ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルセルロースの曝露試験結果では、ポリアクリル酸ナトリウムでのみ、穏やかな炎症反応と線維増生を認めた。このことから、架橋構造を持たないポリアクリル酸ナトリウムにも多少の肺毒性が認められ、架橋構造を持つことによって、その性質が増強されると推察された。

D. 考察

増粘剤は食品・化粧品等の民生品に多く使われているので、本質的に無害でなければならぬ。水に対する増粘効果を保持するためには、溶解してしまうのではあまり高い増粘性を持たない。このため、水には溶解しないが、水になじみやすい構造が必要であると考えられる。一般に、高分子材料の架橋は溶解度を低下させるために行われる。基本的に、架橋されると溶解度は小さくなるが、増粘剤においては親水性基が水に分散したコロイド液あるいは懸濁状態のヒドロゲル状態を形成すると考えられる。この状態では、肺に吸入された場合、排出が困難であると予想される。

今回の研究で架橋構造を持たないポリアクリル酸ナトリウムにも多少の肺毒性が認められ、架橋構造を持つことによって、その性質が増強されることが推察された。これに対し、ポリビニルアルコールやポリヒドロキシエチルセルロースは水溶性が高く、また、これらには細胞内での分解も考えられる。ポリアクリル酸は微生物以外での生物分解が起こりにくく、架橋構造を持つことによって、さらに分解が困難になると考えられる。

E. 結論

架橋構造を持つ架ア水ポリマーと架橋構造を持たない水溶性高分子化合物では、架橋構造の有無が肺毒性に関係することが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

令和元年度労災疾病臨床研究事業費補助金
「架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の粉体を取り扱う労働者に発生した
呼吸器疾患に関する研究（190301-01）」
分担研究報告書

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物と煙草主流煙抽出液の複合曝露の影響

研究分担者 吉岡亘（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座 講師）

【研究要旨】

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（以下、架ア水ポリマー）への曝露と喫煙の複合影響を検証することを目的として、ラットへの気管内投与実験を実施した。架ア水ポリマー曝露による肺での炎症ならびに線維化を単回の喫煙が増強する可能性は非常に低いと考えられる結果を得た。一方で、架ア水ポリマーの単回曝露は少なくとも1ヶ月間薬物代謝酵素 Cyp1a1 と Cyp1b1 の発現レベルを低下させることを発見した。架ア水ポリマーが薬物代謝を変容させる可能性について注意が必要だと考えられた。

研究分担者：与五沢真吾

（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座
講師）

研究協力者：羽野 寛

（東京慈恵会医科大学 名誉教授）

研究協力者：大越裕人

（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座
大学院生）

研究協力者：関良子

（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座
実験助手）

A. 研究目的

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（以下、架ア水ポリマー）の吸入性粉じんを取り扱う複数の労働者から、肺組織の線維化などの呼吸器疾患が生じた[1]。アクリル酸系ポリマーの吸入性粉じんのばく露は呼吸器疾患発症の有力な原因の一つと認められるとされた[1]とともに、当該労働者の喫煙率が高かった(79%)こと[2]から喫煙が複合的に影響した可能性が考えられた。そこで、本研究では、架ア水ポリマーと喫煙の複合影響を検証することを目的として実験動物を用いた複合曝露試験を実施した。

B. 研究方法

1) ラットを用いた架ア水ポリマーと煙草主流煙抽出物の複合曝露試験

F344/Nslc ラット(9週齢雄、約200g)を4群に分け、架ア水ポリマー単独曝露群(P群)、煙草主流煙抽出物単独曝露群(T群)、複合曝露群(PT群)、溶媒対照群(C群)とした。各群の被験動物に0.2 mLの被験液を気管内に単回投与した。架ア水ポリマーは1個体あたり0.5 mg投与した。煙草は国内販売実績首位の製品から既報の方法[3]で主流煙を抽出し、20倍希釈液がヒト肺胞基底上皮系培養細胞A549において上皮間葉転換能を有することを確認した。この煙草主流煙抽出物2倍希液0.2 mL(60 kgのヒト換算で煙草13.7本分)を各被験動物に投与した。

投与1週間後時点および1ヶ月後時点において、X線CT装置(LCT-200: Hitachi)を用いて胸部の撮影を行うとともに、肺組織および気管支肺胞洗浄液(BALF)を試料として採取した。肺の腫大は右肺第一葉の対体重相対重量を指標として評価した。炎症反応を検証するために、BALF中細胞数をScepter (Millipore)で、BALF中タンパク質量をBradford法で、組織中炎症性サ

イトカイン発現レベルを RT-qPCR 法で測定した。煙草主流煙抽出物の曝露影響を検証するために、薬物代謝酵素 P450 Cyp1a1 と Cyp1b1 の発現レベルを RT-qPCR で測定した。組織線維化は、Masson 染色ならびに抗 Collagen type I 抗体 (ab34710: abcam)を用いた免疫染色によって検証した。

データは 平均値±標準誤差 で表記した。架ア水ポリマーおよび煙草主流煙抽出物の曝露影響は 2 元配置分散分析によって分析した。有意水準は 0.05 と定めた。

(倫理面での配慮)

本研究を実施するにあたり東京慈恵会医科大学の動物実験委員会の審査承認を受けた。動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年法律第 105 号)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年環境省告示第 88 号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年文部科学省告示第 71 号) を遵守して、科学的観点と動物の愛護の観点から動物実験等を適正に実施した。

