

総合研究報告書表紙レイアウト

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～4年度 総合研究報告書

研究代表者 矢寺 和博

(令和) 5 (2023) 年 3月

総合研究報告書目次レイアウト

目 次	
I. 総合研究報告 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
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	154

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)」
(総合)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肺障害性を検討するために、1)種々のポリマーの物性評価および合成、2)気管内注入試験(ラット)、3)吸入ばく露試験(ラット・マウス)を行い、以下の結果・知見を得た。

- ① 1)分子量 75.3 万と 25.8 万の非架橋型ポリアクリル酸では、同程度の高い肺の炎症能や線維化能を有し、分子量が数十万レベルの比較的大きい非架橋型ポリアクリル酸は肺障害性があることを認めた。
2)架橋型ポリアクリル酸(架橋度 0.1%以下)と非架橋型のポリアクリル酸では、架橋型ポリアクリル酸(架橋度 0.1%以下)のほうが、細胞傷害性や線維化が強かったことから、0.1%以下の架橋度では線維化などの肺障害性が増強することが示唆された。
- ② 13 週間の架橋型ポリアクリル酸の吸入ばく露試験(ラット)では、最大濃度 2.0 mg/m³にて肺組織の炎症や線維化が観察された。これらの所見は 1 ヶ月まで持続したが、その後消退した。本試験における NOAEL は 0.2 mg/m³であった。
- ③ クラブ細胞除去マウスへの 13 週間の架橋型ポリアクリル酸の吸入ばく露試験では、クラブ細胞の除去で、架橋型ポリアクリル酸による炎症や線維化が増強した。これらの結果から、クラブ細胞は、炎症や線維化を抑制する役割を有することが示唆された。

● 研究内容の概要を示す。

1) **ばく露物質の物性評価**

- ・ 複数のアクリル酸系・非アクリル酸系ポリマーの物理化学的特性を評価し、労働者の情報や我々がこれまでに行ってきた実験の結果なども考慮し、下記をばく露物質に選定した。ポリマー①～④は気管内注入試験に、ポリマーA は吸入曝露試験に用いた。

サンプル	重量平均分子量(Mw)	慣性半径(Rg)(nm)	備考
ポリマー① (非架橋型ポリアクリル酸)	7.53×10 ⁵	74.9	研究チーム内で合成
ポリマー② (非架橋型ポリアクリル酸)	2.58×10 ⁵	42.1	研究チーム内で合成
ポリマー③ (ポリエチレンオキシド)	7.63×10 ⁵	75.1	市販品
ポリマー④ (非架橋型ポリアクリル酸ナトリウム)	6.17×10 ⁵	60.1	研究チーム内で合成
ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)	7.65×10 ⁵	68.7	市販品

- ・ 吸入ばく露試験に用いたポリマーA の空気動学的直径(MMAD)は、2.0 μm (設定濃度 0.2 mg/m³)、2.1 μm (設定濃度 2.0 mg/m³)であった。

2) **気管内注入試験**

- ・ ポリマー①～④を蒸留水に懸濁し、2 用量でラットに気管内注入した。対照群には、分散媒である蒸留水を投与した。注入 3 日後、1 週後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後に 3D マ

イクロ CT を撮影し、その後、解剖を行い、気管支肺胞洗浄液や肺組織を採取した。アクリル酸系ポリマーであるポリマー①、②および④では、気管内注入後に強い炎症が起きた。炎症は1ヶ月ほど持続した。3ヶ月以降は炎症は消退傾向であった。また、ポリマー①、②および④のいずれのポリマーにおいても線維化を認めたが、ポリマー①と②では観察期間(6ヶ月間)を通して線維化が持続したのに対し、ポリマー④では線維化は1ヶ月ほど持続した後、3ヶ月以降は消退傾向であり、6ヶ月後には消失した。いっぽう、非アクリル酸系ポリマーであるポリマー③では、観察期間(6ヶ月間)を通して軽度の炎症を認めたが、線維化はほぼ皆無であった。これらの所見はいずれも用量依存性であった。

- ・ ポリマー①、②および④では、気管支肺胞洗浄液中で、好中球やマクロファージを主体とする炎症細胞、細胞傷害性のマーカーである LDH、好中球走化性因子である CINC-1 や CINC-2 が、対照群と比較して、有意な増加が1ヶ月程度持続していた。また、肺組織中の HO-1 も、対照群と比較して、有意な増加が持続していたが、HO-1 値は、ポリマー①、②のほうが、ポリマー④と比較して、高値であり、有意な増加の持続期間も、ポリマー①、②のほうが、ポリマー④と比較して、長かった。これらの所見はいずれも用量依存性であった。
- ・ 我々がこれまでに行ったポリマーAを気管内注入した肺組織を用いて行った mRNA のマイクロアレイでは、アポトーシスや PI3K-AKT 経路に関連する遺伝子発現の上昇を認めた。

3) <肺組織の遺伝子解析>

- ・ アクリル酸系ポリマーの肺障害性と架橋の関係を調べるために、架橋以外の物理化学的特性の差異がない、異なるポリマーを用いて、肺障害性の比較や遺伝子発現のプロファイル調べた。
- ・ 非架橋型ポリアクリル酸であるポリマー①を気管内注入した肺組織と、これまで我々が行った架橋型ポリアクリル酸であるポリマーA(架橋 0.1%以下)を気管内注入した肺組織を用いて、肺障害性を比較した。その結果、ポリマーAは、ポリマー①よりも、細胞傷害性や線維化が強く、0.1%以下の架橋度では線維化などの肺障害性が増強することが示唆された。
- ・ ポリマーAを気管内注入した肺組織を用いた mRNA のマイクロアレイでは、アポトーシスや PI3K-AKT 経路に関連する遺伝子発現の上昇を認めた。

4) 吸入ばく露試験

<ラット>

- ・ 市販の架橋型ポリアクリル酸(ポリマーA)をラットに吸入ばく露した。設定濃度は低濃度群 0.2 mg/m³・高濃度群 2.0 mg/m³とし、対照群には大気を吸入させた。ばく露時間は6時間/日×5日間/週、ばく露期間は5日間または13週間とした。
- ・ 5日間の吸入ばく露試験では、ばく露群において、濃度依存性に一過性の炎症が起きたが、1ヶ月後には消退した。線維化は認めなかった。
- ・ 13週間の吸入ばく露試験では、高濃度群において、炎症が1ヶ月程度持続したが、3ヶ月目以降は消退傾向であった。線維化は軽微なものが1ヶ月程度持続したが、3ヶ月以降はほぼ消退し、6ヶ月では消失した。低濃度群でも炎症は起きたが軽度でかつ一過性であった。線維化はほぼ皆無であった。

<マウス(クラブ細胞除去モデル含む)>

- ・ 市販の架橋型ポリアクリル酸(ポリマーA)をマウスに吸入ばく露した。設定濃度は低濃度群 0.2 mg/m³、高濃度群 2.0 mg/m³とし、対照群には大気を吸入させた。ばく露時間は6時間/日×5日間/週、ばく露期間は13週間とした。各群において、クラブ細胞除去なし群とクラブ細胞除去あり群を設けた。吸入ばく露終了の3日後、1ヶ月後、3か月後、6ヶ月後に解剖を行った。

- ・ クラブ細胞の除去は、ナフタレン 200 mg/kg(コーン油に溶解)を、吸入ばく露開始の前日から3週間毎に腹腔内注射を行う方法を用いて行った。クラブ細胞除去なし群には、コーン油のみを同様のスケジュールで腹腔内注射した。
- ・ 観察期間(6ヶ月間)を通して、クラブ細胞除去あり群では、クラブ細胞除去なし群と比較して、炎症や線維化が強い傾向にあった。
- ・ クラブ細胞除去なし群では、吸入ばく露終了3日後の低濃度群と3ヶ月後の高濃度群でのみ軽度の炎症を認めた。線維化は、吸入ばく露終了1ヶ月後の低濃度群でごくわずかに認めたのみであった。
- ・ クラブ細胞除去あり群では、炎症は、対照群含めた全群で、吸入ばく露終了3日後から6ヶ月後までの間認めた。線維化は、3日後の対照群を除き、全群の各観察ポイントにおいて認めたが、全般的に軽度であった。これらの所見において、濃度依存性は一定ではなかった。

結果のまとめを以下に示す。

- 1) アクリル酸系ポリマーの肺障害性は、分子量や架橋構造、構成成分に関連する。
- 2) 架橋型ポリアクリル酸の0.2 mg/m³の吸入ばく露では肺障害性は明らかでなかった。
- 3) クラブ細胞除去によって、架橋型ポリアクリル酸による炎症や線維化が増強された。

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
- ・ 西田 千夏・産業医科大学・産業生態科学研究所・学内講師
- ・ 東 泰幸・産業医科大学・医学部・診療助教
- ・ 森本 俊規・産業医科大学・医学部・診療助教
- ・ 東 秀憲・産業医科大学・産業生態科学研究所・教授
- ・ 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。

B. 研究方法

複数のポリマーの物性を評価し、これまでに我々が行ってきた実験結果や労働者の情報などを踏まえ、実験に使用するばく露物質を選定した。また、研究チームにおいて、ポリマーの合成を行った。

気管内注入試験(非架橋型アクリル酸系ポリマー 3 種類と非架橋型非アクリル酸系ポリマー 1 種類)および吸入ばく露試験(架橋型ポリアクリル酸)を行い、肺障害性を検討した。気管内注入または吸入ばく露後、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い、各種解析を行った。

《ポリマーの合成・物性評価》

- ・ 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 RAFT 重合により合成した。RAFT 重合は、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重合法である。合成したポリマーの重量平均分子量(Mw)と慣性半径(Rg)とを、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)と多角度光散乱検出器(MALS)の組み合わせ(GPC-MALS)を用いて測定した。また、架橋構造の有無、分子量や構成成分の違い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や非アクリル酸系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。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の(分子分散されている状態)を使用した。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。
- ・ 吸入ばく露試験に用いた架橋型ポリアクリル酸(ポリマーA)の空気動力学直径(MMAD)は、ローボリュームエアーサンプラーを用いて行った。
- ・ 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、気管内注入や吸入ばく露を行うポリマーの条件を選定した。

気管内注入試験には、非架橋型ポリアクリル酸(分子量大)(ポリマー①)、非架橋型ポリアクリル酸(分子量小)(ポリマー②)、非架橋型ポリエチレンオキシド(ポリマー③)、非架橋型ポリアクリル酸ナトリウム(ポリマー④)を用いた。吸入ばく露試験には、架橋型ポリアクリル酸(ポリマーA)を用いた。

《気管内注入試験》

- 1) ポリマー①～④は、いずれも、蒸留水で懸濁し、低濃度群は 0.2 mg/rat、高濃度群は 1.0 mg/rat の用量で、F344 雄ラット 12 週齢に気管内注入した。対照群には蒸留水を注入した。
- 2) 観察各ポイントは、ポリマー①②④では、気管内注入の 3 日後、1 週間後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後および 2 年後、ポリマー③では、気管内注入の 3 日後、1 週間後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後とした。
- 3) 観察各ポイントにおいて、3D マイクロ CT(各群 3 匹)を行い、その後、解剖をし、体重および肺重量の測定、気管支肺胞洗浄、肺の摘出を行った。注入 3 日後～6 ヶ月後は 1 群あたり 5 匹を、2 年後は 1 群あたり 5～10 匹を割り当てた。
 - ・ 3D マイクロ CT 装置 (CosmoScan GX、Rigaku Co., Tokyo, Japan) の撮影条件は以下の通りである：時間 4.0 分、平均全身被曝量 161.9 mGy/スキャン、管電圧 90kV、管電流 88 μ A、FOV (視野) 60 mm (ボクセルサイズ：120 × 120 × 120 μ m)。ラットは腹臥位にし、セボフルラン (Pfizer Japan Inc., Tokyo, Japan) 吸入による麻酔下で、呼吸同期のもと、撮影を行った。画像は、吸気と呼気の両方の呼吸相で遡及的にゲート処理された。
 - ・ 解剖時は、イソフルラン (Pfizer Japan Inc., Tokyo, Japan) 吸入による麻酔下で行った。体重を測定した後、腹部大動脈を切断し、失血死させた。両肺を生理食塩水で灌流後、左主気管支をクランプした状態で、右肺に 20cmH₂O の圧力で生理食塩水を 2 回注入し、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行った。気管支肺胞洗浄液 (BALF) は自由落下により回収した。その後、右肺と左肺とを分離し、右肺は -80℃ で凍結保存し、左肺は 10 % ホルムアルデヒドを 25cmH₂O の圧力下で注入し固定し、病理組

織学的評価に使用した。

- 4) 気管支肺胞洗浄液：細胞数、細胞分画および LDH 活性、好中球走化性因子 (CINC-1、CINC-2) を測定した。
 - ・ 得られた BALF を 400 g、4℃ で 15 分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移し、保存した。細胞ペレットを多形核白血球 (PMN) バッファー (137.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.2 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 5.6 mM C₆H₁₂O₆) に懸濁して洗浄し、400 g、4℃、15 分間遠心分離した。上清を除去した後、細胞ペレットを 1mL の PMN Buffer で再度懸濁した。BALF 中の細胞数を ADAM-MC (AR BROWN CO., LTD, Tokyo, Japan) でカウントし、サイトスピンを用いてスライドグラス上に細胞を散布した。その後、スライドグラス上の細胞を固定し、Diff-Quik (Sysmex Corp., Kobe, Hyogo, Japan) で染色した後、光学顕微鏡観察下で、細胞数の測定を行った。
 - ・ BALF 上清の LDH 活性は、Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nordrhein-Westfalen, Germany) により測定した。LDH 活性は、既知の濃度のウサギ筋肉由来のリコンビナント LDH から得た標準曲線を用いて推定した。ケモカインである CINC-1 および CINC-2 は、それぞれ ELISA キット #RCN100、#RCN200 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) によって測定した。
- 5) 肺組織：病理標本にて、炎症や線維化などの評価を行った。また、蛋白を抽出し、酸化ストレスのマーカーである HO-1 を測定した。
 - ・ 肺組織の酸化ストレスの解析解剖で得られた右肺の第 3 葉を、タンパク質阻害剤カクテル (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) および cOmplete Mini (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nordrhein-Westfalen, Germany) を含む T-PER 組織タンパク質抽出試薬 (Thermo Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA) を使用して Tissue Ruptor (Qiagen, Hilden, Nordrhein-Westfalen, Germany) でホモジナイズした。得られたホモジネートを遠心分離 (20,400 g, 4℃, 10 分間) した。ホモジネート上清中のタンパク質濃度を、標準としてウシ血清アルブミンを使用して、Pierce 660nm Protein Assay Reagent (Thermo Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA) によって測定し、酸化ストレスのマーカーである HO-1 を

ELISA キット(ADI-EKS-810A (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) または (CSB-E08267r (Cusabio, Houston, TX, USA)を使用し測定した。HO-1 測定結果は、ホモジネート上清中のタンパク質濃度によって補正して、肺組織中の最終的な HO-1 濃度を計算した。

- ・ 肺病理組織標本の評価
10%ホルムアルデヒドで固定した肺組織をパラフィンに包埋し、4 μm の厚さで切片にした後、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色およびマッソントリクローム(MT)染色を行った。肺の炎症と線維化は、それぞれ炎症細胞浸潤スコアとアシュクロフトスコアを使用して評価した。炎症細胞浸潤スコアは、肺組織における炎症細胞浸潤の程度をマクロファージと好中球とに分けて、スコア化(炎症細胞なし (0)、極微 (0.5)、軽度 (1)、中等度 (2)、重度 (3))し、各群における合計点数で評価を実施した。肺の線維化は、アシュクロフトスコアの修正スケールを使用して、肺の病理組織学的所見を 0~8 のスケールでスコア化し、スコアの平均および標準偏差を各群で計算した。

6) 肺組織の遺伝子解析

遺伝子解析では、我々が以前実施した架橋型ポリアクリル酸(ポリマーA)の気管内注入後の肺組織と今回実施したポリマー①の気管内注入後の肺組織を用いて、遺伝子発現のプロファイルを比較検証した。それぞれの注入 1 ヶ月後の解剖で得られた右肺の第 3 葉(各群 5 匹)を、QIAzol 溶解試薬(Qiagen, Hilden, Nordrhein-Westfalen, Germane)を使用し、Tissue Ruptor (Qiagen, Hilden, Nordrhein-Westfalen, Germaney) でホモジナイズした。得られたホモジネートから、miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nordrhein-Westfalen, Germane) を使用して、全 RNA の抽出を実施した。RNA は、NanoDrop 2000 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) を使用して定量し、Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で品質を分析した。DNA マイクロアレイ解析には、20,174 個の遺伝子を搭載している三次元 (3D) Gene Rat Oligo Chips 20K(バージョン 1.1) (TORAY, Tokyo, Japan)を使用した。ポリマーA とポリ

マー①をそれぞれの高用量投与した各 5 匹のラットの肺から抽出した全 RNA を等量混合して、それぞれ 1 つのサンプルとし、Amino Allyl MessageAmp II aRNA Amplification Kit (Ambion, Inc., Austin, CA, USA) を使用して増幅させた。アンチセンス RNA (aRNA) を、Amersham Cy5 Mono-Reactive Dye (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を使用して Cy5 で標識し、標識された aRNA を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 16 時間ハイブリダイズさせた。チップを洗浄および乾燥し、オゾンのない環境で 3D-Gene Scanner 3000 (TORAY, Tokyo, Japan)を使用してスキャンし、3D Gene 抽出ソフトウェア (TORAY, Tokyo, Japan) を使用して分析した。各生データのシグナル強度を、サンプル中の既知の内部標準である ACTB および GAPDH のシグナル強度で割って、それぞれポリマーA およびポリマー①の遺伝子発現レベルを比較した。得られたマイクロアレイデータは、The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) バージョン 2021 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) を使用し、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) パスウェイ解析を実施した。

《吸入ばく露試験》

〈ラット〉

- 1) ポリマーA を用いて、F344 雄ラットへの吸入ばく露試験(12 週齢からばく露開始)を実施した。ばく露濃度設定は、低濃度群 0.2 mg/m^3 、高濃度群 2.0 mg/m^3 とし、対照群には大気を吸入させた。ばく露は、「1 日 6 時間を週 5 日間(短期)」もしくは「1 日 6 時間・週 5 日間を 13 週間(長期)」とした。
- 2) 観察ポイントは、短期吸入ばく露試験ではばく露終了の 3 日後、1 ヶ月後、長期吸入ばく露試験ではばく露終了の 3 日後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後および 2 年とした。
- 3) 吸入ばく露開始時より、定期的に体重測定を行った。
- 4) 観察各ポイントにおいて、3D マイクロ CT(各群 3 匹)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。吸入ばく露終了 3 日後~6 ヶ月後は 1 群あたり 5 匹を、2 年後は 1 群あたり 10 匹を割り当てた。

- ・ 3D マイクロ CT 装置 (CosmoScan GX、Rigaku Co., Tokyo, Japan) の撮影条件は以下の通りである：時間 4.0 分、平均全身被曝量 161.9 mGy/スキャン、管電圧 90kV、管電流 88 μ A、FOV (視野) 60 mm (ボクセルサイズ：120 $\times$ 120 $\times$ 120 μ m)。ラットは腹臥位にし、セボフルラン (Pfizer Japan Inc., Tokyo, Japan) 吸入による麻酔下で、呼吸同期のもと、撮影を行った。画像は、吸気と呼気の両方の呼吸相で遡及的にゲート処理された。
 - ・ 解剖時は、イソフルラン (Pfizer Japan Inc., Tokyo, Japan) 吸入による麻酔下で行った。体重を測定した後、腹部大動脈を切断し、失血死させた。両肺を生理食塩水で灌流後、左主気管支をクランプした状態で、右肺に 20cmH₂O の圧力で生理食塩水を 2 回注入し、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行った。気管支肺胞洗浄液 (BALF) は自由落下により回収した。その後、右肺と左肺とを分離し、右肺は -80 $^{\circ}$ C で凍結保存し、左肺は 10%ホルムアルデヒドを 25 cmH₂O の圧力下で注入し固定し、病理組織学的評価に使用した。
 - 5) 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。
 - ・ 得られた BALF を 400 g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移し、保存した。細胞ペレットを多形核白血球 (PMN) バッファー (137.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.2 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 5.6 mM C₆H₁₂O₆) に懸濁して洗浄し、400 g、4 $^{\circ}$ C、15 分間遠心分離した。上清を除去した後、細胞ペレットを 1 mL の PMN Buffer で再度懸濁した。BALF 中の細胞数を ADAM-MC (AR BROWN CO., LTD, Tokyo, Japan) でカウントし、サイトスピンを用いてスライドグラス上に細胞を散布した。その後、スライドグラス上の細胞を固定し、Diff-Quik (Sysmex Corp., Kobe, Hyogo, Japan) で染色した後、光学顕微鏡観察下で、細胞数の測定を行った。
 - ・ BALF 上清中の LDH 活性は、Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nordrhein-Westfalen, Germany) により測定した。LDH 活性は、既知の濃度のウサギ筋肉由来のリコンビナント LDH から得た標準曲線を用いて推定した。ケモカインである CINC-1 および CINC-2 を、それぞれ ELISA キット #RCN100、#RCN200 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) によって測定した。
 - 6) 肺組織：病理標本にて、炎症や線維化などの評価を行った。10%ホルムアルデヒドで固定した肺組織をパラフィンに包埋し、4 μ m の厚さで切片にした後、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色およびマッソントリクローム (MT) 染色を行った。
- 〈マウス〉
- 1) ポリマー A を用いて、C57B6J 雄マウスへの吸入ばく露試験 (8 週齢からばく露開始) を実施した。ばく露濃度設定は、低濃度群 0.2 mg/m³、高濃度群 2.0 mg/m³ とし、対照群には大気を吸入させた。ばく露は、「1 日 6 時間・週 5 日間を 13 週間」とした。各ばく露群において、クラブ細胞除去あり群とクラブ細胞除去なし群を設けた。クラブ細胞除去は、過去の報告と予備検討の結果から、ナフタレン 200 mg/kg (コーン油に溶解) を、吸入ばく露開始の前日から 3 週間毎に腹腔内注射を行う方法を用いた。クラブ細胞除去なし群には、コーン油のみを同じスケジュールで腹腔内注射を行った。
 - 2) 観察ポイントは、吸入ばく露終了の 3 日後、1 週後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後および 2 年後とした。
 - 3) 吸入ばく露開始時より、定期的に体重測定を行った。
 - 4) 各観察ポイントにおいて、3D マイクロ CT (各群 2 匹) 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。注入 3 日後～6 ヶ月後では 1 群あたり 6 匹 (気管支肺胞洗浄群 4 匹、肺病理組織群 2 匹) を、2 年後では 1 群あたり 12 匹 (気管支肺胞洗浄群 8 匹、肺病理組織群 4 匹) を割り当てた。
 - ・ 3D マイクロ CT 装置 (CosmoScan GX、Rigaku Co., Tokyo, Japan) の撮影条件は以下の通りである：時間 4.0 分、平均全身被曝量 161.9 mGy/スキャン、管電圧 90kV、管電流 88 μ A、FOV (視野) 25 mm (ボクセルサイズ：60 $\times$ 60 $\times$ 60 μ m)。マウスは腹臥位にし、セボフルラン (Pfizer Japan Inc., Tokyo, Japan) 吸入による麻酔下で、呼吸同期のもと、撮影を行った。画像は、吸気と呼気の両方の呼吸相で遡及的にゲート処理された。
 - ・ 解剖時には、イソフルラン (Pfizer Japan Inc., Tokyo, Japan) 吸入による麻酔下で行った。体

重を測定した後、腹部大動脈を切断し、失血死させた。両肺を生理食塩水で灌流後、気管支肺胞洗浄群では、気管をカニューレションし、シリンジを用いて手動で両肺に生理食塩水 0.5mL を注入し、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行った。気管支肺胞洗浄液 (BALF) は生理食塩水を注入したシリンジを用いて手動で回収した。この合計 3 回行った。その後、右肺は -80 °C で凍結保存した。肺病理組織群では、両肺を摘出後に、右主気管支をクランプし、左肺に 10% ホルムアルデヒドを 25 cmH₂O の圧力下で注入して固定し、病理組織学的評価に使用した。

- 5) 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。
 - ・ 得られた BALF を 800 g、4 °C で 10 分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移し、保存した。細胞ペレットを多形核白血球 (PMN) バッファー (137.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.2 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 5.6 mM C₆H₁₂O₆) に懸濁して洗浄し、400 g、4 °C、15 分間遠心分離した。上清を除去した後、細胞ペレットを 0.5 µL の PMN Buffer で再度懸濁した。BALF 中の細胞数を ADAM-MC (AR BROWN CO., LTD, Tokyo, Japan) でカウントし、サイトスピンを用いてスライドガラス上に細胞を散布した。その後、スライドガラス上の細胞を固定し、Diff-Quik (Sysmex Corp., Kobe, Hyogo, Japan) で染色した後、光学顕微鏡観察下で、細胞数の測定を行った。
 - ・ BALF 上清中の LDH 活性は、Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nordrhein-Westfalen, Germany) により測定した。LDH 活性は、既知の濃度のウサギ筋肉由来のリコンビナント LDH から得た標準曲線を用いて推定した。
- 6) 肺組織: 病理標本にて、炎症や線維化などの評価を行った。10%ホルムアルデヒドで固定した肺組織をパラフィンに包埋し、4 µm の厚さで切片にした後、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色およびマッソントリクローム (MT) 染色を行った。

なお、マウスの吸入ばく露試験における各群の略称を以下の通りとする。

群名称	略称
対照群	
クラブ細胞除去なし群	C(-)群

クラブ細胞除去あり群	C(+)群
低濃度群	
クラブ細胞除去なし群	L(-)群
クラブ細胞除去あり群	L(+)群
高濃度群	
クラブ細胞除去なし群	H(-)群
クラブ細胞除去あり群	H(+)群

(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

《ポリマーの合成・物性評価》

- アクリル酸系ポリマーおよび非アクリル酸系ポリマーの物性評価の結果を表 1(A) に示す。
- ポリマーの物性評価の過程において、「分子分散されている状態 (一度、強アルカリに溶解した後に、中性に戻す)」と「最初から水に分散させた状態」とでは、粒子の分散のしかたが大きく異なることが分かった (データ未掲載)。
- ラットおよびマウスの吸入ばく露試験に用いたポリマー A の MMAD は、2.0 µm (低濃度群)、2.1 µm (高濃度群) であった (表 1(B))。

《気管内注入試験》

- ポリマー①～④の気管内注入試験の結果を示す。

《ポリマー①》

- ・ 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) 肺の肉眼的所見を図 1(A) に示す。注入 3 日後～1 ヶ月後のばく露群では、対照群と比較し、肺は浮腫状であった。
 - 2) 体重と相対肺重量の結果を図 2(A)、図 3(A) に示す。体重は、注入後の観察期間の 6 ヶ月間において、対照群とばく露群との間で有意差を認めなかった。相対肺重量は、ばく露群では、対照群と比較し、注入 1 ヶ月後まで、有意な増加があり、高用量群では、観察期間 (6 ヶ月間) を通して、対照群と比較して、有意な増加が持続していた。
 - 3) 3D マイクロ CT: 注入 3 日後～1 ヶ月後では浸潤影やすりガラス影を認めたが、注入 3 ヶ月後および 6 ヶ月後では陰影はほとんど消退してい

た(図 4(A))。

- 4) 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が、注入 3 日後および 1 週後のばく露群で著しい増加を認めた。注入 1 か月後では 3 日後・1 週後と比較すると各パラメータ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。注入 3 ヶ月後および 6 ヶ月後では総細胞数のみ高用量群において対照群と比較して有意な増加が持続していた。好中球走化性因子である CINC-1、CINC-2 は、注入 1 週間後～1 ヶ月後まで、対照群と比較して、有意な増加が持続していた(図 5(A)-1, 図 6(A)-2, 図 7(A)-3, 図 8(A)-4, 図 9(A)-5, 図 10(A)-5)。サイトスピンの写真を図 12(A)に示す。
- 5) 肺組織:酸化ストレスのマーカーである HO-1 は、注入 1 ヶ月後～3 ヶ月後まで、対照群と比較して有意な増加が持続していた(図 11(A)-7)。病理組織標本では、注入 3 日後および 1 週後では、肺腔内および肺泡隔壁への著明な炎症細胞浸潤を認めた。炎症は経時的に消退傾向であったが、観察期間を通して認められた(HE 染色)(図 13(A))。線維化は、注入 3 日後から認められ、観察期間中持続した(MT 染色)(図 13(A))。

〈ポリマー②〉

- ・ 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) 肺の肉眼所見を図 1(B)に示す。注入 3 日後～1 ヶ月後のばく露群では、対照群と比較し、肺は浮腫状であった。
 - 2) 体重と相対肺重量の結果を図 2(B), 図 3(B)に示す。体重は、高用量群では、対照群と比較し、注入 1 週後まで、有意な減少があった。相対肺重量は、ばく露群では、対照群と比較し、注入 1 ヶ月後まで、有意な増加があり、高用量群では、注入 3 ヶ月後まで、対照群と比較して、有意な増加が持続していた。
 - 3) 3D マイクロ CT:注入 3 日後～1 ヶ月後では浸潤影やすりガラス影を認めたが、3 ヶ月後および 6 ヶ月後では陰影はほとんど消退していた。(図 4(B))。
 - 4) 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、好中球割合が、注入 3 日後および 1 週後のばく露群で著しい

増加を認めた。注入 1 ヶ月後では 3 日後・1 週後と比較すると各パラメータ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。注入 3 ヶ月後および 6 ヶ月後では総細胞数のみ高用量群において対照群と比較して有意な増加が持続していた。好中球走化性因子である CINC-1、CINC-2 は、注入 1 週間後～1 ヶ月後まで、対照群と比較して、有意な増加が持続していた(図 5(B)-1, 図 6(B)-2, 図 7(B)-3, 図 8(B)-4, 図 9(B)-5, 図 10(B)-5)。サイトスピンの写真を図 12(B)に示す。

- 5) 肺組織:酸化ストレスのマーカーである HO-1 は、注入 1 週間後まで、対照群と比較して有意な増加が持続していた(図 11(B)-7)。病理組織標本では、肺腔内および肺泡隔壁への著明な炎症細胞浸潤を認めた。炎症は経時的に消退傾向であったが、観察期間を通して認められた(HE 染色)(図 13(B))。線維化は、注入 1 週後から認められ、観察期間中持続した(MT 染色)(図 13(B))。

〈ポリマー③〉

- ・ ポリマー③を注入した肺では、用量依存性に炎症が起き、高用量群では観察期間中持続したもの、経過を通して、軽度の炎症であった。線維化はほぼ皆無であった。
- 1) 肺の肉眼的所見を図 1(C)に示す。観察期間を通して、対照群とばく露群との間で、肉眼的な所見に明らかではなかった。
 - 2) 体重と相対肺重量の結果を図 2(C), 図 3(C)に示す。体重は、注入 3 日後の低用量群で、対照群と比較し、有意な減少があった。相対肺重量は、高用量群では、注入 1 週後まで、対照群と比較して、有意な増加を認めた。
 - 3) 3D マイクロ CT:注入 3 日後の高用量群のみで、すりガラス影を認めたが、ほかは明らかな異常陰影は認めなかった(図 4(C))。
 - 4) 気管支肺胞洗浄液:LDH 活性は、注入 1 ヶ月後の高用量群でのみ、対照群と比較して有意な増加を認めた。総細胞数の増加は、注入 1 週後と 1 ヶ月後の高用量群で、好中球数は、3 日後～1 週後の高濃度群で、好中球割合の増加は、3 日後低用量群・高用量群および 1 週後の高用量群でみられた。好中球走化性因子である CINC-1 は高用量群において注入 3 日後のみ、CINC-2 は高用量群において注入 3

日後と 1 ヶ月後のみにおいて、対照群と比較して、有意な増加を認めた(図 5(C)-1, 図 6(C)-2, 図 7(C)-3, 図 8(C)-4, 図 9(C)-5, 図 10(C)-5)。サイトスピンの写真を図 13(C)に示す。

- 5) 肺組織:酸化ストレスのマーカーである HO-1 は、高用量群において、注入 3 ヶ月後と 6 ヶ月後のみ、対照群と比較して有意な増加を認めた(図 2(C)-7)。病理組織標本では、肺腔内および肺泡隔壁への軽微な炎症細胞浸潤を認めた。炎症は、高用量群では観察期間中持続したが、低用量群では注入 3 日後と 1 ヶ月後のみであった。いずれも軽度であった(HE 染色)(図 13(C))。線維化はほぼすべての個体で認めなかった(MT 染色)(図 13(C)) (注入 1 週後の 1 個体で部分的に認めたのみ)。

〈ポリマー④〉

- ・ ポリマー④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た。炎症は注入 1 ヶ月後まで持続したが、3 ヶ月以降は消退傾向であった。線維化は注入 3 日後～1 ヶ月後まで認めたが、3 ヶ月以降ではほぼ消退した。
- 1) 肺の肉眼的所見を図 1(D)に示す。注入 3 日後～1 ヶ月後のばく露群では、対照群と比較し、肺は浮腫状であった。
- 2) 体重と相対肺重量の結果を図 2(D), 図 3(D)に示す。体重は、注入 1 週後の高用量群において、有意な減少があった。相対肺重量は、ばく露群では、対照群と比較し、注入 1 ヶ月後まで、有意な増加があり、高用量群では、注入 6 ヶ月後まで、対照群と比較して、有意な増加が持続していた。
- 3) 3D マイクロ CT:注入 3 日後～1 ヶ月後では浸潤影やすりガラス影を認めたが、3 ヶ月以降では陰影はほとんど消退していた(図 4(D))。
- 4) 気管支肺胞洗浄液:炎症の指標である、総細胞数は、注入 3 日後～1 週間後のばく露群で、対照群と比較して、有意な増加があり、高用量群では、観察期間中(注入後 6 ヶ月間)、有意な増加を認めた。LDH 活性、好中球数および好中球割合は、注入 3 日後～1 週間後のばく露群で、対照群と比較して、有意な増加を認めた。注入 1 ヶ月後では、高用量群でのみ、対照群と比較して有意な増加を認めた。好中球走化性因子である CINC-1、CINC-2 は、注入

1 週間後～1 ヶ月後まで、対照群と比較して、有意な増加が持続していた(図 5(D)-1, 図 6(D)-2, 図 7(D)-3, 図 8(D)-4, 図 9(D)-5, 図 10(D)-5)。サイトスピンの写真を図 12(D)に示す。

- 5) 肺組織:酸化ストレスのマーカーである HO-1 は、注入 1 週間後まで、対照群と比較して有意な増加が持続していた(図 11(D)-7)。病理組織標本では、注入 3 日後および 1 週間後では、肺腔内および肺泡隔壁への著明な炎症細胞浸潤を認めた。炎症は 1 ヶ月程度持続したが、それ以降は経時的に消退傾向であった(HE 染色)(図 13(D))。線維化は、注入 3 日後～1 ヶ月後まで認めたが、3 カ月後以降はほぼ消退した。(MT 染色)(図 13(D))。

〈架橋構造の有無による肺障害性評価〉

重量平均分子量(Mw)が同程度の、架橋型ポリアクリル酸(ポリマーA)と非架橋型ポリアクリル酸(ポリマー①)のラットへの気管内注入試験の結果を比較し、ポリアクリル酸の架橋構造が及ぼす肺障害性の影響について、検証をおこない、以下の結果を得た。

1) 気管支肺胞洗浄液

- ・ 気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数は、注入 3 日後から 1 週間までのすべてのばく露群において、対照群と比較し、総細胞数、好中球数、好中球割合に有意な増加が見られ、総細胞数においては、注入 1 ヶ月後までその傾向を認めた(図 14(A)~(C))。
- ・ 総タンパク質および LDH 活性も、注入 3 日後から 1 週間までのすべてのばく露群において、対照群と比較し、有意な増加が見られ、注入 1 ヶ月後までその傾向を認めた(図 14(D), (E))。
- ・ 気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞は、ポリマーAよりもポリマー①でより増加したが、LDH 活性はポリマーAの方が高かった。
- ・ 気管支肺胞洗浄液中の CINC-1 および CINC-2 は、注入 3 日後から 1 週間までのほぼすべてのばく露群において、対照群と比較し、有意な増加が見られた(図 14(F), (G))。
- ・ 肺組織中の HO-1 は、注入 3 日後から 1 ヶ月後のほぼすべてのばく露群において、対照群と比較し、有意な増加を見られ、注入 6 ヶ月後まで増加傾向を示した(図 14(H))。
- ・ 上記はいずれも用量依存性であった。

2) 肺組織

- ・ 病理組織標本においては、ポリマーA とポリマー①のいずれにおいても、注入 3 日後では、肺腔への好中球およびマクロファージを主体とする炎症細胞浸潤が用量依存的に顕著であった。ばく露 3 日後から 1 週後で著明な炎症細胞浸潤が観察され、重度の肺炎症が認められた。特に、ポリマーA ばく露群では、ポリマー①に比べて、より著しい炎症細胞の集簇が観察された。炎症細胞浸潤スコアによる評価では、いずれのポリマーにおいても、用量依的にスコアが上昇し、ポリマーA では、ポリマー①と比較しスコアが高くなる傾向が見られた。炎症細胞浸潤と同様に、架橋、非架橋にかかわらずいずれのポリマーの 1.0 mg ばく露群においても線維化が観察されたが、ポリマーA では、線維化がより広範囲に広がっていた(図 14(I), (K))。アシュクロフトスコアによる評価では、ポリマーA とポリマー①のどいづれにおいても、スコアの用量依的な増加を認めた。ポリマーA は、ポリマー① のスコアよりも高く、架橋型ポリアクリル酸は、非架橋型ポリアクリル酸と比較して、線維化形成能が高かった。(図 14(J), (L))。
- ・ ラットにポリマーA、ポリマー①をそれぞれ気管内注入して 1 ヶ月後に採取した肺組織の mRNA のマイクロアレイから、20,177 遺伝子を解析した。その結果、ポリマーA で線維芽細胞に関連する遺伝子の発現上昇を認め、パスウェイ解析では、ポリマーA でアポトーシスや PI3K-AKT 経路に関連する遺伝子発現の上昇を認めた(図 15(A)~(C))。これらの遺伝子発現の傾向は、ポリマーA で線維化能がポリマー①よりも高い傾向と一致していた。

《吸入ばく露試験》

- ポリマーA の吸入ばく露試験(ラット)の結果を示す。
- ・ ばく露期間中の平均ばく露濃度は、短期:低濃度群; $0.26 \pm 0.03 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群; $2.13 \pm 0.13 \text{ mg/m}^3$ 、長期:低濃度; $0.26 \pm 0.04 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度; $2.41 \pm 0.41 \text{ mg/m}^3$ であった。
- ・ 吸入ばく露期間におけるポリマーA のばく露濃度の結果を図 16(A)に示す。

《吸入ばく露試験(ラット/短期)》

- 1) 肺の肉眼所見を図 17(A)に示す。観察期間を通して、対照群とばく露群との間で、肉眼的な

所見に明らかではなかった。

- 2) 吸入ばく露中の体重の推移および解剖時の体重の結果を図 18, 図 19(A)に示す。体重は、注入 3 日後の高用量群および 1 ヶ月後の両ばく露群において、対照群と比較して、有意に増加していた。相対肺重量は、注入 3 日後の高用量群において、対照群と比較して、有意に増加していた。
- 3) 3D マイクロ CT:吸入ばく露終了 3 日後および 1 ヶ月後において、低濃度群・高濃度群においても CT 上では明らかな異常陰影はみられなかった(図 21(A))。
- 4) 気管支肺胞洗浄液:LDH 活性は、観察期間を通して、ばく露群と対照群との間に有意差はなかった。吸入ばく露終了 3 日後では、総細胞数は、高濃度群において、対照群と比較し、有意な増加を認めた。好中球数、好中球割合は、両ばく露群で、対照群と比較して、濃度依存性に有意な増加があった。吸入ばく露終了 1 ヶ月後では、各パラメータとも対照群との有意差を認めなかった(図 22(A))。サイトスピンの写真を図 23(A)に示す。
- 5) 肺組織:病理組織標本では、吸入ばく露終了 3 日後では、両ばく露群とも、肺腔内および肺胞隔壁に、濃度依存性に、炎症細胞浸潤を認めた。吸入ばく露終了 1 ヶ月後では、炎症は消退していた(HE 染色)(図 24(A))。線維化は、観察期間中では特に認められなかった(MT 染色)(図 24(A))。

《吸入ばく露試験(ラット/長期)》

- 1) 肺の肉眼所見を図 17(B)に示す。注入 3 日後~1 ヶ月後の高濃度ばく露群では、対照群と比較し、やや肺は浮腫状であった。
- 2) 吸入曝露開始後の体重の推移を図 18, 図 19(B)に示す。体重は、観察期間の 6 ヶ月間において、対照群とばく露群との間で有意差を認めなかった。相対肺重量は、高用量群では、観察期間中、対照群と比較して、有意に増加していた。
- 3) 3D マイクロ CT:吸入ばく露終了 3 日後では、高濃度群で浸潤影およびすりガラス影を認めたが、1 ヶ月以降は対照群とほとんど相違なかった(図 21(B))。
- 4) 気管支肺胞洗浄液:吸入ばく露終了 3 日後では、高濃度群において、LDH 活性、総細胞数、好中球数、好中球割合の有意な増加があったが、吸入ばく露終了 1 ヶ月後以降は、各パラメ

ータとも対照群との有意差は認めなかった。低濃度群では、吸入ばく露終了 3 日後～6 ヶ月後において、いずれのパラメータも対照群との有意差を認めなかった(図 22(B))。サイトスピンの写真を図 23(B)に示す。

- 5) 肺組織:病理組織標本では、吸入ばく露終了 3 日後では、両ばく露群とも、肺胞腔内および肺胞隔壁に、濃度依存性に、炎症細胞浸潤を認めた。炎症は、1 ヶ月後以降は消退傾向であった(HE 染色)(図 24(B))。線維化は、低濃度群では、吸入ばく露終了 3 日後に解剖した個体のうちの 1 匹において限局性の肺胞壁の肥厚を認めたのみであり、高濃度群では、吸入ばく露終了 3 日後～1 ヶ月後で軽微なものを認めた(MT 染色)(図 24(B))。

〈吸入ばく露試験(マウス/長期)〉

- 1) ばく露期間中の平均ばく露濃度は、低濃度群で $0.24 \pm 0.04 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群で $2.52 \pm 0.31 \text{ mg/m}^3$ であった。吸入ばく露期間におけるポリマー A のばく露濃度の結果を図 25(A), (B)に示す。
- 2) 吸入ばく露中の体重の推移および解剖時の体重の結果を図 26, 図 27に示す。体重は、観察期間を通して、クラブ細胞除去あり群のほうが、クラブ細胞除去なし群と比較して、少ない傾向にあった。
- 3) 3D マイクロ CT:図 28
 - ・クラブ細胞除去なし群では、いずれの群においても、異常陰影は認めなかった。
 - ・クラブ細胞除去あり群では、3 日後～3 ヶ月後まで浸潤影やすりガラス影を認めた。
- 4) 気管支肺胞洗浄液:図 29
 - ・全体として明らかな濃度依存性はみられなかったが、クラブ細胞除去あり群は、クラブ細胞除去なし群と比較して、総じて、各パラメータが高い傾向であった。
 - ・吸入ばく露終了 3 日後では、L(+)群では、他のすべて群と比較して、総細胞数、好中球数、好中球割合の有意な増加を認めた。
 - ・吸入ばく露終了 1 ヶ月後では、クラブ細胞除去あり群の各群において、クラブ細胞除去なし群の各群と比較して、LDH 活性の有意な増加を認めた。
 - ・吸入ばく露終了 3 ヶ月後では、クラブ細胞除去あり群のばく露群において、クラブ細胞除去なし群の各群と比較して、総細胞数の上昇を認めた。また、L(+)群では、C(-)群および H(-)群と

比較して、LDH 活性の有意な増加を認めた。

- ・吸入ばく露終了 6 ヶ月後では、L(+)群では、C(-)群および H(-)群と比較して、LDH 活性の有意な増加を認めた。
 - ・サイトスピンの写真を図 30 に示す。
- 5) 肺組織:図 31
- 病理組織標本において、
- ・クラブ細胞除去なし群では、3 日後の L(-)群および 3 ヶ月後の H(-)群において、軽微な炎症を認めた。また、1 ヶ月後の L(-)群において、ごく軽微な線維化を 1 ヶ所のみ認めた。
 - ・クラブ細胞除去あり群では、吸入ばく露終了すべての観察ポイント(3 日後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後)において、対照群を含む全群で炎症を認めた。ばく露群では、対照群と比較して、炎症が強かった(HE 染色)。また、吸入ばく露終了後 3 日後ではばく露群で、吸入ばく露終了 1 ヶ月後、3 ヶ月後および 6 ヶ月後では対照群を含む全群において、軽微な線維化を認めた(MT 染色)。これらの所見に、濃度依存性は明らかではなかった。
 - ・各観察ポイントにおいて、クラブ細胞に特徴的なマーカーである CCSP の免疫染色を行った。定期的なナフタレンの腹腔内注射によって、気道のクラブ細胞は除去されていた(図 32)。

D. 考察

今回の研究から、以下の結果を得た。

- 1) アクリル酸系ポリマーの肺障害性は、分子量や架橋構造、構成成分に関連する。
 - 2) 架橋型ポリアクリル酸の 0.2 mg/m^3 の吸入ばく露では肺障害性は明らかでなかった。
 - 3) クラブ細胞の除去によって、架橋型ポリアクリル酸による炎症や線維化が増強された。
- 1) ・アクリル酸系ポリマーの基本構造である非架橋型ポリアクリル酸のうち、ポリマー①(分子量 69.7 万)とポリマー②(分子量 25.8 万)の気管内注入試験では、ポリマー①②とも同程度の高い肺障害性を有した。いっぽう、我々がこれまで行った気管内注入試験において、同じ非架橋型ポリアクリル酸でも分子量がおよそ 3 万程度のものでは、ポリマー①②と比較して、炎症や線維化の程度は弱く、持続期間も短く、肺障害性は低かった。よって、非架橋型ポリアクリル酸の肺障害性には、分子量が関連することが示唆された。また、ポリマー①と②

の高い肺障害性の程度に大きな違いがなく、分子量 3 万程度のもものでは肺障害性が低かったことから、非架橋型ポリアクリル酸の肺障害性において、3 万～26 万の間に分子量のしきい値が存在する可能性が考えられた。

・さらに、ポリマーの構成成分に着目すると、肺障害性は、ポリアクリル酸＞ポリアクリル酸ナトリウム＞＞ポリエチレンオキシドであり、アクリル酸系ポリマーの肺障害性には、ポリマーの構成成分が影響する可能性が考えられた。また、アクリル酸系ポリマーは、分散媒によって大きく分散のしかたが変わり、これに関しては、粒度分布を正確に測定して、調整方法と粒度分布、さらには肺障害性との関係を明らかにすることを目指す。

・今回の研究で行った非架橋型ポリアクリル酸であるポリマー①を気管内注入した肺組織と、我々がこれまでにに行った架橋型ポリアクリル酸であるポリマーA(架橋度 0.1%以下)を気管内注入した肺組織を用いて、肺障害性を比較した。その結果、ポリマーAは、ポリマー①よりも、細胞傷害性や線維化が強く、架橋度 0.1%以下のポリアクリル酸のほうが、非架橋型ポリアクリル酸よりも肺障害性が高かった。よって、ポリアクリル酸の肺障害性に、架橋構造が関連することが示唆された。また、ポリマーA を気管内注入した肺組織を用いた mRNA のマイクロアレイでは、*Eln(elastin)*や *Colla1(collagen, type I, alpha1)*などの遺伝子発現の上昇を認め、アポトーシスや PI3K-AKT 経路が架橋型ポリアクリル酸の肺障害性に関連することが示唆された。

- 2) ポリマーA(架橋型ポリアクリル酸)のラットの短期吸入ばく露試験においては、炎症は一過性であり、線維化は認めなかった。BALF の解析においては、低濃度群(0.2 mg/m³)においても、ばく露終了3日後に、BALF中の好中球数および好中球割合が、対照群と比較して有意な増加を認めていた。しかし、短期吸入ばく露試験よりも肺内沈着量が多くなる長期吸入ばく露試験において、ばく露終了3日後の低濃度群の BALF 中好中球数や好中球割合は対照群との差はなかった。類似の事象は、ほかの吸入性化学物質の短期ばく露終了直後でも報告されている。例えば、肺障害性が低い酸化亜鉛ナノ粒子の短期吸入ばく露試験終了直後にも一過性に BALF 中の好中球数の有意な増

加があったものの、13 週間の吸入ばく露試験では、対照群との間に好中球数の差がなかったことが示されている(Adamcakova-Dodd A, et. al., Part Fibre Toxicol., 2014.)。こうした反応は、吸入性粉じんなどの異物にばく露された際に起こる、恒常性を保つための生体反応とも捉えられ、肺障害性が低い物質や濃度へのばく露でも認められることが示唆される。ラットの長期ばく露試験でも、低濃度群(0.2 mg/m³)において炎症は起きたが一過性の軽微なものであった。線維化はほぼ皆無であった。これらのことから、架橋型ポリアクリル酸の 0.2 mg/m³の濃度での吸入ばく露では肺障害性は明らかでなく、吸入性粉じんとしてのポリアクリル酸の NOAEL(無毒性量)を設定する際に、0.2 mg/m³という濃度がひとつの目安となると考えた。既報(Takeda T. et. al., Part Fibre Toxicol., 2022.)においても、対象となった架橋型ポリアクリル酸の物理化学的特性の詳細は不明であるものの、吸入性粉じんとしての架橋型ポリアクリル酸の NOAEL を 0.3 mg/m³としており、本研究の結果と類似していた。

- 3) ポリマーA(架橋型ポリアクリル酸)のマウスへの吸入ばく露試験の結果からは、クラブ細胞を除去することで、架橋型ポリアクリル酸による炎症や線維化が増強した可能性が考えられた。今回の研究において、クラブ細胞を除去した目的は、クラブ細胞が肺腺癌の発生母地になることが報告されている(Shimkin MB, et. al., Adv Cancer Res., 1975.)ことに基づき、クラブ細胞がアクリル酸系ポリマーなどの有害性物質による肺腫瘍形成につながるのかを検証すること、またはその機序を解明することであった。しかし、今回の研究結果は、クラブ細胞が、肺腫瘍につながると考えられる炎症や線維化を抑制する作用があること、つまり生体の防御作用としての働きを有していることを示すものであった。クラブ細胞などの気道上皮細胞は、一般的に、炎症などを誘発するケモカインなどを含むサイトカインを産生することが知られているいっぽうで、炎症や線維化に抑制的に作用するクラブ細胞分泌タンパク(CCSP)を産生することも示されている(Zhu L, et. al., PLoS ONE., 2015., Lesur O, et. al., Am J Respir Crit Care Med., 1995.)。このように、クラブ細胞は、炎症や線維化を増強する、あるいは、抑制するといった、相反する作用を併せ持つことが考えられる。本研究では、クラブ細胞の炎症や線維

化を抑制する作用を主体的に認めた。しかし、本研究は 13 週間の吸入ばく露の結果であり、腫瘍形成にはより長期的なスパンで考える必要がある。長期的なばく露、つまり”刺激”によって正常細胞の phenotype が変化することが考えられ、クラブ細胞の phenotype の変化がおきるか否かを、より長期のばく露試験で検討する必要があると考える。

なお、ラットとマウス(クラブ細胞除去なし)とでは、マウスのほうが炎症やそれに引き続いて起こる線維化は比較的軽度であった。ラットはマウスに比べて肺炎症を起こしやすいことが既報 (Dekkers S. et al., *Inhal Toxicol.*, 2018.) でも指摘されており、本研究の結果も既報に矛盾しなかった。

今後、より長期間の観察や詳細な解析等を行うことで、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

- ・ アクリル酸系ポリマーは、肺障害性には、分子量、架橋構造、構成成分などの物理化学的特性が関与することが示唆された。
- ・ クラブ細胞と炎症や線維化との関連についてはより長期的な検討を要する。

F. 研究発表

1) 論文発表

- 1) Tomonaga T, Nishida C, Izumi H, Kawai N, Wang KY, Higashi H, Takeshita JI, Ono R, Sumiya K, Fujii S, Hata Y, Sakurai K, Morimoto T, Higashi Y, Yamasaki K, Yatera K, Morimoto Y. Crosslinked Structure of Polyacrylic Acid Affects Pulmonary Fibrogenicity in Rats. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 10;23(22):13870.

2) 学会発表

- 1) 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, 2020 年 8 月 28 日, 神戸.
- 2) Sakurai K. 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, 2021 年 1 月 12 日, オンライン開催.
- 3) 秋葉 勇. X 線および中性子小角散乱を相補的に利用した構造解析. 第 3 回 MLF 放射光・中

性子の連携利用に向けた研修会. 2021 年 4 月 9 日, 茨城.

- 4) 石井修平, 河村勇祐, 秋葉 勇. ポリ(アクリル酸エチル-co-アクリル酸ドデシル)を中央ブロック鎖に持つ両親媒性トリブロック共重合体が形成する ミセルの構造. 第 70 回高分子学会年次大会, 2021 年 5 月 26-28 日, オンライン.
- 5) 櫻井 和朗. ミー散乱を用いたサブから数十ミクロン粒子を含む溶液の解析. 第 70 回高分子年次大会 2021 年 5 月 27 日, オンライン.
- 6) Shinichi Mochizuki, Soichi Ogata, Reika Tsuji. Modification of antigenicity for cancer cells by using conjugates consisting of antigenic proteins and hyaluronic acids. 第 70 回高分子学会年次大会, 2021 年 5 月 27 日, オンライン.
- 7) 楠本咲, 秋葉勇. 環状両親媒性化合物のミセル形成. 第 58 回化学関連支部合同九州大会, 2021 年 7 月 5 日, オンライン.
- 8) 石井修平, 秋葉勇. 疎水性中央ブロック鎖を持つ両親媒性トリブロック共重合体が形成する会合体の構造と疎水鎖の剛直性. 第 58 回化学関連支部合同九州大会, 2021 年 7 月 5 日, オンライン.
- 9) 櫻井 和朗. 小角 X 線散乱法で計測したナノ粒子製剤. SPring-8 ユーザー協同体 (SPRUC) 研究会小角散乱とナノ粒子製剤の CMC, 2021 年 12 月 23 日, 東京, ハイブリッド形式.
- 10) Kazuo Sakurai. An alternating copolymer exhibiting the microphase-structure transition from ultrathin plate to unimeric sphere. ACS Spring 2022 NATIONAL MEETING & EXPOSITION. 2022 年 3 月 21 日, サンディエゴ, 米国.
- 11) Toshiki Morimoto, Yasuo Morimoto, Yasuyuki Higashi, Chinatsu Nishida, Naoki Kawai, Taisuke Tomonaga, Hiroto Izumi, Rhohei Ono, Kazuki Sumiya, Kazuo Sakurai, Kei Yamasaki and Kazuhiro Yatera. Inflammatory effects of uncross-linked polyacrylic acid in rat lung following intratracheal instillation. The 30th Japan-China-Korea Conference on Occupational Health, 2022 年 6 月 23-24 日, 北九州.
- 12) Kazuo Sakurai. Discovery of a Novel β -(1,3)-Glucan/DNA Complex and its Application to Targeting Delivery of Therapeutic Oligonucleotides. Exeter University Seminar (University of Exeter, UK) 2022 年 10 月 12 日, 英国.
- 13) 櫻井和朗. 「DDS ナノ粒子の構造解析」軟 X 線

共鳴散乱・反射率/Resonant Soft X-ray Scattering and Reflectivity.2022年11月8日,オンライン.

