

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

令和7年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梅田ゆみ

令和8年（2026）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物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----- 1
梅田 ゆみ

II. 分担研究報告

1. 被験物質候補となる各種増粘剤のレオロジー特性の評価----- 38
梅田 ゆみ
山野 莊太郎
藤井 修治
2. 家畜ブタを用いた肺内投与実験 ----- 45

梅田 ゆみ
新井 佐知子
風間 啓
志賀 崇徳
3. マイクロミニピッグを用いた肺内投与実験 ----- 54
梅田 ゆみ
新井 佐知子
風間 啓
志賀 崇徳
4. 培養細胞を用いた実験 ----- 62
魏 民
清野 透
5. ブタ肺における疾患関連線維芽細胞の探索----- 71
山野 莊太郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 89

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和7年度総括研究報告書

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 (250401-03)

研究代表者 梅田ゆみ 労働安全衛生総合研究所 病理グループ 部長

研究要旨

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物 (CWAAP) の職業曝露による急進的な呼吸器疾患 (ポリマー肺) は、ヒト特有の「広義間質 (小葉間隔壁や軸位間質)」を主座とする線維化が特徴であり、当該構造の発達が乏しい従来の齧歯類モデルでは病態再現が困難であった。

R7年度は、食品業界で多用される増粘剤のレオロジーデータの網羅的な取得、日本人肺由来の新規不死化肺細胞を用いた *in vitro* 評価、およびブタへの単回肺内投与による病態解析を実施し、以下の成果を得た。

1. 安全性の高い増粘剤の同定と有害性因子の解明: 家畜ブタを用いた実験により、食品・医薬品・化粧品グレードの天然由来増粘剤は、CWAAPを凌駕する高粘度条件下での投与においても肺障害を誘発せず、呼吸器に対する健康影響リスクが極めて低い増粘剤を複数種見出すことに成功した。一方で、アクリル酸ポリマーは架橋の有無を問わず顕著な線維性病変を誘発し、特に架橋度と粘性が高い物質ほど病変が重篤化することを確認した。これらの対比により、肺障害の本質は物理的な「粘性」の強さと、特定の「化学構造」とそれに伴う細胞応答の両方が重要である事が示唆された。
2. 高感度な代替評価系の確立: 新たに樹立した日本人肺由来不死化細胞 (HLCs2N-K4DT) が、従来のA549細胞と比較してアクリル酸ポリマーに対し2倍以上の高い毒性検出感度を有することを実証し、動物実験を補完・代替する高精度なスクリーニング手法を確立した。
3. 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。

以上の成果は、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。

研究分担者

新井 佐知子 麻布大学 獣医学部 産業動物内科学研究室 講師

風間 啓 麻布大学 獣医学部 産業動物内科学研究室 助教

志賀 崇徳 麻布大学 獣医学部 病理学研究室 助教

魏 民 大阪公立大学 大学院医学研究科 環境リスク評価学 准教授

清野 透 公益財団法人佐々木研究所・附属佐々木研究所 腫瘍細胞研究部 客員研究員

山野 荘太郎 労働安全衛生総合研究所 上席試験研究員

A. 研究目的

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物 (cross-linked water-soluble acrylic acid polymer: 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

一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、多角的なアプローチから新規の有害性を有する増粘剤を探索すると共に、増粘性を有する高分子化合物が引き起こす呼吸器疾患の機序解明を目的とする。

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被験物質を選定し、各種増粘剤のレオロジー特性（粘度・流動性）を測定した。加えて、家畜ブタ及びマイクロミニピッグを用いて、肺内に直接投与し、病理組織学的検討を行った。加えて、新規肺上皮の培養細胞開発及びそれらを用いた *in vitro* 毒性評価を行った。最後に、CWAAP で誘発したブタ肺疾患材料を用いた空間オミクス解析を駆使し、線維化病変を形成しうる、疾患関連線維芽細胞の探索を行った。

B. 研究方法

1. レオロジー測定

被験物質

日本の災害事案に関連するアクリル酸ポリマー（Cas RN:9003-01-4）および、食品用途で広く使用されている増粘剤を選定した。

アクリル酸ポリマーについては、非架橋型（PAH）および架橋度の異なる4種類（1CLPAH、10CLPAH、20CLPAH、100CLPAH）を用いた。

食品系増粘剤としては、キサンタンガム（Cas RN: 11138-66-2）、グアーガム（Cas RN: 9000-30-0）、 κ -カラギーナン（Cas RN: 11114-20-8）、 λ -カラギーナン（Cas RN: 9064-57-7）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC-Na, Cas RN:9004-32-4）、メチルセルロース 4,000

（MC4000, Cas RN:9004-67-5）、メチルセルロース 15（MC15, CasRN:9004-67-5）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC, Cas RN:9004-65-3）、およびペクチン（CasRN:9000-69-5）を対象とした。

レオロジー測定前の検討

レオロジー特性評価では、各物質について溶解限界を考慮した濃度条件を設定（グアーガム、キサンタンガム、 κ カラギーナンおよび λ カラギーナンは2 mg/mL、その他は10 mg/mL）した。なお、当初は毒性比較の観点から、すべての被験物質を同一濃度（10 mg/mL）で投与する条件を想定し、予備検討を実施した。その結果、キサンタンガムおよびグアーガム等のガム系増粘剤、ならびに κ -カラギーナンおよび λ -カラギーナンについては、10 mg/mL ではゲル化し流動性を失うため、均一な懸濁液として調製することが困難であり、ブタ肺への投与には適さないことが確認された（図1）。一方、これらの物質は2 mg/mL では流動性を保持し、投与可能な状態

で調製できることが確認された。他の物質については10 mg/mLにおいても投与可能な状態を維持した。



図1：高濃度条件における増粘剤の状態

キサンタンガム（10 mg/mL）の例を示す。本条件ではゲル化により流動性を失い、均一な懸濁液として調製することが困難であり、肺内投与には適さない状態であった。

以上の結果を踏まえ、本研究では各物質の溶解性および投与可能性を考慮し、ガム系およびカラギーナン類は2 mg/mL、その他は10 mg/mL の条件で評価を行うこととした。

レオロジー測定方法

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粘度測定を3回以上反復で実施した。計測ジグには直径50mmのコーンプレートを用い、せん断速度を0.1から100s⁻¹まで掃引することにより粘度計測を実施した。コーンプレートを用いることにより、試料には均一なせん断流動を与えることが可能となる。図2はレオメーターを用いた粘度計測の様子である。各種被験物質は適量をスポイトでとり、温度37℃に保たれた平面ステージ（プレート）上に垂らした。被験物質を上からコーンで挟み、その後、温度が安定になるのを待ってから粘度計測を開始した。

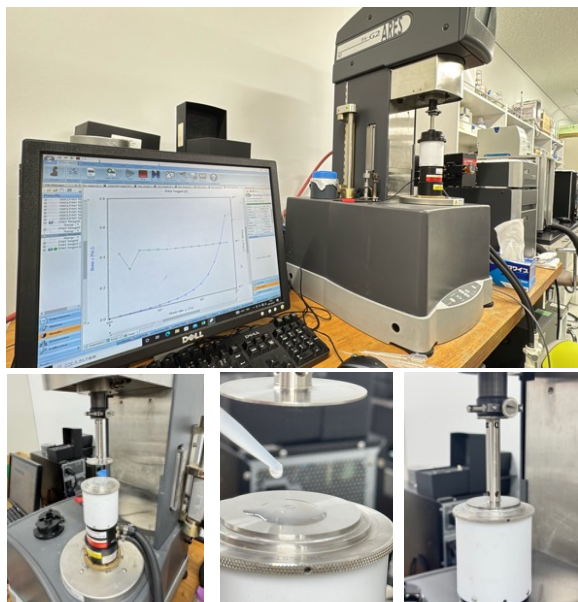


図 2：高性能回転型粘弾性測定装置
ARES-G2 レオメーター

2. 家畜ブタを用いた肺内投与実験

使用動物と投与物質

家畜ブタは株式会社シムコ（千葉）より導入した。馴致期間を経てのち、実験を実施した。

投与試験物質として、災害事案に関連するアクリル酸ポリマー（Cas RN:9003-01-4）および食品用途で広く使用されている増粘剤を選定した。アクリル酸ポリマーについては、非架橋型（PAH）および架橋度の異なる 3 種類（1CLPAH、10CLPAH、100CLPAH）を用い、食品系増粘剤としては、キサンタンガム、グアーガム、 κ カラギーナン、 λ カラギーナン、CMC-Na、MC4000、MC15、ペクチンを対象とした。

レオロジー特性評価では、各物質について溶解限界を考慮した濃度条件を設定（グアーガム、キサンタンガム、 κ カラギーナンおよび λ カラギーナンは 2 mg/ml、その他は 10 mg/ml）し、レオメーターを用いて粘度測定をした。それぞれの投与候補物質のレオメーターによる粘度測定結果から、家畜ブタを用いた肺内単回投与実験を実施した。12 種類の増粘剤について、1 物質 1 濃度とし、左右肺に異なる物質を投与することで、個体数を最小限に抑えつつ広範な影響評価を行った。なお、粘度の高い物質を同一個体の両肺に投与することで、状態の悪化を招く可能性を考慮して表 1 に示す組み合わせで投与した。

投与方法

対象動物にブトルファノール（明治アニマルヘルス、熊本）、メデトミジン塩酸塩（共立製薬、東京）およびミダゾラム（日医工、富山）による三種混合麻酔薬(MMB)を 0.1ml/kg 頸部筋肉注射にて投

与したのち、チアミラールナトリウムを耳静脈より投与して意識消失を確認後、開口し気管支鏡で右および左中後葉の 1 次気管支を確認しながら、ブロッカーチューブを留置し、対象物質を投与した。被検物質の逆流を防ぐ為、投与後約 3 分留置を維持し、逆流がないことを内視鏡で確認後カテーテルを抜去した。

安楽死

1 か月の観察の後、麻布大学における当該委員会で承認された方法で動物を安楽死させた。家畜ブタは株式会社シムコ（千葉）より導入し、メデトミジン+ミダゾラム+ブトルファノールによる三種混合麻酔薬(MMB)の頸部筋肉内投与（0.1ml/kg）で鎮静後、耳介静脈よりチアミラールナトリウム（100mg/kg）を 21G 翼状針で投与し、意識消失を確認し、直ちに CT 撮影後、腋窩動脈より放血殺した。

CT 撮像

被験物質投与 1 か月（解剖前安楽殺後）に胸部 CT イメージを取得した。

撮影の当日は絶食とした。ブトルファノール（明治アニマルヘルス、熊本）、メデトミジン塩酸塩（共立製薬、東京）およびミダゾラム（日医工、富山）による三種混合麻酔薬(MMB)の筋肉内投与（0.1ml/kg）で鎮静後、チアミラールナトリウム 100mg/kg を耳介静脈から注入し、呼吸停止を確認後ただちに Aquilion Exceed LB 80 列 CT（Canon Medical Systems）で胸部 CT イメージを獲得した。

解剖およびサンプリング

全身臓器の状態を肉眼的に観察したのち、投与部位の肺後葉を摘出した。摘出した肺は 10%中性緩衝ホルマリン液を気道より注入し、その後浸漬固定した。加えて、肉眼的に変化の見られた臓器も 10%中性緩衝ホルマリン液にて浸漬固定した、検索に供した。

病理組織解析方法

固定した肺は、カセットに入るサイズ（約 2.5 cm × 2 cm または、4 cm × 5.5 cm）に再度切り出しを行い、ホルマリン後固定を実施し、パラフィン包埋工程へと進めた。

パラフィン包埋工程としては、後固定終了後軽く水洗し、70%エタノールに 6 時間浸漬後、密閉式自動固定包埋装置（サクラファインテックジャパン

（株）製 VIP-6AI）を用いて 100%エタノール I ～ VII、キシレン I ～ III、パラフィン I ～ IV を各 2 時間にて処理し、パラフィン包埋ブロックを作製した。パラフィン包埋ブロックは、薄切機（リトラトーム REM-710, 大和光機株式会社）にて約 3～4 μ m 厚で薄切して FFPE 病理切片を作製した。スライドガラ

スは松浪 FINE FROST（松浪硝子工業株式会社）、カバーガラスは武藤化学株式会社製を使用した。

H&E 染色は脱パラフィン、水洗後 2 倍のカラッチヘマトキシリンにて室温 10 分間染色し、0.5%塩酸/70%アルコール溶液にて分別後、流水にて約 10 分間色出しを実施した。エオジンはエオジン Y を用いたエオジン水溶液にて室温で 3 分間染色し、エタノールにて分別・脱水、キシレンにて透徹後マリノール（武藤化学株式会社）を用いて封入した。

3. マイクロミニピッグを用いた肺内投与実験

使用動物と投与物質

マイクロミニピッグを用いた肺内投与実験のうち、投与および飼育管理については、富士マイクロ株式会社（静岡）で実施した。

マイクロミニピッグ（体重 8-10 kg）は富士マイクロ株式会社（静岡）より 2 頭（個体番号 5143、5161）導入した。

本研究では、家畜ブタを用いた単回肺内投与試験の結果を踏まえ、対象物質として、特徴的な肺病変を示した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）を選定した。投与量は、家畜ブタ試験において重篤な全身状態悪化は認められなかったものの、肺内に比較的多量の被験物質残存が観察されたことを考慮し、長期観察時の過度な局所負荷を避ける目的で、家畜ブタ試験の半量に相当する 5 mg/kg BW に設定した。



図 3. 獣医師らによるマイクロミニピッグへの増粘剤肺内投与の様子

投与方法および解剖

対象動物にブトルファノール（明治アニマルヘルス、熊本）、メデトミジン塩酸塩（共立製薬、東京）およびミダゾラム（日医工、富山）による三種混合麻酔薬(MMB)を 0.1ml/kg 頸部筋肉注射にて投与したのち、2～2.5%イソフルランを吸入させて意識消失を確認後、開口し気管支鏡で右および左後葉の 1 次気管支を確認しながら、気管支ブロッカーチューブを留置し、対象物質を投与した（図 3）。被

験物質の逆流を防ぐ為、投与後 5 分間留置を維持し、逆流がないことを内視鏡で確認後気管支ブロッカーチューブを抜去した。

投与は右後葉に 100CLPAH、左後葉に PAH をそれぞれ 10 ml 投与した。

CT 撮像

被験物質投与 1 か月（解剖直前）に胸部 CT イメージを取得した。



図 4. マイクロミニピッグの胸部 CT 撮影

撮影の当日は絶食とした。ブトルファノール（明治アニマルヘルス、熊本）、メデトミジン塩酸塩（共立製薬、東京）およびミダゾラム（日医工、富山）による三種混合麻酔薬(MMB)の筋肉内投与（0.1ml/kg）で鎮静後、チアミラールナトリウム 100mg/kg を耳介静脈から注入し、呼吸停止を確認後ただちに Aquilion Exceed LB 80 列 CT（Canon Medical Systems）で胸部 CT イメージを獲得した。

解剖およびサンプリング

3 ヶ月の観察の後、麻布大学における当該委員会で承認された方法で動物を安楽死させた。メデトミジン、ミダゾラム、ブトルファノールを 0.1ml/kg 頸部筋肉注射（21G・1 1/2 針）により鎮静したのち、耳介静脈よりチアミラールナトリウム（100mg/kg）を 21G 翼状針で投与し、意識消失を確認し腋窩動脈より放血殺した。

全身臓器の状態を肉眼的に観察したのち、投与部位の肺後葉を摘出した。摘出した肺は 10%中性緩衝ホルマリン液にて 48-72 時間浸漬固定した。

病理組織解析方法

固定した肺は、カセットに入るサイズ（約 2.5 cm × 2 cm または、4 cm × 5.5 cm）に再度切り出しを行い、ホルマリン後固定を実施し、パラフィン包埋工程へと進めた。

パラフィン包埋工程としては、後固定終了後軽く水洗し、70%エタノールに6時間浸漬後、密閉式自動固定包埋装置（サクラファインテックジャパン

（株）製VIP-6AI）を用いて100%エタノールⅠ～Ⅶ、キシレンⅠ～Ⅲ、パラフィンⅠ～Ⅳを各2時間にて処理し、パラフィン包埋ブロックを作製した。パラフィン包埋ブロックは、薄切機（リトラトームREM-710, 大和光機株式会社）にて約3～4 μm厚で薄切してFFPE病理切片を作製した。スライドガラスは松浪FINE FROST（松浪硝子工業株式会社）、カバーガラスは武藤化学株式会社製を使用した。

H&E染色およびエラスチカ・ワンギーソン染色を実施した。

H&E染色は脱パラフィン、水洗後2倍のカラッチヘマトキシリンにて室温10分間染色し、0.5%塩酸/70%アルコール溶液にて分別後、流水にて約10分間色出しを実施した。エオジンはエオジンYを用いたエオジン水溶液にて室温で3分間染色し、エタノールにて分別・脱水、キシレンにて透徹後マリノール（武藤化学株式会社）を用いて封入した。

エラスチカ・ワンギーソン染色は脱パラフィンおよび水洗後、前田変法レゾルシン・フクシン染色液（武藤化学株式会社, Part No. 40321）にて室温で30分間染色した。その後、100%エタノールにて過剰染色を除去し、流水で洗浄した。続いて、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン溶液にて室温で10分間染色し、流水にて約10分間洗浄した。さらに、1%シリウスレッドを用いたワンギーソン溶液にて室温で3～5分間染色し、100%エタノールにて脱水、キシレンにて透徹後、封入した。

4. 培養細胞を用いた実験

ヒト肺由来不死化細胞株の樹立

日本人肺由来細胞を用いた増粘剤毒性評価系を構築するため、ヒト肺由来細胞HLCs2Nに対して、hTERT、CDK4R24C、Cyclin D1などを導入し、不死化細胞株およびその亜株を樹立した。作製した細胞株は、TERTを導入したHLCs2N-T、TERT、CDK4R24CおよびCyclin D1を導入したHLCs2N-K4DT、TERTおよびCDK4R24Cを導入したHLCs2N-K4T、TERTに加えてEpCAM promoter-TetOffシステムによりCDK4R24CおよびCyclin D1を発現するHLCs2N-Tet-K4DT、ならびにTERTに加えてEpCAM promoter-TetOffシステムによりCDK4R24Cを発現するHLCs2N-Tet-K4Tである。樹立した各細胞株について、増殖能および肺由来細胞としての性質を確認し、その後の毒性評価に用いる細胞株を選定した。

Western blot 法による細胞特性の解析

樹立したヒト肺由来不死化細胞株について、肺細胞としての特徴および導入遺伝子の発現を確認する

ため、Western blot 法を実施した。解析対象として、Cyclin D1、CDK4、基底細胞マーカーであるp63、肺上皮 lineage マーカーであるTTF-1、細胞周期制御因子であるp16/INK4aを用いた。また、内部対照としてVinculinを用いた。一次抗体として、Cyclin D1はCell Signaling Technology社製2922S、rabbit monoclonal antibodyを1:1000希釈で用いた。CDK4（D9G3E）はCell Signaling Technology社製12790S、rabbit monoclonal antibodyを1:1000希釈で用いた。p63（EPR5701）はAbcam社製ab124762、rabbit monoclonal antibodyを1:1000希釈で用いた。TTF-1/NKX2-1（SPT24）はLeica/Novocastra社製NCL-L-TTF-1、mouse monoclonal antibodyを1:500希釈で用いた。p16/INK4a（G175-405）はBD Biosciences社製BDB550834、mouse monoclonal antibodyを1:1000希釈で用いた。VinculinはSigma-Aldrich社製V9264、mouse monoclonal antibodyを1:1000希釈で用いた。

Western blotの結果に基づき、p63およびTTF-1の発現を含む肺由来細胞としての特徴、ならびにCDK4R24CおよびCyclin D1の発現を確認した。これらの結果を踏まえ、以後の増粘剤毒性評価にはHLCs2N-K4DT細胞を用いた。

A549細胞およびHLCs2N-K4DT細胞を用いたNeutral Red Uptake（NRU）アッセイ

ヒト肺由来細胞に対する増粘剤の直接的な細胞毒性を評価するため、A549細胞およびHLCs2N-K4DT細胞を用いて、Neutral Red Uptake（NRU）アッセイを実施した。被験物質として、PAH、1CLPAH、10CLPAH、20CLPAHおよび100CLPAHの5物質（Fujifilm, Japan）を用いた（Table 1）。

Day 0に、6 well プレートへA549細胞を 2×10^5 cells/well、HLCs2N-K4DT細胞を 1×10^5 cells/wellの密度で播種した。Day 1に、各被験物質を基礎培地で15 mL チューブ内に調製し、vortexにより約5秒間混和した。あらかじめ培養しておいたA549細胞およびHLCs2N-K4DT細胞から培地を除去し、PBSで1回洗浄した後、調製した被験物質含有培地を添加した。その後、37°C、5% CO₂条件下で15分間インキュベーションした。

細胞毒性はNeutral redの細胞内取込みを指標として評価した。被験物質処理後、顕微鏡観察を行い、被験物質含有培地を除去した。細胞をPBSで2回洗浄した後、Neutral red含有RPMI培地を添加し、37°C、5% CO₂条件下で3時間インキュベーションした。インキュベーション後、培地を除去し、PBSで2回洗浄した。続いて、酢酸-エタノール溶液（50% エタノール、49% Milli-Q 水、1% 氷酢酸）を各wellに1 mL 添加し、振盪により細胞内に取り込まれたNeutral redを溶出させた。得

られた溶出液を 96 well プレートに 180 μ L ずつ分注し、吸光度計を用いて 540 nm における吸光度を測定した。

LC50 の算出

NRU アッセイにより得られた吸光度データを用いて、各被験物質の細胞毒性を解析した。解析には GraphPad Prism 10 (GraphPad Software) を使用した。各被験物質について、投与濃度を対数変換した値を用い、非線形回帰解析 (log[agonist] vs. normalized response – variable slope) により濃度反応曲線を作成した。得られた近似曲線から、細胞生存率が 50% となる濃度を LC50 として算出した。A549 細胞および HLCs2N-K4DT 細胞で得られた LC50 を比較し、新規ヒト肺由来不死化細胞株の毒性検出感度を評価した。

5. ブタ肺における疾患関連線維芽細胞の探索

実験動物および CWAAP 誘発病変モデルの作製

実験動物には、ヒトへの外挿性が高く、広義間質の発達が著しいマイクロミニピッグ

(MicroMiniPig, 富士マイクラ株式会社, 静岡県, 日本) を用いた。正常肺アトラス構築用に健常雄性個体 (n=3) を使用し、疾患モデルには CWAAP (40 mg/m³ 相当懸濁液) を気管内単回投与し、3 ヶ月間の回復期間を経て重篤な広義間質病変を形成させた個体 (n=2) を用いた。組織採取に際しては、肺の中樞から末梢に至る解剖学的勾配を反映させるため、末梢領域 (胸膜含有: Group A、非含有: Group B) および中樞気道・大血管領域 (Group C) の 3 部位から厳密なサンプリングを実施した。

TAS-Seq 法による高感度シングルセル RNA シークエンシング

なお、本報告書のうち正常マイクロミニピッグ肺の TAS-Seq 解析 (別紙 3 図 1~7、および結果 5-0 ~5-5) に用いた基盤データは、令和 7 年度労災疾病臨床研究事業費補助金 (課題番号: 240202-02) における分担研究 (石綿関連疾患研究) と共通のリファレンスアトラスとして構築・使用しているものである。

摘出した肺組織を、肺解離キット (Multi Tissue Dissociation Kit 1, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用い、37°C の恒温槽内で機械的・酵素的に消化し、シングルセル懸濁液を調製した。そその後、死細胞除去および CD31+/CD45+細胞のソーティング (内皮・免疫系) と CD31-/CD45-細胞 (間葉系・上皮系) を 1:1 でソーティング

(FACS Aria III, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を行い、間葉系細胞を高純度に濃縮した。

細胞捕捉およびライブラリ調製には、BD Rhapsody Express システム (BD Biosciences) を用い、TAS-Seq 法 (Shichino et al., 2021) に従い、逆転写反応および cDNA 増幅を実施した。TAS-Seq 法は従来の全トランスクリプトーム解析と比較し、転写産物の捕捉感度が極めて高く低発現な転写因子やシグナル分子の検出に優れている。調整したライブラリは、NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いシークエンシングを行った。

データ解析パイプライン

得られた Raw データに対し、SAW (STOmics Analysis Workflow) および Seurat (v4.4.0, R v4.3.2) を用いて解析した。低品質な細胞 (Mito < 5%, nFeature < 200) を除去後、合計 25,305 細胞を統合した。さらに、間葉系細胞の核心部を抽出するため、COL1A1 陽性細胞 (7,643 細胞) に対してサブクラスターリングを実施し、Harmony アルゴリズムによるバッチ補正を経て、13 の独立した間葉系サブセットを同定した。

空間オミクス解析 (Stereo-Seq OMNI)

CWAAP 誘発肺病変の FFPE (ホルマリン固定パラフィン包埋) ブロックから 10 μ m 厚の切片を作成し、脱パラフィン、親水化、脱架橋 (Decrosslinking) および透過処理 (Permeabilization) の前処理を行った後、Stereo-Seq OMNI V2 チップ (BGI/STOmics, Shenzhen, China) 上にレジストレーションした。

Stereo-Seq (Spatio-Temporal Enhanced REsolution Omics-sequencing) は、DNB (DNA Nanoball) 技術を基盤とした高密度パターンニングアレイを用いることで、プローブ間隔 500nm というナノスケールの解像度を実現しており、1 細胞あたり数百のキャプチャスポットを確保することで、真のシングルセルおよびサブセラー解像度での空間的遺伝子発現情報の捕捉を可能とする技術である。

特に、本研究で用いた OMNI プロトコル (Li et al., 2025) は、FFPE 組織における RNA の断片化やホルマリン架橋といった解析上の重大な課題を克服するために開発された手法である。従来の空間オミクスで主流であった Poly-A 配列を標的とする mRNA キャプチャとは異なり、ランダムプライマーを用いた in situ での Total RNA キャプチャ (Random primed in situ total RNA capturing) を採用している (別紙 3 図 8)。これにより、ホルマリン固定によって断片化した RNA であっても高効率かつ網羅的に捕捉し、組織切片上で cDNA 合成とチップへのライゲーションを完結させることが可能となった。

キャプチャした RNA 由来のライブラリは、DNBSEQ-G400 (MGI Tech, China) にてシークエンシングを実施した。取得された空間座標データと発現

データは、Stereomap v4.0 (STOmics) を用いて解析を行い、高精細な細胞セグメンテーションを実施した。これにより、エラスティカ・ヴァンギーソン染色等で確認された病理組織学的な小葉間隔壁肥厚部位と、特定遺伝子シグネチャーの局在を1細胞レベルで正確に照合した。

(倫理面への配慮)

本実験は、科学的正当性と信頼性（研究不正の防止に関する教育の受講、再現性の確保や透明性の担保）及び社会的責任と安全・環境への配慮、化学物質管理法、労働安全衛生法、など、関係する法律や規制を遵守して行われた。

ブタを持ちた実験は、麻布大学動物実験委員会で承認された方法で実施された（家畜ブタ：承認番号250807-6、マイクロミニピッグ承認番号250616-1）。ヒト肺由来不死化細胞株の樹立については施設の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. レオロジー測定

各投与候補物質のレオメーターによる粘度測定結果を図5および別紙1に示す。いずれの物質においても、流れやすさに関係する条件（せん断速度）の増加に伴い粘度が低下する傾向が認められた。すなわち、力が加わると流れやすくなる性質を有する（非ニュートン流体としての挙動を示す）ことを確認した。

なお、各物質の投与濃度については、事前検討の結果に基づき設定した。ガム系増粘剤およびカラギーナン類は10 mg/mLではゲル化し流動性を失うため投与が困難であったが、2 mg/mLでは投与可能な状態であった。一方、その他の物質は10 mg/mLにおいても流動性を維持していた。

物質間の比較では、メチルセルロース（MC4000、MC15）およびガム系（キサンタンガム、グアーガム）が全体として高い粘度を示した。一方、アクリル酸ポリマー群はこれらと比較して相対的に低粘度であったが、架橋度の違いに応じた明確な差が認められた。アクリル酸ポリマーにおける粘度の順位は、100CLPAH > 20CLPAH > 10CLPAH > 1CLPAH > PAHであり、架橋度の増加に伴い粘度が上昇する傾向が一貫して確認された。非架橋型であるPAHは最も低い粘度を示した。

なお、本研究では各物質の溶解限界を考慮し、ガム系およびカラギーナン類は2 mg/mL、その他は10 mg/mLの条件で測定を行った。このため絶対値の単純比較には制約があるものの、実際の投与条件を想

定した場合の流動特性の相対比較として有用な結果が得られた（表1）。

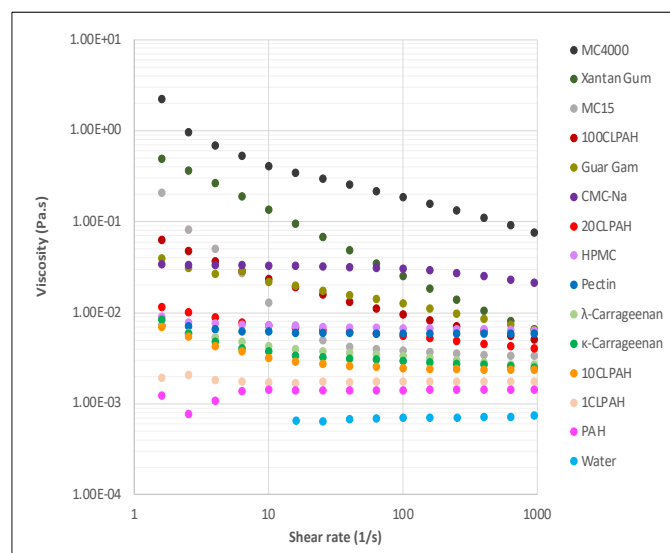


図5：各増粘剤の粘度測定結果（平均値）

各物質について、溶解限界を考慮した濃度条件（ガム系・カラギーナン類：2 mg/mL、その他：10 mg/mL）で測定した。横軸はせん断速度（流れに加わる力の指標）、縦軸は粘度を示す。多くの物質で、応力が加わるほど粘度が低下し、流れやすくなる傾向が認められた。また、物質間で粘度に明確な差がみられた。

表1. 投与候補物質の増粘性順位付け

	増粘剤	濃度 (mg/ml)
1	メチルセルロース 4,000	10
2	キサンタンガム	2
3	メチルセルロース 15	10
4	100CLPAH	10
5	グアーガム	2
6	カルボキシメチルセルロースナトリウム	10
7	20CLPAH	10
8	ヒドロキシプロピルメチルセルロース	10
9	ペクチン	10
10	λ-カラギーナン	2
11	κ-カラギーナン	2
12	10CLPAH	10
13	1CLPAH	10
14	PAH	10

CLPAH: Cross-Linked Polyacrylic Acid

PAH: Polyacrylic Acid

2. 家畜ブタを用いた肺内投与実験

2-2. 状態観察

投与したブタは、気管支内投与後の個別体調管理および、発咳などで投与基剤が気管支から胃内へ逆流し、糞に残留する可能性を考慮し、投与後1週間は個室管理にて糞尿の完全回収を行った。1週間後、体調に問題が無い場合は、その後群飼育へと移行した。実験中に呼吸困難で死亡した個体はいなかった。No.8は投与後Day3に発咳、No.6は投与後Day1～6で活力の低下および食欲不振が見られたが、その後回復した。各個体の体重の推移は図6のとおり。参考値として示した、当大学で飼育した肺内未投与ブタのデータと比較しても、健康な未投与ブタと遜色なく発育していることが確認された。

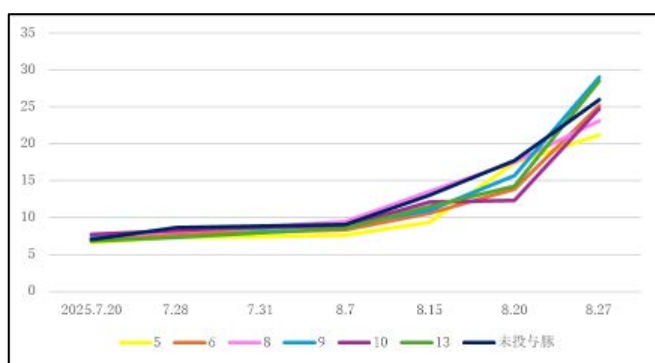


図6. 実験中の体重推移

2-3. HRCT 画像診断

アクリル酸ポリマー投与 (PAH, 1CLPAH, 10CLPAH, 100CLPAH) 肺では、HRCT 上で投与部位に一致したコンソリデーションが認められた。代表的な画像を図7に示す。1CLPAHを投与した家畜ブタの肺では、広範囲なコンソリデーション、隔壁の肥厚、一部網状影を認めた。投与した1CLPAHによる重篤な肺障害が示唆され、網状影から、小葉間隔壁・肺泡隔壁の肥厚を伴う線維化への移行が疑われた。

一方で、キサンタンガム、グアーガム、κカラギーナン、λカラギーナン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース 4,000、メチルセルロース 15、ペクチンを投与した肺では、著変を認めなかった。

2-4. 解剖

病理解剖時の肺の肉眼的観察からは、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 (100 CLPAH、10 CLPAH、1 CLPAH) を投与した肺に変形や表面の陥没がみられた (図8及び4の左上段)。肺葉はいずれの動物もCTの横断像と対比しやすい方向に切り出し、その断面を観察した。非架橋型および架橋型アクリル酸ポリマーを投与した肺の断面に白色斑が確認された (図8及び

9の右上段)。一方、食品系増粘剤を投与した肺はCT観察時同様に、全て剖検時においても切り出し時の観察においても著変は認められなかった。

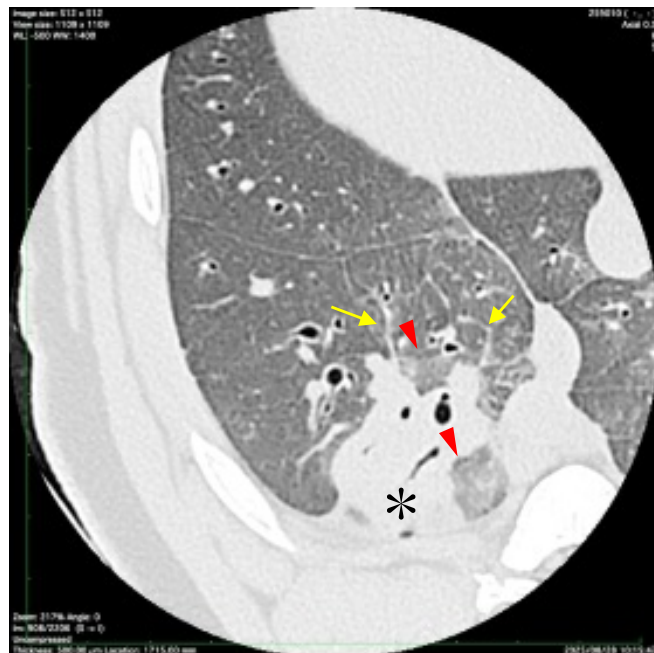


図7. 1CLPAH (左肺) を投与した家畜ブタ胸部HRCT画像

左肺に広範囲なコンソリデーションを認める (*)。周囲の隔壁は肥厚し (黄矢印)、網状影を認める (赤矢頭)。

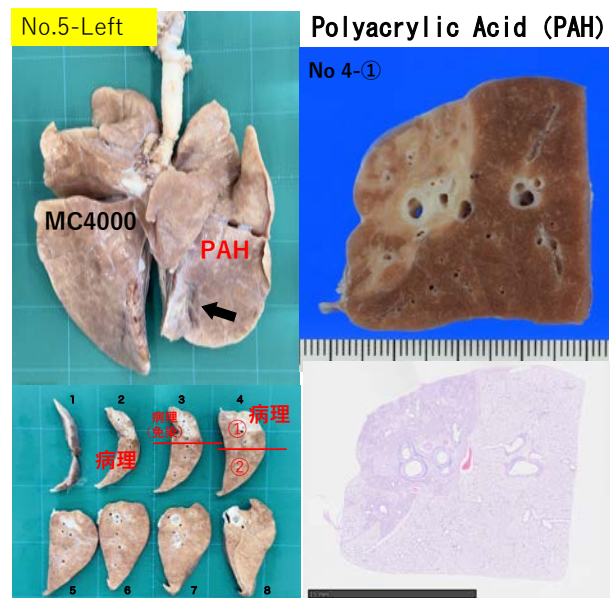


図8. 家畜ブタの肺肉眼像とHEルーペ像

左上段：肺全体肉眼像、左肺後葉は変形し、陥没も見られる (矢印)。左下段：PAHを投与した左肺後葉の切り出し写真。右上段：切り出された肺の拡大。右下段：No4-①のHE標本ルーペ像。