C. 研究結果

1) ラットを用いた架ア水ポリマーと煙草主流煙抽出物の複合投与の 1 週間後の影響

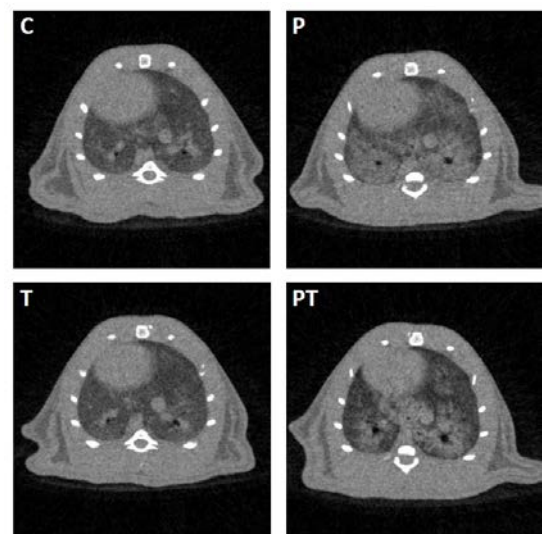
投与 1 週間後の肺組織における薬物代謝酵素 Cyp1a1 の対照群(C 群)に対する相対発現レベルは、P 群で 0.53 ± 0.07 、T 群で 1.29 ± 0.28 、PT 群で 0.96 ± 0.18 であり、架ア水ポリマー曝露による主効果($p=0.02$)ならびに煙草主流煙抽出物曝露による主効果($p=0.04$)が認められ、交互作用は認められなかった($p=0.7$)。薬物代謝酵素 Cyp1b1 は、P 群で 0.76 ± 0.10 、T 群で 1.02 ± 0.07 、PT 群で 0.77 ± 0.14 であり、架ア水ポリマー曝露による主効果のみ認められた($p=0.006$)。

投与 1 週間後の BALF 中細胞数とタンパク質量は、P 群において対照群(C 群)の 5.8 ± 0.4 倍と 7.5 ± 1.5 倍、PT 群において 5.7

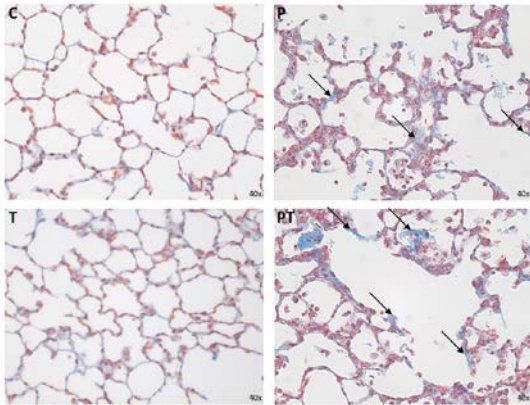
± 0.8 倍と 5.9 ± 1.5 倍と顕著に多かった。一方、T 群は 0.98 ± 0.20 倍と 0.75 ± 0.07 倍であった。これらの項目は架ア水ポリマー曝露による主効果のみ有意(細胞数: $p<0.000000$); タンパク質量: $p=0.00002$)であった。同様に、肺組織相対重量は架ア水ポリマー曝露による主効果のみ有意($p<0.000000$)であり、対照群に対して P 群と PT 群で 1.3 ± 0.1 倍と 1.4 ± 0.0 倍であった。炎症性サイトカイン IL-1b と TNF α についても、架ア水ポリマー曝露による主効果のみ有意(IL-1b: $p=0.0012$; TNF α : $p=0.00002$)であり、対照群に対して IL-1b は P 群と PT 群で 1.4 ± 0.1 倍と 1.4 ± 0.1 倍で TNF α は P 群と PT 群で 2.0 ± 0.1 倍と 2.0 ± 0.2 倍であった。

投与 1 週間後の胸部 CT(図 1)は、対照群(C 群)と T 群において気管支周辺に高吸収部位が観られるのに対して、P 群と PT 群では病変と考えられる高吸収部位が気管支周辺を超えて広がっていた。

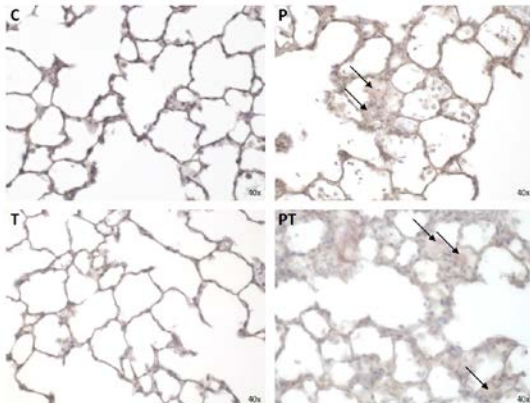
Masson 染色陽性部位(図 2 矢印表示)は、P 群と PT 群で肺胞腔内に観られたが対照群(C 群)と T 群では観られなかった。anti-Collagen type I 免疫染色陽性部位(図 3 矢印表示)は、P 群と PT 群で肺胞の崩壊によって拡大した間質に観られたが対照群(C 群)と T 群では観られなかった。



(図 1. 投与 1 週間後の胸部 CT)



(図 2. 投与 1 週間後の Masson 染色)

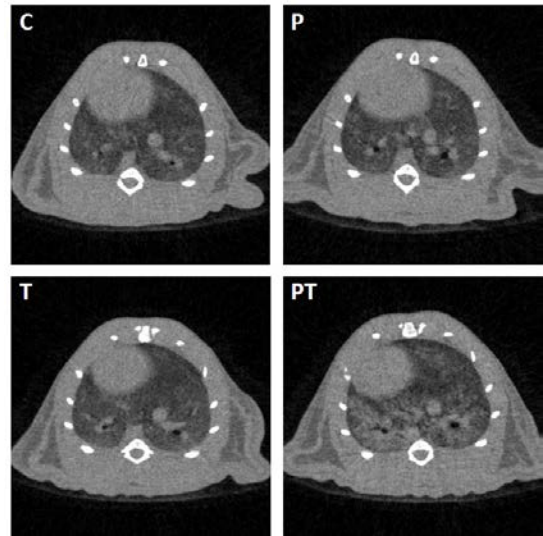


(図 3. 投与 1 週間後の Collagen type I 免疫染色)