- 14) 櫻井和朗「溶液中のバイオナノ粒子からのX線小角散乱」東京都産業技術研究センターヘルスケア関連セミナー【テーマ:小角広角X線散乱装置の試験事例】2022年12月1日,オンライン.
- 15) 櫻井和朗「多糖核酸複合体におけるホスホロチオエート核酸の実用的役割と生命起源への想像」日本薬学会第143年会. 2023年3月26日,札幌.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1

(A) 各サンプルの GPC-MALS 測定の結果

Sample	M _w	R _g (nm)	備考
ポリマー① (非架橋型ポリアクリル酸)	7.53×10^5	74.9	研究チーム内で合成
ポリマー② (非架橋型ポリアクリル酸)	2.58×10^5	42.1	研究チーム内で合成
ポリマー③ (ポリエチレンオキシド)	7.63×10^5	75.1	市販品
ポリマー④ (非架橋型ポリアクリル酸ナトリウム)	6.17×10^5	60.1	研究チーム内で合成
ポリマー⑤ (非架橋型ポリアクリル酸)	1.85×10^4	32.5	研究チーム内で合成
ポリマー⑥ (非架橋型ポリアクリル酸)	1.55×10^4	18.5	研究チーム内で合成
ポリマー⑦ (非架橋型ポリアクリル酸)	8.09×10^4	8.07	研究チーム内で合成
ポリマー⑧ (非架橋型ポリアクリル酸)	5.01×10^4	7.04	研究チーム内で合成
ポリマー⑨ (非架橋型ポリアクリル酸)	5.04×10^4	50.5	研究チーム内で合成
ポリマー⑩ (架橋型ポリアクリル酸)	-	660	研究チーム内で合成
ポリマー⑥ (架橋型ポリアクリル酸)	-	318	研究チーム内で合成
ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)	7.65×10^5	68.7	市販品
ポリマーB (非架橋型ポリアクリル酸)	3.09×10^4	13.5	市販品

(B) 吸入ばく露試験における空気動学的直径

ポリマーA		
	低濃度群	高濃度群
吸入ばく露試験 (ラット、マウス)	2.0 μm (σg=2.0)	2.1 μm (σg=1.9)

図1 肺の肉眼的所見			
(A) ポリマー①	Control	0.2 mg/rat	1.0 mg/rat
3 days			
1 week			
1 month			
3 months			
6 months			

図1 肺の肉眼的所見			
(B) ポリマー②	Control	0.2 mg/rat	1.0 mg/rat
3 days			
1 week			
1 month			
3 months			
6 months			

図1 肺の肉眼的所見			
(C) ポリマー③	Control	0.2 mg/rat	1.0 mg/rat
3 days			
1 week			
1 month			
3 months			
6 months			

図1 肺の肉眼的所見			
(D)ポリマー④	Control	0.2 mg/rat	1.0 mg/rat
3 days			
1 week			
1 month			
3 months			
6 months			

図2 体重

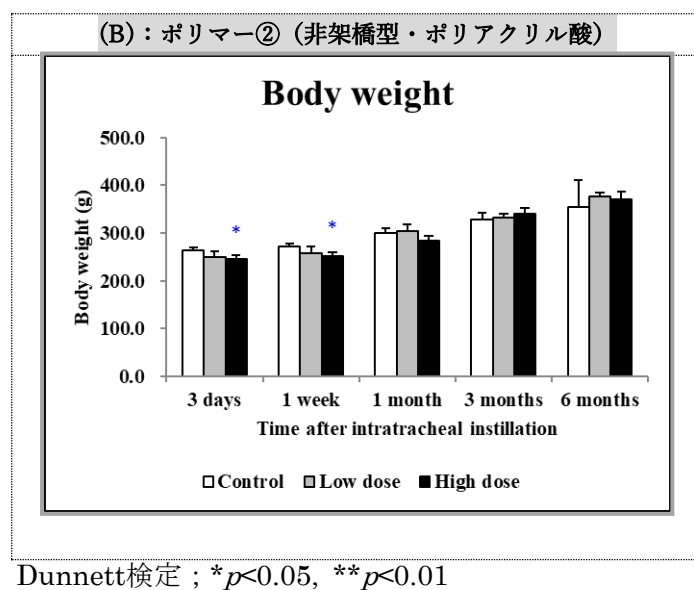
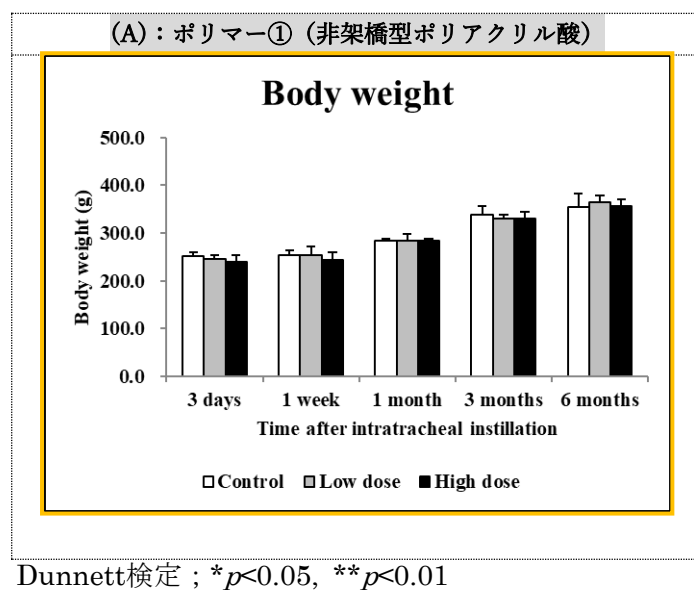


図2 体重

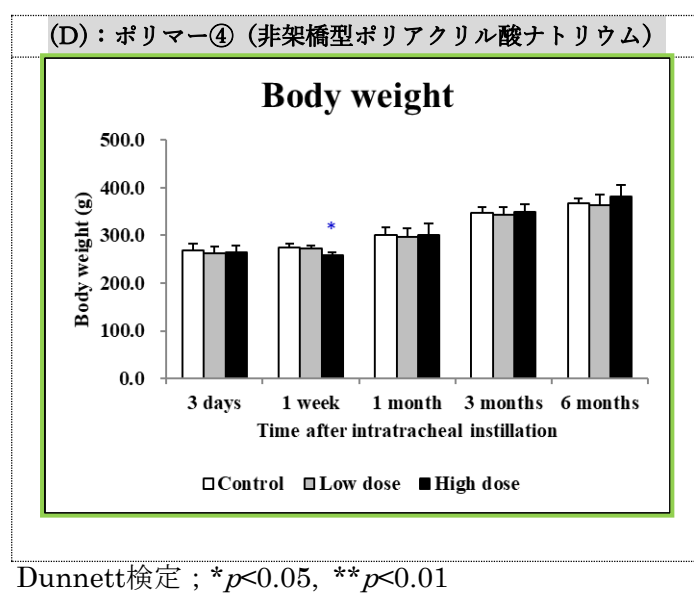
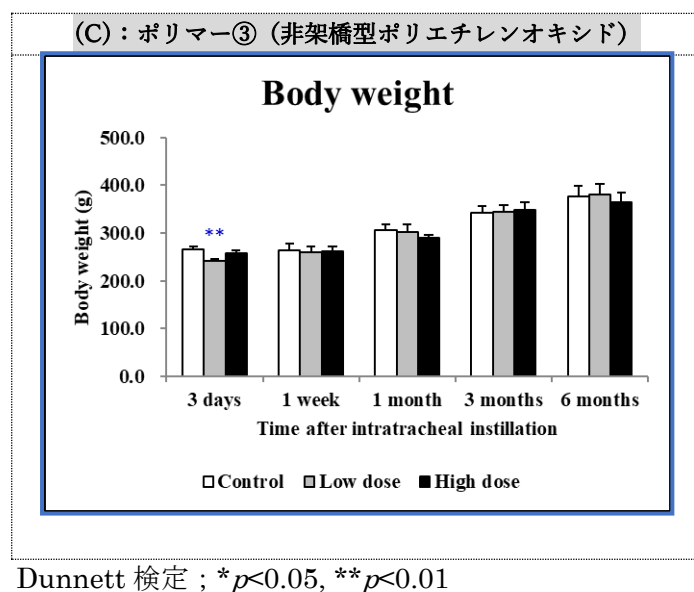


図3 相対肺重量（肺重量/体重）

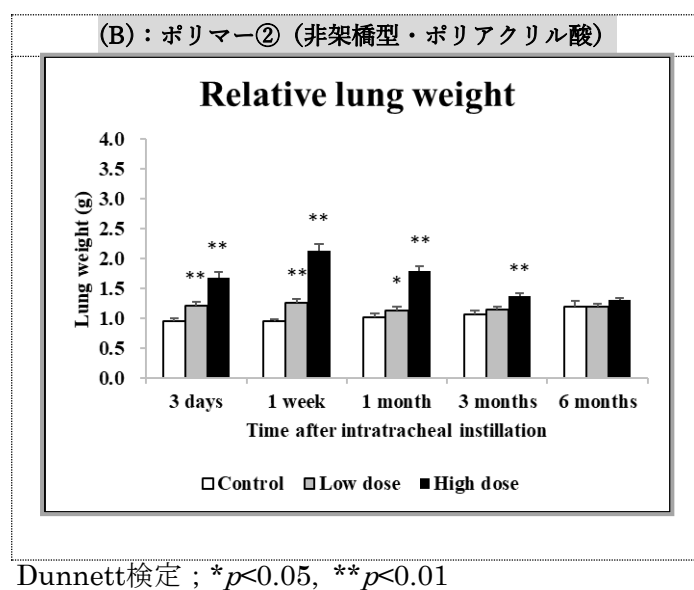
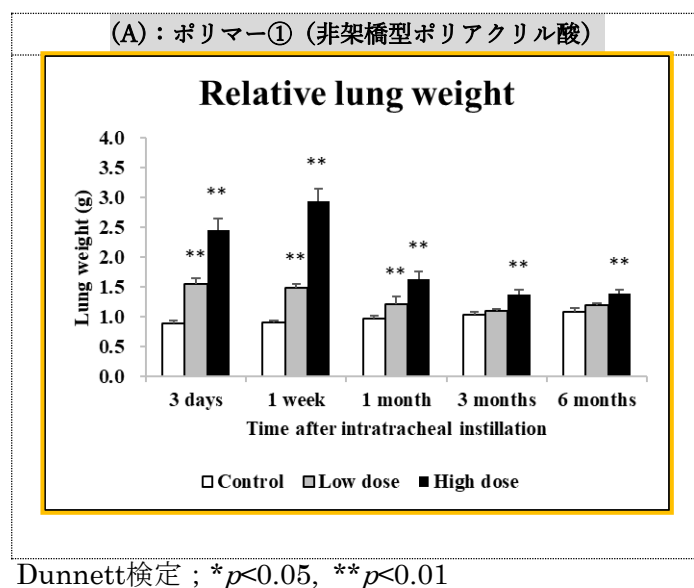
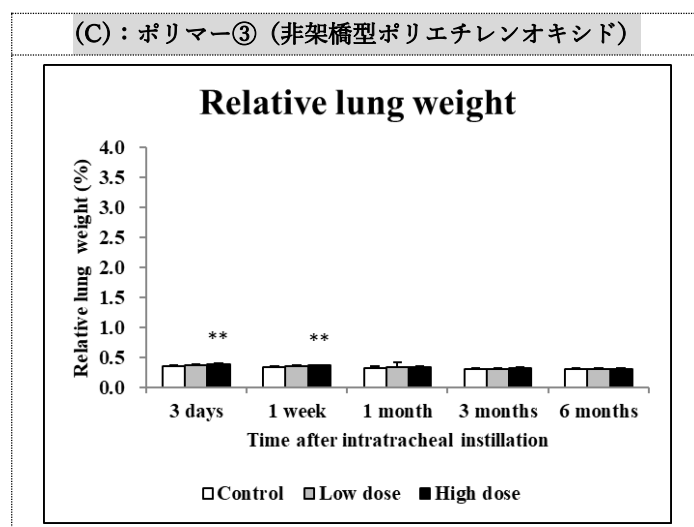
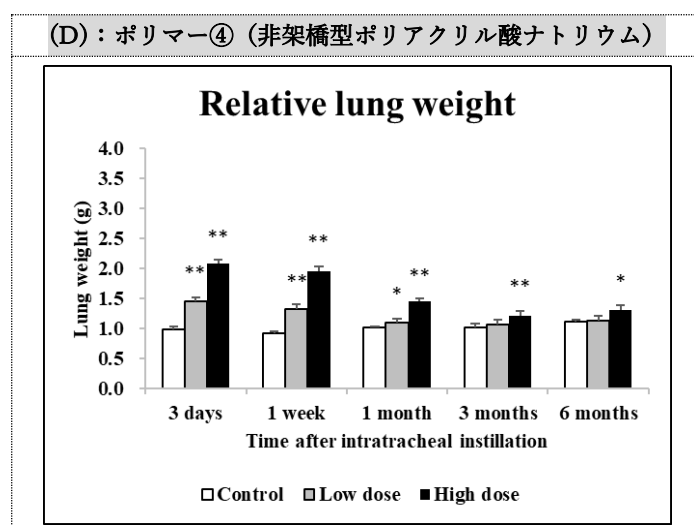


図3 相対肺重量（肺重量/体重）



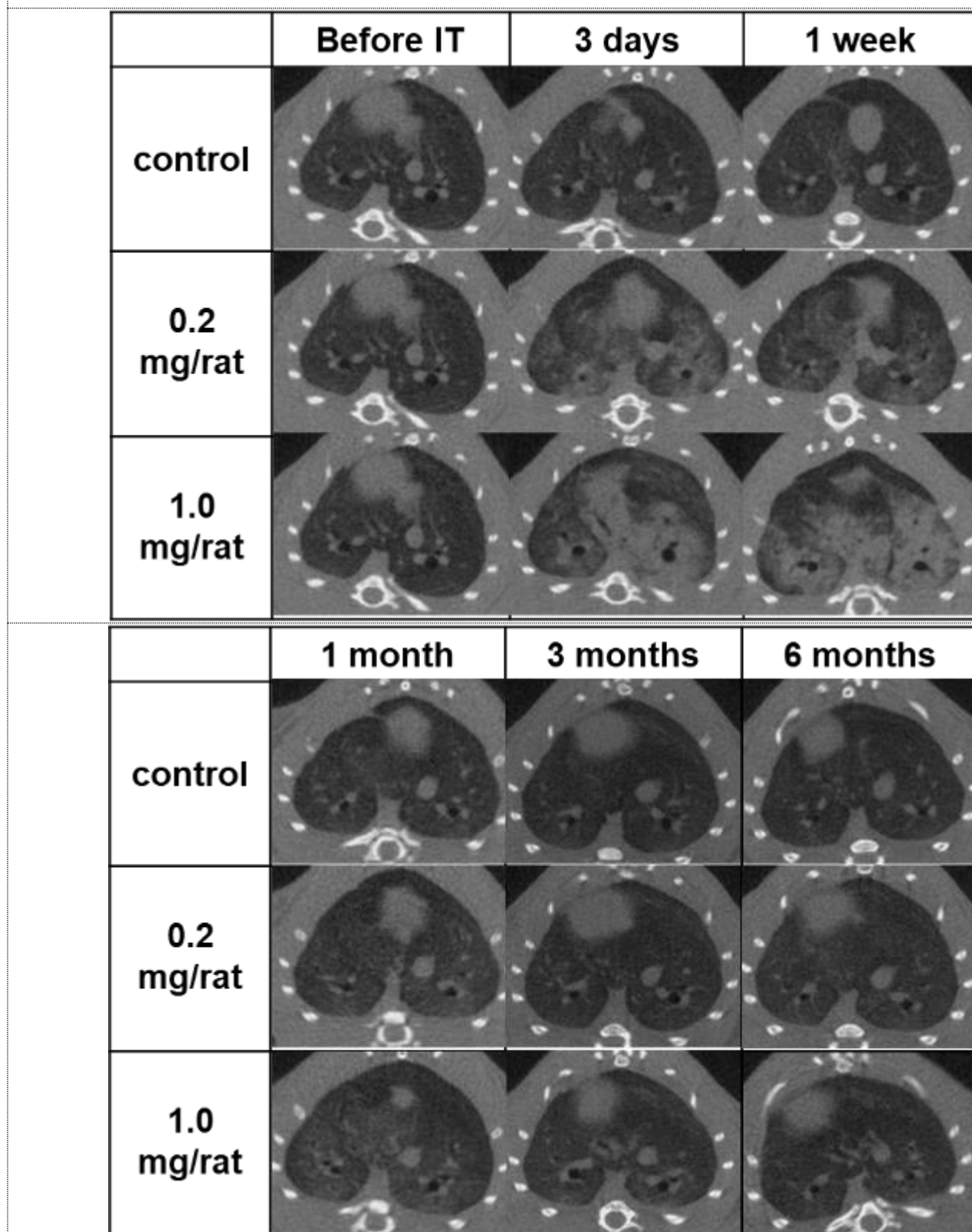
Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$



Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

図4 3D マイクロ CT

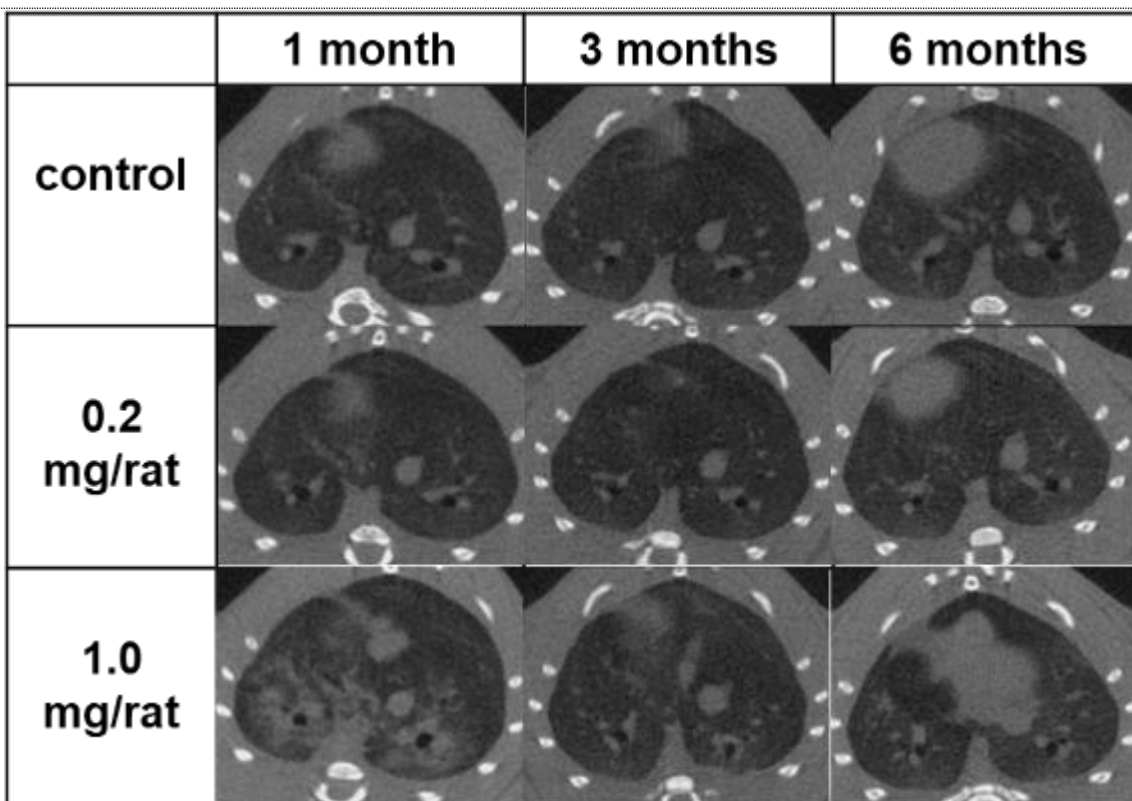
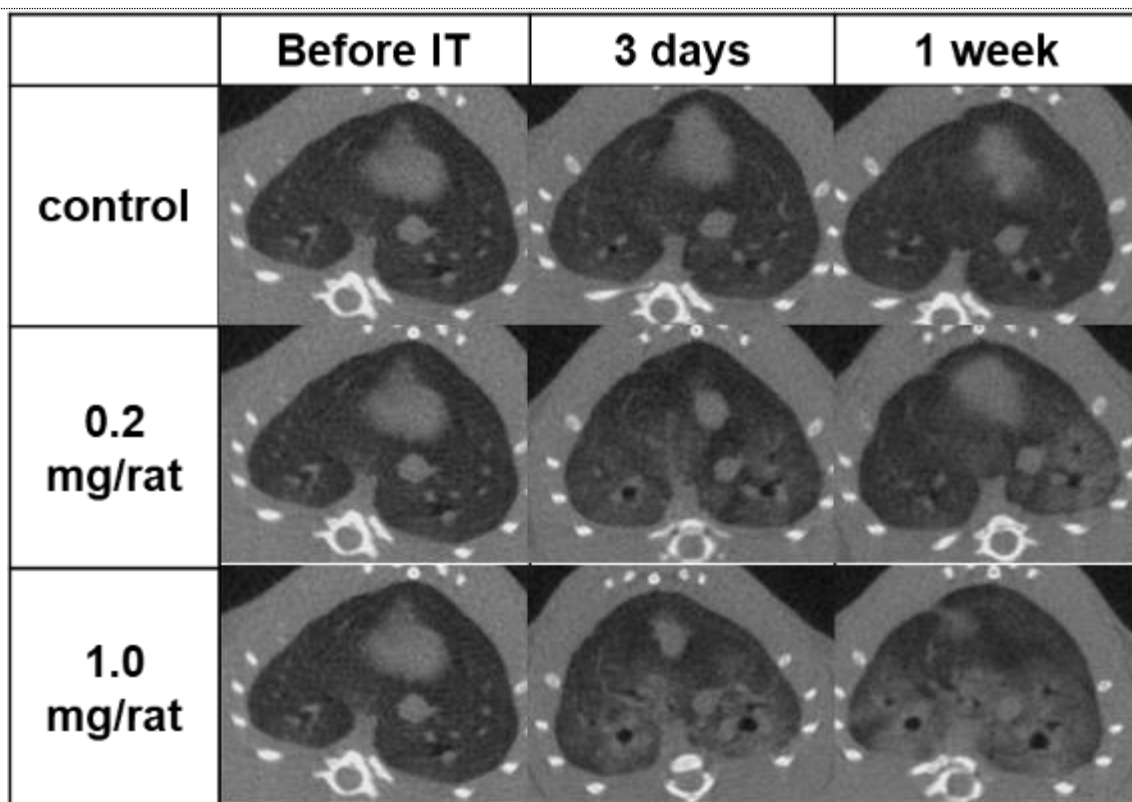
(A)気管内注入試験：ポリマー①（非架橋型ポリアクリル酸（分子量大））



Before IT : Before intratracheal instillation

図4 3D マイクロ CT

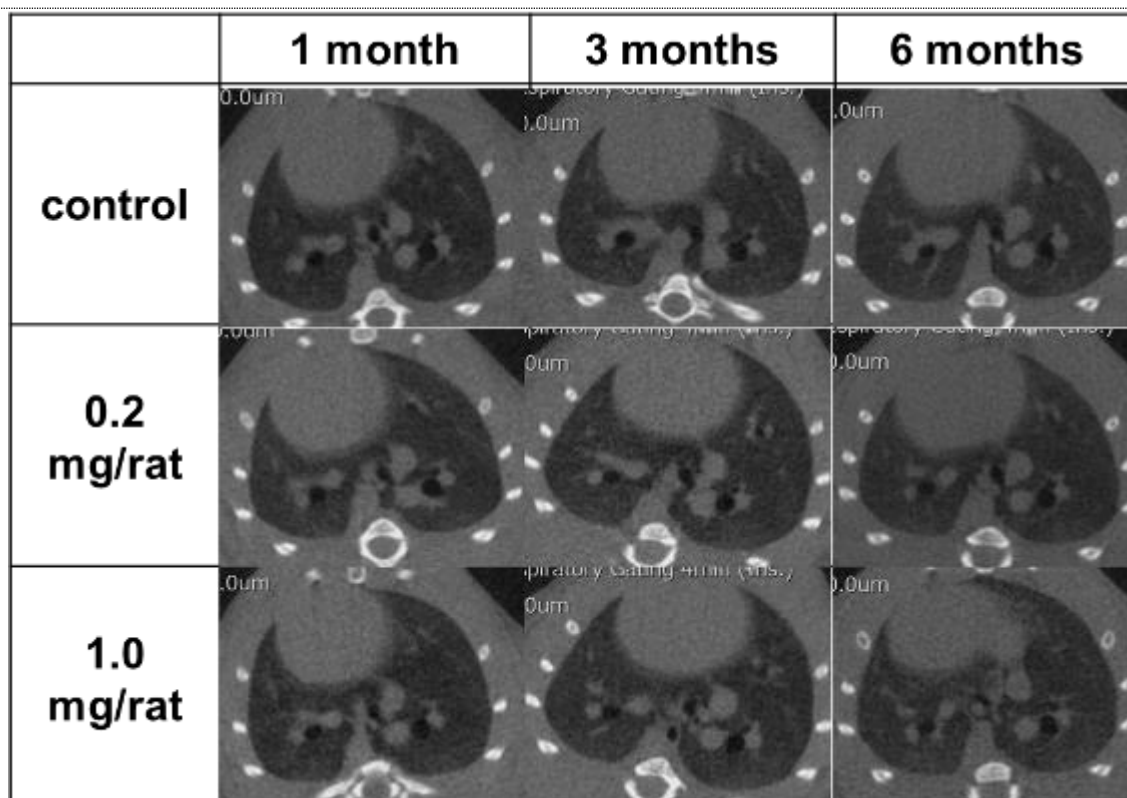
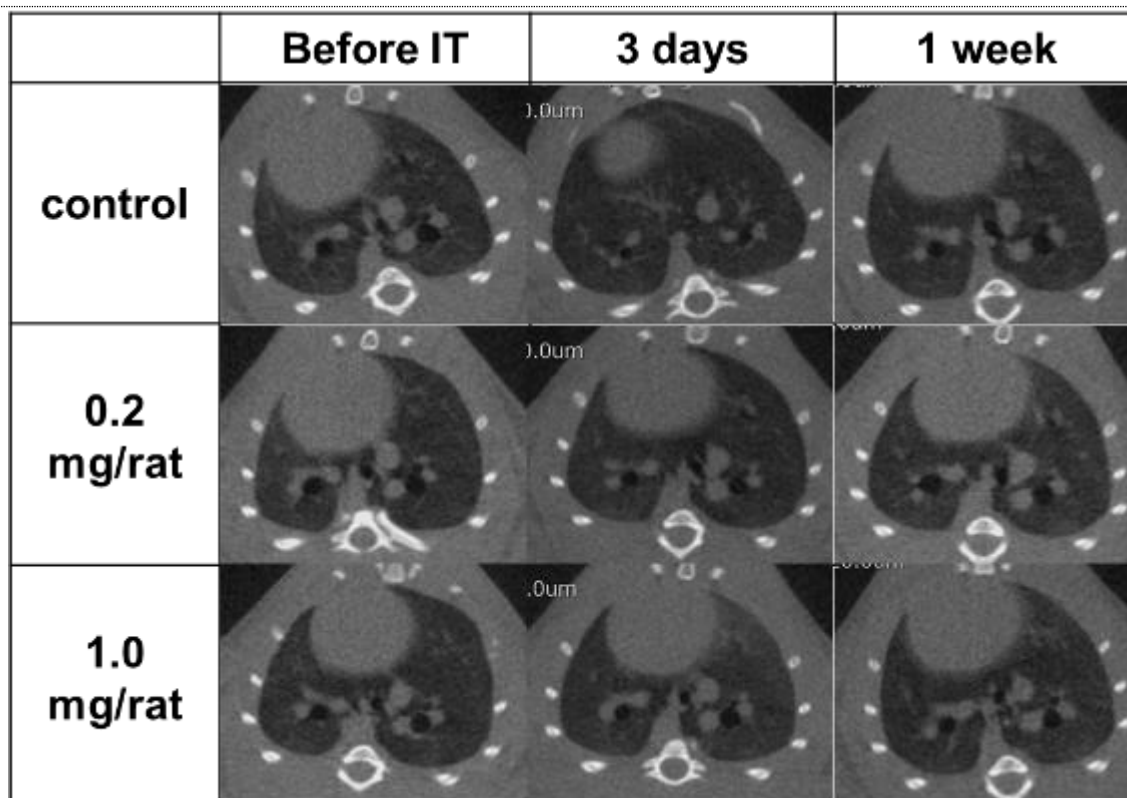
(B)気管内注入試験：ポリマー②（非架橋型ポリアクリル酸（分子量小））



Before IT : Before intratracheal instillation

図4 3D マイクロ CT

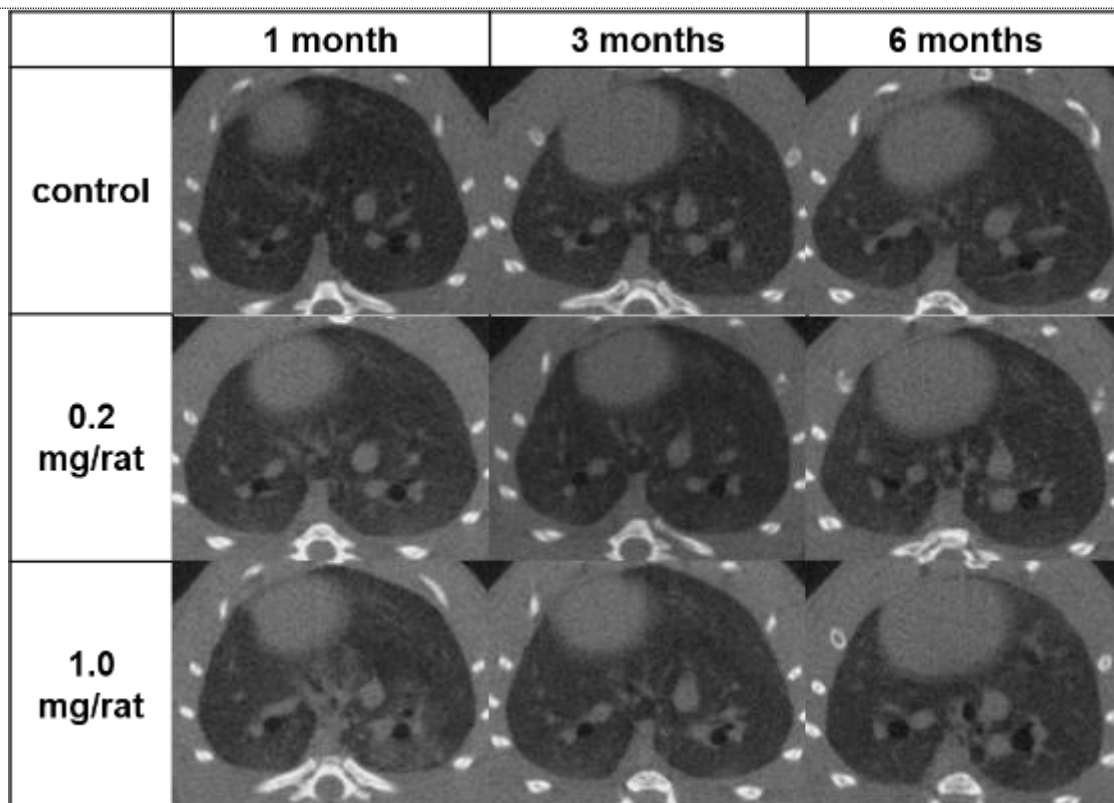
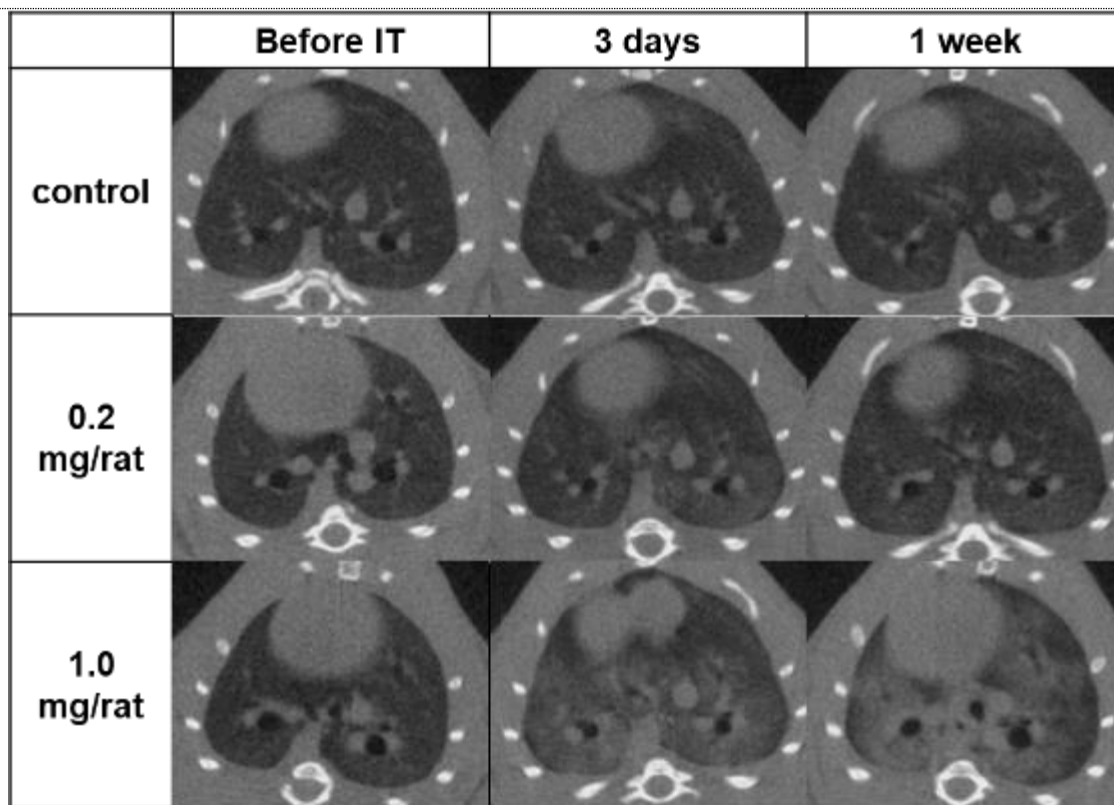
(C)気管内注入試験：ポリマー③（非架橋型ポリエチレンオキシド）



Before IT : Before intratracheal instillation

図4 3D マイクロ CT

(D)気管内注入試験：ポリマー④（非架橋型ポリアクリル酸ナトリウム）



Before IT : Before intratracheal instillation

図5 気管支肺胞洗浄液の解析；炎症細胞（総細胞数）

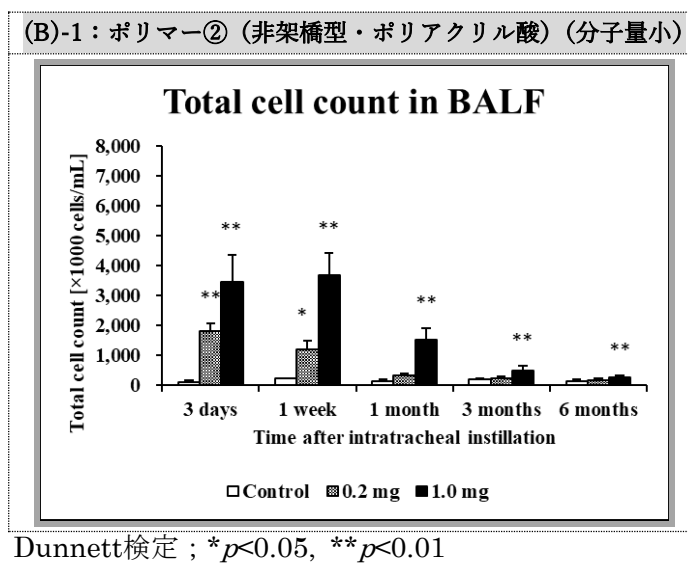
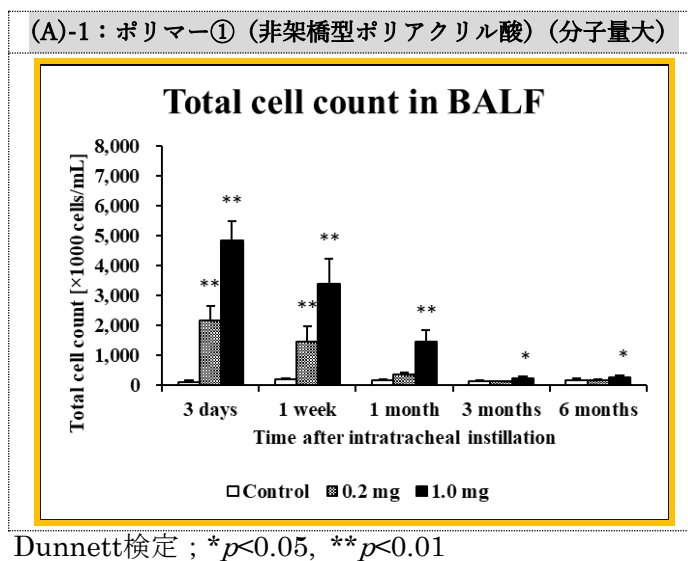
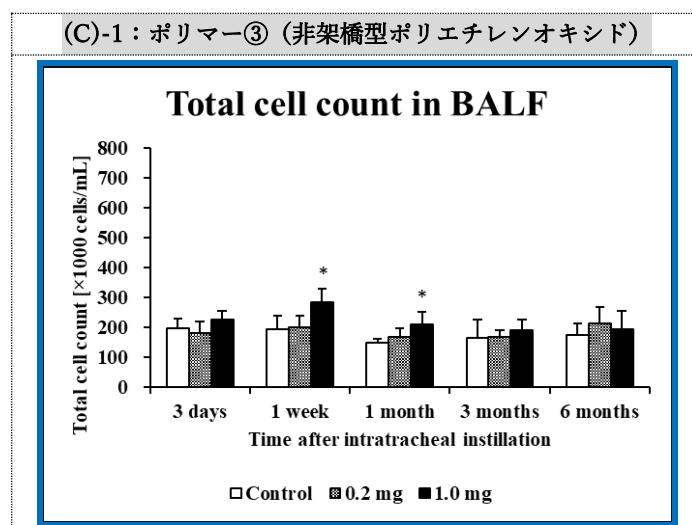
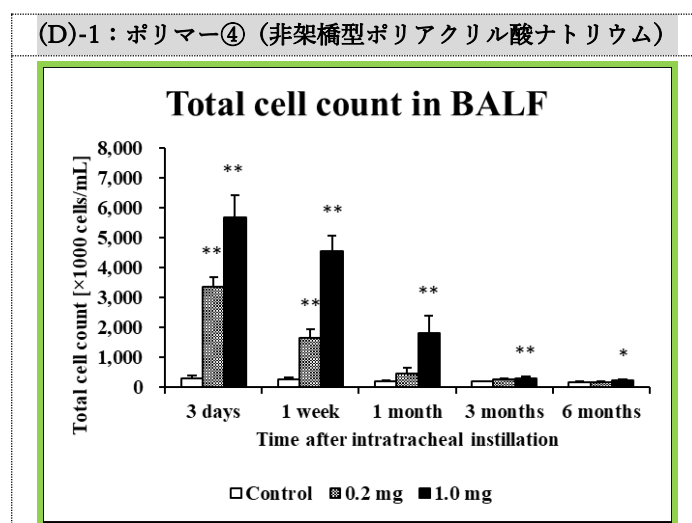


図5 気管支肺胞洗浄液の解析；炎症細胞（総細胞数）



Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$



Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

図6 気管支肺胞洗浄液の解析；炎症細胞（好中球数）

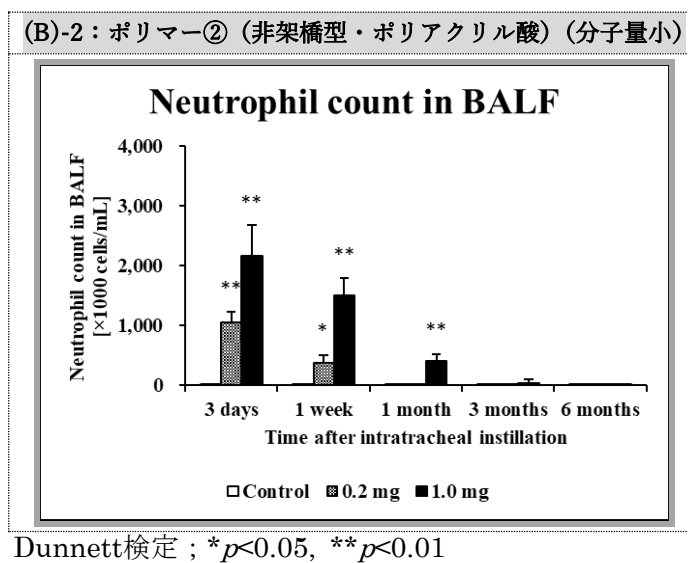
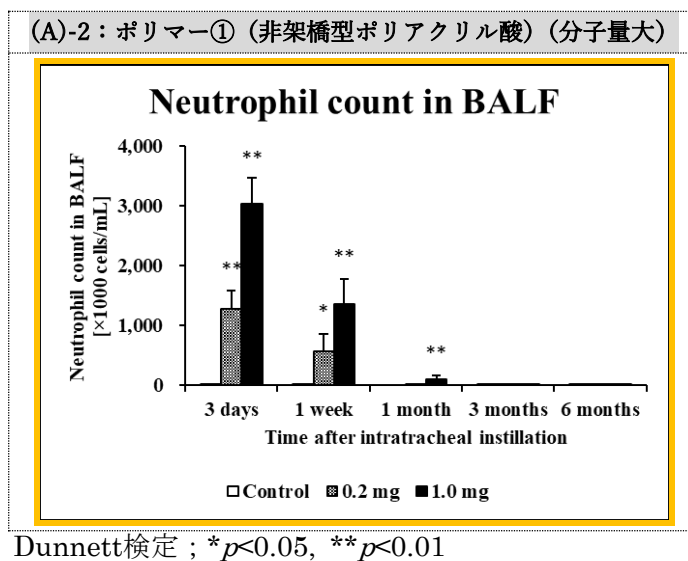
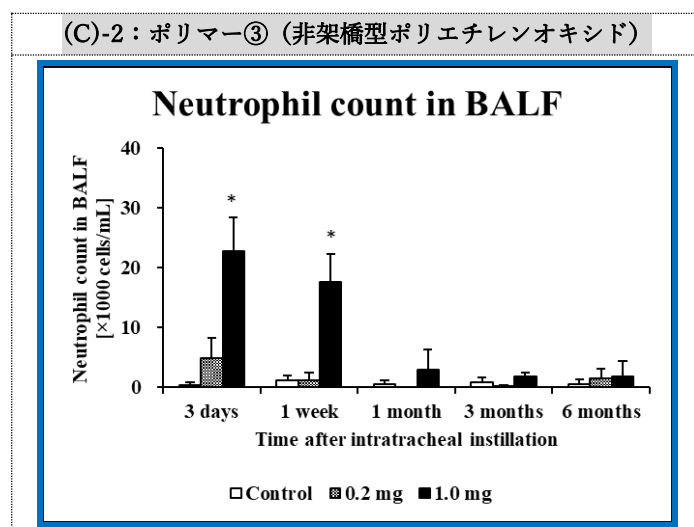
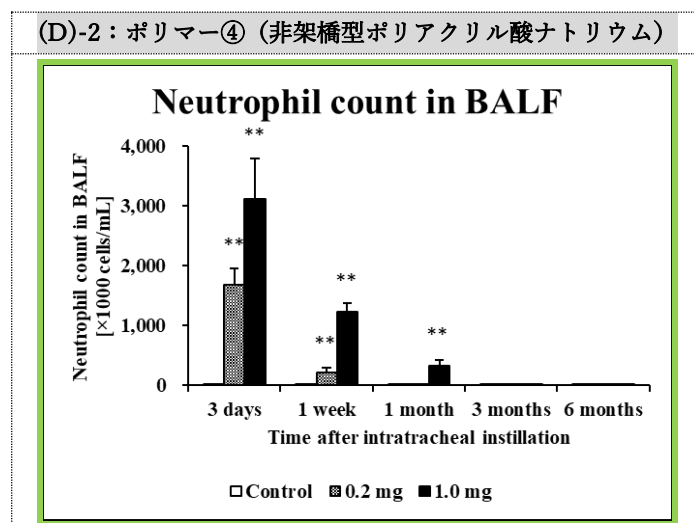