なお、病理解剖を実施した家畜ブタ6頭について、肺以外の臓器を観察したところ、動物番号No.6、No.9およびNo.13において心臓の心外膜お

よび心内膜に出血が認められた（図10）。その他の臓器には肉眼的著変は認められなかった。

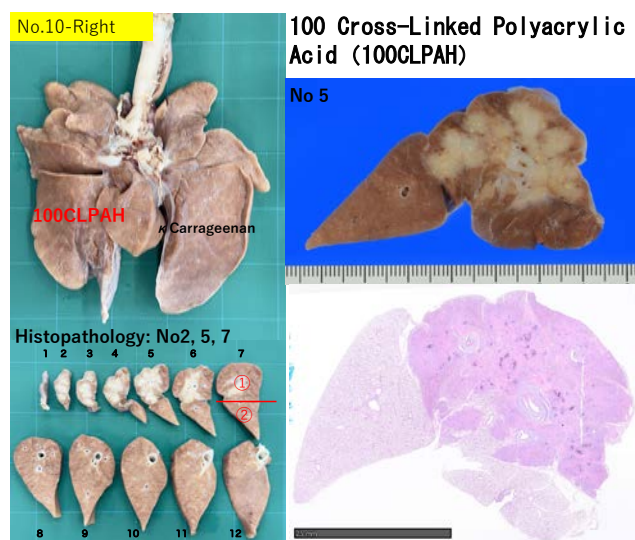


図9. 家畜ブタの肺肉眼像と HE ルーペ像

左上段：肺全体肉眼像、右肺後葉は大きく変形している。左下段：100 CLPAH を投与した右肺後葉の切り出し写真。右上段：切り出された肺の拡大。右下段：No.5 の病理組織標本ルーペ像。

心臓については、以下の手順で切り出しおよび記録を行った（図10）。まず、心臓外観を撮影した後、縦断切開を加えて内部構造を撮影した。次いで、心腔内の血餅を除去した後に再固定を行い、再度縦断面を撮影した。その後、心尖部から約3～3.5 cm 上方の位置で横断切開を実施した。

さらに、出血が認められた個体については、肺動脈から房室間溝近傍にかけて右心室を一部縦断し、病変部の観察を行った。また、右心房および左心房については、それぞれ心房端を切断したうえで撮影・記録を行った。



図10. 家畜ブタ（No.9）の心臓肉眼像

左：心臓全体の肉眼像。主として右心室の心外膜に出血が認められる。右上段：心臓縦断後の肉眼像。心腔内に著変は認められない。右下段：右心室切開後の肉眼像。左図では心内膜および心外膜に出血が認められ

る。右図では横断面において右心室心外膜の出血が認められる。

2-5. 病理組織学的解析

肺における病理組織学的変化として、PAH、1CLPAH、10CLPAH の3種における結節病変に共通して、肺胞構造の破壊的リモデリング、異型腺管上皮の出現と腔内に被検物質及び貪食細胞の集簇（図11、13、15）、および周囲の小葉間隔壁の線維性肥厚（図12、14、16）を共通して認めた。

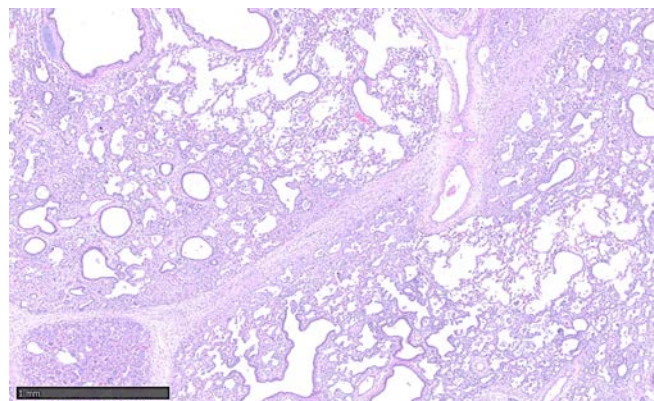


図11. PAH を投与した家畜ブタの肺、低倍増
Bar=1mm、HE 染色

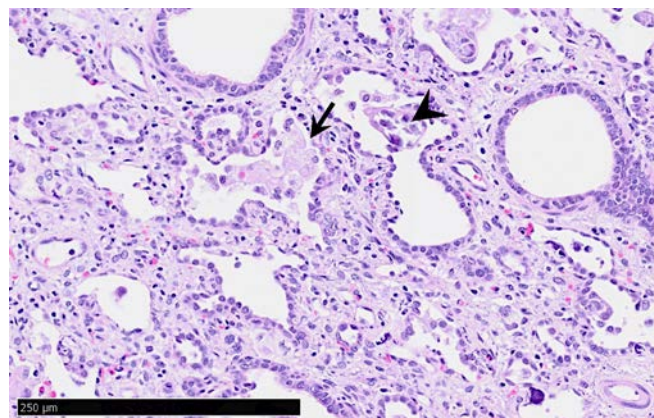


図12. PAH を投与した家畜ブタの肺、高倍増
矢印：マクロファージ、矢頭：投与物質、
Bar=250μm、HE 染色

一方で、100CLPAH においては、上記3種のポリマーと比較しても明らかに強い膠原線維の増加（図17）を認め、小葉構造の中心-辺縁を問わず、100μm 以上の厚みを持った線維束が錯走して認められた（図18）。以上の結果より、アクリル酸ポリマーでは、架橋の有無や強度に関わらず、被検物質が投与された肺末梢領域に対して、強い組織損傷が生じ、その後の修復反応として線維性リモデリングが生じていることが観察された。さらに、その組織反応の強度では、PAH/1CLPAH/10CLPAH と100CLPAH の間で違いが見られることが明らかとなった。

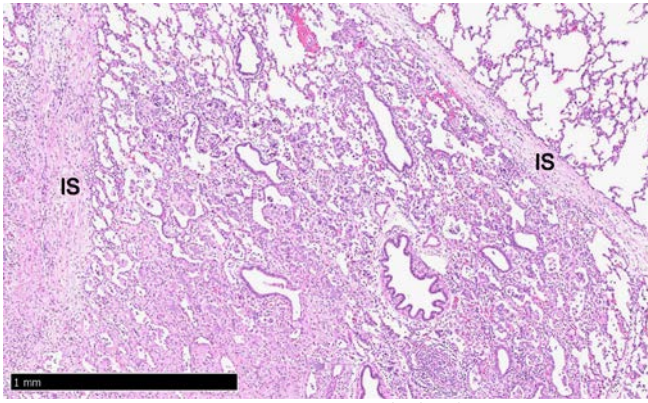


図 1 3．1 CLPAH を投与した家畜ブタの肺，低倍増

IS: 小葉間隔壁、Bar=1mm、HE 染色

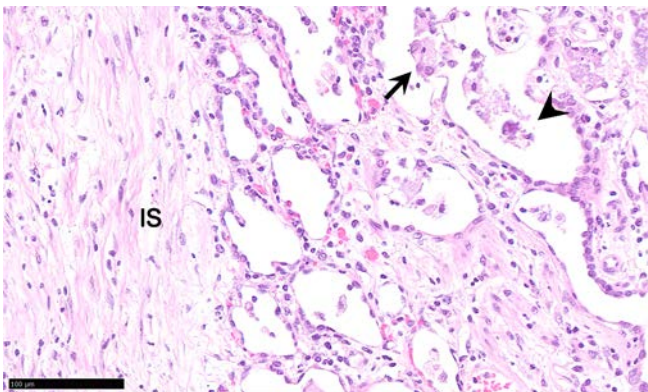


図 1 4．1 CLPAH を投与した家畜ブタの肺，高倍増

IS: 小葉間隔壁、矢印: マクロファージ、矢頭: 投与物質、Bar=100μm、HE 染色

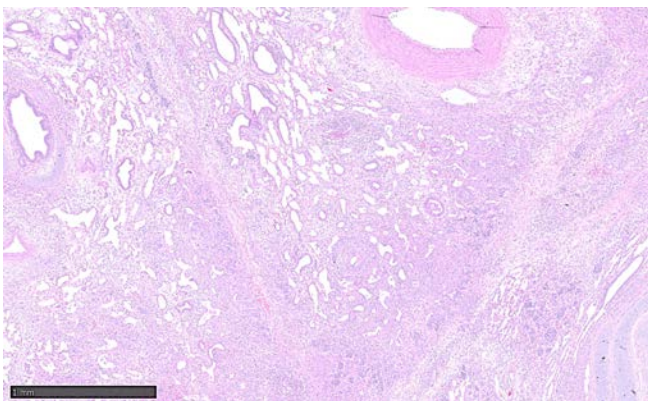


図 1 5．10 CLPAH を投与した家畜ブタの肺，低倍増

IS: 小葉間隔壁、Bar=1mm、HE 染色

一方で、キサンタンガム、グアーガム、κカラギーナン、λカラギーナン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース 4,000、メチルセルロース 15、ペクチンを投与した肺では、投与された肺領域において顕著な組織反応を認めず、非投与部位と同様に正常の肺胞、気道、そして繊細な小葉間隔壁に胸膜が観察された。

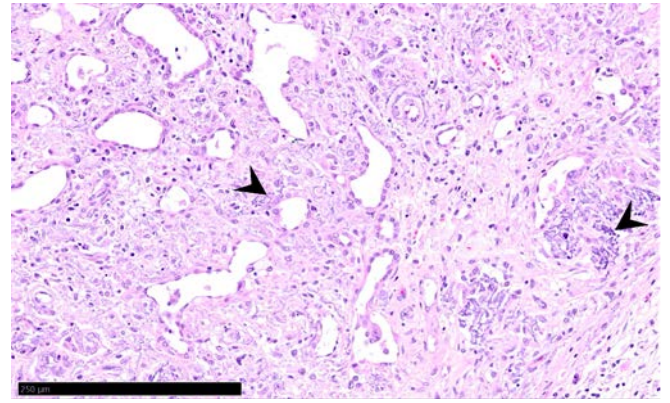


図 1 6．10 CLPAH を投与した家畜ブタの肺

矢頭: 投与物質、Bar=250μm、HE 染色

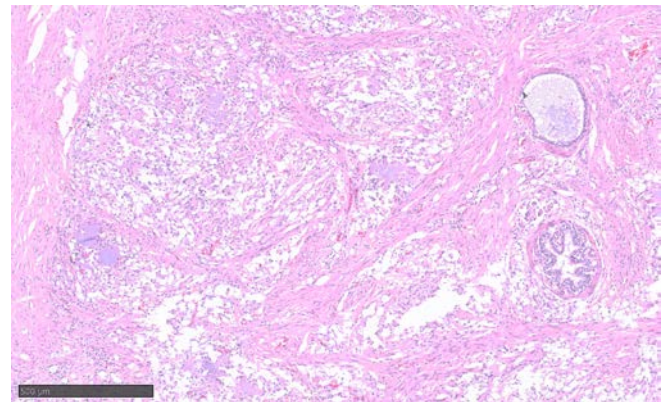


図 1 7．100 CLPAH を投与した家畜ブタの肺，低倍率

Bar=500μm、HE 染色

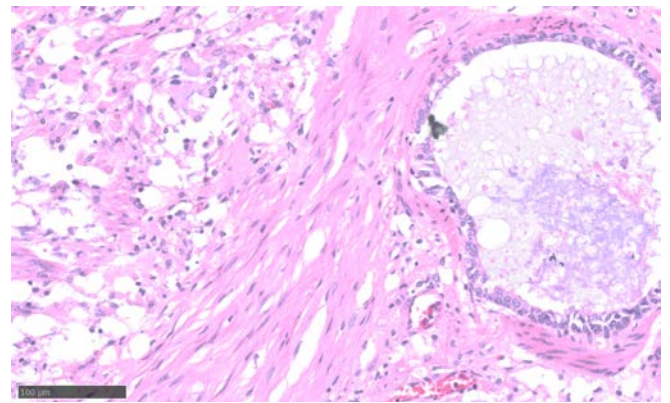


図 1 8．100 CLPAH を投与した家畜ブタの肺，高倍率

気道周囲の軸位間質とは無関係に錯走する膠原線維束. Bar=100μm、HE 染色

なお、解剖時に肉眼的に変化が見られた No.6、No.9 および No.13 の心臓組織標本では、右心室の心外膜、心内膜ならびに心筋線維間には出血が認められた（図 1 9）。一方、心筋実質に著変は認められず、冠状動脈および冠微小血管にも明らかな病変は認められなかった。

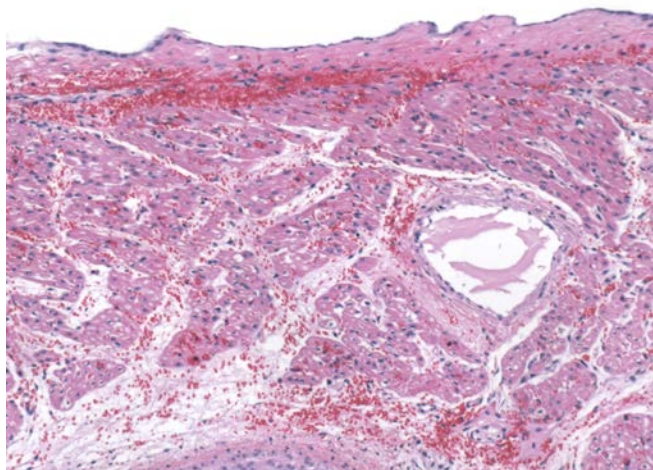


図 19. 家畜ブタ (No. 9) の心臓病理組織像
右心室外膜および心筋線維間の出血 HE 染色

3. マイクロミニピッグを用いた肺内投与実験

3-1. 状態観察

個体番号 5161 の動物に発咳が確認されたが、Day7 までには消失し、その後は活力、食欲ともに問題無く実験終了まで経過した。定期的に体重測定を実施した結果、図 20 に示すとおり、どちらも問題無く成長している様子が見られた。

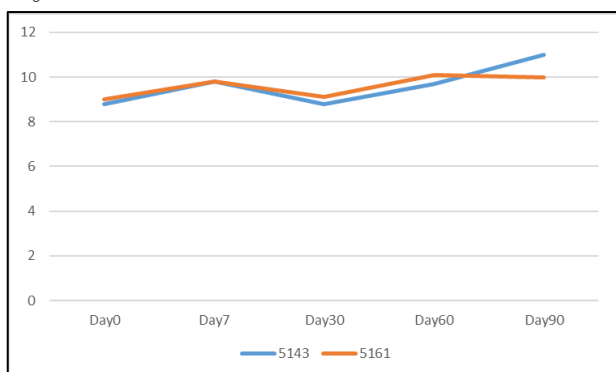


図 20. マイクロミニピッグの体重推移

3-2. HRCT 画像診断

PAH を投与したマイクロミニピッグの肺では、広範囲なコンソリデーション、隔壁の肥厚、一部網状影を認めた (図 21)。投与した PAH による重篤な肺障害が示唆され、特に 100CLPAH を投与した右肺後葉では、顕著な網状影が観察され、小葉間隔壁の肥厚を伴う線維化への移行が疑われた。

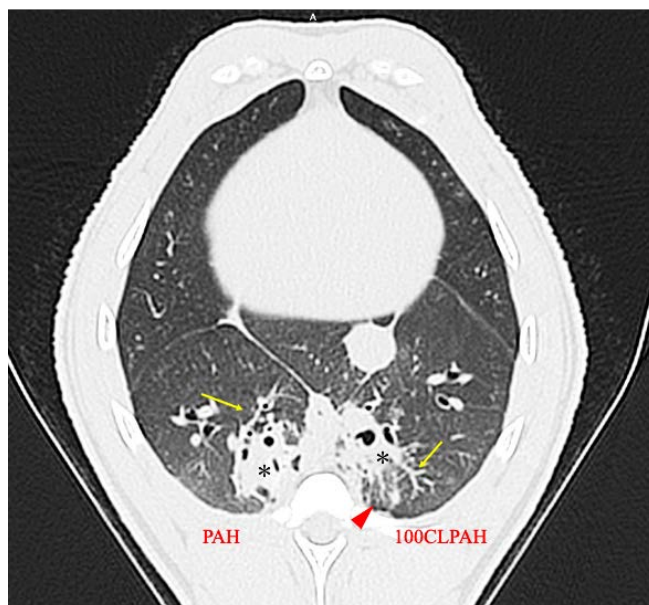


図 21. PAH (左肺) 100CLPAH (右肺) を投与したマイクロミニピッグ胸部 HRCT 画像

投与した両肺後葉に広範囲なコンソリデーションを認める (*). 周囲の隔壁は肥厚し (黄矢印)、特に 100CLPAH を投与した右肺後葉において網状影を認める (赤矢頭)。

3-3. 病理解剖

病理解剖時の肺の肉眼的変化では、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 (100 CLPAH) を投与した肺の後葉は暗赤色調を呈し、表面の陥没など投与部位は変形していた (写真 22 及び 23 の右上段)。肺後葉は CT の横断像と対比しやすい方向に切り出し、その断面を観察した。

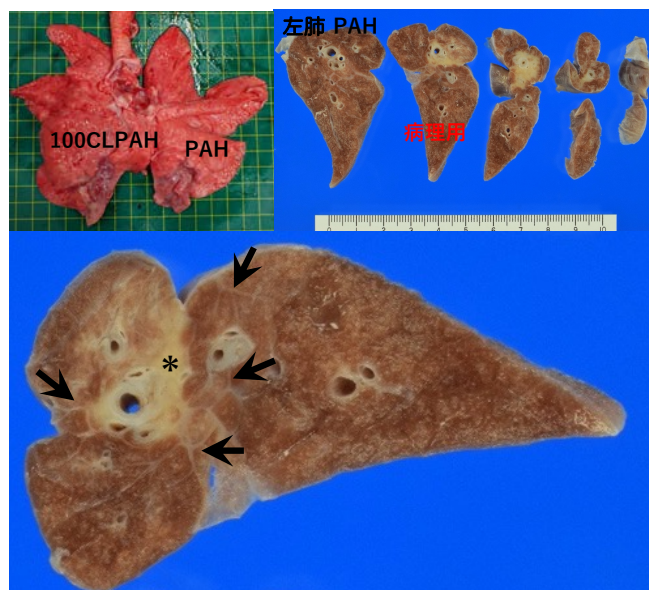


図 22. マイクロミニピッグ (5161) の肺肉眼像
左上段: 肺全体肉眼像、左右とも肺後葉表面は陥没し変形している。右上段: PAH を投与した左肺後葉のホルマリン固定後における切り出し写真。下段: 肺断面の拡大像、白色斑 (*) と小葉間隔壁の肥厚 (矢印) を認める。

非架橋型および架橋型アクリル酸ポリマーを投与した肺共に、CT画像でコンソリデーションを認めた部位に白色斑が観察された。また、肉眼観察からも小葉間隔壁の肥厚が確認された（写真22及び23の下段）。

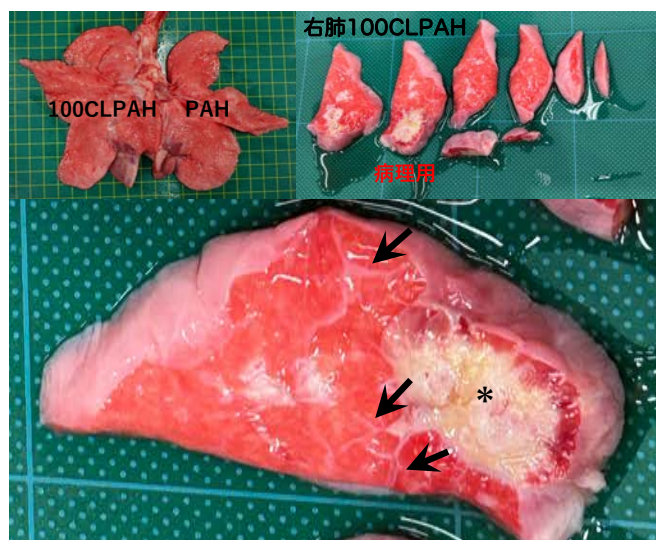


図23. マイクロミニピッグ (5143) の肺肉眼像
左上段：肺全体肉眼像、左右とも肺後葉表面は陥没し変形している。右上段：100CLPAHを投与した左肺後葉の切り出し写真（ホルマリン未固定時）。下段：肺断面の拡大像、白色斑（*）と小葉間隔壁の肥厚（矢印）を認める。

なお、病理解剖を実施したマイクロミニピッグ2頭について、肺以外の臓器を観察したところ、その他の臓器には肉眼的著変は認められなかった（図24）。

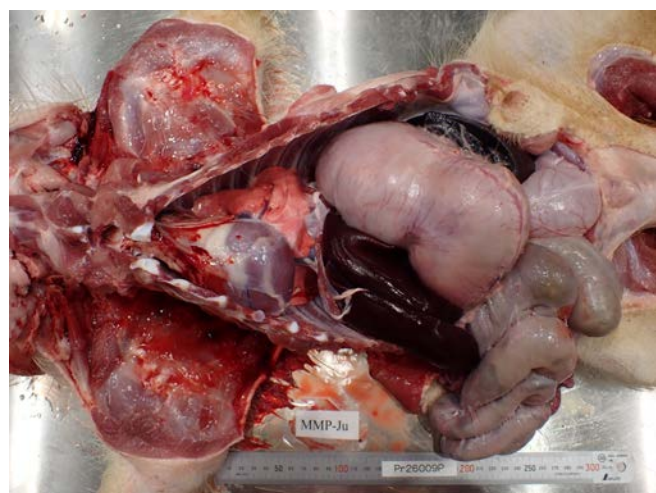


図24. マイクロミニピッグ (5143) の開胸、開腹後の臓器肉眼像
肺以外の体腔臓器に著変は認められなかった。

3-4. 病理組織学的解析

肺は肉眼的変化のみられた部位（CT画像で所見の見た部位に一致）を病理組織解析用に採材し

た。非架橋型（PAH）および架橋型（100CLPAH）アクリル酸ポリマーのいずれの肺においても投与部位に線維化病変が認められた。

PAHを投与した左肺後葉のEVGルーペ像を図25に示す。小葉間隔壁の肥厚はコラーゲン線維（赤色）の増加であることが確認され、投与部位を中心に広範囲に認められた。また、小葉間隔壁の線維化に加え、小葉間隔壁及び軸位間質をつなぐ架橋線維化も認められた（図26）。さらに、肉眼的に白色斑を認めた部位はその表面が陥没した部位にあたり、EVGルーペ像において黒色調を呈する領域として確認された（図25）。当該部位の拡大像からは、通常観察される肺泡構造が確認されず、肺泡領域はエラスチン線維（黒紫色）の増加が顕著であり、加えてコラーゲン線維（赤色）も認められた（図27）。

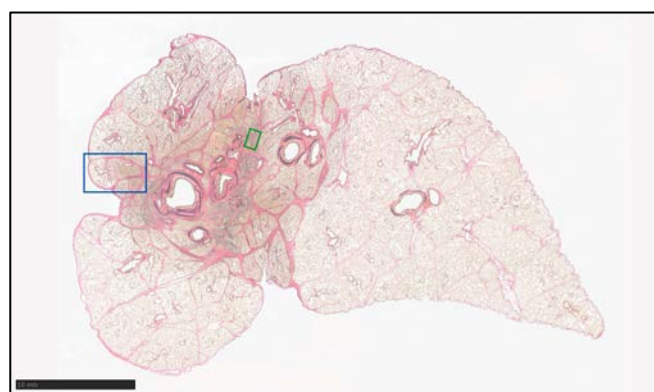


図25. PAHを投与したマイクロミニピッグ (5161) の左肺病理組織像
Bar=10mm、EVG染色

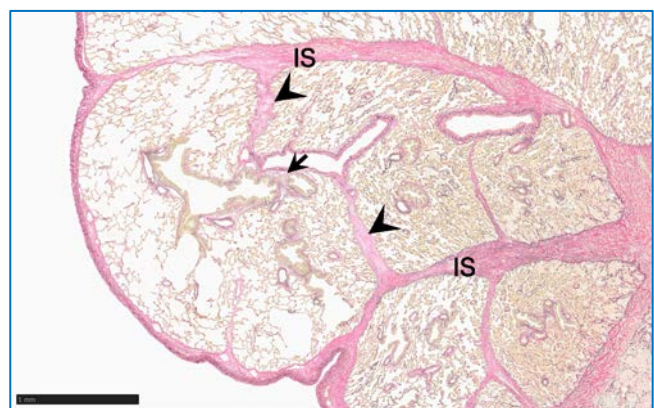


図26. PAHを投与したマイクロミニピッグ (5161) 図25の青枠拡大像
IS: 小葉間隔壁、矢印: 軸位間質、矢頭: 小葉間隔壁及び軸位間質をつなぐ架橋線維化。Bar=1mm、EVG染色

100CLPAHを投与した肺でも、小葉間隔壁の肥厚はコラーゲン線維（赤色）の増加として確認され、当該線維化病変は広範囲に認められた（図28）。

肉眼的に白色斑を認めた部位は、周囲組織に認めるような肺胞による気腔の形成が認められず（図29）、肺泡領域はエラスチン線維（黒紫色）とコラーゲン線維（赤色）で埋められていた（図30）。

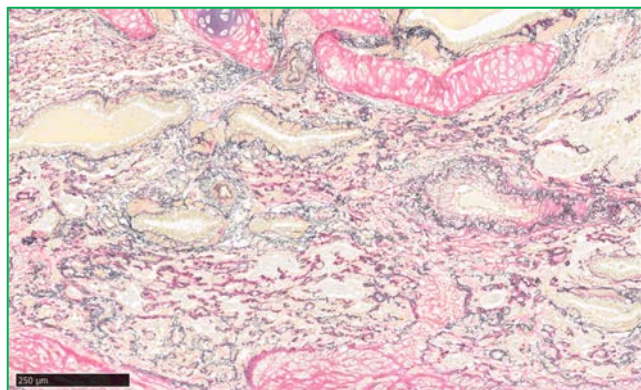


図27. PAHを投与したマイクロミニピッグ(5161)図25の緑枠拡大像

Bar=250μm、EVG染色

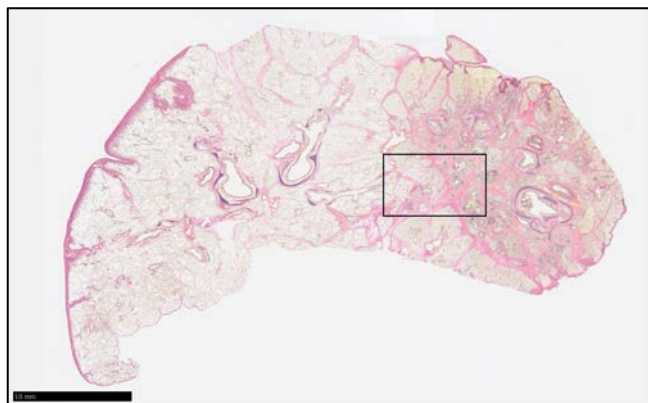


図28. 100CLPAHを投与したマイクロミニピッグ(5143)の右肺病理組織像

Bar=10mm、EVG染色

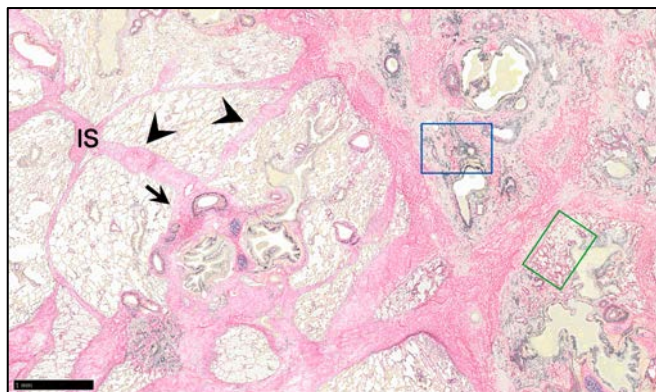


図29. 100CLPAHを投与したマイクロミニピッグ(5143)図28の黒枠拡大像

肉眼的に白色斑としてみられた部位（写真右側）とその周囲組織（写真左側）。周囲組織には肺胞構造として気腔が存在するが、左側には存在しない。IS: 小葉間隔壁、矢印: 軸位間質、矢頭: 小葉間隔壁及び軸位間質をつなぐ架橋線維化。Bar=1mm、EVG染色

一部では、肺胞構造をわずかに認め、肺胞壁が肥厚しておりエラスチン線維（黒紫色）とコラーゲン線維（赤色）の増加が認められた（図31）。

上記白色斑を認めた病変の周囲では広範囲の小葉間隔壁の線維化や、小葉間隔壁及び軸位間質をつなぐ架橋線維化も認められた（図29）。

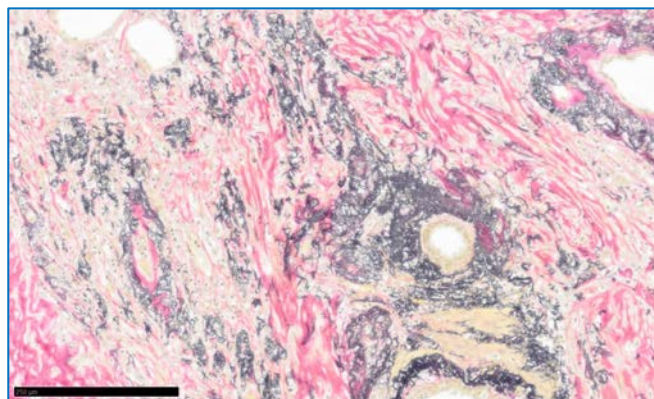


図30. 100CLPAHを投与したマイクロミニピッグ(5143)図29の青枠拡大像

Bar=250μm、EVG染色

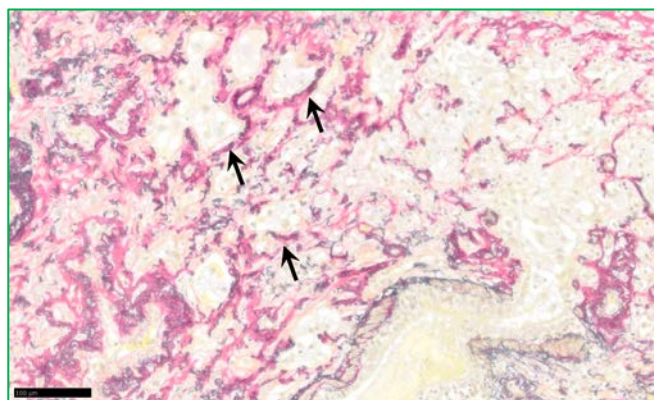


図31. 100CLPAHを投与したマイクロミニピッグ(5143)図29の緑枠拡大像

矢頭: 肺胞壁肥厚。 Bar=100μm、EVG染色

以上の結果から、非架橋型PAH架橋型100CLPAH共にアクリル酸ポリマーによる肺障害では、広義間質を主体とした線維化病変が示された。また、一部の領域ではエラスチン線維の増加も認められた。

なお、肺以外の全身諸臓器において認められた組織学的変化はいずれも軽度であり、被験物質投与との明確な関連を示唆する所見は認められなかった。

4. 培養細胞を用いた実験

4-1. ヒト肺由来不死化細胞株の樹立および特徴解析

正常初代培養ヒト肺細胞 HLCs2N を用いて、TERT、CDK4R24C および Cyclin D1 を組み合わせ

て導入し、複数のヒト肺由来不死化細胞株を樹立した。樹立した各細胞株における導入遺伝子の発現および肺上皮細胞としての特徴を確認するため、Western blot 法により Cyclin D1、CDK4、p63、TTF-1、p16INK4a および Vinculin の発現を解析した。その結果、導入した各遺伝子の発現が確認され、目的とする不死化細胞株が樹立されたことが示された(別紙2 Figure 1)。

まず、HLCs2N、HLCs2N-K4DT および HLCs2N-K4T のいずれにおいても、気道上皮基底細胞マーカーである p63 の発現が認められた。このことから、樹立した HLCs2N 由来不死化細胞株は、肺上皮由来細胞としての性質を一定程度保持していることが示唆された。

次に、各細胞株の増殖速度を比較したところ、HLCs2N-K4DT および HLCs2N-K4T が同程度に高く、HLCs2N-T が最も低かった。この結果から、HLCs2N-K4DT および HLCs2N-K4T は、毒性評価に必要な細胞数の確保および実験再現性の面で有用な細胞株であると考えられた。

さらに、TTF-1 および p16INK4a の発現はいずれの細胞株においても認められたが、HLCs2N-K4DT では、HLCs2N および HLCs2N-K4T と比較して、これらの発現が相対的に高い傾向がみられた。TTF-1 は肺上皮細胞の分化形質に関連するマーカーであることから、HLCs2N-K4DT は肺上皮細胞としての特徴を比較的良好に保持している可能性が考えられた。また、p16INK4a は細胞周期抑制因子であり、細胞老化やストレス応答に伴って発現が上昇することも知られている。そのため、HLCs2N-K4DT における p16INK4a 発現は、細胞周期制御やストレス応答に関連する性質が完全には消失していない可能性を示すものと考えられた。

以上より、HLCs2N-K4DT は、肺上皮細胞としての特徴を一定程度保持し、毒性評価に必要な安定した増殖能を有するとともに、TTF-1 および p16INK4a の発現も比較的明瞭であったことから、本研究では CWAAP の *in vitro* 肺細胞毒性評価に用いる代表的なヒト肺由来不死化細胞株として選択した。

4-2. PAH および CLPAH の *in vitro* 毒性

PAH および架橋度の異なる CLPAH 系列について、A549 細胞および HLCs2N-K4DT 細胞を用いて細胞毒性を評価した(別紙2-Table1, Figure 2)。A549 細胞における PAH、1CLPAH、10CLPAH および 20CLPAH の LC50 は、それぞれ 7.70、7.01、6.94 および 6.25 mg/mL であり、概ね同程度の値を示した。一方、HLCs2N-K4DT 細胞では、それぞれ 3.09、2.72、2.73 および 2.76 mg/mL であり、HLCs2N-K4DT 細胞内では概ね同程度であったものの、A549 細胞と比較して低値を示した。これらの結果から、本実験条件下では、HLCs2N-K4DT 細胞

は A549 細胞よりも PAH および CLPAH に対して高い感受性を示すことが示唆された。100CLPAH については、A549 細胞および HLCs2N-K4DT 細胞のいずれにおいても、最高濃度である 2.5 mg/mL で明確な細胞毒性は認められず、LC50 は 2.5 mg/mL を超えると判断された。なお、100CLPAH では、2.5 mg/mL を超える濃度でゲル状となり、均一な調製および細胞への添加が困難であったため、本試験では 2.5 mg/mL を最高濃度とした。

以上より、PAH、1CLPAH、10CLPAH および 20CLPAH では、架橋度の違いによる急性の直接細胞毒性の差は限定的であった一方、使用する細胞株によって感受性が異なることが示された。

5. ブタ肺における疾患関連線維芽細胞の探索

5-0. 正常ブタ肺全細胞景観および系統特定(別紙3 図1, 2)

TAS-Seq解析の結果、正常ブタ肺から得られた 25,305細胞(図1B)は、44の独立したクラスターとして分離された。系統マーカーの検討(図1D,E)により、EPCAM(上皮系)、COL1A1(間葉系)、CLDN5(内皮系)、PTPRC(免疫系)の発現を確認し、間葉系細胞及び上皮の境界を特定した。

5-1. 肺間葉系細胞における13サブクラスターの定義(別紙3 図2, 3, 4)

本解析では、COL1A1陽性細胞を対象とした高解像度サブクラスター解析により、計7,643個の間葉系細胞を同定した。特筆すべき点として、マウスのシングルセル解析では肺泡領域由来の Alveolar_Fib が圧倒的多数を占めることが一般的であるが、本解析の結果では、最多の Ductal_MyoF (1,453個) および 2位の Adventitial_Fib (1,111個) がいずれも Alveolar_Fib (805個) を大きく上回る数で同定された。これは、ブタがヒトと同様に極めて発達した広義間質(大血管や胸膜、気道周囲の鞘状組織)を保持していることを定量的に裏付けていた。

また、サンプリング領域(領域A: 胸膜側、領域B: 実質末梢、領域C: 中枢側)を分けた実験デザインにより、共通の系譜に属しながら局在を異にする解剖学的亜種が明確に分離された。各クラスターの機能的定義および分布特性を以下に記す。

1. Ductal_MyoF (1,453個): 肺管入口部の括約筋的な構造を支える細胞であり、領域B(実質末梢)において最も優位に認められた。
2. Adventitial_Fib (AdvF) (1,111個): 血管および気道の外膜を包む鞘細胞であり、領域AおよびB(末梢側)に広く分布し、弾性線維のアセンブリを担っていた。
3. Bronchial_MyoF (960個): 気道平滑筋束に隣接

して分布する物理負荷適応型の細胞であり、主に領域Bにおいて同定された。

4. Alveolar_Fib (AlvF) (805個)：肺胞壁に常在し上皮支持を担うニッチ細胞 (MANC) であり、領域AおよびBの実質領域に集積していた。
5. Chondrocyte (786個)：肺の骨格を成す軟骨細胞であり、発達した腺組織を伴う領域C (中枢側) にのみ特異的に認められた。
6. Inflam_Fib (InflamF) (550個)：Adventitial_Fibと多くのマーカー (PI16, DPT等) を共有する系譜であるが、領域Cに優位に認められた。UMAP上でもAdventitial_Fibと近接しており、中枢側における炎症応答型亜種として定義された。
7. ASM (449個)：気道周囲を螺旋状に取り囲む平滑筋細胞であり、領域AおよびBの気道沿いに分布していた。
8. Axial_MyoF (422個)：肺門部の気管支に特異的な筋線維芽細胞であり、免疫制御機能を備え、領域Cに極めて優位に局在した。
9. Pericyte (409個)：毛細血管の内皮を裏打ちする周細胞であり、中枢側の血管系を含む領域Cにおいて高い割合で認められた。
10. Vascular_Fib (VascF) (283個)：Alveolar_Fibと同じ系譜 (NPNT, FGFR4陽性) に属するが、肺胞と小葉間隔壁や細動脈の接触部位という特殊なニッチに局在し、領域AおよびBにおいて同定された。
11. Arterial_SMC (229個)：肺動脈中膜を構成する高度な収縮ユニットであり、領域Bを中心に末梢血管系において広く認められた。
12. VSM (104個)：血管壁を構成する平滑筋細胞であり、今回の解析では領域A (胸膜側) において最もdominantに認められた。
13. Schwann_cell (82個)：末梢神経を絶縁する神経随伴細胞であり、領域CおよびBの中枢寄り領域に局在していた。