2) ラットを用いた架ア水ポリマーと煙草主流煙抽出物の複合投与の 1 ヶ月後の影響

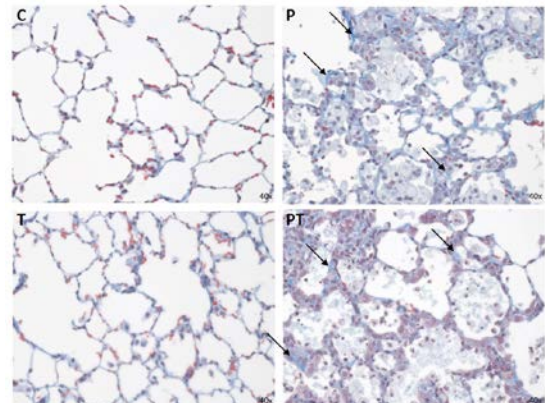
投与 1 週間後時点で認められた曝露影響は全体的に減弱し不明瞭となった。ただし、Cyp1a1 の相対発現量は P 群で 0.87 ± 0.30 、T 群で 1.68 ± 0.14 、PT 群で 0.83 ± 0.10 であり、Cyp1b1 の相対発現量は P 群で 0.60 ± 0.02 、T 群で 0.84 ± 0.06 、PT 群で 0.65 ± 0.06 であり、架ア水ポリマー曝露による主効果が 1 週間後と同様に明瞭に認められた (Cyp1a1: $p=0.03$; Cyp1b1: $p=0.0003$)。肺組織相対重量についても、P 群と PT 群で 1.3 ± 0.1 倍と 1.6 ± 0.2 倍であり、架ア水ポリマー曝露による効果が明瞭であった ($p=0.0007$)。

投与 1 ヶ月後の胸部 CT (図 4) は、対照群 (C 群) と T 群において気管支周辺に高吸収部位が観られるのに対して、P 群と PT 群では高吸収部位が気管支周辺を超えて広がっていた。この高吸収部位の分布は 1 週間時点に比して狭い範囲にとどまった。

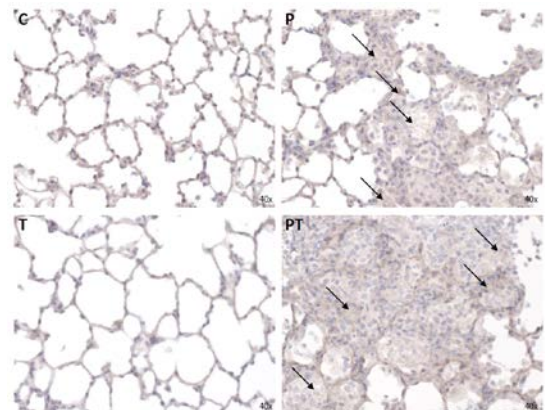


(図 4. 投与 1 ヶ月後の胸部 CT)

Masson 染色 (図 5) と anti-Collagen type I 免疫染色 (図 6) の陽性部位は P 群と PT 群では肺胞の崩壊によって拡大した間質に観られた。



(図 5. 投与 1 ヶ月後の Masson 染色)



(図 6. 投与 1 ヶ月後の Collagen type I 免疫染色)

組織の線維化を促進する因子として知られている TGF- β 1 の相対発現レベルは、P 群で 1.18 ± 0.03 、T 群で 1.08 ± 0.03 、PT 群で 0.14 ± 0.05 であり、架ア水ポリマーによる有意な増加が認められ ($p=0.009$)、煙草主流煙抽出物では有意な変化がみられなかった($p=0.7$)。

D. 考察

架ア水ポリマー投与群(P 群と PT 群)においては、投与 1 週間後に炎症反応の指標とした炎症性サイトカイン発現レベルが明瞭に上昇し、1 ヶ月後にその影響が減弱した。一方、肺組織重量や線維化関連項目は同レベルまたは重篤化した。これらのことから、曝露早期に急性炎症が生じ、次いで線維化が誘導されたと考えられる。架ア水ポリマー曝露は 1 ヶ月時点において持続および増強する評価項目(肺組織重量や線維化関連項目)があったことから、影響が長期間続くものと考えられた。

煙草主流煙抽出物投与群(T 群と PT 群)では、薬物代謝酵素 Cyp1a1 の発現レベルが投与 1 週間後に上昇し 1 ヶ月において有意でなくなった。1 ヶ月時点において煙草主流煙抽出物曝露の効果が認められる項目がなかった(表 1)ことから、煙草主流煙抽出物の曝露影響は短期間しか持続しないものと考えられた。

表 1 煙草主流煙抽出物の影響

	1週間	1ヶ月
Cyp1a1発現上昇	○	×
肺組織重量増加	×	×
炎症性反応	×	×
線維化誘導	×	×

本研究では当初作業仮説を「架ア水ポリマーの曝露影響を煙草主流煙抽出物が増強する」としていた。架ア水ポリマーの曝露の主要な評価項目と想定した炎症指標、X 線 CT 画像、組織学解析結果のいずれから、この仮説は支持されなかった。架ア水ポリマーが引き起こす炎症および組織

線維化に対して、1 回の喫煙が増強効果を引き起こす可能性は極めて低いと推定される。ただし、習慣的な喫煙による架ア水ポリマー毒性の増強作用については今後検討する必要がある。