図6 気管支肺胞洗浄液の解析；炎症細胞（好中球数）

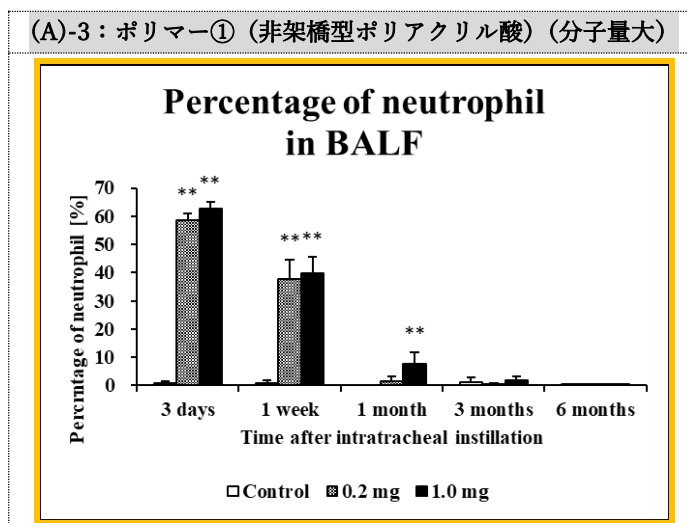


Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

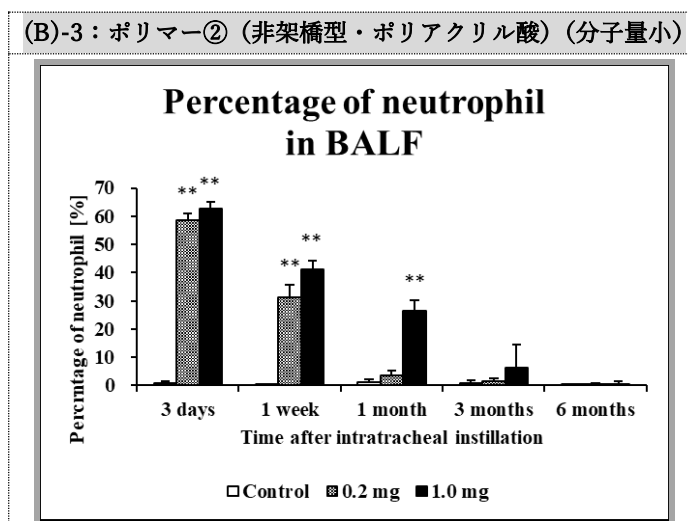


Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

図7 気管支肺胞洗浄液の解析；炎症細胞（好中球割合）

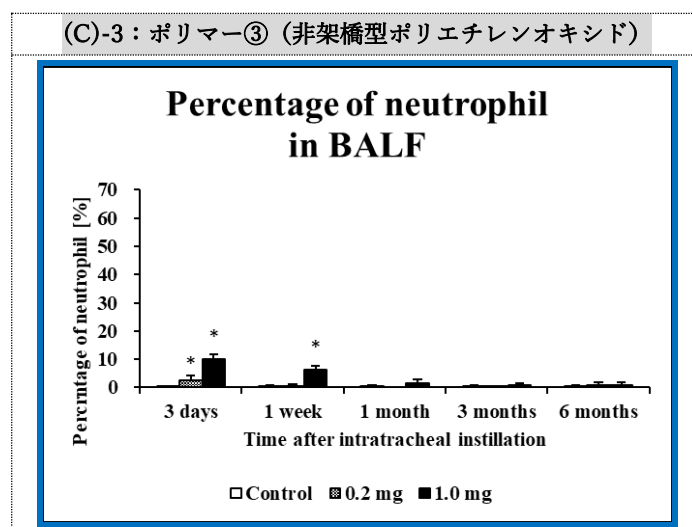


Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

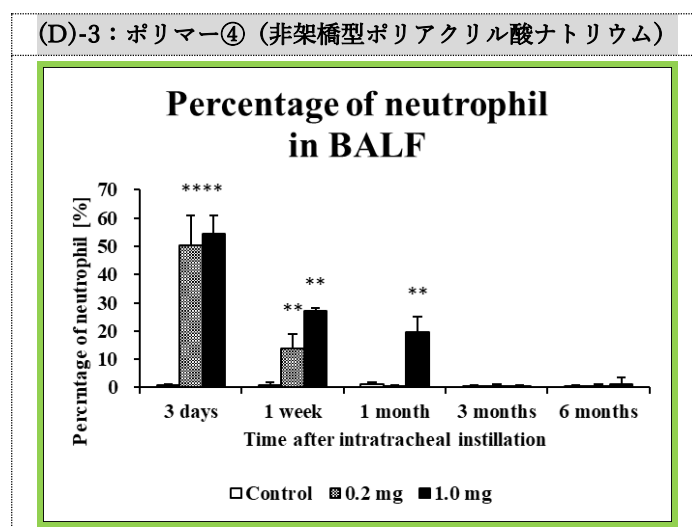


Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

図7 気管支肺胞洗浄液の解析；炎症細胞（好中球割合）

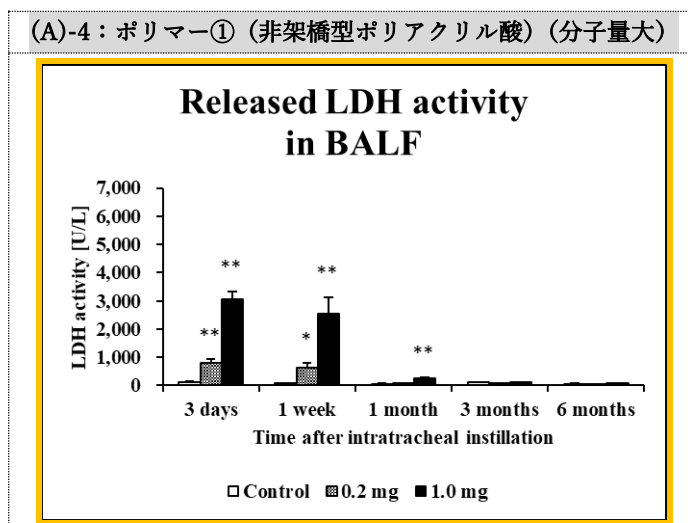


Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

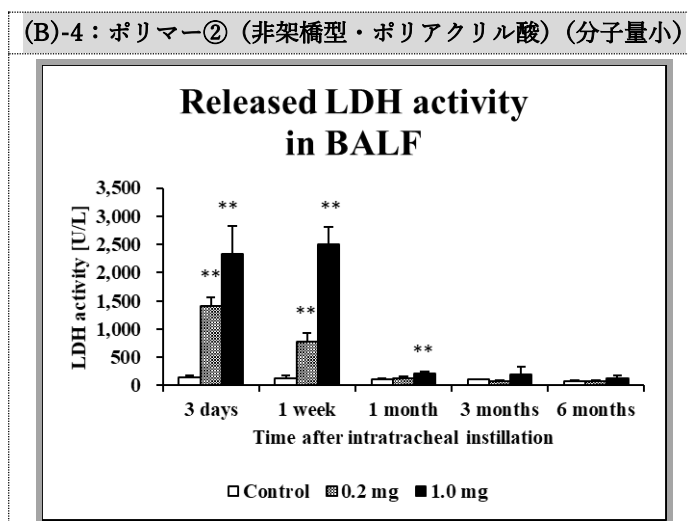


Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

図8 気管支肺胞洗浄液の解析；細胞傷害性のマーカー

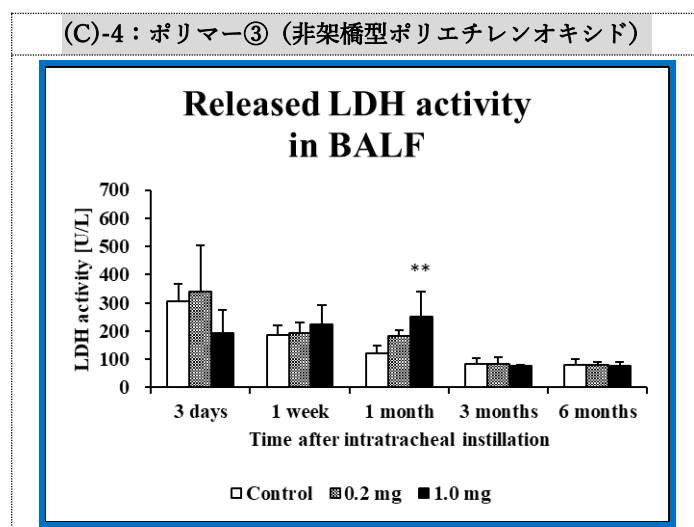


Dunnett検定；** $p<0.01$, * $p<0.05$

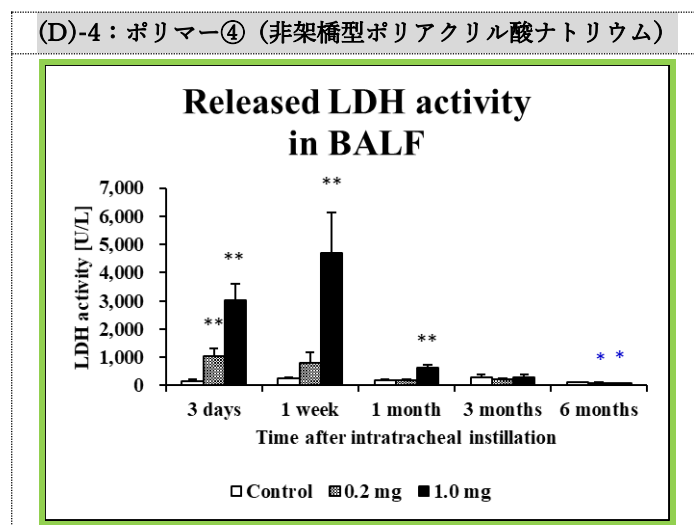


Dunnett検定；** $p<0.01$, * $p<0.05$

図8 気管支肺胞洗浄液の解析；細胞傷害性のマーカー



Dunnett検定；** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

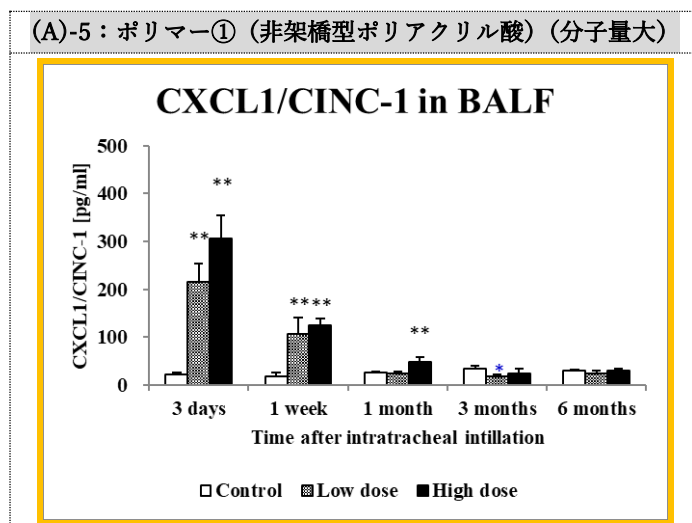


Dunnett 検定；

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な増加）

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な減少）

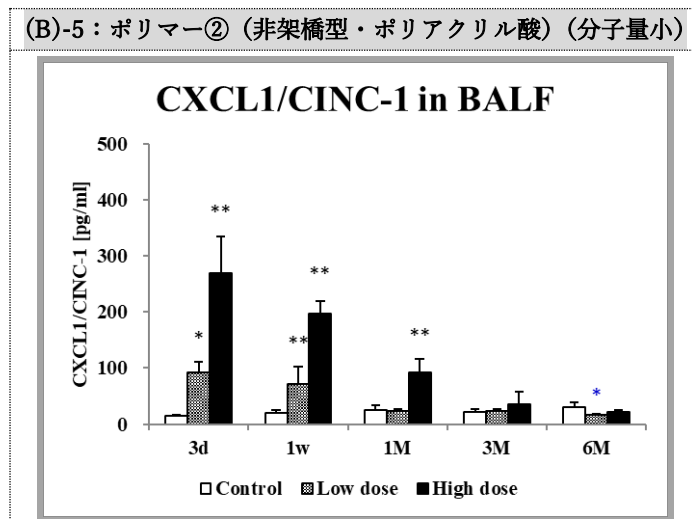
図9 気管支肺胞洗浄液の解析；好中球走化性因子（CINC-1）



Dunnett 検定；

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な増加）

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な減少）

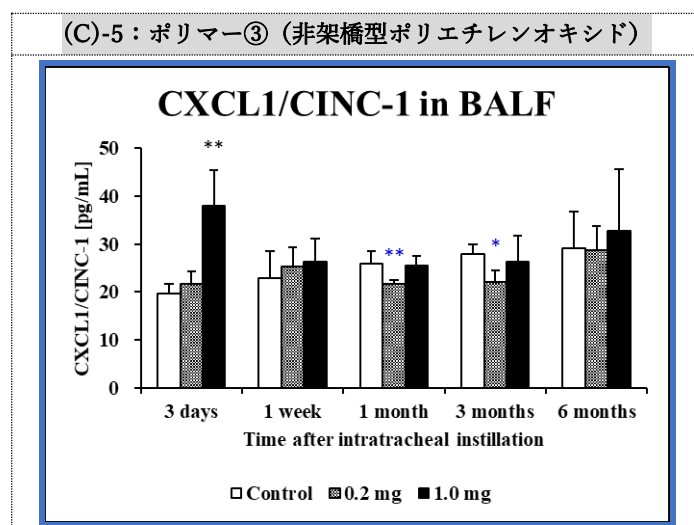


Dunnett 検定；

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な増加）

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な減少）

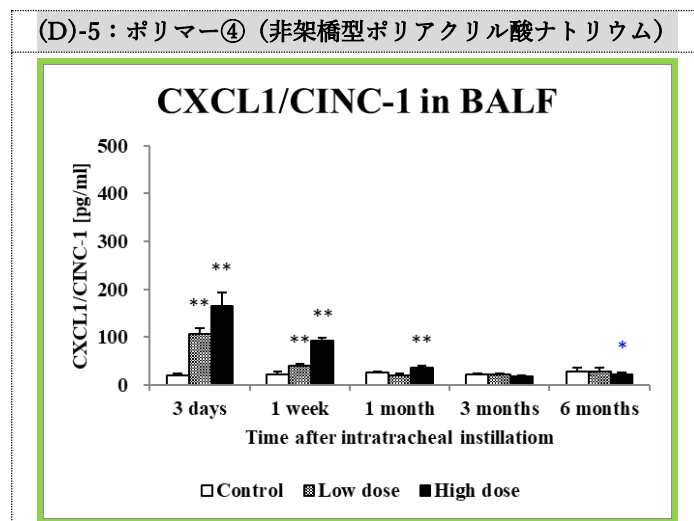
図9 気管支肺胞洗浄液の解析；好中球走化性因子（CINC-1）



Dunnett 検定；

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な増加）

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な減少）

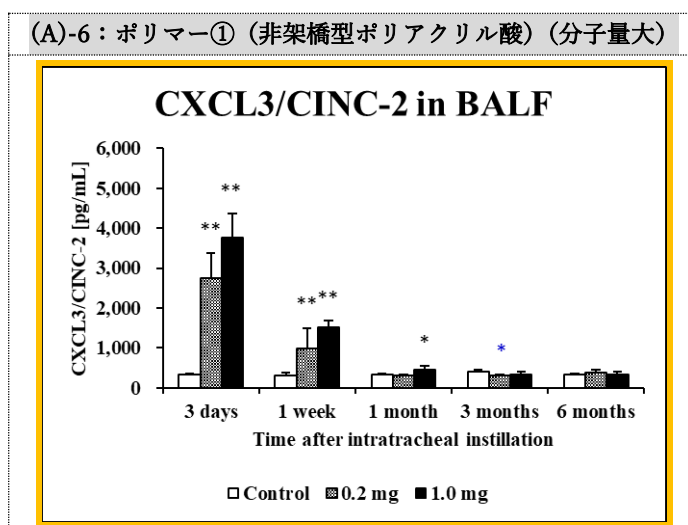


Dunnett 検定；

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な増加）

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な減少）

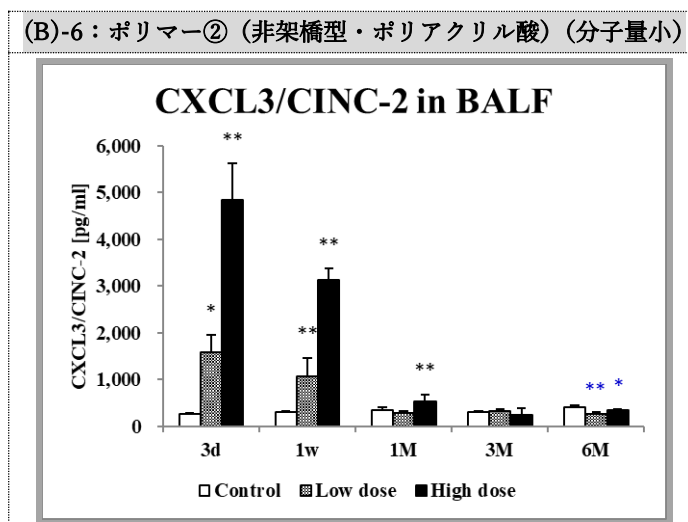
図 1 0 気管支肺胞洗浄液の解析；好中球走化性因子（CINC-2）



Dunnett 検定；

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な増加）

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な減少）

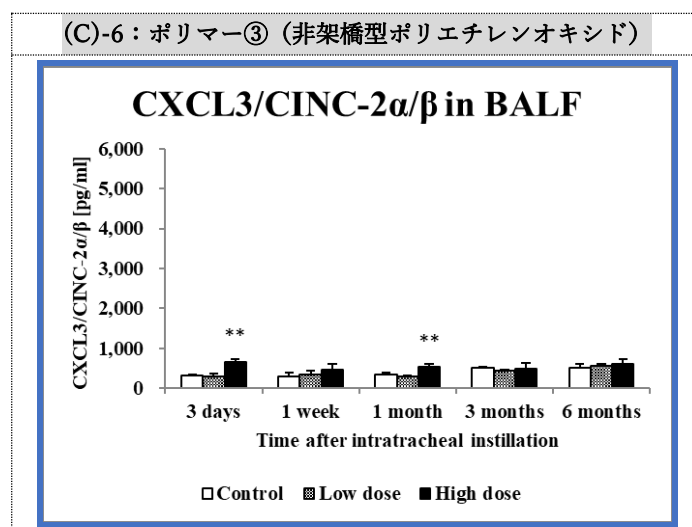


Dunnett 検定；

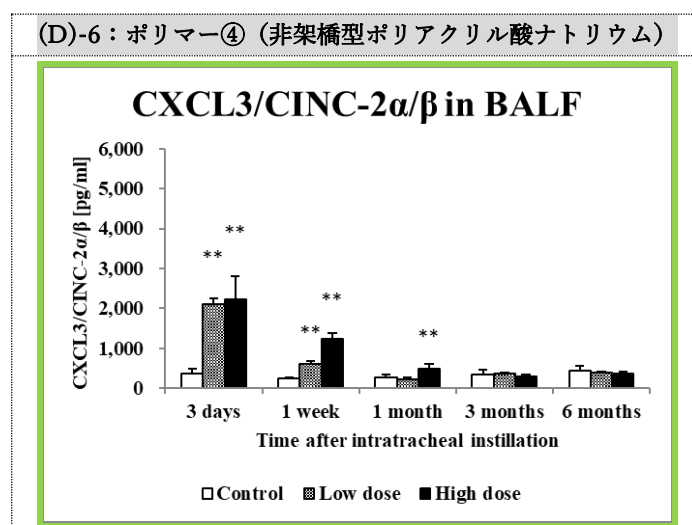
** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な増加）

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ （対照群と比較し、有意な減少）

図 1 0 気管支肺胞洗浄液の解析；好中球走化性因子（CINC-2）

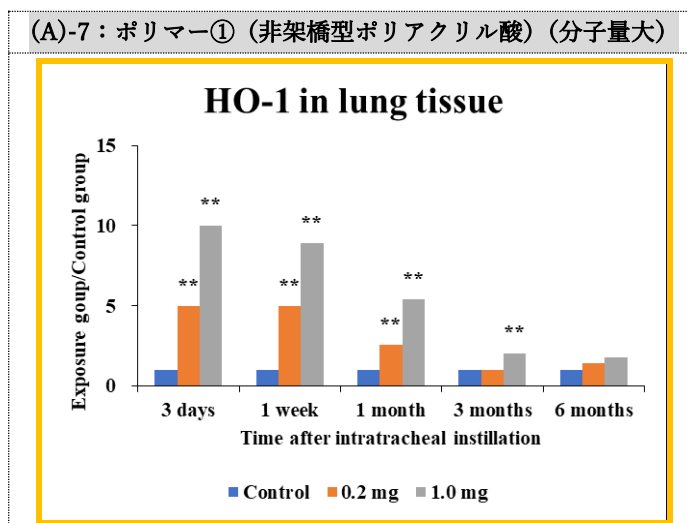


Dunnett検定；** $p<0.01$, * $p<0.05$



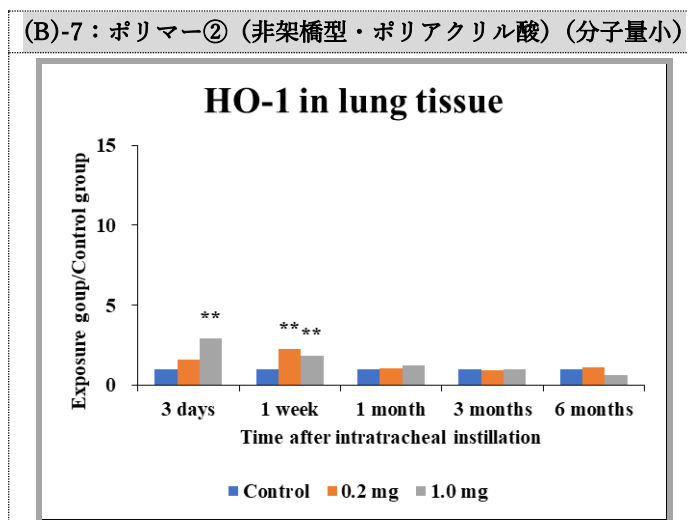
Dunnett検定；** $p<0.01$, * $p<0.05$

図 1 1 肺組織の解析；酸化ストレスのマーカー



Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

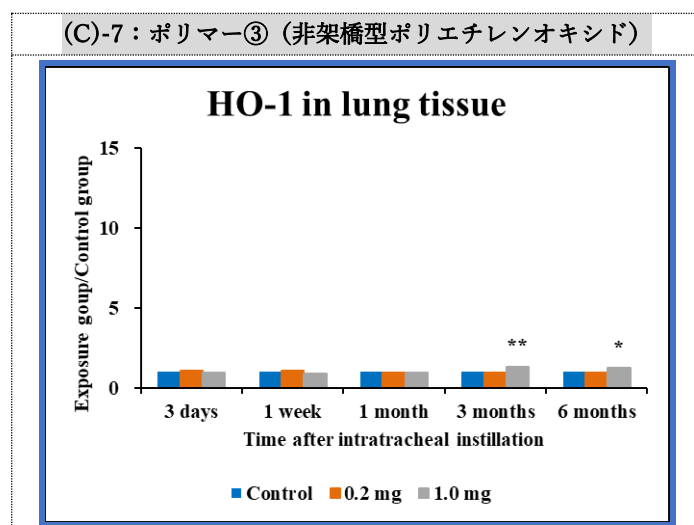
*実験進行中に、従来使用していたHO-1測定試薬が販売中止となったため、ポリマー③および④は、新たな試薬で測定した。従って、対照群との比によって比較を行っている。



Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

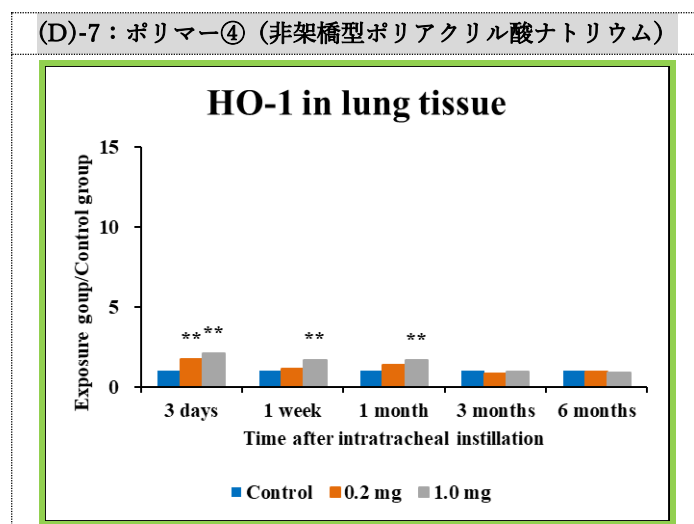
*実験進行中に、従来使用していたHO-1測定試薬が販売中止となったため、ポリマー③および④は、新たな試薬で測定した。従って、対照群との比によって比較を行っている。

図 1 1 肺組織の解析；酸化ストレスのマーカー



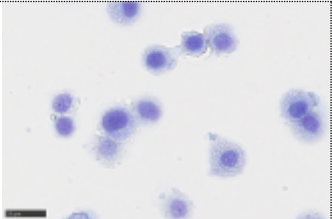
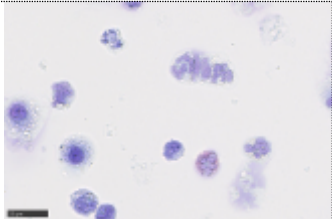
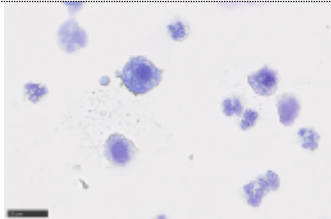
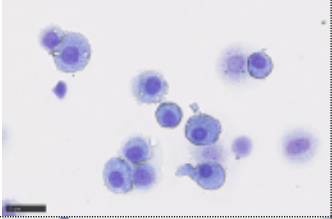
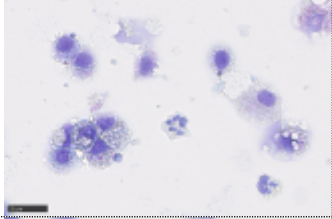
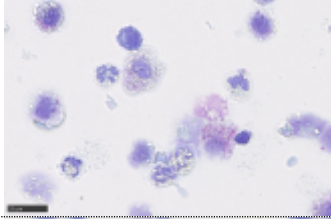
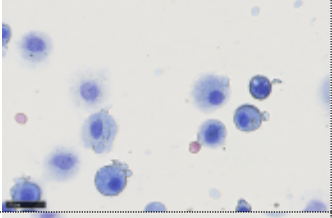
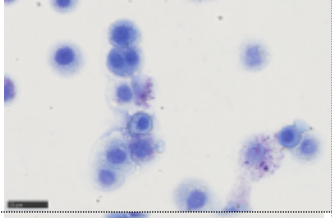
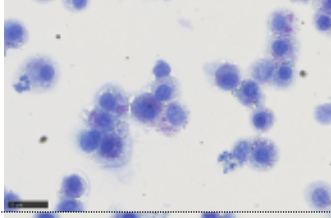
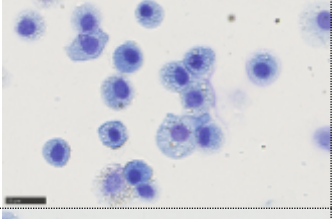
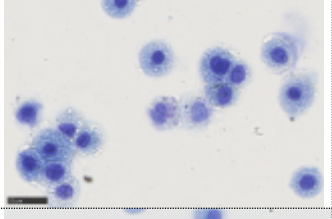
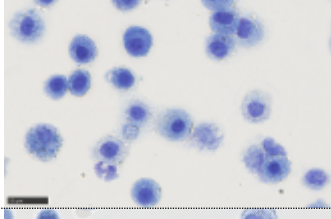
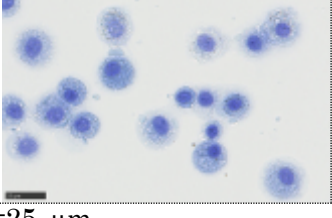
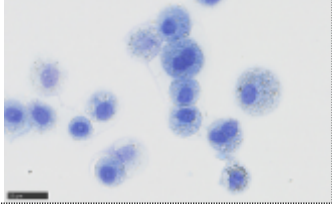
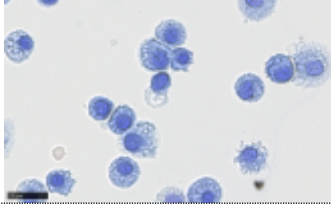
Dunnett検定；* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

*実験進行中に、従来使用していた HO-1 測定試薬が販売中止となったため、ポリマー③および④は、新たな試薬で測定した。従って、対照群との比によって比較を行っている。

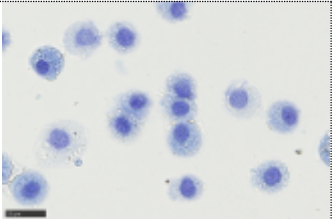
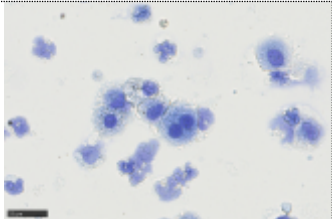
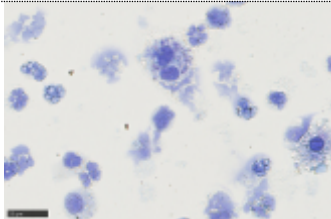
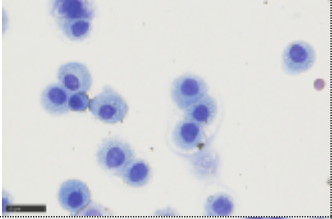
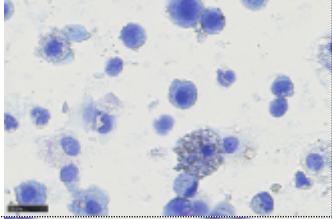
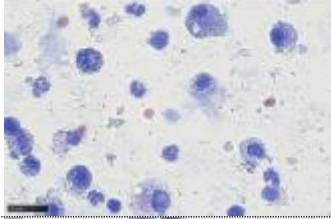
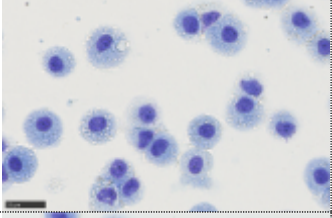
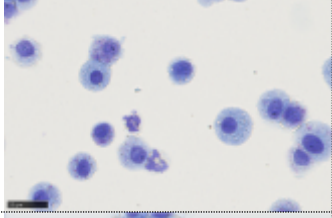
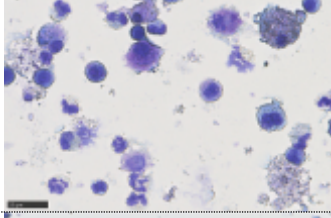
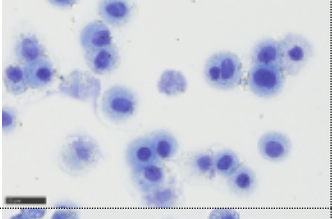
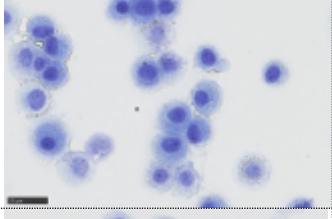
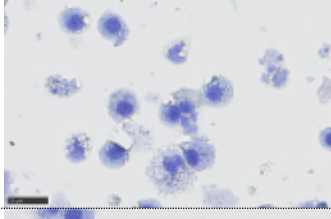
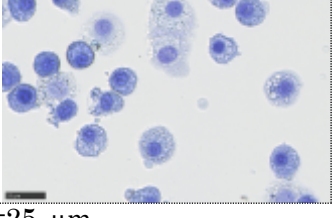
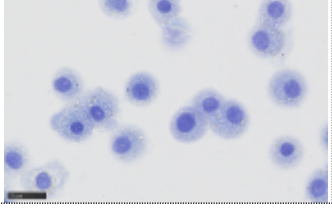
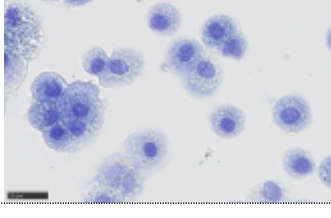


Dunnett検定；* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

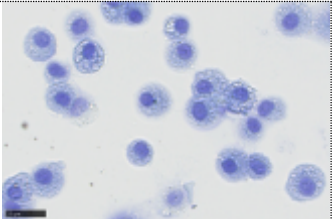
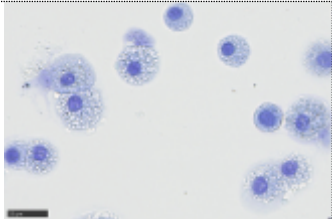
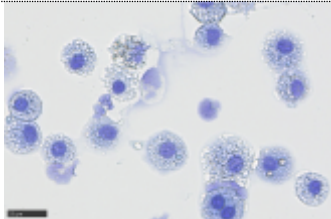
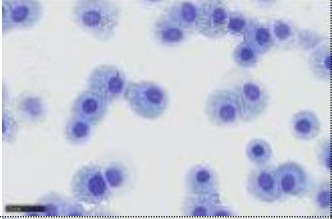
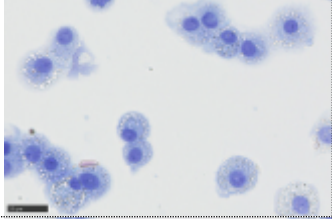
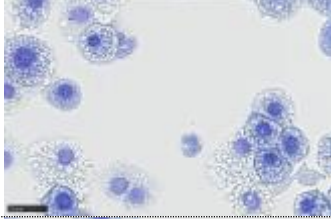
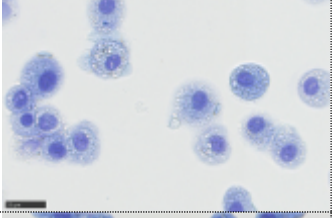
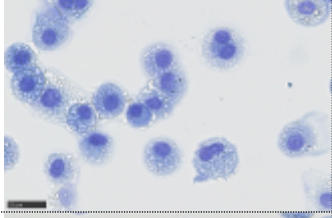
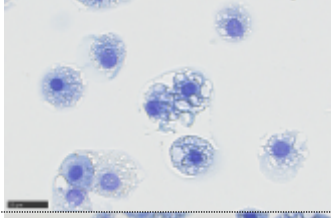
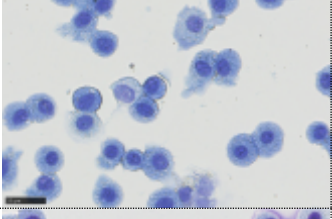
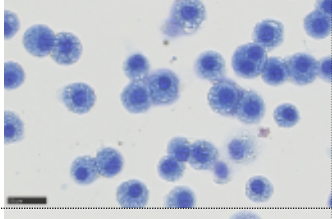
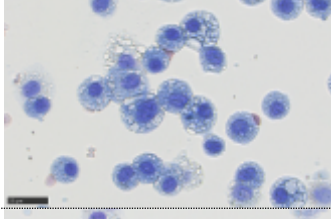
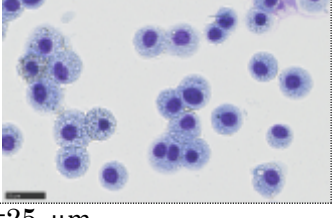
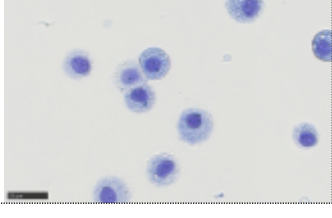
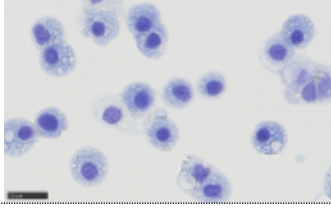
*実験進行中に、従来使用していたHO-1測定試薬が販売中止となったため、ポリマー③および④は、新たな試薬で測定した。従って、対照群との比によって比較を行っている。

図 1 2 サイトスピン所見			
(A) ポリマ ー①	Control	0.2 mg/rat	1.0 mg/rat
3 days			
1 week			
1 month			
3 months			
6 months			

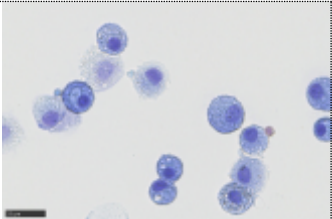
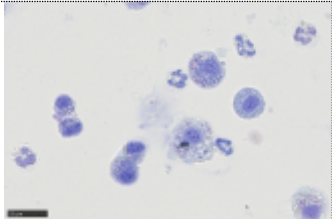
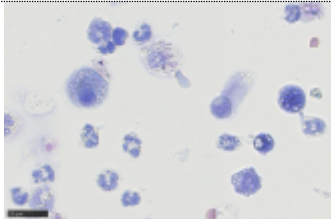
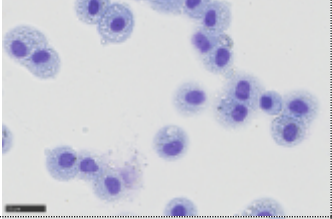
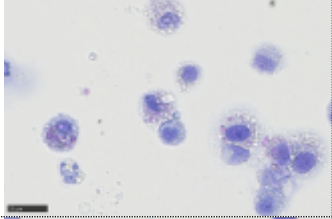
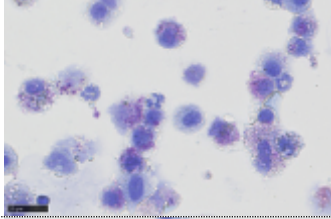
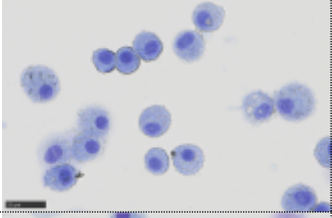
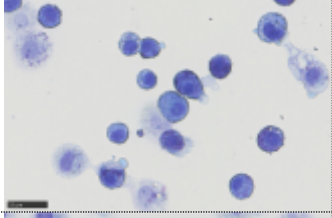
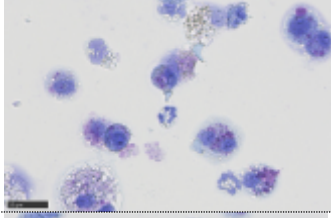
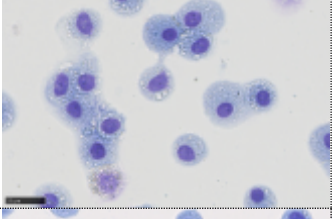
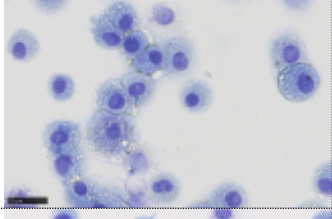
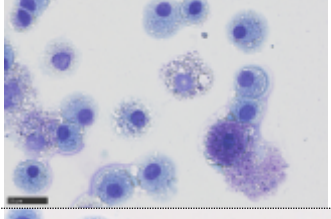
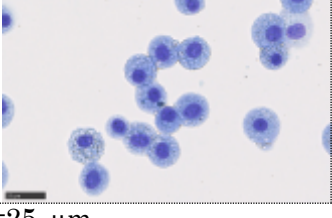
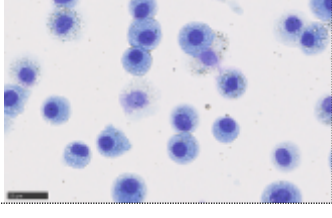
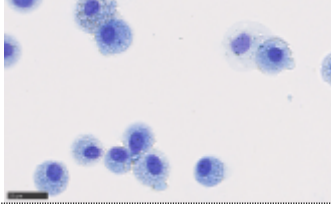
Scale bar=25 μ m

図 1 2 サイトスピン所見			
(B) ポリマ ー②	Control	0.2 mg/rat	1.0 mg/rat
3 days			
1 week			
1 month			
3 months			
6 months			

Scale bar=25 μ m

図 1 2 サイトスピン所見			
(C) ポリマ ー③	Control	0.2 mg/rat	1.0 mg/rat
3 days			
1 week			
1 month			
3 months			
6 months			

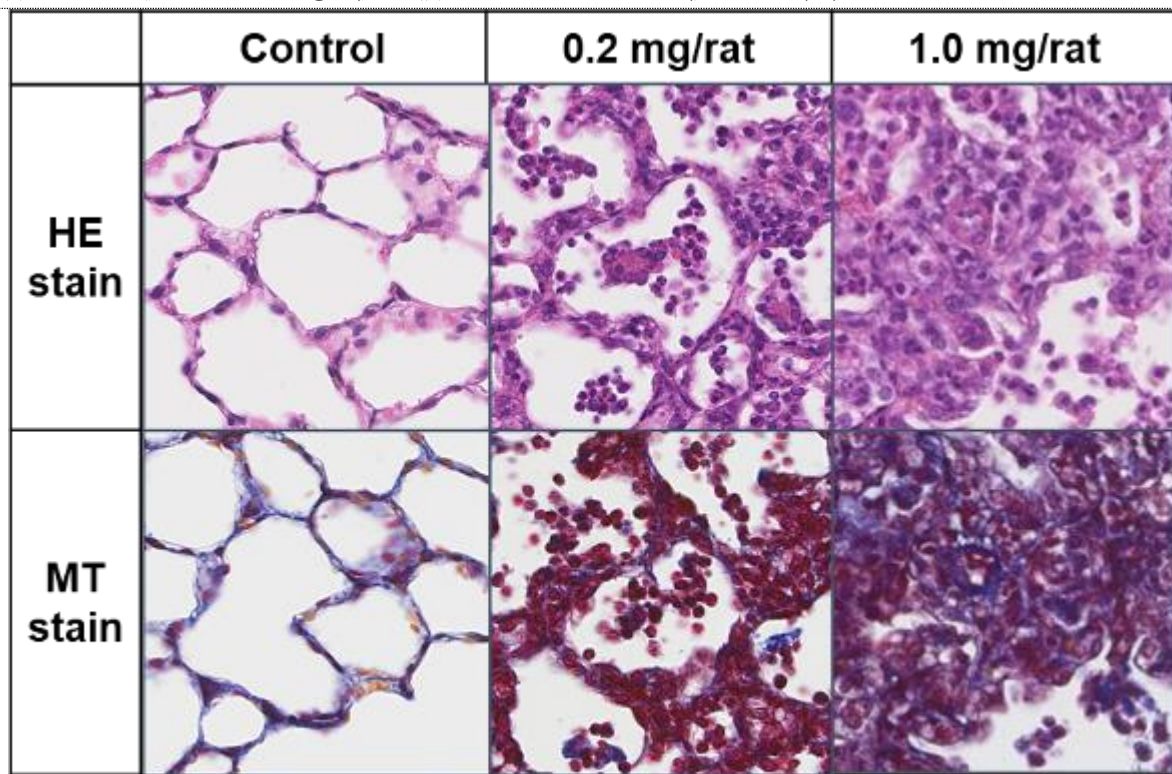
Scale bar=25 μ m

図 1 2 サイトスピン所見			
(D) ポリマ ー④	Control	0.2 mg/rat	1.0 mg/rat
3 days			
1 week			
1 month			
3 months			
6 months			

Scale bar=25 μ m

図 1 3 肺病理組織

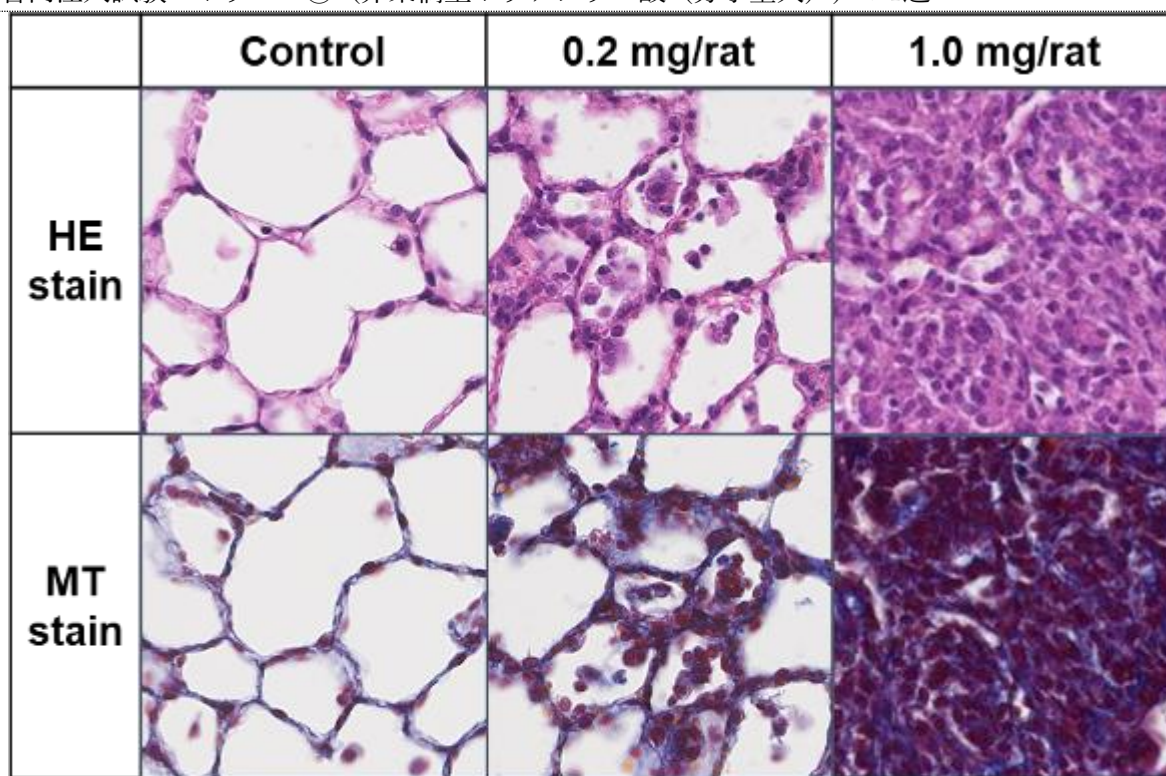
(A)気管内注入試験：ポリマー①（非架橋型ポリアクリル酸（分子量大））；3日



— 100 μ m

図 1 3 肺病理組織

(A)気管内注入試験：ポリマー①（非架橋型ポリアクリル酸（分子量大））；1週



100 μm

図 1 3 肺病理組織

(A)気管内注入試験：ポリマー①（非架橋型ポリアクリル酸（分子量大））；1ヶ月

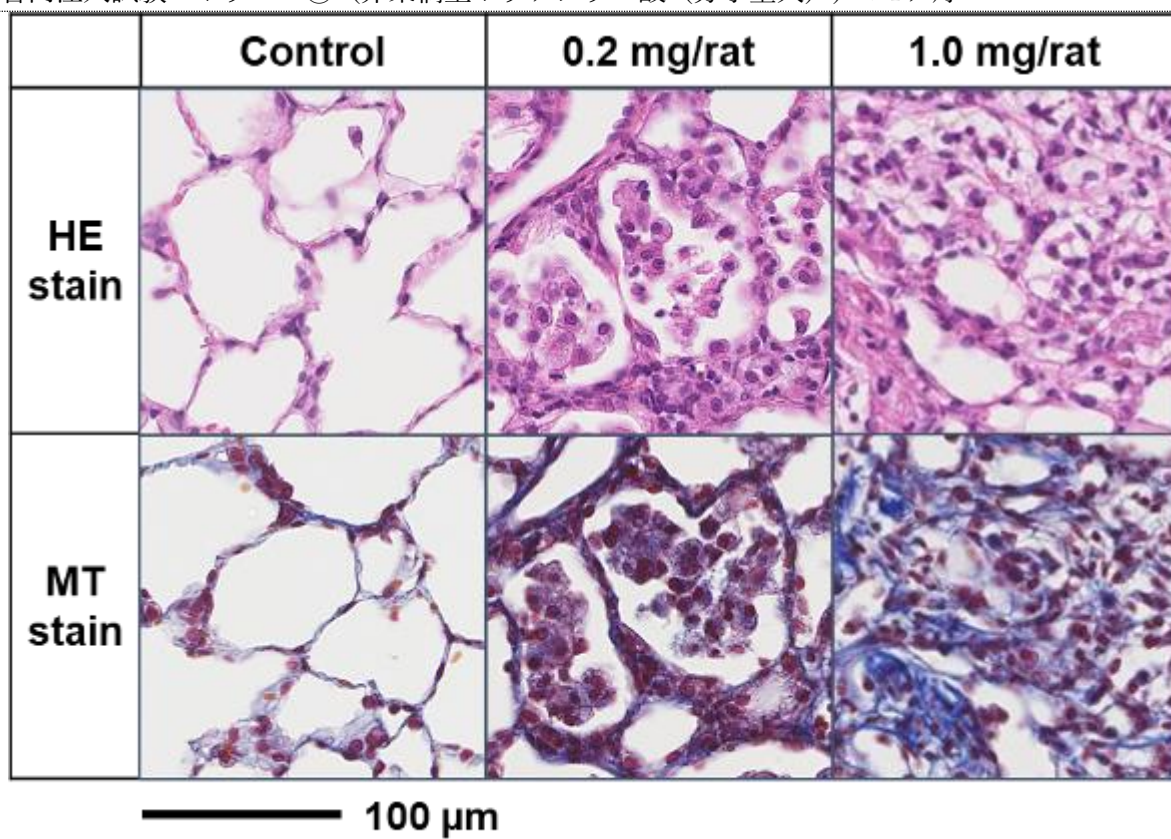
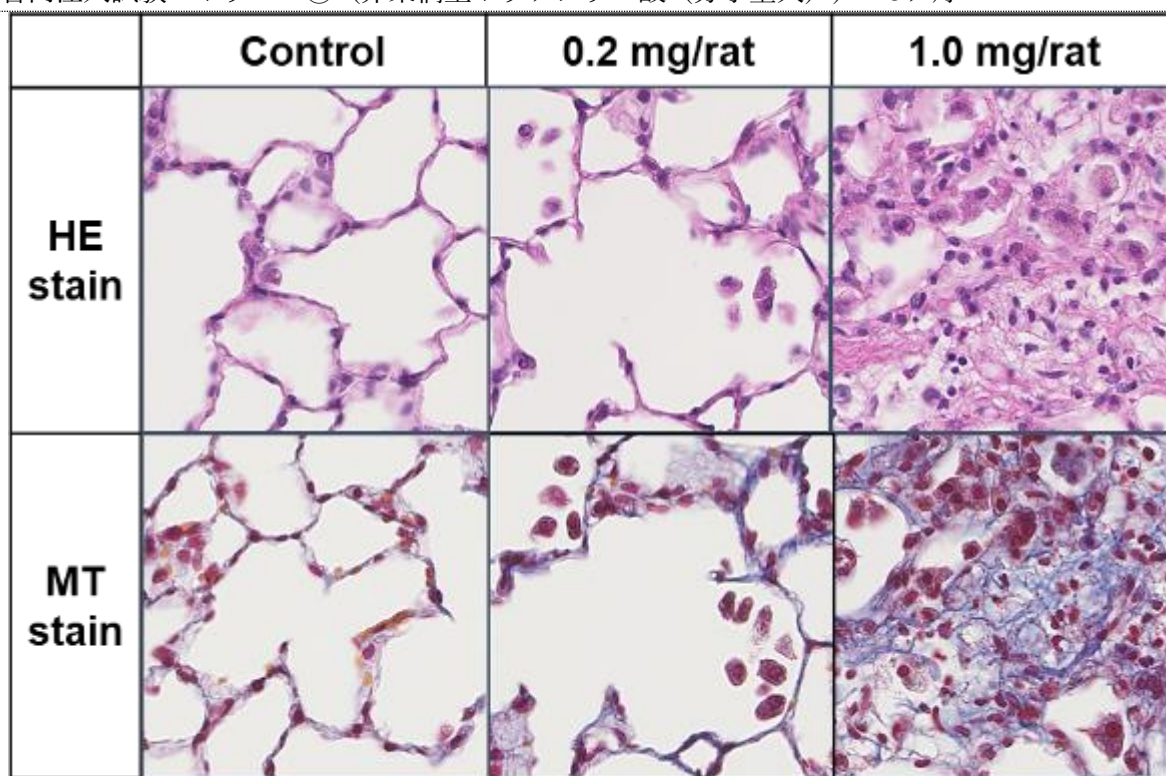


図 1 3 肺病理組織

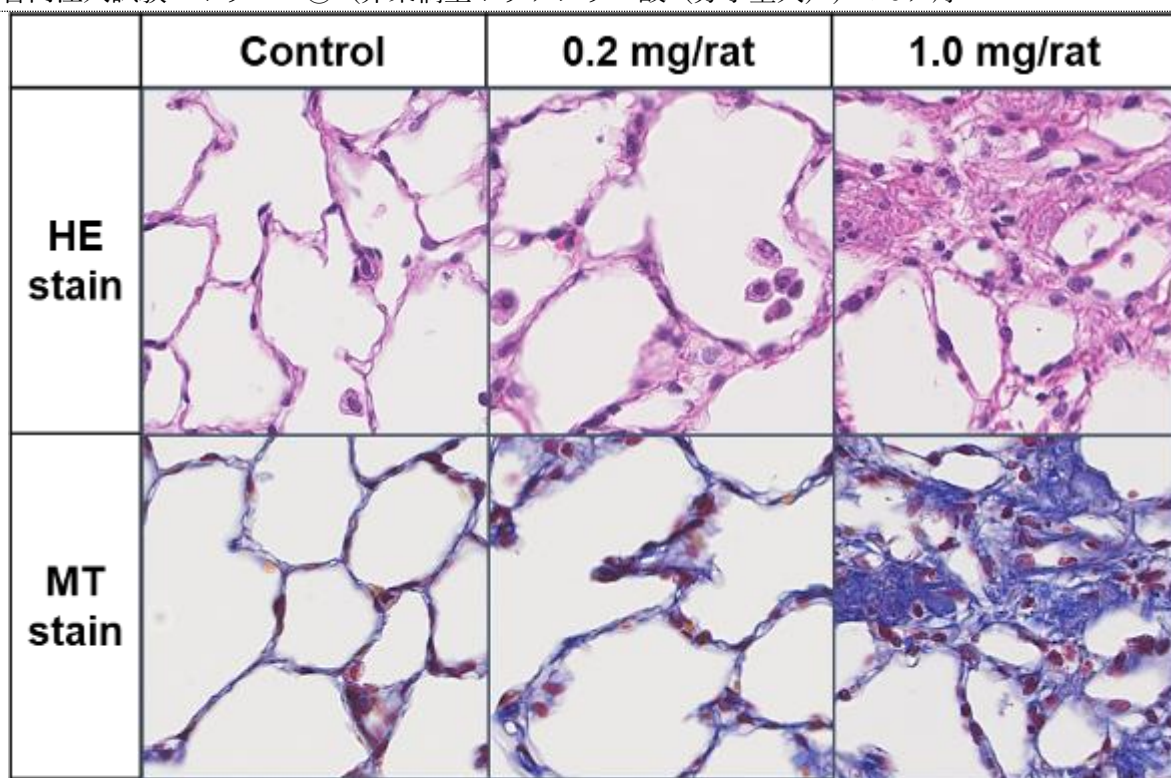
(A)気管内注入試験：ポリマー①（非架橋型ポリアクリル酸（分子量大））；3ヶ月



— 100 μm

図 1 3 肺病理組織

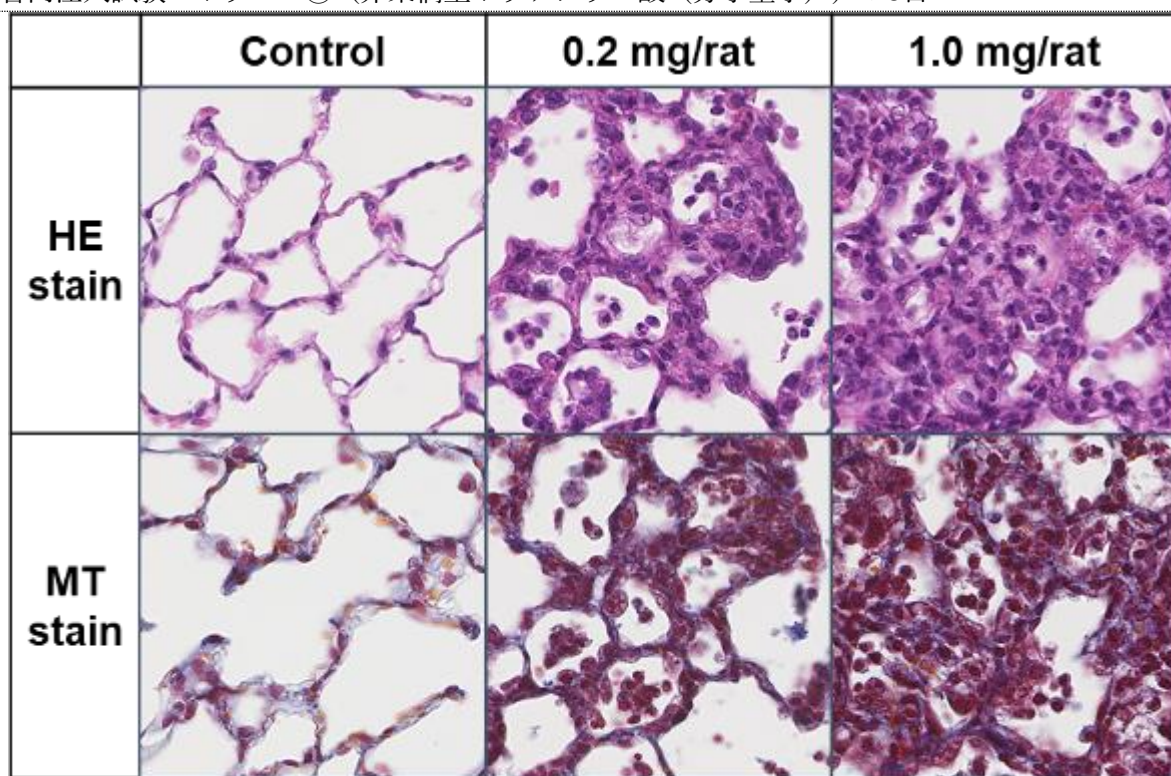
(A)気管内注入試験：ポリマー①（非架橋型ポリアクリル酸（分子量大））；6ヶ月



100 μm

図 1 3 肺病理組織

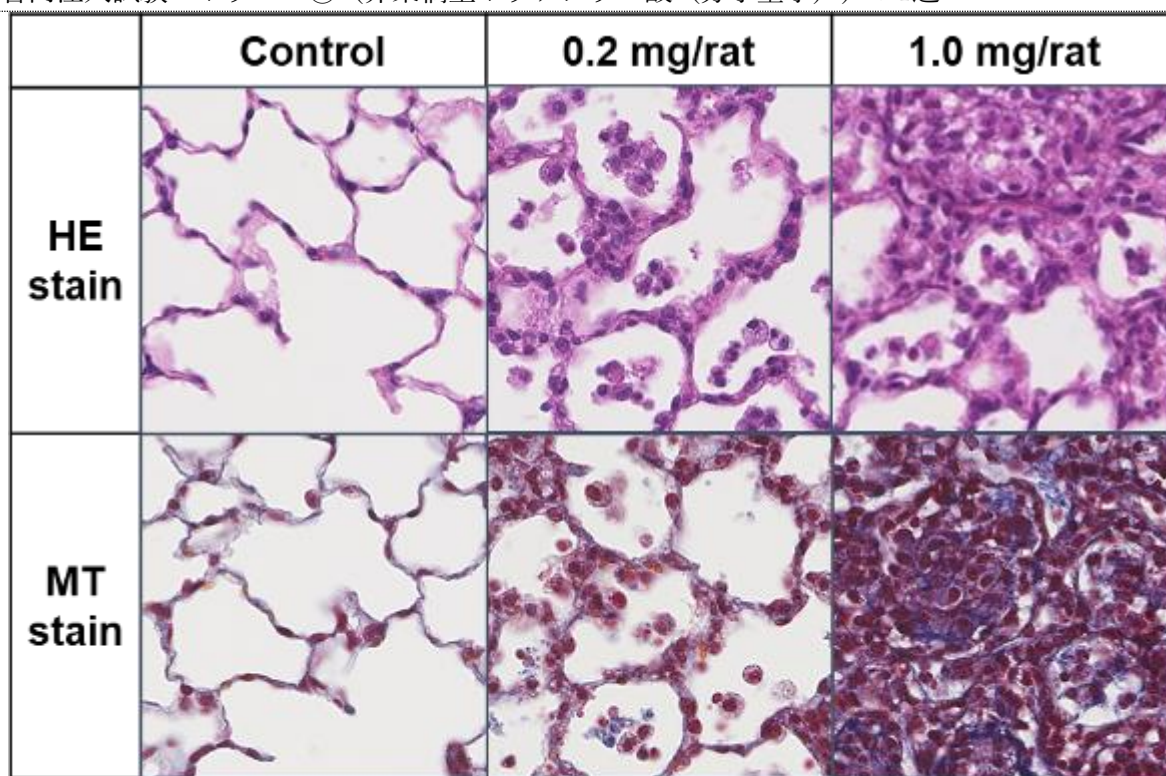
(B)気管内注入試験：ポリマー②（非架橋型ポリアクリル酸（分子量小））；3日



— 100 μm

図 1 3 肺病理組織

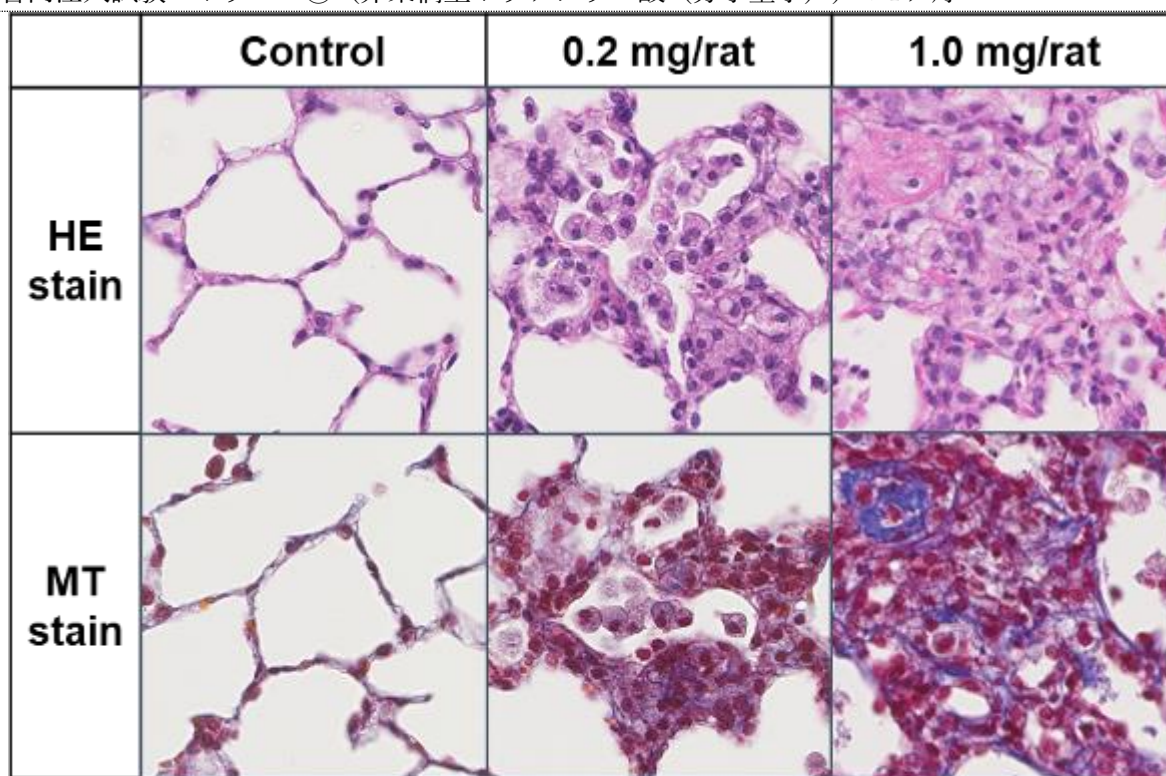
(B)気管内注入試験：ポリマー②（非架橋型ポリアクリル酸（分子量小））；1週



— 100 μm

図 1 3 肺病理組織

(B)気管内注入試験：ポリマー②（非架橋型ポリアクリル酸（分子量小））；1ヶ月



— 100 μm

図 1 3 肺病理組織

(B)気管内注入試験：ポリマー②（非架橋型ポリアクリル酸（分子量小））；3ヶ月

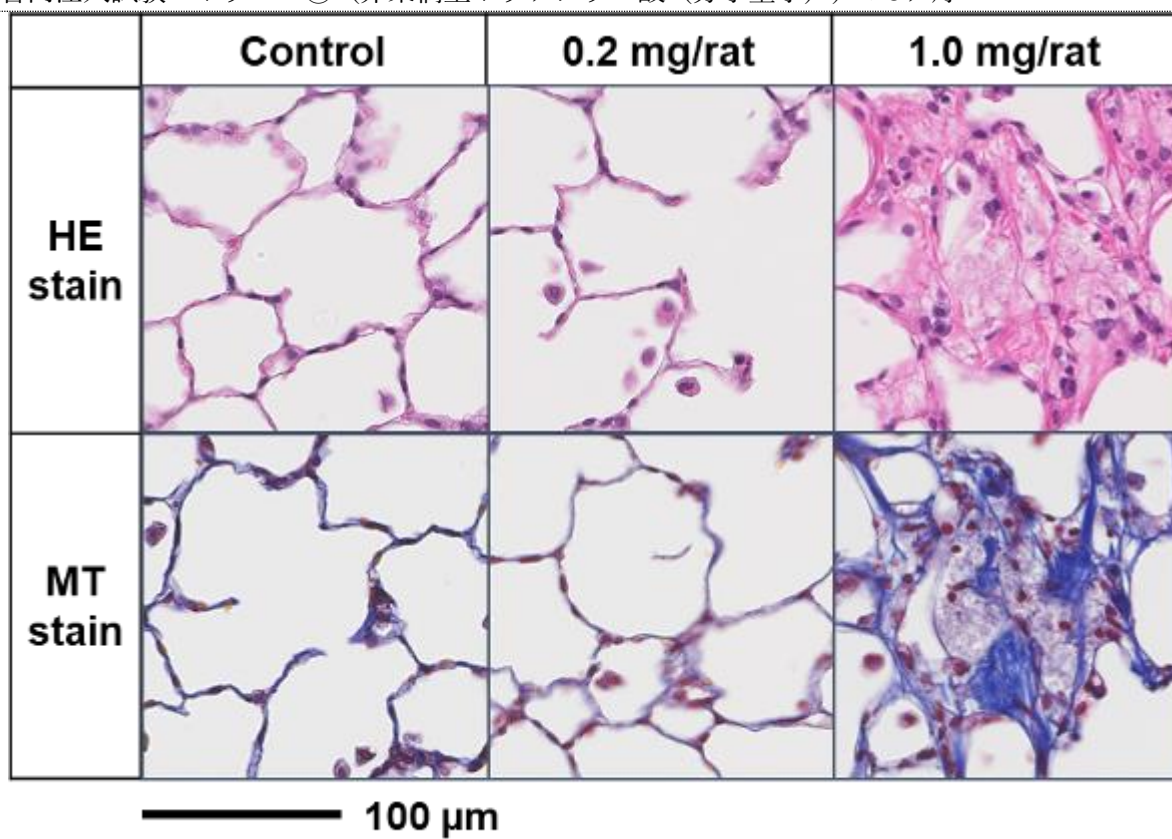


図 1 3 肺病理組織

(B)気管内注入試験：ポリマー②（非架橋型ポリアクリル酸（分子量小））；6ヶ月

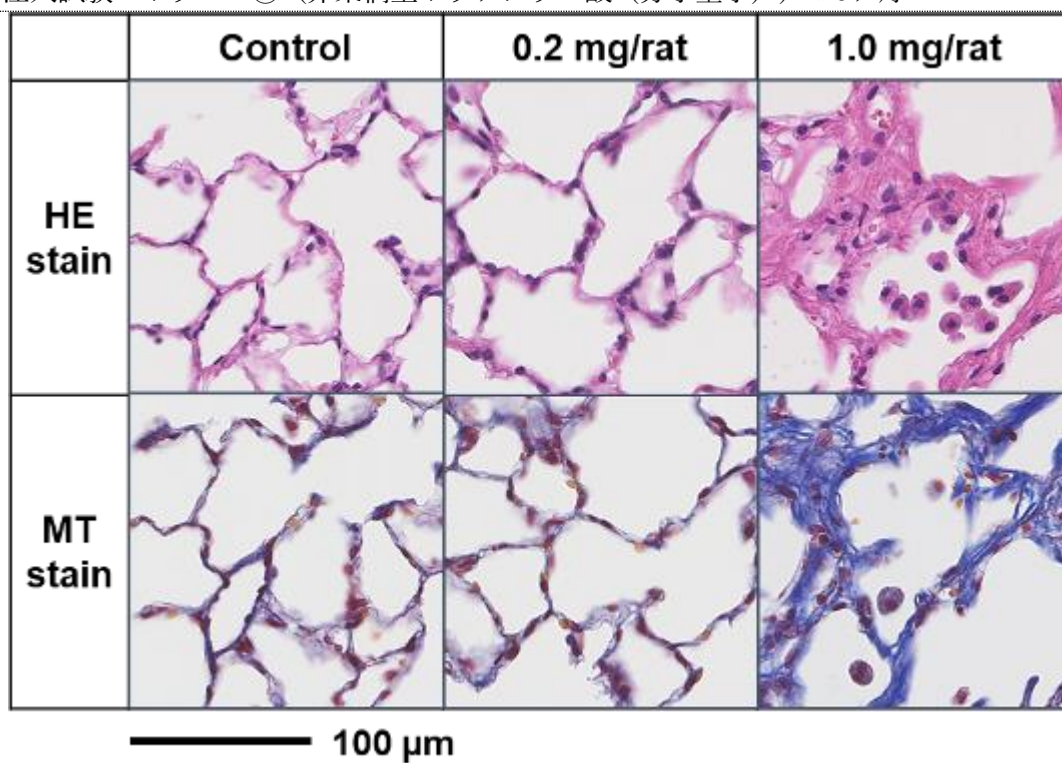
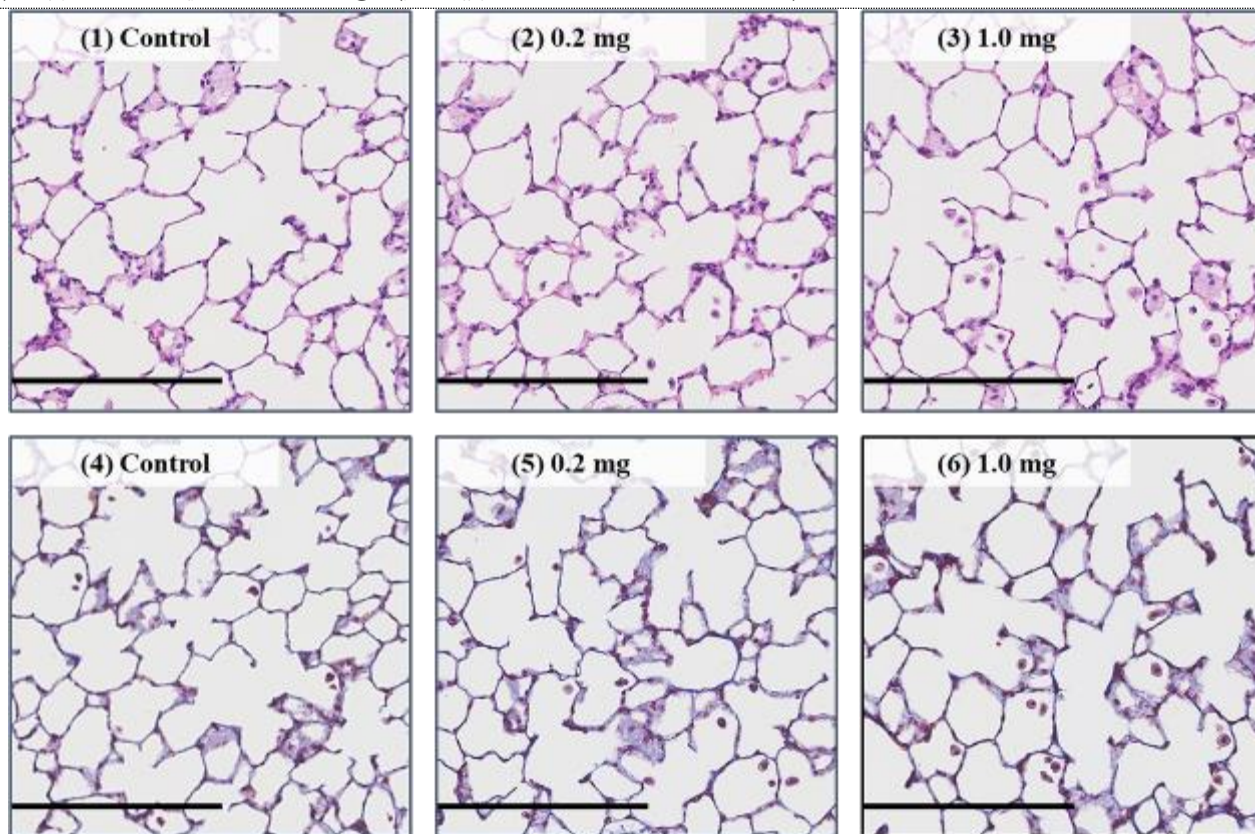


