

研究課題名：架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物および増粘作用を有する類縁合成高分子化合物の粉体に対する呼吸器疾患に関する研究

研究代表：梅田ゆみ

研究年度：令和 7 年度

研究目的

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（CWAAP）粉体の吸入性粉じんとしての職業曝露により、労働者に肺線維化を主体とする呼吸器疾患が発生し、国内では労災認定事例として報告されている。これまでの動物実験および病理学的解析により、CWAAP が肺に線維性病変を誘発することが示されており、CWAAP および類縁増粘性高分子化合物の肺毒性を評価することは、労働者の健康障害防止および職業性呼吸器疾患のリスク評価の観点から重要である。一方、増粘作用を有する高分子化合物は、医薬品、化粧品、食品、工業製品など幅広い分野で使用されているものの、その物理化学的特性、特にレオロジー特性と呼吸器有害性との関連については十分に解明されていない。

そこで本研究では、肺の解剖学的構造がヒトに極めて近似する大型動物（家畜ブタ・マイクロミニピッグ）を基盤評価系として確立し、物質の物理化学的特性（レオロジー特性）と呼吸器有害性の相関を多角的に評価することを目的とした。

研究方法

レオロジー測定では、日本の災害事案に関連するアクリル酸ポリマーおよび食品用途で広く使用される各種増粘剤を対象とした。アクリル酸ポリマーについては非架橋型および架橋度の異なる 4 種類を用い、食品系増粘剤としてキサンタンガム、グアーガム、カラギーナン類、セルロース誘導体、ペクチン等を選定した。各試料の粘度は、高性能回転型粘弾性測定装置 ARES-G2 レオメーターを用いて、3 回以上反復測定した。

家畜豚を用いた肺内投与実験では、上記レオロジー測定結果を基に、非架橋型アクリル酸ポリマーおよび架橋度の異なるアクリル酸ポリマー、食品系増粘剤合計 12 種について、1 物質 1 濃度とし、左右肺（後葉）に異なる物質を単回投与した。1 ヶ月の観察期間の後に胸部 CT 撮影、解剖、病理組織学的解析を行なった。

マイクロミニピッグを用いた実験では、家畜ブタでの実験結果を踏まえ、非架橋型アクリル酸ポリマー（PAH）および架橋型アクリル酸ポリマー（100CLPAH）を選定し、肺内単回投与後 3 ヶ月の観察の後に胸部 CT 撮影、解剖、病理組織学的解析を行なった。

培養細胞を用いた実験では、ヒト肺由来細胞 HLCs2N に hTERT、CDK4R24C、Cyclin D1 などを導入し、不死化細胞株 HLCs2N-K4DT を樹立した。樹立細胞について、Western blot 法により肺由来細胞としての性質および導入遺伝子の発現を確認し、毒性評価用細胞株を選定した。細胞毒性評価には、A549 細胞および HLCs2N-K4DT 細胞を用い、各種ア

クリル酸ポリマーを曝露後、Neutral Red Uptake (NRU) アッセイにより細胞生存性を評価した。Neutral red の細胞内取り込み量を 540 nm の吸光度として測定し、濃度反応曲線から LC50 を算出した。これにより、新規ヒト肺由来不死化細胞株の増粘剤毒性に対する感受性を評価した。

ブタ肺における疾患関連線維芽細胞の探索では、既に実施した実験の、CWAAP 気管内単回投与後 3 か月経過したマイクロミニピッグ肺を解析サンプルに用いた。肺組織は中枢から末梢まで複数部位より採取し、酵素処理およびセルソーティングによりシングルセル懸濁液を調製した。得られた細胞について、BD Rhapsody Express システムを用いた TAS-Seq 法によりシングルセル RNA シークエンス解析を実施した。取得データは SAW および Seurat を用いて解析し、COL1A1 陽性間葉系細胞のサブクラスタリングにより疾患関連線維芽細胞集団を探索した。さらに、FFPE 肺組織切片に対して Stereo-Seq OMNI による空間オミクス解析を行い、病理組織像と遺伝子発現分布を統合的に解析した。

結論

1. 安全性の高い増粘剤の同定：食品、医薬品、化粧品業界で広く使用される天然由来増粘剤（キサンタンガム、CMC-Na、グアーガム等）について、高粘度条件下での肺内投与においても呼吸器有害性が極めて低いことを、ヒトに近い構造を持つブタモデルを用いて実証した。
2. アクリル酸ポリマーによる急進的病変の再現：アクリル酸ポリマーにおいては、架橋の有無や強度にかかわらず、投与後わずか 1 ヶ月で肺胞構築の破壊と顕著な線維性病変を誘発し、強い肺疾患原性を有することを確認した。
3. 病変の慢性化プロセスの解明：3 ヶ月間の長期観察の結果、非架橋型（PAH）で見られた初期の上皮性変化は減衰し、最終的には架橋型と同様に「広義間質」を主座とする慢性線維化病変へと移行した。これにより、架橋の有無は初期病変に差異をもたらすものの、さらなる時間経過後には質的に共通した不可逆的な慢性線維化に至ることが明らかとなった。
4. 高感度 in vitro 評価系の確立：新たな日本人肺由来不死化細胞を用いた短期毒性評価手法を確立し、複数のアクリル酸ポリマーに対する直接的な細胞傷害性を A549 細胞よりも鋭敏に検出し得ることを示した。
5. 線維化を主導する「病的ニッチ」の同定：空間オミクス解析（Stereo-seq OMNI）結果を検討し、広義間質の線維化部位に集積・動員される外膜由来線維芽細胞系譜（PI16 陽性等）を特定した。これらが病変形成の核心となる「病的ニッチ」として機能していることを空間的に実証し、広義間質の肺疾患の機序解明に繋がる重要な知見を得た。

今後の展望

R7年度は、比較的安全性が高い可能性が考えられる食品及び化粧品業界で使用されている天然由来増粘剤を中心に実施した。次年度は、化粧品や工業製品など幅広い分野で使用されている更なる合成高分子/増粘剤について、物質選定を行い、大型動物や培養細胞を用いた更なる検討を進める。本研究の遂行はレオロジー特性と化学構造に基づいた増粘剤のカテゴリー評価系構築のための強固な科学的基盤となるものであり、将来的な労働衛生上のリスク管理および呼吸器疾患の予防・診断技術の向上に大きく寄与することが期待される。