5-2. 外膜系譜 (PI16陽性)：弾性線維形成と免疫制御ハブの分業 (別紙3図4-6)

外膜系譜に属する AdvF と InflamF は、共通して PI16, LOX, HTRA3, ECM1, C4A, MFAP5 といった強力な遺伝子シグネチャーを共有しており、同一の細胞系統に属する「解剖学的亜種」であることが示唆された。しかし、詳細な発現プロファイルの比較により、両者の間には以下の通り明確な機能的分業が認められた。

AdvFにおいては、弾性線維の主要構成成分である FBLN2 や、組織の機械的特性を維持する ASPN が優位に発現していた。特に MFAP5 と FBLN2 は弾性線維のアセンブリ (組み立て) に必須の糖タンパク質であり、これに加え、組織の硬化 (架橋) を直接担う LOX (Lysyl Oxidase) ファミリーや、細胞外マトリックス (ECM) の品質管理を司る HTRA3 や

ASPN が集積していた。これは、AdvFが物理的な「鞘」として、大血管や気道の外膜構造を強固に構築・維持する役割に特化していることを裏付けていた。

対照的に、中枢側に優位に局在した InflamFにおいては、ブタにおいて極めて鋭敏な新規指標である CRABP1 (レチノイン酸結合タンパク質) や RARRES1 を獲得していた。機能面では、補体系の活性化因子である CFB, C2, C3, C4A や、免疫細胞の強力な遊走因子である CXCL12, CCL2 を高発現しており、単なる支持細胞を超えた免疫制御ハブとして、初期の炎症応答や免疫細胞の動員を司る特殊な機能を獲得した亜種であることが判明した。

外膜系譜に属する AdvF および InflamF は、先行研究において全身の多様な組織に普遍的に存在し、組織傷害時のリザーバーとして機能する「Universal fibroblast」に相当する遺伝子シグネチャーを提示した。本解析において、AdvF および InflamF はいずれも PI16, DPT, CD34 を高発現しており、これら幹細胞性に関連する共通マーカーを保持していることが認められた。特に DPT や CD34 は、ヒトの多様な臓器において線維芽細胞の前駆状態を定義する指標として知られており、ブタの肺外膜系譜が「未分化なリザーバー細胞」としてのポテンシャルを有していることが分子レベルで裏付けられた。

一方で、マウスの PI16+ 線維芽細胞において主要な指標とされる IL33, CCL11, ADH7, DPP4 の発現を詳細に検討したところ、本解析のブタ AdvF/InflamF クラスタにおいては、これらの遺伝子は完全に陰性あるいは極めて微弱な発現に留まっていることが判明した (図6B)。マウスを用いた先行研究では、外膜系細胞は IL33 等を介した 2型免疫応答の指示細胞としての側面が強調されてきたが、ブタにおいてはこれらのマウス型シグネチャーが欠如していた。

この結果は、ブタの肺外膜系譜が、マウス特有の免疫学的プロファイルとは明確に異なり、ヒトの「Universal fibroblast」により近い分子的アイデンティティを保持していることを示唆している。すなわち、サンプリング領域 (領域A, B, C) を分けることで捉えられた AdvF (末梢側構造維持型) と InflamF (中枢側免疫制御型) の機能分化は、ヒト型 Universal fibroblast が局所のニッチに応じて専門分化した姿であると解釈された。

5-3. 肺胞・血管系譜 (NPNT陽性)：代謝活性型ニッチと血管走行ガイダンス (別紙3図4, 5, 7)

肺胞壁を主座とする Alveolar_Fib (AlvF) と、血管随伴性の Vascular_Fib (VascF) は、いずれも ITGA8, COL13A1, FGFR4, CES1, SOD3, A2M, VEGFD を核とした共通の系譜として同定された。これらの共通因子は、肺胞領域における恒常性維持や脂質代謝、酸化ストレス保護という本系統の基盤的機能を象徴していた。

AlvFにおいては、肺胞上皮(AT2)の接着を直接助ける NPNT (Nephronectin) や、上皮支持シグナルを担う FGFR4、および脂質代謝酵素 CES1 を強力に発現しており、ヒト型 MANC (Mesenchymal Alveolar Niche Cell) の形質を再現していた。さらに本解析では、心肺の発生に関与する GJA5 (Connexin 40) が AlvF 優位に認められた。これは、AT2 と密接に接触し、細胞間コミュニケーションを介して上皮の分化や恒常性を直接支持する機能を裏付けるものである。特筆すべきは、マウスで顕著な脂質貯蔵型 (Lipofibroblast) の指標である PLIN2, PPARG, LRAT, RBP1 がブタでは完全に陰性であった点である。しかし、脂質輸送を担う APOE, LPL, FABP4 の発現は認められ、ブタはヒトと同様に「貯蔵」ではなく「能動的な代謝・輸送」によって肺胞環境を制御する代謝活性型ニッチを有していることが判明した。

一方で、血管や隔壁境界部に局在する VascF においては、細胞骨格制御に関わる DOCK4 や、微小管モータータンパク質 KIF26B、マトリックス修飾酵素 UST、さらに血管走行の誘導に関わる受容体 GRID2, PTPRD、および ECM 微細調節因子である ADAMTSL1, ADAMTS17 の特異的な集積が認められた。これは、肺胞壁から血管走行路へと移行する微細な解剖学的境界において、血管ネットワークの構築や維持を物理的・分子的にガイドする専門的な役割を担っていることを示唆している。

5-4. 筋線維芽細胞系譜：物理負荷適応とニッチ形成 (別紙3図4, 5)

Myofibroblast (MyoF) 系譜として同定された Ductal_MyoF と Bronchial_MyoF は、共通して WIF1, GREM1, CLDN11, WNT11, FGF18 といったシグナル調節因子を発現していた。両者は共に ACTA2, TAGLN, MYH11 といった収縮関連マーカーを豊富に保持する一方で、中間径フィラメントである DES (Desmin) が陰性であるという、成熟平滑筋細胞とは一線を画す「生理的筋線維芽細胞」としての共通シグネチャーを提示した。

Ductal_MyoF (肺胞管入口部の括約筋) においては、Hedgehogシグナルの抑制因子 HHIP や Wnt拮抗因子 WIF1 を高発現していた。これらは気道と肺胞の接続部において、幹細胞ニッチの恒常性を保つニッチとして機能していることが推測された。対照的に、気道周囲に局在する Bronchial_MyoF においては、PDZRN4, KCNQ5, TRPC4 の特異的な発現が新規に同定された。これらの遺伝子群は機械刺激受容やカルシウムチャネル制御に関与しており、気道の収縮・拡張に伴う物理的な負荷に動的に適応するための専門的なプログラムを保持していることが示された。

5-5. 軸位間質系譜：中枢気道領域の免疫制御ハブ (別紙3図4, 5)

Axial_MyoF (軸位間質線維芽細胞) は、主に領域 C (中枢気道・大血管領域) に極めて特異的に局在するクラスターとして同定された。本細胞は血管平滑筋細胞 (VSM) や周細胞 (Pericyte) と共通のシグネチャー (NOTCH3, DES 等) を呈する一方で、免疫細胞の動員を司るケモカイン CCL19, CCL2 を極めて強力に産生している点が最大の特徴である。

解剖学的に中枢側の太い気管支を包む軸位間質に位置する本細胞は、石綿等の有害物質吸入時に、リンパ系へと続く道筋でマクロファージやリンパ球を動員する免疫制御ハブとしての役割を担っていると推測される。これはヒトの太い気道で見つかっている IR-fibro と相同な細胞であり、中枢側における初動の免疫応答を統御する重要なニッチとして機能している。

5-6. 空間オミクスによる病変部位の分子動態 (別紙3図9-11)

マイクロミニピッグに CWAAP を肺内投与後3ヶ月回復期間をおいた後に解剖したホルマリン固定パラフィン標本を用いた。事前にエラスティカヴァンギーソン染色にて病変部を病理観察した結果、広義間質に線維性肥厚が観察される一方で、肺胞領域では著変は認められなかった (図9A)。細気管支と細動脈で構成さえる軸位間質 (図9B) 及び小葉間隔壁 (図9C) では、顕著な膠原線維の増加が観察され間質の肥厚が認められると共に、弾性線維も散見された。また、これらの線維性肥厚病変は一部で繋がっており (図9A)、臨床で散見される架橋線維化も生じていることが明らかとなった。

CWAAP投与後の病理組織において認められた病変部位を含む肺組織に対して、空間オミクス (図10) を解析した。その結果、肺組織からは病変部からも十分量遺伝子が検出されており、クラスター解析の結果、合計35のクラスターが同定された。さらに、クラスター毎に局在を検討した結果、クラスター1のマーカーであり、線維化の指標となる COL3A1 が病変部に局在し、さらに PI16 陽性細胞が高度に集積していることを同定した。これにより、外膜由来系譜が空間的な病変形成の中心的な役割を担っていることが実証された。次に個別の遺伝子局在について検討した (図11)。広義間質病変部 (ピンクのアノテーション内) では、クラスター1のマーカーであり、線維化のマーカーでもある COL3A1 が局在していることが明らかとなった。さらに AdvF/InflamF のマーカーでもある PI16 が病変部で特徴的に発現しており、これらの結果から広義間質病変内には PI16 陽性細胞が増加し存在することが明らかとなった。一方で AlvF/VascularF の特徴的マーカーである COL13A1 の発現は正常肺胞組織に局限して局在していた。さらに、DuctalMyoF, BronchialMyoF, AxialMyoF, ASM, VSM, ArtSMC, Pericyte のブロードマーカーである MYH11 は、病変部にも正常肺胞組織

にも同程度局在しており、疾患部位特異性は認められなかった。

以上の結果より、外膜由来系譜が空間的な病変形成の中心に存在することを確認した。

D. 考察

本研究により、R7 年度に検討した大部分の増粘剤は、一定の粘性が確認される濃度で家畜ブタに投与したにもかかわらず、顕著な肺障害性を示さないことが明らかとなった。特にキサンタンガム、カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na)、グアーガム等の食品・医薬品グレードの天然由来増粘剤は、アクリル酸ポリマー (100CLPAH) を凌駕する粘度条件下であっても、肺に著明な病理組織学的変化を認めなかった。この事実は、増粘性 (物理的特性) のみが肺障害を引き起こす決定因子ではなく、物質の化学構造やそれに起因する特異的な細胞応答が、毒性発現の本質であると考えられる。

一方で、アクリル酸ポリマー間での比較においては、架橋度および粘性が最も高い 100CLPAH が、非架橋型 (PAH) や低架橋型 (1CLPAH、10CLPAH) と比較して明らかに強い線維原性を示した。100CLPAH 投与肺では 100 μ m 以上の厚みを持つ膠原線維束が錯走する重篤な病変が認められ、増粘性が高い物質ほど病変部位における滞留性が増し、肺障害の強度を高める重要な因子となる可能性が示唆された。

in vitro 評価系においては、新たに樹立した日本人肺由来不死化細胞 (HLCs2N-K4DT) が、従来の A549 細胞と比較してアクリル酸ポリマーに対し約 2 倍以上の高い毒性検出感度を示した。これは、よりヒトの生理的条件に近い高精度な有害性予測が可能になったことを意味し、動物実験の代替・補完手法として極めて有用である。さらにブタ肺を用いた先進医学解析により、ヒトのポリマー肺の特徴である「広義間質 (軸位間質や小葉間隔壁)」の線維化部位において、PI16 陽性の外膜線維芽細胞系譜が「病的ニッチ」として高度に集積・動員されていることを世界で初めて空間的に実証した。特にこれら外膜由来系譜が病変形成の中心に存在するという知見は、難治性である職業性肺疾患の機序解明における極めて重要な進展である。

E. 結論

R7 年度の研究を通じ、以下の重要な知見を得た。

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。

以上の成果は、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を構築するための科学的基盤となるものであり、労働現場における呼吸器疾患の予防およびリスク管理の高度化に大きく寄与することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Otsuka A, Shimazoe MA, Watanabe S, Minami K, Tamura S, Kiyono T, Takeshita F, Maeshima K. Single-nucleosome imaging uncovers biphasic chromatin dynamics in inducible human transformed cells. *Cell Struct Funct.* 2026 Feb 7;51(1):37-53.
- 2) Yamano S, Schaudien D, Umeda Y. The Pneumoconiosis Renaissance: Revisiting the Pulmonary Pathology of Poorly Soluble Low Toxicity Particles: Insights from Rodent Inhalation Studies on Titanium Dioxide Nanoparticles. *Nanomaterials.* 2026 Feb 16(4):230.
- 3) Mizuno S, Teshima N, Yokota T, et al. Genetic diversity and evolutionary relationships of porcine astroviruses from wild boars and domestic pigs in Japan. *Infect Genet Evol.* 2026 Jan;137:105875.
- 4) Vachiraarunwong A, Fujioka M, Alexander DB, et al. Developing a novel in vitro toxicity assay for predicting inhalation toxicity in rats. *Toxicol Lett.* 2026 Jan;415:111803.
- 5) Maeda-Tateishi T, Nagata Y, Imanishi Y, et al. Evaluation of tumor clonality with chemical carcinogenesis in a mouse model of visualized X chromosome inactivation. *J Toxicol Pathol.* 2026 Jan;39(1):31-38.
- 6) Bai L, Takahashi M, Kobayashi J, et al. Engineering Immortalized Bovine Granulosa Cells Using a Triple-Gene Approach: Mutant CDK4, Cyclin D1, and TERT. *Cell Biology International.* 2026 Jan 21: 50(2) e70126.

- 7) Kawada Y, Kazama K, Aihara N, et al. A calf with concurrent infantile hemangioma and coronary artery fistula: notes on simultaneous onset. *J Vet Med Sci*. 2026.
- 8) Yamano S, Sadakane K, Ichinose T, Umeda Y, Maki T. Mouse pulmonary pathological characteristics induced by Asian-mineral dust transported with *Coniothyrium fuckelii* at a high altitude of 2,000 meters. *Sci Rep*. 2025 Dec 8;16(1):1507.
- 9) Otsuka A, Shimazoe M, Watanabe S, et al. Single-nucleosome imaging uncovers biphasic chromatin dynamics in inducible human transformed cells. *Cell Struct Funct*. 2025 Dec 23.
- 10) Gi M, Suzuki S, Saleh DM, et al. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats. *Nanomaterials (Basel)*. 2025 Nov 29;15(23):1806.
- 11) Wu B, Shichino S, Ueha S, et al. Ex vivo lung-organoid model for aberrant basaloid cell induction and activation. *Inflamm Regen*. 2025 Oct 30;45(1):33.
- 12) Uchida Y, Mizukawa M, Kamiya Y, et al. DAPI as a novel fluorochrome for amyloid staining that binds to β -pleated sheet. *Biotech Histochem*. 2025 Oct;100(7):440-449.
- 13) Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander DB, et al. Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment. *J Appl Toxicol*. 2025 Oct 9.
- 14) Shiga T, Kakinuma Y, Takada M, et al. Chronic bronchitis and bronchiolitis with prominent globule leukocyte infiltration in a cat with *Filobacterium felis*. *Vet Pathol*. 2025 Sep;62(5):762-766.
- 15) Guo R, Gi M, Kiyono T, et al. Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in Toxicity Assessment of Arsenicals. *Toxics*. 2025 Sep 29;13(10):828.
- 16) Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, et al. Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs. *Nanomaterials (Basel)*. 2025 Sep 11;15(18):1402.
- 17) Yamaji M, Nakahara T, Nakanishi T, et al. Disruption of Human Papillomavirus 16 E6/E7 Genes Using All-in-One Adenovirus Vectors Expressing Eight Double-Nicking Guide RNAs. *Int J Mol Sci*. 2025 Sep 5;26(17):8685.
- 18) Kakehashi A, Suzuki S, Nishidoi Y, et al. The Impact of Peroxiredoxin 3 on Molecular Testing, Diagnosis, and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*. 2025 Jul 1;17(13):2212.
- 19) Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Sato K, et al. Chemopreventive Effects of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae Protein Hydrolysates in a Rat Model of Early-Stage Colorectal Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2025 Jun 20;26(13):5955.
- 20) Uchibori Y, Suekuni M, Kokaji Y, et al. AmNA-Modified Antisense Oligonucleotide Targeting MCM8 as a Cancer-Specific Chemosensitizer for Platinum Compounds. *Cancer Sci*. 2025 May;116(5):1405-1416.
- 21) Yamano S, Umeda Y. Fibrotic pulmonary dust foci is an advanced pneumoconiosis lesion in rats induced by titanium dioxide nanoparticles in a 2-year inhalation study. Part Fibre Toxicol. 2025 Apr 18;22(1):7.
- 22) Umeda Y, Izawa T, Kazama K, et al. Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in mammals. *J Toxicol Pathol*. 2025 Apr;38(2):113-129.
- 23) Inoko A, Soga N, Suzuki M, et al. Long-term expansion of basal cells and the novel differentiation methods identify mechanisms for switching Claudin expression in normal epithelia. *Sci Rep*. 2025 Apr 9;15(1):12172.
- 24) Noura I, Suzuki S, Gi M, et al. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J Toxicol Pathol*. 2025 Apr;38(2):147-154.
- 25) Turner MC, Godderis L, et al. Carcinogenicity of automotive gasoline and some oxygenated gasoline additives. *Lancet Oncol*. 2025 Mar 20.
- 26) Mineshige T, Takagi S, Shiga T, et al. Acanthomatous ameloblastoma with mucinous glandular differentiation in a dog. *J Vet Med Sci*. 2025 Feb 4;87(2):194-197.
- 27) Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Taya S, et al. Anticancer and Antioxidant Effects of Bioactive Peptides from Black Soldier Fly Larvae. *Nutrients*. 2025 Feb 11;17(4):645.
- 28) Mizukawa M, Tanaka K, Kashimura A, et al. Identification and characterization of spontaneous AA amyloidosis in CD-1 mice used in toxicity studies. *J Toxicol Pathol*. 2025 Jan;38(1):69-82.
- 29) Nakano M, Gi M, Toyooka T, et al. Occupational health topics series on the effects of chemicals: risk assessments of ortho-toluidine for bladder cancer. *J Occup Health*. 2025 Jan 7;67(1).
- 30) Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, et al. Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J Toxicol Pathol*. 2025 Jan;38(1):59-67.
- 31) Ushida K, Kamiie J, Kazama K, Onda K, Arai S. Therapeutic effects of platelet-rich plasma on cartilage in experimental swine models of leg weakness. *J Vet Med Sci*. 2025.
- 32) Kachi E, Kazama K, Murakami M, Onda K. Opsin 3, encoding a non-visual photoreceptor, is a pseudogene in cattle. *Res Vet Sci*. 2025.

- 33) Kurumisawa T, Kazama K, Gondaira S, et al. Anti-inflammatory effects of glycyrrhizin on lipoteichoic acid and lipopolysaccharide-induced bovine mastitis. *Pol J Vet Sci*. 2025.
- ## 2. 学会発表
- 1) Suzuki S, Fujioka M, Qiu GY, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Gi M. Evaluation of the Hepatotoxic Effects of Various PFAS in a Short-Term Rat Study. Society of Toxicology 2026 Annual Meeting. 2026 Mar.
 - 2) Gi M, Vachiraarunwong A, Fujioka M, et al. A novel in vitro toxicology assay for predicting inhalation toxicity in rats. Society of Toxicology 2026 Annual Meeting. 2026 Mar.
 - 3) 窪谷 菜々子, 志賀 崇徳, 成毛 淳人, 相原 尚之, 上家 潤一. ウサギにおける巨細胞の出現を伴う悪性毛包上皮腫の一例. 第13回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026年3月.
 - 4) 田中 志朋, 丹生 早耶, 相原 尚之, ほか. 牛伝染性リンパ腫ウイルス感染牛のFALCにおいてウイルスとIL-5の共刺激がB-1a細胞の腫瘍化を誘導する. 第13回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026年3月.
 - 5) 池永 恭, 志賀 崇徳, 柿沼 陽子, ほか. 猫の肺生検組織におけるCARパチルスの検出およびglobule leukocyteの免疫表現型の解析. 第13回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026年3月.
 - 6) 岡村 さくら, 志賀 崇徳, 相原 尚之, ほか. 家畜ブタの心臓における加齢に伴う病理組織学的変化. 第13回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026年3月.
 - 7) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 上空由来植物病原菌・黄砂の複合曝露が誘導する肺病理像の再定義. 第17回大気バイオエアロゾルシンポジウム. 2026年2月.
 - 8) 郭 潤傑, Arpamas V, 鈴木 周五, ほか. Oncomodulin as an early marker in rat models of urinary bladder carcinogenesis. 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会. 2026年2月.
 - 9) 河村 百合菜, Arpamas V, 藤岡 正喜, ほか. ヒト肺腺がん由来細胞株A549を用いたニュートラルレッドアッセイによる化学物質吸入毒性のin vitro代替評価法の開発. 第42回日本毒性病理学会総会. 2026年1月.
 - 10) Himari Matsusaka, Eiko Uno, et al. Functional characterization of immortalized human adipose-derived mesenchymal stem cells. 日本動物細胞工学会 2025年度大会. 2025年12月.
 - 11) 永根 大幹, 谷脇 優華, 藤原 優子, ほか. ガングリオシドGD3の欠損は骨格筋再生を遅延させる. 第98回日本生化学会大会. 2025年11月.
 - 12) 梅田 ゆみ, 山野 莊太郎. F344ラットにおける酸化チタンナノ粒子吸入暴露によるじん肺病変. 第73回日本職業災害・医学会学術大会. 2025年11月.
 - 13) Arpamas V, Shugo Suzuki, et al. Comparative hepatotoxicity of carboxylate and sulfonate per- and polyfluoroalkyl substances in immortalized human hepatocytes. 第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 2025年10月.
 - 14) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 産業衛生分野における次世代の健康影響基盤の創生. 日本産業衛生学会 第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 2025年10月.
 - 15) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 1細胞解像度で紐解く大動物肺疾患アトラスの創出. フォーラム 2025 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2025年9月.
 - 16) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 呼吸器疾患研究を加速させる先端モデル動物とは?. 先端モデル動物支援プラットフォーム 2025年度若手支援技術講習会. 2025年9月.
 - 17) Y Umeda, K Kazama, S Arai, J Kamiie, et al. Pioneering a Swine Platform for Cutting-Edge Pulmonary Disease Research. 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2025). 2025 Sep.
 - 18) 郭 潤傑, Arpamas V, ほか. DMH投与ラットにおける大腸発がん初期の遺伝子発現変動. 第84回日本癌学会学術総会. 2025年9月.
 - 19) 邱 桂鈺, 魏 民, ほか. カーボンナノチューブ誘発ラット肺発がんにおける物性の違いを踏まえた遺伝子発現変化の比較. 第84回日本癌学会学術総会. 2025年9月.
 - 20) Arpamas V, Shugo Suzuki, et al. Structure-Dependent Hepatotoxicity and Carcinogenic Potential of PFASs in Immortalized Human Liver Cells. 第84回日本癌学会学術総会. 2025年9月.
 - 21) 清野 透, 中原 知美, ほか. 8個のgRNAとCas9 nickaseを発現するアデノウイルスベクターによるがん細胞内でのHPV16のE6E7遺伝子破壊. 第84回日本癌学会学術集会. 2025年9月.
 - 22) 長谷川 舞瑠, ほか. Immortalization of Japanese Black Cattle derived myoblast with expression of cell cycle regulators. 日本畜産学会 第133回大会. 2025年9月.

- 23) 皆川 丈和, ほか. ミニチュアダックスフント由来線維芽細胞に対するプレドニゾロン処理が誘発する遺伝子発現変化. 第 31 回日本野生動物医学会大会. 2025 年 9 月.
- 24) 松倉 華美, ほか. 四国のツキノワグマ線維芽細胞の無限分裂化. 第 31 回日本野生動物医学会大会. 2025 年 9 月.
- 25) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 大型動物×先進医学解析技術による職業性肺疾患研究の新展開. 第 13 回日本繊維状物質研究学術集会. 2025 年 8 月.
- 26) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 二酸化チタンナノ粒子で誘発される齧歯類のじん肺病変. 第 42 回エアロゾル科学・技術研究討論会. 2025 年 8 月.
- 27) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 1 細胞解像度で紐解く大型動物肺疾患アトラスの創出. 第 38 回発癌病理研究会. 2025 年 8 月.
- 28) Arpamas V, 魏 民, ほか. ラットの急性吸入毒性を予測する新規 in vitro 毒性試験系の開発. 第 52 回日本毒性学会学術年会. 2025 年 7 月.
- 29) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. ミニブタモデルで職業性肺疾患を科学する. 第 98 回日本産業衛生学会. 2025 年 5 月.
- 30) 鈴木 周五, 魏 民, ほか. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん. 第 114 回日本病理学会総会. 2025 年 4 月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

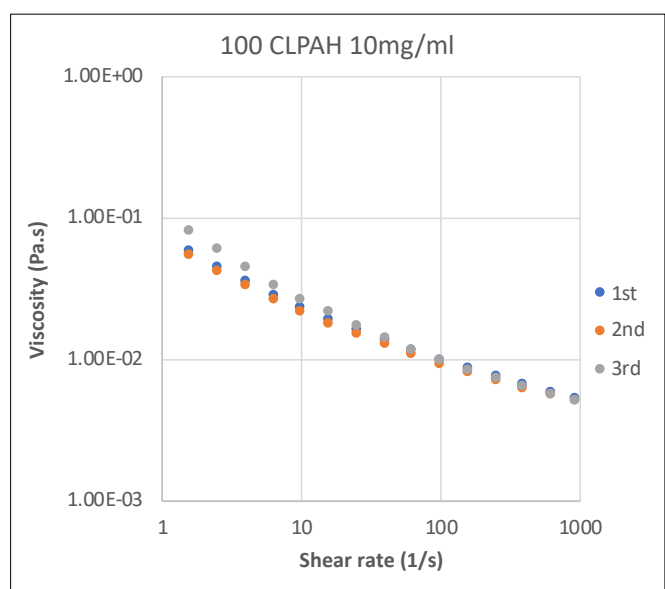
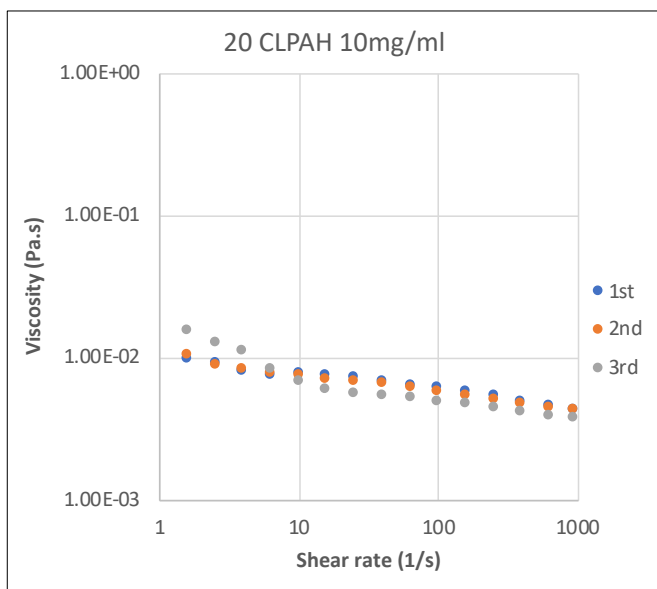
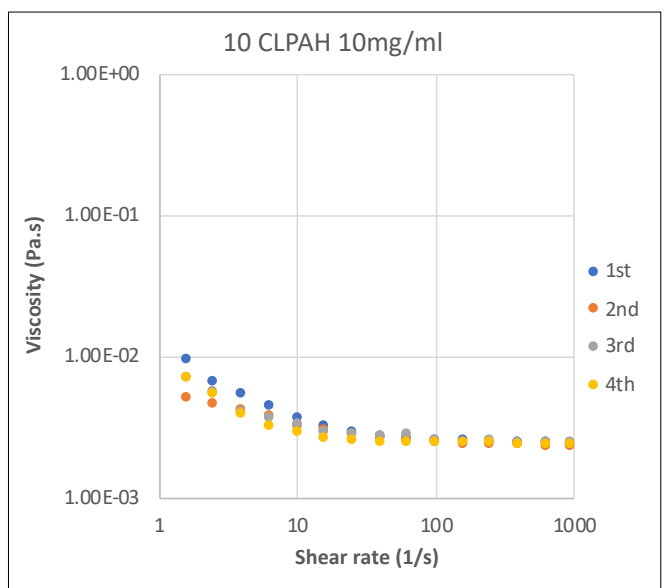
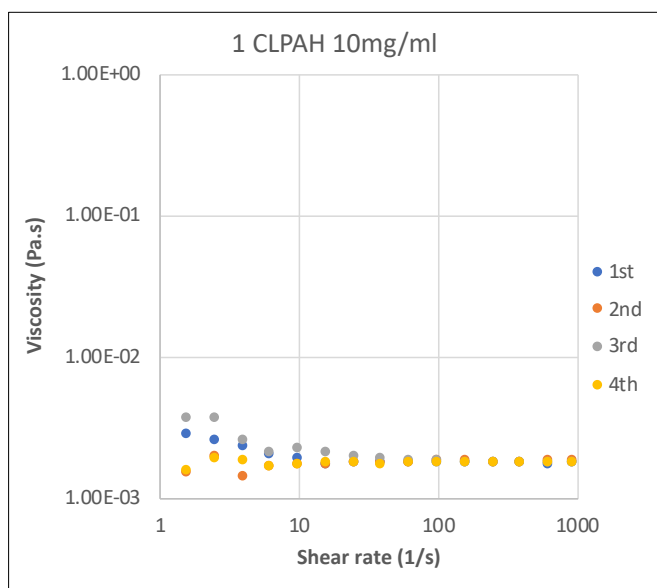
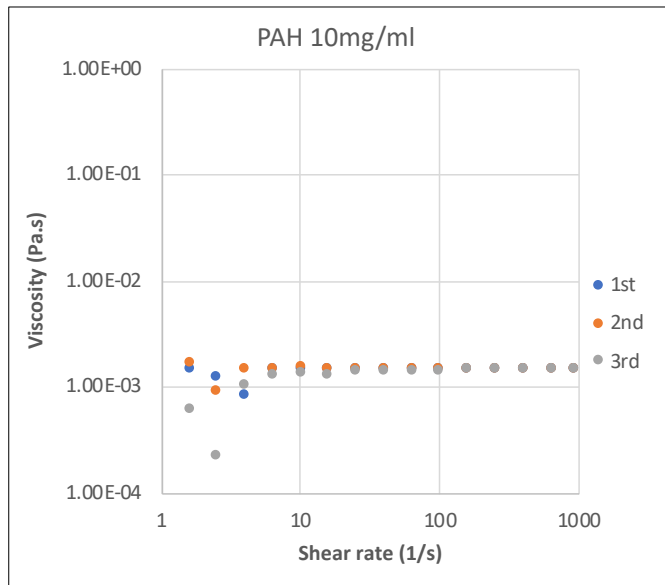
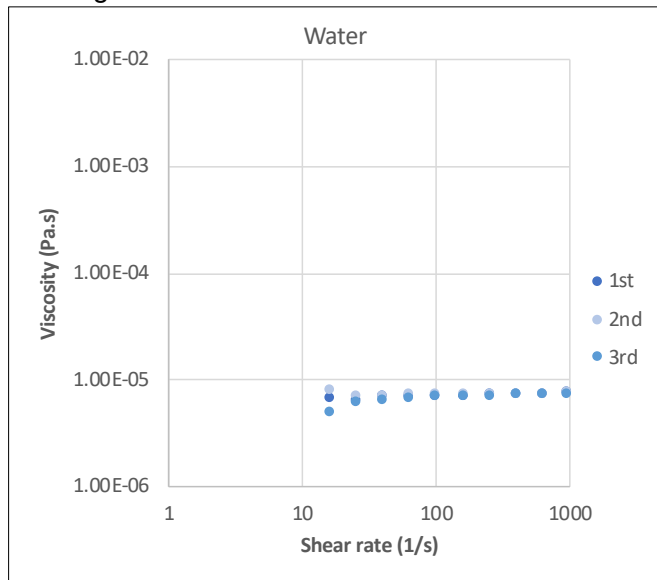
該当なし

3. その他

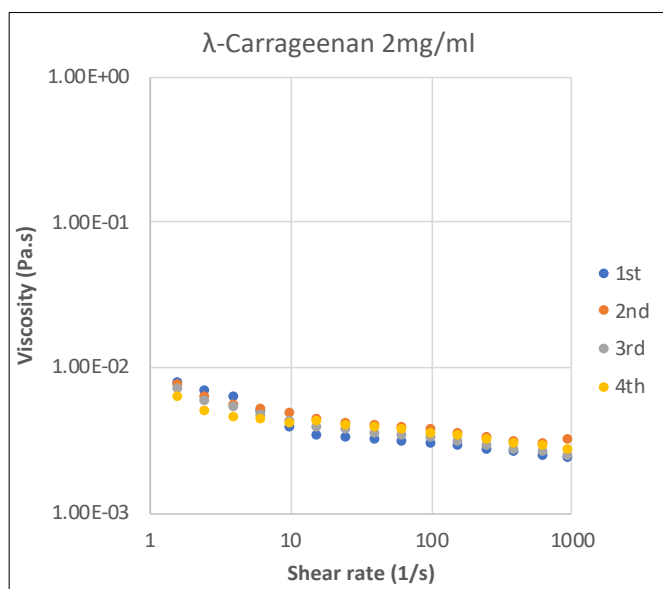
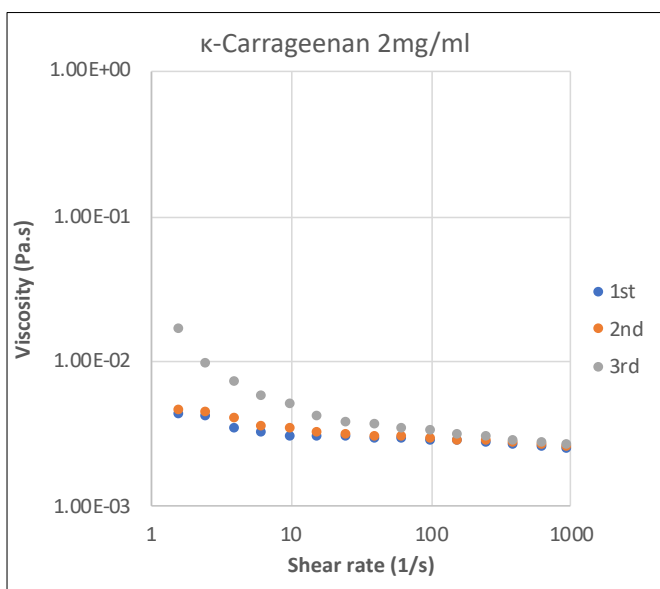
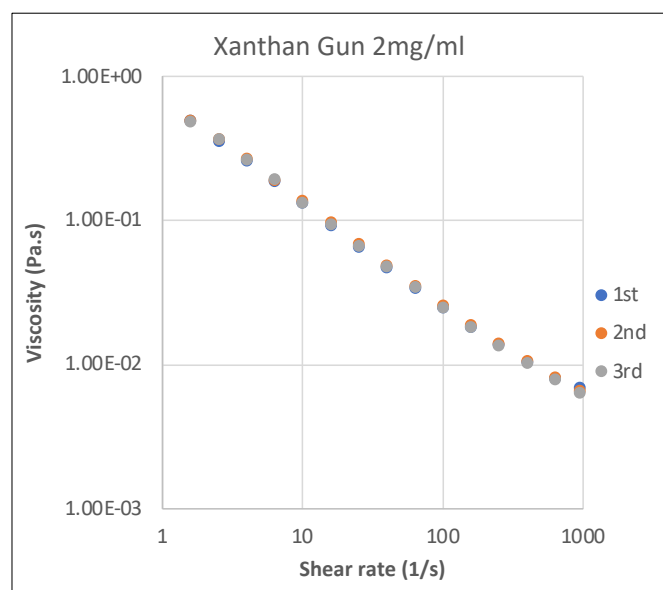
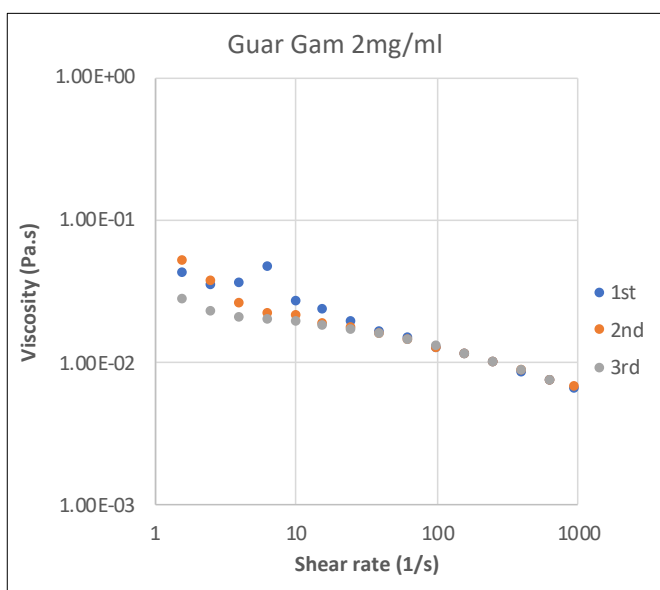
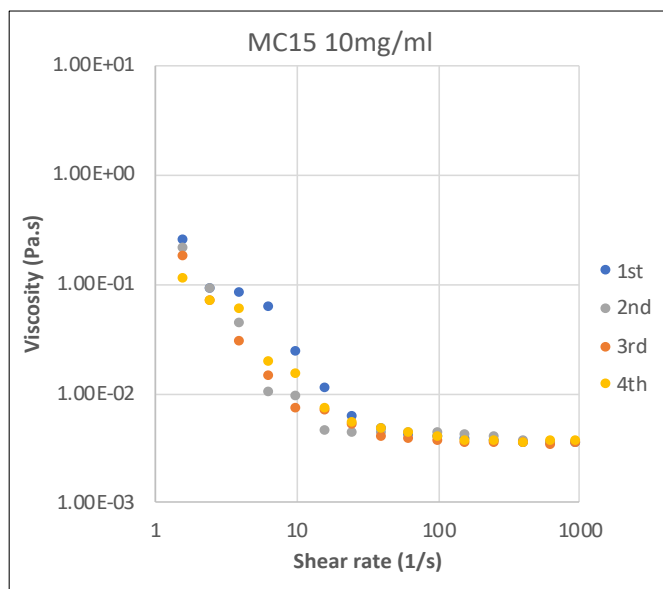
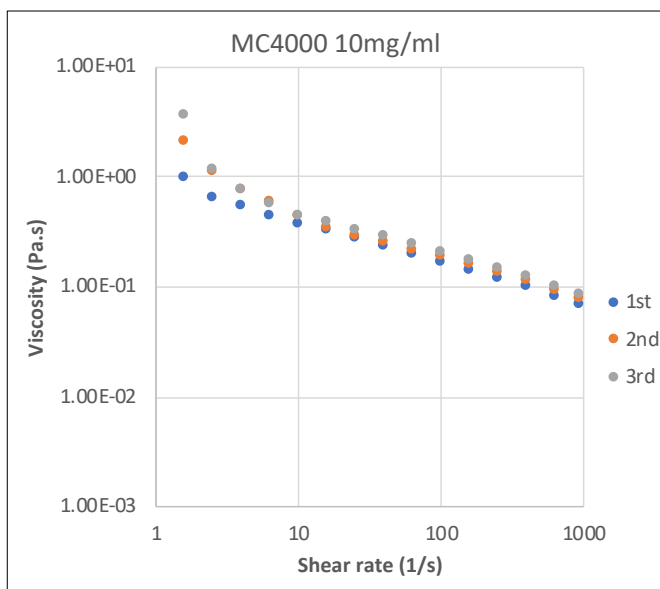
該当なし