図 1 3 肺病理組織

(C)気管内注入試験：ポリマー③（非架橋型ポリエチレンオキシド）；3日



Scale bar= 250 μm

図 1 3 肺病理組織

(C)気管内注入試験：ポリマー③（非架橋型ポリエチレンオキシド）；1週

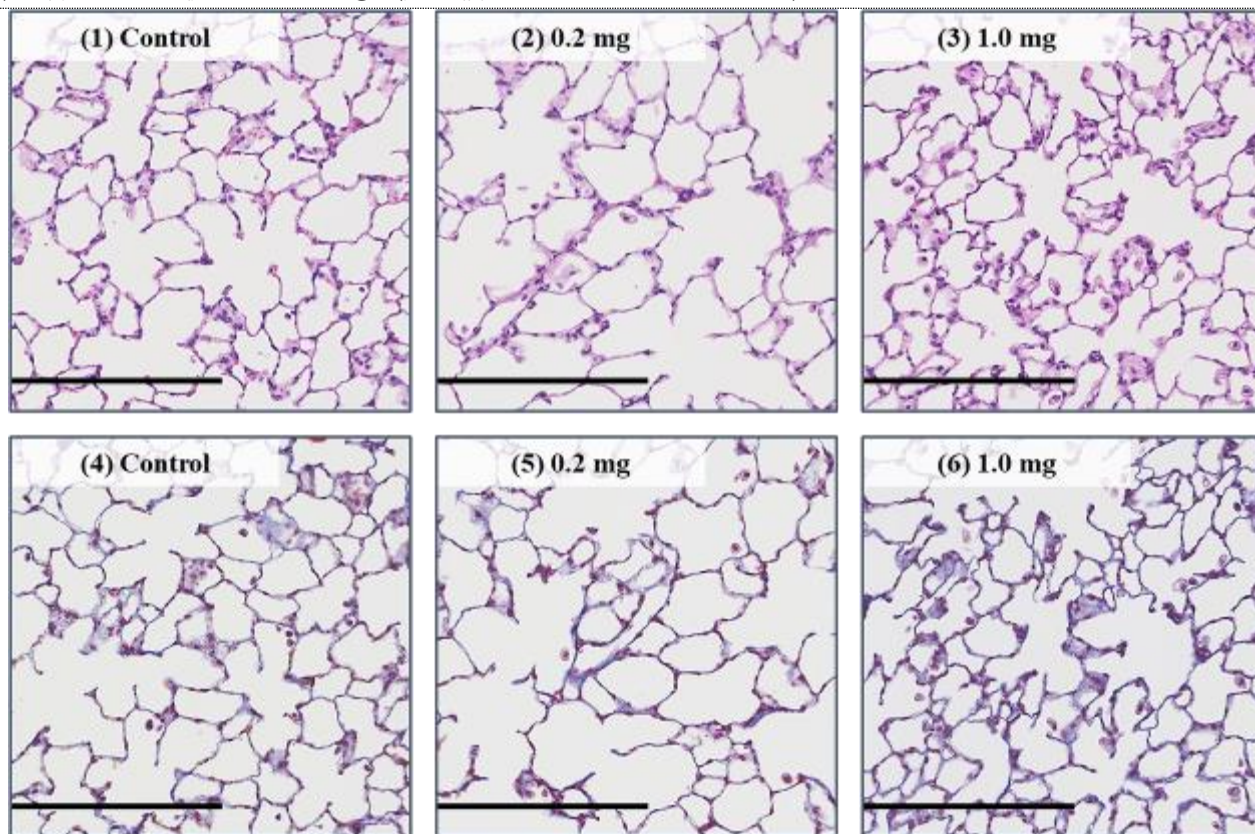


図 1 3 肺病理組織

(C)気管内注入試験：ポリマー③（非架橋型ポリエチレンオキシド）；1ヶ月

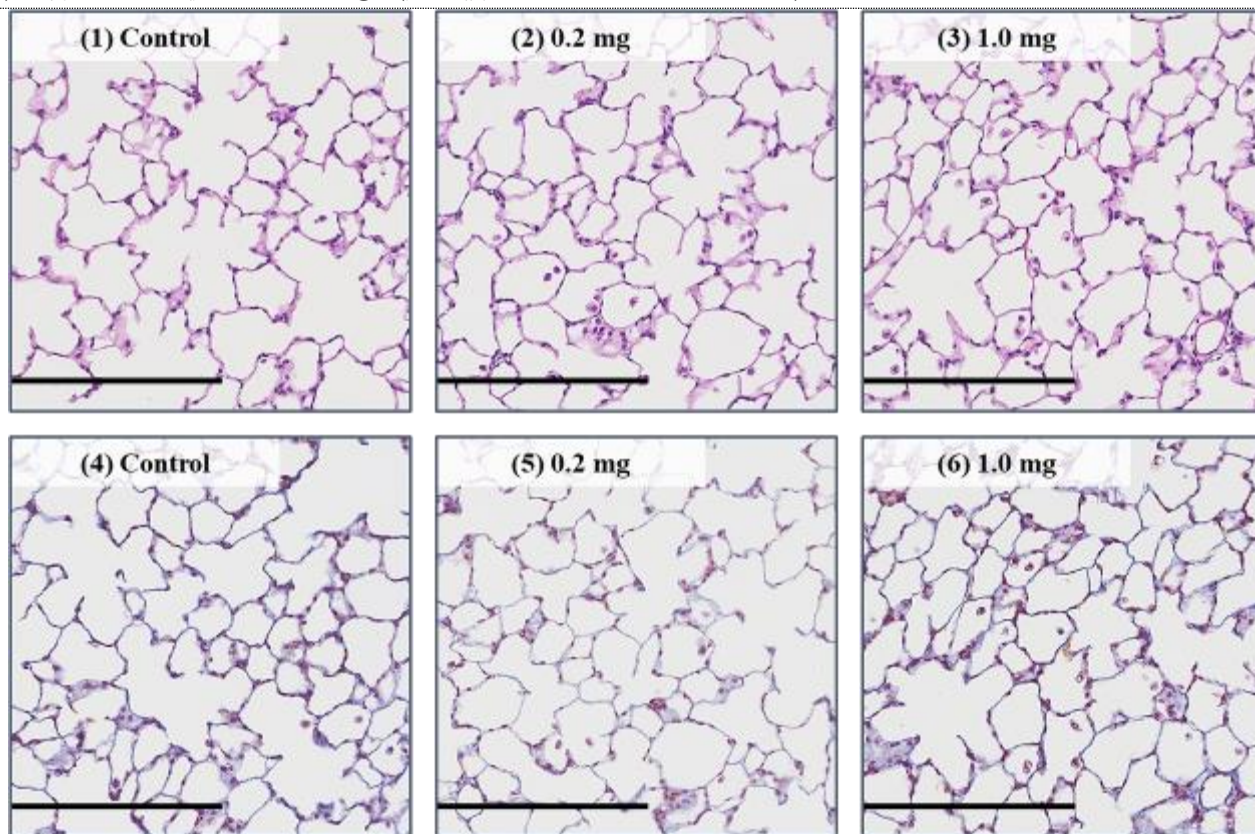
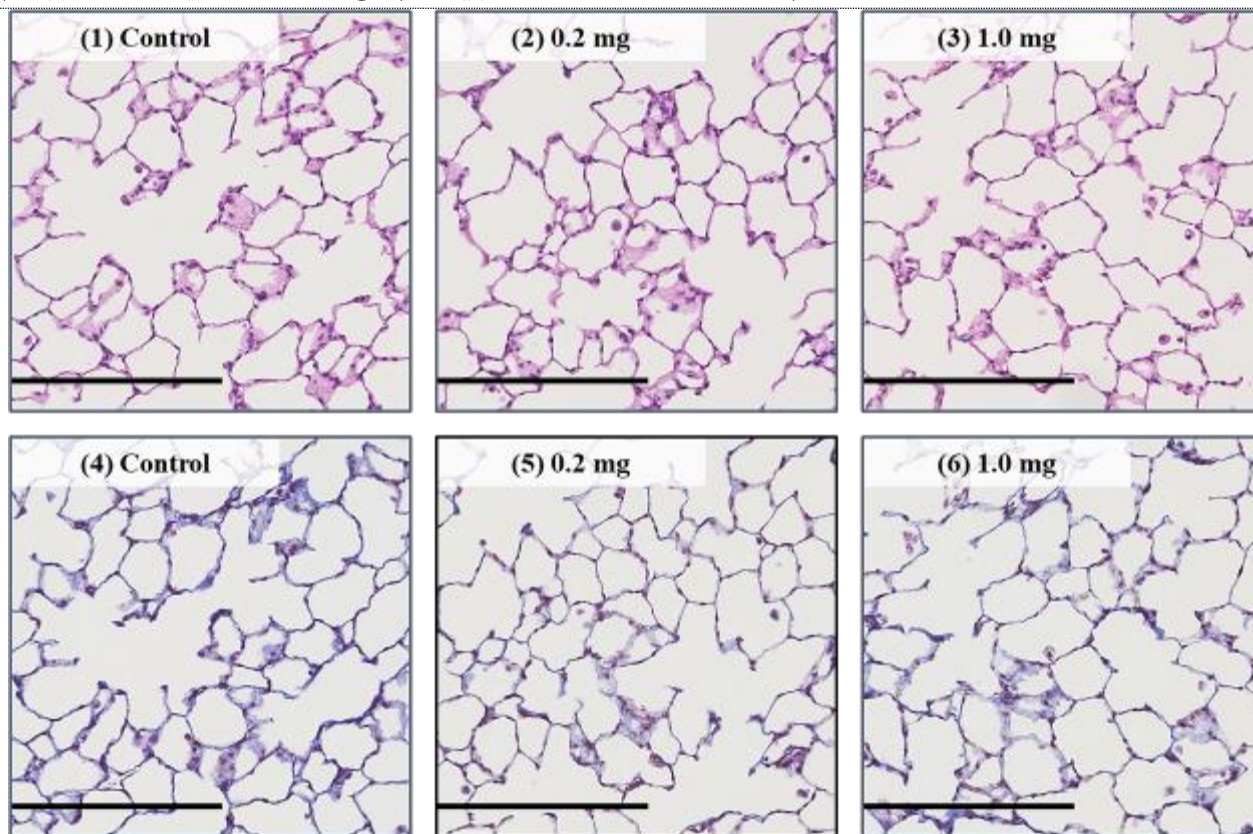


図 1 3 肺病理組織

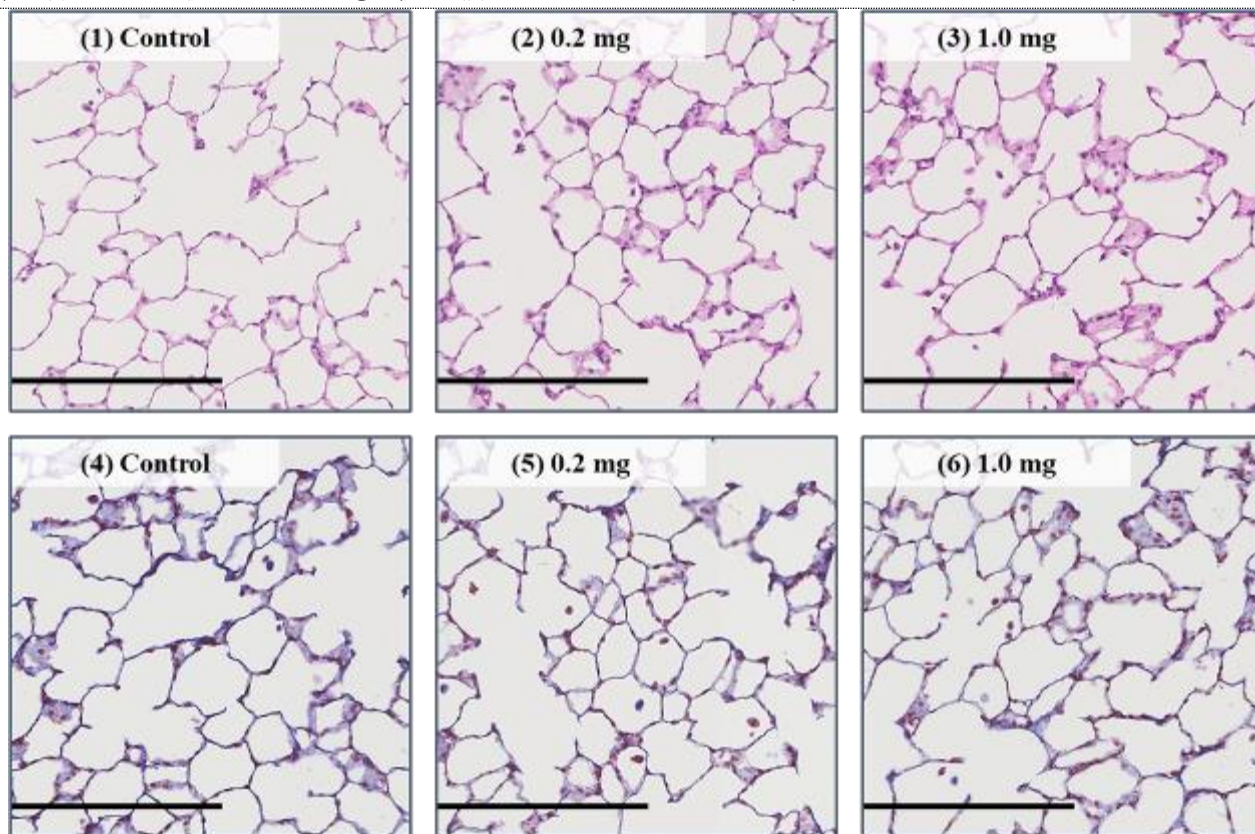
(C)気管内注入試験：ポリマー③（非架橋型ポリエチレンオキシド）；3ヶ月



Scale bar= 250 μ m

図 1 3 肺病理組織

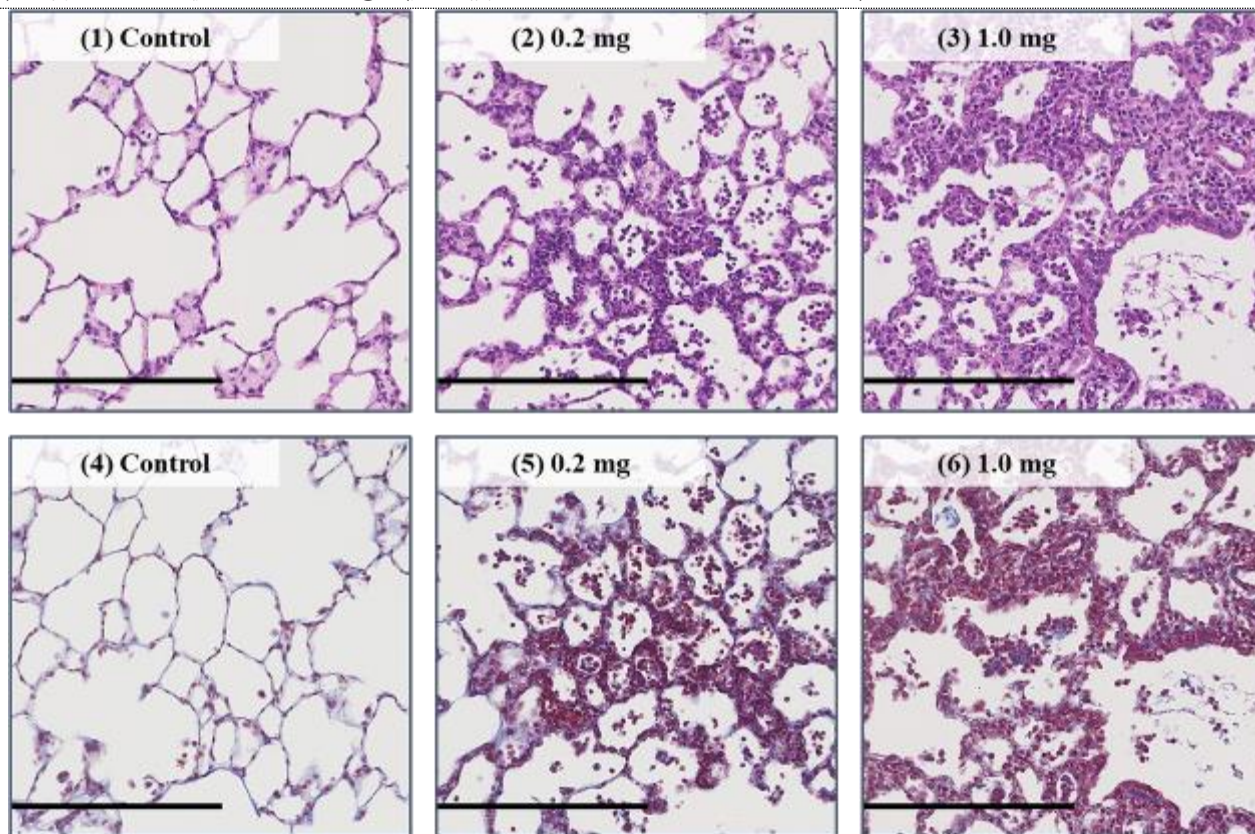
(C)気管内注入試験：ポリマー③（非架橋型ポリエチレンオキシド）；6ヶ月



Scale bar= 250 μ m

図 1 3 肺病理組織

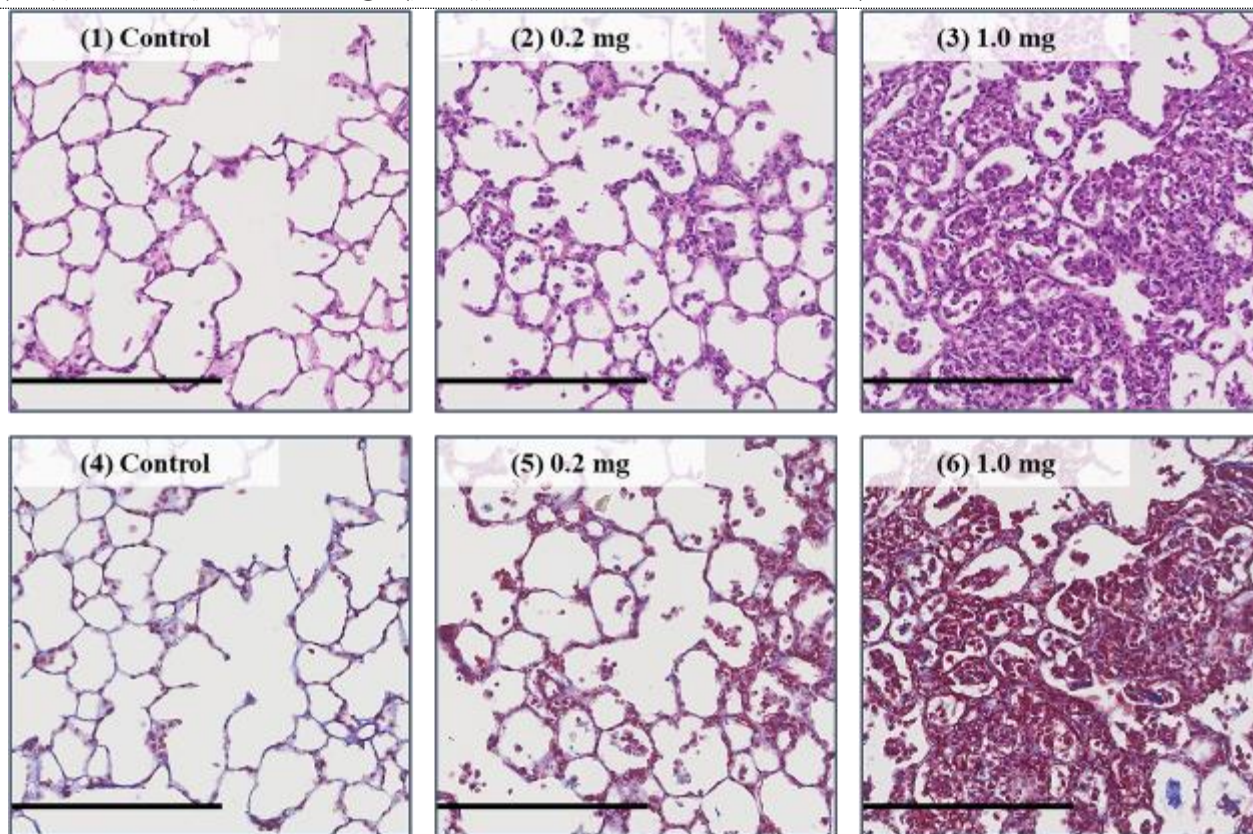
(D)気管内注入試験：ポリマー④（非架橋型ポリアクリル酸ナトリウム）；3日



Scale bar= 250 μm

図 1 3 肺病理組織

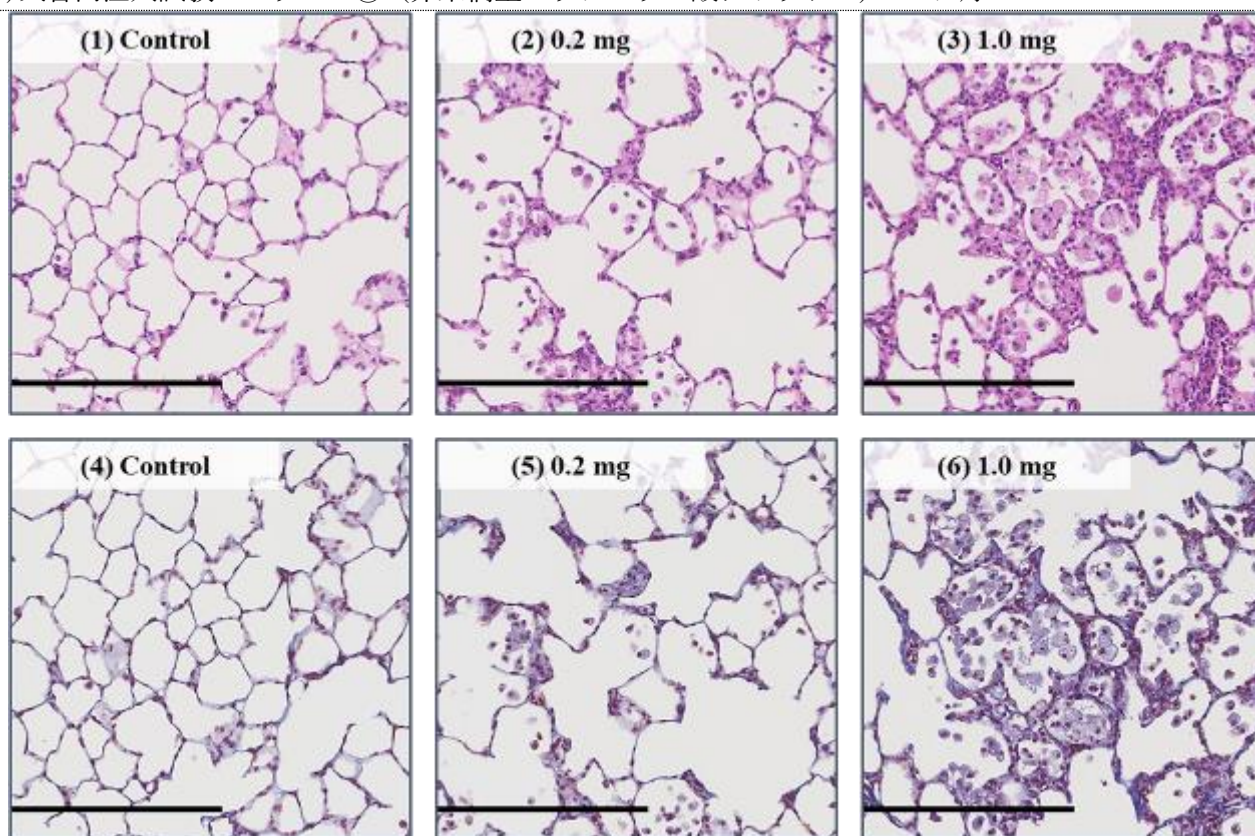
(D)気管内注入試験：ポリマー④（非架橋型ポリアクリル酸ナトリウム）；1週



Scale bar= 250 μ m

図 1 3 肺病理組織

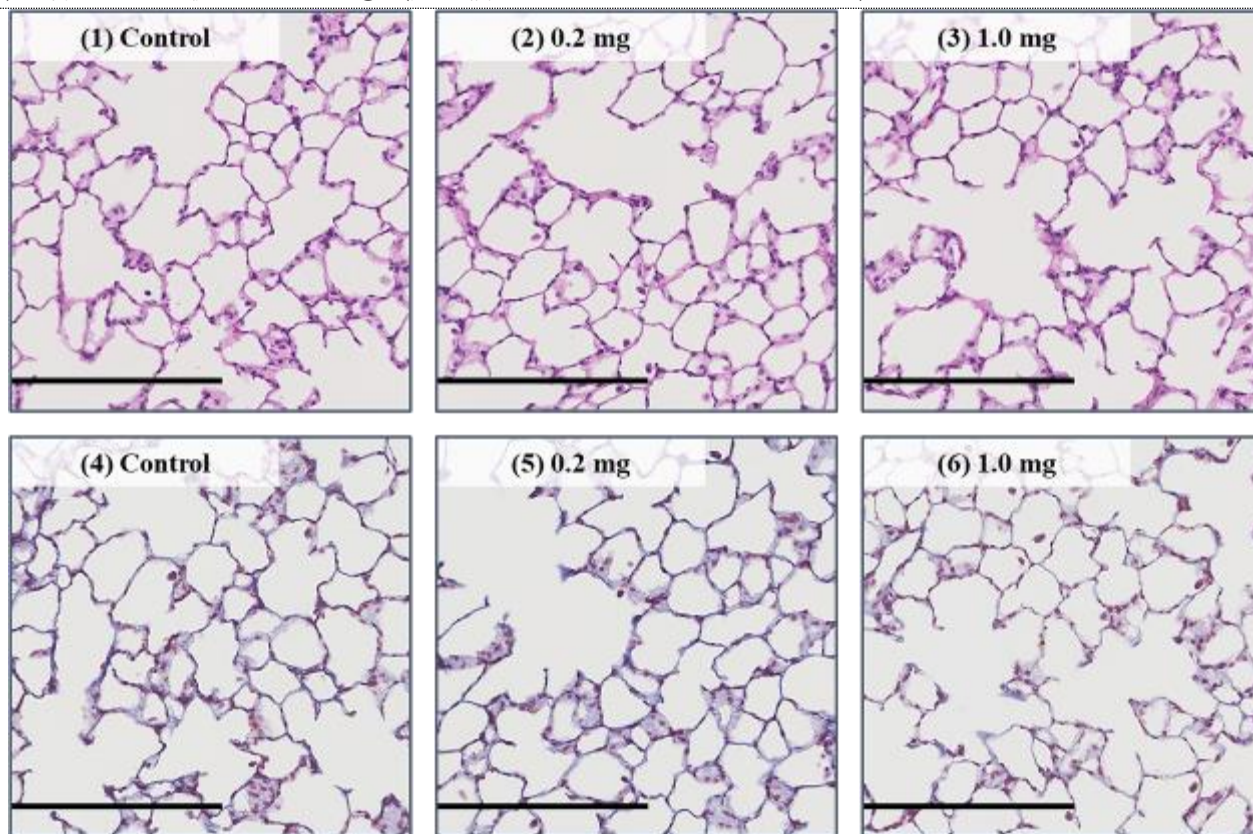
(D)気管内注入試験：ポリマー④（非架橋型ポリアクリル酸ナトリウム）；1ヶ月



Scale bar= 250 μm

図 1 3 肺病理組織

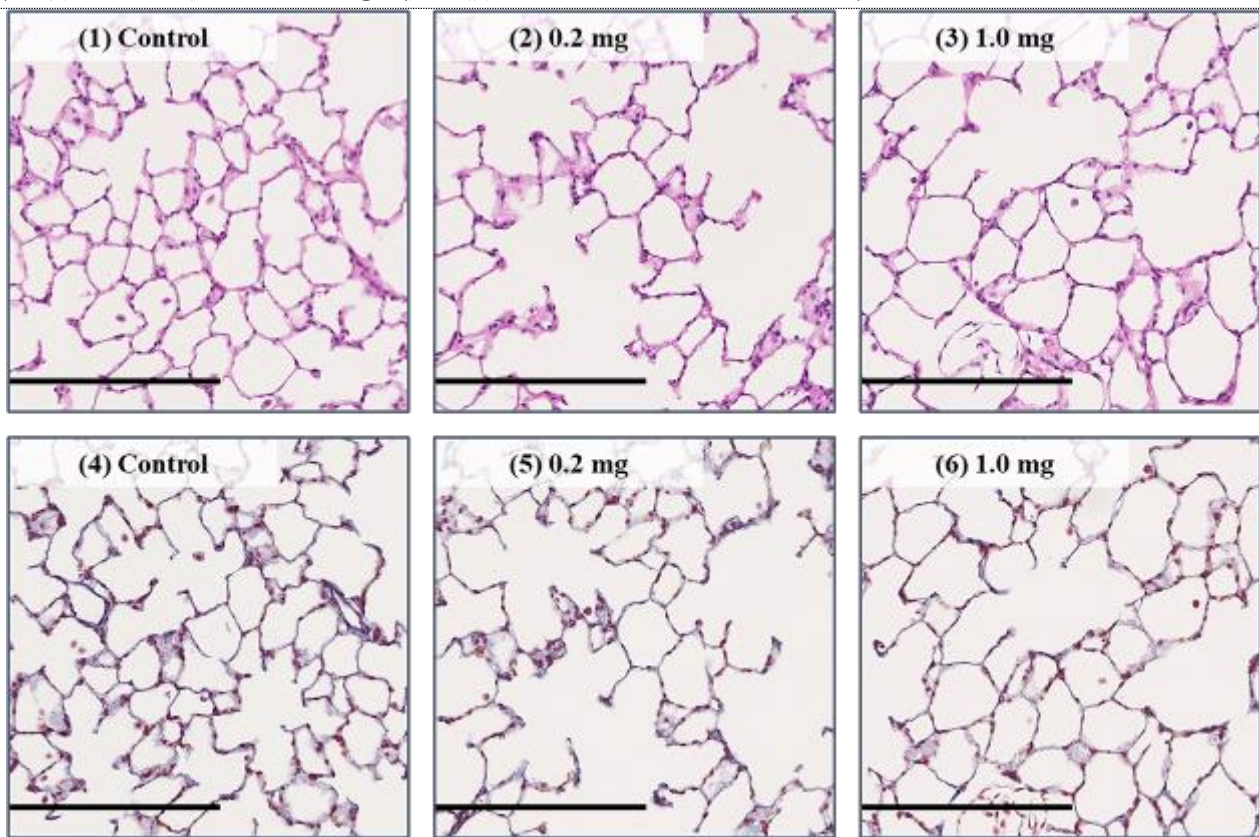
(D)気管内注入試験：ポリマー④（非架橋型ポリアクリル酸ナトリウム）；3ヶ月



Scale bar= 250 μ m

図 1 3 肺病理組織

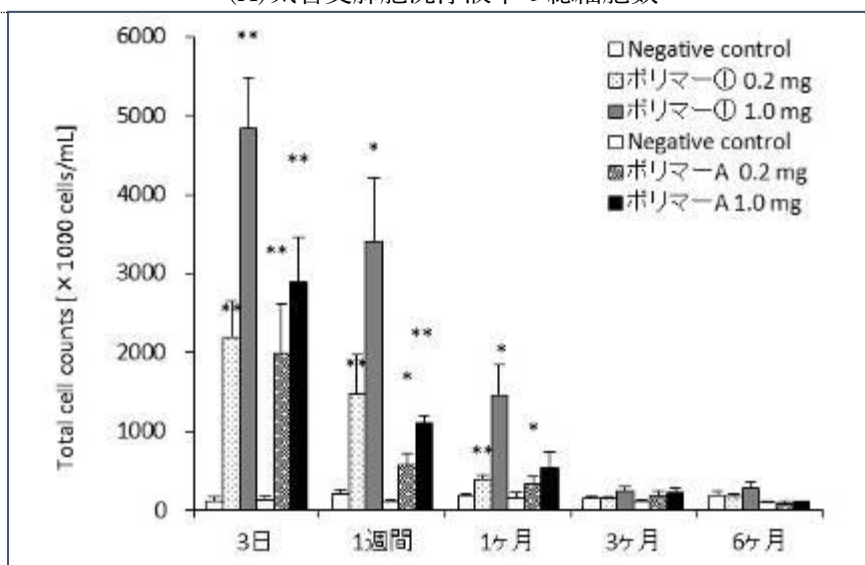
(D) 気管内注入試験：ポリマー④（非架橋型ポリアクリル酸ナトリウム）；6ヶ月



Scale bar= 250 μm

図 1 4 架橋構造の有無による肺障害性評価

(A) 気管支肺胞洗浄液中の総細胞数



(B) 気管支肺胞洗浄液中の好中球数

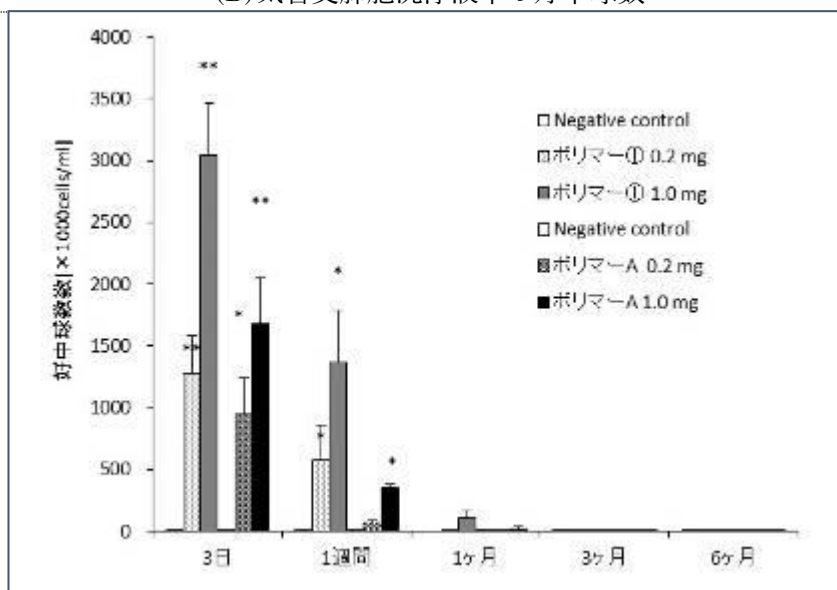
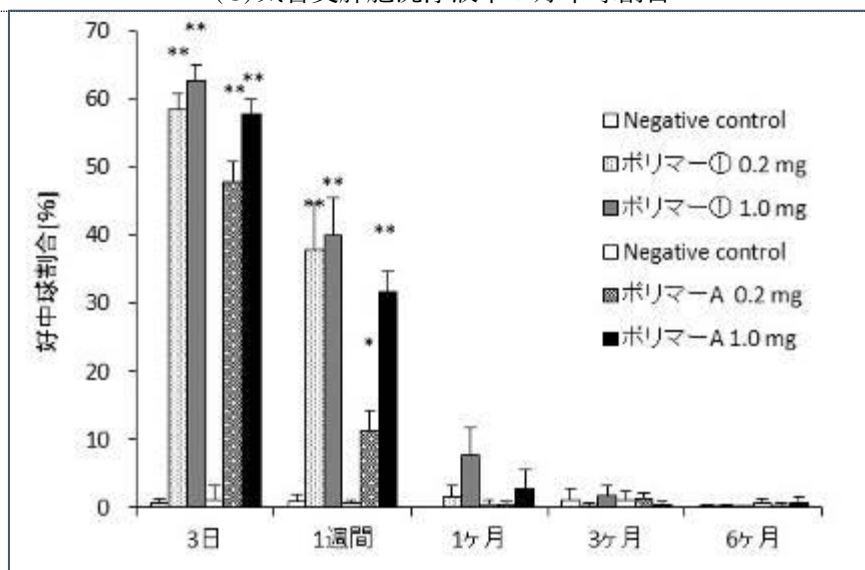


図 1 4 架橋構造の有無による肺障害性評価

(C)気管支肺胞洗浄液中の好中球割合



(D)気管支肺胞洗浄液中の総蛋白濃度

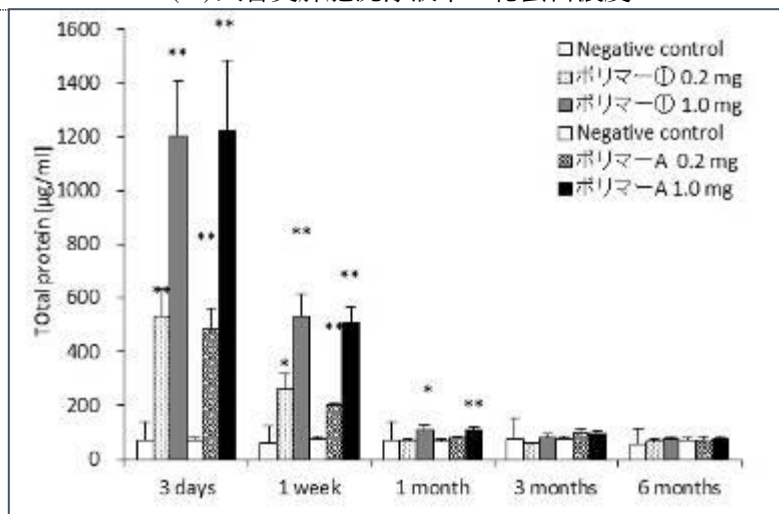
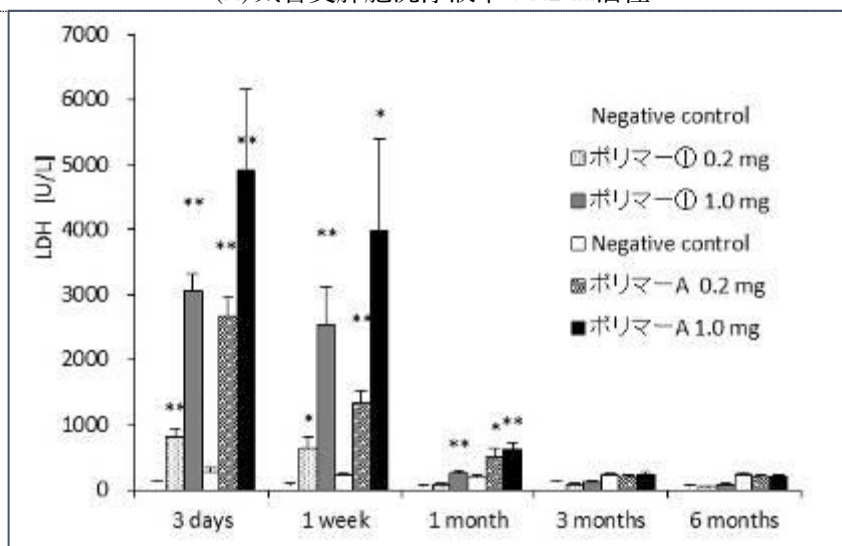


図 1 4 架橋構造の有無による肺障害性評価

(E)気管支肺胞洗浄液中のLDH活性



(F)気管支肺胞洗浄液中のCINC-1濃度

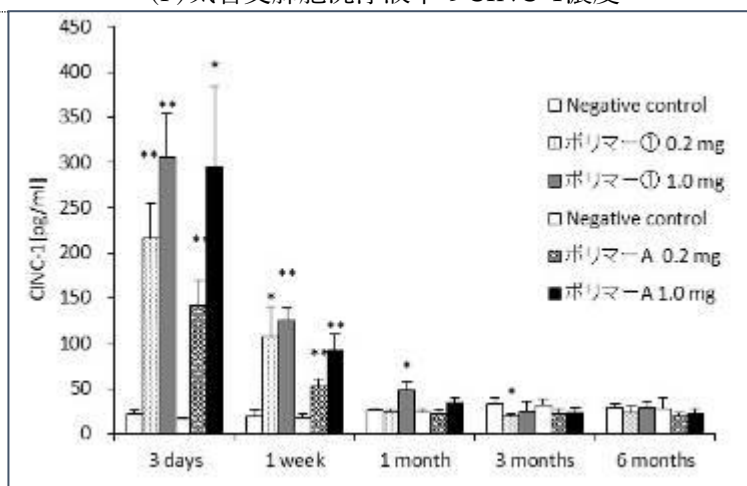
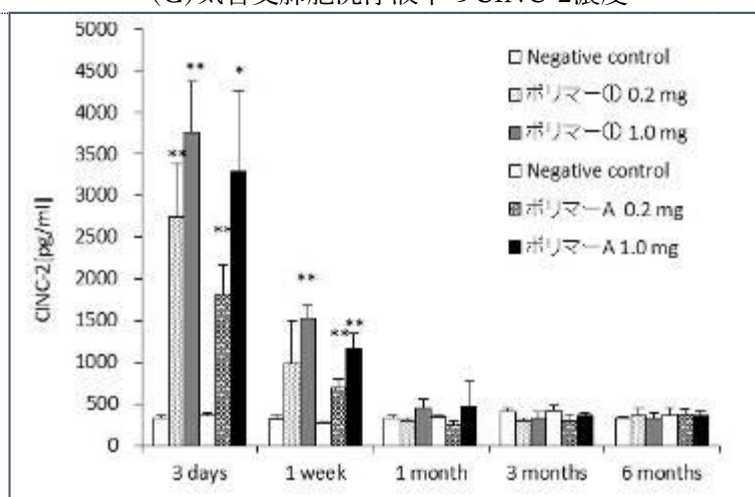


図 1 4 架橋構造の有無による肺障害性評価

(G)気管支肺胞洗浄液中のCINC-2濃度



(H)肺組織中のHO-1濃度

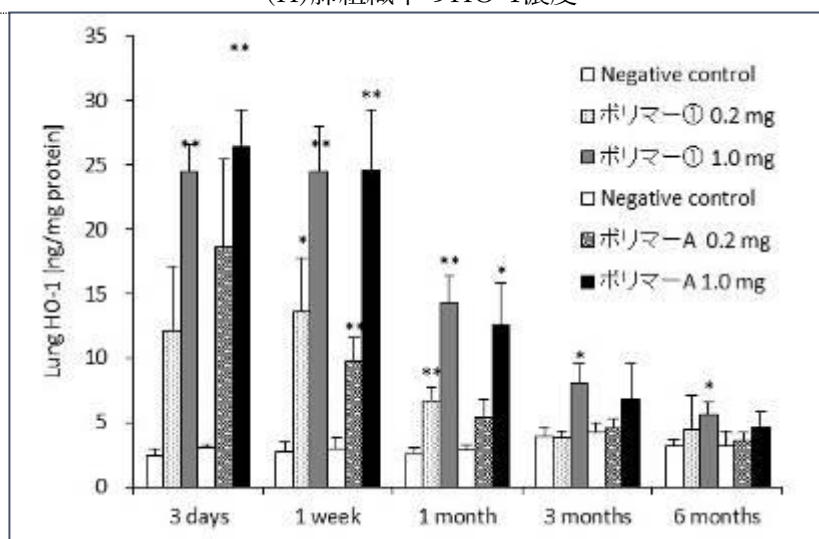


図 1 4 架橋構造の有無による肺障害性評価

(I) 肺病理組織 (HE染色)

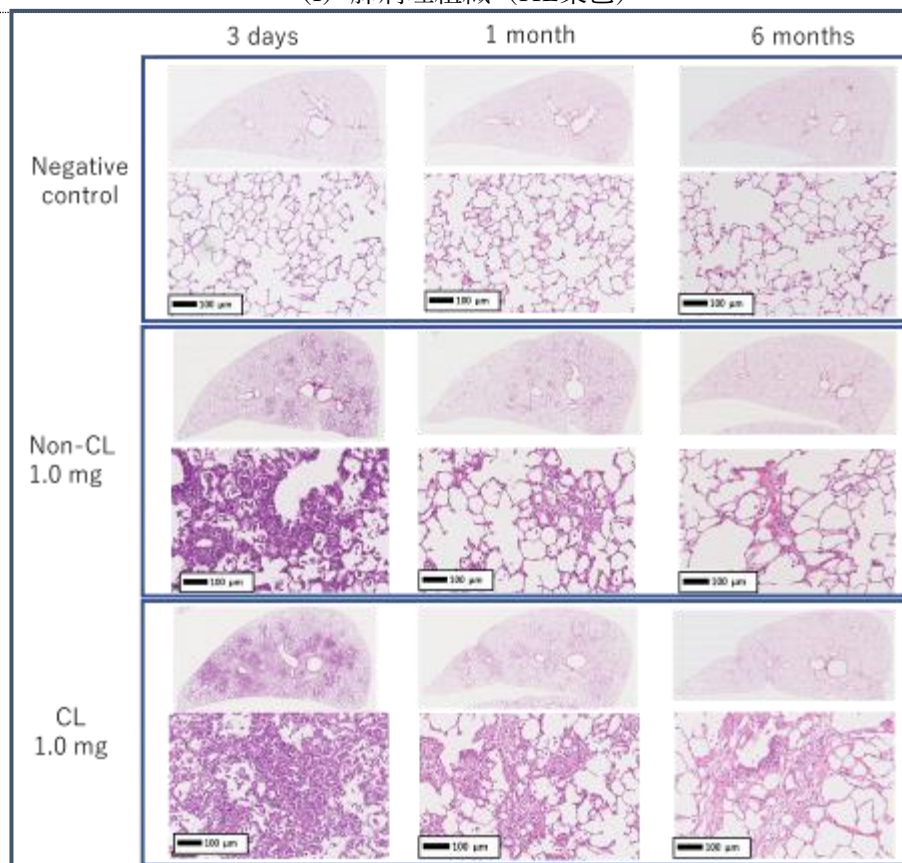


図 1 4 架橋構造の有無による肺障害性評価

(J) 肺病理組織 (MT染色)