架ア水ポリマー単回投与が薬物代謝酵素 Cyp1a1 と Cyp1b1 の発現レベルを 1 週時点ならびに 1 ヶ月時点で減少させた。このことから、架ア水ポリマーに 1 度曝露すると 1 ヶ月以上に亘って Cyp1a1 と Cyp1b1 の発現が抑制されると考えられた。薬物代謝酵素は体内に取り込まれた治療薬や有害物質の代謝を行うことが知られており、Cyp1a1 についてはアナグレリドやグラニセトロン等の化合物を基質とする。本研究で観られた Cyp1a1 および Cyp1b1 の発現低下がどのような薬剤に対してどの程度影響するか現時点で不明であり今後検討する必要がある。

本研究の主題とした複合影響について、薬物代謝酵素の発現レベルは煙草主流煙抽出物による増加と架ア水ポリマーによる減少の相加的効果が 1 週間時点において認められた。単回曝露により短期間ではあるが複合影響が認められたことから、習慣的な喫煙は、架ア水ポリマーの生体影響を変容させる可能性がある。

E. 結論

架ア水ポリマー曝露による肺での炎症ならびに線維化を単回の喫煙が増強する可能性は非常に低いと考えられる。ただし、架ア水ポリマーは単回曝露であっても 1 ヶ月以上に亘って薬物代謝を変容させる可能性があることについては注意を要する。

参考文献

- 「架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の吸入性粉じんの製造事業場で発生した肺障害の業務上外に関する検討会」報告書 2019 年
- 「架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の粉体を取り扱う労働者に発生した呼吸器疾患に関する研究 (180301-01)」 2018 年 4 月

3. *Curr Protoc Neurosci.* ; 77:
9.54.1-9.54.10.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

令和元年度労災疾病臨床研究事業費補助金
「架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の粉体を取り扱う労働者に発生した
呼吸器疾患に関する研究（190301-01）」
分担研究報告書

チャイニーズハムスター肺由来 CHL 細胞および
ヒト肺由来 A549 細胞を用いた遺伝毒性評価
～*In vitro* 小核試験とリン酸化ヒストン H2AX による DNA 損傷評価試験～

研究分担者 与五沢真吾（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座 講師）

【研究要旨】

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（以下、架ア水ポリマー）の遺伝毒性について、培養細胞を用いた小核試験及びリン酸化ヒストン H2AX を指標とした DNA 損傷の検出により検討した。細胞は遺伝毒性試験に汎用される新生チャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 CHL/IU およびヒト肺胞上皮 II 型細胞様株細胞 A549 を用いた。いずれの細胞においても、有意な小核の出現および有意なリン酸化ヒストン H2AX の増加がみられなかったことから、架ア水ポリマーが細胞へ直接的に DNA 損傷を起こして遺伝毒性をもたらす可能性は低いと考えられた。

研究協力者：関 良子
（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座
実験助手）

A. 研究目的

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（以下、架ア水ポリマー）の遺伝毒性の有無を調べることを目的として、培養細胞（新生チャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 CHL/IU、ヒト肺胞上皮 II 型細胞様細胞 A549）を用いて小核試験とリン酸化ヒストン H2AX を指標とした DNA 損傷試験を行った。

B. 研究方法

1) 細胞へのばく露方法

架ア水ポリマーは PBS に懸濁後 3 分間超音波処理を行い、水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整した。ばく露は 24、48、72 時間連続でばく露させる連続処理法、6 時間ばく露後 washout し、その後 18、42、66 時間インキュベートする短時間処理法、6 時間ラット肝ホモジネート薬物代謝酵素

分画（S9）と共にばく露後 washout し、その後 18、42、66 時間インキュベートする代謝活性化系短時間処理法の 3 種類で行った¹⁾。陽性対照には OECD ガイドラインに推奨されているマイトマイシン C

（MMC）を連続処理法および短時間処理法非代謝活性化系に、ベンツピレン（BaP）を短時間処理法代謝活性化系に用いた²⁾。新生チャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 CHL/IU は国立医薬品食品衛生研究所より、ヒト肺胞上皮 II 型細胞様細胞 A549 は(国研)医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。CHL/IU の培養には EMEM、10%CS を、A549 の培養には DMEM、10%FBS を用い、5% CO₂、37°C で培養した。

2) *in vitro* 小核試験

小核は細胞分裂の際に染色体分配異常により生じるもので、化学物質の変異原性や潜在的がん原性を調べる目的で行われている。

1) のように処理した細胞を 0.25% トリ

プシンで回収し、細胞浮遊液を調整した。これをスライドグラスに滴下して乾燥させ、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色で核を染色し、蛍光顕微鏡下で細胞 1000 個当たりの小核数をカウントした²⁾。

3) リン酸化ヒストン H2AX を指標とした DNA 損傷試験

DNA 二重鎖切断が起こると、その切断部位を中心に、周囲に存在するヒストン H2AX のセリン 139 番目が迅速にリン酸化される。この性質を利用し、リン酸化されたヒストン H2AX を指標に、化学物質の DNA 損傷性の評価を行う試験法である³⁾。

細胞をカバースリップ上に播種し、1) のように処理を行った。その後 PBS で洗浄し、-20°C の 100% メタノールで固定した。PBS で洗浄後、1 % BSA 含 PBST (PBS + 0.1 % Tween 20) で 30 分ブロッキングを行なった後、抗マウスリン酸化 H2AX 抗体(ab26350、abcam 社)を 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、2 次抗体として Alexa Fluor 555 結合抗マウス IgG (A21422、サーモフィッシャー社)を 1 時間反応させた。洗浄後、細胞核 (DNA) を DAPI で染色して封入し、蛍光顕微鏡で撮影後、100 細胞数 (核数) あたりのリン酸化ヒストン H2AX の強度を画像処理ソフト Image J(NIH)で定量した。