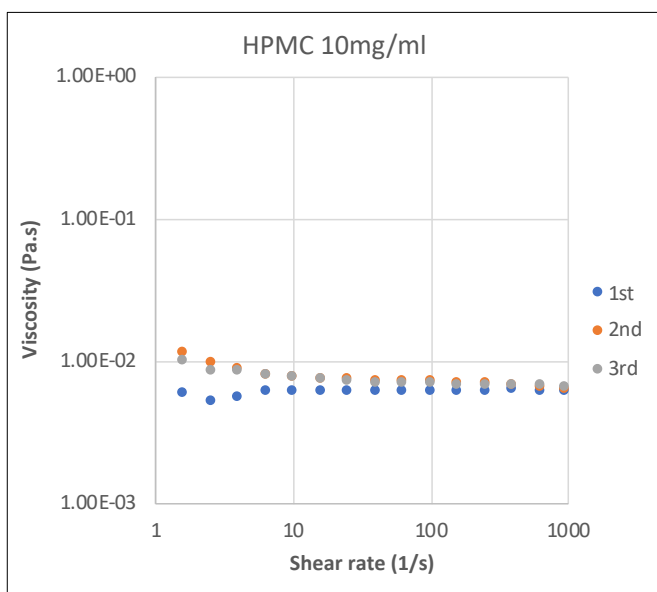
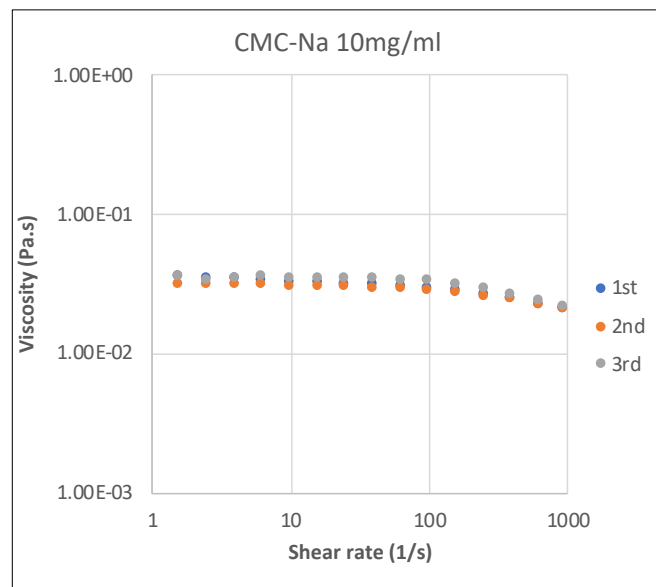
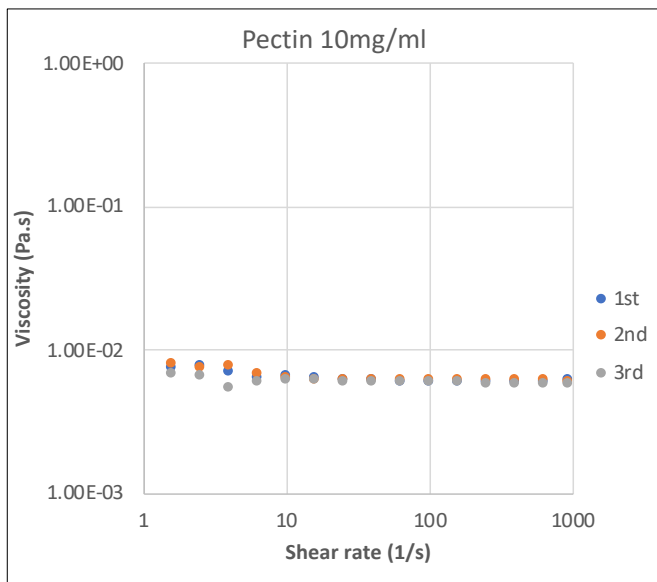
別紙 1

Rheological measurement



次ページに続く





別紙 2

Immortalized human lung cells: HLCs2N cells

Cell line	Construction
HLCs2N-T	TERT
HLCs2N-K4DT	TERT/ CDK4R24C + Cyclin D1
HLCs2N-K4T	TERT/ CDK4R24C
HLCs2N-Tet-K4DT	TERT/ EpCAM promoter-TetOff (CDK4R24C + Cyclin D1)
HLCs2N-Tet-K4T	TERT/ EpCAM promoter-TetOff (CDK4R24C)

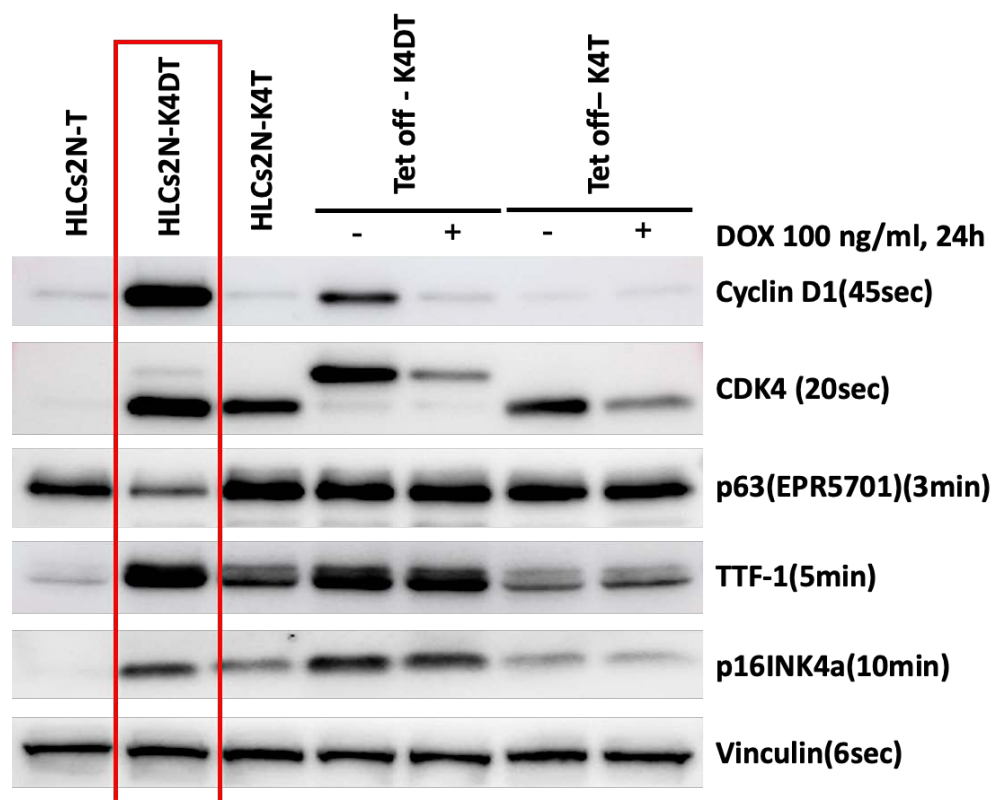


Figure 1. Characterization of HLCs2N-K4DT cells by Western blot analysis.

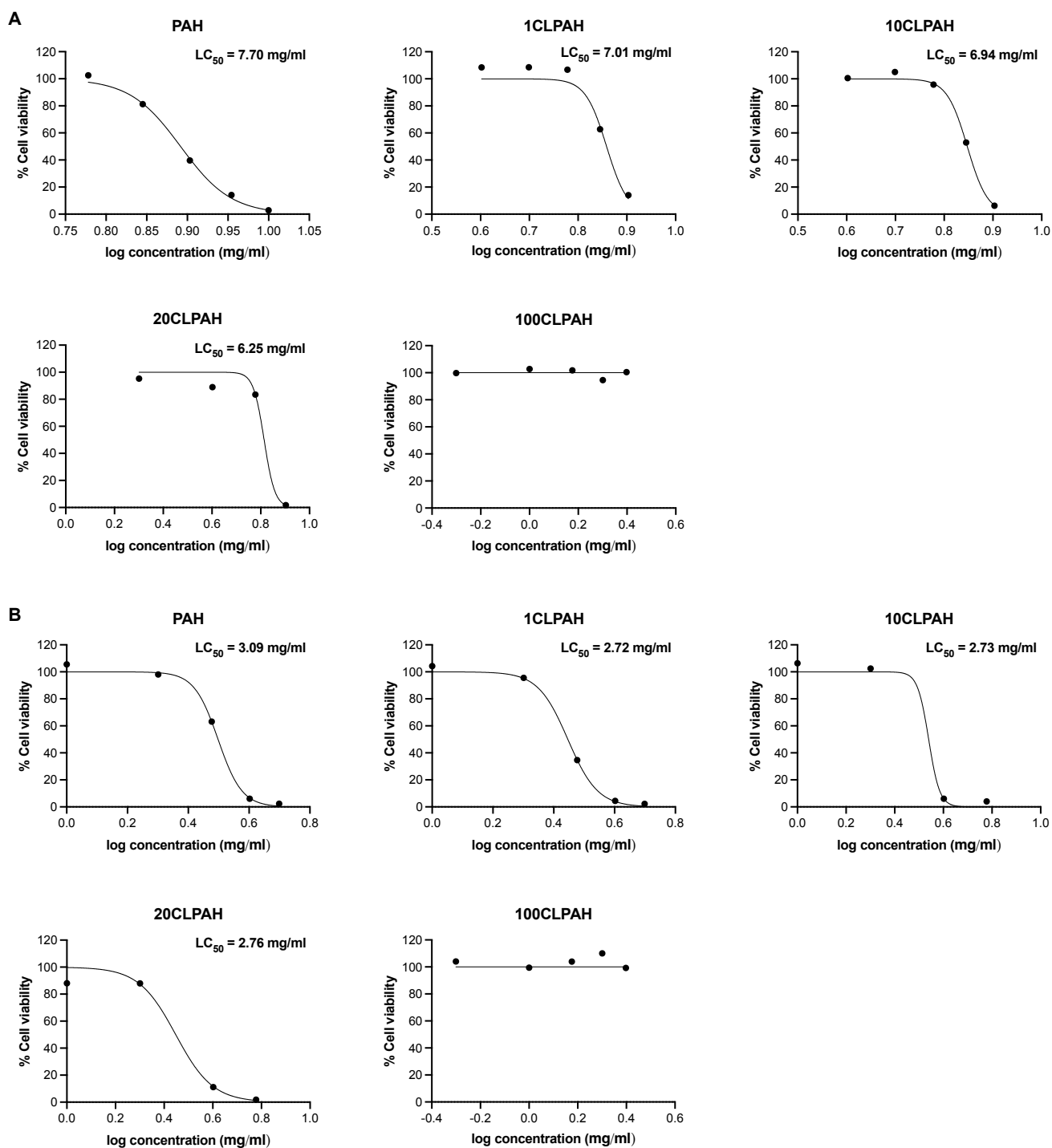


Figure 2. Dose–response curves and LC₅₀ values of all tested chemicals in (A) human lung adenocarcinoma cells (A549) and (B) immortalized human lung cells (HLCs2N-K4DT).

Table 1. Cytotoxicity of PAH and CLPAH in A549 and HLCs2N-K4DT cells

Chemicals	A549 cells		HLCs2N-K4DT cells	
	Concentration range (mg/ml) ^a	LC ₅₀ (mg/ml)	Concentration range (mg/ml) ^a	LC ₅₀ (mg/ml)
PAH	6 – 10	7.70	1 – 5	3.09
1 CLPAH	4 – 8	7.01	1 – 5	2.72
10 CLPAH	4 – 8	6.94	1 – 6	2.73
20 CLPAH	2 – 8	6.25	1 – 6	2.76
100 CLPAH	0.5 – 2.5	> 2.50*	0.5 – 2.5	> 2.50 [#]

^a Concentration range used for calculation of LC₅₀.

* Cell viability at 2.5 mg/mL was 100.4%.

[#] # Cell viability at 2.5 mg/mL was 99.3%.

PAH: polyacrylic acid, CLPAH: cross-linked polyacrylic acid.

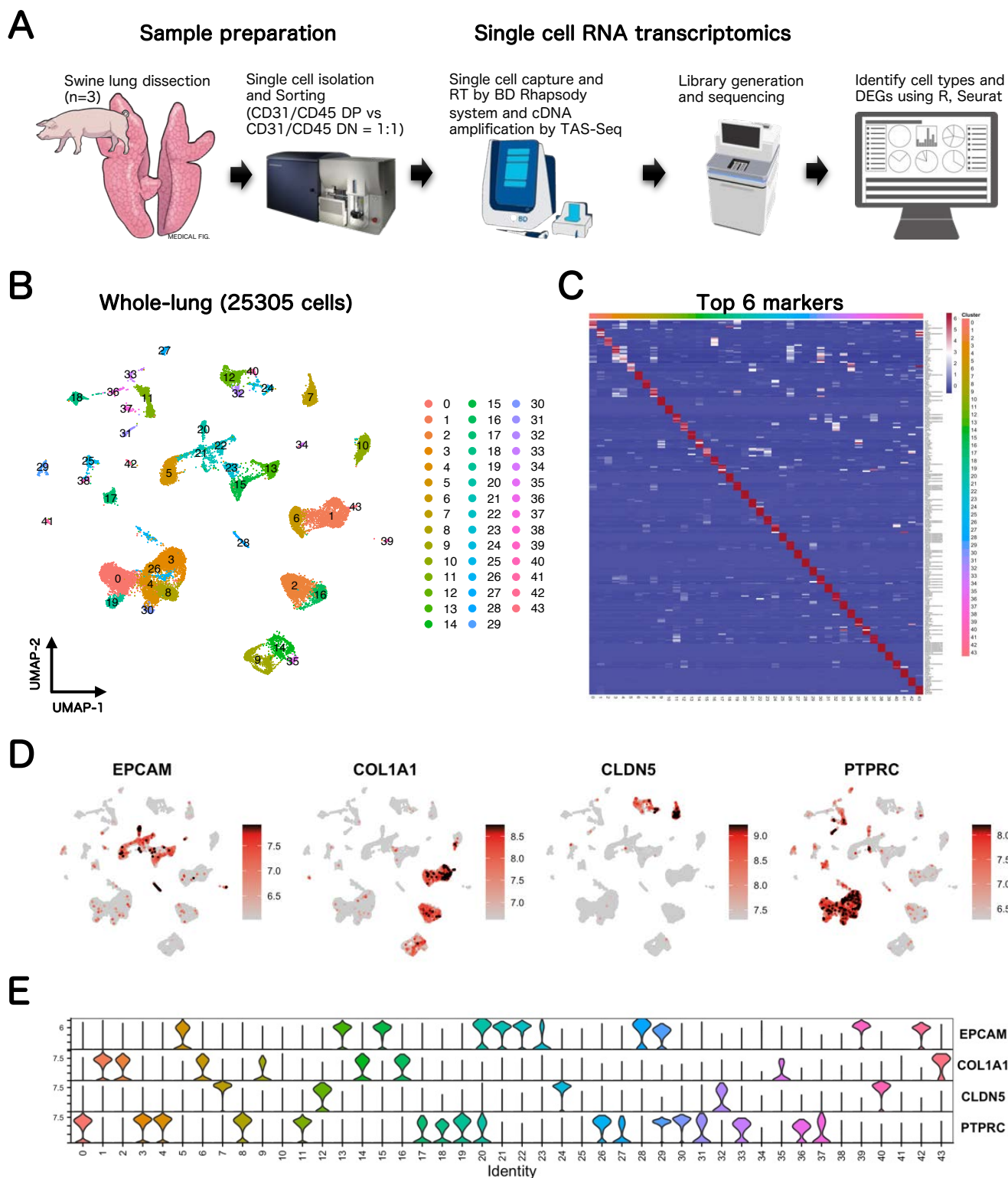


図1 正常マイクロミニピッグ肺の1細胞解析概要

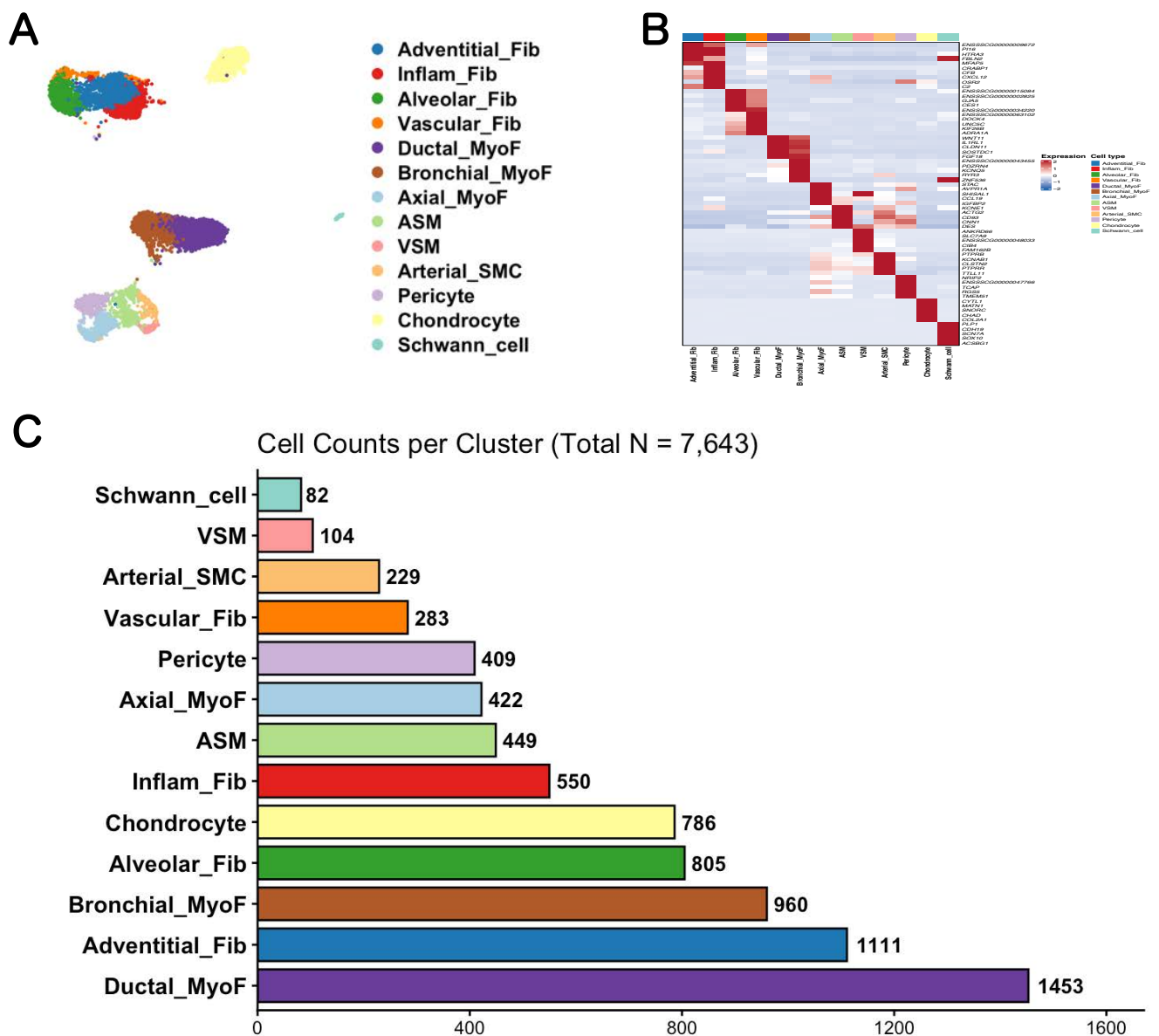
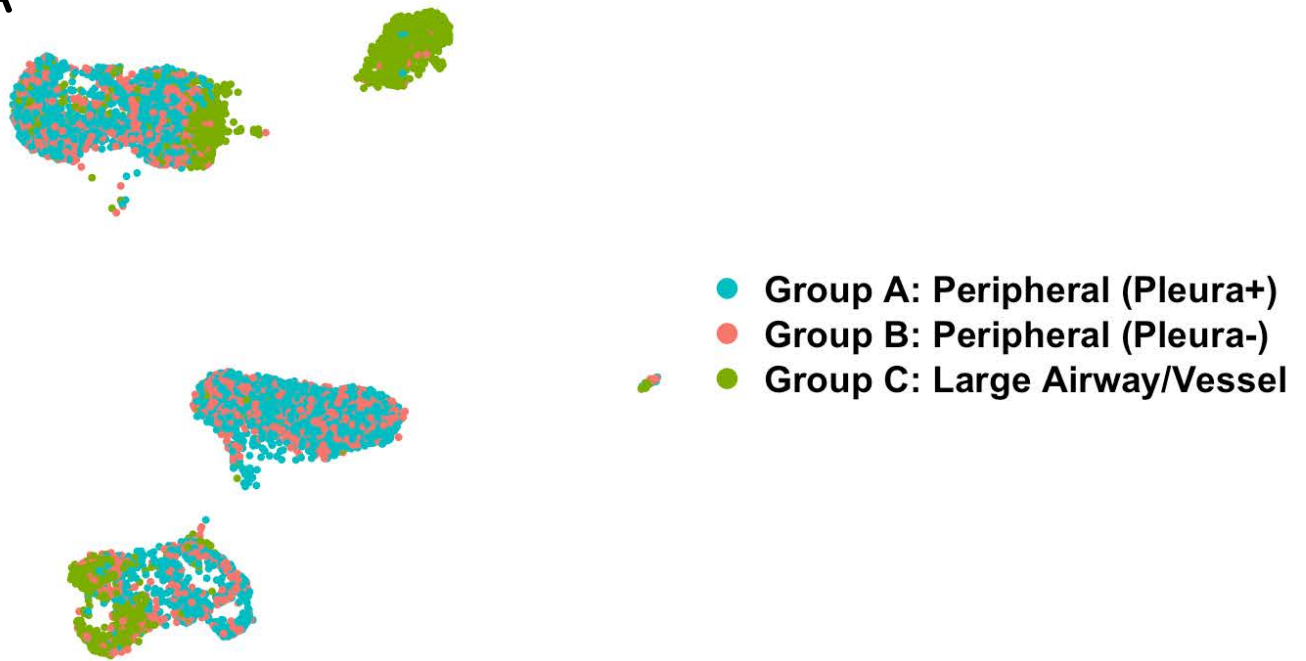
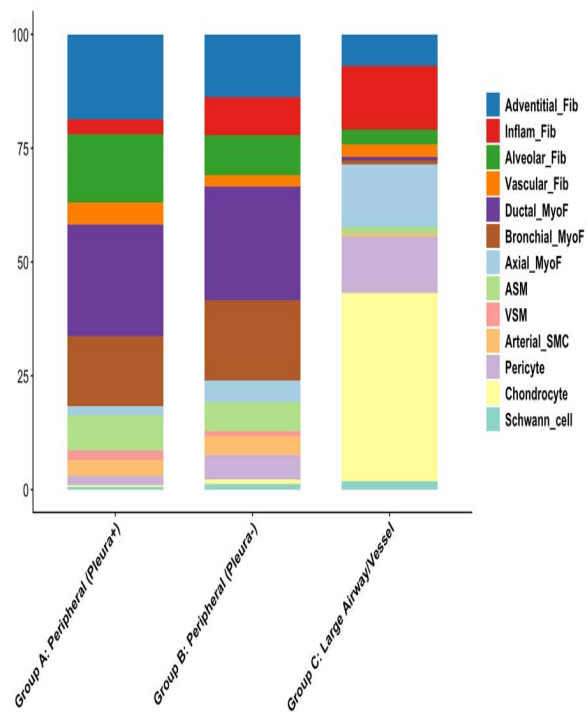


図2 COL1A1陽性細胞のSub-Clustering解析結果の概要

A



B



C

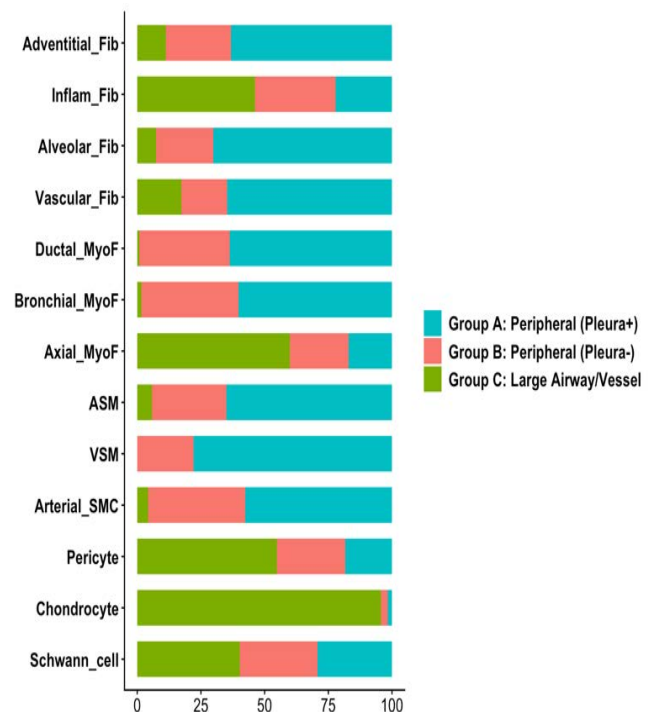


図3 サンプル領域ごとの割合

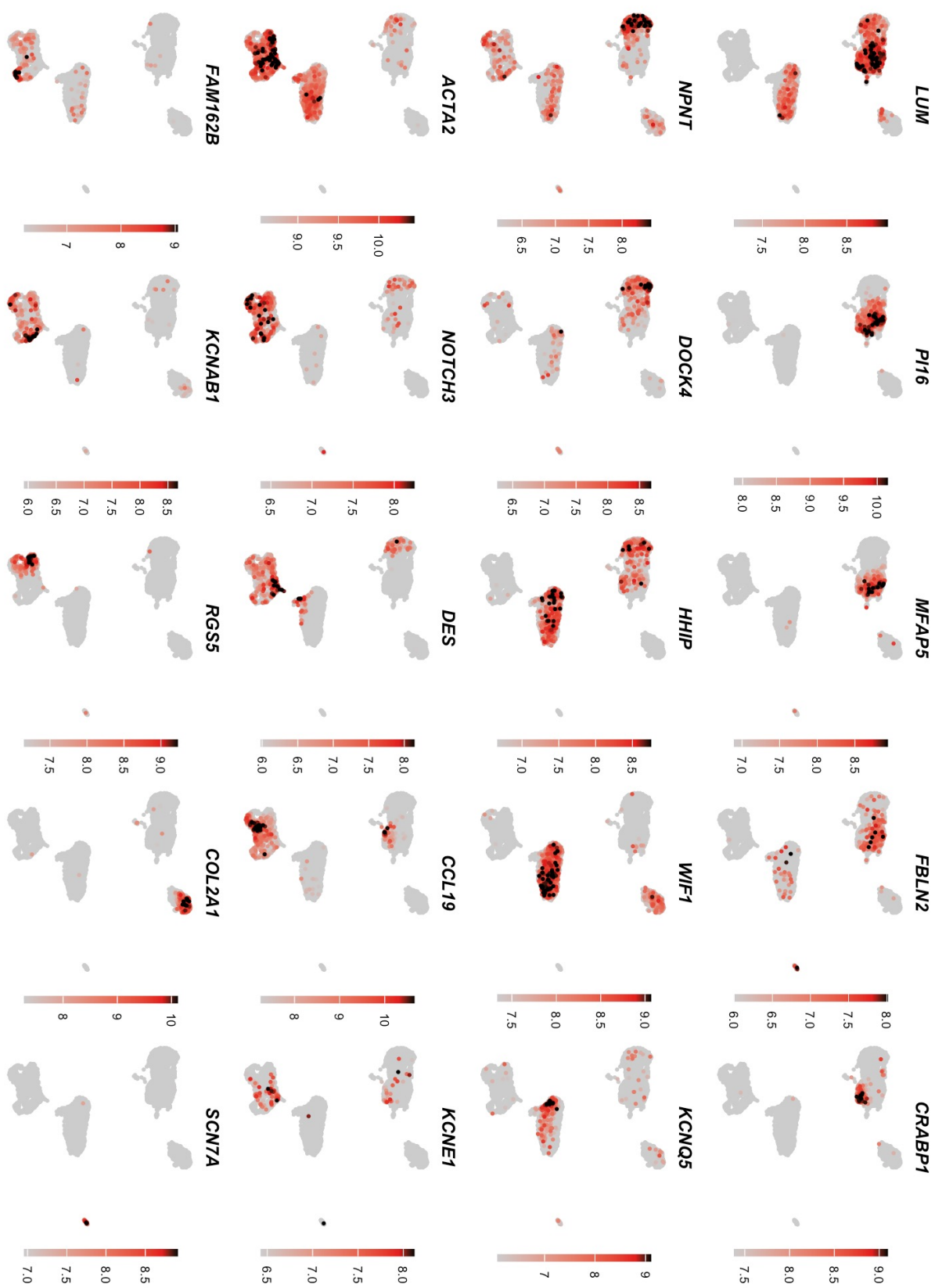


図4 マーカー遺伝子を用いたFeaturePlot

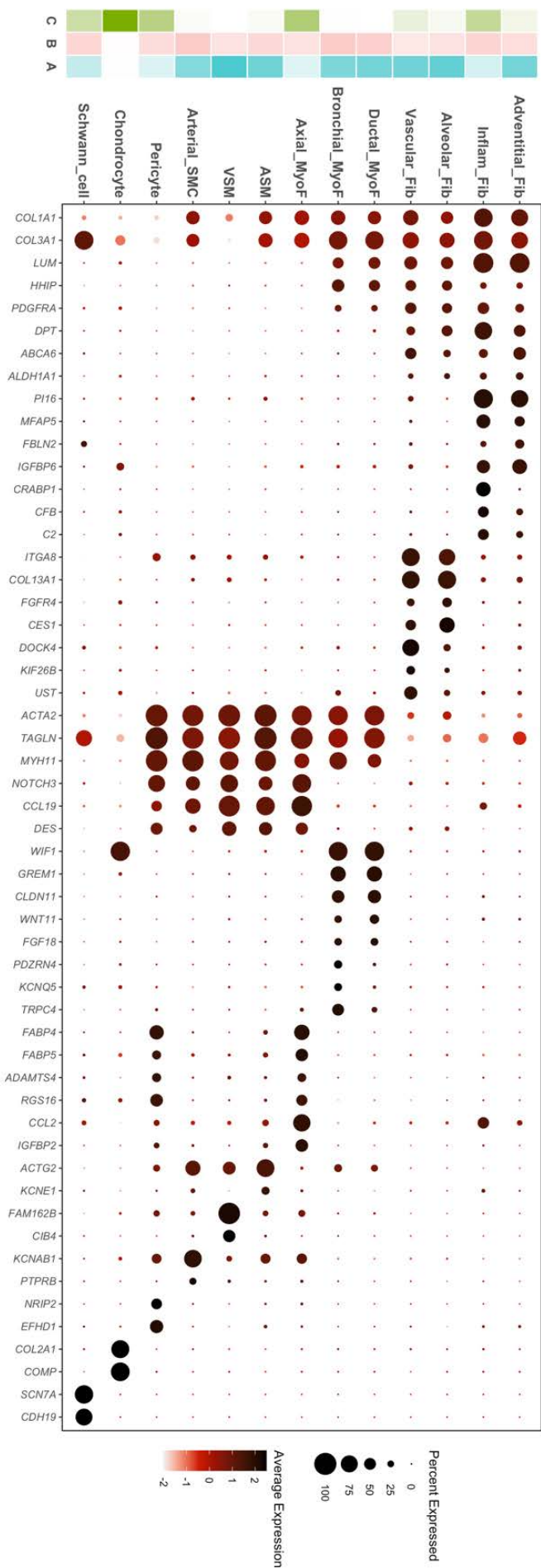
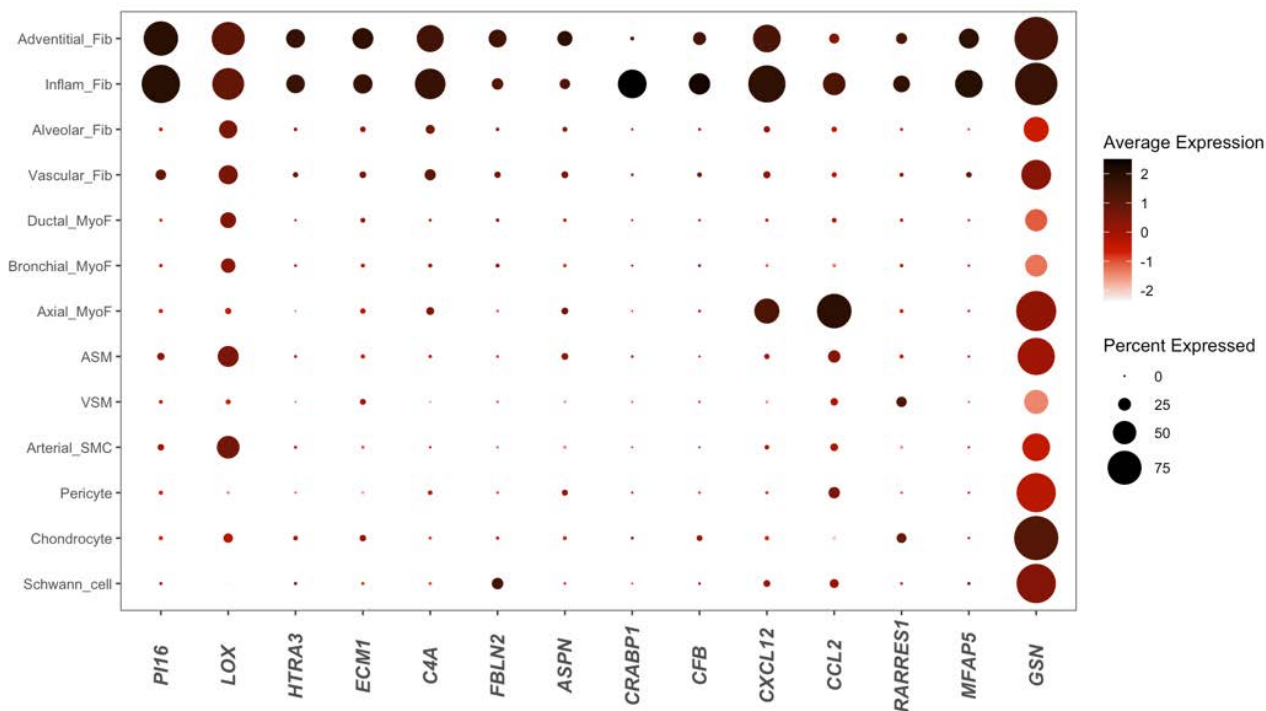