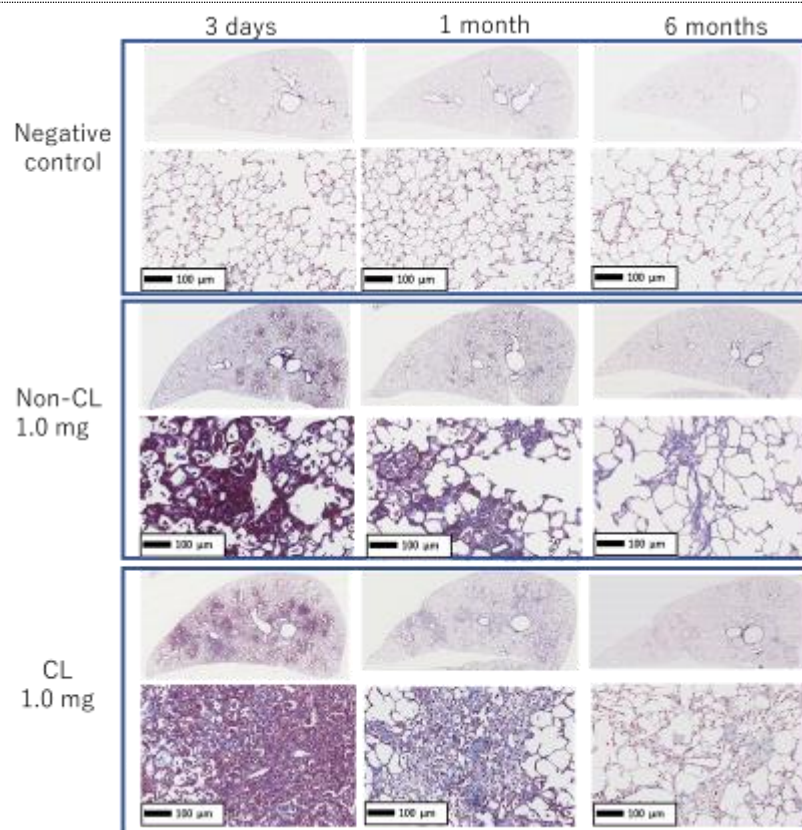


図 1 4 架橋構造の有無による肺障害性評価

(K) 炎症細胞浸潤スコア

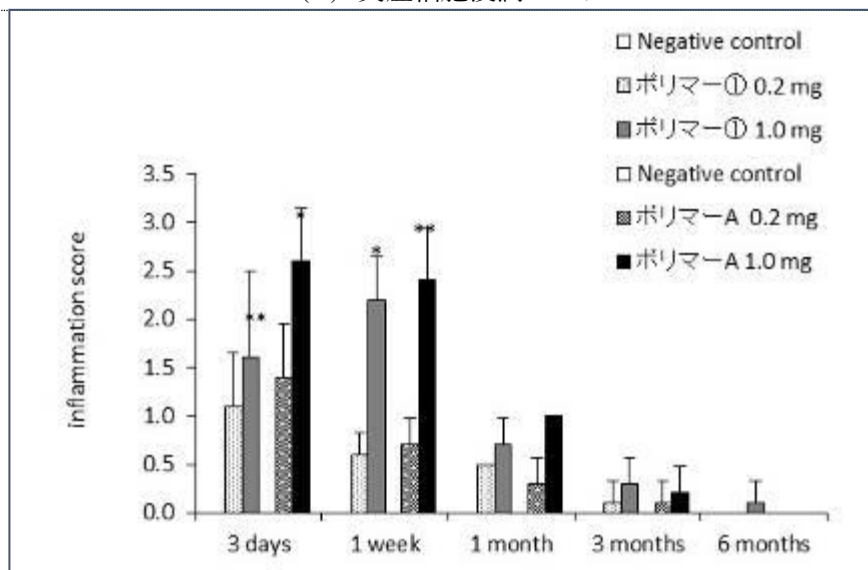


図 1 4 架橋構造の有無による肺障害性評価

(L) アシュクロフトスコア

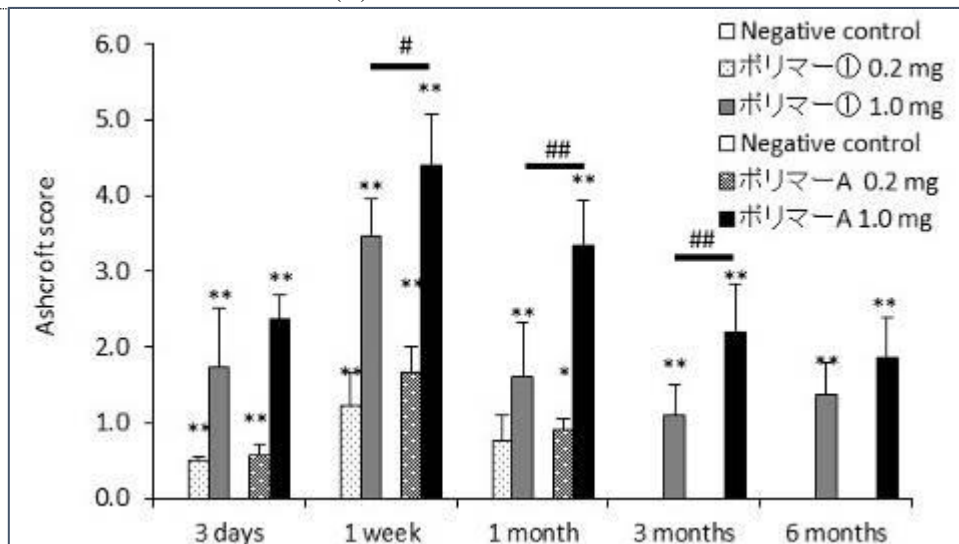


図 1 5 (A) ポリマーAを気管内注入した1ヶ月後のラット肺で、対照群と比較して、発現が上昇していた上位20個の遺伝子

Gene symbol	Gene description	Fold change (ACTB)	Fold change (GAPDH)
Mt3	metallothionein 3	5.6	8.0
AABR07056026.1	-	3.1	4.4
Olr1523	olfactory receptor 1523	3.0	4.3
Hbq1b	hemoglobin, theta 1B	2.8	4.1
Mt2A	metallothionein 2A	2.8	4.1
Rab24	RAB24, member RAS oncogene family	2.8	4.0
Tuba3b	tubulin, alpha 3B	2.8	4.0
Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	2.6	3.8
Igh-6	immunoglobulin heavy chain 6	2.6	3.7
RGD1565617	similar to Ig variable region, light chain	2.6	3.7
Ttl11	tubulin tyrosine ligase like11	2.5	3.6
Atp13a2	ATPase 13A2	2.4	3.4
Sec14l1	SEC14-like lipid binding 1	2.3	3.3
Igsf8	immunoglobulin superfamily, member 8	2.2	3.1
Egfl7	EGF-like-domain, multiple 7	2.2	3.1
Fau	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed	2.1	3.0
Eln	elastin	2.1	3.0
Ep300	E1A binding protein p300	2.0	2.9
Arl2	ADP-ribosylation factor like GTPase 2	2.0	2.9
Otop2	otopetrin 2	1.5	2.1

図 1 5 (B) ポリマーAを気管内注入した1ヶ月後のラット肺で、対照群と比較して、発現上昇を認める遺伝子のうち、線維芽細胞に関連する上位10個の遺伝子

Gene symbol	Gene description	Fold change (ACTB)	Fold change (GAPDH)
Eln	elastin	2.1	3.0
Akt1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	1.8	2.6
Ccm2l	CCM2 like scaffolding protein	1.7	2.4
Mif	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	1.6	2.3
Parp10	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10	1.6	2.3
Pdgfrb	platelet derived growth factor receptor beta	1.5	2.1
Col1a1	collagen, type I, alpha 1	1.4	2.1
Fgfr4	fibroblast growth factor receptor 4	1.4	2.0
Ctgf	connective tissue growth factor	1.4	2.0
Hyal2	hyaluronoglucosaminidase 2	1.4	2.0

図 1 5 (C) KEGG pathwayによる解析

Terms of KEGG pathway	Gene Counts	%	P Value	Benjamini
Salmonella infection	10	5.08	0.0012	0.151
Alzheimer disease	12	6.09	0.0021	0.151
Tuberculosis	8	4.06	0.0022	0.151
Apoptosis	7	3.55	0.0027	0.151
Fluid shear stress and atherosclerosis	7	3.55	0.0045	0.202
PI3K-Akt signaling pathway	10	5.08	0.0088	0.284
Sphingolipid signaling pathway	6	3.05	0.0089	0.284

* 対照群と比較して、1.5倍以上の発現の増加を認めた遺伝子を解析対象とした。

図 1 6 (A) 吸入ばく露試験中のポリマーAのばく露濃度（ラット（短期/長期））：低濃度群							
Day	曝露日	ろ紙 測定後(mg)	ろ紙 測定前(mg)	粉体捕集量 (mg)	測定時間 (min)	吸引流量 (ℓ /min)	曝露濃度 (mg/m ³)
1	2021年7月12日	20.910	20.709	0.201	360	2.5	0.22
2	2021年7月13日	20.733	20.467	0.266	360	2.5	0.30
3	2021年7月14日	20.901	20.689	0.212	360	2.5	0.24
4	2021年7月15日	20.899	20.650	0.249	360	2.5	0.28
5	2021年7月16日	21.001	20.743	0.258	360	2.5	0.29
6	2021年7月19日	20.741	20.535	0.206	360	2.5	0.23
7	2021年7月20日	20.719	20.479	0.240	360	2.5	0.27
8	2021年7月21日	20.987	20.747	0.240	360	2.5	0.27
9	2021年7月26日	20.920	20.617	0.303	360	2.5	0.34
10	2021年7月27日	20.892	20.692	0.200	360	2.5	0.22
11	2021年7月28日	20.906	20.601	0.305	360	2.5	0.34
12	2021年7月29日	20.408	20.207	0.201	360	2.5	0.22
13	2021年7月30日	20.918	20.712	0.206	360	2.5	0.23
14	2021年8月2日	20.542	20.241	0.301	360	2.5	0.33
15	2021年8月3日	21.434	21.121	0.313	360	2.5	0.35
16	2021年8月4日	20.938	20.737	0.201	360	2.5	0.22
17	2021年8月5日	20.366	20.165	0.201	360	2.5	0.22
18	2021年8月6日	20.382	20.117	0.265	360	2.5	0.29
19	2021年8月10日	19.350	19.167	0.183	360	2.5	0.20
20	2021年8月11日	22.423	22.09	0.333	360	2.5	0.37
21	2021年8月12日	20.579	20.322	0.257	360	2.5	0.29
22	2021年8月13日	19.896	19.656	0.240	360	2.5	0.27
23	2021年8月16日	20.609	20.420	0.189	360	2.5	0.21
24	2021年8月17日	19.192	18.980	0.212	360	2.5	0.24
25	2021年8月18日	19.784	19.543	0.241	360	2.5	0.27
26	2021年8月19日	19.768	19.515	0.253	360	2.5	0.28
27	2021年8月20日	19.116	18.898	0.218	360	2.5	0.24
28	2021年8月23日	19.720	19.468	0.252	360	2.5	0.28
29	2021年8月24日	19.640	19.385	0.255	360	2.5	0.28
30	2021年8月25日	20.818	20.581	0.237	360	2.5	0.26
31	2021年8月26日	20.953	20.717	0.236	360	2.5	0.26
32	2021年8月27日	20.995	20.794	0.201	360	2.5	0.22
33	2021年8月30日	20.733	20.528	0.205	360	2.5	0.23
34	2021年8月31日	20.571	20.289	0.282	360	2.5	0.31
35	2021年9月1日	20.711	20.482	0.229	360	2.5	0.25

36	2021年9月2日	20.998	20.791	0.207	360	2.5	0.23
37	2021年9月3日	20.399	20.211	0.188	360	2.5	0.21
38	2021年9月6日	20.959	20.761	0.198	360	2.5	0.22
39	2021年9月7日	21.005	20.816	0.189	360	2.5	0.21
40	2021年9月8日	20.798	20.573	0.225	360	2.5	0.25
41	2021年9月9日	20.608	20.418	0.190	360	2.5	0.21
42	2021年9月10日	21.092	20.775	0.317	360	2.5	0.35
43	2021年9月13日	21.040	20.792	0.248	360	2.5	0.28
44	2021年9月14日	20.936	20.736	0.200	360	2.5	0.22
45	2021年9月15日	20.719	20.549	0.170	360	2.5	0.19
46	2021年9月16日	20.838	20.642	0.196	360	2.5	0.22
47	2021年9月17日	20.968	20.72	0.248	360	2.5	0.28
48	2021年9月21日	20.703	20.478	0.225	360	2.5	0.25
49	2021年9月22日	20.937	20.736	0.201	360	2.5	0.22
50	2021年9月24日	21.127	20.864	0.263	360	2.5	0.29
51	2021年9月27日	20.564	20.311	0.253	360	2.5	0.28
52	2021年9月28日	20.932	20.710	0.222	360	2.5	0.25
53	2021年9月29日	20.752	20.550	0.202	360	2.5	0.22
54	2021年9月30日	20.922	20.662	0.260	360	2.5	0.29
55	2021年10月1日	21.229	20.953	0.276	360	2.5	0.31
56	2021年10月4日	21.386	21.183	0.203	360	2.5	0.23
57	2021年10月5日	20.702	20.489	0.213	360	2.5	0.24
58	2021年10月6日	20.849	20.624	0.225	360	2.5	0.25
59	2021年10月7日	20.559	20.358	0.201	360	2.5	0.22
60	2021年10月8日	21.655	21.393	0.262	360	2.5	0.29
61	2021年10月11日	20.219	19.990	0.229	360	2.5	0.25
62	2021年10月12日	20.949	20.733	0.216	360	2.5	0.24
63	2021年10月13日	19.581	19.335	0.246	360	2.5	0.27
64	2021年10月14日	21.682	21.478	0.204	360	2.5	0.23
65	2021年10月15日	20.179	19.916	0.263	360	2.5	0.29
						平均	0.26
						標準偏差	0.04

図 1 6 (B) 吸入ばく露試験中のポリマーAのばく露濃度（ラット（短期/長期））：高濃度群							
実験	曝露日	ろ紙 測定後(mg)	ろ紙 測定前(mg)	粉体捕集量 (mg)	測定時間 (min)	吸引流量 (ℓ /min)	曝露濃度 (mg/m ³)
1	2021年7月12日	22.768	20.693	2.075	360	2.5	2.31
2	2021年7月13日	22.478	20.467	2.011	360	2.5	2.23
3	2021年7月14日	22.629	20.813	1.816	360	2.5	2.02
4	2021年7月15日	22.451	20.628	1.823	360	2.5	2.03
5	2021年7月16日	22.195	20.351	1.844	360	2.5	2.05
6	2021年7月19日	21.689	19.891	1.798	360	2.5	2.00
7	2021年7月20日	22.339	20.553	1.786	360	2.5	1.98
8	2021年7月21日	22.375	20.59	1.785	360	2.5	1.98
9	2021年7月26日	22.277	20.497	1.780	360	2.5	1.98
10	2021年7月27日	22.158	20.313	1.845	360	2.5	2.05
11	2021年7月28日	22.225	20.460	1.765	360	2.5	1.96
12	2021年7月29日	23.301	21.177	2.124	360	2.5	2.36
13	2021年7月30日	22.126	20.304	1.822	360	2.5	2.02
14	2021年8月2日	21.226	20.321	0.905	360	2.5	1.01
15	2021年8月3日	22.933	20.675	2.258	360	2.5	2.51
16	2021年8月4日	22.019	20.027	1.992	360	2.5	2.21
17	2021年8月5日	22.815	20.325	2.490	360	2.5	2.77
18	2021年8月6日	20.223	18.406	1.817	360	2.5	2.02
19	2021年8月10日	23.932	21.245	2.687	360	2.5	2.99
20	2021年8月11日	22.153	19.511	2.642	360	2.5	2.94
21	2021年8月12日	23.007	20.309	2.698	360	2.5	3.00
22	2021年8月13日	21.280	18.780	2.500	360	2.5	2.78
23	2021年8月16日	21.566	19.016	2.550	360	2.5	2.83
24	2021年8月17日	22.426	19.425	3.001	360	2.5	3.33
25	2021年8月18日	21.021	19.067	1.954	360	2.5	2.17
26	2021年8月19日	21.421	19.425	1.996	360	2.5	2.22
27	2021年8月20日	21.572	19.124	2.448	360	2.5	2.72
28	2021年8月23日	21.523	18.997	2.526	360	2.5	2.81
29	2021年8月24日	21.076	19.329	1.747	360	2.5	1.94
30	2021年8月25日	22.555	20.527	2.028	360	2.5	2.25
31	2021年8月26日	22.544	20.628	1.916	360	2.5	2.13
32	2021年8月27日	22.684	20.682	2.002	360	2.5	2.22
33	2021年8月30日	22.656	20.075	2.581	360	2.5	2.87
34	2021年8月31日	23.155	20.553	2.602	360	2.5	2.89
35	2021年9月1日	22.410	20.518	1.892	360	2.5	2.10

36	2021年9月2日	23.289	20.767	2.522	360	2.5	2.80
37	2021年9月3日	22.775	20.639	2.136	360	2.5	2.37
38	2021年9月6日	22.521	20.617	1.904	360	2.5	2.12
39	2021年9月7日	23.016	20.681	2.335	360	2.5	2.59
40	2021年9月8日	22.247	20.427	1.820	360	2.5	2.02
41	2021年9月9日	22.460	20.620	1.840	360	2.5	2.04
42	2021年9月10日	22.382	20.462	1.920	360	2.5	2.13
43	2021年9月13日	23.151	20.593	2.558	360	2.5	2.84
44	2021年9月14日	22.724	20.350	2.374	360	2.5	2.64
45	2021年9月15日	22.886	20.935	1.951	360	2.5	2.17
46	2021年9月16日	22.461	20.325	2.136	360	2.5	2.37
47	2021年9月17日	23.393	20.804	2.589	360	2.5	2.88
48	2021年9月21日	23.260	20.580	2.680	360	2.5	2.98
49	2021年9月22日	22.419	20.657	1.762	360	2.5	1.96
50	2021年9月24日	22.974	20.350	2.624	360	2.5	2.92
51	2021年9月27日	22.570	20.532	2.038	360	2.5	2.26
52	2021年9月28日	23.362	20.634	2.728	360	2.5	3.03
53	2021年9月29日	22.936	20.433	2.503	360	2.5	2.78
54	2021年9月30日	22.938	20.452	2.486	360	2.5	2.76
55	2021年10月1日	22.884	20.773	2.111	360	2.5	2.35
56	2021年10月4日	22.559	20.556	2.003	360	2.5	2.23
57	2021年10月5日	22.660	20.537	2.123	360	2.5	2.36
58	2021年10月6日	22.001	19.893	2.108	360	2.5	2.34
59	2021年10月7日	23.001	21.173	1.828	360	2.5	2.03
60	2021年10月8日	22.653	19.997	2.656	360	2.5	2.95
61	2021年10月11日	22.789	20.616	2.173	360	2.5	2.41
62	2021年10月12日	24.124	21.528	2.596	360	2.5	2.88
63	2021年10月13日	22.001	19.606	2.395	360	2.5	2.66
64	2021年10月14日	22.145	19.657	2.488	360	2.5	2.76
65	2021年10月15日	20.998	18.972	2.026	360	2.5	2.25
						平均	2.41
						標準偏差	0.41

図 1 7 肺の肉眼的所見			
(A) ラット・短期 吸入ばく露試験	Control	0.2 mg/m ³	2.0 mg/m ³
3 days			
1 month			

図 1 7 肺の肉眼的所見

(B) ラット・長期 吸入ばく露試験	Control	0.2 mg/m ³	2.0 mg/m ³
3 days			
1 month			
3 months			
6 months			

図 1 8 吸入ばく露中の体重推移

吸入ばく露試験（ラット/短期・長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）

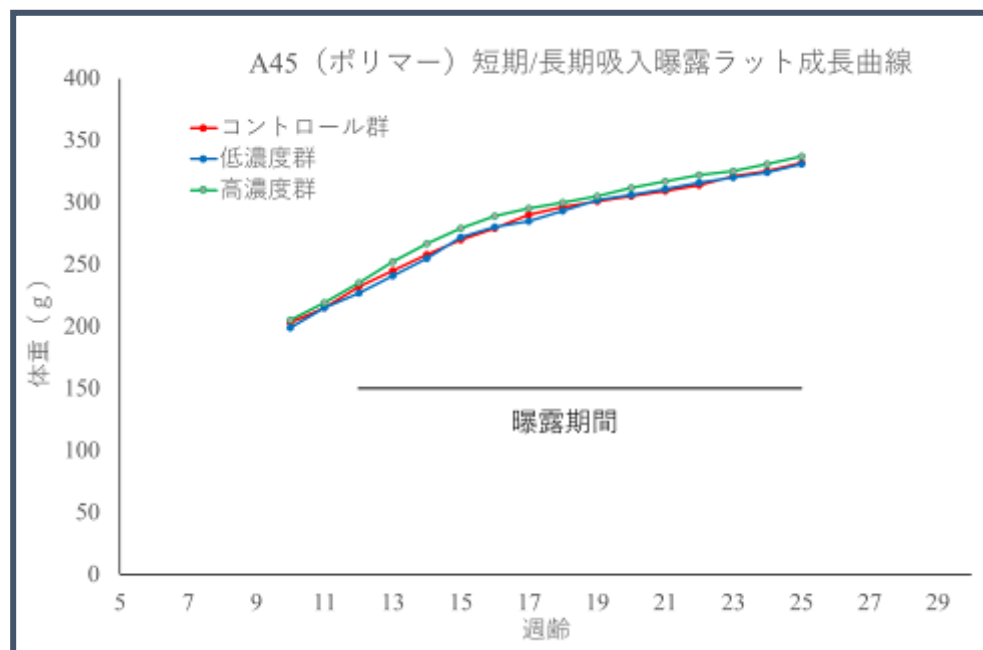
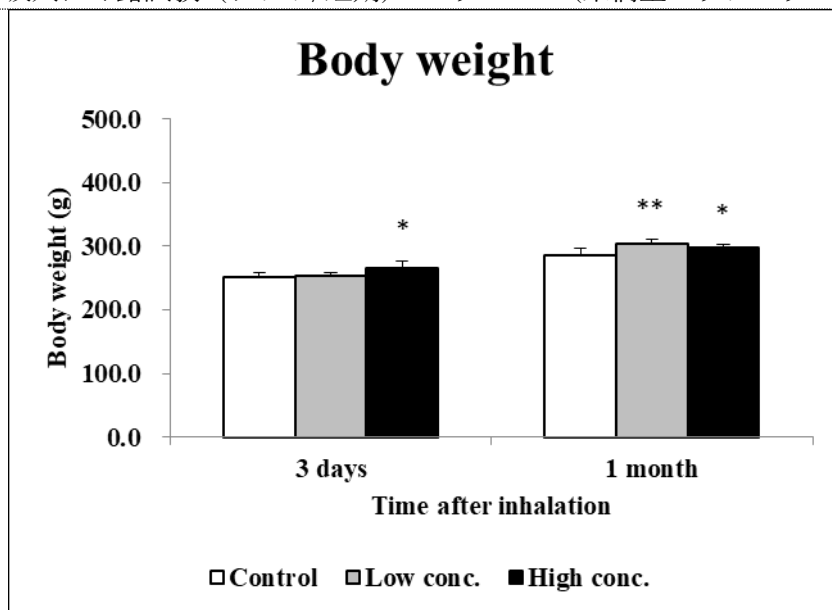


図 1 9 体重 (解剖時)

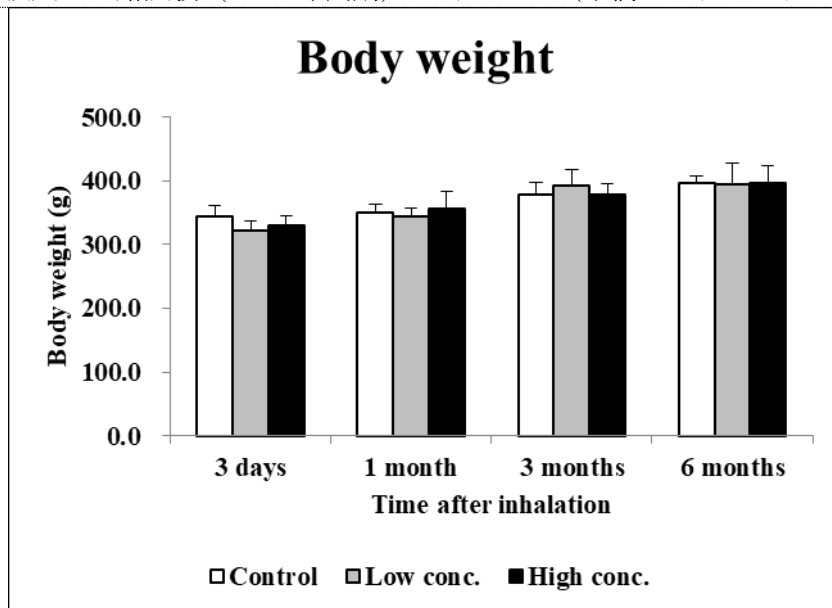
(A)吸入ばく露試験 (ラット/短期) : ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)



Dunnett検定 ; * $p<0.05$, ** $p<0.01$

図 1 9 体重 (解剖時)

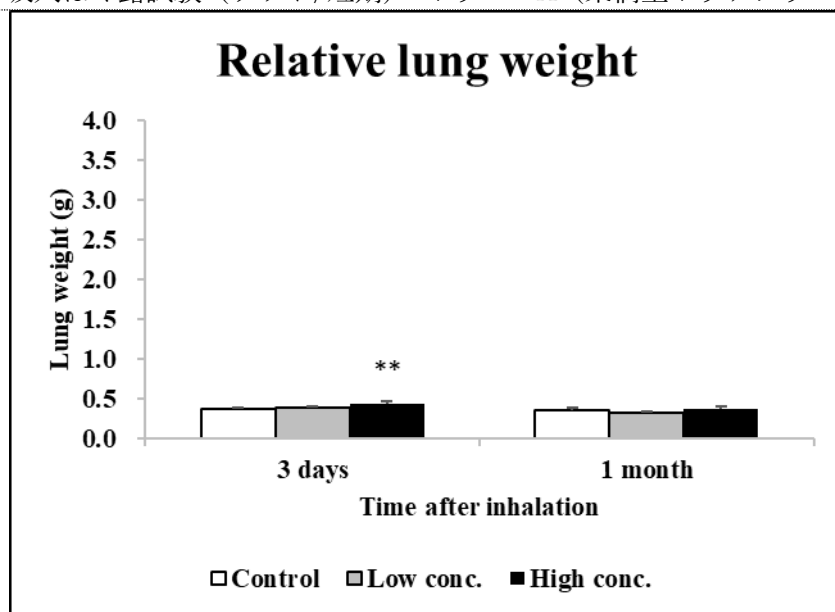
(B)吸入ばく露試験 (ラット/長期) : ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)



Dunnett検定 ; 有意差なし

図 2 0 相対肺体重

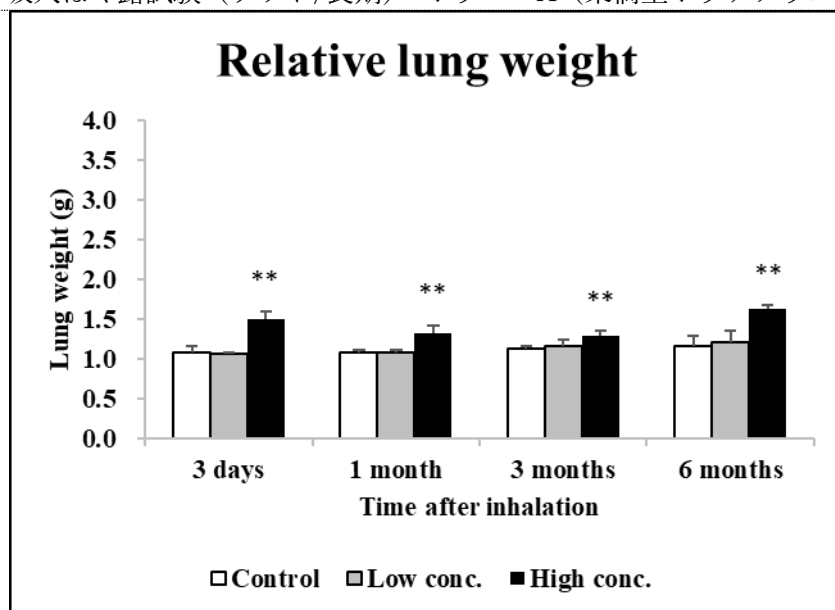
(A)吸入ばく露試験 (ラット/短期)：ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)



Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

図 2 0 相対肺体重

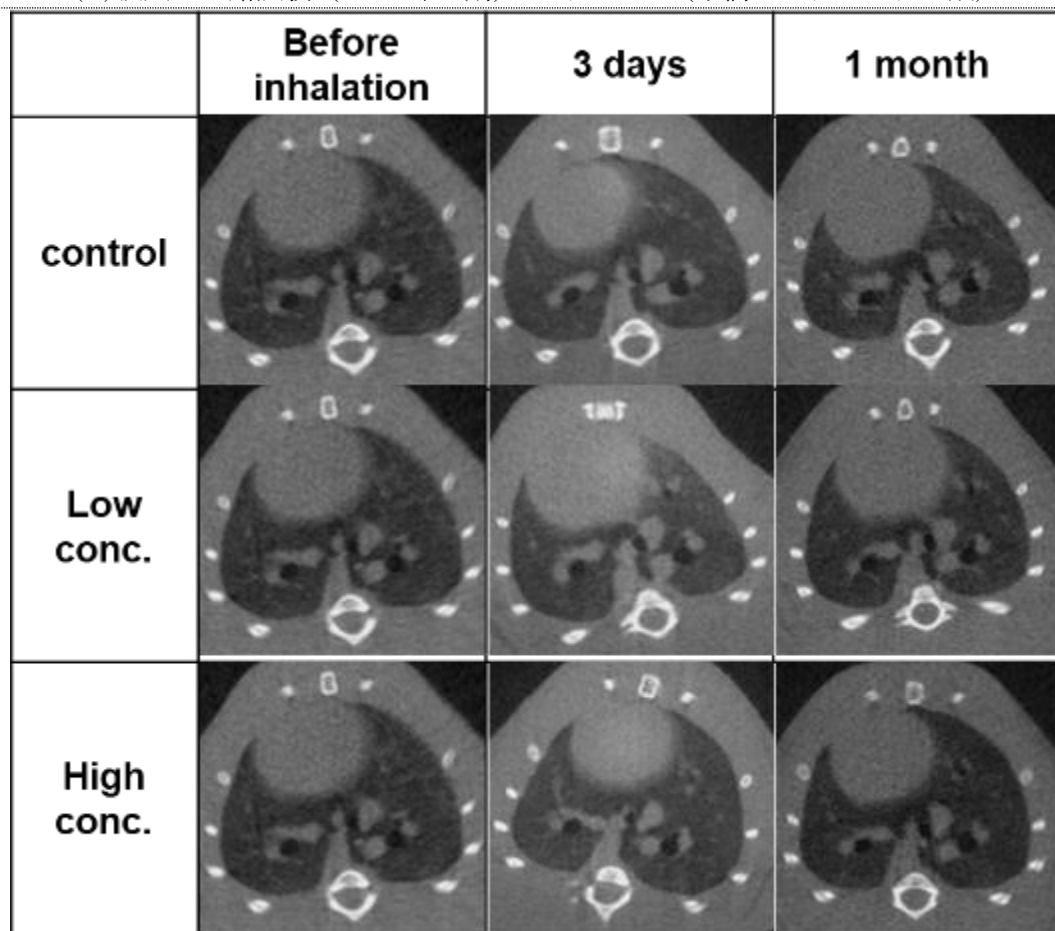
(B)吸入ばく露試験 (ラット/長期)：ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)



Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

図 2 1 3D マイクロ CT

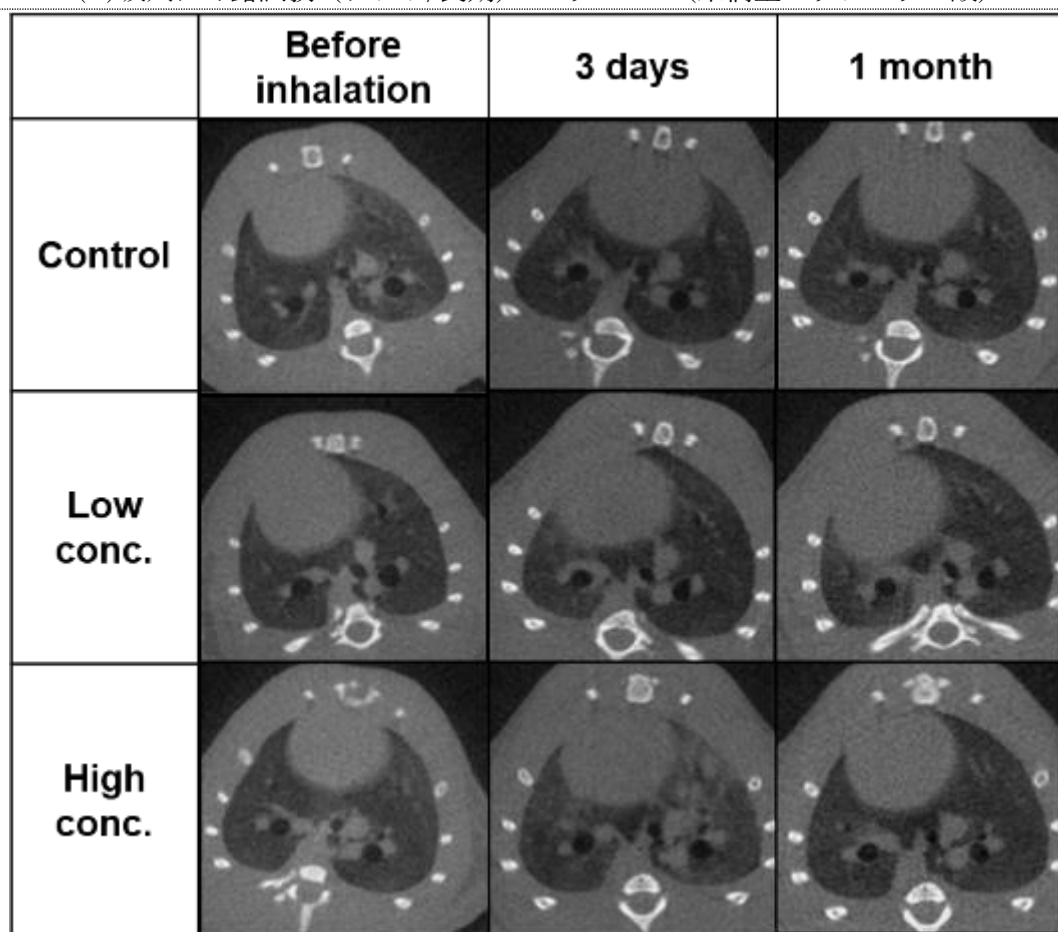
(A)吸入ばく露試験 (ラット/短期) : ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)



Low conc.: Low concentration, High conc.: High concentration

図 2 1 3D マイクロ CT

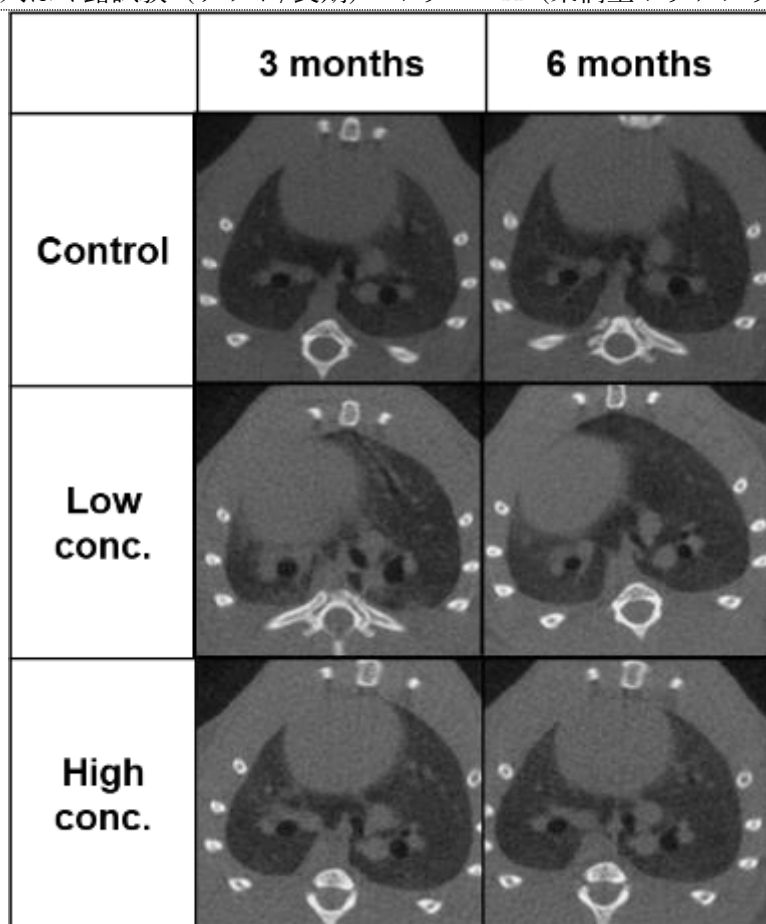
(B)吸入ばく露試験 (ラット/長期) : ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)



Low conc.: Low concentration, High conc.: High concentration

図 2 1 3D マイクロ CT

(B)吸入ばく露試験 (ラット/長期) : ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)



Low conc.: Low concentration, High conc.: High concentration

図 2 2 気管支肺胞洗浄液の解析

(A)吸入ばく露試験 (ラット/短期)：ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)

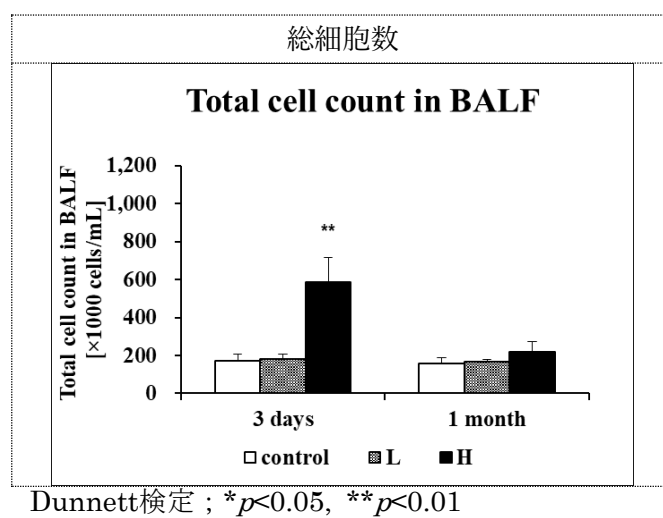
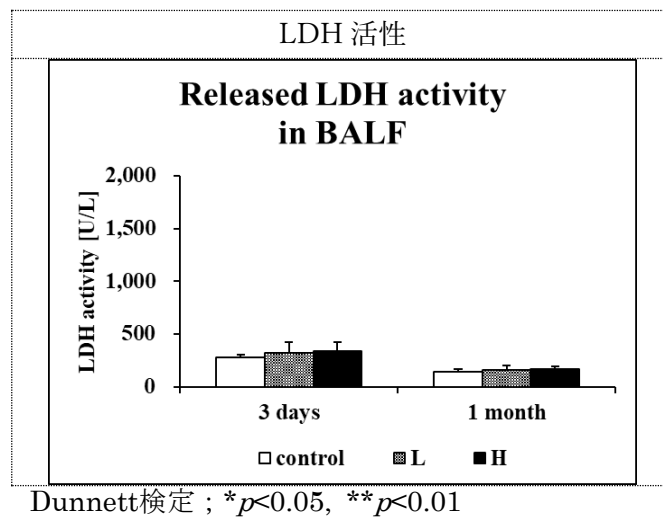


図 2 2 気管支肺胞洗浄液の解析

(A)吸入ばく露試験 (ラット/短期) : ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)

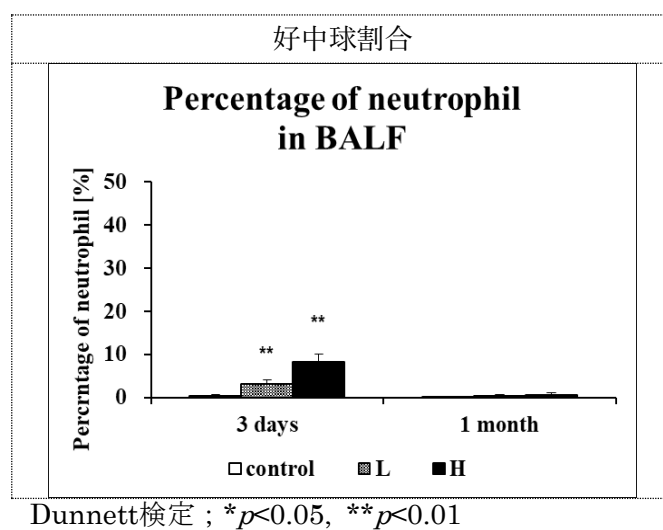
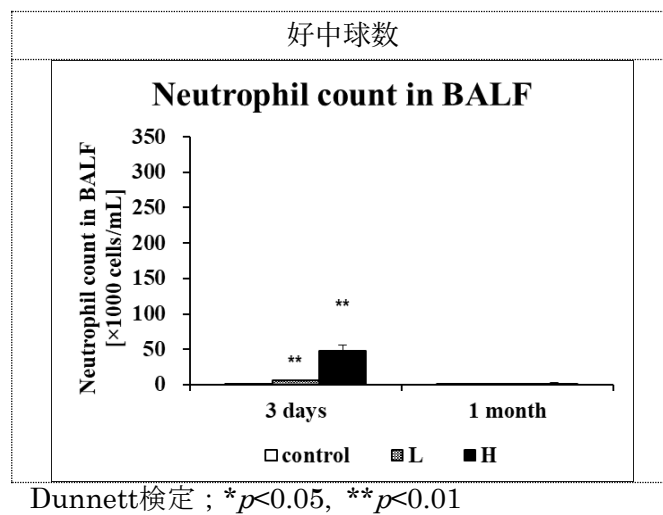
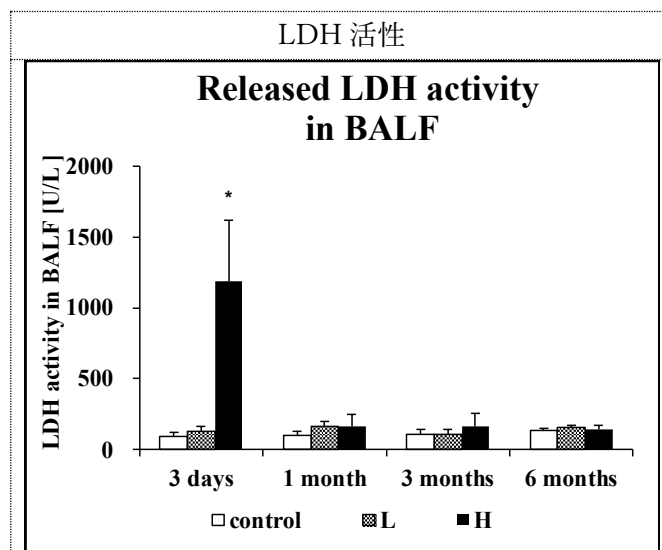
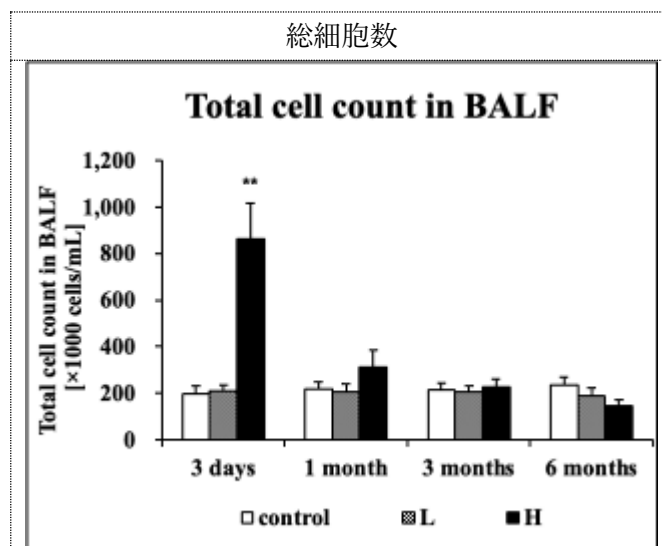


図 2 2 気管支肺胞洗浄液の解析

(B)吸入ばく露試験 (ラット/長期)：ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)



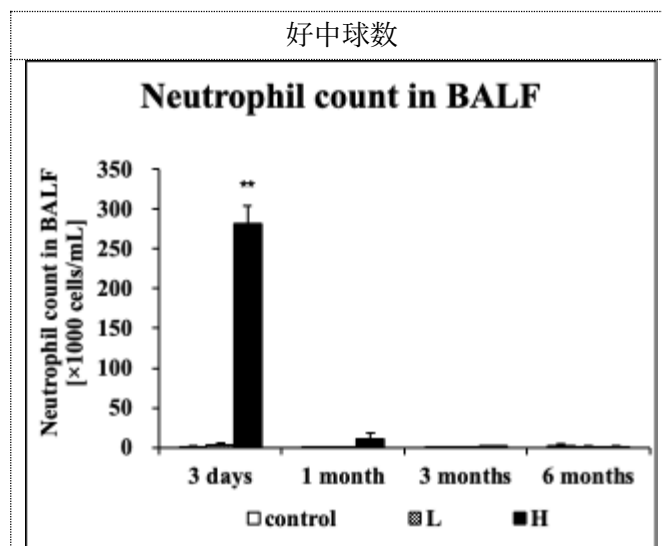
Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$



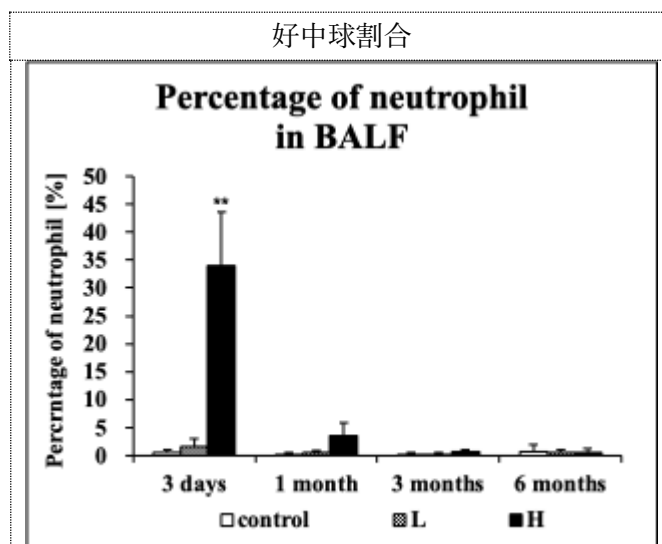
Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

図 2 2 気管支肺胞洗浄液の解析

(B)吸入ばく露試験 (ラット/長期)：ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)



Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$



Dunnett検定；* $p<0.05$, ** $p<0.01$

図 2 3 サイトスピンの所見

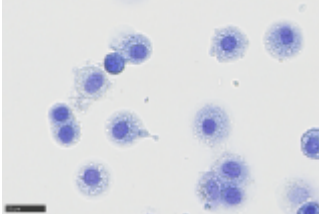
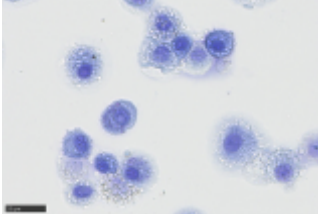
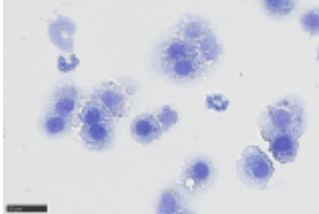
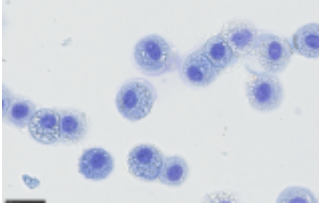
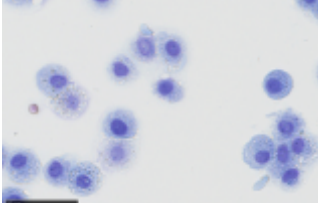
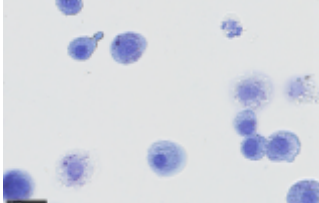
(A) ラット・短期 吸入ばく露試験	Control	0.2 mg/m ³	2.0 mg/m ³
3 days			
1 month			

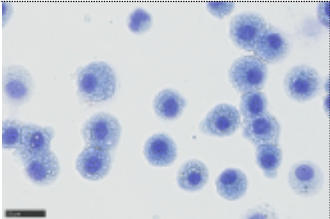
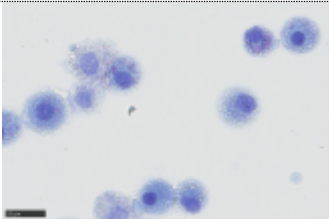
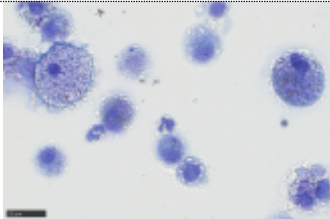
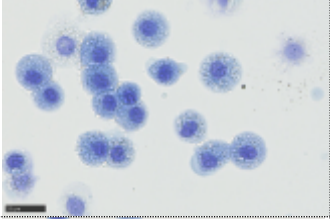
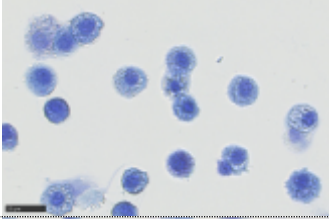
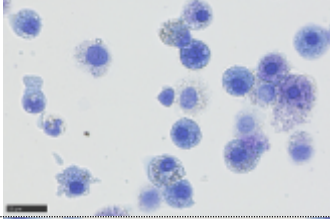
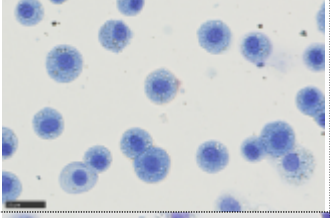
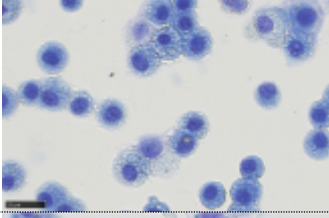
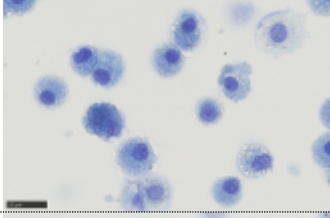
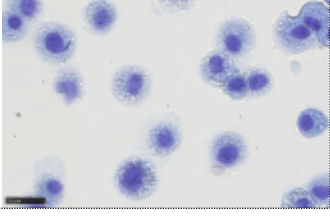
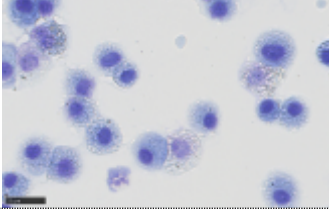
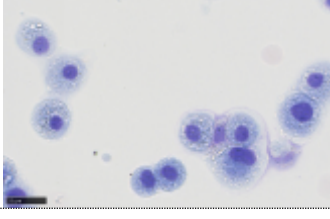
図 2 3 サイトスピン所見			
(B) ラット・長期 吸入ばく露試験	Control	0.2 mg/m ³	2.0 mg/m ³
3 days			
1 month			
3 months			
6 months			

図 2 4 肺病理組織

(A)吸入ばく露試験 (ラット/短期)：ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)；3 日

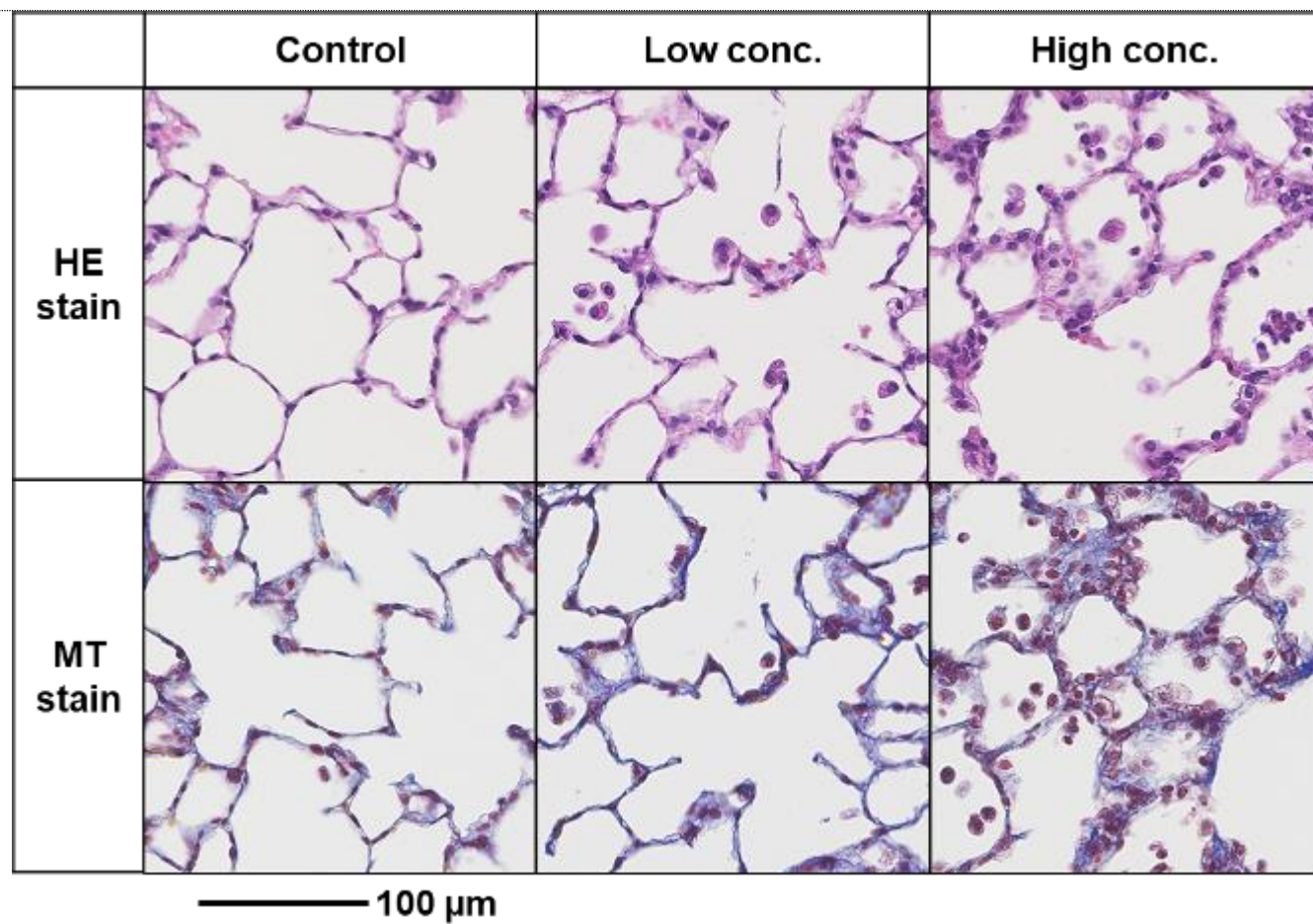


図 2 4 肺病理組織

(A)吸入ばく露試験 (ラット/短期) : ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸) ; 1 ヶ月