C. 研究結果

1) A549 細胞の結果(図 1)

いずれのばく露方法によっても、架ア水ポリマー最高濃度 (426ug/ml)、24 時間の処理で 6-8 割程度の増殖抑制効果がみられたが、48、72 時間後でも抑制率に変化はなかった (図 1A、B、C 生存曲線)。小核の誘発も濃度、時間依存性を認めず、有意な誘発は観察されなかった (図 1A、B、C 小核試験)。また DNA 損傷についても、どのばく露方法でもそれぞれの陽性対照にあるような DNA 損傷の活性は架ア水ポリマーでは観察されなかった (図 1A、B、C DNA 損傷評価試験)。

2) CHL/IU 細胞の結果(図 2)

A549 の場合と同様に、架ア水ポリマー最高濃度 (426ug/ml)、24 時間の処理で細胞増殖は 6-7 割程度まで抑制された (図 2A、B、C 生存曲線)。ただし 48、72 時間後でも抑制率に変化はなかった。小核の誘発も濃度、時間依存性を認めず、有意な誘発は観察されなかった (図 2A、B、C 小核試験)。また DNA 損傷についても、どのばく露方法でもそれぞれの陽性対照にあるような DNA 損傷の活性は架ア水ポリマーでは観察されなかった (図 2A、B、C DNA 損傷評価試験)。短時間処理群の非代謝活性化系では、陽性対照群でも DNA 損傷があまりみられなかった。この状況下では、有意差はないものの、架ア水ポリマー処理群で DNA 損傷が抑制される傾向がみられた (図 2B)。

D. 考察

本研究で行った濃度帯において、架ア水ポリマーによる DNA 損傷および小核を誘導する活性はみとめられなかった。実験に用いた濃度帯では高い細胞増殖抑制効果がみとめられず、強い細胞周期停止やアポトーシス誘導は起きていないと思われる。本実験で強い DNA 傷害活性や細胞分裂異常がみとめられなかったことをあわせて考えれば、少なくともこの濃度帯では、架ア水ポリマーが細胞へ直接的に DNA 損傷を起こして遺伝毒性をもたらす可能性は低いと考えられる。

架ア水ポリマーが肺組織に線維化を起こすことは木戸らによる動物実験の結果から明らかであるが、架ア水ポリマーは肺上皮細胞に直接作用するのではなく、マクロファージなどの免疫系の細胞を介して肺上皮細胞が上皮間葉転換などにより繊維芽細胞へと分化して線維化が起こっている可能性も考えられる。次項 (本別添 p.28~31) の抗架ア水ポリマー抗体を用いた検討で、架ア水ポリマーを添加した群でシグナルの増強を観察できたのが、A549 ではなくマクロファージ様細胞だけであ

ったことは、架ア水ポリマーが上皮細胞には取り込まれず、マクロファージに取り込まれる可能性を示唆しており、興味深い。

今後は肺上皮細胞に対する架ア水ポリマーの直接ばく露ではなく、他の細胞を介した影響について検討する必要があると考えられる。

E. 結論

新生チャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 CHL/IU、ヒト肺胞上皮II型細胞様細胞 A549 に対し、架ア水ポリマーによる DNA 損傷の増加および小核の誘発を指標とする遺伝毒性はみとめられなかった。

参考文献

1. R. Takagi, Y. Suzuki, Y. Seki, M. Ikehata, C. Kajihara, H. Shimizu, H. Yanagisawa, Indium chloride-induced micronuclei in vivo and in vitro experimental systems, *J. Occup. Health* 53 (2) (2011) 102–109.

2. 経済協力開発機構(OECD)化学物質の試験に関するガイドライン 哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験

<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9714561e.pdf>

3. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858-5868.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

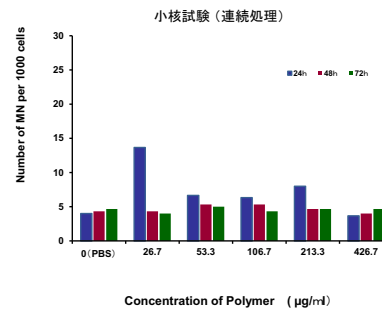
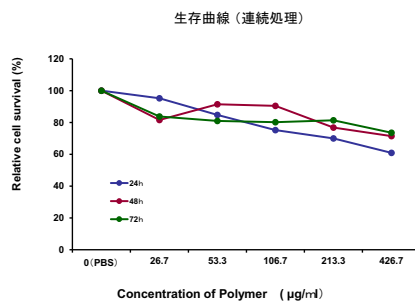
2. 学会発表

なし

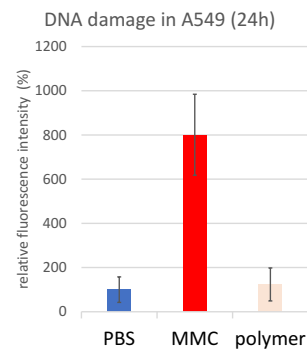
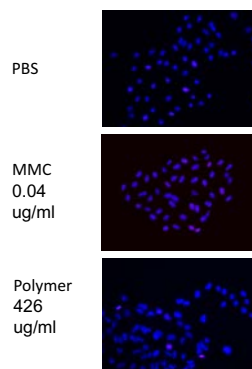
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

