

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 2 年度 総括研究報告書

研究代表者 矢寺 和博

令和 3 (2021) 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	----- 1
研究代表者氏名 矢寺 和博	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 8

令和 2 (2020) 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(200101-01)」
総括研究報告書

研究代表者 矢寺 和博 (産業医科大学 医学部 呼吸器内科学 教授)

【研究要旨】アクリル酸系ポリマーの基本型である、もっともシンプルな構造の「非架橋型のポリアクリル酸」を用いて、アクリル酸系ポリマーの基本構造の肺障害への関与について実験的検証を行った。また、物理化学的特性を決定する主要な因子のひとつである分子量の違いによる肺障害の程度についても併せて検討した。

- ・ RAFT 重合により、分子量が異なる非架橋型のポリアクリル酸 (ポリマー①、②) を合成し、GPC-MALS を用いて、分子量 (Mw) と慣性半径 (Rg) を測定した。併せて、市販の架橋型のポリマー (ポリマーA) および分子量が小さい非架橋型のポリマー (ポリマーB) についても同様の測定を行った。
- ・ 研究チームで合成したポリマーのうち、分子量大のポリアクリル酸をポリマー①、分子量小のポリアクリル酸をポリマー②とした。
- ・ ポリマー①、②を蒸留水で懸濁し、Fischer 雄性ラット 12 週齢に気管内注入した。
- ・ ポリマー①、②とも、低用量(0.2 mg/rat)および高用量(1.0 mg/rat)で気管内注入した。陰性対照群には蒸留水を気管内注入した。気管内注入後、定期的に解剖を行い、肺内の炎症や線維化を検討した。
- ・ ポリマー①注入群は、注入の 3 日、1 週間、1 か月後に解剖を行った。気管支肺胞洗浄液や肺組織では、用量依存性に著明な好中球性の炎症所見を認め、持続した。同時に肺組織へのコラーゲン沈着 (線維化) も認め、観察期間中、経時的に増悪した。
- ・ ポリマー②注入群は、注入の 3 日、1 週間後に解剖を行った。ポリマー①と同様に用量依存性の著明な好中球性の炎症所見を認め、持続した。同時に肺組織へのコラーゲン沈着 (線維化) も認め、観察期間中、経時的に増悪した。
- ・ ポリマー①注入群とポリマー②注入群との比較では、ポリマー①注入群のほうが炎症および線維化が強い傾向にあった。

以上より、実験に使用したポリアクリル酸は、肺に強い炎症とそれに続く線維化を引き起こした。分子量の違いが肺障害の程度に関与することが示唆された。

研究分担者氏名・所属研究機関名および所属研究機関における職名

- ・ 和泉 弘人・産業医科大学 産業生態科学研究 所・准教授
- ・ 友永 泰介・産業医科大学 産業生態科学研究 所・助教
- ・ 山崎 啓・産業医科大学・医学部・講師
- ・ 櫻井 和朗・北九州市立大学・環境技術研究 所・教授
- ・ 秋葉 勇・北九州市立大学・国際環境工学 部・教授
- ・ 望月 慎一・北九州市立大学・国際環境工学 部・准教授

A. 研究目的

気管内注入試験・吸入ばく露試験や物理化学的特性の分析により、「架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物」(以下、アクリル酸系ポリマー)の 1) 肺障害性(特に線維化能や腫瘍能)の評価、2) 肺障害性に関わる物理化学的特性の特定、3) 肺障害背の機序の解明を行い、ヒトの臨床所見・経過等との整合性を検証し、ばく露と疾病発症との因果関係を解明することを目的とする。

平成 29(2017)年 4 月に有機高分子化合物であるアクリル酸系ポリマーの粉体による肺疾患が発生したと厚生労働省から発表があり、平成 31(2019)年には労災認定が行われた。肺疾患発症者はいずれも同じ作業場において、本物質を主成分とする吸入性粉じんにより日常的に高濃度でばく露し、多くがばく露開始から 2 年前後の短期間に、じん肺を含むさまざまな肺疾患を発症していたことが判明している。