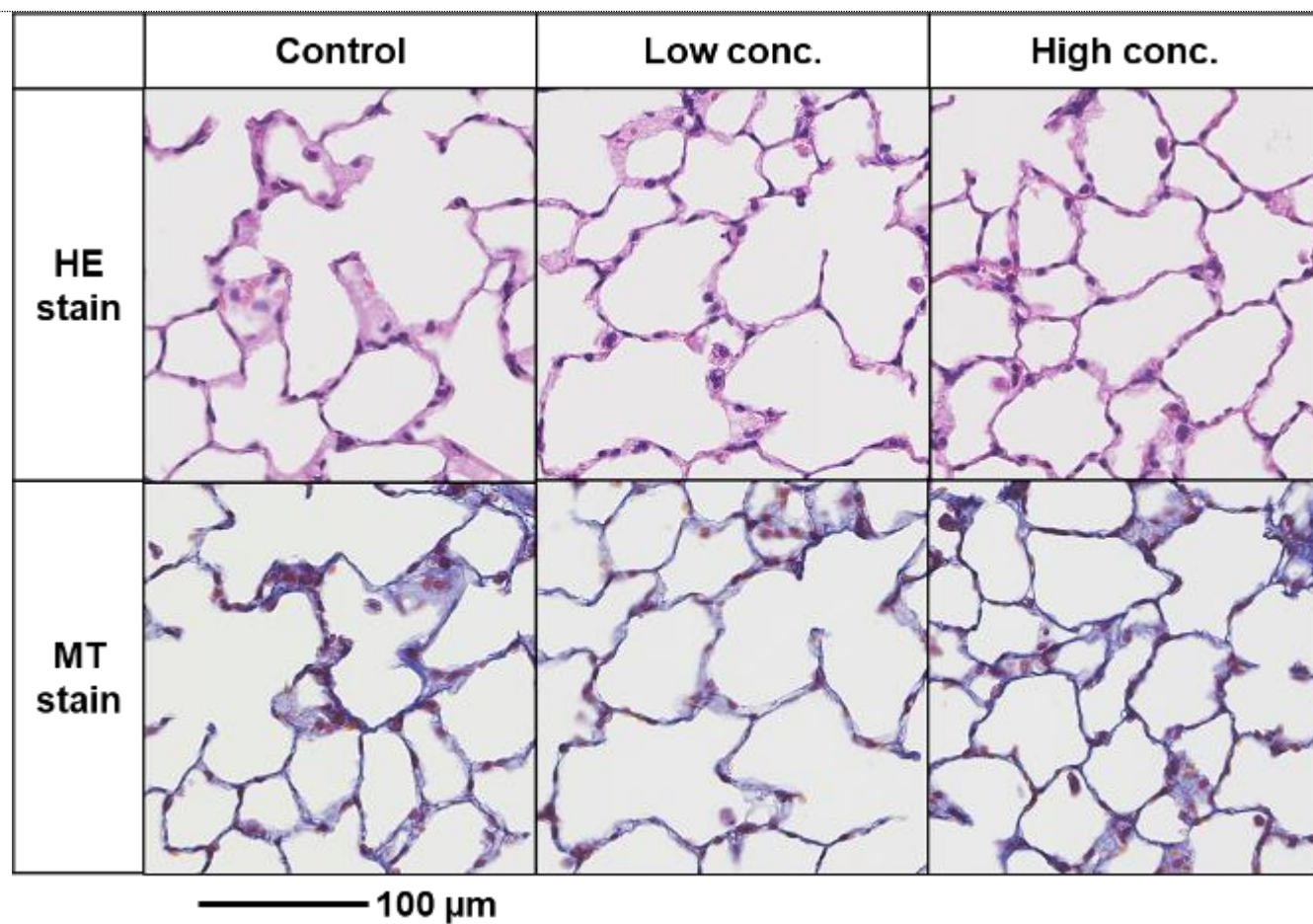
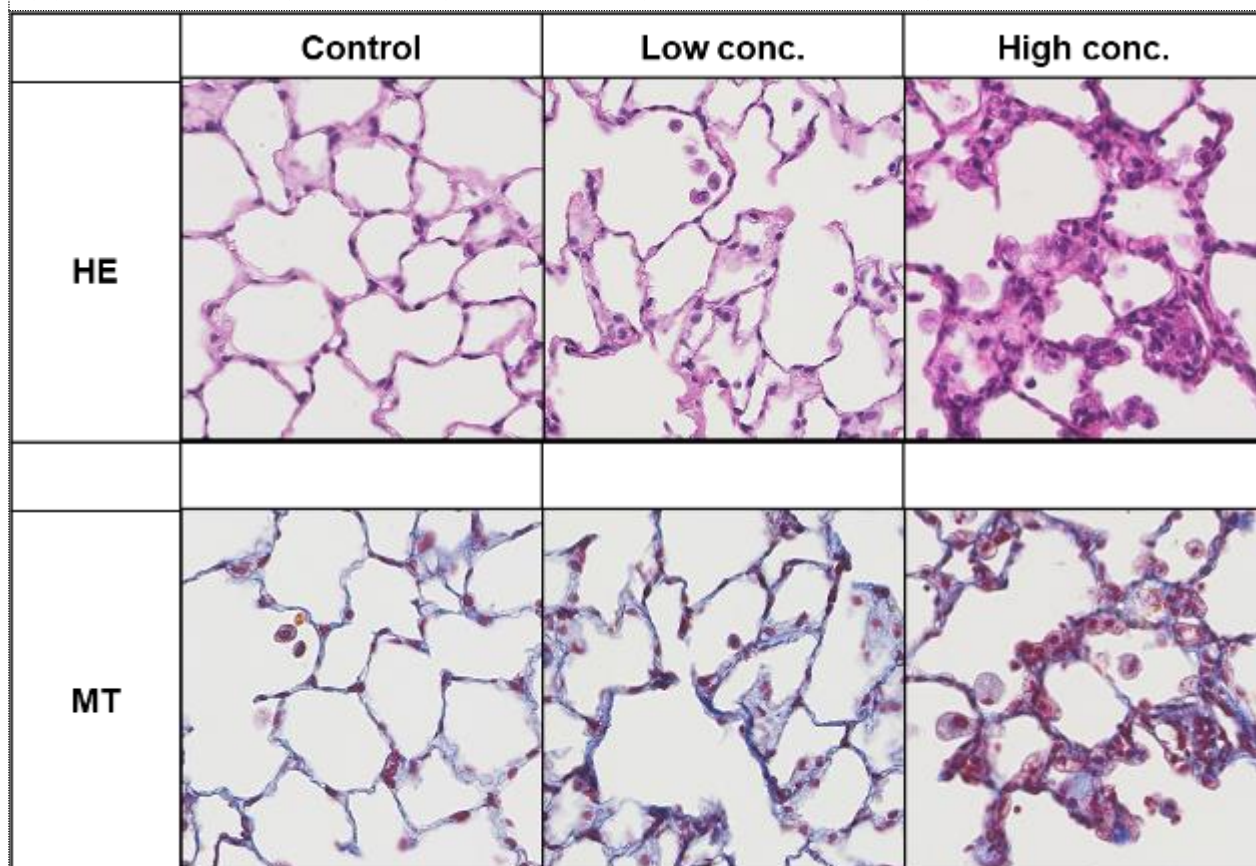


図 2 4 肺病理組織

(B)吸入ばく露試験 (ラット/長期)：ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)；3 日



— 100 μm

図 2 4 肺病理組織

(B)吸入ばく露試験 (ラット/長期)：ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)；1ヶ月

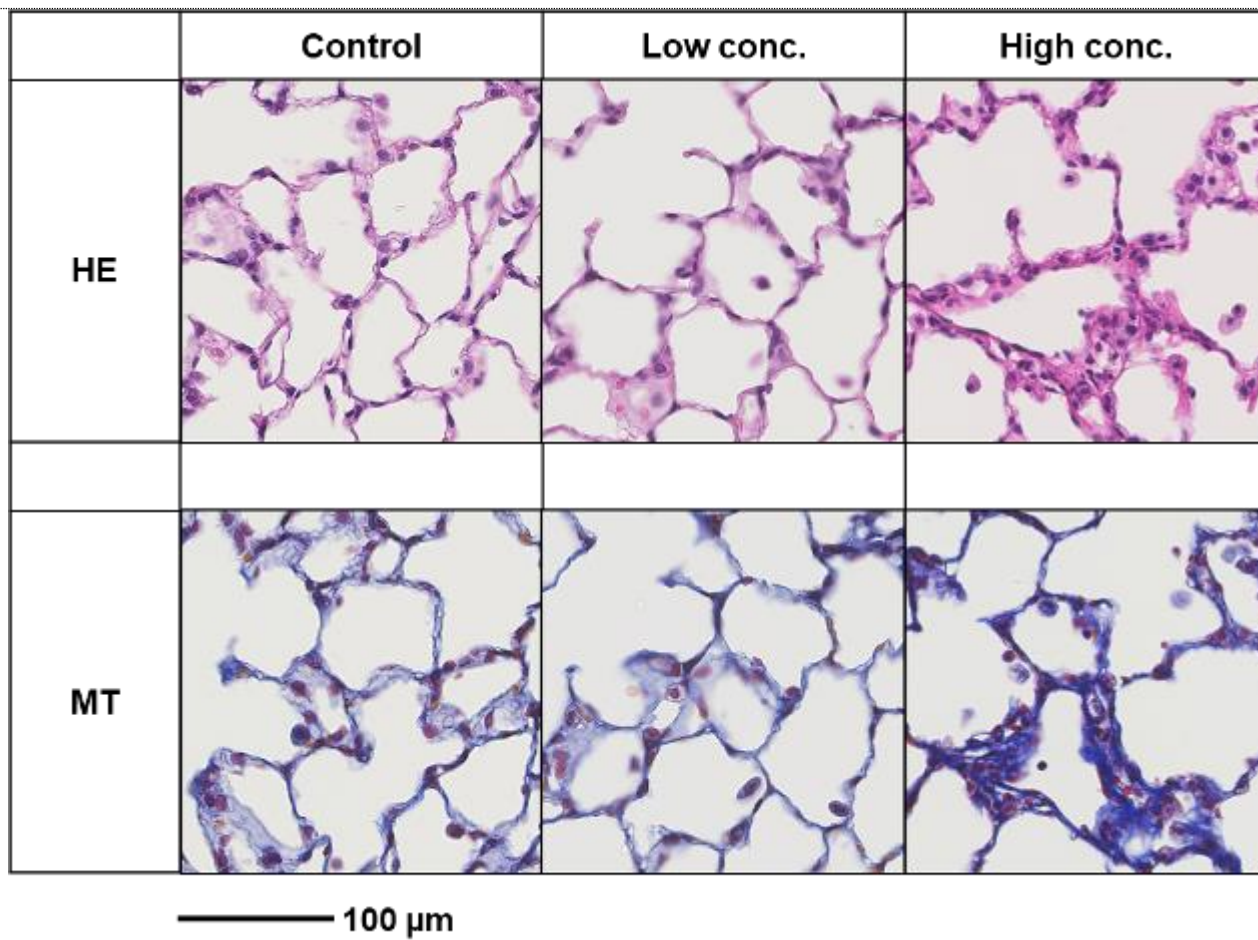


図 2 4 肺病理組織

(B)吸入ばく露試験 (ラット/長期)：ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)；3 ヶ月

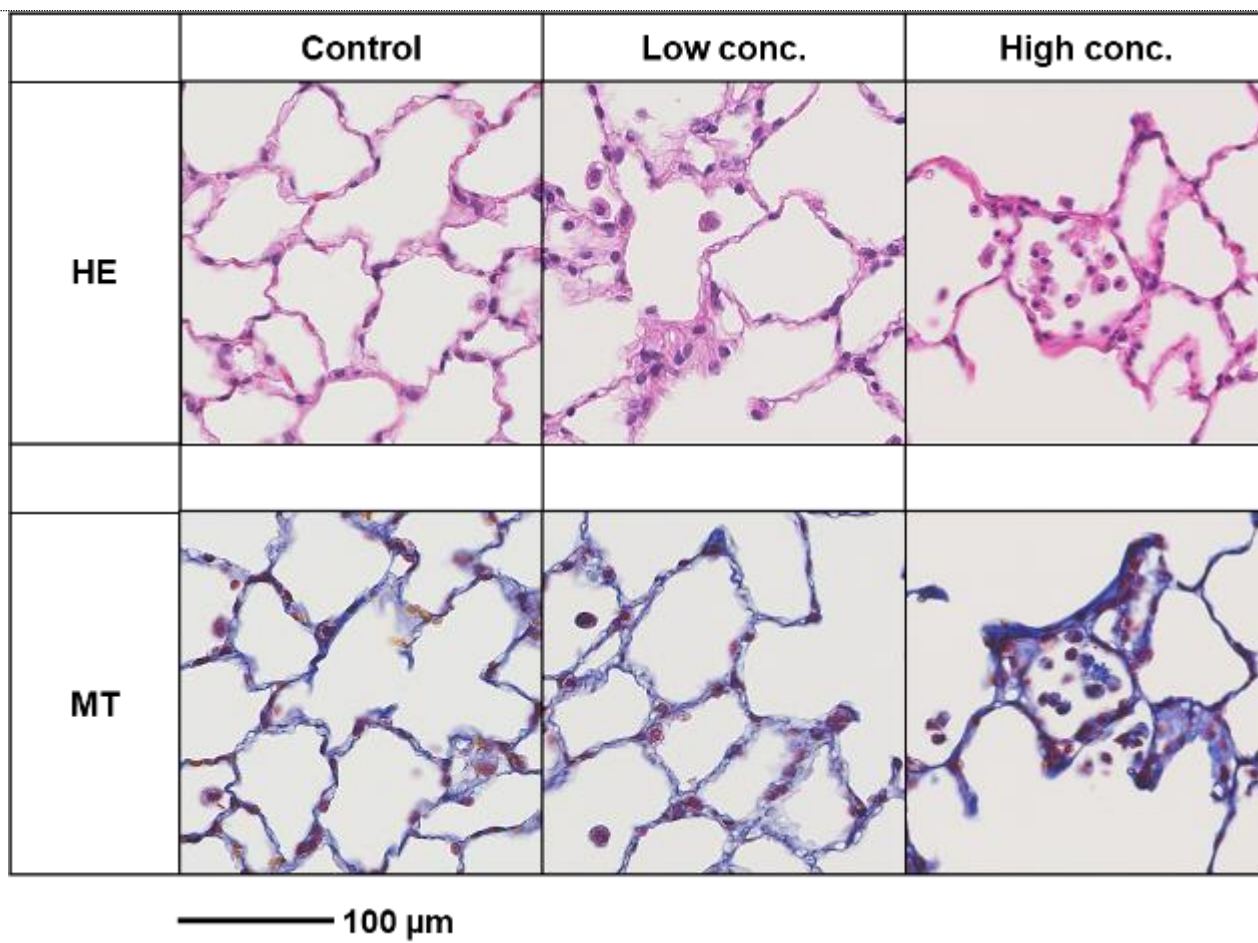
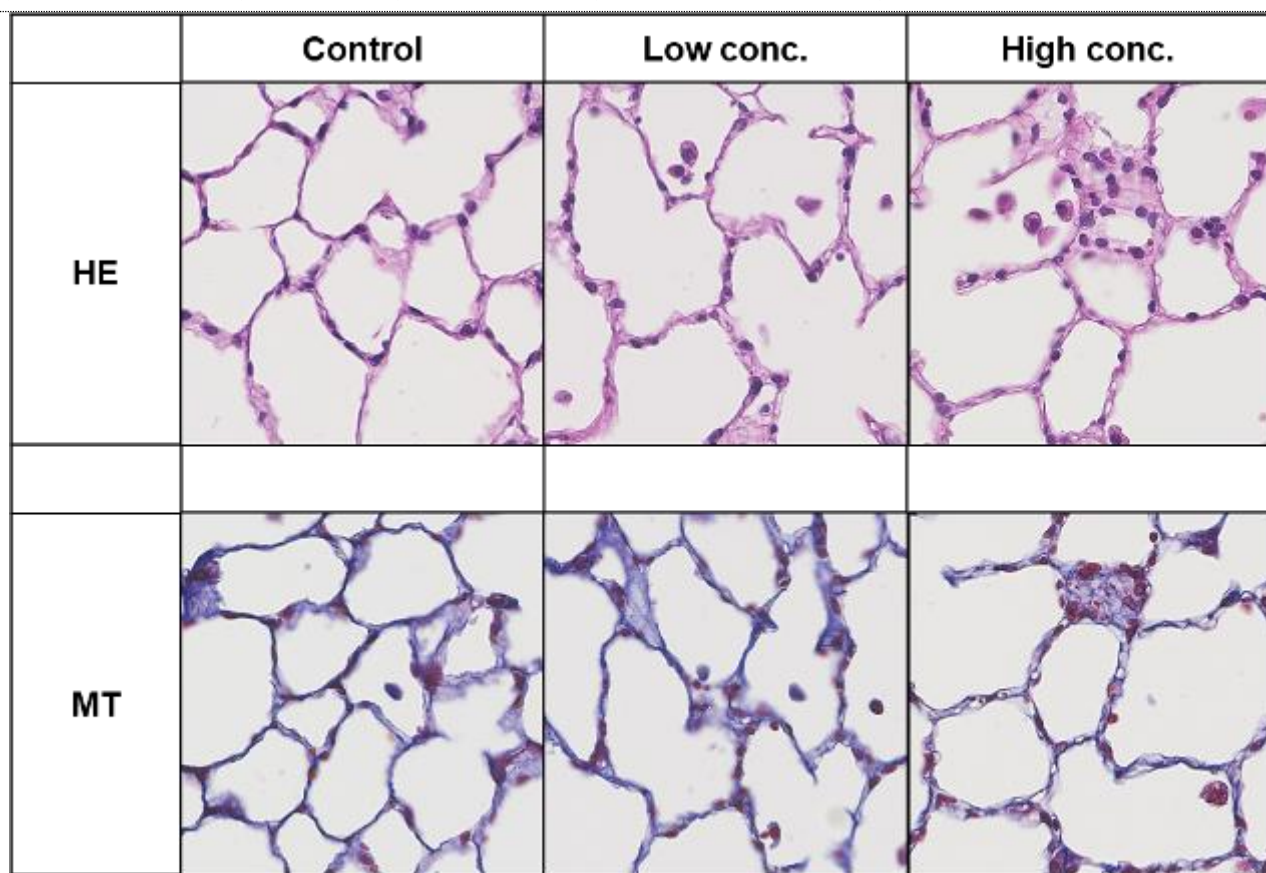


図 2 4 肺病理組織

(B)吸入ばく露試験 (ラット/長期) : ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸) ; 6 ヶ月



— 100 μm

図 2 5 (A) 吸入ばく露試験中のポリマーAのばく露濃度 (マウス) : 低濃度群							
実験	曝露日	ろ紙 測定後(mg)	ろ紙 測定前(mg)	粉体捕集量 (mg)	測定時間 (min)	吸引流量 (ℓ /min)	曝露濃度 (mg/m ³)
1	2022年1月31日	20.888	20.666	0.222	360	2.5	0.25
2	2022年2月1日	21.091	20.832	0.259	360	2.5	0.29
3	2022年2月2日	20.770	20.577	0.193	360	2.5	0.21
4	2022年2月3日	20.930	20.729	0.201	360	2.5	0.22
5	2022年2月4日	21.000	20.778	0.222	360	2.5	0.25
6	2022年2月7日	21.244	21.073	0.171	360	2.5	0.19
7	2022年2月8日	21.436	21.236	0.200	360	2.5	0.22
8	2022年2月9日	20.694	20.505	0.189	360	2.5	0.21
9	2022年2月10日	21.191	20.981	0.210	360	2.5	0.23
10	2022年2月14日	21.124	20.871	0.253	360	2.5	0.28
11	2022年2月15日	21.487	21.166	0.321	360	2.5	0.36
12	2022年2月16日	19.645	19.467	0.178	360	2.5	0.20
13	2022年2月17日	21.222	20.971	0.251	360	2.5	0.28
14	2022年2月18日	21.317	21.078	0.239	360	2.5	0.27
15	2022年2月21日	21.257	21.082	0.175	360	2.5	0.19
16	2022年2月22日	21.134	20.987	0.147	360	2.5	0.16
17	2022年2月24日	21.259	21.068	0.191	360	2.5	0.21
18	2022年2月25日	20.109	19.850	0.259	360	2.5	0.29
19	2022年2月28日	21.227	21.015	0.212	360	2.5	0.24
20	2022年3月1日	21.361	21.174	0.187	360	2.5	0.21
21	2022年3月2日	21.233	21.043	0.190	360	2.5	0.21
22	2022年3月3日	21.032	20.794	0.238	360	2.5	0.26
23	2022年3月4日	21.454	21.185	0.269	360	2.5	0.30
24	2022年3月7日	21.675	21.447	0.228	360	2.5	0.25
25	2022年3月8日	20.944	20.763	0.181	360	2.5	0.20
26	2022年3月9日	21.733	21.485	0.248	360	2.5	0.28
27	2022年3月10日	21.421	21.156	0.265	360	2.5	0.29
28	2022年3月11日	21.728	21.489	0.239	360	2.5	0.27
29	2022年3月14日	21.655	21.458	0.197	360	2.5	0.22
30	2022年3月15日	21.435	21.223	0.212	360	2.5	0.24
31	2022年3月16日	21.241	21.042	0.199	360	2.5	0.22
32	2022年3月17日	21.310	21.065	0.245	360	2.5	0.27
33	2022年3月18日	20.871	20.630	0.241	360	2.5	0.27
34	2022年3月22日	21.235	20.992	0.243	360	2.5	0.27
35	2022年3月23日	21.535	21.282	0.253	360	2.5	0.28

36	2022年3月24日	21.882	21.658	0.224	360	2.5	0.25
37	2022年3月25日	21.019	20.757	0.262	360	2.5	0.29
38	2022年3月28日	21.158	20.982	0.176	360	2.5	0.20
39	2022年3月29日	21.589	21.392	0.197	360	2.5	0.22
40	2022年3月30日	21.392	21.146	0.246	360	2.5	0.27
41	2022年3月31日	20.986	20.796	0.190	360	2.5	0.21
42	2022年4月1日	21.213	20.949	0.264	360	2.5	0.29
43	2022年4月4日	21.431	21.189	0.242	360	2.5	0.27
44	2022年4月5日	21.354	21.135	0.219	360	2.5	0.24
45	2022年4月6日	21.232	21.051	0.181	360	2.5	0.20
46	2022年4月7日	21.134	20.922	0.212	360	2.5	0.24
47	2022年4月8日	21.269	21.020	0.249	360	2.5	0.28
48	2022年4月11日	21.505	21.274	0.231	360	2.5	0.26
49	2022年4月12日	21.538	21.359	0.179	360	2.5	0.20
50	2022年4月13日	21.618	21.440	0.178	360	2.5	0.20
51	2022年4月14日	21.339	21.123	0.216	360	2.5	0.24
52	2022年4月15日	21.359	21.164	0.195	360	2.5	0.22
53	2022年4月18日	21.603	21.347	0.256	360	2.5	0.28
54	2022年4月19日	21.103	20.924	0.179	360	2.5	0.20
55	2022年4月20日	19.727	19.485	0.242	360	2.5	0.27
56	2022年4月21日	19.377	19.177	0.200	360	2.5	0.22
57	2022年4月25日	21.301	21.045	0.256	360	2.5	0.28
58	2022年4月26日	21.089	20.889	0.200	360	2.5	0.22
59	2022年4月27日	22.222	21.993	0.229	360	2.5	0.25
60	2022年5月2日	21.386	21.183	0.203	360	2.5	0.23
61	2022年5月9日	21.867	21.657	0.210	360	2.5	0.23
62	2022年5月10日	20.930	20.671	0.259	360	2.5	0.29
63	2022年5月11日	21.752	21.542	0.210	360	2.5	0.23
64	2022年5月12日	21.005	20.823	0.182	360	2.5	0.20
65	2022年5月13日	21.013	20.773	0.240	360	2.5	0.27
						平均	0.24
						標準偏差	0.04

図 2 5 (B) 吸入ばく露試験中のポリマーAのばく露濃度 (マウス) : 高濃度群							
実験	曝露日	ろ紙	ろ紙	粉体捕集量	測定時間	吸引流量	曝露濃度
		測定後(mg)	測定前(mg)	(mg)	(min)	(ℓ /min)	(mg/m ³)
1	2022年1月31日	22.680	20.821	1.859	360	2.5	2.07
2	2022年2月1日	22.582	20.628	1.954	360	2.5	2.17
3	2022年2月2日	23.011	20.808	2.203	360	2.5	2.45
4	2022年2月3日	23.183	20.749	2.434	360	2.5	2.70
5	2022年2月4日	22.559	20.520	2.039	360	2.5	2.27
6	2022年2月7日	23.433	20.991	2.442	360	2.5	2.71
7	2022年2月8日	23.202	20.981	2.221	360	2.5	2.47
8	2022年2月9日	23.455	21.355	2.100	360	2.5	2.33
9	2022年2月10日	24.028	21.369	2.659	360	2.5	2.95
10	2022年2月14日	23.104	20.468	2.636	360	2.5	2.93
11	2022年2月15日	23.516	21.503	2.013	360	2.5	2.24
12	2022年2月16日	23.841	21.230	2.611	360	2.5	2.90
13	2022年2月17日	23.508	21.214	2.294	360	2.5	2.55
14	2022年2月18日	23.652	21.183	2.469	360	2.5	2.74
15	2022年2月21日	23.628	21.059	2.569	360	2.5	2.85
16	2022年2月22日	23.223	21.131	2.092	360	2.5	2.32
17	2022年2月24日	23.880	21.240	2.640	360	2.5	2.93
18	2022年2月25日	23.557	20.683	2.874	360	2.5	3.19
19	2022年2月28日	23.343	21.038	2.305	360	2.5	2.56
20	2022年3月1日	22.940	20.481	2.459	360	2.5	2.73
21	2022年3月2日	23.893	21.282	2.611	360	2.5	2.90
22	2022年3月3日	22.884	21.056	1.829	360	2.5	2.03
23	2022年3月4日	23.786	21.379	2.407	360	2.5	2.67
24	2022年3月7日	21.420	19.310	2.110	360	2.5	2.34
25	2022年3月8日	21.264	19.341	1.923	360	2.5	2.14
26	2022年3月9日	22.774	20.953	1.821	360	2.5	2.02
27	2022年3月10日	23.377	20.980	2.397	360	2.5	2.66
28	2022年3月11日	23.418	21.325	2.093	360	2.5	2.33
29	2022年3月14日	23.315	21.065	2.250	360	2.5	2.50
30	2022年3月15日	23.126	21.103	2.023	360	2.5	2.25
31	2022年3月16日	21.577	19.623	1.954	360	2.5	2.17
32	2022年3月17日	23.135	21.176	1.959	360	2.5	2.18
33	2022年3月18日	23.876	21.384	2.492	360	2.5	2.77
34	2022年3月22日	23.511	21.266	2.245	360	2.5	2.49
35	2022年3月23日	23.378	21.208	2.170	360	2.5	2.41

36	2022年3月24日	23.354	20.854	2.500	360	2.5	2.78
37	2022年3月25日	23.293	20.922	2.371	360	2.5	2.63
38	2022年3月28日	23.381	21.242	2.139	360	2.5	2.38
39	2022年3月29日	23.055	21.034	2.021	360	2.5	2.25
40	2022年3月30日	24.148	21.484	2.664	360	2.5	2.96
41	2022年3月31日	23.778	21.182	2.596	360	2.5	2.88
42	2022年4月1日	23.570	21.138	2.432	360	2.5	2.70
43	2022年4月4日	21.941	19.333	2.608	360	2.5	2.90
44	2022年4月5日	23.625	21.046	2.579	360	2.5	2.87
45	2022年4月6日	23.281	21.551	1.730	360	2.5	1.92
46	2022年4月7日	22.568	20.593	1.975	360	2.5	2.19
47	2022年4月8日	23.224	20.930	2.294	360	2.5	2.55
48	2022年4月11日	23.788	21.805	1.983	360	2.5	2.20
49	2022年4月12日	23.785	21.245	2.540	360	2.5	2.82
50	2022年4月13日	23.315	20.766	2.549	360	2.5	2.83
51	2022年4月14日	22.999	21.188	1.811	360	2.5	2.01
52	2022年4月15日	23.289	21.306	1.983	360	2.5	2.20
53	2022年4月18日	23.409	20.850	2.559	360	2.5	2.84
54	2022年4月19日	23.483	21.474	2.009	360	2.5	2.23
55	2022年4月20日	23.071	20.941	2.130	360	2.5	2.37
56	2022年4月21日	23.381	21.109	2.272	360	2.5	2.52
57	2022年4月25日	21.268	19.257	2.011	360	2.5	2.23
58	2022年4月26日	21.679	19.025	2.654	360	2.5	2.95
59	2022年4月27日	23.282	21.254	2.028	360	2.5	2.25
60	2022年5月2日	23.281	21.295	1.986	360	2.5	2.21
61	2022年5月9日	23.608	21.283	2.325	360	2.5	2.58
62	2022年5月10日	23.991	21.303	2.688	360	2.5	2.99
63	2022年5月11日	22.808	20.952	1.856	360	2.5	2.06
64	2022年5月12日	24.426	22.051	2.375	360	2.5	2.64
65	2022年5月13日	23.421	21.010	2.411	360	2.5	2.68
						平均	2.52
						標準偏差	0.31

図 2 6 吸入ばく露中の体重推移

吸入ばく露試験（マウス/長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）

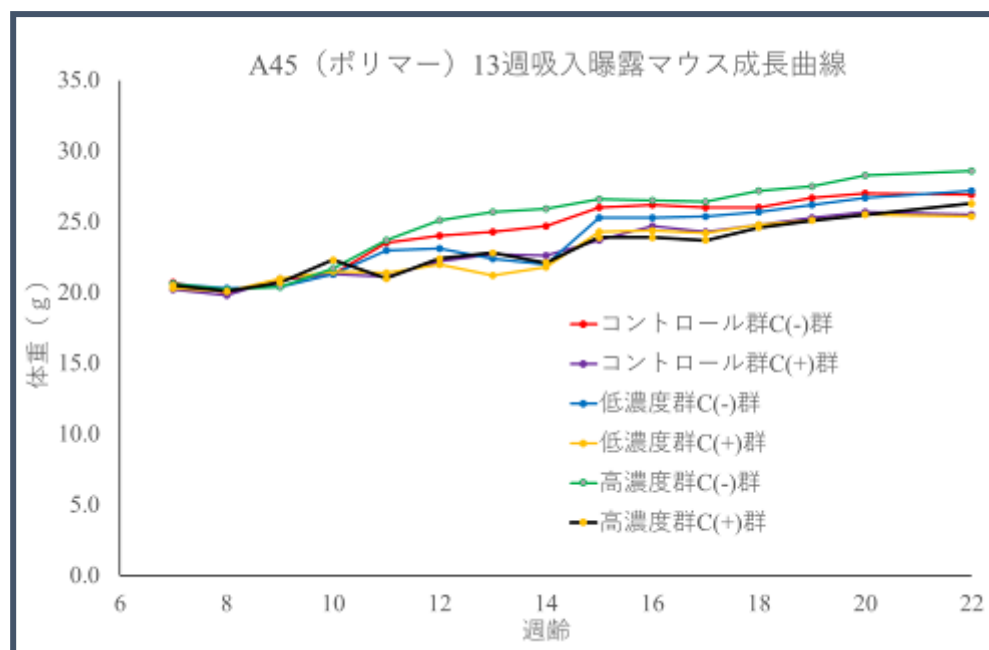
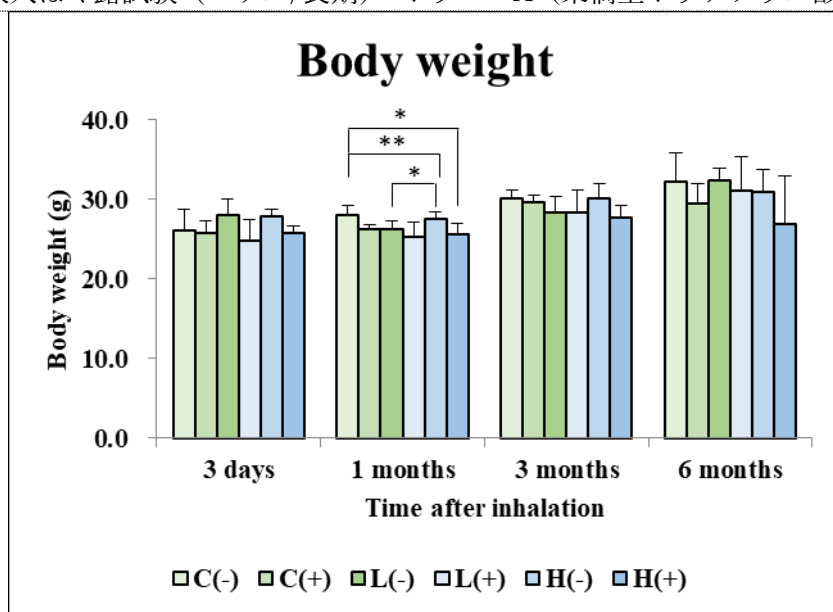


図 2 7 体重 (解剖時)

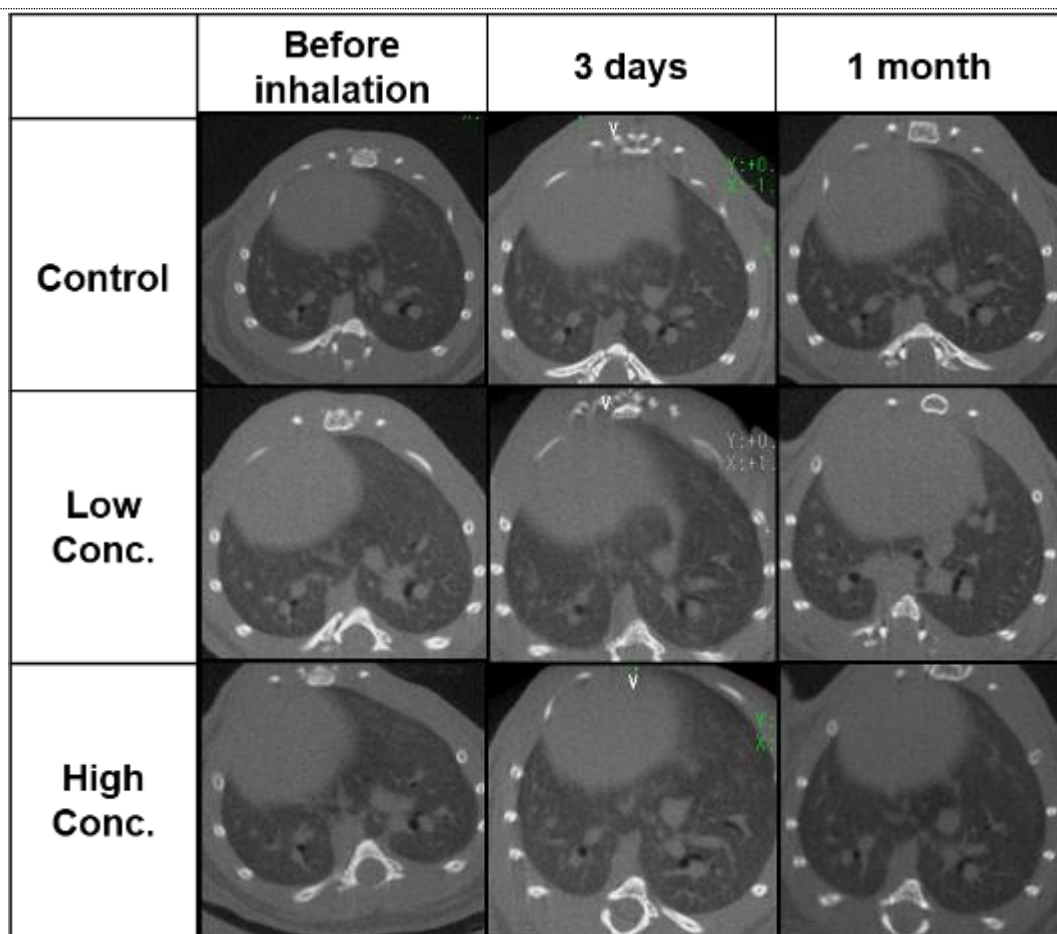
吸入ばく露試験 (マウス/長期): ポリマーA (架橋型ポリアクリル酸)



Turkey検定 ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 2 8 3D マイクロ CT

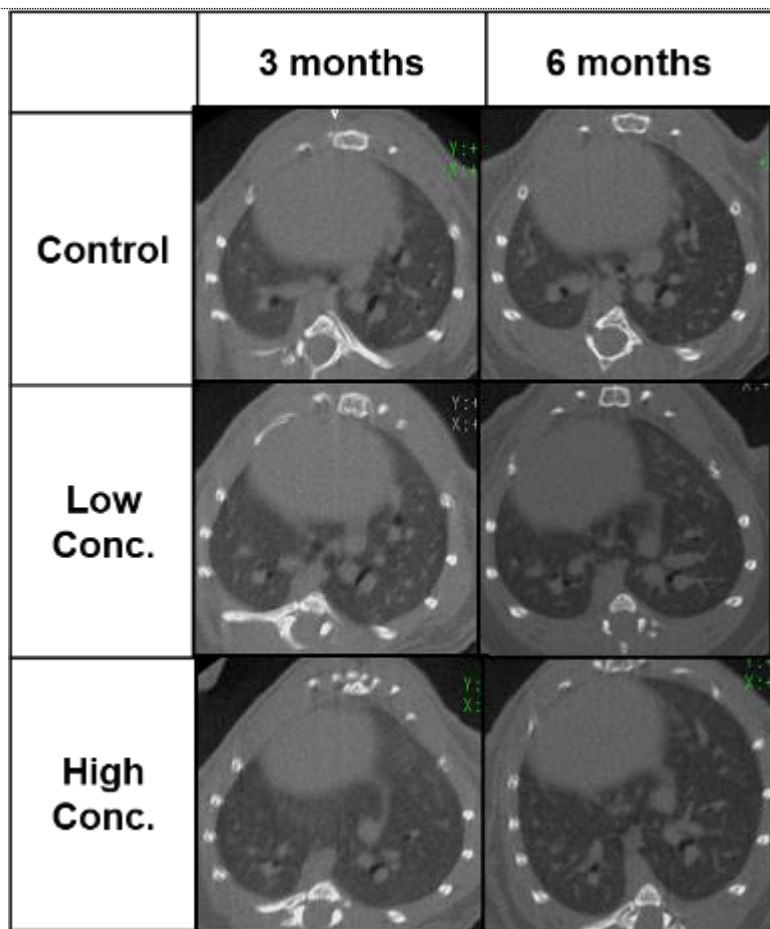
吸入ばく露試験（長期/マウス） クラブ細胞除去なし：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）



Low conc.: Low concentration, High conc.: High concentration

図 2 8 3D マイクロ CT

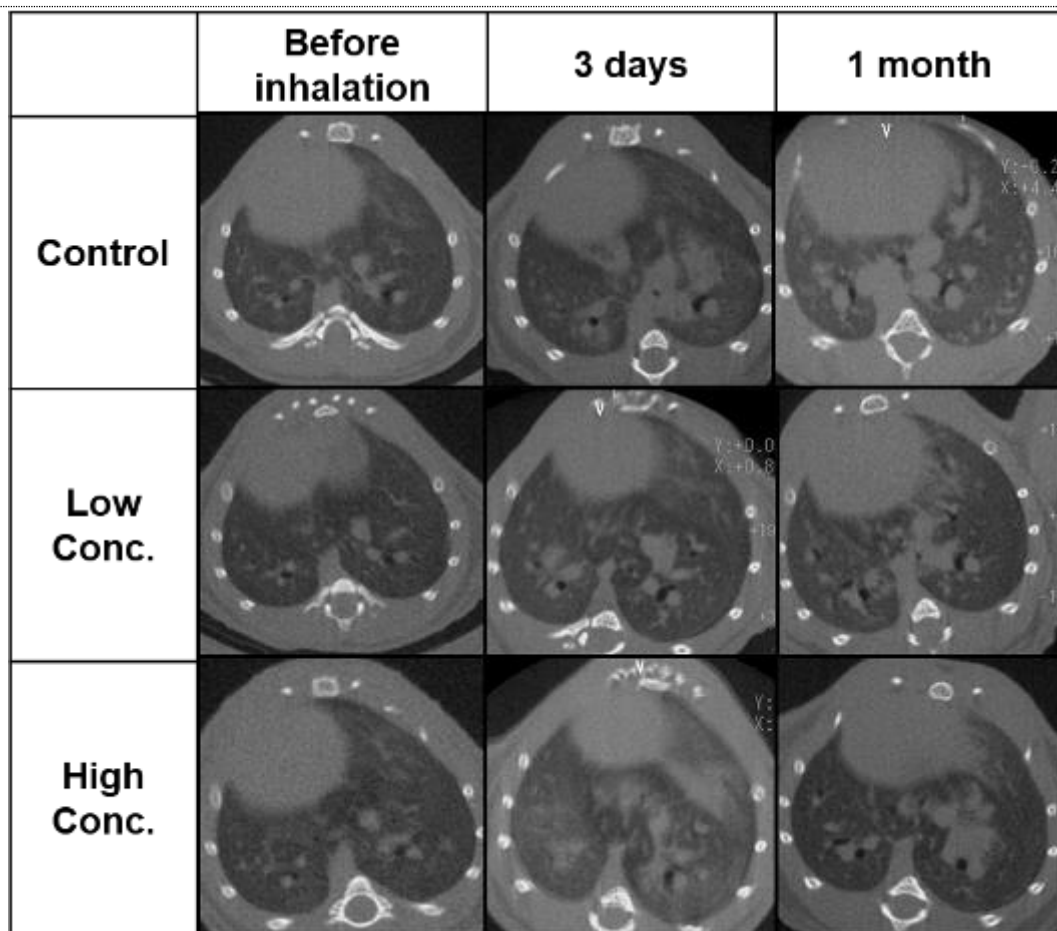
吸入ばく露試験（長期/マウス） クラブ細胞除去なし：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）



Low conc.: Low concentration, High conc.: High concentration

図 2 8 3D マイクロ CT

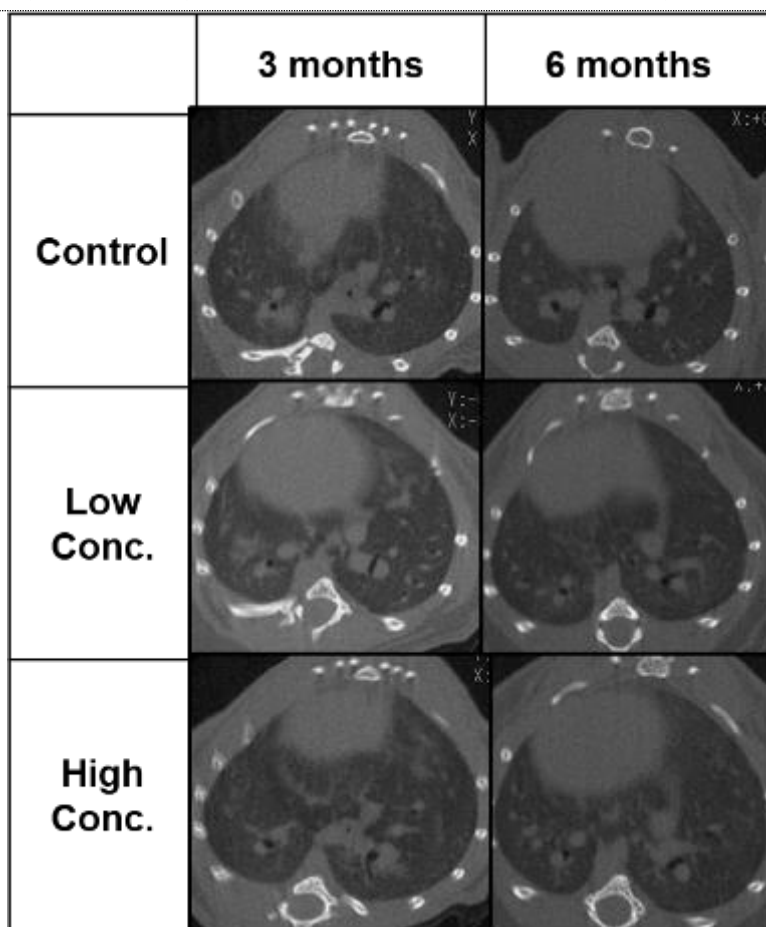
吸入ばく露試験（長期/マウス） クラブ細胞除去あり：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）



Low conc.: Low concentration, High conc.: High concentration

図 2 8 3D マイクロ CT

吸入ばく露試験（長期/マウス） クラブ細胞除去あり：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）



Low conc.: Low concentration, High conc.: High concentration

図 2 9 気管支肺胞洗浄液の解析

吸入ばく露試験（マウス/長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）

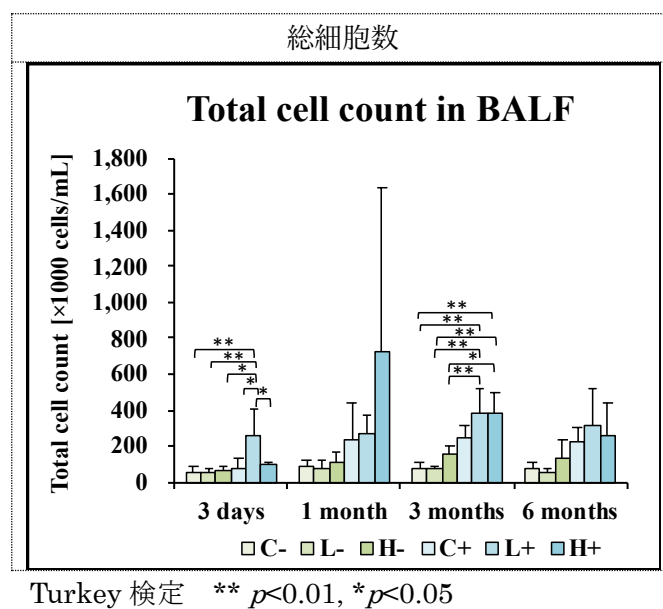
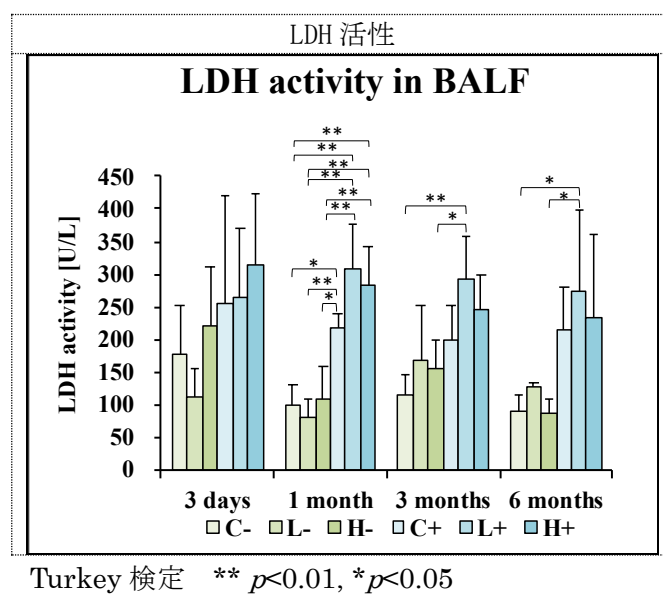
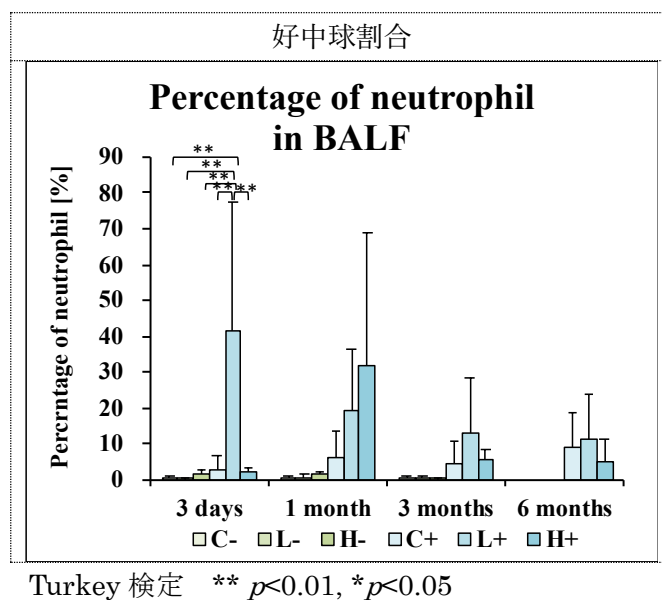
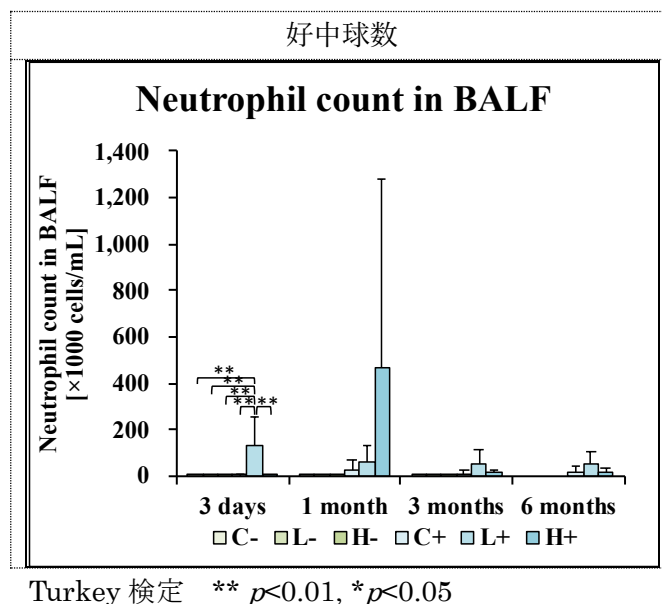


図 2 9 気管支肺胞洗浄液の解析

吸入ばく露試験（マウス/長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）



群名称	略称
対照群	
クラブ細胞除去なし群	C(-)群
クラブ細胞除去あり群	C(+)群
低濃度群	
クラブ細胞除去なし群	L(-)群
クラブ細胞除去あり群	L(+)群
高濃度群	
クラブ細胞除去なし群	H(-)群
クラブ細胞除去あり群	H(+)群

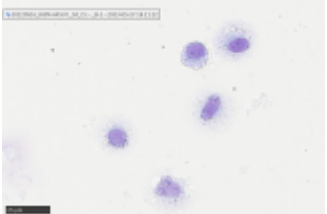
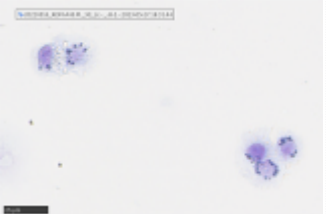
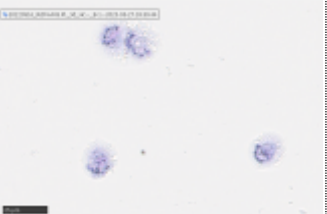
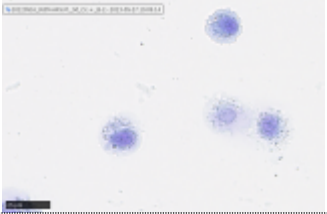
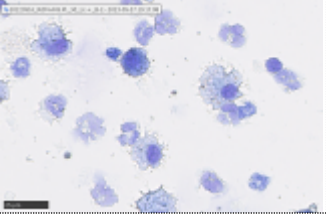
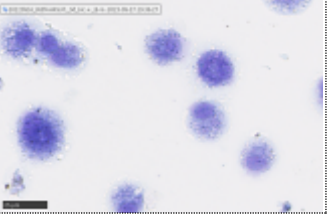
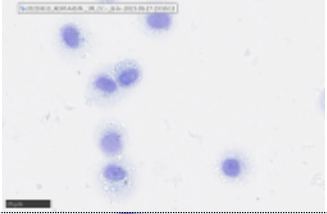
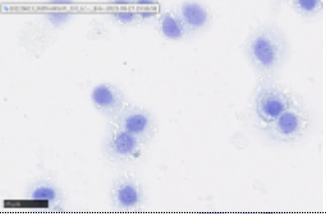
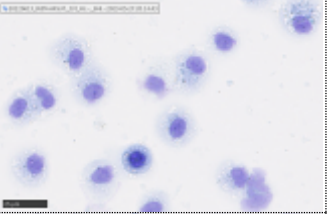
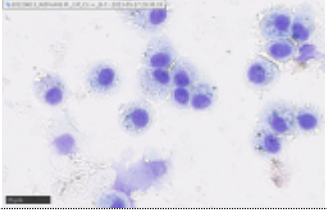
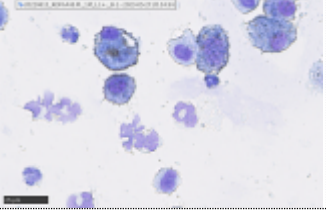
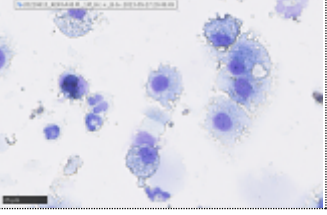
図 3 0 サイトスピンの所見			
マウス・長期 吸入ばく露試験	Control	0.2 mg/m ³	2.0 mg/m ³
3 days			
クラブ細胞 除去なし群			
クラブ細胞 除去あり群			
1 month			
クラブ細胞 除去なし群			
クラブ細胞 除去あり群			

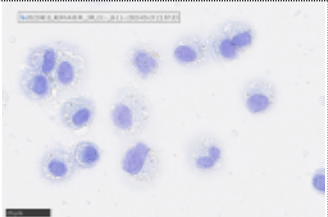
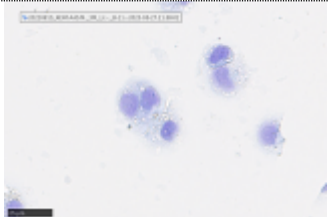
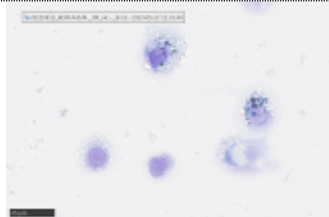
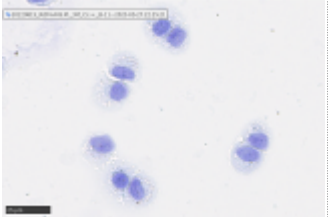
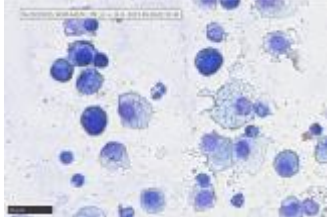
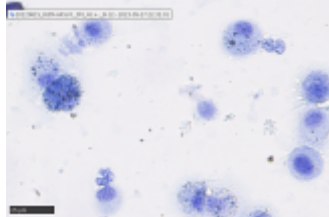
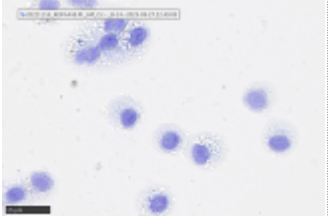
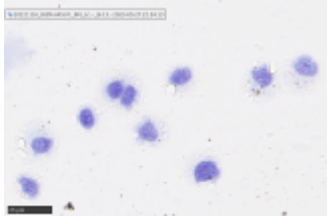
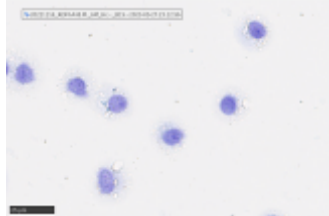
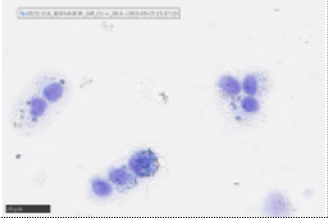
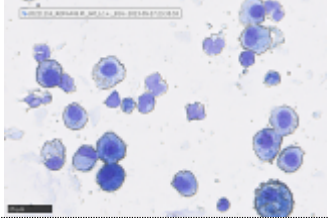
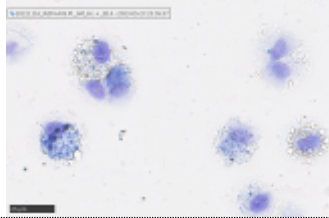
図 3 0 サイトスピンの所見			
マウス・長期 吸入ばく露試験	Control	0.2 mg/m ³	2.0 mg/m ³
3 months			
クラブ細胞 除去なし群			
クラブ細胞 除去あり群			
6 months			
クラブ細胞 除去なし群			
クラブ細胞 除去あり群			