A A549 連続処理法

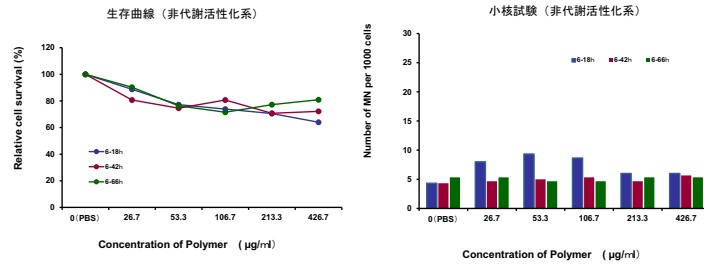


リン酸化ヒストンH2AXによるDNA損傷評価試験



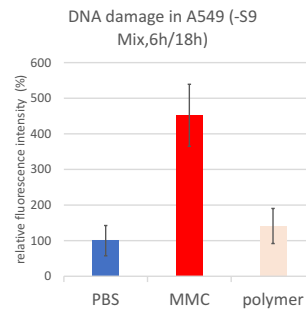
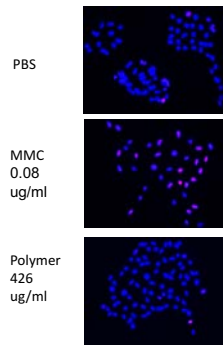
15

B A549 短時間処理法・非代謝活性化系



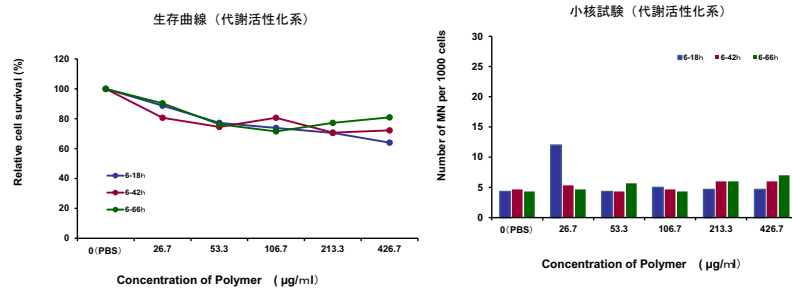
16

リン酸化ヒストンH2AXによるDNA損傷評価試験

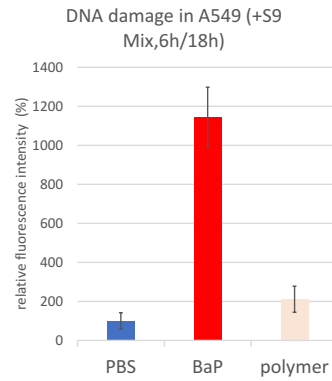
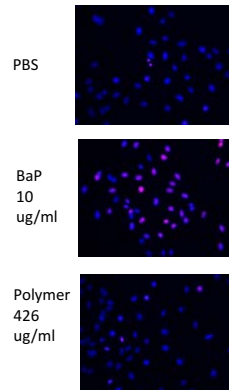


17

C A549 短時間処理法・代謝活性化系



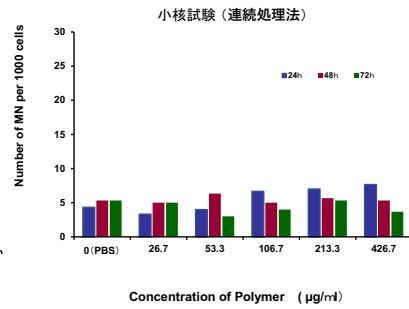
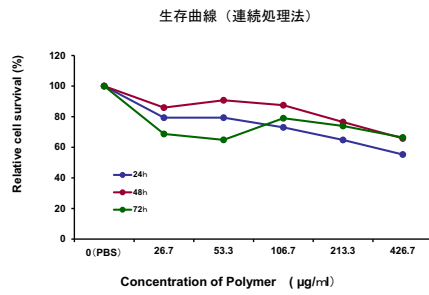
リン酸化ヒストンH2AXによるDNA損傷評価試験



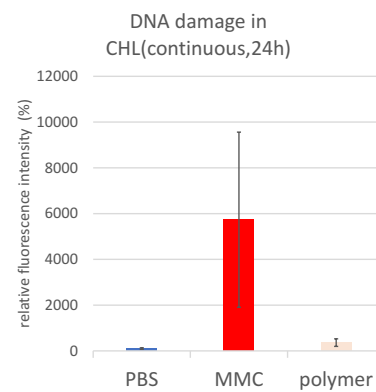
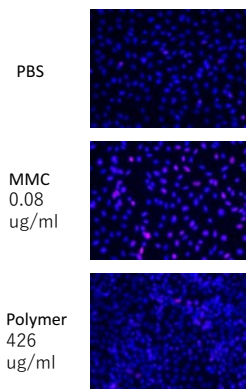
19

図1 A549細胞の結果
A:連続処理法 B:短時間処理法 C:代謝活性化系短時間処理法

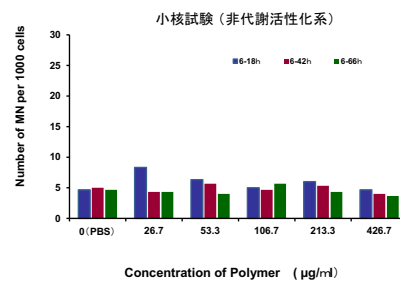
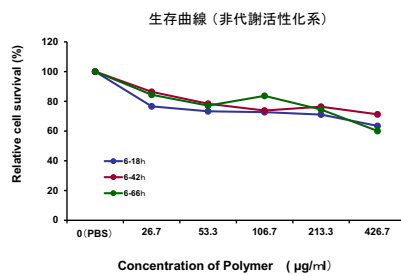
A CHL/IU 連続処理法