じん肺とは粉じんを吸入することによって肺に生じた線維増殖性変化を主体とする疾病であるが、これまで報告されたじん肺症例の多くは無機粉じんによるものである。さらに、通常のじん肺はばく露から 20 年程度以上かけて緩徐に進行する場合が多いことに対し、本物質によるじん肺は、驚くべきことに、ばく露期間が 2 年前後という非常に短い期間で発症しており、通常のじん肺よりも著しく進行が早い。

アクリル酸系ポリマーは、単量体(モノマー)の種類、分子量、架橋構造の有無や程度、粒径などを調整し特性を制御することにより、医薬品の中間体などを含め様々な用途で国際的に広く用いられているが、これまでに肺への有害性の報告はない。

このような状況を鑑みると、本物質の肺障害性を検証し、研究成果についての情報を社会に提供することで、産業医学的介入や啓発による疾病の予防を徹底させること、本物質による肺疾患の発症機序を解明することが喫緊の課題と言える。

そこで、令和 2(2020)年度は、肺障害を起こしたアクリル酸系ポリマーの特性と生理活性との相関を把握するため、分子量、粒径、架橋、アクリル酸系ポリマーの側鎖の化学種について正確な測定ができるような方法の確立を目指すとともに、それらの物性を制御したアクリル酸系ポリマーの合成を行った。そして、アクリル酸系ポリマーの基本型、つまり、もっともシンプルな構造である「非架橋型のポリアクリル酸」を用いて、アクリル酸系ポリマーの基本構造の肺障害への関与について実験的検証を行った。また、物理化学的特性を決定する主要な因子のひとつである分子量の違いによる肺障害の程度についても検討した。

B. 研究方法

- ・ 北九州市立大学グループにおいて、分子量が異なる非架橋型のポリアクリル酸を、分子量が制御でき、分子量分布の狭いポリマーを合成することができる RAFT 重合により合成した。合成したポリマーの分子量(Mw)と慣性半径(Rg)とを GPC-MALS を用いて測定した。また、架橋構造の有無や分子量による肺障害性の相関を調査するために、市販の架橋が施されたポリマー、分子量の小さい直鎖状のポリマーに対しても GPC-MALS 測定により Mw と Rg とを決定した。物性評価を行ったポリマーは、産業医科大学グループでのラットへの気管内注入試験へ供された。
- ・ 申請者らが入手している労働者の情報(当該物質の使用頻度やばく露状況、物質特性など)やこれまでの予備検討の結果なども考慮し、気管内注入を行うポリマーの条件を選定した。
- ・ 産業医科大学グループにおいて、北九州市立大学グループで合成されたポリマーのうち 2 種類のポリマーを用いて、ラットへの気管内注入試験を行った。気管内注入後、定期的に、3D マイクロ CT、気管支肺胞洗浄および肺組織採取を行った。
- ・ なお、気管内注入試験に用いたポリアクリル酸のうち、分子量が大きいほうをポリマー①、小さいほうをポリマー②とする。

《気管内注入試験》

- 1) ポリマー①、②は蒸留水で懸濁し、0.2 mg/rat, 1.0 mg/rat の用量で気管内注入した。対照群には蒸留水を注入した。
- 2) 投与匹数は、観察各ポイントにおいて、1 群あたり 5 匹とした。
- 3) ポリマー①は気管内注入の 3 日後、1 週間後、1

か月後に、ポリマー②は気管内注入後の3日後、1週間後に、それぞれ3DマイクロCTを行い、その後、解剖をし、気管支肺胞洗浄、肺の摘出を行った。

- 4) 気管支肺胞洗浄液：細胞数、細胞分画およびLDH活性を測定した。

肺組織：病理標本にて、炎症や線維化などの評価を行った。

(倫理面での配慮)

本研究を実施するにあたり産業医科大学動物実験委員会の審査承認を受けた。実験時には、必要に応じて適切な麻酔を行い、十分な麻酔深度に達していることを確認してから行った。