図 3 1 肺病理組織

吸入ばく露試験（マウス/長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）；3日

クラブ細胞除去なし群

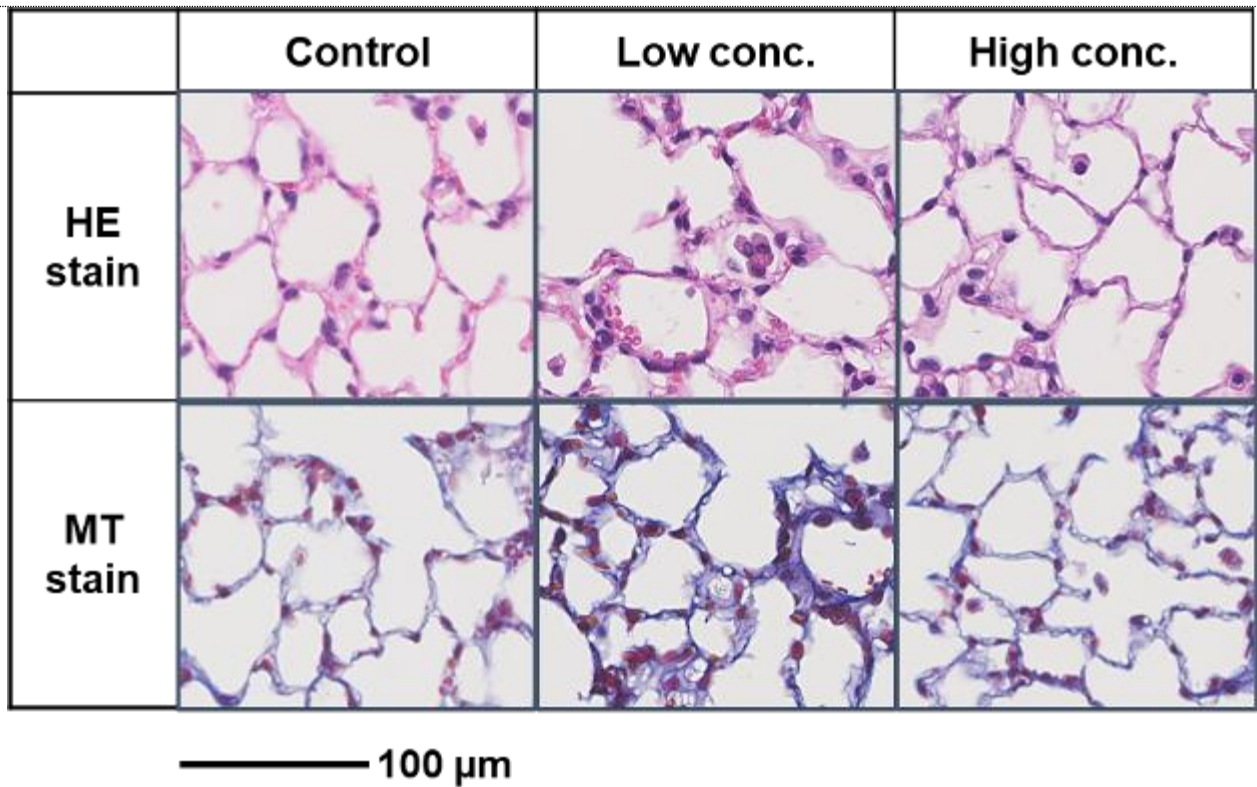
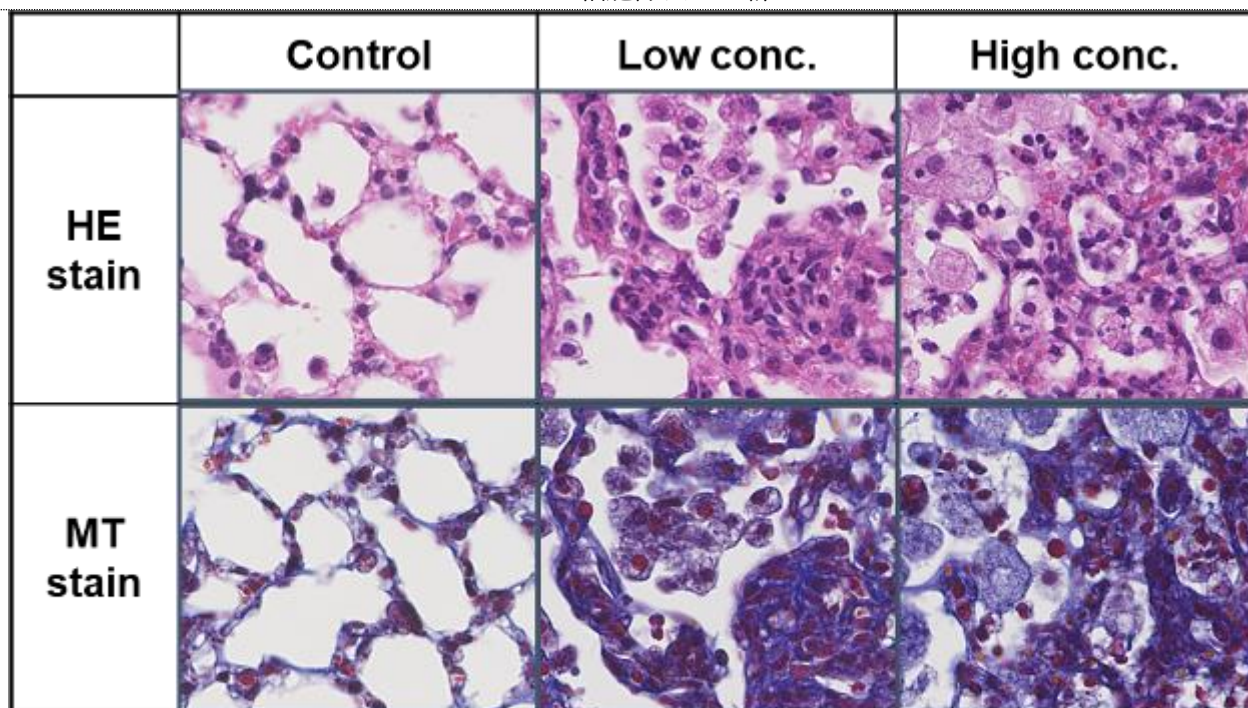


図 3 1 肺病理組織

吸入ばく露試験（マウス/長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）；3日

クラブ細胞除去あり群

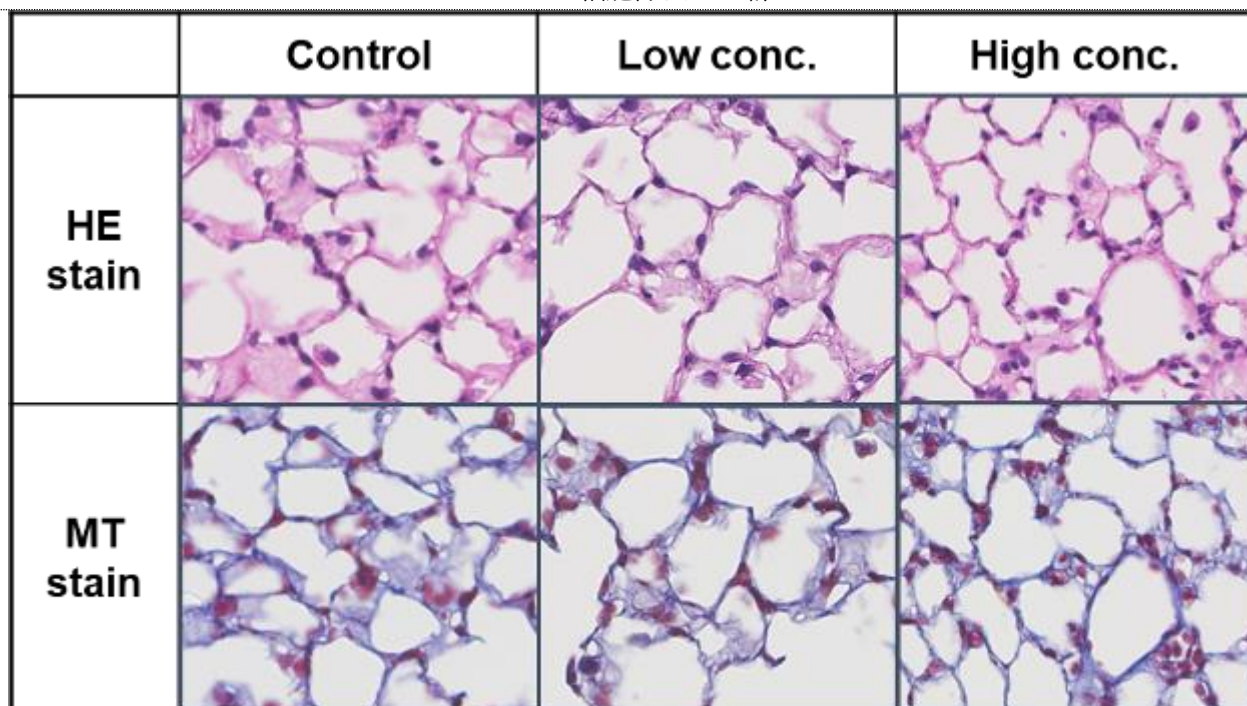


———— 100 μ m

図 3 1 肺病理組織

吸入ばく露試験（マウス/長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）；1ヶ月

クラブ細胞除去なし群

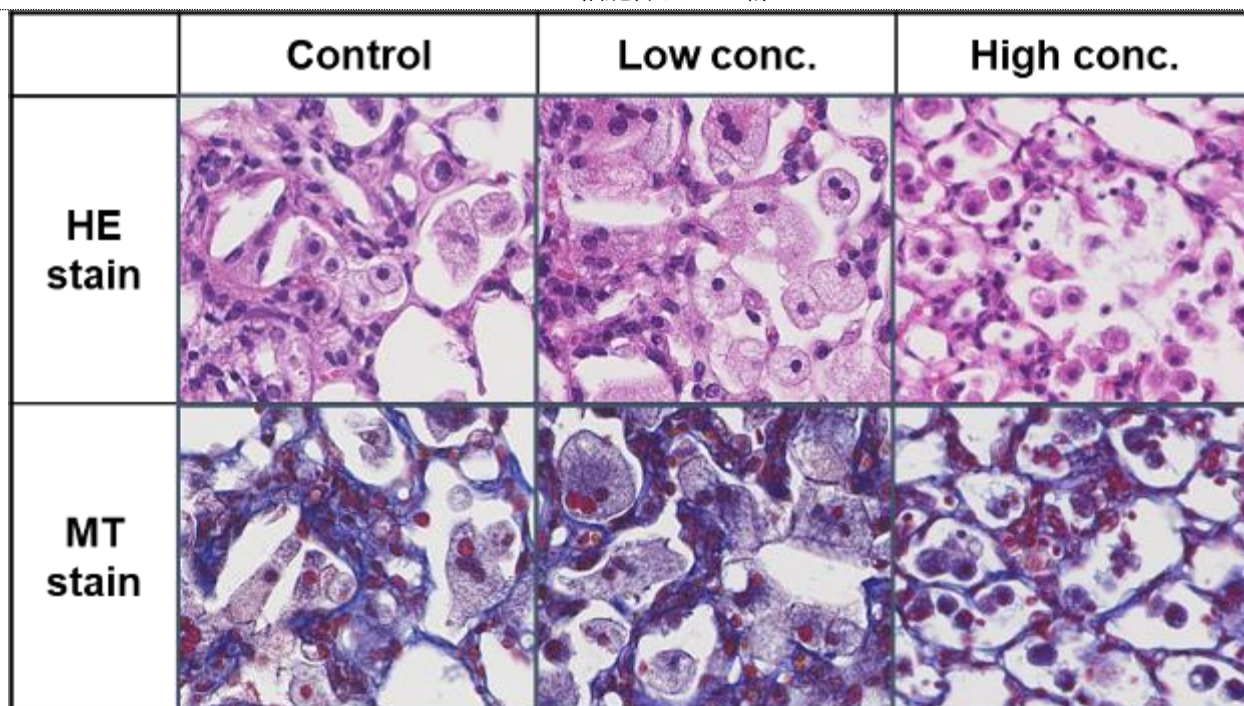


———— 100 μm

図 3 1 肺病理組織

吸入ばく露試験（マウス/長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）；1ヶ月

クラブ細胞除去あり群



———— 100 μ m

図 3 1 肺病理組織

吸入ばく露試験（マウス/長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）；3ヶ月

クラブ細胞除去なし群

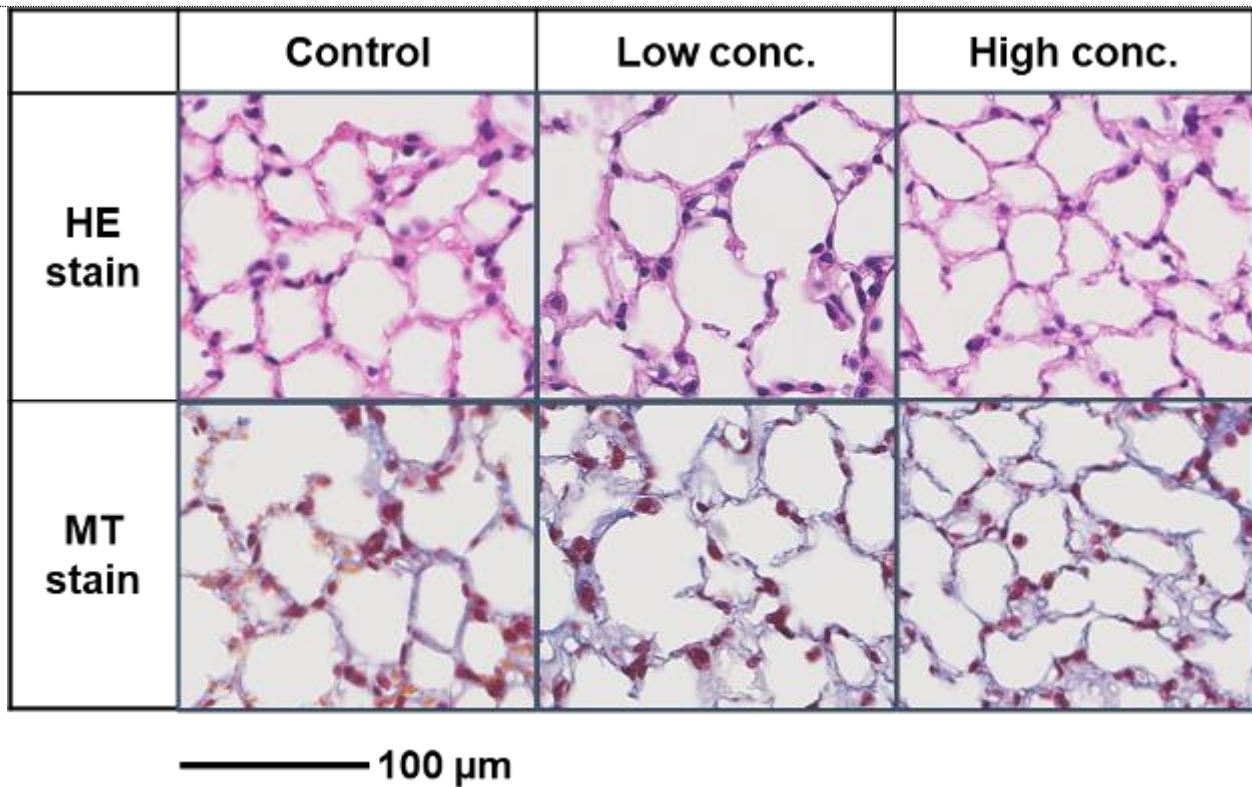
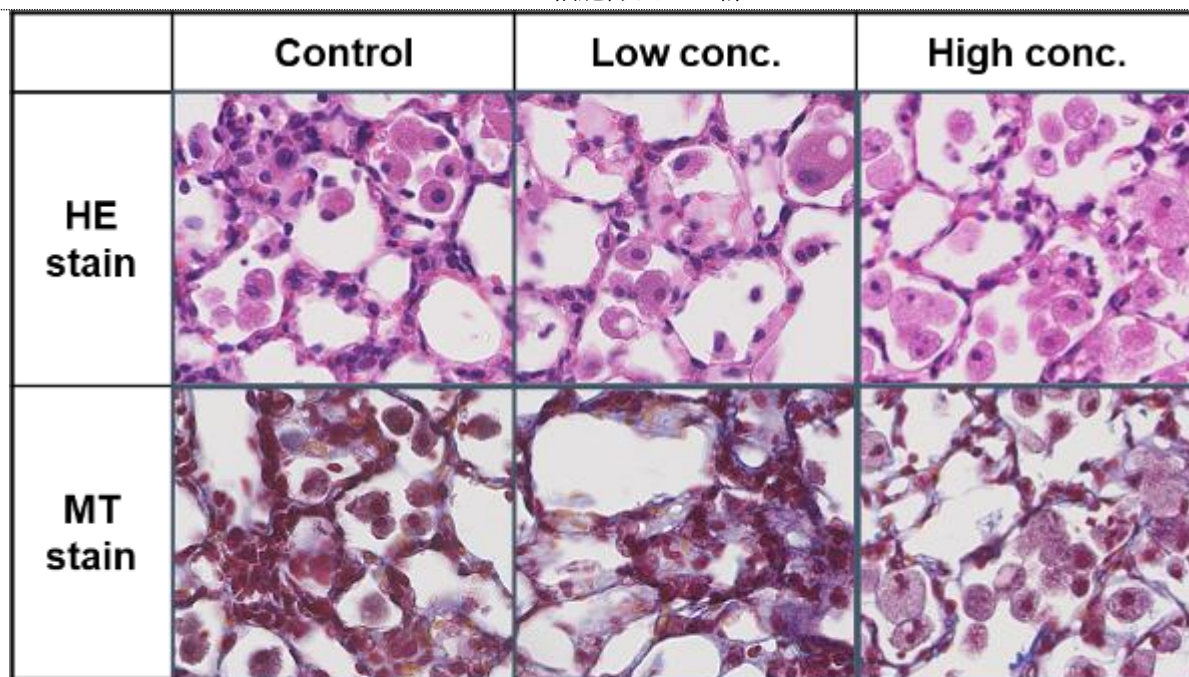


図 3 1 肺病理組織

吸入ばく露試験（マウス/長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）；3ヶ月

クラブ細胞除去あり群



— 100 μm

図 3 1 肺病理組織

吸入ばく露試験（マウス/長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）；6ヶ月

クラブ細胞除去なし群

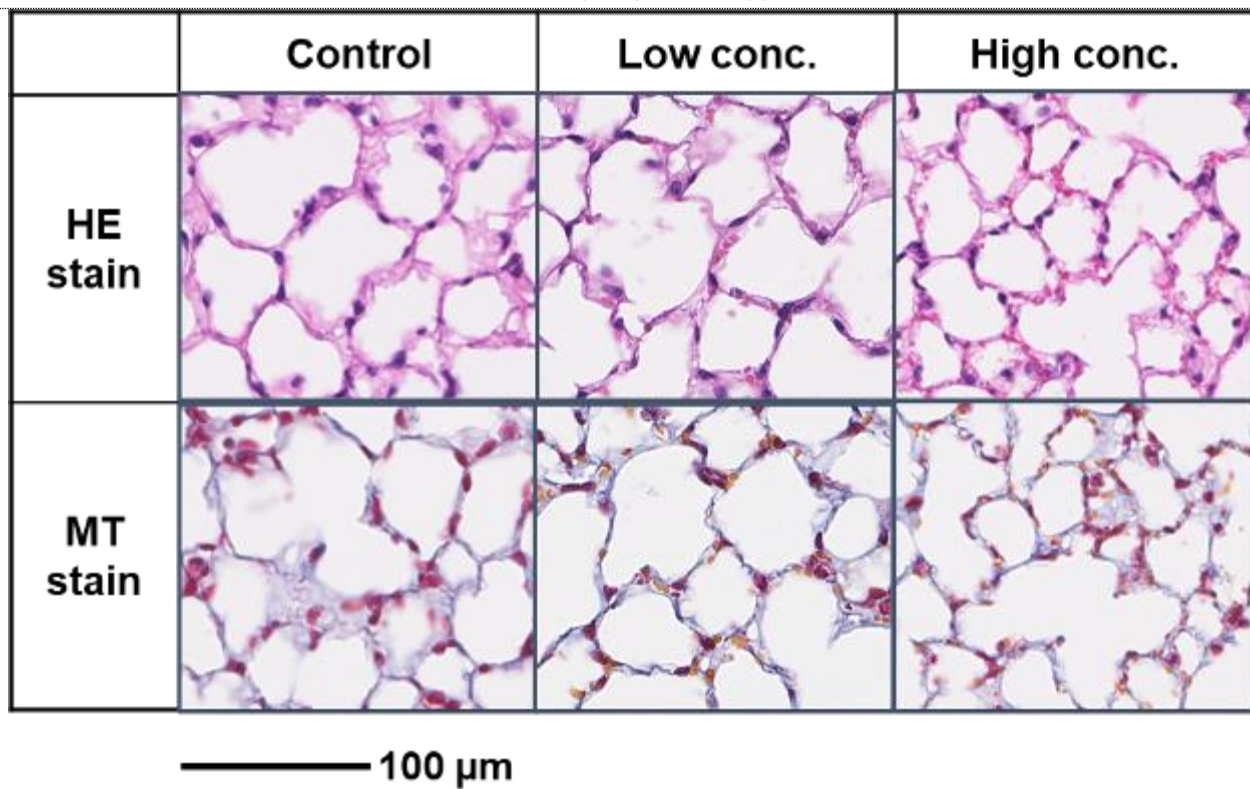
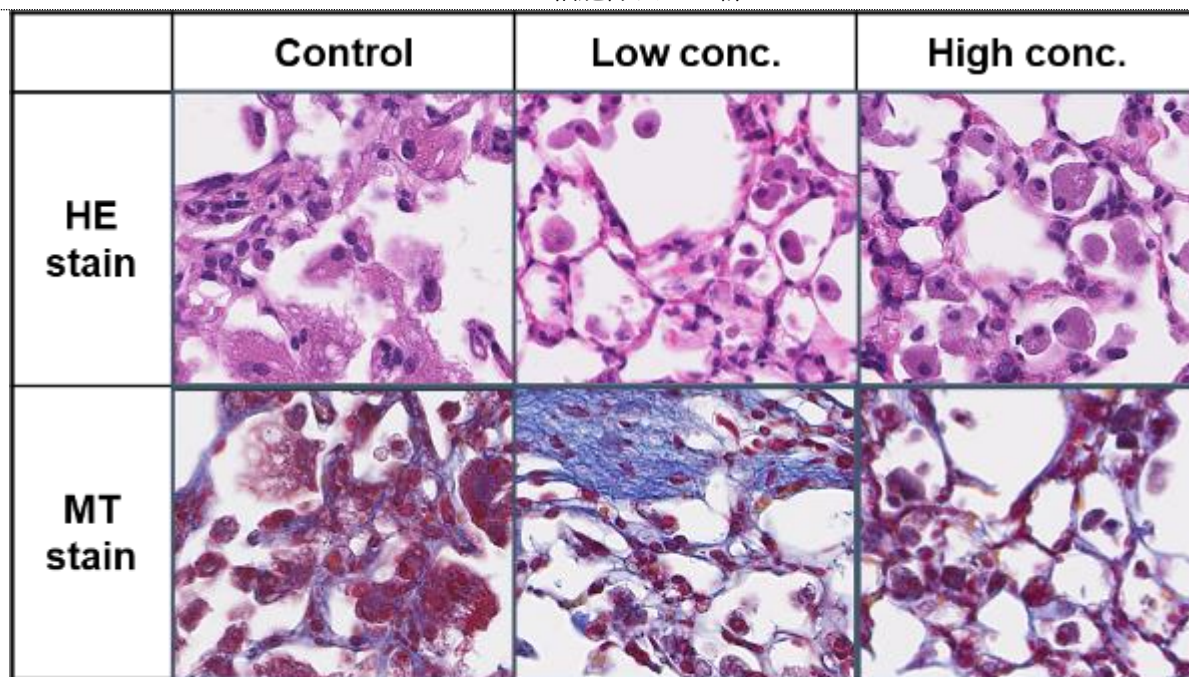


図 3 1 肺病理組織

吸入ばく露試験（マウス/長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）；6ヶ月

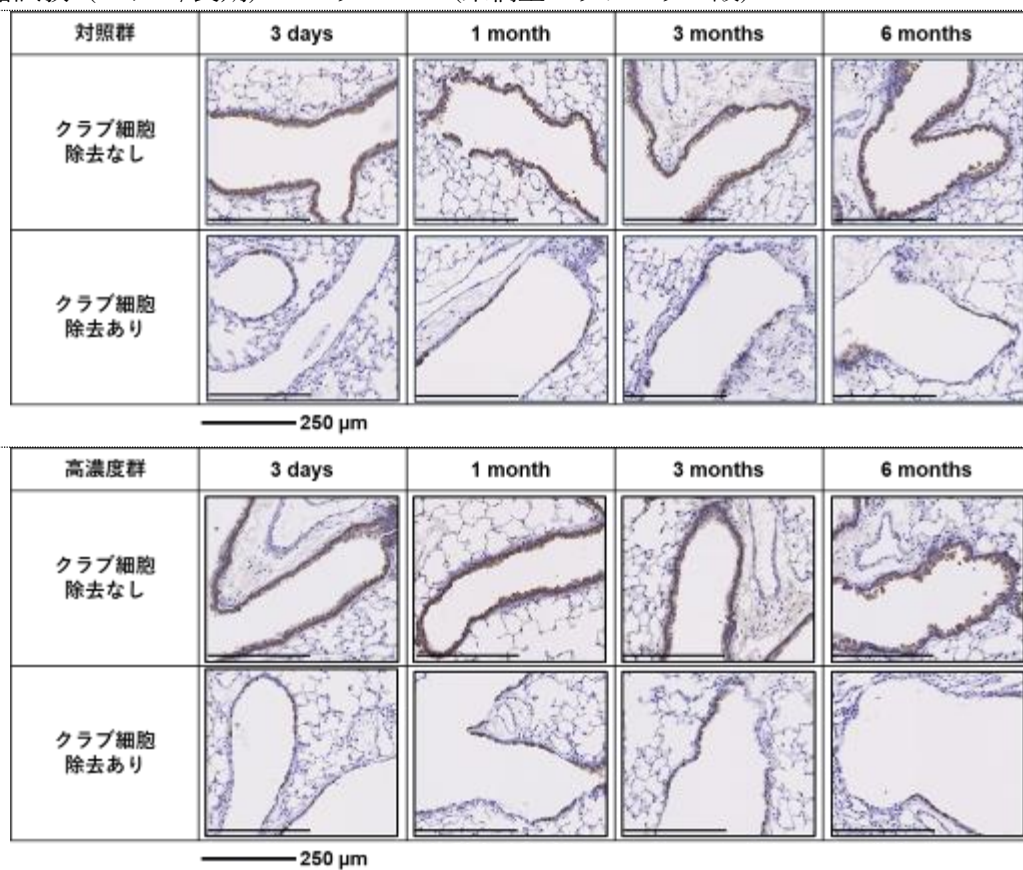
クラブ細胞除去あり群



— 100 μ m

図 3 2 CCSP免疫染色

吸入ばく露試験（マウス/長期）：ポリマーA（架橋型ポリアクリル酸）



3DマイクロCT装置



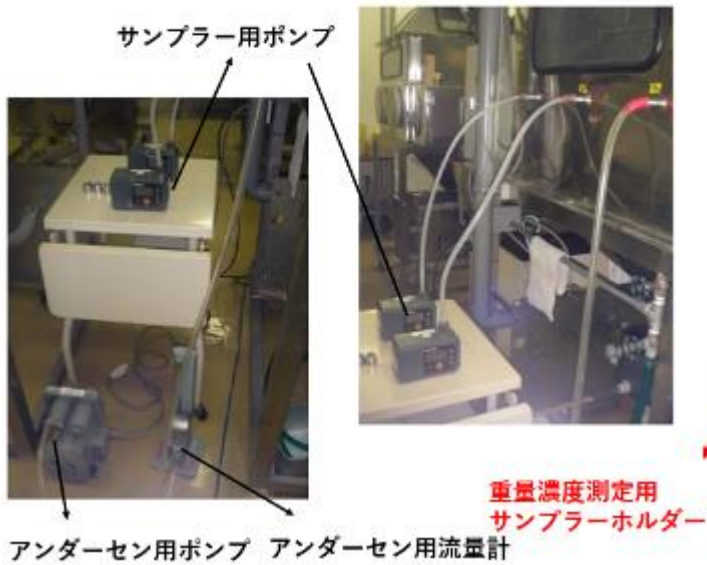
吸入ばく露試験



吸入ばく露試験



予備実験測定用機器配置写真



電顕用試料採取用サンプラー

アンダーセンサンプラー



ポンプとサンプラーの接続写真



ゴム栓



吸入ばく露試験

水平制御板（ターンテーブルのグローブに粉じんが一定量になるように、余分な粉体をカットするもの）



ホッパー



空気動力学的測定（ポリマーA）①

A45（ポリマー）アンダーセンサンプラー1回目測定 2021年5月26日（水）

No	dpa	測定後 ろ紙重量(mg)	測定前 ろ紙重量(mg)	ダスト重量 (mg)	積算 (mg)	積算 (%)
8 バックアップ	0	184.737	184.718	0.019	0.019	0.16
7	0.4	188.434	188.404	0.030	0.049	0.42
6	0.7	188.742	188.332	0.410	0.459	3.92
5	1.1	187.504	186.149	1.355	1.814	15.49
4	2.1	187.195	184.456	2.739	4.553	38.87
3	3.3	194.745	190.845	3.900	8.453	72.17
2	4.7	186.977	184.694	2.283	10.736	91.66
1	7	185.127	184.516	0.611	11.347	96.88
0	11	181.335	180.969	0.366	11.713	—

※ 150分間測定 曝露濃度 $2.76\text{mg}/\text{m}^3$

A45（ポリマー）アンダーセンサンプラー2回目測定 2021年5月27日（木）

No	dpa	測定後 ろ紙重量(mg)	測定前 ろ紙重量(mg)	ダスト重量 (mg)	積算 (mg)	積算 (%)
8 バックアップ	0	195.884	195.830	0.054	0.054	0.15
7	0.4	180.238	180.140	0.098	0.152	0.43
6	0.7	182.726	181.489	1.237	1.389	3.89
5	1.1	183.131	179.061	4.070	5.459	15.28
4	2.1	192.195	183.977	8.218	13.677	38.29
3	3.3	192.349	180.421	11.928	25.605	71.69
2	4.7	190.270	183.120	7.150	32.755	91.71
1	7	196.076	194.212	1.864	34.619	96.93
0	11	197.571	196.475	1.096	35.715	—

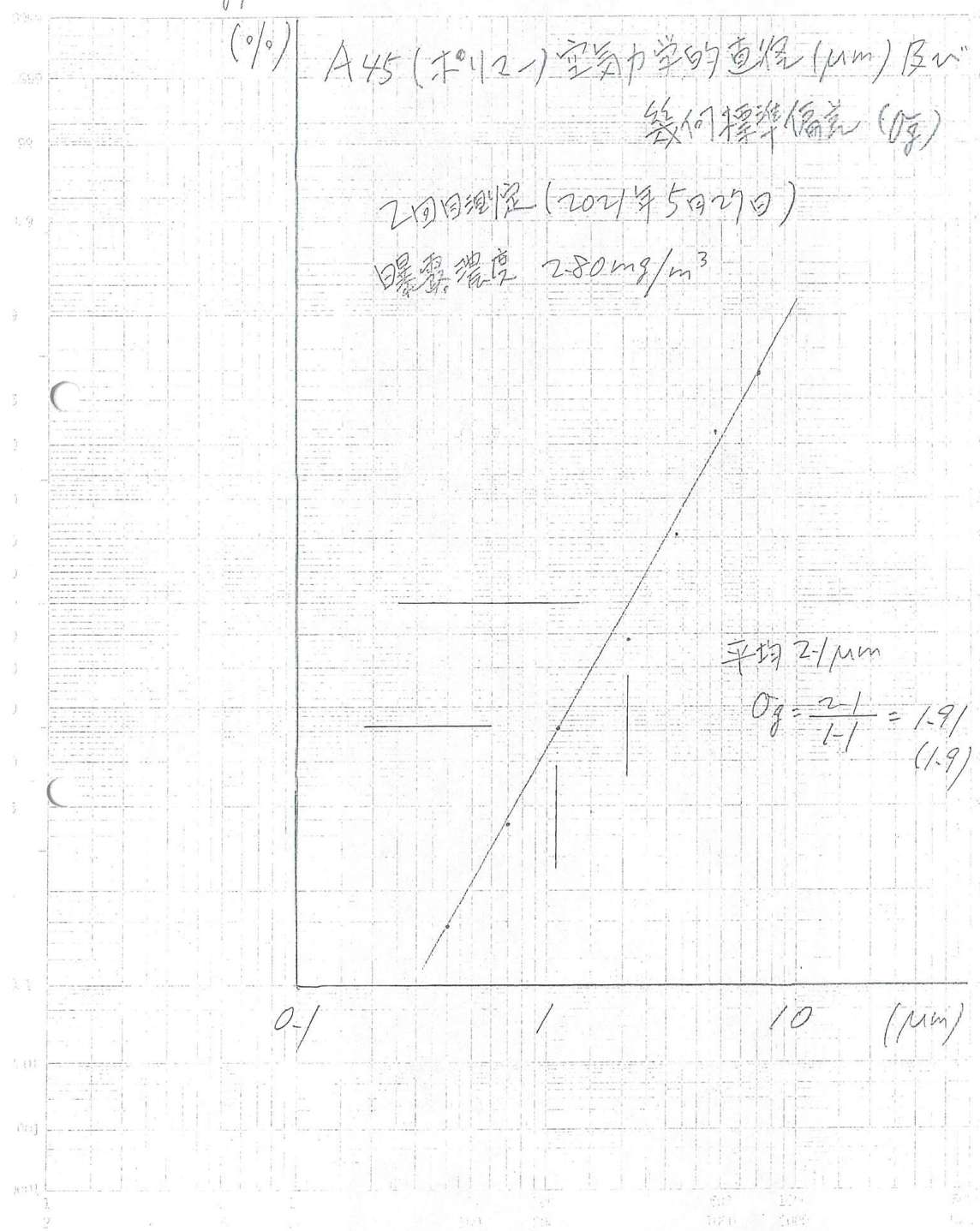
※ 450分間測定 曝露濃度 $2.80\text{mg}/\text{m}^3$

2mg/m³測定2

(%) A45 (ポリ2) 空気の直径 (μm) 及び
幾何標準偏差 (σ_g)

2日目測定 (2024年5月27日)

曝露濃度 2.80mg/m³



空気動力学的測定（ポリマーA）②

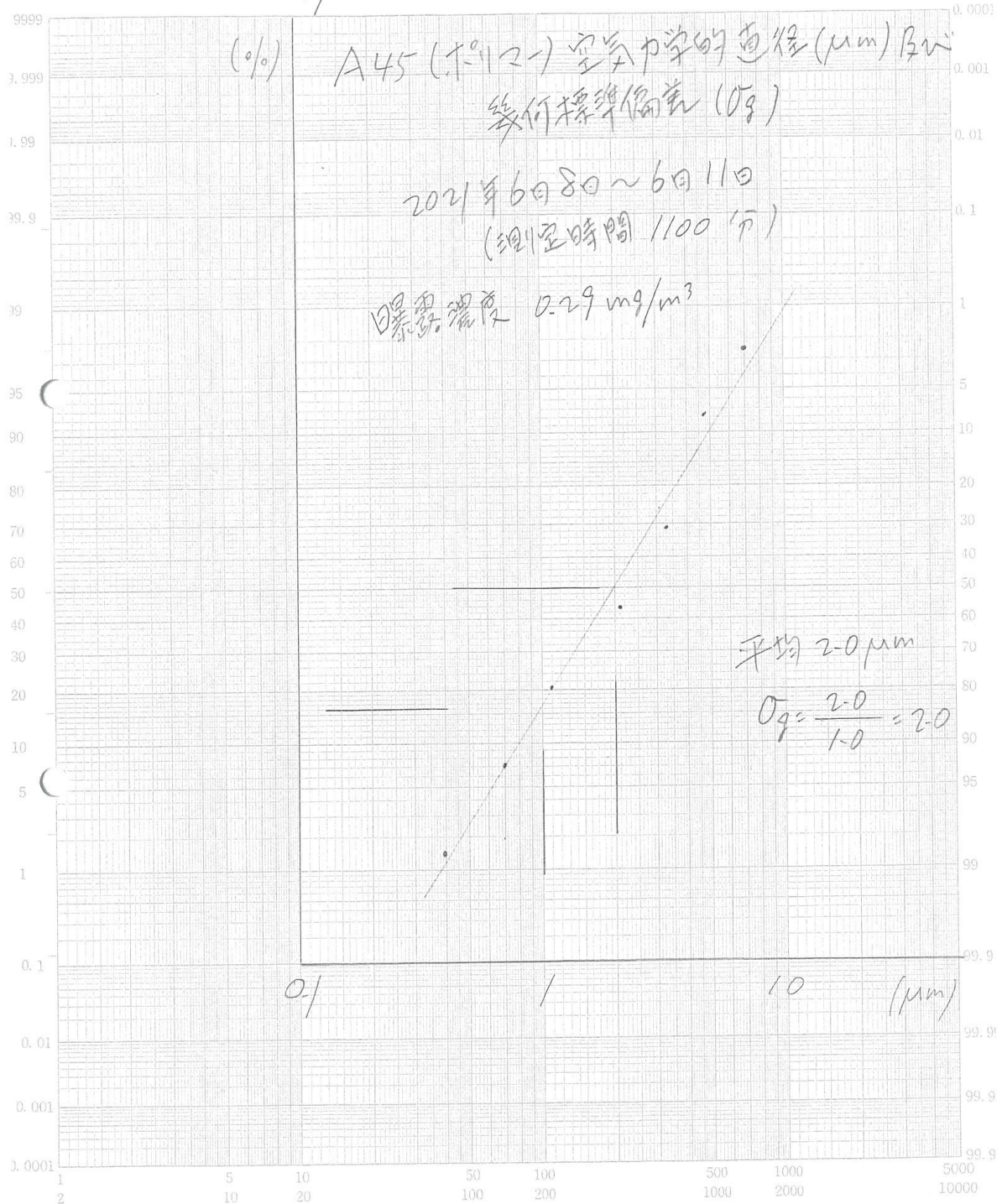
A45（ポリマー）アンダーセンサンプラー測定

（2021年6月8日～6月11日測定）

No	dpa	測定後 ろ紙重量(mg)	測定前 ろ紙重量(mg)	ダスト重量 (mg)	積算 (mg)	積算 (%)
8 バックアップ	0	170.100	170.027	0.073	0.073	0.81
7	0.4	175.824	175.761	0.063	0.136	1.51
6	0.7	176.459	175.943	0.516	0.652	7.24
5	1.1	185.996	184.682	1.314	1.966	21.84
4	2.1	185.198	183.204	1.994	3.960	44.00
3	3.3	192.728	190.423	2.305	6.265	69.60
2	4.7	190.448	188.418	2.030	8.295	92.16
1	7	187.649	187.164	0.485	8.780	97.54
0	11	204.483	204.262	0.221	9.001	—

※ 1,100分測定 曝露濃度0.29 mg/m³

0.2mg/m³測定





Article

Crosslinked Structure of Polyacrylic Acid Affects Pulmonary Fibrogenicity in Rats

Taisuke Tomonaga ^{1,*}, Chinatsu Nishida ², Hiroto Izumi ³, Naoki Kawai ⁴, Ke-Yong Wang ⁵,
Hidenori Higashi ⁶, Jun-ichi Takeshita ⁷, Ryohei Ono ⁸, Kazuki Sumiya ⁹, Shota Fujii ⁹, Yuki Hata ⁹,
Kazuo Sakurai ⁹, Toshiki Morimoto ², Yasuyuki Higashi ², Kei Yamasaki ², Kazuhim Yatera ²
and Yasuo Morimoto ¹

- ¹ Department of Occupational Pneumology, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan 1-1 Iseigakka, Yahata Nishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan
- ² Department of Respiratory Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan 1-1 Iseigakka, Yahata Nishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan
- ³ Shared-Use Research Center, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan 1-1 Iseigakka, Yahata Nishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan
- ⁴ Department of Environmental Health Engineering, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan 1-1 Iseigakka, Yahata Nishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan
- ⁵ Research Institute of Science for Safety and Sustainability, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan 16-1 Onogawa, Tsukuba 305-8565, Japan
- ⁶ Department of Chemistry and Biochemistry, The University of Kitakyushu, 3-1, Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu 808-0125, Japan
- ^{*} Correspondence: t-tomonaga@med.uoeh-u.ac.jp; Tel.: +81-93-691-7466



Citation: Tomonaga, T.; Nishida, C.; Izumi, H.; Kawai, N.; Wang, K.-Y.; Higashi, H.; Takeshita, J.-i.; Ono, R.; Sumiya, K.; Fujii, S.; et al. Crosslinked Structure of Polyacrylic Acid Affects Pulmonary Fibrogenicity in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13870. <https://doi.org/10.3390/ijms232213870>

Academic Editors: Axel T. Noll and Malin Wadberg

Received: 29 September 2022

Accepted: 8 November 2022

Published: 10 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: We conducted intratracheal instillations of polyacrylic acid (PAA) with crosslinking and non-crosslinking into rats in order to examine what kinds of physicochemical characteristics of acrylic-acid-based polymers affect responses in the lung. F344 rats were intratracheally exposed to similar molecular weights of crosslinked PAA (CL-PAA) (degree of crosslinking: ~0.1%) and non-crosslinked PAA (Non-CL-PAA) at low and high doses. Rats were sacrificed at 3 days, 1 week, 1 month, 3 months, and 6 months post-exposure. Both PAAs caused increases in neutrophil influx, cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINC) in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and heme oxygenase-1 (HO-1) in the lung tissue from 3 days to 6 months following instillation. The release of lactate dehydrogenase (LDH) activity in the BALF was higher in the CL-PAA-exposed groups. Histopathological findings of the lungs demonstrated that the extensive fibrotic changes caused by CL-PAA were also greater than those in exposure to the Non-CL-PAA during the observation period. CL-PAA has more fibrogenicity of the lung, suggesting that crosslinking may be one of the physicochemical characteristic factors of PAA-induced lung disorder.

Keywords: polyacrylic acid (PAA); organic chemicals; crosslinking; pulmonary toxicity

1. Introduction

Inorganic chemicals such as asbestos and crystalline silica are known to cause fibrosis-based lung disorders such as pneumoconiosis, while organic chemicals are known to cause allergic diseases such as bronchial asthma and hypersensitivity pneumonitis, but are not considered to cause lung fibrosis directly. In recent years, however, it has been reported that organic chemicals induce fibrosis following inflammation. In Korea, general consumers exposed to disinfectants used in humidifiers developed progressive interstitial pneumonia, which became a social problem [1,2], and in the United States, e-cigarette users suffered from acute respiratory failure [3,4]. In Japan, progressive lung disorder was observed in workers who handled several polyacrylic acids (PAA), and the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) considered this lung disorder important and issued a notice [5–7].

PAA is a white powder that is composed of acrylic acid monomers that are repeatedly linked together to form a so-called polymer structure, and by using a crosslinking agent to induce covalent crosslinking of multiple linear molecules, the polymer is made more polymeric, forming a complex three-dimensional structure [8]. Since PAA is an organic chemical that has water absorbency and thickening properties when dissolved in water, it is used in various products in daily use—from diapers, shampoos, and cosmetics to food additives—and is a highly safe substance that is widely used in general society [9]. In Japan, however, inflammation and fibrosis of the interstitium around the airways have been reported in workers handling PAAs that are water-absorbing crosslinked polymer compounds [5–7]. The progression of fibrosis is more rapid than that of lung disorder caused by asbestos or crystalline silica, which are known as representative inorganic chemicals with fibrogenicity. Elucidation of its pathogenesis is urgently needed.

Several animal exposure studies using PAA have confirmed that its pathogenesis is lung disorder, as in humans [7,10,11]. Rat intratracheal instillation and inhalation exposure studies of PAA have reported neutrophilic lung inflammation, lung injury, and subsequent rapid fibrosis [7,10,11]; however, it has not yet been elucidated as to what physicochemical properties of PAA affect the physiopathology in the lung.

We previously reported in an intratracheal instillation in rats [12] that PAA with high molecular weights causes more lung disorders than PAA with low molecular weights. It is thought that the thickening property changes with increasing molecular weight, resulting in an advance in the inflammogenicity and fibrogenicity of PAA. The crosslinking structure is also considered to be another major factor that affects the thickening property. In the present study, an intratracheal instillation was performed on rats using crosslinked PAA (CL-PAA) and non-crosslinked PAA (Non-CL-PAA) at the same molecular weight level in order to evaluate whether or not crosslinking structures of PAA affect physiopathology in lung.

2. Results

2.1. Relative Lung Weights

Relative lung weight (lung weight/body weight) increased dose-dependently at each observation point in both the Non-CL-PAA and CL-PAA exposure groups (Figure 1A). The amounts of BALF were significantly lower in both the Non-CL-PAA and CL-PAA exposure groups compared with the control group in a dose-dependent manner throughout the observation period (Figure 1B). The CL-PAA-exposed lungs, especially the 1.0 mg of CL-PAA-exposed lungs, were more rigid, and it was difficult to expand the lungs when obtaining the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (Figure 2).

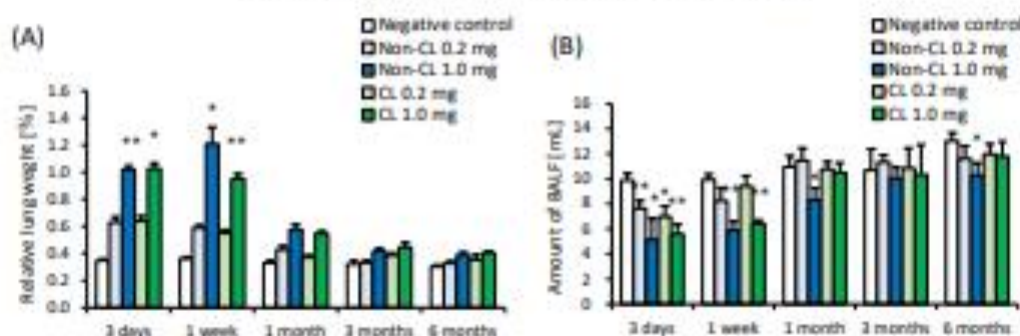


Figure 1. Relative lung weight after the instillation, and amount of BALF in the dissection. (A) Relative weight of the entire lung was calculated as a ratio of total lung weight (g) to body weight for each rat in the Non-CL-PAA and CL-PAA exposure groups. (B) The amounts of BALF

were obtained during dissection at each time after exposure. The relative lung weight was generally significantly heavier in the exposed groups compared with the control group in a dose-dependent manner throughout the observation period. The amounts of BALF were also significantly lower in the exposed groups compared with the control group in a dose-dependent manner throughout the observation period. Data are presented as mean $\pm$ SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). An average of negative controls in Non-CL-PAA and CL-PAA experiments at each time point showed a single bar of negative control.

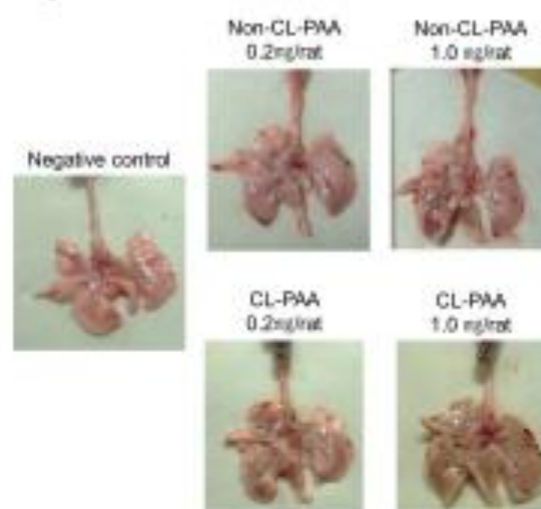


Figure 2. Macro findings 3 days after the instillation. The lungs in the exposed groups showed swelling at 3 days after intratracheal instillation. In the 1.0 mg CL-PAA-exposed group, the surface of the lungs was rigid, and it was difficult to expand the lungs when BALF was obtained.

2.2. Cell Analysis and Cell Injury Markers in Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF)

Figure 3 shows the results of inflammatory cell counts, lactate dehydrogenase (LDH) activity, and total protein in BALF. There were statistically significant increases in the number of total cells, neutrophils, and percentage of neutrophils in all of the exposure groups from 3 days to 1 month after exposure compared with each control group (Figure 3A–C). The results of LDH activity and total protein in all of the exposure groups also showed statistical tendencies to increase from 3 days to 1 month after exposure compared with the control group (Figure 3D,E). There was a greater increase in inflammatory cells in the BALF in the Non-CL-PAA-exposed groups than in the CL-PAA, while the release of LDH activity in the BALF was higher in the CL-PAA-exposed groups.

2.3. Concentration of Cytokine-Induced Neutrophil Chemottractant (CINC) in BALF and Concentration of Heme Oxygenase (HO)-1 in Lung Tissue

Figure 4 shows the concentrations of CINC-1 and CINC-2 in the BALF and HO-1 in lung tissue following the intratracheal instillation of Non-CL-PAA and CL-PAA. The CINC-1 and CINC-2 in the BALF showed an upward trend in all of the exposure groups from 3 days to 1 week. The HO-1 in the lung tissue showed an increase in a dose-dependent manner from 3 days to 1 month, and there was a tendency to increase in the 1.0 mg exposure group of both PAAs until 6 months after exposure. These results indicate that Non-CL-PAA and CL-PAA induced transient increases of chemokines and lung injury from an acute phase after exposure, except for an oxidative stress marker.

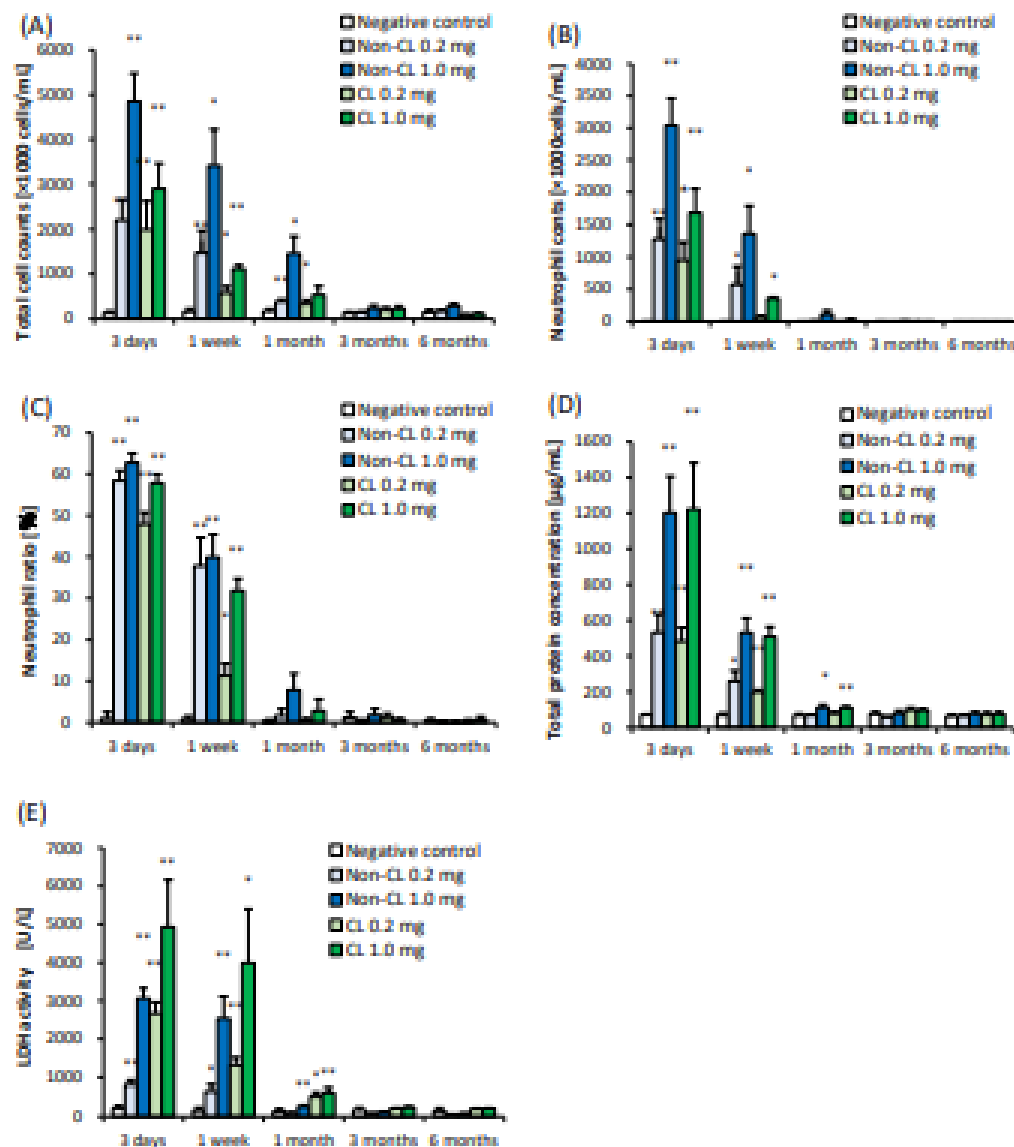


Figure 3. Analysis of cell number, released LDH activity, and total protein in BALF following intratracheal instillation of Non-CL-PAA and CL-PAA. (A) Total cell number in BALF. (B) Neutrophil count in BALF. (C) Percentage of neutrophils in BALF. (D) Concentration of total protein in BALF. (E) Released LDH activity in BALF. Inflammatory cell counts, released LDH activity, and concentration of total protein in BALF in all of the exposed groups were higher than those in the control groups in a dose-dependent manner at 3 days to 1 month after exposure. Inflammatory cells in BALF were more increased in the Non-CL-PAA than in the CL-PAA exposure groups, while released LDH activity in

BALF was higher in the CL-PAA. Data are presented as mean $\pm$ SD (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). An average of negative controls in the Non-CL-PAA and CL-PAA experiments at each time point showed a single bar of negative control.