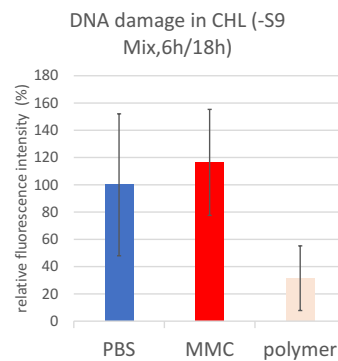
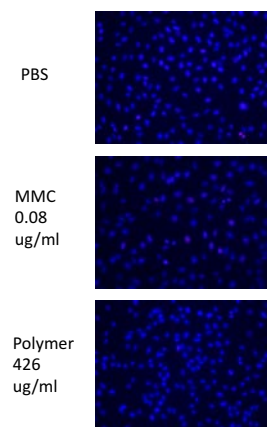
リン酸化ヒストンH2AXによるDNA損傷評価試験



B CHL/IU 短時間処理法・非代謝活性化系



リン酸化ヒストンH2AXによるDNA損傷評価試験



C CHL/IU 短時間処理法・代謝活性化系

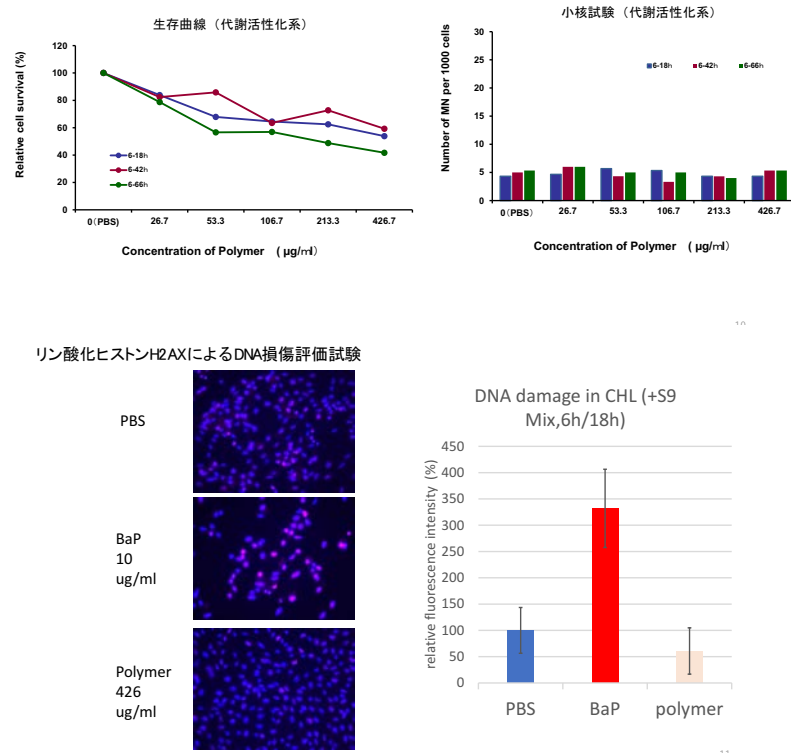


図 2 CHL/IU 細胞の結果

A:連続処理法 B:短時間処理法 C:代謝活性化系短時間処理法

令和元年度労災疾病臨床研究事業費補助金
「架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物の粉体を取り扱う労働者に発生した
呼吸器疾患に関する研究（190301-01）」
分担研究報告書

抗架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物抗体の間接蛍光抗体法による細胞染色

研究分担者 与五沢真吾（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座 講師）

【研究要旨】

抗架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（以下、架ア水ポリマー）ウサギポリクローナル抗体を用いて、間接蛍光抗体法により架ア水ポリマーに曝露された培養細胞を染色し観察した。マクロファージ様に分化誘導させたヒト単球由来細胞 THP-1 では架ア水ポリマー曝露によりシグナルの増強がみられたが、ヒト肺胞上皮Ⅱ型細胞様株細胞 A549 ではみられなかったことから、架ア水ポリマーが貪食されて細胞内に蓄積した可能性が考えられた。

A. 研究目的

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（以下、架ア水ポリマー）は肺線維化を生じさせることが当研究室により明らかにされたが、架ア水ポリマーが細胞にどのようなにはたらくのかについてはまだ不明な部分が多い。そこで、当研究室で作出された抗架ア水ポリマー抗体を用いて、架ア水ポリマーの細胞への取り込みがみられるかどうかを検討した。細胞はヒト肺胞上皮Ⅱ型細胞様細胞 A549 と、ヒト単球由来 THP-1 を Phorbol 12-myristate 3-acetate (PMA)によりマクロファージ様へ分化させた細胞を用いた。

B. 研究方法

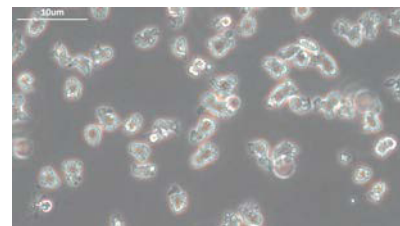
1) A549 への架ア水ポリマーのばく露

ヒト肺胞上皮Ⅱ型細胞様細胞 A549 は（国研）医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。培養には DMEM/10%FBS を用いた。カバースリップを入れた well に播種し、翌日、超音波破碎機を用いて PBS に溶解させた架ア水ポリマーを 500 μ g/ml で一晩ばく露させた。対照群には等量の PBS を添加した。

2) THP-1 の分化誘導、架ア水ポリマーのばく露

ヒト単球由来 THP-1 は（国研）医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。培養には RPMI1640/10%FBS を用いた。分化誘導は Denholm, EM らの論文を参考にして行った。THP-1 は通常培養では浮遊しているが、カバースリップを入れた well に播種し翌日 1 μ M PMA で処理し 3 日間培養すると、ほとんどの細胞