C. 研究結果

- ポリアクリル酸の分子量と慣性半径の測定結果を次の表1に示す。RAFT重合により合成した直鎖状のポリアクリル酸をポリマー①、架橋構造を持つポリアクリル酸をポリマーA、分子量の小さい非架橋型のポリアクリル酸をポリマーBとした。GPCはShodexのGF-7Mの2本カラムを使用し、溶離液は0.1 M 重炭酸バッファー(pH=10.1)を使用した。サンプルは、それぞれ、0.1 M 重炭酸バッファー(pH=10.1)に溶解させた後に一度2 NのNaOH水溶液を加え、強アルカリ性にした後に1 NのHCl水溶液を加え中性に戻したものを使用した。

- GPC-MALS測定を行ったサンプルをラット肺に気管内注入した1週間後の肺病理組織の一部を図1に示す。比較的分子量が大きいポリマー①、ポリマーAを注入した肺では強い炎症が引き起こされたが、分子量が小さいポリマーBを注入した肺では炎症の程度は弱かった。

- 次に、ポリマー①とポリマー②の気管内注入試験の結果を示す。

- ・ ポリマー①を注入した肺では、用量依存性に、強い炎症とそれに引き続く線維化が起き、観察期間中持続した。

- 1) 3DマイクロCT：注入後3日、1週間では浸潤影およびすりガラス影を認めた。注入後1か月ではすりガラス影を認めた(図2(A))。

- 2) 気管支肺胞洗浄液：炎症の指標である、LDH活性、総細胞数、好中球数および好中球割合の増加などが起こった。注入後3日および1週間では著しい増加を認めた。注入後1か月では3日・1週間と比較すると各パラメーターは減少していたものの、高用量群においては

対照群と比較して有意な増加が持続していた(図3(A))。

- 3) 肺組織：肺胞腔内への著明な炎症細胞浸潤を認め、観察期間中持続した(Hematoxylin Eosin染色(以下HE染色))。同時に、肺組織へのコラーゲン沈着(線維化)も認め、観察期間中、経時的に増悪した(Masson's Trichrome染色(以下、MT染色)(図4(A))。

- ・ ポリマー②を注入した肺では、用量依存性に、強い炎症とそれに引き続く線維化が起き、観察期間中持続した。

- 1) 3DマイクロCT：注入後3日、1週間では浸潤影およびすりガラス影を認めた(図2(B))。

- 2) 気管支肺胞洗浄液：炎症の指標である、LDH活性、総細胞数、好中球数、好中球割合の増加などが起こった。注入後3日および1週間では著しい増加を認めた(図3(B))。

- 3) 肺組織：肺胞腔内への著明な炎症細胞浸潤を認め、観察期間中持続した(HE染色)。同時に、肺組織へのコラーゲン沈着(線維化)も認め、観察期間中、経時的に増悪した(MT染色)(図4(B))。

- ・ 炎症および線維化の程度はポリマー①のほうが、ポリマー②よりも強い傾向にあった(図4(A)、(B))。

ポリマー①、ポリマー②を注入したいずれの群においても、引き続き、観察を継続している。

D. 考察

実験に使用したポリマー①および②は、いずれも用量依存性に肺に持続炎症・線維化を来した。ポリマー①と②とでは、分子量がより大きいポリマー①のほうが肺の炎症や線維化が強い傾向があり、今回の検討では、分子量の違いが肺障害の程度に関与することが示唆された。

われわれは、今回、気管内注入試験によって、ポリマー①および②の肺への有害性評価を行った。気管内注入試験は、ボラス効果による一過性の急性炎症が惹起される可能性があるものの、長期間の観察を行い、持続炎症の有無をみることで、肺への有害性評価のスクリーニングの手段として有用である。

肺における持続炎症は、線維化や癌化などの不可逆性病変の前段階と考えられており、不可逆性病変の形成に重要である。実際に、既知の高肺障害性物質である結晶質シリカや酸化ニッケルナノ粒子などでは