図5 マーカー遺伝子を用いたDotplot

A



B

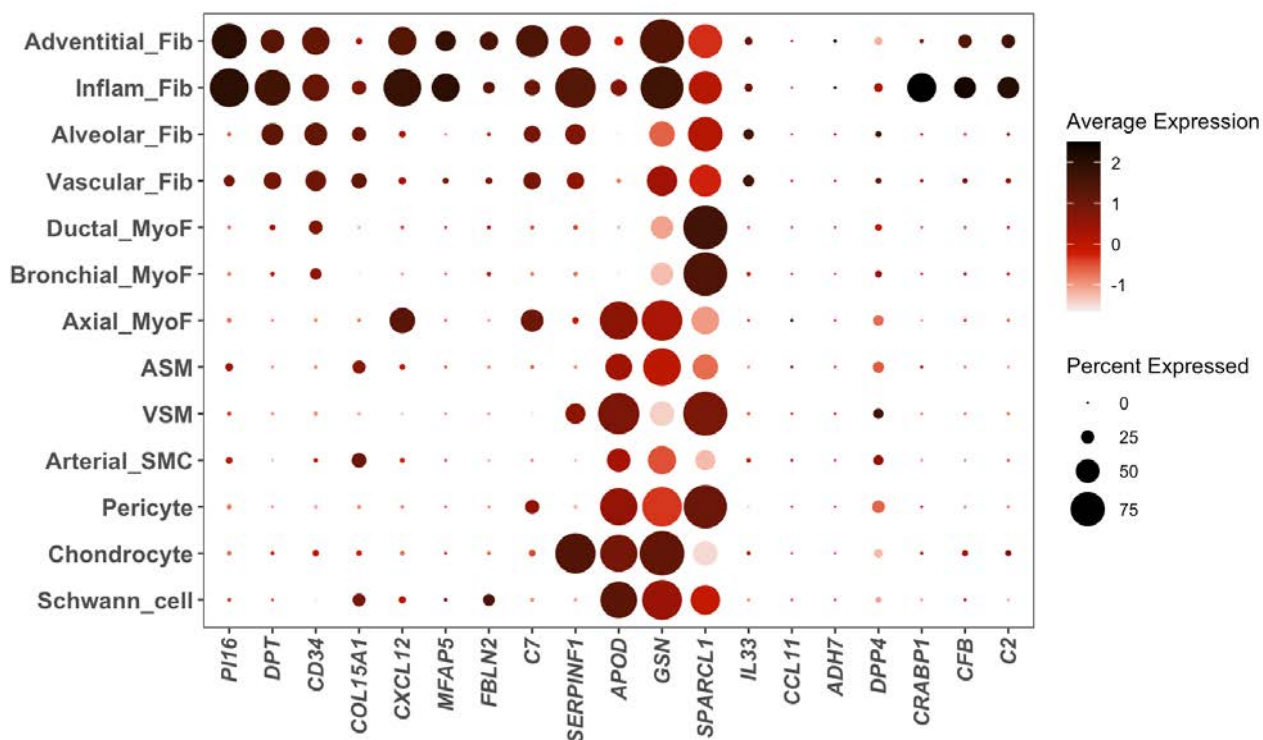


図6 AdvF/InflamFの遺伝子シグネチャー特徴

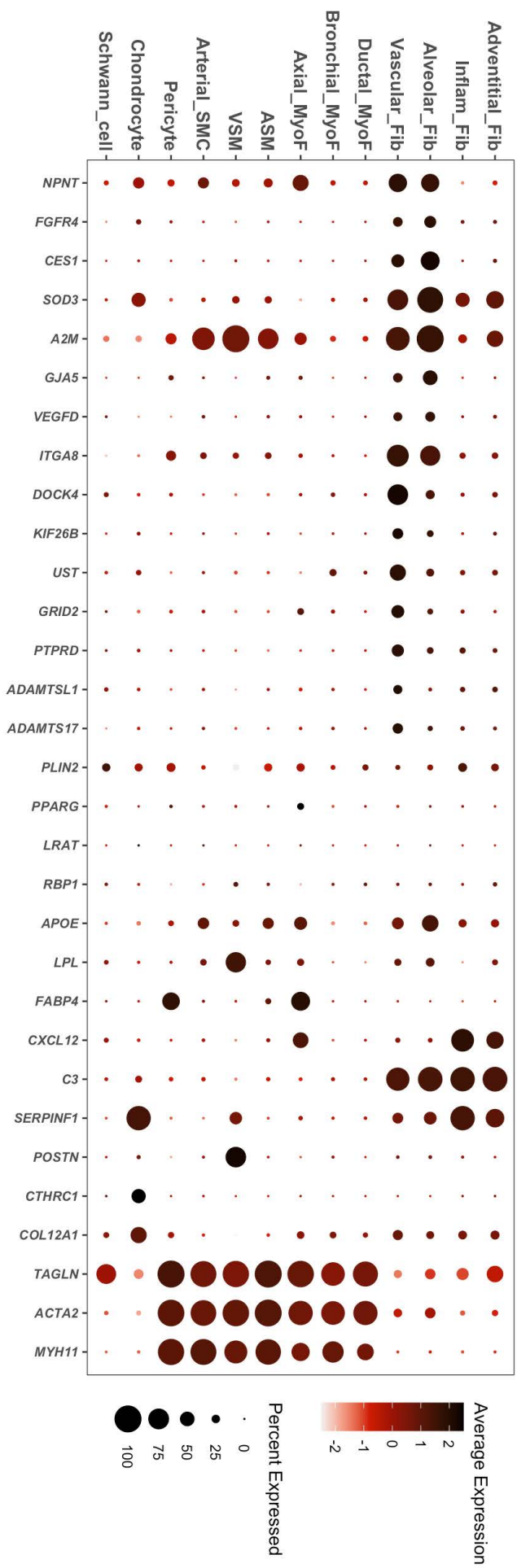


図7 AlVFの遺伝子シグネチャー特徴

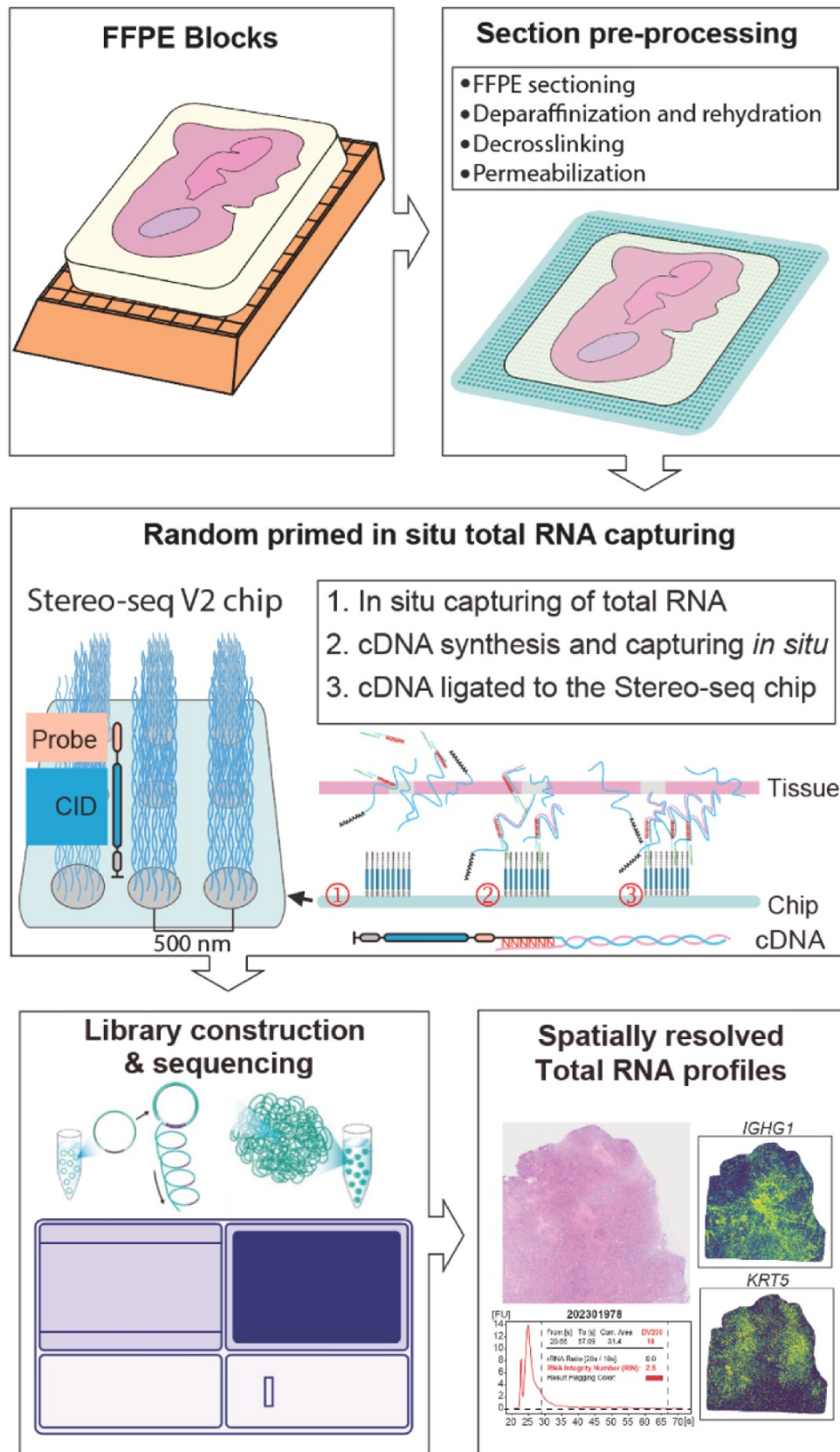


図8 Stereo-Seq OMNIのワークフロー

(出典: Li, Z., et al. (2025). *Cell*, 188(23), 6554-6571.e21.
doi:10.1016/j.cell.2025.08.008 より引用/改変)

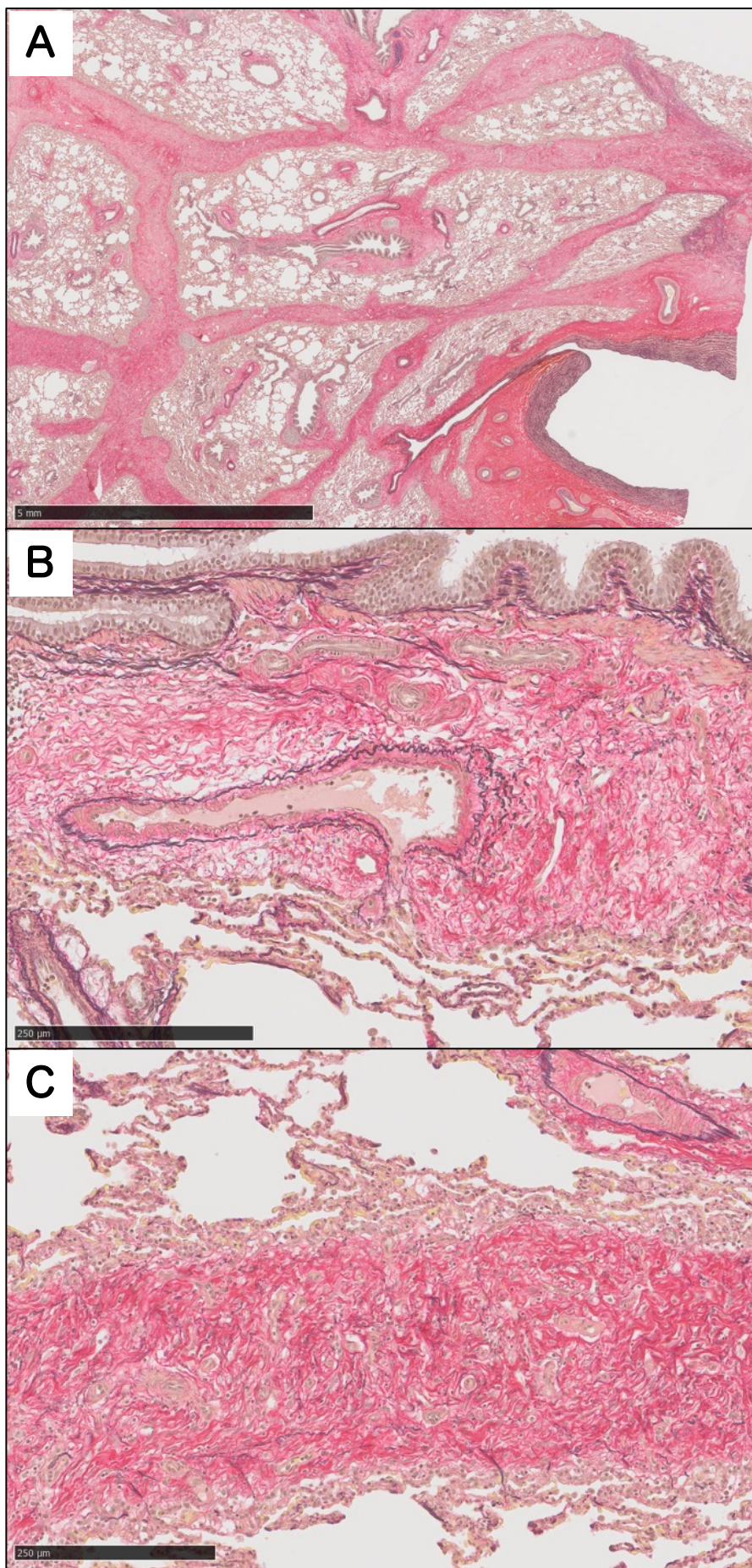
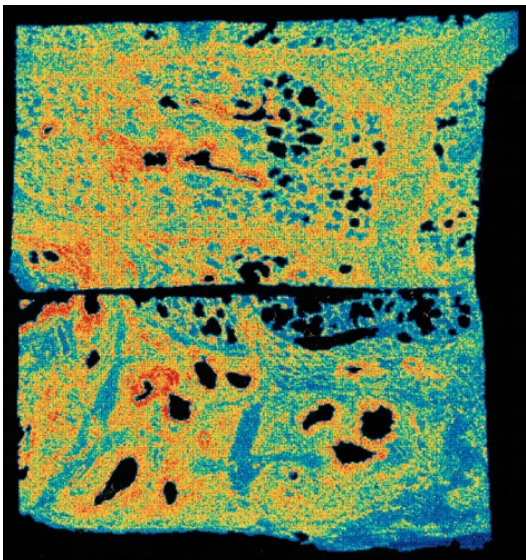
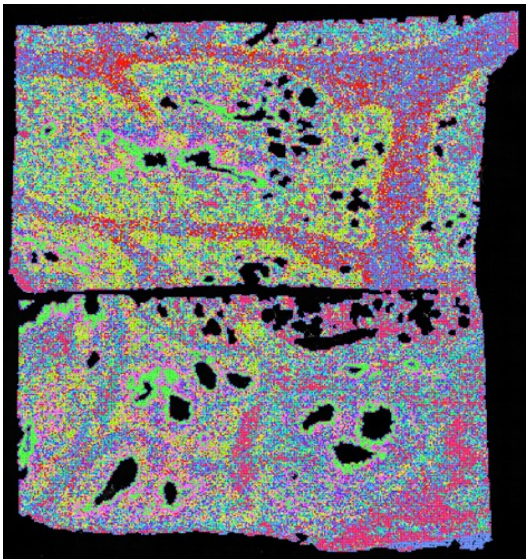


図9 広義間質病変のEVG染色

遺伝子発現量



クラスター解析



クラスター1の局在

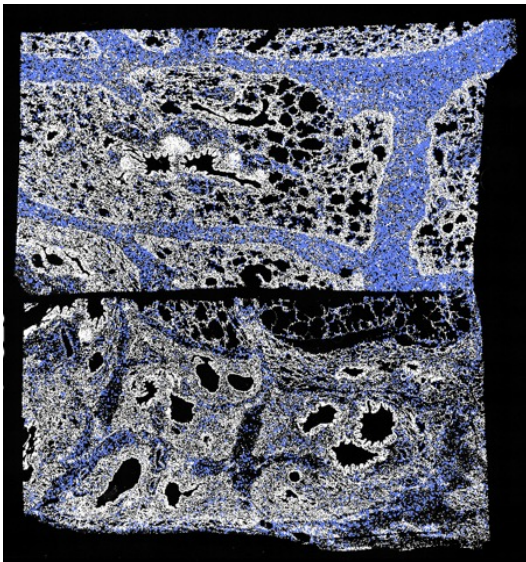
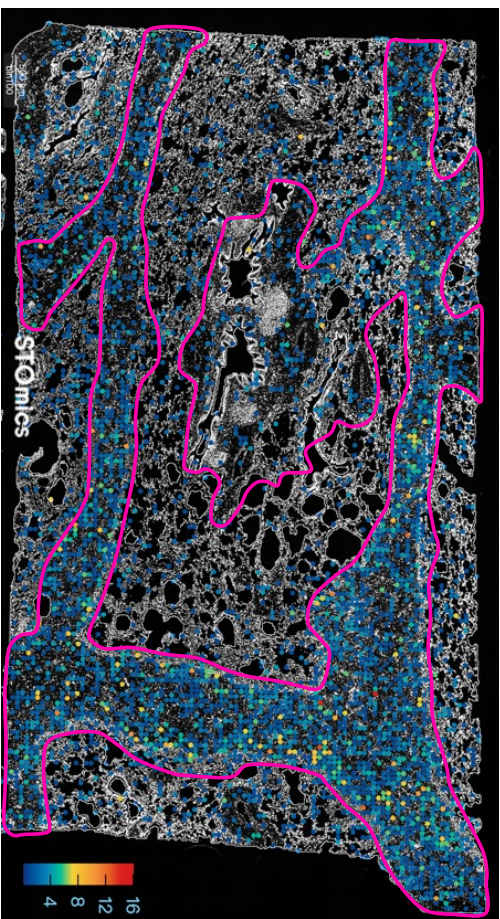
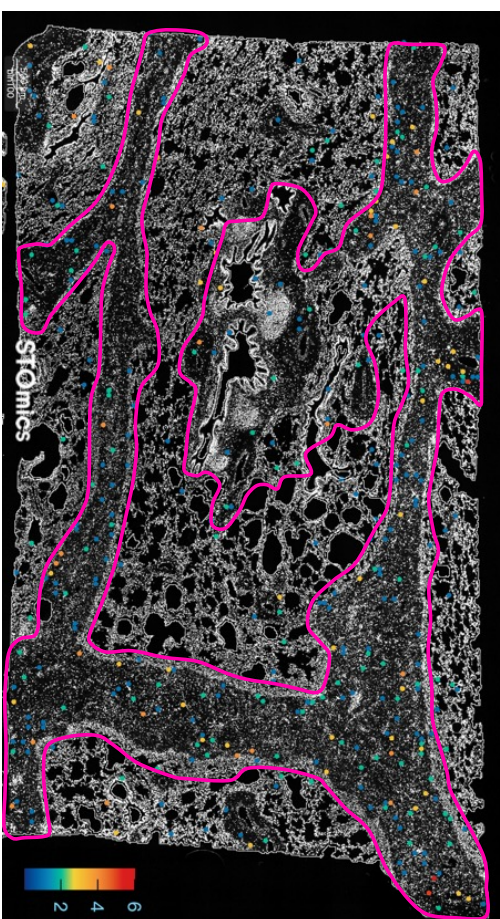


図10 CWAAP誘発ブタ広義間質病変の空間オミクス結果

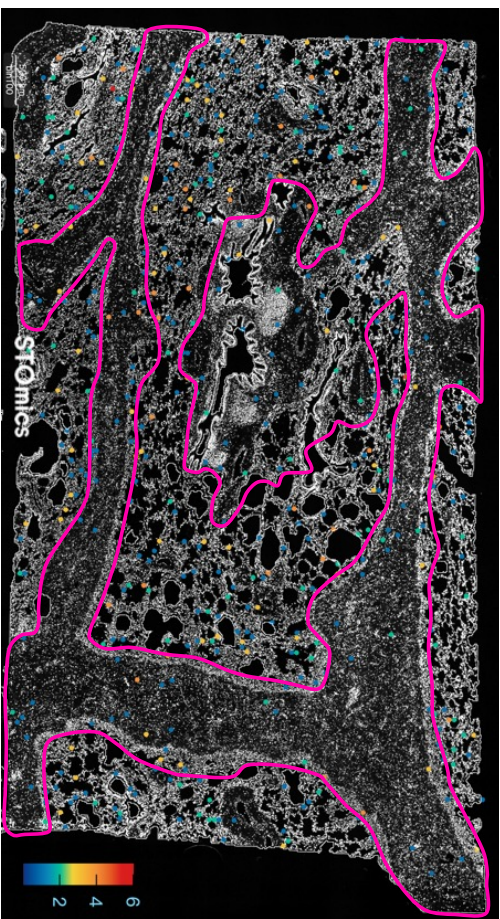
線維化マーカー (COL3A1)



Advマーカー (P116)



Alveマーカー (COL13A1)



MyoF/SMC/Periマーカー (MYH11)

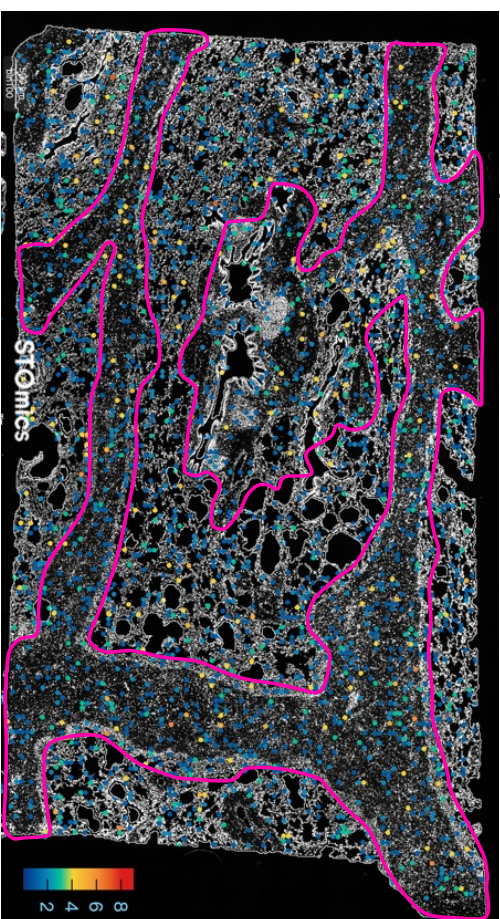


図11 代表的な4遺伝子の発現局在

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和7年度分担研究報告書

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物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 (250401-03)

分担研究項目：被験物質候補となる各種増粘剤のレオロジー特性の評価

研究代表者 梅田ゆみ 労働安全衛生総合研究所 病理グループ 部長
研究分担者 山野荘太郎 労働安全衛生総合研究所 病理グループ 上席試験研究員
研究協力者 藤井修治 東洋大学食環境科学部 教授

研究要旨

本研究では、増粘剤、特にアクリル酸ポリマーを中心とした有機高分子化合物について、その肺障害リスクを物理化学的特性（レオロジー特性）と生体影響の両面から評価することを目的とした。本分担研究では、後続の細胞試験および動物試験に用いる被験物質の基礎データとして、各種増粘剤の粘度特性を網羅的に評価した。

対象としたのは、日本の労災事案に関連するアクリル酸ポリマー（非架橋型および架橋度の異なる複数種）ならびに、食品用途で広く使用されているガム類やセルロース系増粘剤等である。各物質について、溶解限界を考慮した濃度条件でレオメーターによる粘度測定を実施した。

その結果、いずれの物質においても、力に加わるほど流れやすくなる性質が認められた。また、メチルセルロースやガム系は高い粘度を示し、アクリル酸ポリマーは全体としてそれらより低粘度であったが、架橋度の増加に伴い粘度が上昇する傾向が確認された。

これらの結果から、増粘剤の流動特性は化学構造、とりわけ架橋構造の違いに強く依存することが示された。本研究で得られたレオロジー特性は、肺内での物質の挙動や生体影響を理解するための基礎情報となるものであり、今後の細胞試験および動物試験との統合的解析により、物性に基づく肺障害リスク評価への展開が期待される。

【研究成果の概要】

A. 研究目的

本研究は、増粘剤、特にアクリル酸ポリマーを中心とした有機高分子化合物について、その肺障害リスクを物理化学的特性（レオロジー特性）と生体影響の両面から体系的に評価することを目的とする。

具体的には、日本で労災事案となった架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物を含む各種増粘剤を対象とし、バイオレオロジーの観点からその流動・力学挙動を分類するとともに、ヒト由来細胞およびブタを用いた評価により、有害性との相関関係に関する基盤的知見の構築を目指す。

本研究項目では、これらの検討に資するため、投与候補物質のレオロジーデータを網羅的に取得する。最終的には、レオロジー特性に基づき、労働者に生じる肺障害リスクを評価可能とすることを目標とする。

B. 研究方法

1. 被験物質

日本の災害事案に関連するアクリル酸ポリマー（Cas RN:9003-01-4）および、食品用途で広く使用されている増粘剤を選定した。

アクリル酸ポリマーについては、非架橋型（PAH）および架橋度の異なる4種類（1CLPAH、10CLPAH、20CLPAH、100CLPAH）を用いた。

食品系増粘剤としては、キサンタンガム（Cas RN: 11138-66-2）、グアーガム（Cas RN: 9000-30-0）、 κ -カラギーナン（Cas RN: 11114-20-8）、 λ -カラギーナン（Cas RN: 9064-57-7）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC-Na, Cas RN:9004-32-4）、メチルセルロース 4,000（MC4000, Cas RN:9004-67-5）、メチルセルロース 15（MC15, CasRN:9004-67-5）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC, Cas RN:9004-65-3）、およびペクチン（CasRN:9000-69-5）を対象とした。

2. レオロジー測定前の検討

レオロジー特性評価では、各物質について溶解限界を考慮した濃度条件を設定（グアーガム、キサントガム、 κ カラギーナンおよび λ カラギーナンは 2 mg/mL、その他は 10 mg/mL）した。なお、当初は毒性比較の観点から、すべての被験物質を同一濃度（10 mg/mL）で投与する条件を想定し、予備検討を実施した。その結果、キサントガムおよびグアーガム等のガム系増粘剤、ならびに κ -カラギーナンおよび λ -カラギーナンについては、10 mg/mL ではゲル化し流動性を失うため、均一な懸濁液として調製することが困難であり、ブタ肺への投与には適さないことが確認された（図 1）。一方、これらの物質は 2 mg/mL では流動性を保持し、投与可能な状態で調製できることが確認された。他の物質については 10 mg/mL においても投与可能な状態を維持した。



図 1：高濃度条件における増粘剤の状態

キサントガム（10 mg/mL）の例を示す。本条件ではゲル化により流動性を失い、均一な懸濁液として調製することが困難であり、肺内投与には適さない状態であった。

以上の結果を踏まえ、本研究では各物質の溶解性および投与可能性を考慮し、ガム系およびカラギーナン類は 2 mg/mL、その他は 10 mg/mL の条件で評価を行うこととした。

3. レオロジー測定方法

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粘度測定を 3 回以上反復で実施した（図 3）。計測ジグには直径 50mm のコーンプレートを用い、せん断速度を 0.1 から 100s⁻¹ まで掃引することにより粘度計測を実施した。コーンプレートを用いることにより、試料には均一なせん断流動を

与えることが可能となる。図 2 はレオメーターを用いた粘度計測の様子である。各種被験物質は適量をスポイトでとり、温度 37℃ に保たれた平面ステージ（プレート）上に垂らした。被験物質を上からコーンで挟み、その後、温度が安定になるのを待ってから粘度計測を開始した。

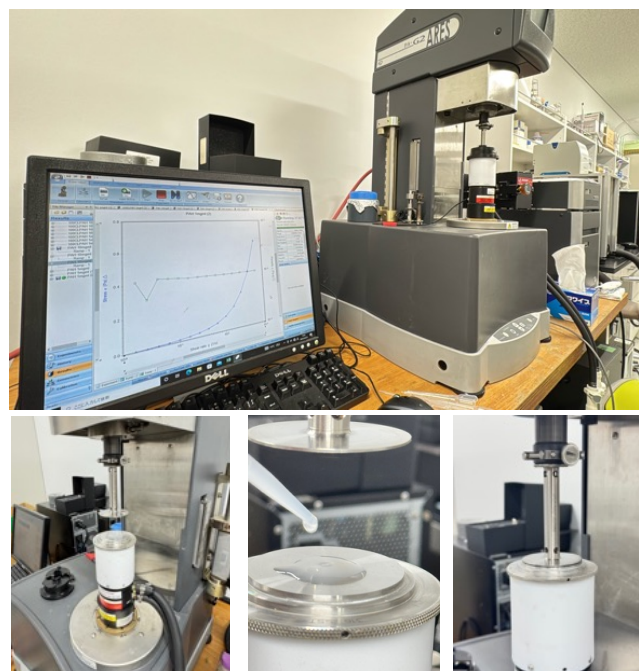


図 2：高性能回転型粘弾性測定装置
ARES-G2 レオメーター

4. 倫理面への配慮

本実験は、科学的正当性と信頼性（研究不正の防止に関する教育の受講、再現性の確保や透明性の担保）及び社会的責任と安全・環境への配慮、化学物質管理法、労働安全衛生法、など、関係する法律や規制を遵守して行われた。

C. 研究結果

各投与候補物質のレオメーターによる粘度測定結果を図 3 および別紙 1 に示す。いずれの物質においても、流れやすさに関する条件（せん断速度）の増加に伴い粘度が低下する傾向が認められた。すなわち、力が加わると流れやすくなる性質を有する（非ニュートン流体としての挙動を示す）ことを確認した。

なお、各物質の投与濃度については、事前検討の結果に基づき設定した。ガム系増粘剤およびカラギーナン類は 10 mg/mL ではゲル化し流動性を失うため投与が困難であったが、2 mg/mL では投与可能な状態であった。一方、その他の物質は 10 mg/mL においても流動性を維持していた。

物質間の比較では、メチルセルロース（MC4000、MC15）およびガム系（キサントガム、グアーガム）が全体として高い粘度を示した。一方、アクリ

ル酸ポリマー群はこれらと比較して相対的に低粘度であったが、架橋度の違いに応じた明確な差が認められた。アクリル酸ポリマーにおける粘度の順位は、100CLPAH > 20CLPAH > 10CLPAH > 1CLPAH > PAH であり、架橋度の増加に伴い粘度が上昇する傾向が一貫して確認された。非架橋型である PAH は最も低い粘度を示した。

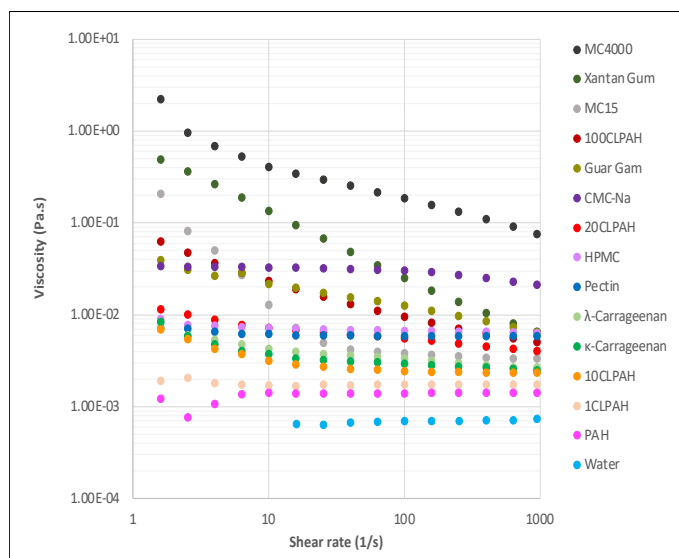


図3：各増粘剤の粘度測定結果（平均値）

各物質について、溶解限界を考慮した濃度条件（ガム系・カラギーナン類：2 mg/mL、その他：10 mg/mL）で測定した。横軸はせん断速度（流れに加わる力の指標）、縦軸は粘度を示す。多くの物質で、応力加わるほど粘度が低下し、流れやすくなる傾向が認められた。また、物質間で粘度に明確な差がみられた。

なお、本研究では各物質の溶解限界を考慮し、ガム系およびカラギーナン類は2 mg/mL、その他は10 mg/mLの条件で測定を行った。このため絶対値の単純比較には制約があるものの、実際の投与条件を想定した場合の流動特性の相対比較として有用な結果が得られた（表1）。

D. 考察

本研究により、増粘剤のレオロジー特性は化学構造、とりわけ架橋構造に強く依存することが示された。アクリル酸ポリマーにおいては、架橋度の増加に伴い三次元ネットワーク構造が強固となり、溶媒中での分子運動が制限されることで粘度が上昇したと考えられる。

一方、メチルセルロースやガム系多糖は比較的低濃度条件においても高粘度を示しており、分子鎖の絡み合いや水和構造の形成が流動特性に大きく寄与している可能性が示唆される。

重要な点として、本研究の測定条件は各物質の溶解性および実際の投与条件を考慮して設定しており、必ずしも同一濃度での比較ではない。この点は厳密な物性比較の観点では制約となるが、生体影響

評価においては「実際に投与されうる状態での物性」を反映しているという点で意義がある。なお、本研究における濃度設定は、単なる物性比較ではなく、実際に肺内へ投与可能な状態を確保するための事前検討結果に基づいており、生体影響評価との関連付けを重視した条件設定である。特に肺内における沈着後の挙動（分散性、クリアランス、局所滞留）には粘度が影響する可能性があり、本条件での比較は毒性評価との関連付けに有用であると考えられる。

表1．投与候補物質の増粘性順位付け

	増粘剤	濃度 (mg/ml)
1	メチルセルロース 4,000	10
2	キサンタンガム	2
3	メチルセルロース 15	10
4	100CLPAH	10
5	グアーガム	2
6	カルボキシメチルセルロースナトリウム	10
7	20CLPAH	10
8	ヒドロキシプロピルメチルセルロース	10
9	ペクチン	10
10	λ-カラギーナン	2
11	κ-カラギーナン	2
12	10CLPAH	10
13	1CLPAH	10
14	PAH	10

CLPAH: Cross-Linked Polyacrylic Acid

PAH: Polyacrylic Acid

さらに、すべての試験物質において外から力が加わると流れやすくなる性質（シアニング挙動）が確認された。このことは、呼吸運動や気流などの動的環境下で粘度が変化しうることを示唆しており、投与後の肺内挙動を考える上で重要な知見である。

本研究で得られたレオロジー特性と、細胞系およびブタモデルにおける炎症・線維化等の生体応答との関連を解析することで、物性と毒性の関係性をより明確にする必要がある。

E. 結論

本研究により、増粘剤のレオロジー特性は物質ごとに大きく異なり、特にアクリル酸ポリマーにおいては架橋度が粘度を規定する主要因であることが明らかとなった。

また、実際の投与条件を考慮した濃度設定においても、各物質の流動特性には明確な差異が認められ、これらの特性が生体内での挙動および肺への影響に関与する可能性が示唆された。

以上より、本研究で取得したレオロジーデータは、後続の in vitro および in vivo 試験における

結果解釈の基盤となるとともに、将来的な物性に基づく肺障害リスク評価の確立に資する重要な基礎データであると考えられる。

G. 研究発表

3. 論文発表

- 34) Yamano S, Schaudien D, Umeda Y. The Pneumoconiosis Renaissance: Revisiting the Pulmonary Pathology of Poorly Soluble Low Toxicity Particles: Insights from Rodent Inhalation Studies on Titanium Dioxide Nanoparticles. *Nanomaterials*. 2026 Feb 16(4):230. <https://doi.org/10.3390/nano16040230>
- 35) Yamano S, Sadakane K, Ichinose T, Umeda Y, Maki T. Mouse pulmonary pathological characteristics induced by Asian-mineral dust transported with *Coniothyrium fuckelii* at a high altitude of 2,000 meters. *Sci Rep*. 2025 Dec 8;16(1):1507. doi: 10.1038/s41598-025-31378-3.
- 36) Wu B, Shichino S, Ueha S, Matsukiyo R, Ishimura Y, Ogiwara H, Takasu M, Yamano S, Umeda Y, Matsushima K. Ex vivo lung-organoid model for aberrant basaloid cell induction and activation. *Inflamm Regen*. 2025 Oct 30;45(1):33. doi: 10.1186/s41232-025-00396-z.
- 37) Yamano S, Umeda Y. Fibrotic pulmonary dust foci is an advanced pneumoconiosis lesion in rats induced by titanium dioxide nanoparticles in a 2-year inhalation study. *Part Fibre Toxicol*. 2025 Apr 18;22(1):7. doi: 10.1186/s12989-025-00623-y.
- 38) Umeda Y, Izawa T, Kazama K, Arai S, Kamiie J, Nakamura S, Hano K, Takasu M, Hirata A, Rittinghausen S, Yamano S. Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in mammals. *J Toxicol Pathol*. 2025 Apr;38(2):113-129. doi: 10.1293/tox.2024-0071.