A control



B PMA 3日間処理



図 1 THP-1 細胞の PMA による分化誘導
A:コントロール B:PMA 1 μ M 処理 3 日後

がカバースリップに接着し、仮足を伸ばして形態の変化が観察された (図 1)。翌日、超音波破砕機を用いて PBS に溶解させた架ア水ポリマーを 500 μ g/ml で一晩ばく露させた。対照群には等量の PBS を添加した。

3) 間接蛍光抗体法による染色

細胞が播種されたカバースリップを PBS で洗浄し、4%パラフォルムアルデヒドで固定した。PBS で洗浄後、0.5% Triton-X100/ PBS で 5 分処理後、再び PBS で洗浄し、1% BSA 含 PBST (PBS + 0.1% Tween 20) で 30 分ブロッキングを行なった。その後、当研究室で作出された抗架ア水ポリマーウサギポリクローナル抗体 (抗体精製方法の詳細は木戸・吉岡の研究分担報告書 (本別添 p.5~7) を参照のこと) を 20 倍に希釈し、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、2 次抗体として Alexa Fluor 488 結合抗ウサギ IgG (A11008、サーモフィッシャー社) を 1 時間反応させた。洗浄後、細胞核 (DNA) を DAPI で染色して封入し、蛍光顕微鏡 (オールインワン BZ-9000、キーエンス社) で撮影した。撮影条件は全て同一の条件 (緑色蛍光観察時 1/6sec.、青色蛍光 (DAPI) 観察時 1/2sec.、位相差観察時 1/8sec.) で行った。なお、自家蛍光を検討する目的で抗体を入れない群、二次抗体のバックグラウンドを検討する目的で、一次抗体を入れない群も対照群として同様に施行したが、上記条件ではシグナルが確認できない程低レベルであった。

C. 研究結果

1) A549 細胞の結果

架ア水ポリマー処理、非処理に関わらず同じように染色された (図 2)。

2) THP-1 細胞の結果

架ア水ポリマー処理群で、非処理群よりも強く染色される細胞が観察された (図 3)。

D. 考察

A549 細胞では control の架ア水ポリマー非処理群においても、処理群と同様の染色パターンが観察された (図 2) ことから、架ア水ポリマーに依存しない非特異的な反応によるものであると考えられる。それに対し、PMA 誘導 THP-1 細胞については、架ア水ポリマー処理群でシグナルの強い細胞が多く観察された (図 3) ことから、架ア水ポリマーに特異的なシグナルが検出されたと考えられる。PMA 誘導 THP-1 はマクロファージ様に分化誘導されるの

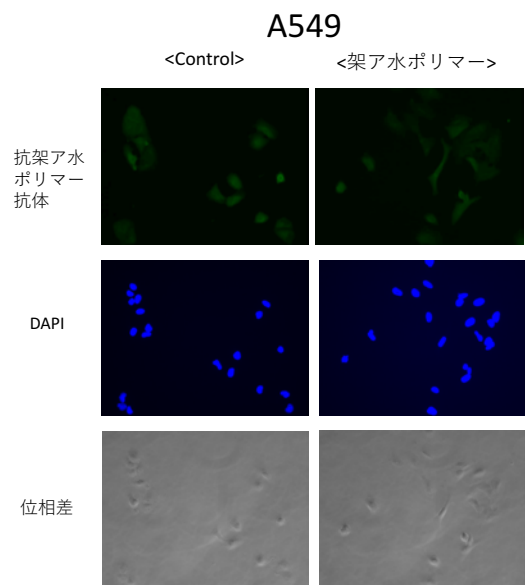


図 2 A549 細胞の結果

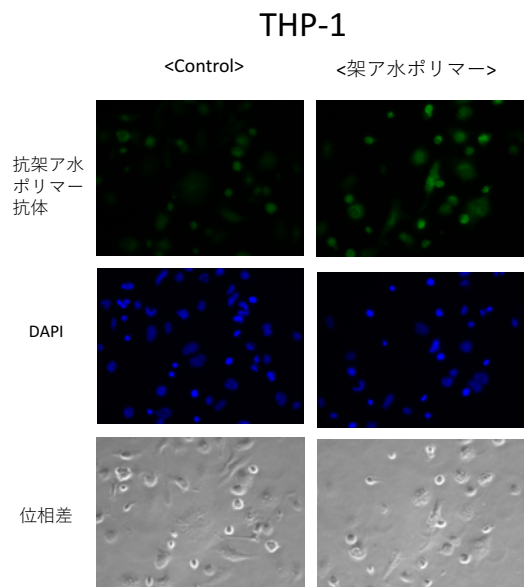


図 3 THP-1 細胞の結果

で、その貪食能により細胞内に取り込まれた架ア水ポリマーが検出された可能性が考えられる。

一方で、A549 や THP-1 の架ア水ポリマー非処理群で観察されたシグナルは細胞の自家蛍光や二次抗体のバックグラウンドレベルより明らかに強いため、架ア水ポリマー抗体に依存したシグナルであると考えられ、本抗体が架ア水ポリマー以外の抗原に非特異的に結合する性質を有していることを示しており、注意が必要である。架ア水ポリマーがマクロファージに貪食され細胞内に蓄積する可能性については、本研究結果だけでなく、標識した架ア水ポリマーを用いるなどの方法で、今後も検証が必要であると考えられる。

E. 結論

抗架ア水ポリマー抗体を用いて架ア水ポリマー処理/非処理細胞における免疫染色を行ったところ、架ア水ポリマー処理をしたマクロファージ用 THP-1 細胞でシグナルが増強されたことから、架ア水ポリマーはマクロファージの貪食により処理されると考えられた。

参考文献

1. Denholm EM, Stankus GP. Changes in the expression of MCP-1 receptors on monocytic THP-1 cells following differentiation to macrophages with phorbol myristate acetate., *Cytokine* 7 (5) (1995) 436–40.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					