持続炎症を呈し、低肺障害性物質である酸化チタンナノ粒子などでは一過性の炎症のみに留まる。

今回の実験で用いたポリマー①および②は、いずれも、肺に著しい炎症を起こし、その炎症は1週間～1か月持続した。同時に線維化も引き起こした。これらのことから、ポリマー①および②は、肺への高い障害性を持つことが示唆された。また、より分子量が大きいポリマー①のほうが、ポリマー②よりも強い炎症や線維化を引き起こす傾向があり、ポリアクリル酸の肺障害の程度に分子量が関与している可能性が考えられた。

今後、今回の実験のより長期間の観察や詳細な解析、吸入ばく露試験等を行うことで、アクリル酸系ポリマーの肺障害性について、更なる検討を行うことが、産業医学的に重要であると考えている。

E. 結論

今回の実験に用いたポリマー①および②は、用量依存的に、肺に持続炎症と線維化を引き起こした。また、分子量がより大きいポリマー①のほうが、炎症や線維化の程度が強い傾向があり、分子量の違いが肺障害の程度に関与することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
別紙4参照

2. 学会発表
櫻井和朗. 多糖拡散複合体を用いた核酸医薬の免疫系細胞への選択的デリバリー 第36回日本DDS学会 学術集会 神戸学院大学 2020年8月28日

Kazuo Sakurai. Characterizing Self-Assembled Nanoparticles of Drug Delivery by use of Solution Scattering Techniques. 高分子学会 関東支部企画 GPS-K2020 Web 開催 2021年1月12日

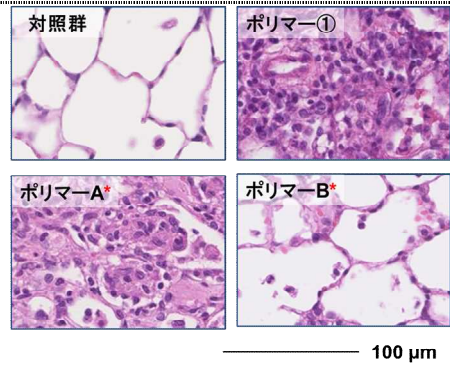
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用指南登録
なし
3. その他
なし

表 1 各サンプルの GPC-MALS 測定の結果

Sample	M_w (g/mol)	R_g (nm)	M_w / M_n
ポリマー①	6.97×10^5	83.7	1.22
ポリマーA	5.13×10^5	69.5	1.46
ポリマーB	3.24×10^4	14.9	1.72