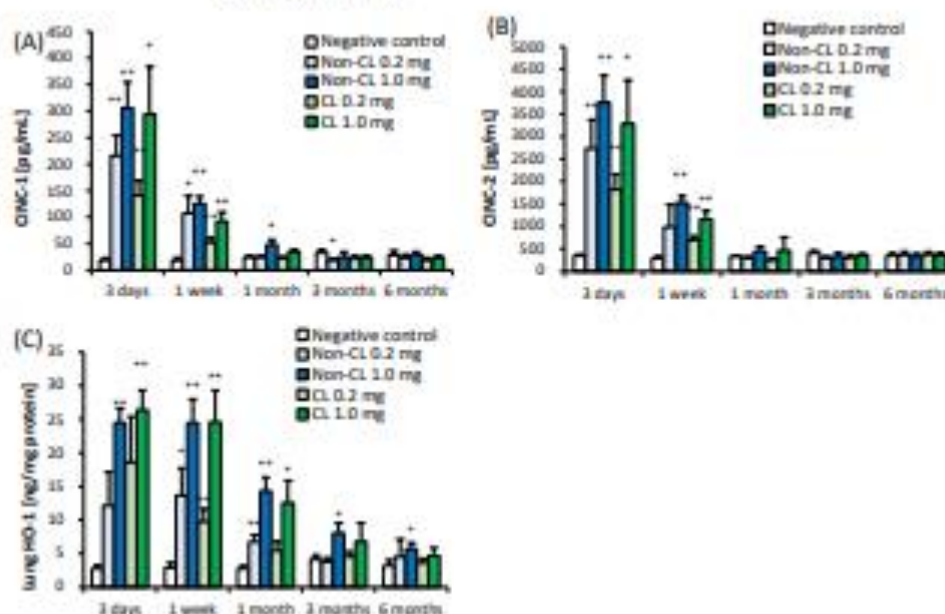


Figure 4. Analysis of cytokines in BALF and HO-1 in lung tissue after intratracheal instillation. (A) CINC-1 concentration in BALF. (B) CINC-2 concentration in BALF. (C) HO-1 concentration in lung tissue. CINC-1 and CINC-2 in BALF showed a tendency to increase in all exposure groups from 3 days to 1 week. HO-1 in lung tissue showed an increase in a dose-dependent manner from 3 days to 1 month, and a tendency to increase in the 1.0 mg exposure group of both PAAs until 6 months after exposure. Data are presented as mean $\pm$ SD. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicate that the values are significantly higher than the control group.) An average of negative controls in the Non-CL-PAA and CL-PAA experiments at each time point showed a single bar of negative control.

2.4. Histopathological Features in the Lung

Representative histopathological findings in the lung at 3 days, 1 month, and 6 months after the instillation of Non-CL-PAA and CL-PAA are shown in Figure 5A. Inflammatory cell infiltrations into the alveoli, mainly neutrophils, were remarkable in the lung in a dose-dependent manner at 3 days after exposure to both Non-CL-PAA and the CL-PAA. Fibroinflammatory changes were observed from 3 days to 1 week after exposure, indicating a high degree of lung injury. In the 1.0 mg exposure group of CL-PAA especially, there were stronger clusters of inflammatory cells than in Non-CL-PAA. Evaluation by the inflammation score showed a dose-dependent increase in the score in the exposure to both Non-CL-PAA and CL-PAA, and there were tendencies of higher scores in the 1.0 mg exposure group of CL-PAA than in that of Non-CL-PAA (Figure 5B). Similar to the spread of inflammatory cell infiltration, fibrosis was also observed in the 1.0 mg exposure group of both Non-CL-PAA and CL-PAA, whereas fibrosis was more widespread in the 1.0 mg exposure group of CL-PAA (Figure 6A). Evaluation by the Ashcroft score showed a dose-dependent increase in the score of the exposure to both Non-CL-PAA and CL-PAA. There were higher scores in the 1.0 mg exposure group of CL-PAA than of Non-CL-PAA (Figure 6B).

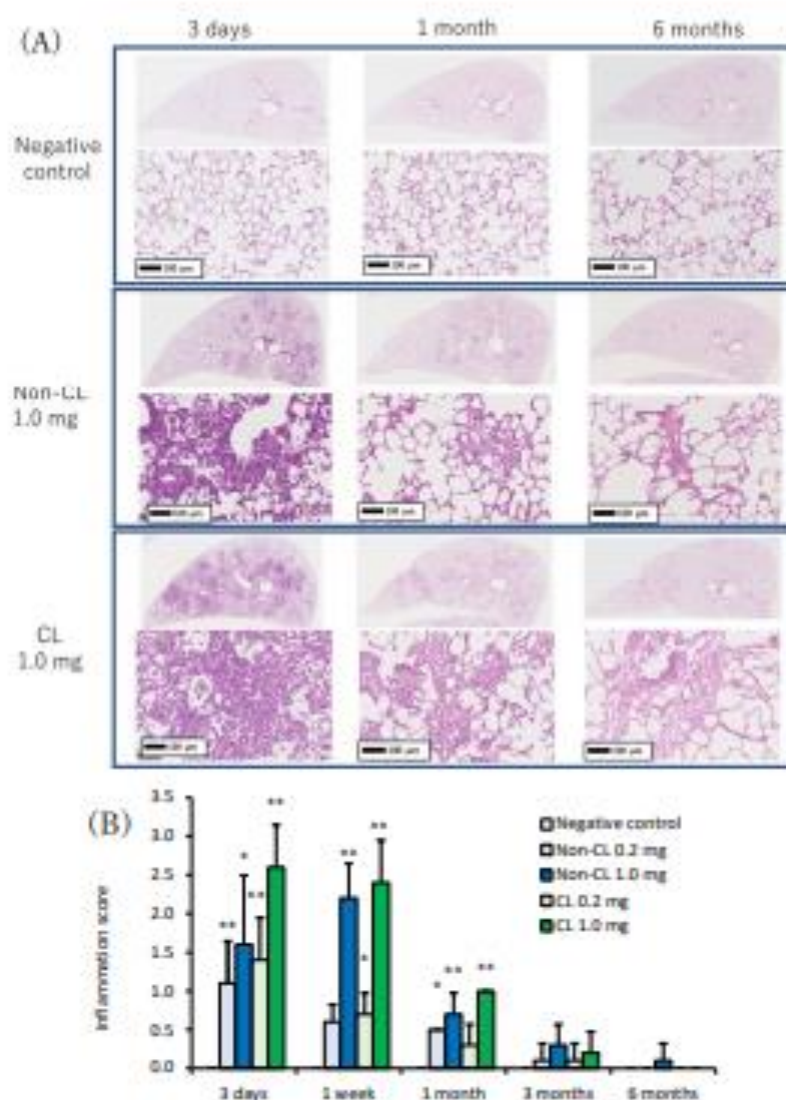


Figure 5. Histopathological findings of HE staining in lung exposed to Non-CL-PAA and CL-PAA. **(A)** Representative histopathological findings in the lung at 3 days, 1 month, and 6 months after the instillation of Non-CL-PAA and CL-PAA. **(B)** Inflammation score in histopathological findings of lung. Inflammatory cell infiltrations into the alveoli, mainly neutrophils, were remarkable in the lung in a dose-dependent manner at 3 days after exposure to both Non-CL-PAA and CL-PAA. Fibroinflammatory changes were observed from 3 days to 1 week after exposure. An average of negative controls in Non-CL-PAA and CL-PAA experiments at each time point showed a single bar of negative control. Data are presented as mean $\pm$ SD. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicate that the values are significantly higher than the control group.) An average of negative controls in the Non-CL-PAA and CL-PAA experiments at each time point showed a single bar of negative control.

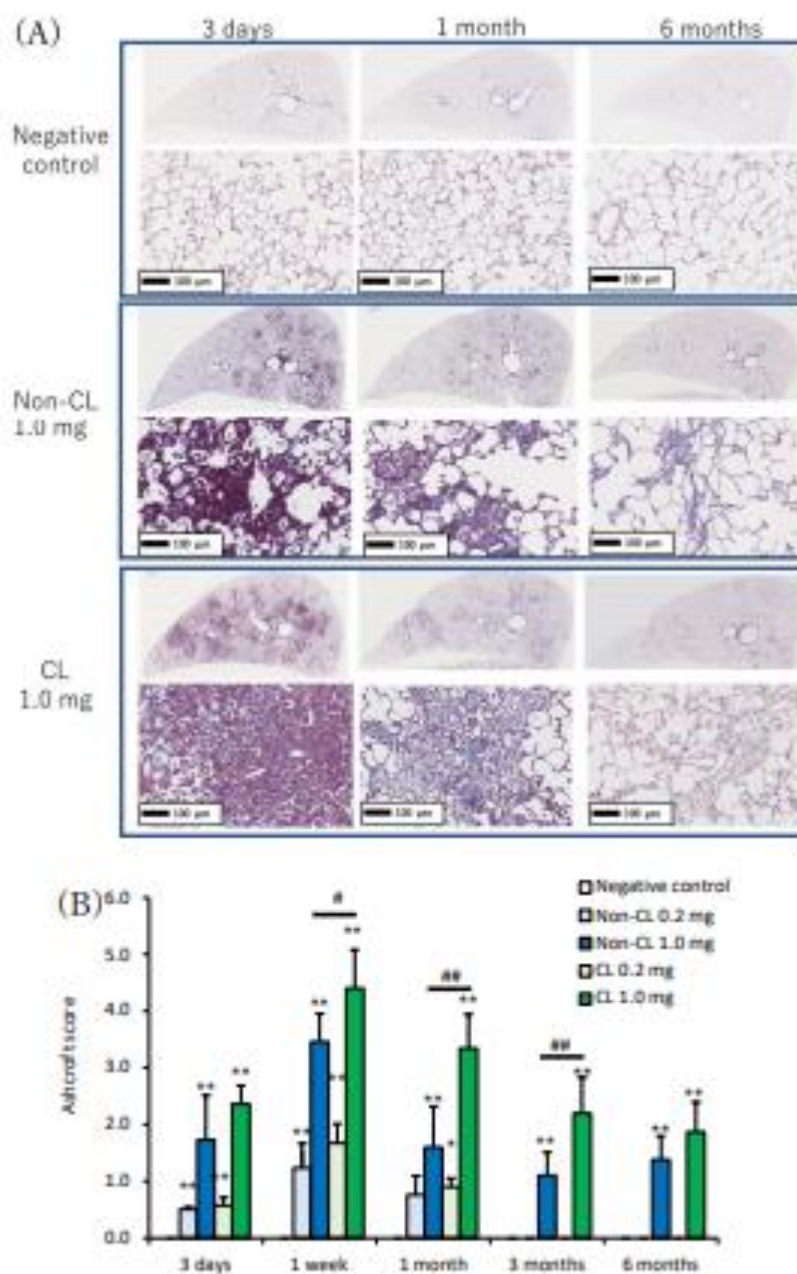


Figure 6. Histopathological findings of MT staining in lung exposed to Non-CL-PAA and CL-PAA. (A) Representative histopathological findings in the lung at 3 days, 1 month, and 6 months after the

instillation of Non-CL-PAA and CL-PAA. (B) Ashcroft score, which indicates fibrosis score, in histopathological findings of lung. Fibrosis was also observed in the 1.0 mg exposure groups of both Non-CL-PAA and CL-PAA, whereas fibrosis was more widespread in the 1.0 mg exposure group of CL-PAA. Evaluation by the Ashcroft score showed a dose-dependent increase in the scores in the exposure groups of both Non-CL-PAA and CL-PAA. There were higher scores in the 1.0 mg exposure group of CL-PAA than in that of Non-CL-PAA. An average of negative controls in Non-CL-PAA and CL-PAA experiments at each time point showed a single bar of negative control. Data are presented as mean $\pm$ SD. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicate that the values are significantly higher than the control group; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ indicate that the values are significantly higher than in the Non-CL-PAA 1.0 mg exposure group). An average of negative controls in the Non-CL-PAA and CL-PAA experiments at each time point showed a single bar of negative control.

2.5. The Relationship between Lung Fibrosis and Lung Injury

Figure 7 shows the relationship between the lung fibrosis and lung injury. Neutrophil counts in the BALF showed a biphasic upward trend between non-crosslinked and crosslinked PAA (Figure 7A), while LDH, an indicator of cytotoxicity, showed a nearly linear increase in response to fibrosis (Figure 7B).

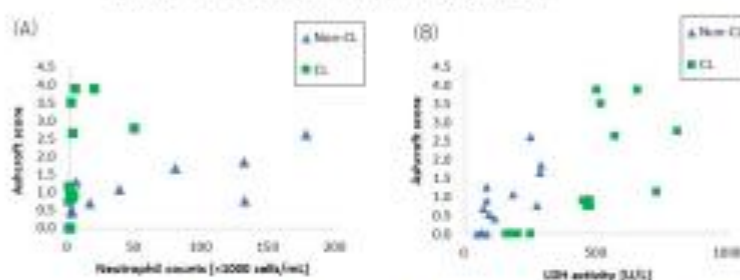


Figure 7. The relationship between lung fibrosis and lung injury. (A) The relationship between lung fibrosis and neutrophil counts. (B) The relationship between lung fibrosis and released LDH activity. Neutrophil counts in BALF showed a biphasic upward trend between Non-CL-PAA and CL-PAA, while LDH, an indicator of cytotoxicity, showed a nearly linear increase in response to fibrosis.

2.6. Gene Expression Analysis

Tables 1 and 2 show the number of genes, among the 20,174 genes examined by cDNA microarray, sorted by the fold change of mRNA expression levels in the lung tissue at 1 month in the 1.0 mg exposure group of CL-PAA compared with that of Non-CL-PAA. A total 266 genes were more than 1.5-fold upregulated; the top 20 of them are shown in Table 1. The gene-related fibroblast cells in the top 10 of those genes are shown in Table 2. The result of KEGG pathway revealed that differentially expressed upregulated genes were significantly enriched in 7 pathways (Table 3), including the “Apoptosis” and “PI3K-Akt signaling” pathway.

Table 1. Upregulating of the top 20 genes in lung exposed to CL-PAA.

Gene Symbol	Gene Description	Fold Change (ACTB)	Fold Change (GAPDH)
MTD	metallothionein 3	5.6	8.0
AAH07054026.1	-	3.1	4.4
Otr1523	olfactory receptor 1523	3.0	4.3
Hbq1b	hemoglobin, beta 1B	2.8	4.1
MTA	metallothionein 2A	2.6	4.1
Rab24	RAB24, member RAS oncogene family	2.8	4.0
Tuba3b	tubulin, alpha 3B	2.8	4.0
Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	2.6	3.8
Igh-4	immunoglobulin heavy chain 4	2.6	3.7

Table 1. Cont.

Gene Symbol	Gene Description	Fold Change (ACTB)	Fold Change (GAPDH)
BCD1565627	similar to Ig variable region, light chain	2.6	3.7
Tfbl1	tubulin tyrosine ligase like1	2.5	3.6
Atp13a2	ATPase 13A2	2.4	3.4
Sec14l1	SEC14-like lipid binding 1	2.3	3.3
Igsb	immunoglobulin superfamily, member 8	2.2	3.1
Egfr7	EGF-like domain, multiple 7	2.2	3.1
Fas	Finkel-Biskin-Jilly murine sarcoma virus (FBJ-MuSV) ubiquitously expressed	2.1	3.0
Eln	elastin	2.1	3.0
Ep300	ELA binding protein p300	2.0	2.9
Auf1	ADP-ribosylation factor like GTPase 2	2.0	2.9
Onap2	onapretin 2	1.5	2.1

Table 2. The top 10 genes related to fibroblast cell in lung exposed to CL-PAA.

Gene Symbol	Gene Description	Fold Change (ACTB)	Fold Change (GAPDH)
Eln	elastin	2.1	3.0
Akt1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	1.8	2.6
Ccm2l	CCM2-like scaffolding protein	1.7	2.4
Mil	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	1.6	2.3
Prp10	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10	1.6	2.3
Pdgfrb	platelet derived growth factor receptor beta	1.5	2.1
Col1a1	collagen, type I, alpha 1	1.4	2.1
Fgfr4	fibroblast growth factor receptor 4	1.4	2.0
Ctgf	connective tissue growth factor	1.4	2.0
Hyal2	hyaluronoglucosaminidase 2	1.4	2.0

Table 3. The result of KEGG pathway using more than 1.5-fold upregulated genes in lung exposed to CL-PAA.

Terms of KEGG Pathway	Gene Counts	%	p-Value
Salmonella infection	10	5.08	0.0012
Alzheimer disease	12	6.09	0.0021
Tuberculosis	8	4.06	0.0022
Apoptosis	7	3.55	0.0027
Fluid shear stress and atherosclerosis	7	3.55	0.0045
PI3K-Akt signaling pathway	10	5.08	0.0088
Sphingolipid signaling pathway	6	3.05	0.0089

3. Discussion

In the present study, Non-CL-PAA and CL-PAA were intratracheally instilled into rats, and CL-PAA significantly caused lung fibrosis compared with Non-CL-PAA. We discussed (1) inflammogenicity and fibrogenicity induced by both types of PAA, (2) pathophysiology accompanied with the crosslinked type, and (3) factors related to the crosslinking structure of PAA in the progress of fibrosis.

- (1) Inflammogenicity and fibrogenicity induced by both types of PAA. In the present study, both Non-CL-PAA and CL-PAA induced severe lung inflammation in the acute phase but it was transient. In addition, fibrosis occurred to a certain degree in both of the PAAs. In the past, persistent lung inflammation was considered to lead to irreversible fibrosis in lung exposed to inhaled chemicals. In the case of silica and asbestos, which have high pulmonary toxicity, there was persistent inflammation that progressed to fibrosis in rat lung up to 6–12 months after exposure [10,13–15]. On the other hand,

inhaled chemicals such as titanium dioxide (TiO₂) and zinc oxide (ZnO), which have low pulmonary toxicity, show acute-phase lung inflammation and lung injury, but inflammation is recovered from within 1 week to 1 month after exposure and does not progress to fibrosis [16–18]. In the present study, lung inflammation was caused for about 1 week, and CINC, a neutrophil chemokine, increased significantly in both PAAs to 1 week in a dose-dependent manner. Total protein and LDH in the BALF (tissue injury indicators) and HO-1 in the lung tissue (oxidative stress indicator) were also significantly increased in the exposed groups until 1 month after exposure.

Considering that persistent inflammation is associated with the potential for lung disorder, it is speculated that the lung disorder potential of both PAAs is not high, based on transient inflammation and inflammation-associated cytokine production by both PAAs. However, although the inflammation by PAAs ended at the acute phase, it was accompanied by fibrosis, and we considered that the acute inflammation rapidly transitioned to the next stage, fibrosis—that is, it progressed to an irreversible lesion.

Fibrosis after acute inflammation has been observed in animal exposure studies and clinical cases; it is often observed in LPS exposure models that induce acute inflammation and in ARDS that presents with acute respiratory failure. The clinical presentation of ARDS is known to cause lung injury of the alveolar epithelium due to inflammation followed by fibrosis from repair processes [19]. Animal models of acute respiratory failure caused by LPS or bleomycin also show severe lung inflammation that ends in 1–2 weeks, followed by fibrosis [20,21]. Although the persistent inflammation by both PAAs was not observed for long periods, the inflammations did cause fibrosis. Similarly, in other reports of PAA, the inflammation is followed promptly by fibrosis [7,10]. Although asbestosis usually causes fibrosis after 10 years of exposure in clinical cases, PAA causes rapid fibrosis in 1 to 2 years in the clinical cases of workers working with it. The present study is clinically consistent with PAA having fibrotic potential.

In the present study, both exposures to PAA caused irreversible fibrosis from 1 month after intratracheal instillation. Proliferation of fibroblasts or deposition of collagen in the lung interstitium has been observed from about 1 month after pharyngeal aspiration exposure of asbestos or MWCNTs in mice [14]. An intratracheal instillation in mice using the organic substance polyhexamethylene guanidine phosphate (PHMG-p) also showed collagen deposition as well as lung inflammation from 2 weeks after intratracheal instillation [22]. Considering these reports, the fibrosis observed in the present study after exposure to Non-CL-PAA and CL-PAA suggests that both polymers have fibrogenic potential.

- (2) Pathophysiology accompanied with the crosslinked type. The level of crosslinking of CL-PAA in the present study was below 0.1%, which is commonly used in industrial applications for its thickening and water absorbency properties, and the fibrogenicity of CL-PAA in the lung with the level of crosslinking in industrial applications has been evaluated. In the present study, the CL-PAA caused more fibrosis of the lungs than did the Non-CL-PAA. To investigate the difference in fibrosis progression between the CL-PAA and Non-CL-PAA, we performed a microarray analysis using lung tissue one month after exposure, which is considered to be the fibrosis transition period. Compared with Non-CL-PAA, the expression of elastin, which constitutes elastic fibers, and the collagen 1a1 gene, which is involved in the fibrosis, was higher in CL-PAA. Increased elastin gene and collagen 1a1 gene expression in fibrotic lesions have been reported in a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model [23,24], suggesting that increased elastin as well as collagen was involved in the fibrosis of the lung histopathology findings of CL-PAA.

In the CL-PAA with strongly induced fibrosis, the LDH in the BALF was found to be higher than in Non-CL-PAA, suggesting that CL-PAA causes greater cellular injury to the constituent cells of the lung. Several reports have recognized that stronger lung injury leads to the development of fibrosis: in inhalation exposure and intratracheal instillation of MWCNTs in mice, it was reported that the increase in the LDH in BALF

and the deposition and fibrosis levels of MWCNTs showed similar tendencies to increase [14,25]. In the present study, the relationship between LDH and fibrosis in the BALF with both PAAs showed an almost linear correlation between LDH and fibrosis (Figure 7A). On the other hand, a correlation was observed between the number of neutrophils in the BALF and fibrosis, but not as linear as the correlation between LDH and fibrosis (Figure 7B). It is likely that lung injury has a more direct effect on the fibrosis development of PAA than does inflammatory cell infiltration.

As for gene expression involved in lung injury including cell death, KEGG pathway analysis in genes that are more upregulated in CL-PAA showed genes related to apoptosis, including apoptosis and the Phosphoinositide 3-kinase-AKT (PI3K-AKT) signaling pathway, and it is reported that these pathways are involved in fibrosis. In models of idiopathic pulmonary fibrosis and bleomycin-induced pulmonary fibrosis, it has been reported that the expression of genes related to the PI3K-AKT pathway is elevated and involved in the development of fibrosis in the lung [26,27]. Although apoptosis is necessary for normal repair to eliminate inflammatory cells and proliferating fibroblasts that collect in the alveolar walls and alveolar space during lung injury [28], it has been reported that excessive apoptosis is involved in the pathogenesis of ARDS, which is a transition to fibrosis [26]. Considering the increased expression of collagen genes and the enhancement of the apoptotic pathways, including the PI3K-AKT pathway in lung tissue due to lung injury, the progression of fibrosis in CL-PAA may be related to lung injury.

- (3) Factors related to the crosslinking structure of PAA in the progress of fibrosis. The molecular weights of Non-CL-PAA and CL-PAA in this study were 7.53×10^5 g/mol and 7.65×10^5 g/mol, respectively, and the radius of gyration (Rg) indicated that the radii of polymer particles in solution were 74.9 nm and 68.7 nm, respectively. Since both PAAs have similar molecular weights, we considered that the crosslinking structure was responsible for the enhancement of fibrosis by the PAA. In general, the thickening properties of PAA change with increasing molecular weight [8]. It has been reported that there is an optimal viscosity for sputum clearance [29,30]. The thickening that comes with increasing molecular weight may affect the delay in clearance of the PAA from the lungs. In the present study, the rat lungs at dissection 3 days to 1 month after intratracheal instillation of PAA, especially in the 1.0 mg exposure group, were not expanded, and BALF was not recovered sufficiently even when saline was infused into the lung (Figure 1B). Such poor recovery of BALF may reflect the result of a collapsed lung, and a collapsed lung may affect the delay in clearance of PAA. On the other hand, the presence of a crosslinked structure makes a high water-absorbency property and low viscosity when the molecular weight of both PAAs are the same level [31,32]. In other words, CL-PAA incorporates water molecules into the polymer's strong braided structure by crosslinking in the lung, while Non-CL-PAA has a weak retention of water molecules due to its lack of a strong network structure. It is possible that the water-absorbing property of the CL-PAA changes the osmotic pressure in the lungs by absorbing water molecules *in vivo*, causing cytotoxicity. *In vitro* studies using polymeric nanoparticles have shown that cytotoxicity increases with elevation in the osmotic pressure of the culture medium. When the biodegradable polymer Poly(lactide-co-glycolide) was exposed to macrophages (RAW cells) and alveolar epithelial cells (A549 cells), it caused cell death as the osmotic pressure of the medium increased, and a correlation was observed between the increase in osmotic pressure and cell death [33]. Since PAAs also cause osmotic pressure changes due to water absorption, this difference in water absorption by PAAs may have influenced the difference in fibrosis via cell injury (Figure 8).

In the present study, the maximum intratracheal instillation dose was set at 1.0 mg. These doses were set to not reach overdose, assuming human exposure. Regarding toner particles as poorly soluble particles, it has been reported that lung damage due to overdose in addition to toxicity of the substance itself occurs when the amount of deposition in

the lungs exceeds 1 to 3 mg [34,35]. We previously examined the biopersistence of TiO₂ nanoparticles with low toxicity among nanomaterials in rat lung in an intratracheal instillation study, and the clearance of TiO₂ nanoparticles in the rat lung accompanied by neutrophil inflammation began to delay at doses exceeding 1 mg/rat [36]. We considered that pulmonary inflammation by a high dose of more than 1.0 mg/rat may be induced by the excessive dose of material, not the toxicity of the material itself.

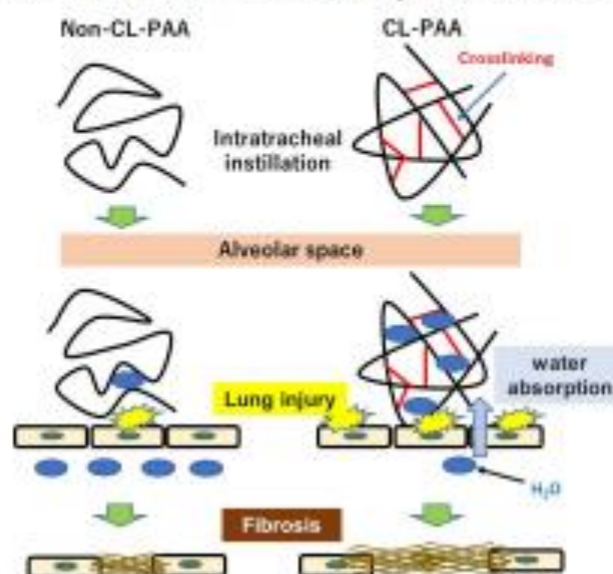


Figure 8. Schematic overview of the study. CL-PAA cause osmotic pressure changes due to water absorption, and this difference in water absorption by PAAs may have influenced the difference in fibrosis via cell injury.

Intratracheal instillation studies can be helpful for approximating the hazardous effects of inhalable chemicals; however, a limitation of this study is that its exposure route was not physiological and bolus effects were caused. Despite the instillation of PAA of a respirable size, it is not the same as in inhalation studies in terms of the distribution, clearance, and retention of materials.

4. Materials and Methods

4.1. Sample Polymer

A sample of CL-PAA was purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. CL-PAA is a white, easily scattered powder, with a specific gravity of 1.2. The degree of crosslinking of a polymer is generally expressed as the weight % of the crosslinker in the raw material. The degree of crosslinking of our CL-PAA sample was 0.1% or less. A sample of Non-CL-PAA was synthesized by the polymerization of an acrylic acid monomer without a crosslinking agent. Briefly, Reversible Addition/Fragmentation Chain Transfer Polymerization were conducted using 4-Cyano-4-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl) sulfanyl]pentanoic acid (CDP, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), α, α' -Azobisisobutyronitrile (AIBN, KANTO CHEMICAL CO., INC., Tokyo, Japan), and *t*-butyl acrylate. Next, Deprotection of the *t*-butyl group of the resulting poly *t*-Butyl acrylate was performed to obtain Non-CL-PAA without using a crosslinking agent (Figure A1). Non-CL-PAA and the CL-PAA were mixed with distilled water and slowly stirred for 40 min (Mag-Mixer MF820 or MD900, Yamato Scientific co., Ltd., Tokyo, Japan). The weight average molecular weight

(MW), number average molecular weight (M_n), and poly dispersity index (PDI) of the polymer and the radius of gyration (R_g) were measured by gel permeation chromatography (GPC) (a Prominence 501 system (SHOKO SCIENCE, Kanagawa, Japan) coupled with a multi-angle static light scattering (MALS) detector (Dawn-Eleos-II, Wyatt Technology Europe GmbH, Dernbach, Rheinland-Pfalz, Germany) using GF-7MHQ (Showa Denko K.K., Tokyo, Japan) with 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer as the eluent [37,38]. The viscosity of the PAA suspensions was measured as 25 °C using a viscometer (VISCO lab 4000, Cambridge Viscosity, Inc., Boston, MA, USA) with a temperature controller (F12-MB, JULABO GmbH, Seelbach, Germany).

The fundamental characteristics of Non-CL-PAA and CL-PAA are summarized in Table 4. The Non-CL-PAA and CL-PAA used in our study had weight average molecular weights (MW) of 7.53×10^5 g/mol and 7.65×10^5 g/mol, respectively. In the molecular dispersion, the polymers were dissolved in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer; then, the solutions were alkalized with 2N NaOH and neutralized with 1N HCl. Figure 9 shows the scanning electron microscopy (SEM) images obtained using a HITACHI S-4500 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) of the dispersed Non-CL-PAA and CL-PAA in the molecular dispersion (Figure 9A,B) and the distilled water (Figure 9C,D), respectively.

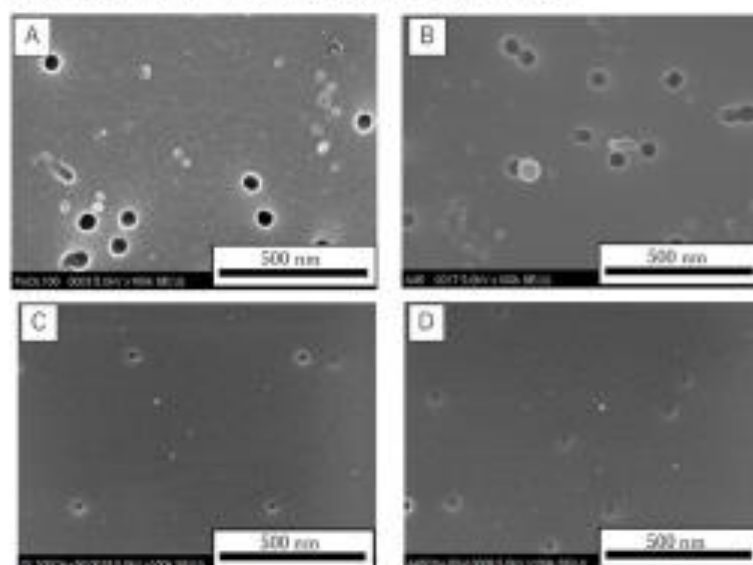


Figure 9. SEM images of the polymers used in the present study. Suspension of Non-CL-PAA and CL-PAA in the molecular dispersion (A,B), and the distilled water (C,D), respectively (internal scale bar = 500 nm).

Table 4. Physicochemical characterization of the polymer used in the present study.

Physicochemical Characterization	Non-Crosslinked Polyacrylic Acid	Crosslinked Polyacrylic Acid
Structural formula	$\left[\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array} \right]_n$	

Table 4. Cont.

Physicochemical Characterization	Non-Crosslinked Polyacrylic Acid	Crosslinked Polyacrylic Acid
Weight average molecular weight (MW)	7.53×10^5 g/mol	7.65×10^5 g/mol
Number average molecular weight (Mn)	6.10×10^5 g/mol	4.14×10^5 g/mol
Poly dispersity index (PDI)	1.24	1.85
Degree of crosslinking	None	~0.1%
Viscosity (mPa·s) at 25 °C	3.039 mPa·s	2.383 mPa·s
radius of gyration (Rg)	74.9 nm	68.7 nm

4.2. Animals

Male Fischer 344 rats (8 weeks old) (Charles River Laboratories International, Inc., Kanagawa, Japan) were acclimated for 4 weeks in the Laboratory Animal Research Center of the University of Occupational and Environmental Health, Japan with free access to a commercial diet and water. All procedures and animal handling were performed according to the guidelines described in the Japanese Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as approved by the Animal Care and Use Committee, University of Occupational and Environmental Health, Japan (animal studies ethics clearance proposal number: AE17-009).

4.3. Intratracheal Instillation

Doses of 0.2 mg (0.8 mg/kg BW) and 1.0 mg (4.0 mg/kg BW) of Non-CL-PAA and CL-PAA suspended in 0.4 mL distilled water were administered to the lungs of rats (12 weeks old) in single intratracheal instillations. Rats were intratracheally instilled under anesthesia by sevoflurane (Pfizer Japan, Tokyo, Japan) inhalation. Briefly, a laryngeal extension was performed using a laryngoscope blade (MAC1, Rudolf Roesler GmbH, Jungingen, Germany), an animal feeding needle (KN-348, Natsume Seisakusho Co., Ltd., Tokyo, Japan) was inserted directly into the trachea, and the suspension was manually injected. Then, 3 mL of air twice with a syringe from the animal feeding needle was inserted into the trachea. The rats were then allowed to awaken spontaneously and were observed periodically. Single intratracheal instillations of 0.2 mg and 1.0 mg of Non-CL-PAA and CL-PAA were performed at different times, and the single intratracheal instillations were conducted a total of two times. The control group received distilled water, and a control group was established for each intratracheal instillation. Dosages of 0.2 and 1.0 mg/rat were used in the intratracheal instillation of the PAAs. This maximum dose was set assuming human exposure and to avoid overload in the lung [10].

4.4. Animals Following Intratracheal Instillation

There were 5 rats in each exposure and control group at each time point. Animals were dissected at 3 days, 1 week, 1 month, 3 months, and 6 months after intratracheal instillation under anesthesia by isoflurane (Pfizer Japan, Tokyo, Japan) inhalation. Body and lung weights were measured; then, at autopsy, blood was removed from the abdominal aorta and the lungs were perfused with normal saline. The right lungs were repeatedly inflated with normal saline under a pressure of 20 cm H₂O, following fluid recovery two times, while the left main bronchus was clamped. Between 7 and 14 mL of the recovered fluid (BALF) was collected in collection tubes by free fall, and then the right and left lungs were divided. The homogenized third lobes of the right lungs were used for HO-1 and cDNA microarray after recovery of BALF. The left lungs were inflated and fixed by 10% formaldehyde under a pressure of 25 cm H₂O for use in histopathological evaluation.

4.5. Cytospin Analysis of Inflammatory Cells and Measurement of Inflammation Related Markers in BALF

BALF was centrifuged at $400\times g$ at 4°C for 15 min, and the supernatant was transferred to a new tube for measurement of total protein, lactate dehydrogenase (LDH), and cytokines. The pellets were washed by suspension with polymorphonuclear leukocyte (PMN) Buffer (137.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.2 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , and 5.6 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) and centrifuged at $400\times g$ at 4°C for 15 min. After removal of the supernatant, the pellets were resuspended with 1 mL of PMN (polymorphonuclear leukocyte) Buffer. The number of cells in the BALF was counted by ADAM-MC (AR BROWN CO., LTD, Tokyo, Japan); the cells were splashed on a slide glass using cytospin, and fixed and stained with Diff-Quik (Sysmex CO., Kobe, Hyogo, Japan), after which the number of neutrophils and alveolar macrophages were counted by microscopic observation. The released LDH and ALP activity in the BALF supernatant was measured by a Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nordrhein-Westfalen, Germany) according to the manufacturer's instructions. LDH activity was estimated using a standard curve obtained from known concentrations of recombinant LDH from rabbit muscle (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan). The concentration of protein in the supernatant of the BALF was determined by a Pierce™ 660 nm Protein Assay (Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, USA).

4.6. Measurement of Chemokines in BALF and HO-1 in Lung Tissue

Concentrations of CINC-1 and CINC-2 in the BALF were measured by ELISA kits #RCN100 and #RCN200 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), respectively. All measurements were performed according to the manufacturer's instructions. The third lobes of the right lungs were homogenized with a T-PER tissue protein extraction reagent (Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, USA) including protein inhibitor cocktails (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and cOmplete Mini (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nordrhein-Westfalen, Germany), and then centrifuged ($20,400\times g$ at 4°C for 10 min). The protein concentration in the supernatant was measured by a Pierce 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, USA), using bovine serum albumin as a standard. The results of the HO-1 measurements with ELISA kit, ADI-EKS-810A (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) were corrected by the protein concentration in the supernatant to calculate the final HO-1 concentration in the lung tissue.

4.7. Total RNA Extraction

The third lobes of the right lungs ($n = 5$ per group per time point) were homogenized while using a QIAzol lysis reagent with a Tissuelyser (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA from the homogenates was extracted using a miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. RNA was quantified using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), and the quality of the samples was analyzed by a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

4.8. Microarray Analysis

We used a three-dimensional (3D)-Gene Rat Oligo Chips 20K (version 1.1) (Toray Industries, Tokyo, Japan), which could mount 20,174 genes, for the DNA microarray analysis. The total RNA extracted from the lungs of the five rats in the high dose Non-CL-PAA group was mixed in equal amounts to make one sample, which was then amplified by the use of an Amino Alkyl MessageAmp II aRNA Amplification Kit (Ambion, Inc., Austin, CA, USA). The CL-PAA of the high-dose group was treated in the same manner.

The antisense RNA (aRNA) were labeled with Cy5, using Amersham Cy5 Mono-Reactive Dye (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), and the labeled aRNA were hybridized at 37°C for 16 h. The hybridization was performed according to the supplier's protocols. The chips were washed and dried, then scanned in an ozone-free environment

using a 3D-Gene Scanner 3000 (Toray Industries, Tokyo, Japan) and analyzed by use of 3D-Gene Extraction Software (Toray Industries, Tokyo, Japan). Each raw signal intensity was divided by the signal intensities of the beta-actin (ACTB) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which are known internal standards in the samples, to compare the gene expression levels of Non-CL-PAA and CL-PAA, respectively. We analyzed the relationship genes that were found to be elevated in CL-PAA using the above microarray data for Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis via the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) version 2021 (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>) (accessed on 29 July 2022).

4.9. Histopathology

Formaldehyde-fixed lung tissue was embedded in paraffin, sectioned at a thickness of 4 μ m, and then stained with hematoxylin and eosin (HE) and Masson trichrome (MT) staining. The lung inflammation and fibrosis were examined using the inflammatory cell infiltration score [39] and the Ashcroft score [40,41], respectively, as in previous reports [10,34]. Briefly, the inflammatory cell infiltration score was obtained by scoring the degree of inflammatory cell infiltration in lung tissue as follows: none (0), minimal (0.5), mild (1), moderate (2), or severe (3). Lung fibrosis was assessed by scoring the lung histopathological findings on a scale of 0 to 8, using the Modified Scale of Ashcroft score, and the mean and standard deviation were calculated in each group.

4.10. Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using IBM® SPSS® software (IBM Corporation, Chicago, IL, USA). *p*-values < 0.05 were considered statistically significant. Dunnett's tests and Tukey's honestly significant difference test were used appropriately to detect individual differences between those exposed to the crosslinked polyacrylate samples and the controls.

5. Conclusions

We conducted intratracheal instillations using Non-CL-PAA and CL-PAA in rats and evaluated the pulmonary pathology. Both PAAs induced lung inflammation and fibrosis, and CL-PAA with a degree of crosslinking within 0.1% was found to have stronger fibrotic potential and lung injury than Non-CL-PAA, suggesting that the crosslinking structure in PAA, which is used in crosslinking levels in industrial applications, may contribute to the progression of the fibrogenicity of PAA.

Author Contributions: Authors T.T., C.N., H.I., K.Y. (Kazuhito Yatera) and Y.M. are responsible for the study design and writing of the manuscript. Authors T.T., C.N., H.I., K.-Y.W., H.H., J.-I.T., R.O., K.S. (Kazuki Sumiya), S.F., Y.H. (Yuki Hata), K.S. (Kazuo Sakurai), Y.H. (Yasuyuki Higashi), K.Y. (Kei Yamasaki), K.Y. (Kazuhito Yatera) and Y.M. are responsible for data and analysis. Authors T.T., C.N., H.I., K.-Y.W., H.H., T.M., N.K., R.O., K.S. (Kazuki Sumiya), S.F., Y.H. (Yuki Hata), K.S. (Kazuo Sakurai), Y.H. (Yasuyuki Higashi) and Y.M. performed the experiments. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The present study was supported by the Ministry of Health, Labour and Welfare (Industrial Disease Clinical Research Grants Grant Numbers 200101-01).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of University of Occupational and Environmental Health, Japan (protocol code AE17-009 and date of approval: 8 March 2018).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Tomoko Watanabe, Rika Takai, Mayumi Tashiro, Yuzo Ariyoshi, Kumiko Matsuyama, and Tomoko Morimoto for technical support with the experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

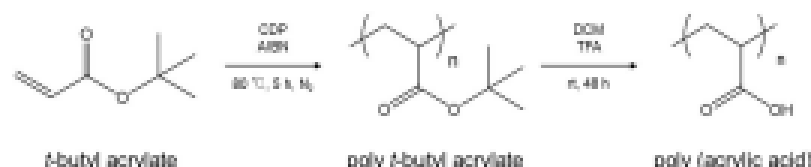


Figure A1. Overview for synthesis of Non-CL-PAA. Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization was conducted using 4-Cyano-4-[(dodecylsulfanyltiocarbonyl) sulfanyl]pentanoic acid (CDP; Sigma Aldrich), *α,α'*-Azobisisobutyronitrile (AIBN; KANTO CHEMICAL CO., INC.), and t-butyl acrylate. The dissolved solution was transferred to a Schlenk tube and bubbled with nitrogen for 30 min. The reaction was then carried out in an oil bath at 80 °C for 5 h, and purified by re-precipitation in a mixture of water and methanol (2:8) and filtration. The polymer was dissolved in THF and dried to obtain poly t-Butyl acrylate. The resulting poly t-Butyl acrylate was dissolved in dichloromethane (DCM), trifluoroacetic acid (TFA) was added, and the reaction was carried out at room temperature for 48 h to deprotect the t-butyl group to obtain PAA. Hexane was added to the reaction solution to precipitate the PAA, and the solvent was removed by filtration. The resulting polymer was then dissolved in methanol, dialyzed, purified, and lyophilized with 1,4-dioxane to obtain Non-CL-PAA.

References

- Kim, K.W.; Ahn, K.; Yang, H.J.; Lee, S.Y.; Park, J.D.; Kim, W.K.; Kim, J.-T.; Kim, H.H.; Kha, Y.H.; Park, Y.M.; et al. Humidifier Disinfectant-Associated Children's Interstitial Lung Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *188*, 131107125401005. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Park, D.; Koh, Y.; Park, D.-U.; Cheong, H.-K.; Do, K.-H.; Lim, C.-M.; Hong, S.-I.; Kim, Y.-H.; Lee, J.-H.; Chung, K.H.; et al. Nationwide Study of Humidifier Disinfectant Lung Injury in South Korea, 1994–2011. Incidence and Dose-Response Relationships. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2015**, *12*, 1813–1821. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- McCauley, L.; Markin, C.; Hosmer, D. An Unexpected Consequence of Electronic Cigarette Use. *Chest* **2012**, *141*, 1110–1113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Thota, D.; Latham, E. Case Report of Electronic Cigarettes Possibly Associated with Eosinophilic Pneumonitis in a Previously Healthy Active-duty Sailor. *J. Emerg. Med.* **2014**, *47*, 15–17. [\[CrossRef\]](#)
- Ministry of Health, Labour, and Welfare. Notification about Prevention of Lung Disease Caused by Organic Dust (Published on 28 April 2017). Available online: <https://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000163568.html> (accessed on 27 June 2022). (In Japanese)
- Ministry of Health, Labour, and Welfare. Working Group Report to Decide whether Pulmonary Disorder That Occurred at the Workplace of Production of Powder of Cross-Linked Polyacrylic Acid Is Work-Related Disease or Not (Published on 19 April 2019). Available online: <https://www.mhlw.go.jp/content/11402000/000502982.pdf> (accessed on 27 June 2022). (In Japanese)
- Morimoto, Y.; Nishida, C.; Tomonaga, T.; Inumi, H.; Yatera, K.; Sakurai, K.; Kim, Y. Lung disorders induced by respirable organic chemicals. *J. Occup. Health* **2021**, *63*, e12240. [\[CrossRef\]](#)
- Horiuchi, T. Physico-chemical properties of water-soluble polymers in aqueous solution. *J. Surf. Finish. Soc. Jpn.* **2009**, *60*, 746–753. [\[CrossRef\]](#)
- Piuma, M.Z. Final Report on the Safety Assessment of Acrylates Copolymer and 33 Related Cosmetic Ingredients. *Int. J. Toxicol.* **2002**, *21*, 1–50. [\[CrossRef\]](#)
- Nishida, C.; Tomonaga, T.; Inumi, H.; Wang, K.-Y.; Higashi, H.; Ishida, T.; Takeshita, J.; Ono, R.; Sumiya, K.; Fujii, S.; et al. Inflammogenic effect of polyacrylic acid in rat lung following intratracheal instillation. *Part. Fibre Toxicol.* **2022**, *19*, 8. [\[CrossRef\]](#)
- Takeda, T.; Yamano, S.; Goto, Y.; Hirai, S.; Furukawa, Y.; Kikuchi, Y.; Misumi, K.; Suzuki, M.; Takano, K.; Senoh, H.; et al. Dose-response relationship of pulmonary disorders by inhalation exposure to cross-linked water-soluble acrylic acid polymers in F344 rats. *Part. Fibre Toxicol.* **2022**, *19*, 27. [\[CrossRef\]](#)
- Nishida, C.; Inumi, H.; Tomonaga, T.; Wang, K.-Y.; Higashi, H.; Takeshita, J.-I.; Ono, R.; Sumiya, K.; Fujii, S.; Hata, Y.; et al. Effect of Different Molecular Weights of Polyacrylic Acid on Rat Lung Following Intratracheal Instillation. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10345. [\[CrossRef\]](#)
- Kajiwara, T.; Ogami, A.; Yamato, H.; Oyabu, T.; Morimoto, Y.; Tanaka, I. Effect of Particle Size of Intratracheally Instilled Crystalline Silica on Pulmonary Inflammation. *J. Occup. Health* **2007**, *49*, 88–94. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

14. Snyder-Talkington, B.N.; Dong, C.; Porter, D.W.; Ducatman, B.; Wolfarth, M.G.; Andrew, M.; Battelli, L.; Reese, R.; Castranova, V.; Gao, N.L.; et al. Multiwalled carbon nanotube-induced pulmonary inflammatory and fibrotic responses and genomic changes following aspiration exposure in mice: A 1-year postexposure study. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **2016**, *79*, 352–366. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Cyphert, J.M.; Padilla-Carlin, D.J.; Schlachet, M.C.; Shannahan, J.H.; Nyska, A.; Kodavanti, U.P.; Garrett, S.H. Long-Term Response of Rats to Single Intratracheal Exposure of Libby Amphibole or Amosite. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **2012**, *75*, 183–200. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Warheit, D.B.; Hoke, K.A.; Finlay, C.; Dornier, E.M.; Reed, K.L.; Soyars, C.M. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol. Lett.* **2007**, *171*, 99–110. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Morimoto, Y.; Izumi, H.; Yoshiura, Y.; Tomonaga, T.; Lee, B.-W.; Okada, T.; Oyabu, T.; Myojo, T.; Kawai, K.; Yatera, K.; et al. Comparison of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation and inhalation of nanoparticles. *Nanotoxicology* **2016**, *10*, 607–618. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Morimoto, Y.; Izumi, H.; Yoshiura, Y.; Tomonaga, T.; Oyabu, T.; Myojo, T.; Kawai, K.; Yatera, K.; Shimada, M.; Kubo, M.; et al. Evaluation of pulmonary toxicity of zinc oxide nanoparticles following inhalation and intratracheal instillation. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1241. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Marshall, R.; Bellinger, G.; Laurent, G. The acute respiratory distress syndrome: Fibrosis in the fast lane. *Thorax* **1998**, *53*, 815–817. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Kim, S.-N.; Lee, J.-S.; Yang, H.-S.; Cho, J.-W.; Kwon, S.-J.; Kim, Y.-B.; Her, J.-D.; Cho, K.-H.; Song, C.-W.; Lee, K.-H. Dose-response Effects of Bleomycin on Inflammation and Pulmonary Fibrosis in Mice. *Toxicol. Res.* **2010**, *26*, 217–222. [\[CrossRef\]](#)
21. de Souza Xavier Costa, N.; Ribeiro Júnior, G.; dos Santos Alemany, A.A.; Belotti, L.; Zati, D.H.; Penta Cavalcante, M.; Matara Vinas, M.; Ribeiro, S.; Kallás, E.G.; Nascimento Saldiva, P.H.; et al. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0185474. [\[CrossRef\]](#)
22. Lee, S.J.; Park, J.-H.; Lee, J.-Y.; Jeong, Y.-I.; Song, J.-A.; Lee, K.; Kim, D.-J. Establishment of a mouse model for pulmonary inflammation and fibrosis by intratracheal instillation of polyhexamethyleneguanidine phosphate. *J. Toxicol. Pathol.* **2016**, *29*, 95–102. [\[CrossRef\]](#)
23. Blaauw, M.E.; Boetjen, F.J.; Emsen, C.L.; Turner, S.M.; Zandieh-Doulabi, B.; Hanemaaijer, R.; Smit, T.H.; Sloop, R.; Everts, V. Extracellular matrix proteins: A positive feedback loop in lung fibrosis? *Matrix Biol.* **2014**, *34*, 170–178. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Barbayart, L.; Ninou, I.; Trouvot, A.; Aidinis, V. Bleomycin Revisited: A Direct Comparison of the Intratracheal Micro-Spraying and the Oropharyngeal Aspiration Routes of Bleomycin Administration in Mice. *Front. Med.* **2018**, *5*, 269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Porter, D.W.; Hubbs, A.F.; Chen, B.T.; McKinney, W.; Mercer, R.R.; Wolfarth, M.G.; Battelli, L.; Wu, N.; Seaman, K.; Leonard, S.; et al. Acute pulmonary dose-responses to inhaled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology* **2012**, *7*, 1179–1194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Wang, J.; Hu, K.; Cai, X.; Yang, B.; He, Q.; Wang, J.; Weng, Q. Targeting PI3K/AKT signaling for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Acta Pharm. Sin.* **2022**, *43*, 15–22. [\[CrossRef\]](#)
27. Hu, H.-S.; Lin, C.-C.; Lin, J.-H.; Hsu, T.-W.; Hsu, J.-W.; Su, K.; Hsu, S.-C. Involvement of ER stress, PI3K/AKT activation, and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14272. [\[CrossRef\]](#)
28. Polunovsky, V.A.; Chen, B.; Henke, C.; Snover, D.; Windt, C.; Ingbar, D.H.; Siferman, P.B. Role of mesenchymal cell death in lung remodeling after injury. *J. Clin. Invest.* **1993**, *92*, 388–397. [\[CrossRef\]](#)
29. Chen, T.M.; Dufano, M.J. Mucus viscoelasticity and mucociliary transport rate. *J. Lab. Clin. Med.* **1978**, *92*, 423–431.
30. Zhong, L.; Xiang, Y.; Zheng, Z.; Liu, N.; Hu, J.; Yang, F.; Chen, R. Effect of short-term inhalation of warm saline atomized gas on patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis. *ERJ Open Res.* **2020**, *6*, 130–2019. [\[CrossRef\]](#)
31. Urahama, Y.; Hasegawa, Y.; Murata, J.; Kishi, H. Investigation of the Mechanical Properties of a Pressure-Sensitive Adhesive Part 3: Effect of Polydispersity Index (PDI) on Crosslinking Property of Acrylic Polymers. *J. Adhes. Soc. Jpn.* **2020**, *56*, 4–11. [\[CrossRef\]](#)
32. Xu, J.; Kim, K.O.; Yoon, K.J. Effect of Cross-Linker Length on the Absorption Characteristics of the Sodium Salt of Cross-Linked Polyaspartic Acid. *Polymers* **2022**, *14*, 2244. [\[CrossRef\]](#)
33. Singh, R.P.; Ramarao, P. Accumulated Polymer Degradation Products as Effector Molecules in Cytotoxicity of Polymeric Nanoparticles. *Toxicol. Sci.* **2013**, *136*, 131–143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Morones, P.E.; Mühle, H.; Mermelstein, R. Chronic Inhalation Study Findings as a Basis for Proposing a New Occupational Dust Exposure Limit. *Int. J. Toxicol.* **1991**, *10*, 279–290. [\[CrossRef\]](#)
35. Belmont, B.; Mühle, H.; Croustenberg, O.; Mermelstein, R. Irreversible pulmonary changes induced in rat lung by dust overload. *Environ. Health Perspect.* **1992**, *97*, 189–191. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Oyabu, T.; Morimoto, Y.; Hirohashi, M.; Horie, M.; Kambara, T.; Lee, B.W.; Hashiba, M.; Mizuguchi, Y.; Myojo, T.; Kuroda, E. Dose-dependent pulmonary response of well-dispersed titanium dioxide nanoparticles following intratracheal instillation. *J. Nanoparticle Res.* **2013**, *15*, 1600. [\[CrossRef\]](#)
37. Sumiya, K.; Matsunaga, T.; Tanaka, M.; Mochizuki, S.; Sakurai, K. Oligo-DNA Stoichiometrically Binds β -1,3-Glucan with the Best Fit Length. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 4825–4834. [\[CrossRef\]](#)

38. Doan, V.T.H.; Lee, J.H.; Takahashi, R.; Nguyen, P.T.M.; Nguyen, V.A.T.; Pham, H.T.T.; Fujii, S.; Sakurai, K. Cyclodextrin-based nanoparticles encapsulating α -mangostin and their drug release behavior: Potential carriers of α -mangostin for cancer therapy. *Polym. J.* **2020**, *52*, 457–466. [[CrossRef](#)]
39. Nishida, C.; Inami, H.; Tomonaga, T.; Takeshita, J.; Wang, K.-Y.; Yamasaki, K.; Yabea, K.; Morimoto, Y. Predictive Biomarkers for the Ranking of Pulmonary Toxicity of Nanomaterials. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 2032. [[CrossRef](#)]
40. Ashcroft, T.; Simpson, J.M.; Timbrell, V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J. Clin. Pathol.* **1988**, *41*, 467–470. [[CrossRef](#)]
41. Hübner, R.-H.; Gitter, W.; Eddine El Mokhtari, N.; Mathiak, M.; Both, M.; Bolte, H.; Freitag-Wolf, S.; Bewig, B. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques* **2008**, *44*, 507–517. [[CrossRef](#)]

1. 「A. 研究目的」について
労災補償行政の課題との関連性を含めて記入すること。
2. 「B. 研究方法」について
 - (1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること。
 - (2) 「（倫理面への配慮）」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）に関わる状況、実験動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。
なお、人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（令和3年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、遺伝子治療等臨床研究に関する指針（平成31年厚生労働省告示第48号）、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続を行うこと。
3. 「C. 研究結果」について
・全体の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。
4. その他
 - (1) 日本産業規格A列4番の用紙を用いること。
 - (2) 文字の大きさは、10～12ポイント程度とする。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
<u>Tomonaga T</u> , <u>Nishida C</u> , <u>Izumi H</u> , Kawai N, Wang KY, <u>Higashi H</u> , Takeshita JI, Ono R, Sumiya K, Fujii S, Hata Y, <u>Sakurai K</u> , <u>Morimoto T</u> , <u>Higashi Y</u> , Yamasaki K, <u>Yatera K</u> , <u>Morimoto Y</u> .	Crosslinked structure of polyacrylic acid affects pulmonary fibrogenicity in rats.	Int J Mol Sci.	23(22)	13870	2022

発行元
〒807-8555
福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘1番1号
産業医科大学 医学部 呼吸器内科学
TEL : 093-691-7453
FAX : 093-602-9373
E-mail : k2684@med.uoeh-u.ac.jp