4. 学会発表

- 31) 山野 荘太郎, 梅田 ゆみ. 上空由来植物病原菌・黄砂の複合曝露が誘導する肺病理像の再定義 - 第16回本シンポジウムを契機とした共同研究成果-第17回大気バイオエアロゾルシンポジウム 2026年2月
- 32) 梅田 ゆみ, 山野 荘太郎. F344 ラットにおける酸化チタンナノ粒子吸入暴露によるじん肺病

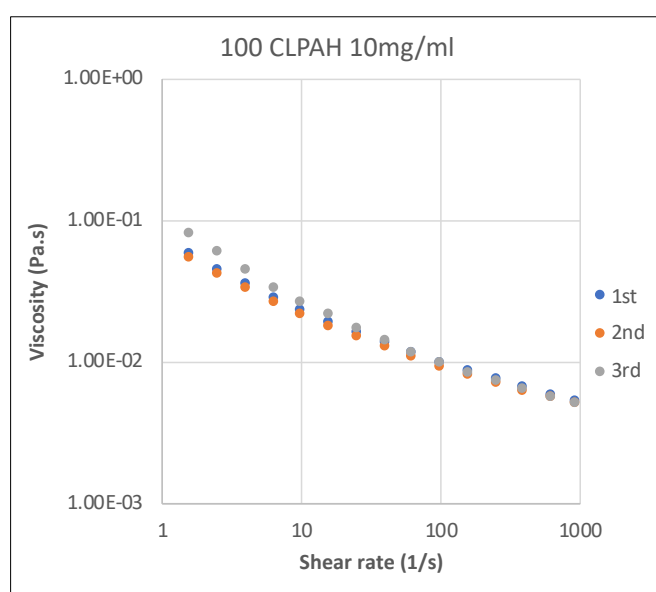
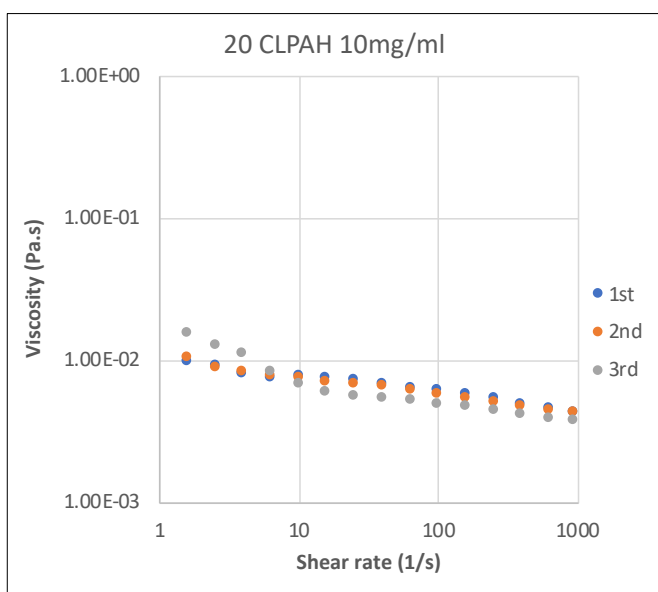
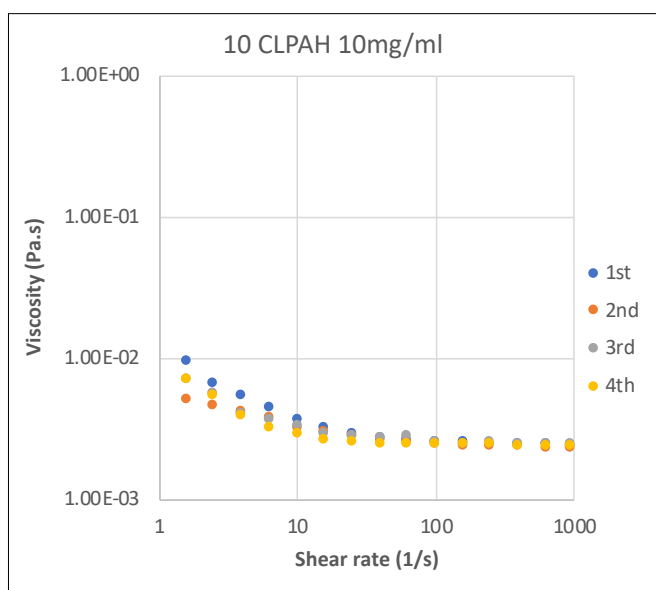
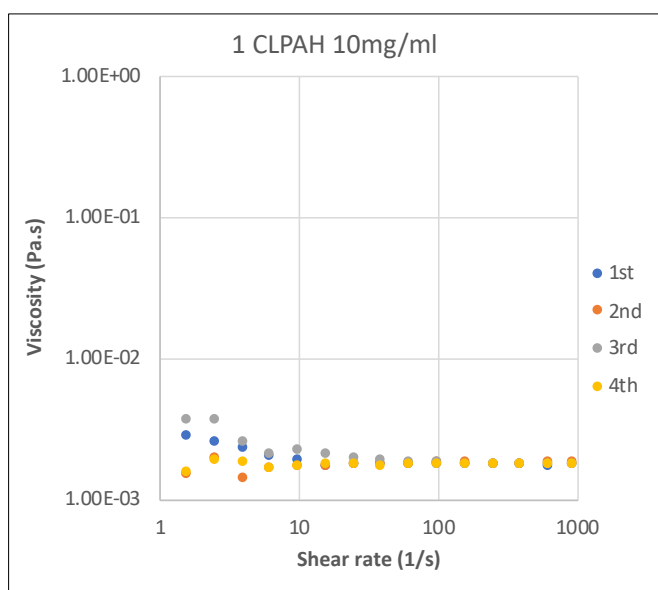
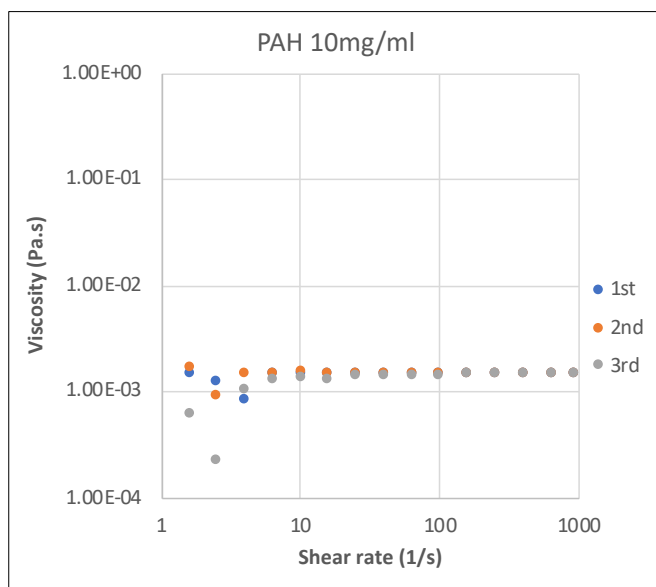
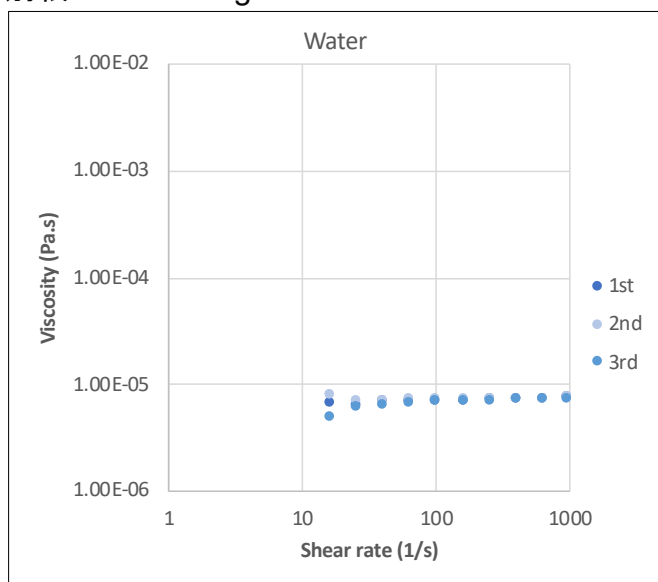
変 第73回日本職業災害・医学会学術大会 2025年11月

- 33) 山野 荘太郎, 梅田 ゆみ. 産業衛生分野における次世代の健康影響基盤の創生 日本産業衛生学会 第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 2025年10月
- 34) 山野 荘太郎, 梅田 ゆみ. 1細胞解像度で紐解く大動物肺疾患アトラスの創出 フォーラム 2025 衛生薬学・環境トキシコロジー 2025年9月
- 35) 山野 荘太郎, 梅田 ゆみ. 呼吸器疾患研究を加速させる先端モデル動物とは? 文科省学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 2025年度 若手支援技術講習会 2025年9月
- 36) Y Umeda, K Kazama, S Arai, J Kmiie, S Nakamura, K Hano, M Takasu, A Hirata, M Saito, Y Goto, Y Ohtsuka, T Kishimoto, S Shichino, Y Yamamoto, S Yamano. Pioneering a Swine Platform for Cutting-Edge Pulmonary Disease Research. 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2025) 2025 Sep
- 37) 山野 荘太郎, 梅田 ゆみ. 大型動物×先進医学解析技術による 職業性肺疾患研究の新展開 第13回 日本繊維状物質研究学術集会 2025年8月 招待有り
- 38) 山野 荘太郎, 梅田 ゆみ. 二酸化チタンナノ粒子で誘発される齧歯類のじん肺病変 第42回 エアロゾル科学・技術研究討論会 2025年8月
- 39) 山野 荘太郎, 梅田 ゆみ. 1細胞解像度で紐解く大型動物肺疾患アトラスの創出 第38回発癌病理研究会 2025年8月
- 40) 山野 荘太郎, 梅田 ゆみ. ミニブタモデルで職業性肺疾患を科学する 第98回 日本産業衛生学会 2025年5月

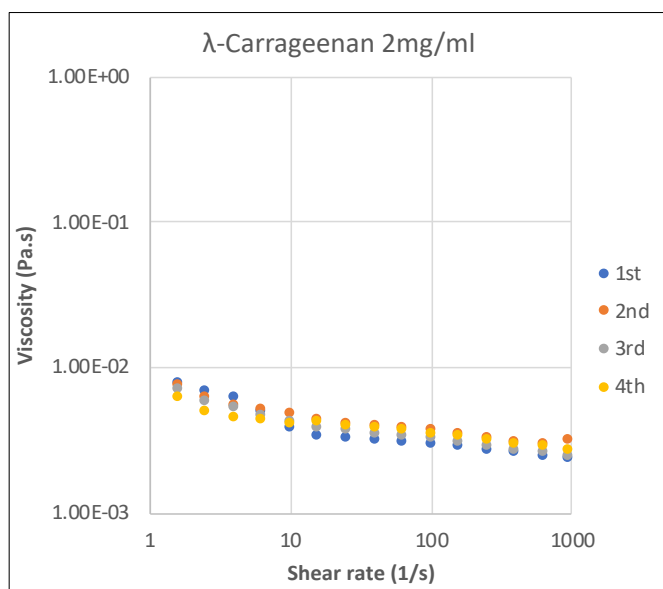
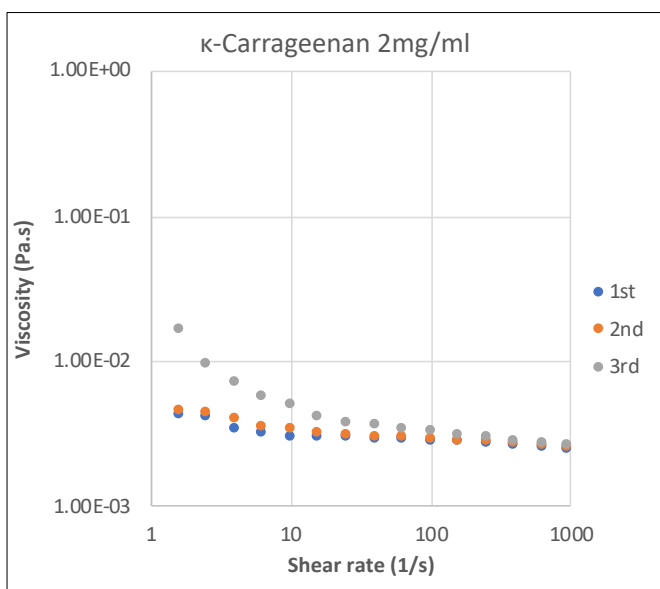
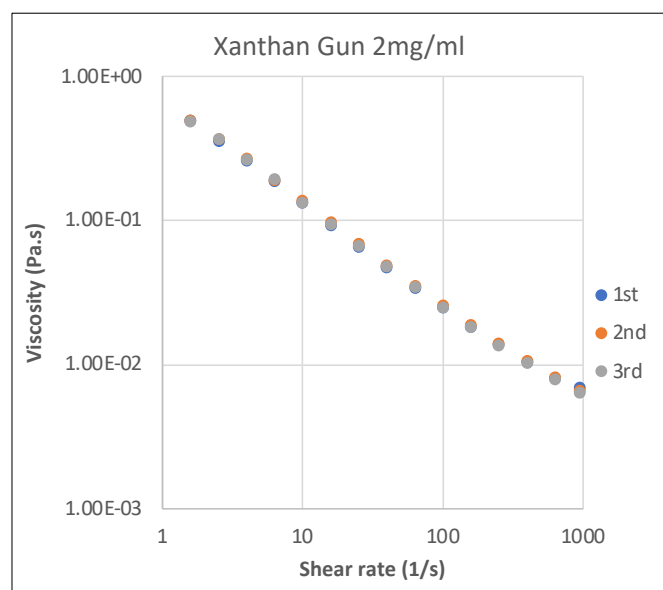
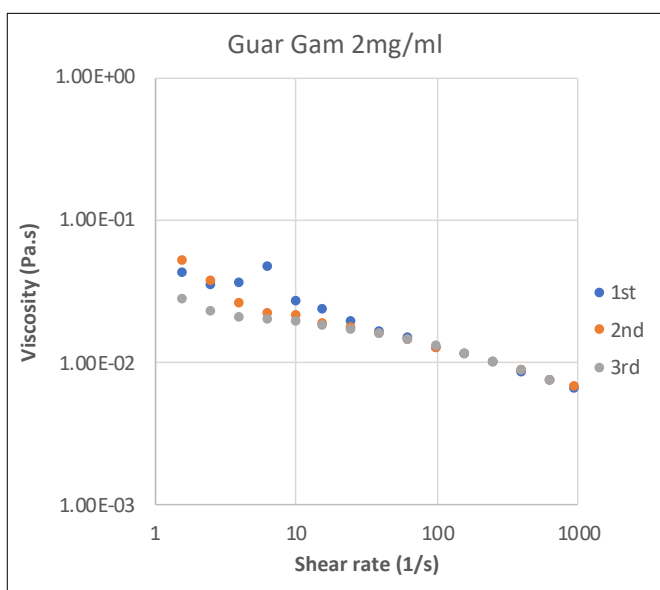
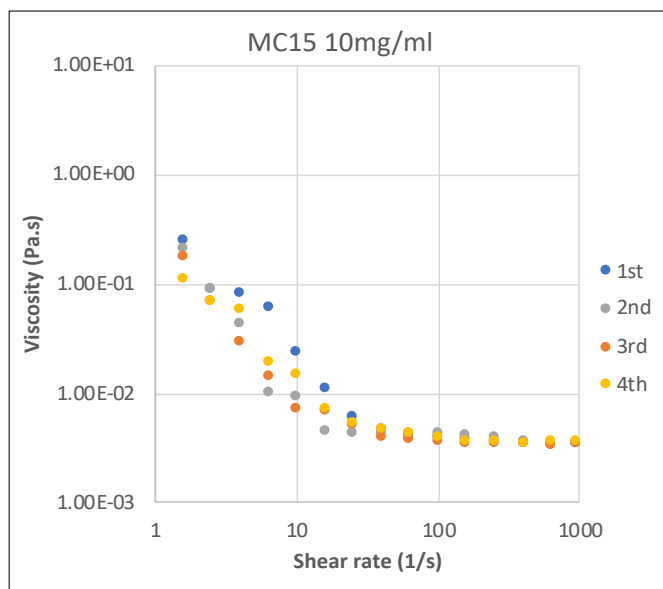
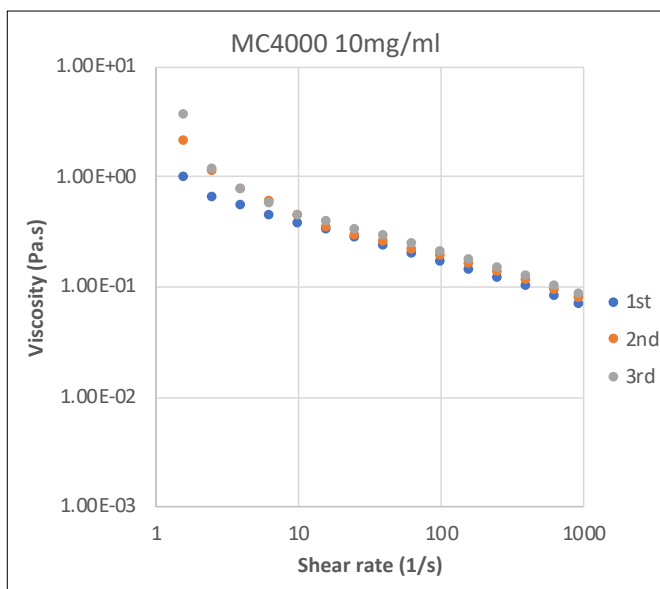
H. 知的財産権の出願・登録状況

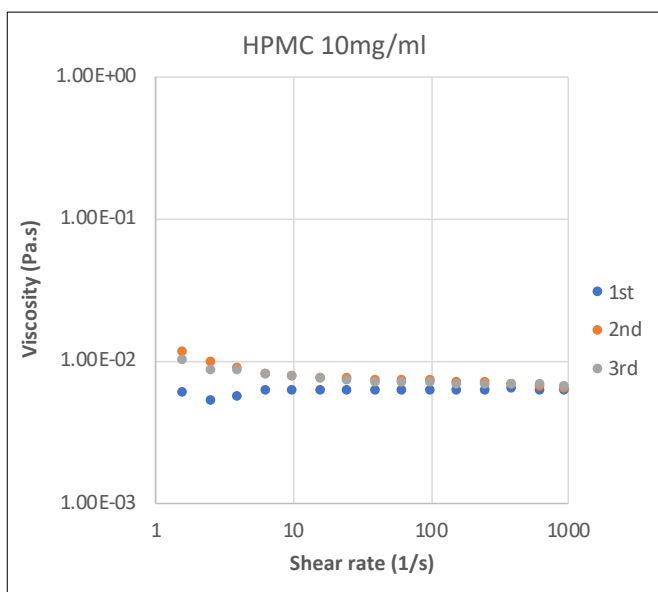
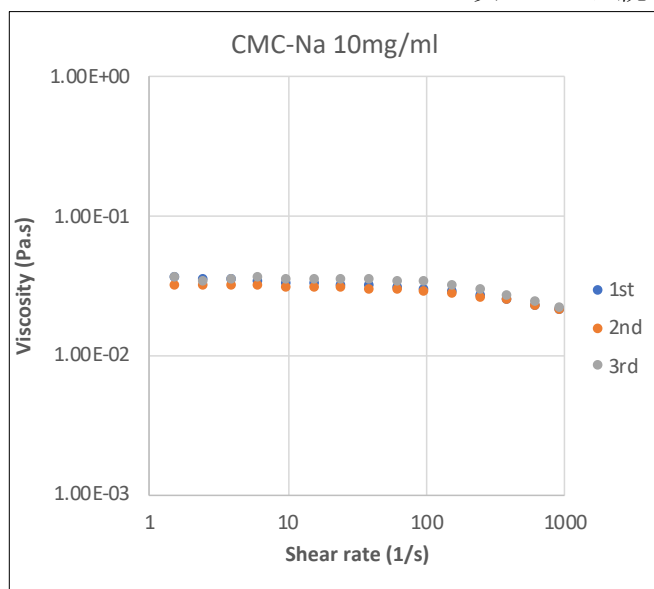
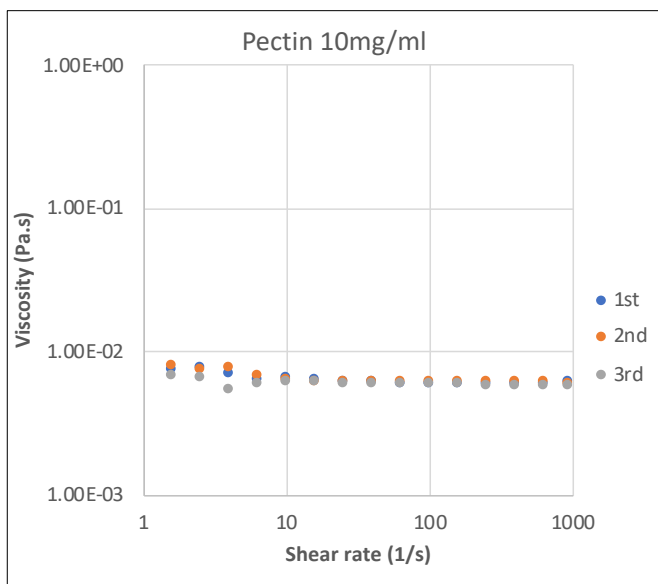
- 1. 特許取得
該当なし
- 2. 実用新案登録
該当なし
- 3. その他
該当なし

別紙 1. Rheological measurement



次ページに続く





労災疾病臨床研究事業費補助金
令和7年度分担研究報告書

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物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 (250401-03)

分担研究項目：家畜ブタを用いた肺内投与実験

研究代表者 梅田ゆみ 労働安全衛生総合研究所 病理グループ 部長
研究分担者 山野荘太郎 労働安全衛生総合研究所 病理グループ 上席試験研究員研究分担者
新井佐知子 麻布大学 獣医学部 産業動物内科学研究室 講師
研究分担者 風間 啓 麻布大学 獣医学部 産業動物内科学研究室 助教
研究分担者 志賀崇徳 麻布大学 獣医学部 病理学研究室 助教

研究要旨

本研究では、架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物を含む各種増粘剤について、肺内投与による呼吸器影響の有無およびその特徴を探索的に評価した。

ヒトの肺と解剖学的特徴が類似する家畜ブタを用い、各種増粘剤を単回肺内投与した。対象物質は、非架橋型アクリル酸ポリマー (PAH)、架橋度の異なるアクリル酸ポリマー (1CLPAH、10CLPAH、100CLPAH)、および食品用途で広く使用される天然物由来増粘剤 (キサンタンガム、グアーガム、MC4000 等) 計 12 種類である。投与 1 か月後に、HRCT 画像診断、病理解剖および病理組織学的解析を実施した。

アクリル酸ポリマー投与群では、HRCT 上で投与部位に一致したコンソリデーションが認められ、病理解剖では肺表面の陥没や割面での白色斑形成が観察された。病理組織学的には、肺胞構造の破壊のリモデリングに加え、小葉間隔壁や肺胞領域の線維性病変が共通して認められた。特に、架橋度と粘性が最も高い 100CLPAH では、100 μ m 以上の厚みを持つ線維束が錯走する極めて強い線維増生が確認された。一方、食品系増粘剤群では、高粘度条件での投与であっても、CT および病理組織学的な著変は認められなかった。また、いずれの物質においても肺臓器以外への明らかな影響は認められなかった。

従って、アクリル酸ポリマーは、架橋の有無に関わらず強い肺疾患原性を有し、特に架橋度や増粘性が高いほど病変が持続的に進展する可能性が示唆された。対照的に、食品系増粘剤で病変が認められなかった事実は、肺障害の本質が粘性そのものではなく、物質の化学構造や細胞応答に依存する可能性を示している。また、本実験モデルは動物の一般状態を悪化させずに局所病変を評価可能であり、動物福祉 (3R) の観点からも有用な評価手法である事が確認された。以上の知見は、増粘剤の吸入曝露による呼吸器系への健康影響リスクをスクリーニング評価するための体系化に向けた重要な基礎的知見となる。

【研究成果の概要】

A. 研究目的

本研究は、架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物をはじめとする各種増粘剤について、肺内投与による呼吸器影響の有無およびその特徴を広く把握することを目的とする。これらの物質は食品および工業用途で広く利用されている一方で、国内において粉体吸入に関連すると考えられる肺障害の報告があり、物質ごとの影響を整理する基礎的知見の蓄積が求められている。

本分担研究では、ヒト肺の解剖学的特徴に近い家畜ブタを用い、各種増粘剤を肺内に単回投与し、投与後の肺内分布、炎症反応および線維化の有無を、CT 画像および病理組織学的手法により評価する。投与条件は各物質の溶解性および投与可能性を考慮し、可能な範囲で高濃度条件を設定することで、影

響の有無を把握するための探索的な検討を行う。また、左右肺に異なる物質を投与する実験系を採用することで、個体差の影響を低減しつつ効率的な比較を可能とする。

本研究は、増粘剤の影響を広く把握するための基礎的検討として位置付けられるものであり、今後、特徴的な影響が認められた物質については、マイクロミニピッグを用いた 3 か月間の観察期間をおいた実験に展開し、より詳細な毒性評価を実施する予定である。最終的には、得られた知見を基に、増粘剤による肺障害の特徴を体系的に整理することを目指す。

B. 研究方法

1. 使用動物と投与物質

家畜ブタは株式会社シムコ（千葉）より導入した。馴致期間を経てのち、実験を実施した。

投与被験物質として、災害事案に関連するアクリル酸ポリマー（Cas RN:9003-01-4）および食品用途で広く使用されている増粘剤を選定した。アクリル酸ポリマーについては、非架橋型（PAH）および架橋度の異なる3種類（1CLPAH、10CLPAH、100CLPAH）を用い、食品系増粘剤としては、キサンタンガム（Cas RN: 11138-66-2）、グアーガム（Cas RN: 9000-30-0）、κカラギーナン（Cas RN: 11114-20-8）、λカラギーナン（Cas RN: 9064-57-7）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC-Na, Cas RN: 9004-32-4）、メチルセルロース 4,000（MC4000, Cas RN:9004-67-5）、メチルセルロース 15（MC15, Cas RN:9004-67-5）、ペクチン（Cas RN:9000-69-5）を対象とした。

レオロジー特性評価では、各物質について溶解限界を考慮した濃度条件を設定（グアーガム、キサンタンガム、κカラギーナンおよびλカラギーナンは2 mg/ml、その他は10 mg/ml）し、レオメーターを用いて粘度測定をした。それぞれの投与候補物質のレオメーターによる粘度測定結果から、家畜ブタを用いた肺内単回投与実験を実施した。12種類の増粘剤について、1物質1濃度とし、左右肺に異なる物質を投与することで、個体数を最小限に抑えつつ広範な影響評価を行った。なお、粘度の高い物質を同一個体の両肺に投与することで、状態の悪化を招く可能性を考慮して表1に示す組み合わせで投与した。

2. 投与方法

対象動物にブトルファノール（明治アニマルヘルス、熊本）、メデトミジン塩酸塩（共立製薬、東京）およびミダゾラム（日医工、富山）による三種混合麻酔薬(MMB)を0.1ml/kg 頸部筋肉注射にて投与したのち、チアミラールナトリウムを耳静脈より

投与して意識消失を確認後、開口し気管支鏡で右および左中後葉の1次気管支を確認しながら、ブロッカーチューブを留置し、対象物質を投与した。被検物質の逆流を防ぐ為、投与後約3分留置を維持し、逆流がないことを内視鏡で確認後カテーテルを抜去した。

3. 安楽死

1か月の観察の後、麻布大学における当該委員会で承認された方法で動物を安楽死させた。家畜ブタは株式会社シムコ（千葉）より導入し、メデトミジン+ミダゾラム+ブトルファノールによる三種混合麻酔薬(MMB)の頸部筋肉内投与（0.1ml/kg）で鎮静後、耳介静脈よりチアミラールナトリウム（100mg/kg）を21G 翼状針で投与し、意識消失を確認し、直ちにCT撮影後、腋窩動脈より放血殺した。

4. CT撮像

被験物質投与1か月（解剖前安楽殺後）に胸部CTイメージを取得した。
撮影の当日は絶食とした。ブトルファノール（明治アニマルヘルス、熊本）、メデトミジン塩酸塩（共立製薬、東京）およびミダゾラム（日医工、富山）による三種混合麻酔薬(MMB)の筋肉内投与（0.1ml/kg）で鎮静後、チアミラールナトリウム100mg/kgを耳介静脈から注入し、呼吸停止を確認後ただちにAquilion Exceed LB 80 列CT（Canon Medical Systems）で胸部CTイメージを獲得した。

5. 解剖およびサンプリング

全身臓器の状態を肉眼的に観察したのち、投与部位の肺後葉を摘出した。摘出した肺は10%中性緩衝ホルマリン液を気道より注入し、その後浸漬固定した。加えて、肉眼的に変化の見られた臓器も10%中性緩衝ホルマリン液にて浸漬固定した、検索に供した。

表1.家畜ブタを用いた単回肺内投与

豚No.	体重		投与日	解剖日	粘度	右後葉	粘度	左後葉
	250720	250727						
No.8	7.42kg	8.8	20250721	20250821		カルボキシメチルセルロースナトリウム 10mg/kgBW		ペクチン 10mg/kgBW
No.9	7.32kg	8.58	20250728	20250828		グアーガム 2mg/kgBW		λ-カラギーナン 2mg/kgBW
No.10	7.18kg	8.78	20250728	20250828		100CLPAH 10mg/kgBW		κ-カラギーナン 2mg/kgBW
No.6	7.06kg	8.06	20250728	20250828		メチルセルロース 15 10mg/kgBW		10CLPAH 10mg/kgBW
No.13	6.82kg	7.96	20250728	20250828		キサンタンガム 2mg/kgBW		1CLPAH 10mg/kgBW
No.5	6.64kg	7.42	20250728	20250828		メチルセルロース 4,000 10mg/kgBW		PAH 10mg/kgBW

5. 病理組織解析方法

1) ホルマリン固定パラフィンブロック作製

固定した肺は、カセットに入るサイズ（約 2.5 cm × 2 cm または、4 cm × 5.5 cm）に再度切り出しを行い、ホルマリン後固定を実施し、パラフィン包埋工程へと進めた。

パラフィン包埋工程としては、後固定終了後軽く水洗し、70%エタノールに 6 時間浸漬後、密閉式自動固定包埋装置（サクラファインテックジャパン

（株）製 VIP-6AI）を用いて 100%エタノール I ～ VII、キシレン I ～ III、パラフィン I ～ IV を各 2 時間にて処理し、パラフィン包埋ブロックを作製した。パラフィン包埋ブロックは、薄切機（リトラトーム REM-710, 大和光機株式会社）にて約 3～4 μm 厚で薄切して FFPE 病理切片を作製した。スライドガラスは松浪 FINE FROST（松浪硝子工業株式会社）、カバーガラスは武藤化学株式会社製を使用した。

2) 染色法

H&E 染色を実施した。

H&E 染色は脱パラフィン、水洗後 2 倍のカラッチヘマトキシリンにて室温 10 分間染色し、0.5%塩酸/70%アルコール溶液にて分別後、流水にて約 10 分間色出しを実施した。エオジンはエオジン Y を用いたエオジン水溶液にて室温で 3 分間染色し、エタノールにて分別・脱水、キシレンにて透徹後マリノール（武藤化学株式会社）を用いて封入した。

- ① 脱パラフィン・水洗
- ② 2 倍カラッチヘマトキシリン液・・・10 分
- ③ 水洗
- ④ 0.5%塩酸/70%アルコール溶液（分別）・・・軽く
- ⑤ 水洗（色出し）・・・10 分
- ⑥ 70%エタノール・・・1 分
- ⑦ エオジン水溶液・・・3 分
- ⑧ エタノール I ～ VII（脱水・分別）
- ⑨ キシレン I ～ VII（透徹）・・・各 1 分
- ⑩ マリノール（武藤化学株式会社）（封入）

6. 倫理面への配慮

本実験は、麻布大学動物実験委員会で承認された方法で実施された（承認番号 250616-1）。

C. 研究結果

1. 状態観察

投与したブタは、気管支内投与後の個別体調管理および、発咳などで投与基剤が気管支から胃内へ逆流し、糞に残留する可能性を考慮し、投与後 1 週間は個室管理にて糞尿の完全回収を行った。1 週間後、体調に問題が無い場合は、その後群飼育へと移行した。実験中に呼吸困難で死亡した個体はいなかった。No.8 は投与後 Day3 に発咳、No.6 は投与後

Day1～6 で活力の低下および食欲不振が見られたが、その後回復した。各個体の体重の推移は図 1 のとおり。参考値として示した、当大学で飼育した肺内未投与ブタのデータと比較しても、健康な未投与ブタと遜色なく発育していることが確認された。

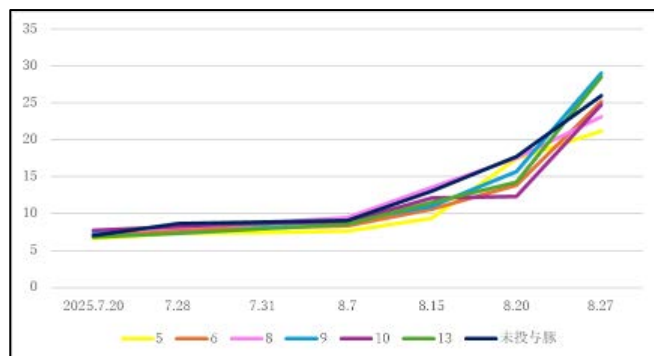


図 1. 実験中の体重推移

2. HRCT 画像診断

アクリル酸ポリマー投与（PAH, 1CLPAH, 10CLPAH, 100CLPAH）肺では、HRCT 上で投与部位に一致したコンソリデーションが認められた。代表的な画像を図 2 に示す。1CLPAH を投与した家畜ブタの肺では、広範囲なコンソリデーション、隔壁の肥厚、一部網状影を認めた。投与した 1CLPAH による重篤な肺障害が示唆され、網状影から、小葉間隔壁・肺泡隔壁の肥厚を伴う線維化への移行が疑われた。

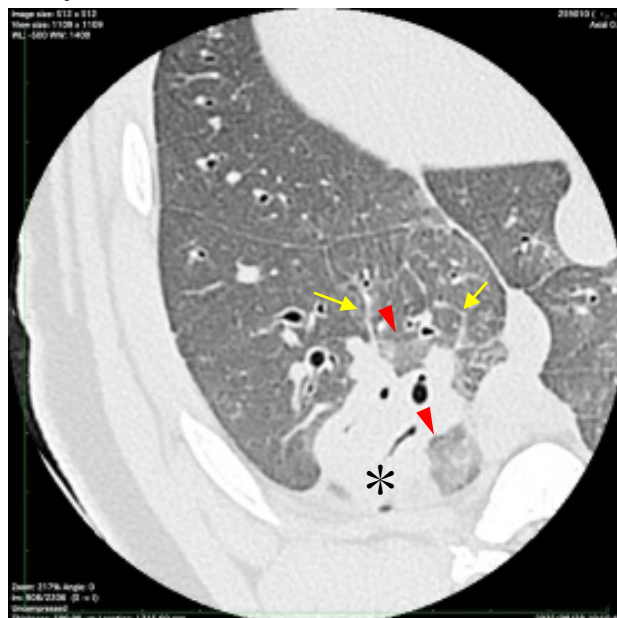


図 2. 1CLPAH（左肺）を投与した家畜ブタ胸部 HRCT 画像

左肺に広範囲なコンソリデーションを認める（*）。周囲の隔壁は肥厚し（黄矢印）、網状影を認める（赤矢頭）。

一方で、キサンタンガム、グアーガム、κカラギーナン、λカラギーナン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース 4,000、メチルセ

ルコース 15、ペクチンを投与した肺では、著変を認めなかった。

3. 解剖

病理解剖時の肺の肉眼的観察からは、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（100 CLPAH、10 CLPAH、1 CLPAH）を投与した肺に変形や表面の陥没がみられた（図3及び4の左上段）。肺葉はいずれの動物もCTの横断像と対比しやすい方向に切り出し、その断面を観察した。非架橋型および架橋型アクリル酸ポリマーを投与した肺の断面に白色斑が確認された（図3及び4の右上段）。一方、食品系増粘剤を投与した肺はCT観察時同様に、全て剖検時においても切り出し時の観察においても著変は認められなかった。

なお、病理解剖を実施した家畜ブタ6頭について、肺以外の臓器を観察したところ、動物番号No.6、No.9およびNo.13において心臓の心外膜および心内膜に出血が認められた（図5）。その他の臓器には肉眼的著変は認められなかった。

心臓については、以下の手順で切り出しおよび記録を行った（図5）。まず、心臓外観を撮影した後、縦断切開を加えて内部構造を撮影した。次いで、心腔内の血餅を除去した後に再固定を行い、再度縦断面を撮影した。その後、心尖部から約3～3.5 cm上方の位置で横断切開を実施した。