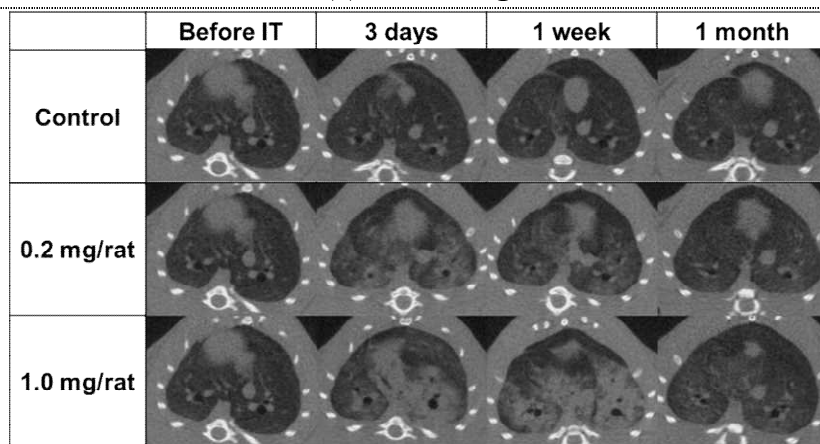
図 1 サンプル注入後の肺病理組織



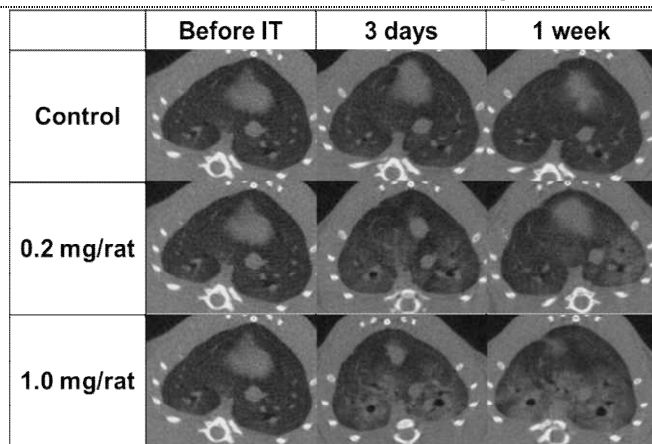
*別プロジェクトによる参考所見

図 2 3D マイクロ CT

(A) ポリマー①



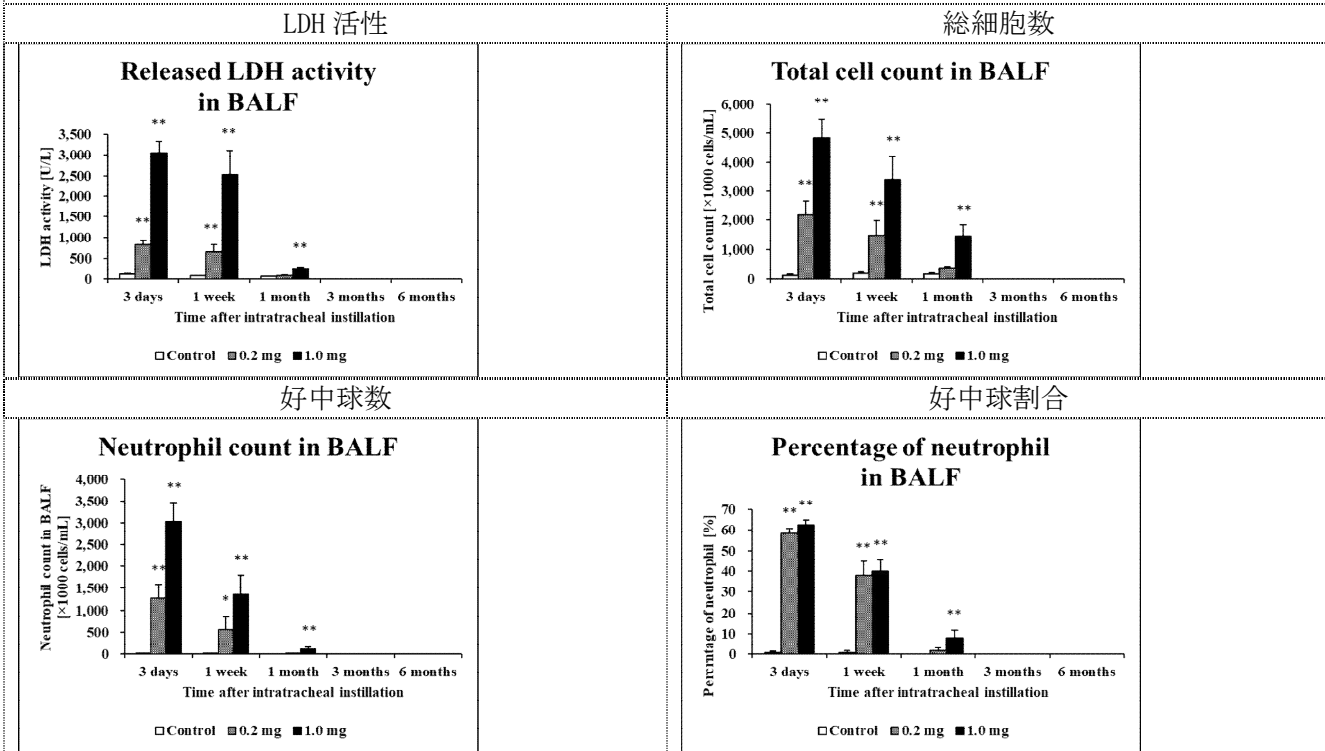
(B) ポリマー②



Before IT : Before intratracheal instillation (気管内注入前)

図3 気管支肺胞洗浄液の細胞分画測定

(A) ポリマー① (3 months および 6 months は観察期間経過待ち)



(B) ポリマー② (1 month、3 months および 6 months は観察期間経過待ち)

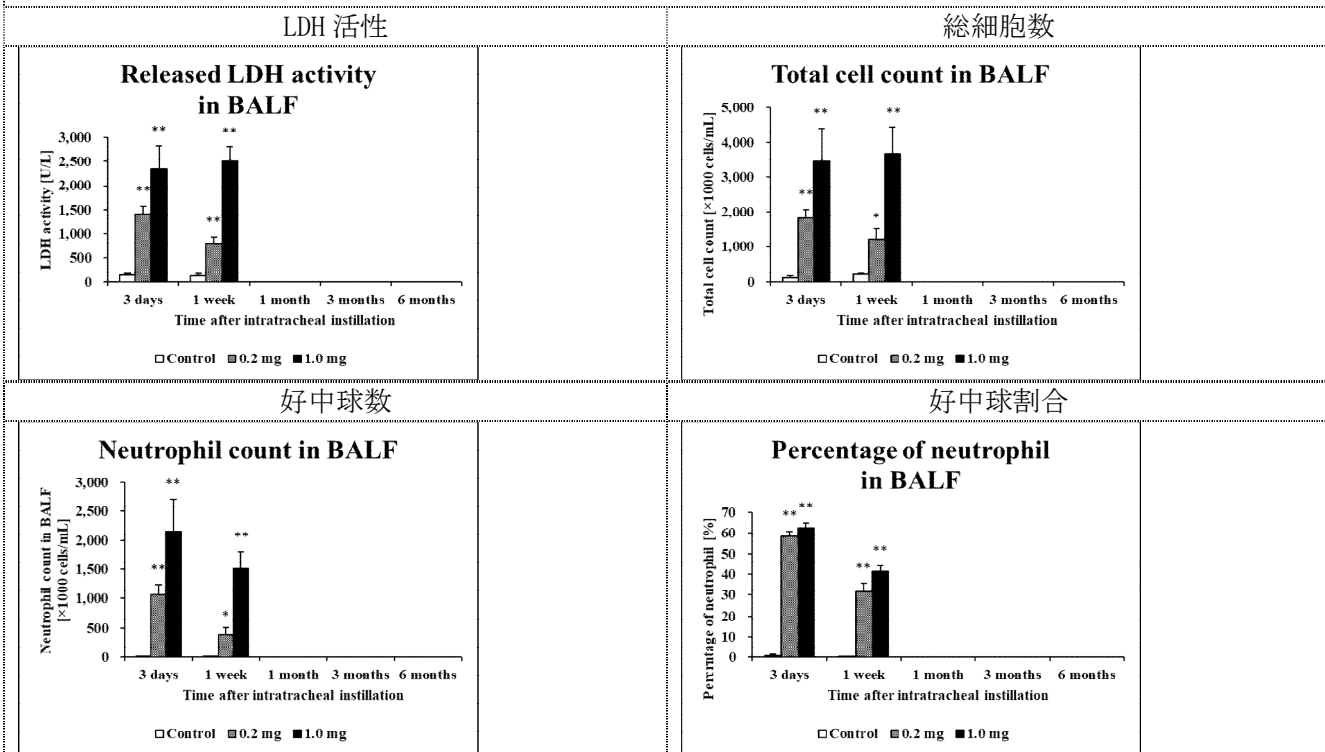
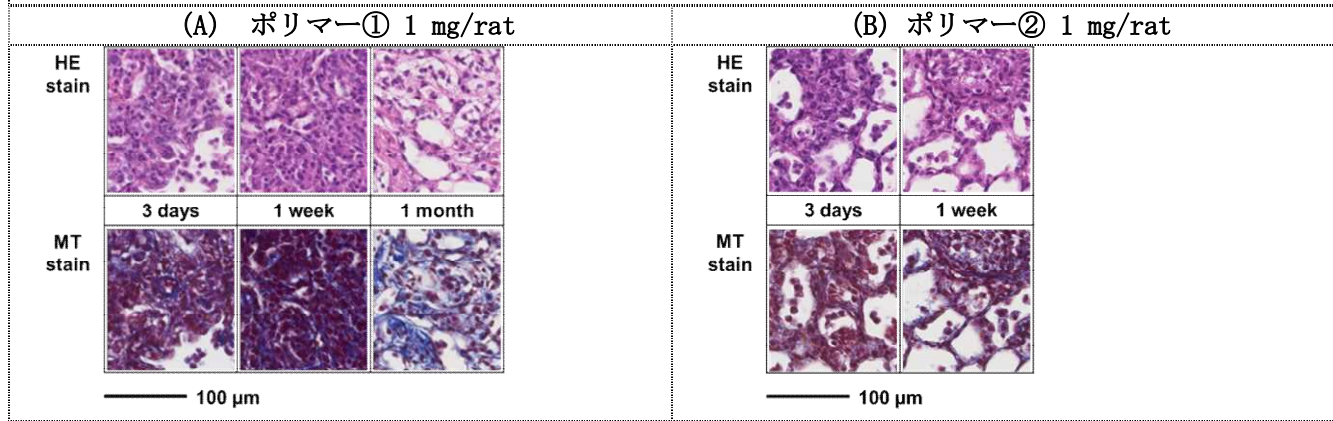