さらに、出血が認められた個体については、肺動脈から房室間溝近傍にかけて右心室を一部縦断し、病変部の観察を行った。また、右心房および左心房については、それぞれ心房端を切断したうえで撮影・記録を行った。

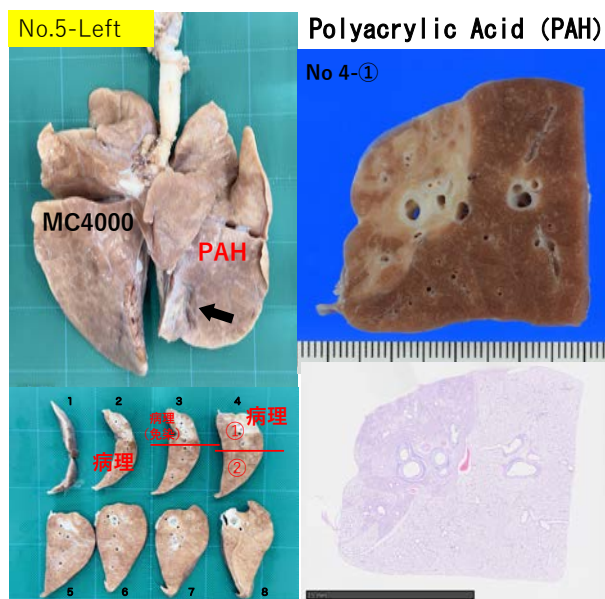


図3. 家畜ブタの肺肉眼像とHEルーペ像

左上段：肺全体肉眼像、左肺後葉は変形し、陥没も見られる（矢印）。左下段：PAHを投与した左肺後葉の切り出し写真。右上段：切り出された肺の拡大。右下段：No.4-①のHE標本ルーペ像。

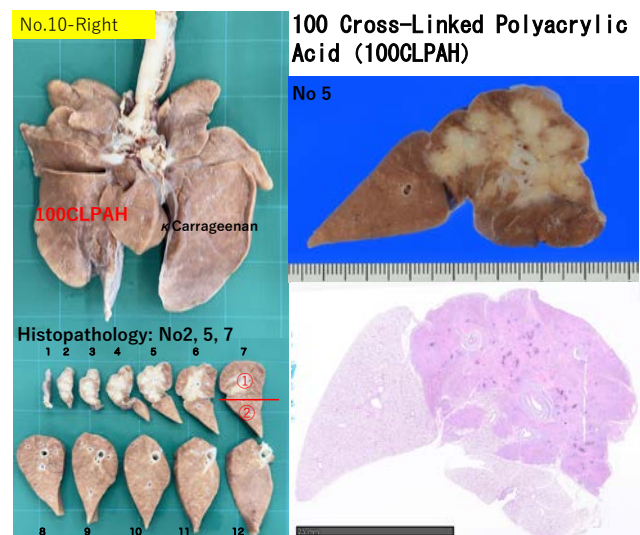


図4. 家畜ブタの肺肉眼像とHEルーペ像

左上段：肺全体肉眼像、右肺後葉は大きく変形している。左下段：100 CLPAHを投与した右肺後葉の切り出し写真。右上段：切り出された肺の拡大。右下段：No.5の病理組織標本ルーペ像。



図5. 家畜ブタ（No.9）の心臓肉眼像

左：心臓全体の肉眼像。主として右心室の心外膜に出血が認められる。右上段：心臓縦断後の肉眼像。心腔内に著変は認められない。右下段：右心室切開後の肉眼像。左図では心内膜および心外膜に出血が認められる。右図では横断面において右心室外膜の出血が認められる。

4. 病理組織学的解析

肺における病理組織学的変化として、PAH、1CLPAH、10CLPAHの3種における結節病変に共通して、肺胞構造の破壊のリモデリング、異型腺管上皮の出現と腔内に被検物質及び貪食細胞の集簇（図6, 8, 10）、および周囲の小葉間隔壁の線維性肥厚（図7, 9, 11）を共通して認めた。

一方で、100CLPAHにおいては、上記3種のポリマーと比較しても明らかに強い膠原線維の増加（図12）を認め、小葉構造の中心-辺縁を問わず、100um以上の厚みを持った線維束が錯走して認められた

(図13)。以上の結果より、アクリル酸ポリマーでは、架橋の有無や強度に関わらず、被検物質が投与された肺末梢領域に対して、強い組織損傷が生じ、その後の修復反応として線維性リモデリングが生じていることが観察された。さらに、その組織反応の強度では、PAH/1CLPAH/10CLPAHと100CLPAHの間で違いが見られることが明らかとなった。

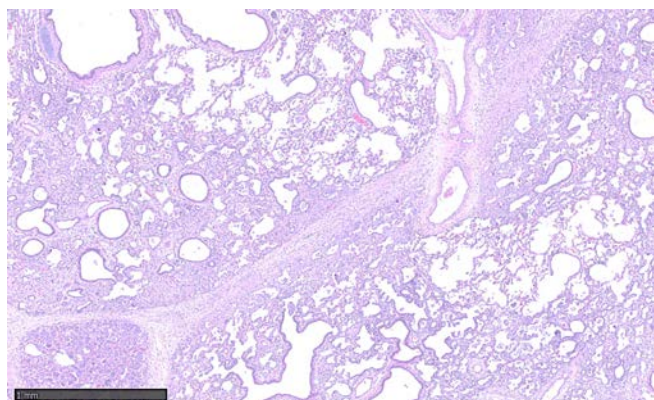


図6. PAHを投与した家畜ブタの肺, 低倍増
Bar=1mm、HE染色

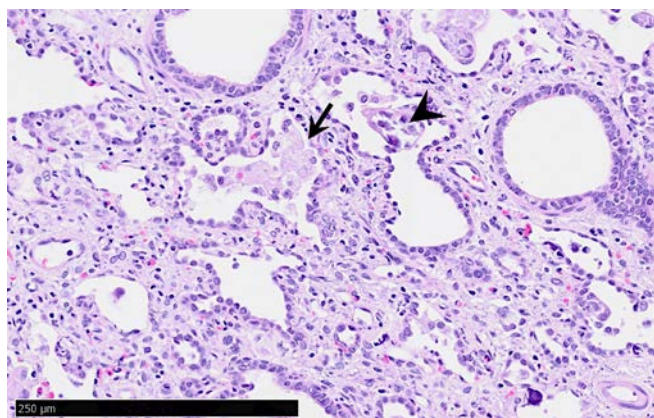


図7. PAHを投与した家畜ブタの肺, 高倍増
矢印: マクロファージ、矢頭: 投与物質、
Bar=250μm、HE染色

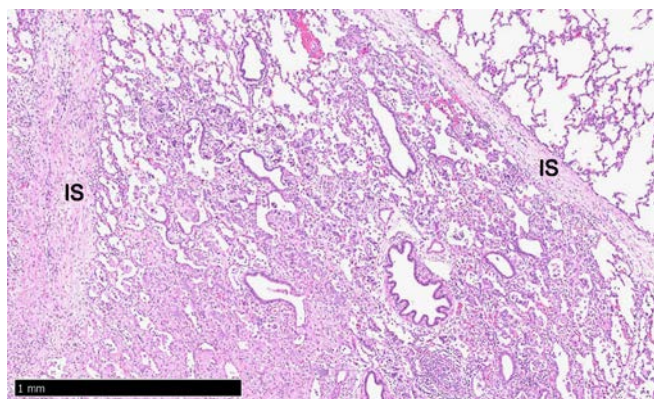


図8. 1 CLPAHを投与した家畜ブタの肺, 低倍増
IS: 小葉間隔壁、Bar=1mm、HE染色

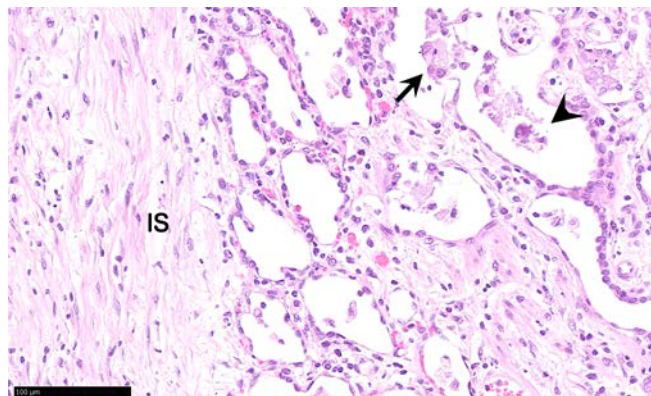


図9. 1 CLPAHを投与した家畜ブタの肺, 高倍増
IS: 小葉間隔壁、矢印: マクロファージ、矢頭: 投与物質、Bar=100μm、HE染色

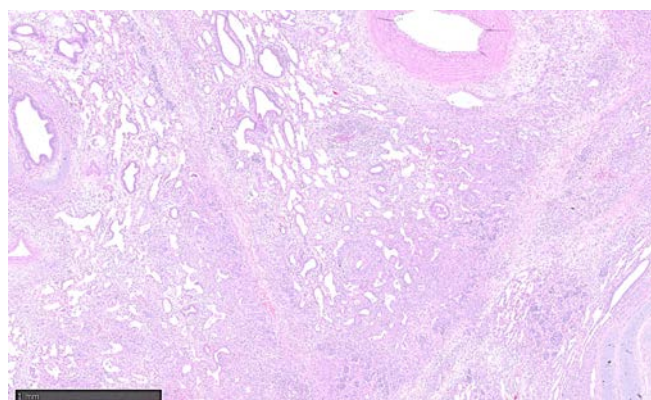


図10. 10 CLPAHを投与した家畜ブタの肺, 低倍増
IS: 小葉間隔壁、Bar=1mm、HE染色

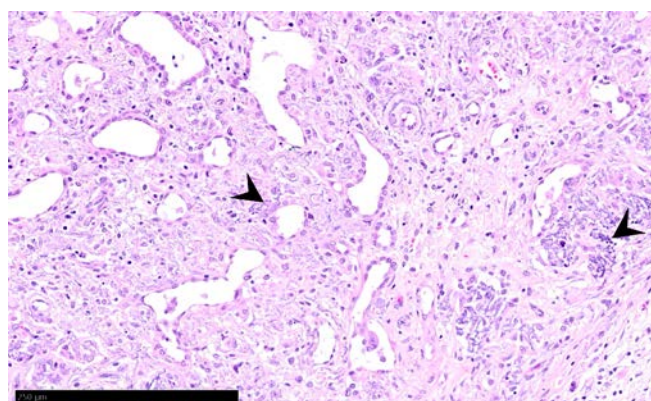


図11. 10 CLPAHを投与した家畜ブタの肺
矢頭: 投与物質、Bar=250μm、HE染色

一方で、キサンタンガム、グアーガム、κカラギーナン、λカラギーナン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース 4,000、メチルセルロース 15、ペクチンを投与した肺では、投与された肺領域において顕著な組織反応を認めず、非投与部位と同様に正常の肺胞、気道、そして繊細な小葉間隔壁に胸膜が観察された。

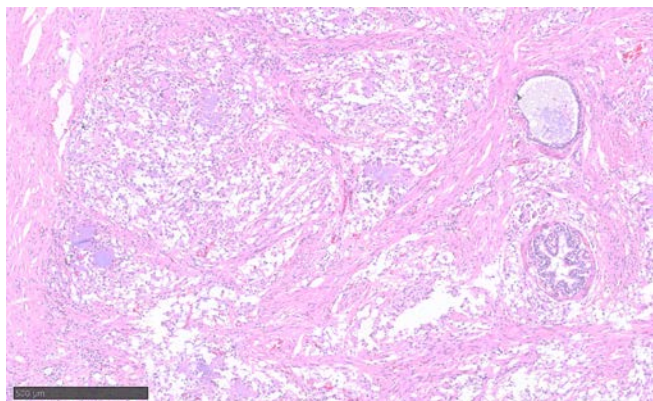


図 1 2. 100 CLPAH を投与した家畜ブタの肺、低倍率

Bar=500μm、HE 染色

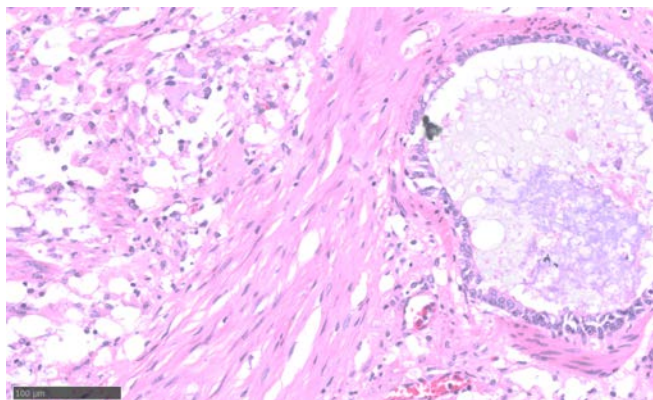


図 1 3. 100 CLPAH を投与した家畜ブタの肺、高倍率

気道周囲の軸位間質とは無関係に錯走する膠原線維束。
Bar=100μm、HE 染色

なお、解剖時に肉眼的に変化が見られた No.6、No.9 および No.13 の心臓組織標本では、右心室の心外膜、心内膜ならびに心筋線維間に出血が認められた (図 14)。一方、心筋実質に著変は認められず、冠状動脈および冠微小血管にも明らかな病変は認められなかった。

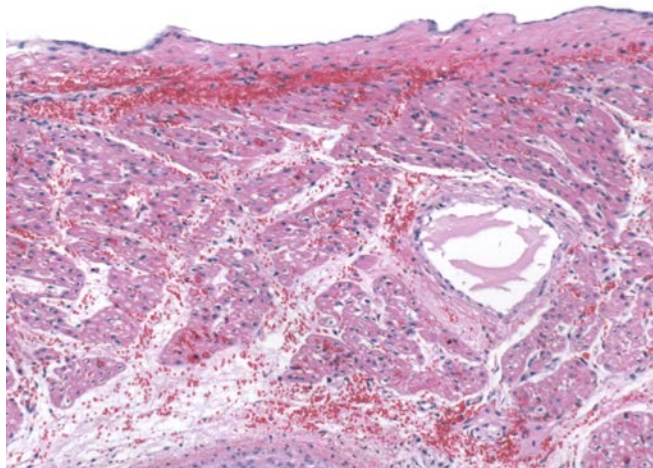


図 14. 家畜ブタ (No. 9) の心臓病理組織像

右心室心外膜および心筋線維間の出血 HE 染色

D. 考察

近年の化学物質の開発加速により食品・医薬品・工業用品として様々な増粘剤が粉体として扱われており、天然由来と合成化学物質としての増粘剤は、我々の生活を豊かにしている。本研究班の初年度にあたる R7 年度では、比較的健康影響のリスクが低いことが見込まれる食品または医薬品等で使用されている天然由来および合成化学物質としての増粘剤に焦点を絞り検討を進めた。

その結果、キサンタンガム、グアーガム、κカラギーナン、λカラギーナン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース 4,000、メチルセルロース 15、ペクチンのいずれにおいても、様々な程度で増粘性を持つことをレオロジー解析で確認した上で肺内に投与したにも関わらず、投与部位での病理組織学的著変を認めなかった。特に、カルボキシメチルセルロースナトリウムとグアーガムは、100CLPAHと比較しても強い粘性を有する濃度での投与にも関わらず、著変を認めなかった。これらの結果は、肺臓器に対する組織障害または疾患原性を有する本質は、その物質の化学構造と細胞応答が重要である可能性を示唆しており、増粘性のみを持って肺障害を引き起こすものではないことを示すと共に、吸入曝露を介した健康影響リスクの低い増粘剤を見出せたものと考えている。

一方でこれまでの結果と一致して、アクリル酸ポリマーでは、架橋の有無や強度に関わらず、強い肺疾患原性を有することが確認された。特に、架橋度が本検討の中で相対的に最も強く、増粘性が最も高い 100CLPAH では、その他の PAH, 1CLPAH, 10CLPAH と比較しても強い線維原性を有する可能性が明らかとなった。肺泡領域の組織障害後の修復パターンとして、PAH, 1CLPAH, 10CLPAH で見られた腺管構造と、それを取り巻く細胞外基質によるリモデリングに比べ、100CLPAH の太い膠原線維束の錯走は、更なる病変の進展を予想させる著変として考えられた。これらの反応の違いにおいては、増粘性が寄与している可能性が考えられ、より被検物質が疾患領域に止まることによる、病態の持続的進展が推察された。

一方で、肺臓器以外の重要臓器における病理組織学的著変は認められず、一般状態の持続的悪化も観察されていない。これらのことから、本実験手法は、肺疾患原性の強い化学物質の評価であっても、過度な個体の一般状態悪化を招きにくい。すなわち、目的とする局所病変を確実に評価しつつも、実験期間中の動物の QOL (生活の質) を著しく損なわないという特徴を持つ。これは、国際的な動物福祉の基本である「3R の原則」における Refinement (苦痛の軽減) の要請に高度に合致するものであり、不必要な人道的エンドポイントの適用を回避し得る、動物愛護的観点からも極めて有用な評価手法であることが示唆された。

なお、粉塵・粒子吸入による心血管系への影響が報告されていることから、各種増粘剤の肺内投与による心臓および血管系への影響についても組織学的に精査した。Hadeiら(2020)は、粒子状物質曝露と心血管影響との関連を報告している。今回の検討では、増粘剤投与に起因すると考えられる明らかな心血管病変は認められなかった。一方、No.6、No.9およびNo.13で認められた右心系を主体とする出血病変については、心筋実質や血管壁に器質的異常を伴わなかったことから、死戦期の呼吸状態変化や循環動態変化に伴う非特異的变化である可能性が考えられた。

E. 結論

家畜豚を用いた本実験条件下において、単回投与後1ヶ月の観察でも、線維性病変が見出される事が確認された。加えて、アクリル酸ポリマーの複数種の比較では、架橋度合と増粘性、および疾患原性に正の関係を有する可能性が示唆された。加えて、本実験モデルでは肺臓器に対する健康影響リスクの低い増粘剤を複数種見出すことに成功した。

G. 引用文献

- 1) Umeda Y, Izawa T, Kazama K, Arai S, Kamiie J, Nakamura S, Hano K, Takasu M, Hirata A, Rittinghausen S, Yamano S. Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in mammals. *J Toxicol Pathol*. 2025. doi: <https://doi.org/10.1293/tox.2024-0071>
- 2) Kishimoto T, Okamoto K, Koda S, Ono M, Umeda Y, Yamano S, Takeda T, Rai K, Kato K, Nishimura Y, Kobashi Y, Kawamura T. Respiratory disease in workers handling cross-linked water-soluble acrylic acid polymer. *PLOS One*. 2023; 18(4):e0284837. doi: 10.1371/journal.pone.0284837. PMID: 37083639; PMCID: PMC10120934.
- 3) Hadei M, Naddafi K. Cardiovascular effects of airborne particulate matter: A review of rodent model studies. *Chemosphere*. 2020 Mar;242:125204. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125204. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31675579.

G. 研究発表

5. 論文発表

- 1) Yamano S, Schaudien D, Umeda Y. The Pneumoconiosis Renaissance: Revisiting the Pulmonary Pathology of Poorly Soluble Low Toxicity Particles: Insights from Rodent Inhalation Studies on Titanium Dioxide Nanoparticles. *Nanomaterials*. 2026;16(4):230. doi: <https://doi.org/10.3390/nano16040230>

- 2) Mizuno S, Teshima N, Yokota T, Khin STMM, Takemae H, Oi T, Fukuda F, Masuda T, Kikkawa Y, Shiga T, Aihara N, Kamiie J, Ishida H, Murakami H, Mizutani T, Oba M, Nagai M. Genetic diversity and evolutionary relationships of porcine astroviruses from wild boars and domestic pigs in Japan. *Infect Genet Evol*. 2026 Jan;137:105875. doi: 10.1016/j.meegid.2025.105875.
- 3) Kawada Y, Kazama K, Aihara N, Aoki T, Hori K, Kawai K, Onda K, Terui H, Murakami M, Yamada K. A calf with concurrent infantile hemangioma and coronary artery fistula: notes on simultaneous onset. *J Vet Med Sci*. 2026. doi: <https://doi.org/10.1292/jvms.25-0440>
- 4) Yamano S, Sadakane K, Ichinose T, Umeda Y, Maki T. Mouse pulmonary pathological characteristics induced by Asian-mineral dust transported with *Coniothyrium fuckelii* at a high altitude of 2,000 meters. *Sci Rep*. 2025 Dec 8;16(1):1507. doi: 10.1038/s41598-025-31378-3.
- 5) Wu B, Shichino S, Ueha S, Matsukiyo R, Ishimura Y, Ogiwara H, Takasu M, Yamano S, Umeda Y, Matsushima K. Ex vivo lung-organoid model for aberrant basaloid cell induction and activation. *Inflamm Regen*. 2025 Oct 30;45(1):33. doi: 10.1186/s41232-025-00396-z.
- 6) Uchida Y, Mizukawa M, Kamiya Y, Shiga T, Aihara N, Kamiie J. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) as a novel fluorochrome for amyloid staining that binds to β -pleated sheet. *Biotech Histochem*. 2025 Oct;100(7):440-449. doi: 10.1080/10520295.2025.2552251.
- 7) Shiga T, Kakinuma Y, Takada M, Imai R, Aoki T, Ishida H, Kasahara-Kamiie M, Aihara N, Kamiie J. Chronic bronchitis and bronchiolitis with prominent globule leukocyte infiltration in a cat with *Filobacterium felis*. *Vet Pathol*. 2025 Sep;62(5):762-766. doi: 10.1177/03009858251324646.
- 8) Ushida K, Kamiie J, Kazama K, Onda K, Arai S. Therapeutic effects of platelet-rich plasma on cartilage in experimental swine models of leg weakness. *J Vet Med Sci*. 2025. doi: <https://doi.org/10.1292/jvms.25-0445>
- 9) Kachi E, Kazama K, Murakami M, Onda K. Opsin 3, encoding a non-visual photoreceptor, is a pseudogene in cattle. *Res Vet Sci*. 2025. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2025.105586>
- 10) Kurumisawa T, Kazama K, Gondaira S, Higuchi H, Eguchi A, Onda K, Roh SG, Kawai K. Anti-inflammatory effects of glycyrrhizin on lipoteichoic acid and lipopolysaccharide-induced bovine mastitis. *Pol J Vet Sci*. 2025. doi: <https://doi.org/10.24425/pjvs.2025.154011>
- 11) Yamano S, Umeda Y. Fibrotic pulmonary dust foci is an advanced pneumoconiosis lesion in rats induced by titanium dioxide nanoparticles in a 2-year inhalation study. *Part Fibre Toxicol*. 2025 Apr 18;22(1):7. doi: 10.1186/s12989-025-00623-y.

- 12) Mineshige T, Takagi S, Shiga T, Aihara N, Yoshida H, Kanai E, Kamiie J. Acanthomatous ameloblastoma with mucinous glandular differentiation in a dog. *J Vet Med Sci*. 2025 Feb 4;87(2):194-197. doi: 10.1292/jvms.24-0374.
- 13) Mizukawa M, Tanaka K, Kashimura A, Uchida Y, Shiga T, Aihara N, Kamiie J. Identification and characterization of spontaneous AA amyloidosis in CD-1 mice used in toxicity studies: implications of SAA1 and SAA2 copy number variations. *J Toxicol Pathol*. 2025 Jan;38(1):69-82. doi: 10.1293/tox.2024-0070.
- 14) Umeda Y, Izawa T, Kazama K, Arai S, Kamiie J, Nakamura S, Hano K, Takasu M, Hirata A, Rittinghausen S, Yamano S. Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in mammals. *J Toxicol Pathol*. 2025. doi: <https://doi.org/10.1293/tox.2024-0071>
- 7) 梅田 ゆみ, 山野 莊太郎. F344 ラットにおける酸化チタンナノ粒子吸入暴露によるじん肺病変. 第 73 回日本職業災害・医学会学術大会. 2025 年 11 月
- 8) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 産業衛生分野における次世代の健康影響基盤の創生. 日本産業衛生学会 第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 2025 年 10 月
- 9) 畠山 裕衣, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 鈴木 武人, 神谷 有美子, 吉岡 耕治, 野口 倫子. 人為的泌乳誘起豚から得られた乳の代用初乳としての有用性の検討. 第 133 回日本畜産学会大会. 2025 年 9 月
- 10) 新井 椋也, 志賀 崇徳, 相原 尚之, 上家 潤一. ブロイラーの胸筋変性の病理学的解析およびジストロフィン-糖タンパク質複合体の発現の関与. 第 133 回日本畜産学会大会. 2025 年 9 月
- 11) 田口 すみれ, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 上家 潤一. BLV 感染リンパ腫牛における個体間および個体内組織間での免疫グロブリン可変領域の解析. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 12) 田中 志朋, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 風間 啓, 村上 裕信, 上家 潤一. 牛伝染性リンパ腫ウイルス感染牛の FALC においてウイルスと IL-5 の共刺激が B-1a 細胞の腫瘍化を誘導する. 第 13 回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026 年 3 月
- 13) 池永 恭, 志賀 崇徳, 柿沼 陽子, 峰重 隆幸, 町田 雪乃, 道下 正貴, チェンバーズ ジェームズ, 内田 和幸, 相原 尚之, 上家 潤一. 猫の肺生検組織における CAR パチルスの検出および globule leukocyte の免疫表現型の解析. 第 13 回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026 年 3 月
- 4) 岡村 さくら, 志賀 崇徳, 相原 尚之, チェンバーズ ジェームズ, 内田 和幸, 上家 潤一. 家畜ブタの心臓における加齢に伴う病理組織学的変化. 第 13 回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026 年 3 月
- 5) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 上空由来植物病原菌・黄砂の複合曝露が誘導する肺病理像の再定義 -第 16 回本シンポジウムを契機とした共同研究成果-. 第 17 回大気バイオエアロゾルシンポジウム. 2026 年 2 月
- 6) 永根 大幹, 谷脇 優華, 藤原 優子, 濱 弘太郎, 横山 和明, 辰巳 響, 水垣 ひなの, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 上家 潤一. ガングリオシド GD3 の欠損は骨格筋再生を遅延させる. 第 98 回日本生化学会大会. 2025 年 11 月

6. 学会発表

- 1) 窪谷 菜々子, 志賀 崇徳, 成毛 淳人, 相原 尚之, 上家 潤一. ウサギにおける巨細胞の出現を伴う悪性毛包上皮腫の一例. 第 13 回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026 年 3 月
- 2) 田中 志朋, 丹生 早耶, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 風間 啓, 村上 裕信, 上家 潤一. 牛伝染性リンパ腫ウイルス感染牛の FALC においてウイルスと IL-5 の共刺激が B-1a 細胞の腫瘍化を誘導する. 第 13 回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026 年 3 月
- 3) 池永 恭, 志賀 崇徳, 柿沼 陽子, 峰重 隆幸, 町田 雪乃, 道下 正貴, チェンバーズ ジェームズ, 内田 和幸, 相原 尚之, 上家 潤一. 猫の肺生検組織における CAR パチルスの検出および globule leukocyte の免疫表現型の解析. 第 13 回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026 年 3 月
- 4) 岡村 さくら, 志賀 崇徳, 相原 尚之, チェンバーズ ジェームズ, 内田 和幸, 上家 潤一. 家畜ブタの心臓における加齢に伴う病理組織学的変化. 第 13 回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026 年 3 月
- 5) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 上空由来植物病原菌・黄砂の複合曝露が誘導する肺病理像の再定義 -第 16 回本シンポジウムを契機とした共同研究成果-. 第 17 回大気バイオエアロゾルシンポジウム. 2026 年 2 月
- 6) 永根 大幹, 谷脇 優華, 藤原 優子, 濱 弘太郎, 横山 和明, 辰巳 響, 水垣 ひなの, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 上家 潤一. ガングリオシド GD3 の欠損は骨格筋再生を遅延させる. 第 98 回日本生化学会大会. 2025 年 11 月
- 7) 梅田 ゆみ, 山野 莊太郎. F344 ラットにおける酸化チタンナノ粒子吸入暴露によるじん肺病変. 第 73 回日本職業災害・医学会学術大会. 2025 年 11 月
- 8) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 産業衛生分野における次世代の健康影響基盤の創生. 日本産業衛生学会 第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 2025 年 10 月
- 9) 畠山 裕衣, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 鈴木 武人, 神谷 有美子, 吉岡 耕治, 野口 倫子. 人為的泌乳誘起豚から得られた乳の代用初乳としての有用性の検討. 第 133 回日本畜産学会大会. 2025 年 9 月
- 10) 新井 椋也, 志賀 崇徳, 相原 尚之, 上家 潤一. ブロイラーの胸筋変性の病理学的解析およびジストロフィン-糖タンパク質複合体の発現の関与. 第 133 回日本畜産学会大会. 2025 年 9 月
- 11) 田口 すみれ, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 上家 潤一. BLV 感染リンパ腫牛における個体間および個体内組織間での免疫グロブリン可変領域の解析. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 12) 田中 志朋, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 風間 啓, 村上 裕信, 上家 潤一. 牛伝染性リンパ腫における B-1a 細胞腫瘍化を誘導する FALC 微小環境の in vitro 解析. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 13) 石原 美紅, 長田 百加, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 上家 潤一. 内在性トリ白血球ウイルス発現による非化膿性心筋炎と非定型リンパ腫への進展. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 14) 比企 希実, 望木 琴水, 金原 美蘭, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 藤野 寛, 長井 誠, 上家 潤一. モルモットのリンパ腫の病理学的性状とレトロウイルスの病理発生への関与. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 15) 鈴木 日向子, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 上家 潤一. *Actinobacillus pleuropneumoniae* 不活化抗原誘導性免疫介在性糸球体腎症マウスモデルの確立と病理発生 の 解 明 . 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 16) 山口 眞生子, 峰重 隆幸, 志賀 崇徳, 相原 尚之, 茅沼 秀樹, 上家 潤一. ラブドイド形質を示した犬の口腔悪性黒色腫の一例. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 17) 綿貫 唯, 上家 潤一, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 上家 美和子, 柿沼 陽子, 新井 佐知子, 大場 真己, 竹前 等, 水谷 哲也. 2024 年度の国内における豚繁殖・呼吸器障害症候群ウイルスの

流行調査. 第 168 回日本獣医学会学術集会.
2025 年 9 月

- 18) 村田 頌昌, 永根 大幹, 竹田 志郎, 納谷 裕子, 志賀 崇徳, 相原 尚之, 上家 潤一, 山下 匡. 納豆菌死菌によるポストバイオティクスは筋修復を促進する. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 19) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 1 細胞解像度で紐解く大型動物肺疾患アトラスの創出. フォーラム 2025 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2025 年 9 月
- 20) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 呼吸器疾患研究を加速させる先端モデル動物とは?. 文科省学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 2025 年度若手支援技術講習会. 2025 年 9 月
- 21) Y Umeda, K Kazama, S Arai, J Kamiie, S Nakamura, K Hano, M Takasu, A Hirata, M Saito, Y Goto, Y Ohtsuka, T Kishimoto, S Shichino, Y Yamamoto, S Yamano. Pioneering a Swine Platform for Cutting-Edge Pulmonary Disease Research. 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2025). 2025 Sep.

- 22) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 大型動物×先進医学解析技術による職業性肺疾患研究の新展開. 第 13 回日本繊維状物質研究学術集会. 2025 年 8 月 (招待講演)
- 23) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 二酸化チタンナノ粒子で誘発される齧歯類のじん肺病変. 第 42 回エアロゾル科学・技術研究討論会. 2025 年 8 月
- 24) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 1 細胞解像度で紐解く大型動物肺疾患アトラスの創出. 第 38 回発癌病理研究会. 2025 年 8 月
- 25) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. ミニブタモデルで職業性肺疾患を科学する. 第 98 回日本産業衛生学会. 2025 年 5 月

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和7年度分担研究報告書

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物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 (250401-03)
分担研究項目：マイクロミニピッグを用いた肺内投与実験

研究代表者 梅田ゆみ 労働安全衛生総合研究所 病理グループ 部長
研究分担者 山野荘太郎 労働安全衛生総合研究所 病理グループ 上席試験研究員研究分担者
新井佐知子 麻布大学 獣医学部 産業動物内科学研究室 講師
研究分担者 風間 啓 麻布大学 獣医学部 産業動物内科学研究室 助教
研究分担者 志賀崇徳 麻布大学 獣医学部 病理学研究室 助教

研究要旨

近年、架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（CWAAP）曝露労働者において、急速進行性の間質性肺炎および肺線維症が報告されている。本研究では、前章の家畜ブタ1か月観察実験で特徴的病変を示した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）を対象に、ヒト肺に近い解剖学的特徴を有するマイクロミニピッグへ単回肺内投与し、3か月間観察を実施した。

マイクロミニピッグ2頭に対し、PAHおよび100CLPAHをそれぞれ5 mg/kg BWで肺内投与し、胸部CT撮影、病理解剖、病理組織学的解析を行った。胸部CTでは、両投与肺後葉に広範囲なコンソリデーション、隔壁肥厚、網状影が認められた。病理解剖では、肺後葉表面の陥没変形および白色斑が観察された。病理組織学的解析では、PAHおよび100CLPAHのいずれにおいても、広義間質の線維化病変が形成されていた。特に肉眼的白色斑部では、正常肺泡構築が消失し、気腔構造が認められず、肺泡領域がコラーゲン線維およびエラスチン線維を伴う線維組織へ置換されていた。また、その周囲には広範囲の小葉間隔壁線維化や、小葉間隔壁と軸位間質を連結する架橋線維化も認められた。

以上の結果により、アクリル酸系増粘剤による肺障害の本質が、広義間質を主座とした慢性線維化病変形成にあることが示された。今後は、シングルセルゲノム解析および空間オミクス解析を導入し、病変形成に関与する疾患関連線維芽細胞（病的ニッチ）の解明を進める予定である。

【研究成果の概要】

A. 研究目的

前章で実施した家畜ブタを用いた単回肺内投与後1か月観察実験では、アクリル酸ポリマー投与群で強い肺障害性が確認された。

本分担研究では、ヒト肺に近い解剖学的特徴を有し、長期観察にも適したマイクロミニピッグを用いて、PAHおよび100CLPAHを単回肺内投与し、3か月間の長期観察を行うことで、増粘剤による肺病変の持続性および慢性化の特徴を明らかにすることを目的とした。

特に、ヒト肺で発達する小葉間隔壁や軸位間質などの「広義間質」に着目し、胸部CT画像による非侵襲的評価と病理組織学的解析を組み合わせることで、形成される線維化病変の分布、性状ならびに組織再構築の特徴について検討した。

本研究により、増粘剤肺内投与後に生じる呼吸器影響の持続性および慢性病変形成に関する基礎的知見を得るとともに、その病態学的特徴を整理することを目指した。最終的には、増粘剤による呼吸器障

害の特徴を体系的に理解するための基盤情報を構築することを目指す。

B. 研究方法

1. 使用動物と投与物質

マイクロミニピッグを用いた肺内投与実験のうち、投与および飼育管理については、富士マイクラ株式会社（静岡）で実施した。

マイクロミニピッグ（体重8-10 kg）は富士マイクラ株式会社（静岡）より2頭（個体番号5143、5161）導入した。

本研究では、家畜ブタを用いた単回肺内投与試験の結果を踏まえ、対象物質として、特徴的な肺病変を示した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）を選定した。投与量は、家畜ブタ試験において重篤な全身状態悪化は認められなかったものの、肺内に比較的多量の被験物質残存が観察されたことを考慮し、長期観察時の過度な局所負荷を避ける目的で、家畜ブタ試験の半量に相当する5 mg/kg BWに設定した。

2. 投与方法

対象動物にブトルファノール（明治アニマルヘルス、熊本），メデトミジン塩酸塩（共立製薬，東京）およびミダゾラム（日医工，富山）による三種混合麻酔薬(MMB)を 0.1ml/kg 頸部筋肉注射にて投与したのち、2～2.5%イソフルランを吸入させて意識消失を確認後、開口し気管支鏡で右および左後葉の1次気管支を確認しながら、気管支ブロッカーチューブを留置し、対象物質を投与した（図1）。被検物質の逆流を防ぐ為、投与後5分間留置を維持し、逆流がないことを内視鏡で確認後気管支ブロッカーチューブを抜去した。

投与は右後葉に 100CLPAH、左後葉に PAH をそれぞれ 10 ml 投与した。



図1. 獣医師らによるマイクロミニピッグへの増粘剤肺内投与の様子

3. CT 撮像

被被験物質投与1か月（解剖直前）に胸部 CT イメージを取得した。

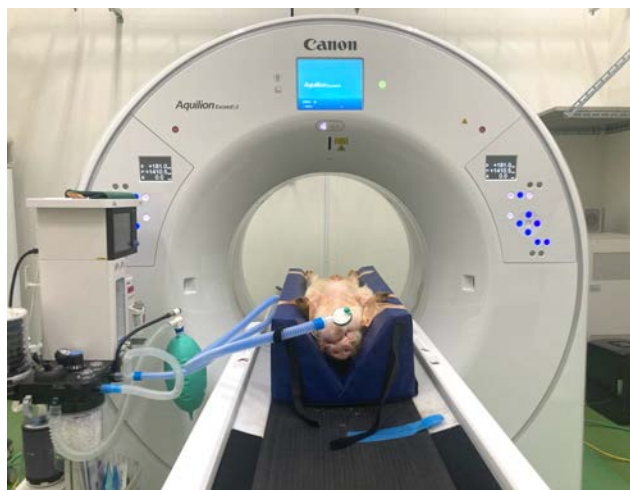


図2. マイクロミニピッグの胸部 CT 撮影

撮影の当日は絶食とした。ブトルファノール（明治アニマルヘルス，熊本），メデトミジン塩酸塩

（共立製薬，東京）およびミダゾラム（日医工，富山）による三種混合麻酔薬(MMB)の筋肉内投与（0.1ml/kg）で鎮静後，チアミラルナトリウム 100mg/kg を耳介静脈から注入し、呼吸停止を確認後ただちに Aquilion Exceed LB 80 列 CT（Canon Medical Systems）で 胸部 CT イメージを獲得した。