図4 肺病理組織



別紙4 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishida C, <u>Izumi H</u> , <u>Tomonaga T</u> , Takeshita JI, Wang KY, <u>Yamasaki K</u> , <u>Yatera K</u> , Morimoto Y.	Predictive Biomarkers for the Ranking of Pulmonary Toxicity of Nanomaterials.	Nanomaterials (Basel).	10 (10)	2032	2020
<u>Tomonaga T</u> , <u>Izumi H</u> , Oyabu T, Lee BW, Kubo M, Shimada M, Noguchi S, Nishida C, <u>Yatera K</u> , Morimoto Y.	Assessment of Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractants as Biomarkers for Prediction of Pulmonary Toxicity of Nanomaterials.	Nanomaterials (Basel).	10 (8)	1563	2020
<u>Tomonaga T</u> , <u>Izumi H</u> , Yoshiura Y, Marui T, Wang KY, Nishida C, <u>Yatera K</u> , Morimoto Y.	Long-term observation of pulmonary toxicity of toner with external additives following a single intratracheal instillation in rats.	J Occup Health	62 (1)	e12146	2020
Sakamoto S, Kataoka K, Kondoh Y, Kato M, Okamoto M, Mukae H, Bando M, Suda T, <u>Yatera K</u> , Tanino Y, Kishaba T, Hattori N, Taguchi Y, Saito T, Nishioka Y, Kuwano K, Kishi K, Inase N, Sasaki S, Takizawa H, Johkoh T, Sakai F, Homma S; Diffuse Lung Diseases Research Group of the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.	Pirfenidone plus inhaled N-acetylcysteine for idiopathic pulmonary fibrosis: a randomised trial.	Eur Respir J	57 (1)	2000348	2021
<u>Yatera K</u> , Mukae H.	Drastic change in the lung microbiome induced by mechanical ventilation.	Respir Investig.	S2212-5345 (20)	30116-30117	2020
Naito K, Noguchi S, <u>Yatera K</u> , Kawanami T, <u>Yamasaki K</u> , Fukuda K, Ikegami H, Akata K, Kido T, Sakamoto N, Saito M, Mukae H.	Coinfection With Multiple Nontuberculous Mycobacteria as a Possible Exacerbating Factor in Pulmonary Nontuberculous Mycobacteriosis: Clone Library Analysis Using the 16S Ribosomal RNA Gene.	Chest	8 (6)	2304-2313	2020
Hata R, Kawanami T, Noguchi S, Fukuda K, Akata K, <u>Yamasaki K</u> , Saito M, <u>Yatera K</u> , Mukae H.	Clinical characteristics of patients with bacterial pleuritis in the presence of Streptococcus anginosus group and obligate anaerobes detected by clone library analysis.	Clin Respir J	14 (3)	267-276	2020

Rintaro Takahashi, Shota Fujii, Isamu Akiba, <u>Kazuo Sakurai</u>	Scattering Form Factor of Block Copolymer Micelles with Corona Chains Discretely Distributed on the Core Surface	The Journal of Physical Chemistry B	124 (28)	6140-6146	2020
Arimura-Omori M, Kiyohara C, Yanagihara T, Yamamoto Y, Ogata-Suetsugu S, Harada E, Hamada N, Tsuda T, Takata S, Shimabukuro I, Nagata N, <u>Yatera K</u> , Torii R, Okamoto M, Fujita M, Nakanishi Y.	Association between Telomere-Related Polymorphisms and the Risk of IPF and COPD as a Precursor Lesion of Lung Cancer: Findings from the Fukuoka Tobacco-Related Lung Disease (FOLD) Registry.	Asian Pac J Cancer Prev	21 (3)	667-673	2020
Jun Matsuno, Takuma Kanamaru, Koichi Arai, Rena Tanaka, Ji Ha Lee, Rintaro Takahashi, <u>Kazuo Sakurai</u> , Shota Fujii	Synthesis and characterization of nanoemulsion-mediated core crosslinked nanoparticles, and in vivo pharmacokinetics depending on the structural characteristics	Journal of Controlled Release	324	405-412	2020
Shota Fujii, Rika Miyake, Liliana de Campo, Ji Ha Lee, Rintaro Takahashi, <u>Kazuo Sakurai</u>	Structural Polymorphism of Resorcinarene Assemblies	Langmuir	36 (22)	6222-6227	2020
Shota Fujii, Sotaro Kuroyanagi, Naohiko Shimada, Jun Matsuno, Ji Ha Lee, Rintaro Takahashi, Atsushi Maruyama, <u>Kazuo Sakurai</u>	Bundling Process of Citrulline Polypeptides upon UCST-Type Phase Separation	The Journal of Physical Chemistry B	124 (20)	4036-4043	2020
Rena Tanaka, Koichi Arai, Jun Matsuno, Miyo Soejima, Ji Ha Lee, Rintaro Takahashi, <u>Kazuo Sakurai</u> , Shota Fujii	Furry nanoparticles: synthesis and characterization of nanoemulsion-mediated core crosslinked nanoparticles and their robust stability in vivo	Polymer Chemistry	11 (27)	4408-4416	2020
Rintaro Takahashi, Shotaro Miwa, Carsten Rössel, Shota Fujii, Ji Ha Lee, Felix H Schacher, <u>Kazuo Sakurai</u>	Polymersome formation induced by encapsulation of water-insoluble molecules within ABC triblock terpolymers	Polymer Chemistry	11 (20)	3446-3452	2020

Rintaro Takahashi, Kiyomasa Doi, Shota Fujii, <u>Kazuo Sakurai</u> .	Flower Necklaces of Controllable Length Formed From N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide-Based Amphiphilic Statistical Copolymers	Langmuir	36 (39)	11556-11563	2020
Kazuki Sumiya, Takuya Matsunaga, Motoko Tanaka, Shinichi Mochizuki, <u>Kazuo Sakurai</u>	Oligo-DNA Stoichiometrically Binds β -1, 3-Glucan with the Best Fit Length	Biomacromolecules	21 (12)	4823-4834	2020
Van TH Doan, Shin Takano, Ngoc Anh T Doan, Phuong TM Nguyen, T Nguyen Van Anh, Huong TT Pham, Koji Nakazawa, Shota Fujii, <u>Kazuo Sakurai</u> .	Anticancer efficacy of cyclodextrin-based hyperbranched polymer nanoparticles containing alpha-mangostin	Polymer Journal	53	481-492	2021
Shin Takano, Waliul Islam, Kohji Nakazawa, Hiroshi Maeda, Kazuo Sakurai, Shota Fujii.	Phosphorylcholine-Grafted Molecular Bottlebrush–Doxorubicin Conjugates: High Structural Stability, Long Circulation in Blood, and Efficient Anticancer Activity	Biomacromolecules	22 (3)	1186-1196	2021