4. 解剖およびサンプリング

3ヶ月の観察の後、麻布大学における当該委員会で承認された方法で動物を安楽死させた。メデトミジン、ミダゾラム、ブトルファノールを 0.1ml/kg 頸部筋肉注射（21G・1 1/2 針）により鎮静したのち、耳介静脈よりチアミラルナトリウム

（100mg/kg）を 21G 翼状針で投与し、意識消失を確認し腋窩動脈より放血殺した。

全身臓器の状態を肉眼的に観察したのち、投与部位の肺後葉を摘出した。摘出した肺は 10%中性緩衝ホルマリン液にて 48-72 時間浸漬固定した。

5. 病理組織解析方法

1) ホルマリン固定パラフィンブロック作製

その後、カセットに入るサイズ（約 2.5 cm×2 cm または、4 cm×5.5 cm）に再度切り出しを行い、ホルマリン後固定を実施し、パラフィン包埋工程へと進めた。

パラフィン包埋工程としては、後固定終了後軽く水洗し、70%エタノールに 6 時間浸漬後、密閉式自動固定包埋装置（サクラファインテックジャパン

（株）製 VIP-6AI）を用いて 100%エタノール I ～ VII、キシレン I ～ III、パラフィン I ～ IV を各 2 時間にて処理し、パラフィン包埋ブロックを作製した。パラフィン包埋ブロックは、薄切機（リトラトーム REM-710, 大和光機株式会社）にて約 3～4 μm 厚で薄切して FFPE 病理切片を作製した。スライドガラスは松浪 FINE FROST（松浪硝子工業株式会社）、カバーガラスは武藤化学株式会社製を使用した。

2) 各種染色法

H&E 染色およびエラスチカ・ワンギーソン染色を実施した。

H&E 染色は脱パラフィン、水洗後 2 倍のカラッチヘマトキシリンにて室温 10 分間染色し、0.5%塩酸/70%アルコール溶液にて分別後、流水にて約 10 分間色出しを実施した。エオジンはエオジン Y を用いたエオジン水溶液にて室温で 3 分間染色し、エタノールにて分別・脱水、キシレンにて透徹後マリノール（武藤化学株式会社）を用いて封入した。

⑪ 脱パラフィン・水洗

⑫ 2 倍カラッチヘマトキシリン液・・・10 分

⑬ 水洗

⑭ 0.5%塩酸/70%アルコール溶液（分別）・・・軽く

⑮ 水洗（色出し）・・・10 分

- ⑯ 70%エタノール・・・1分
- ⑰ エオジン水溶液・・・3分
- ⑱ エタノールⅠ～Ⅶ（脱水・分別）
- ⑲ キシレンⅠ～Ⅶ（透徹）・・・各1分
- ⑳ マリノール（武藤化学株式会社）（封入）

エラスチカ・ワンギーソン染色は脱パラフィンおよび水洗後、前田変法レゾルシン・フクシン染色液（武藤化学株式会社，Part No. 40321）にて室温で30分間染色した。その後、100%エタノールにて過剰染色を除去し、流水で洗浄した。続いて、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン溶液にて室温で10分間染色し、流水にて約10分間洗浄した。さらに、1%シリウスレッドを用いたワンギーソン溶液にて室温で3～5分間染色し、100%エタノールにて脱水、キシレンにて透徹後、封入した。

- ① 脱パラフィン・水洗
- ② 前田変法レゾルシン・フクシン染色液・・・30分（室温）
- ③ 100%エタノール・・・過剰染色の除去
- ④ 水洗
- ⑤ ワイゲルト鉄ヘマトキシリン溶液・・・10分（室温）
- ⑥ 水洗（色出し）・・・約10分
- ⑦ ワンギーソン溶液・・・3～5分（室温）
- ⑧ 水洗
- ⑨ エタノール（100%）・・・脱水
- ⑩ キシレン・・・透徹
- ⑪ マリノール（武藤化学株式会社）（封入）

6. 倫理面への配慮

本実験は、麻布大学動物実験委員会で承認された方法で実施された（承認番号 250807-6）。

C. 研究結果

1. 状態観察

個体番号 5161 の動物に発咳が確認されたが、Day7 までには消失し、その後は活力、食欲ともに問題無く実験終了まで経過した。定期的に体重測定を実施した結果、図3に示すとおり、どちらも問題無く成長している様子が見られた。

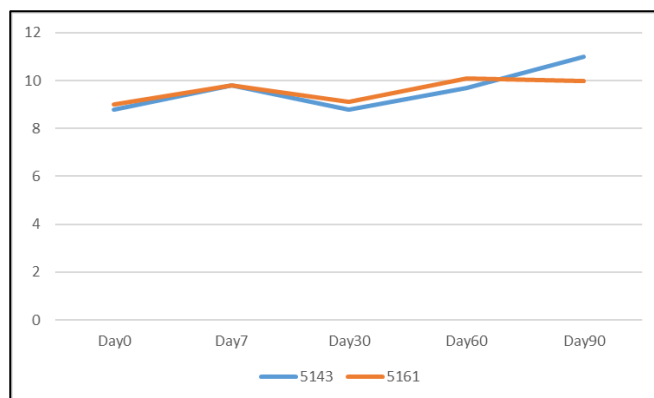


図3. マイクロミニピッグの体重推移

2. HRCT 画像診断

PAHを投与したマイクロミニピッグの肺では、広範囲なコンソリデーション、隔壁の肥厚、一部網状影を認めた（図4）。投与したPAHによる重篤な肺障害が示唆され、特に100CLPAHを投与した右肺後葉では、顕著な網状影が観察され、小葉間隔壁の肥厚を伴う線維化への移行が疑われた。

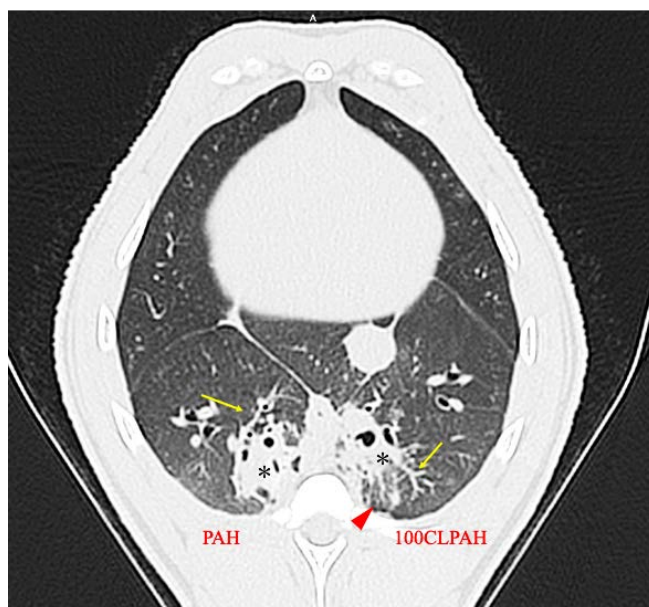


図4. PAH（左肺）100CLPAH（右肺）を投与したマイクロミニピッグ胸部 HRCT 画像

投与した両肺後葉に広範囲なコンソリデーションを認める（*）。周囲の隔壁は肥厚し（黄矢印）、特に100CLPAHを投与した右肺後葉において網状影を認める（赤矢頭）。

3. 病理解剖

病理解剖時の肺の肉眼的変化では、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（100 CLPAH）を投与した肺の後葉は暗赤色調を呈し、表面の陥没など投与部位は変形していた（写真5の右上段）。肺後葉はCTの横断像と対比しやすい方向に切り出し、その断面を観察した。非

架橋型および架橋型アクリル酸ポリマーを投与した肺共に、CT画像でコンソリデーションを認めた部位に白色斑が観察された。また、肉眼観察からも小葉間隔壁の肥厚が確認された（写真5及び6の下段）。

なお、病理解剖を実施したマイクロミニピッグ2頭について、肺以外の臓器を観察したところ、その他の臓器には肉眼的著変は認められなかった（図7）。

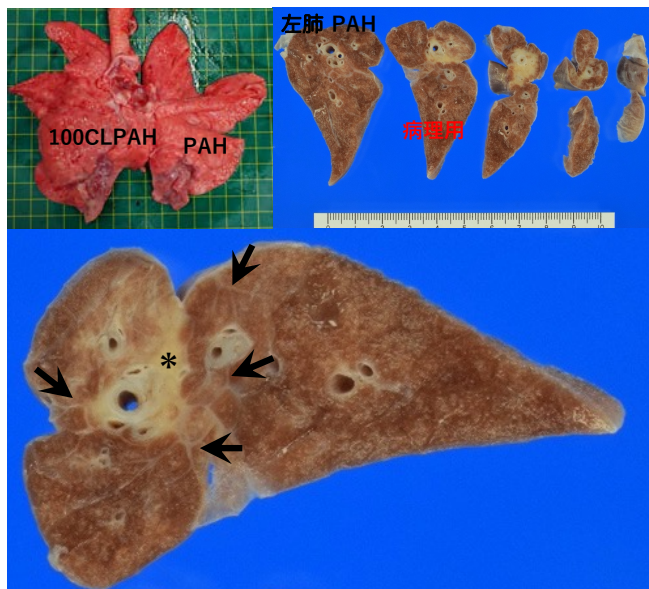


図5. マイクロミニピッグ (5161) の肺肉眼像
左上段：肺全体肉眼像、左右とも肺後葉表面は陥没し変形している。右上段：PAHを投与した左肺後葉のホルマリン固定後における切り出し写真。下段：肺断面の拡大像、白色斑（*）と小葉間隔壁の肥厚（矢印）を認める。

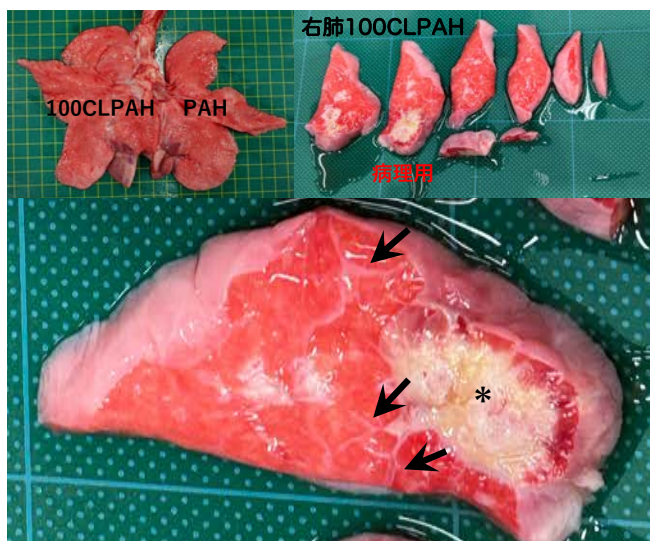


図6. マイクロミニピッグ (5143) の肺肉眼像
左上段：肺全体肉眼像、左右とも肺後葉表面は陥没し変形している。右上段：100CLPAHを投与した左肺後葉の切り出し写真（ホルマリン未固定時）。下段：肺断面の拡大像、白色斑（*）と小葉間隔壁の肥厚（矢印）を認める。

4. 病理組織学的解析

肺は肉眼的変化のみられた部位（CT画像で所見の見た部位に一致）を病理組織解析用に採材した。非架橋型（PAH）および架橋型（100CLPAH）アクリル酸ポリマーのいずれの肺においても投与部位に線維化病変が認められた。

PAHを投与した左肺後葉のEVGルーペ像を図8に示す。小葉間隔壁の肥厚はコラーゲン線維（赤色）の増加であることが確認され、投与部位を中心に広範囲に認められた。また、小葉間隔壁の線維化に加え、小葉間隔壁及び軸位間質をつなぐ架橋線維化も認められた（図9）。さらに、肉眼的に白色斑を認めた部位はその表面が陥没した部位にあたり、EVGルーペ像において黒色調を呈する領域として確認された（図8）。当該部位の拡大像からは、通常観察される肺泡構造が確認されず、肺泡領域はエラスチン線維（黒紫色）の増加が顕著であり、加えてコラーゲン線維（赤色）も認められた（図10）。

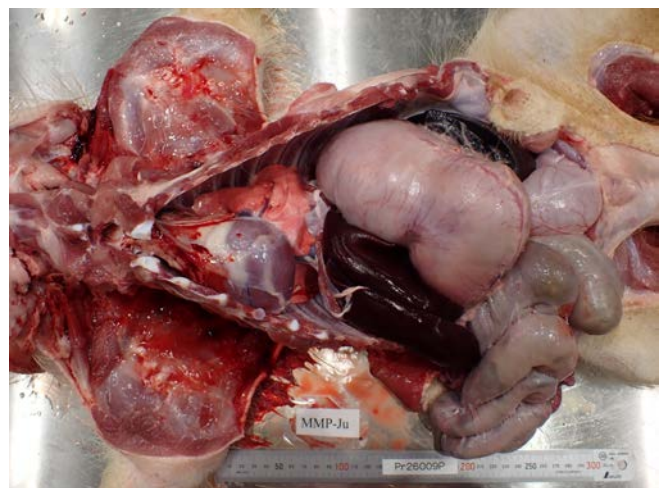


図7. マイクロミニピッグ (5143) の開胸、開腹後の臓器肉眼像
肺以外の体腔臓器に著変は認められなかった。

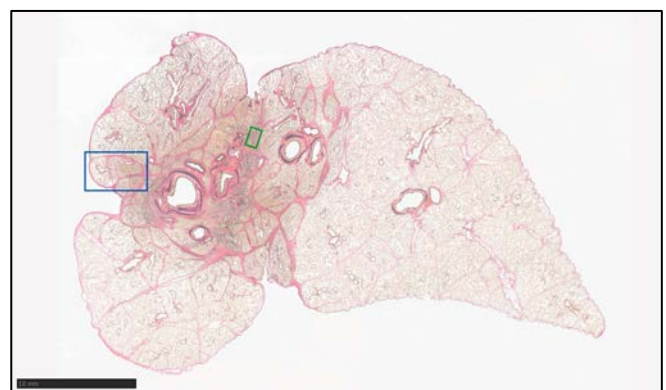


図8. PAHを投与したマイクロミニピッグ (5161) の左肺病理組織像
Bar=10mm、EVG染色

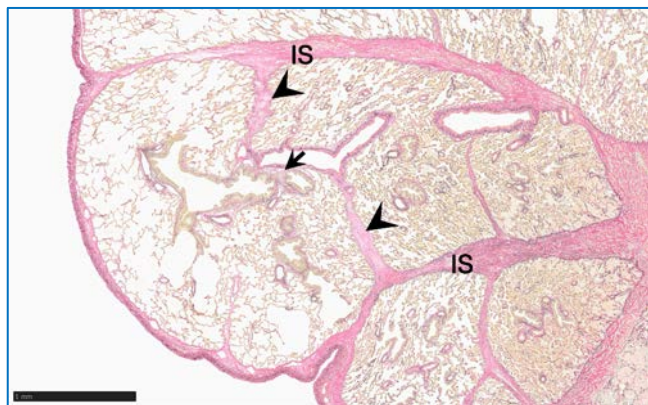


図 9. PAH を投与したマイクロミニピッグ (5161)

図 8 の青枠拡大像

IS: 小葉間隔壁、矢印: 軸位間質、矢頭: 小葉間隔壁及び軸位間質をつなぐ架橋線維化。Bar=1mm、EVG 染色

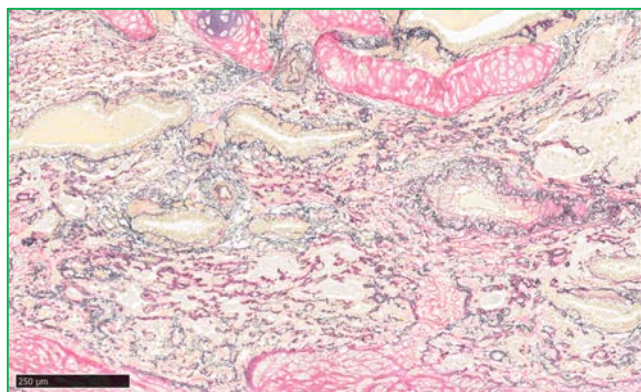


図 10. PAH を投与したマイクロミニピッグ (5161) 図 8 の緑枠拡大像

Bar=250μm、EVG 染色

100CLPAH を投与した肺でも、小葉間隔壁の肥厚はコラーゲン線維（赤色）の増加として確認され、当該線維化病変は広範囲に認められた（図 11）。

肉眼的に白色斑を認めた部位は、周囲組織に認めるような肺泡による気腔の形成が認められず（図 12）、肺泡領域はエラスチン線維（黒紫色）とコラーゲン線維（赤色）で埋められていた（図 13）。一部では、肺泡構造をわずかに認め、肺泡壁が肥厚しておりエラスチン線維（黒紫色）とコラーゲン線維（赤色）の増加が認められた（図 14）。

上記白色斑を認めた病変の周囲では広範囲の小葉間隔壁の線維化や、小葉間隔壁及び軸位間質をつなぐ架橋線維化も認められた（図 12）。

以上の結果から、非架橋型 PAH 架橋型 100CLPAH 共にアクリル酸ポリマーによる肺障害では、広義間質を主体とした線維化病変が示された。また、一部の領域ではエラスチン線維の増加も認められた。

なお、肺以外の全身諸臓器において認められた組織学的変化はいずれも軽度であり、被験物質投与との明確な関連を示唆する所見は認められなかった。

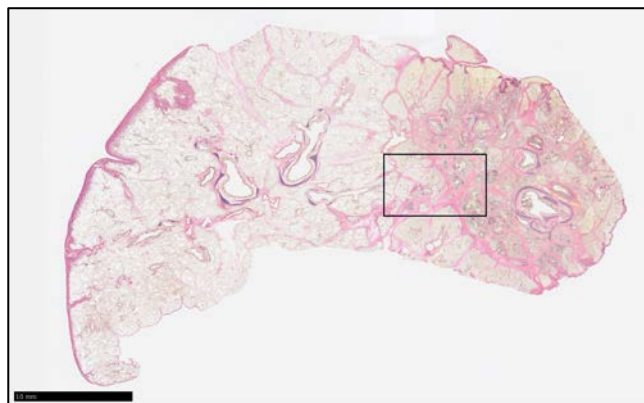


図 11. 100CLPAH を投与したマイクロミニピッグ (5143) の右肺病理組織像

Bar=10mm、EVG 染色

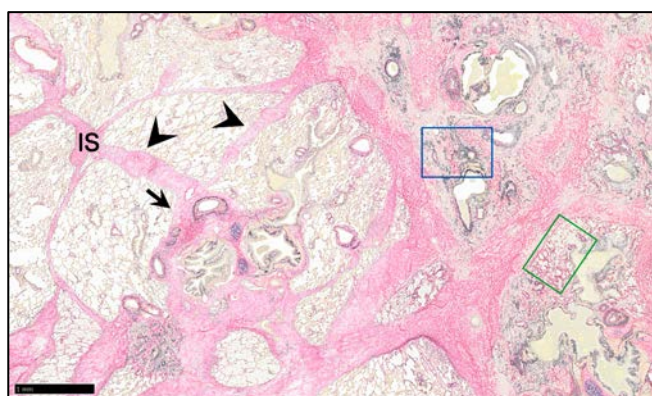


図 12. 100CL PAH を投与したマイクロミニピッグ (5143) 図 11 の黒枠拡大像

肉眼的に白色斑としてみられた部位（写真右側）とその周囲組織（写真左側）。周囲組織には肺泡構造として気腔が存在するが、左側には存在しない。IS: 小葉間隔壁、矢印: 軸位間質、矢頭: 小葉間隔壁及び軸位間質をつなぐ架橋線維化。Bar=1mm、EVG 染色

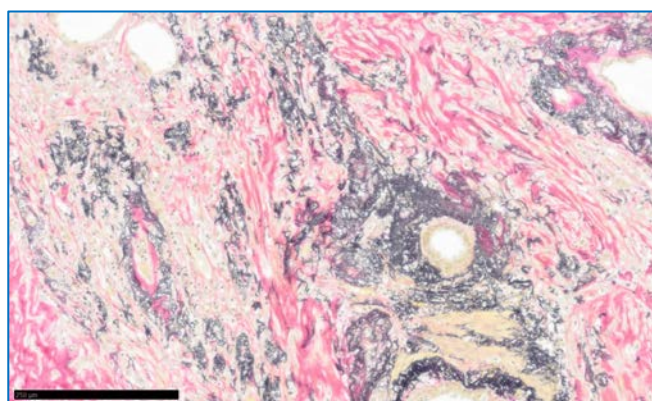


図 13. 100CL PAH を投与したマイクロミニピッグ (5143) 図 12 の青枠拡大像

Bar=250μm、EVG 染色

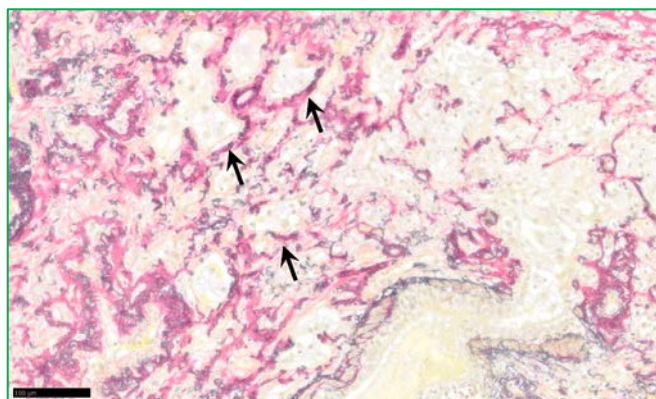


図 14. 100CLPAH を投与したマイクロミニピッグ (5143) 図 12 の緑枠拡大像

矢頭: 肺胞壁肥厚。 Bar=100μm、EVG 染色

D. 考察

本研究では、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) をマイクロミニピッグに単回肺内投与し、3か月間観察した結果、いずれの物質においても広義間質を主体とする線維化病変が形成されることを確認した。

病変は主として小葉間隔壁や軸位間質に形成され、胸部CTでは隔壁肥厚や網状影として描出された。また、病理解剖では白色斑として認識された病変部位において、病理組織学的には正常な肺胞構築が消失し、気腔構造が保たれていなかった。これらの部位では、肺胞領域がコラーゲン線維およびエラスチン線維を伴う線維組織へ置換されている像が認められ、肺胞障害後の修復過程において不可逆的な線維化へ移行した状態である可能性が考えられた。

一方、前章で実施した家畜ブタ1か月観察実験では、PAH投与肺において肺胞構築の破壊と上皮様細胞の増生を主体とする病変が認められていた。しかし、本研究の3か月観察時点では、そのような上皮主体の変化は限定的となり、最終的には100CLPAHと同様に、広義間質を主体とする線維化病変へ移行していた。すなわち、初期病変には差異が認められたものの、長期経過後には両物質とも質的に共通した慢性線維化病変を形成したものと考えられた。

また、本研究で形成された病変では、小葉間隔壁や軸位間質などの広義間質病変が主体であった一方、一部では肺胞壁（狭義間質）にも線維化が波及していた。特に、傷害の強い病変部位ではエラスチン線維の増生を伴う線維化が認められた。一般に、ラットやマウスでは肺胞構造内の弾性線維ネットワーク自体が乏しく、ヒトでみられるような弾性線維を伴う間質性線維化病変の再現には限界があると考えられている。これに対し、ブタ肺ではヒトと同様に小葉間隔壁や軸位間質を含む広義間質構造および弾性線維構築が発達しており、本研究で認められたエラスチン線維増生は、ヒト肺疾患に近い組織修復・線維化応答を反映している可能性が考えられた。これ

らの所見は、ブタモデルが齧歯類では再現困難なヒトに近い間質性線維化病変を再現し得る可能性を示唆するものと考えられた。

以上の結果から、アクリル酸系ポリマーによる肺障害の本質は、架橋の有無に関わらず、広義間質を主座とした線維化形成にあることが明らかとなった。しかし、投与された高分子化合物がどのような細胞応答を引き起こし、いかなる分子メカニズムを経て広義間質の線維化を主導しているのか、その詳細な実行部隊（責任細胞）は未だ特定されていない。今回の3か月観察で明らかになった「間質主体の線維化」という病態基盤を分子レベルで解明するためには、従来の病理組織学的観察を超え、個々の細胞の不均一性や空間的な配置を網羅的に解析する手法が必要不可欠である。

次章では、この病態背景を踏まえ、最新のシングルセルゲノム解析および空間オミクス技術を導入することで、線維化病変の鍵となる疾患関連線維芽細胞（病的ニッチ）の探索を試みる。

E. 結論

本研究では、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) をマイクロミニピッグへ単回肺内投与し、3か月間観察した結果、架橋の有無にかかわらず、広義間質の線維化病変が形成されることを確認した。

G. 研究発表

7. 論文発表

- 15) Yamano S, Schaudien D, Umeda Y. The Pneumoconiosis Renaissance: Revisiting the Pulmonary Pathology of Poorly Soluble Low Toxicity Particles: Insights from Rodent Inhalation Studies on Titanium Dioxide Nanoparticles. *Nanomaterials*. 2026;16(4):230. doi: <https://doi.org/10.3390/nano16040230>
- 16) Mizuno S, Teshima N, Yokota T, Khin STMM, Takemae H, Oi T, Fukuda F, Masuda T, Kikkawa Y, Shiga T, Aihara N, Kamiie J, Ishida H, Murakami H, Mizutani T, Oba M, Nagai M. Genetic diversity and evolutionary relationships of porcine astroviruses from wild boars and domestic pigs in Japan. *Infect Genet Evol*. 2026 Jan;137:105875. doi: 10.1016/j.meegid.2025.105875.
- 17) Kawada Y, Kazama K, Aihara N, Aoki T, Hori K, Kawai K, Onda K, Terui H, Murakami M, Yamada K. A calf with concurrent infantile hemangioma and coronary artery fistula: notes on simultaneous onset. *J Vet Med Sci*. 2026. doi: <https://doi.org/10.1292/jvms.25-0440>
- 18) Yamano S, Sadakane K, Ichinose T, Umeda Y, Maki T. Mouse pulmonary pathological characteristics induced by Asian-mineral dust transported with *Coniothyrium fuckelii* at a high

- altitude of 2,000 meters. *Sci Rep*. 2025 Dec 8;16(1):1507. doi: 10.1038/s41598-025-31378-3.
- 19) Wu B, Shichino S, Ueha S, Matsukiyo R, Ishimura Y, Ogiwara H, Takasu M, Yamano S, Umeda Y, Matsushima K. Ex vivo lung-organoid model for aberrant basaloid cell induction and activation. *Inflamm Regen*. 2025 Oct 30;45(1):33. doi: 10.1186/s41232-025-00396-z.
 - 20) Uchida Y, Mizukawa M, Kamiya Y, Shiga T, Aihara N, Kamiie J. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) as a novel fluorochrome for amyloid staining that binds to β -pleated sheet. *Biotech Histochem*. 2025 Oct;100(7):440-449. doi: 10.1080/10520295.2025.2552251.
 - 21) Shiga T, Kakinuma Y, Takada M, Imai R, Aoki T, Ishida H, Kasahara-Kamiie M, Aihara N, Kamiie J. Chronic bronchitis and bronchiolitis with prominent globule leukocyte infiltration in a cat with *Filobacterium felis*. *Vet Pathol*. 2025 Sep;62(5):762-766. doi: 10.1177/03009858251324646.
 - 22) Ushida K, Kamiie J, Kazama K, Onda K, Arai S. Therapeutic effects of platelet-rich plasma on cartilage in experimental swine models of leg weakness. *J Vet Med Sci*. 2025. doi: <https://doi.org/10.1292/jvms.25-0445>
 - 23) Kachi E, Kazama K, Murakami M, Onda K. Opsin 3, encoding a non-visual photoreceptor, is a pseudogene in cattle. *Res Vet Sci*. 2025. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2025.105586>
 - 24) Kurumisawa T, Kazama K, Gondaira S, Higuchi H, Eguchi A, Onda K, Roh SG, Kawai K. Anti-inflammatory effects of glycyrrhizin on lipoteichoic acid and lipopolysaccharide-induced bovine mastitis. *Pol J Vet Sci*. 2025. doi: <https://doi.org/10.24425/pjvs.2025.154011>
 - 25) Yamano S, Umeda Y. Fibrotic pulmonary dust foci is an advanced pneumoconiosis lesion in rats induced by titanium dioxide nanoparticles in a 2-year inhalation study. *Part Fibre Toxicol*. 2025 Apr 18;22(1):7. doi: 10.1186/s12989-025-00623-y.
 - 26) Mineshige T, Takagi S, Shiga T, Aihara N, Yoshida H, Kanai E, Kamiie J. Acanthomatous ameloblastoma with mucinous glandular differentiation in a dog. *J Vet Med Sci*. 2025 Feb 4;87(2):194-197. doi: 10.1292/jvms.24-0374.
 - 27) Mizukawa M, Tanaka K, Kashimura A, Uchida Y, Shiga T, Aihara N, Kamiie J. Identification and characterization of spontaneous AA amyloidosis in CD-1 mice used in toxicity studies: implications of SAA1 and SAA2 copy number variations. *J Toxicol Pathol*. 2025 Jan;38(1):69-82. doi: 10.1293/tox.2024-0070.
 - 28) Umeda Y, Izawa T, Kazama K, Arai S, Kamiie J, Nakamura S, Hano K, Takasu M, Hirata A, Rittinghausen S, Yamano S. Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in mammals. *J Toxicol Pathol*. 2025. doi: <https://doi.org/10.1293/tox.2024-0071>
- ## 8. 学会発表
- 26) 窪谷 菜々子, 志賀 崇徳, 成毛 淳人, 相原 尚之, 上家 潤一. ウサギにおける巨細胞の出現を伴う悪性毛包上皮腫の一例. 第 13 回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026 年 3 月
 - 27) 田中 志朋, 丹生 早耶, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 風間 啓, 村上 裕信, 上家 潤一. 牛伝染性リンパ腫ウイルス感染牛の FALC においてウイルスと IL-5 の共刺激が B-1a 細胞の腫瘍化を誘導する. 第 13 回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026 年 3 月
 - 28) 池永 恭, 志賀 崇徳, 柿沼 陽子, 峰重 隆幸, 町田 雪乃, 道下 正貴, チェンバーズ ジェームズ, 内田 和幸, 相原 尚之, 上家 潤一. 猫の肺生検組織における CAR パチルスの検出および globule leukocyte の免疫表現型の解析. 第 13 回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026 年 3 月
 - 29) 岡村 さくら, 志賀 崇徳, 相原 尚之, チェンバーズ ジェームズ, 内田 和幸, 上家 潤一. 家畜ブタの心臓における加齢に伴う病理組織学的変化. 第 13 回日本獣医病理学専門家協会学術集会. 2026 年 3 月
 - 30) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 上空由来植物病原菌・黄砂の複合曝露が誘導する肺病理像の再定義 -第 16 回本シンポジウムを契機とした共同研究成果-. 第 17 回大気バイオエアロゾルシンポジウム. 2026 年 2 月
 - 31) 永根 大幹, 谷脇 優華, 藤原 優子, 濱 弘太郎, 横山 和明, 辰巳 響, 水垣 ひなの, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 上家 潤一. ガングリオシド GD3 の欠損は骨格筋再生を遅延させる. 第 98 回日本生化学会大会. 2025 年 11 月
 - 32) 梅田 ゆみ, 山野 莊太郎. F344 ラットにおける酸化チタンナノ粒子吸入暴露によるじん肺病変. 第 73 回日本職業災害・医学会学術大会. 2025 年 11 月
 - 33) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 産業衛生分野における次世代の健康影響基盤の創生. 日本産業衛生学会 第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会. 2025 年 10 月
 - 34) 畠山 裕衣, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 鈴木 武人, 神谷 有美子, 吉岡 耕治, 野口 倫子. 人為的泌乳誘起豚から得られた乳の代用初乳としての有用性の検討. 第 133 回日本畜産学会大会. 2025 年 9 月
 - 35) 新井 椋也, 志賀 崇徳, 相原 尚之, 上家 潤一. ブロイラーの胸筋変性の病理学的解析およびジストロフィン-糖タンパク質複合体の発現の関与. 第 133 回日本畜産学会大会. 2025 年 9 月

- 36) 田口 すみれ, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 上家 潤一. BLV 感染リンパ腫牛における個体間および個体内組織間での免疫グロブリン可変領域の解析. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 37) 田中 志朋, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 風間 啓, 村上 裕信, 上家 潤一. 牛伝染性リンパ腫における B-1a 細胞腫瘍化を誘導する FALC 微小環境の in vitro 解析. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 38) 石原 美紅, 長田 百加, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 上家 潤一. 内在性トリ白血ウイルス発現による非化膿性心筋炎と非定型リンパ腫への進展. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 39) 比企 希実, 望木 琴水, 金原 美蘭, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 藤野 寛, 長井 誠, 上家 潤一. モルモットのリンパ腫の病理学的性状とレトロウイルスの病理発生への関与. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 40) 鈴木 日向子, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 上家 潤一. *Actinobacillus pleuropneumoniae* 不活化抗原誘導性免疫介在性糸球体腎症マウスモデルの確立と病理発生の解明. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 41) 山口 眞生子, 峰重 隆幸, 志賀 崇徳, 相原 尚之, 茅沼 秀樹, 上家 潤一. ラブドイド形質を示した犬の口腔悪性黒色腫の一例. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 42) 綿貫 唯, 上家 潤一, 相原 尚之, 志賀 崇徳, 上家 美和子, 柿沼 陽子, 新井 佐知子, 大場 真己, 竹前 等, 水谷 哲也. 2024 年度の国内における豚繁殖・呼吸器障害症候群ウイルスの流行調査. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 43) 村田 頌昌, 永根 大幹, 竹田 志郎, 納谷 裕子, 志賀 崇徳, 相原 尚之, 上家 潤一, 山下 匡. 納豆菌死菌によるポストバイオティクスは筋修復を促進する. 第 168 回日本獣医学会学術集会. 2025 年 9 月
- 44) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 1 細胞解像度で紐解く大型動物肺疾患アトラスの創出. フォーラム 2025 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2025 年 9 月
- 45) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 呼吸器疾患研究を加速させる先端モデル動物とは?. 文科省学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 2025 年度若手支援技術講習会. 2025 年 9 月
- 46) Y Umeda, K Kazama, S Arai, J Kamiie, S Nakamura, K Hano, M Takasu, A Hirata, M Saito, Y Goto, Y Ohtsuka, T Kishimoto, S Shichino, Y Yamamoto, S Yamano. Pioneering a Swine Platform for Cutting-Edge Pulmonary Disease Research. 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2025). 2025 Sep.
- 47) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 大型動物×先進医学解析技術による職業性肺疾患研究の新展開. 第 13 回日本繊維状物質研究学術集会. 2025 年 8 月 (招待講演)
- 48) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 二酸化チタンナノ粒子で誘発される齧歯類のじん肺病変. 第 42 回エアロゾル科学・技術研究討論会. 2025 年 8 月
- 49) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. 1 細胞解像度で紐解く大型動物肺疾患アトラスの創出. 第 38 回発癌病理研究会. 2025 年 8 月
- 50) 山野 莊太郎, 梅田 ゆみ. ミニブタモデルで職業性肺疾患を科学する. 第 98 回日本産業衛生学会. 2025 年 5 月

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

労災疾病臨床研究事業費補助金
分担研究報告書

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物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

分担研究項目：培養細胞を用いた実験

研究分担者 清野 透 佐々木研究所・附属佐々木研究所腫瘍細胞研究部 客員研究員
魏 民 大阪公立大学大学院医学研究科環境リスク評価学 准教授

研究要旨

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（cross-linked water-soluble acrylic acid polymer: CWAAP）粉体の職業性吸入ばく露により、肺線維化を主体とする呼吸器疾患が発生することが報告されており、CWAAP および増粘作用を有する類縁高分子化合物の呼吸器有害性評価は、労働者の健康障害防止ならびに職業性呼吸器疾患のリスク評価の観点から重要である。本分担研究では、ヒト肺由来細胞を用いた *in vitro* 評価系により、CWAAP 類縁増粘剤のヒト肺細胞に対する直接的な細胞毒性を検討し、増粘性粉体の肺障害リスク評価に資する基盤情報を得ることを目的とした。本年度は、まず日本人肺由来細胞 HLCs2N に hTERT、CDK4R24C および Cyclin D1 を導入し、ヒト肺由来不死化細胞株 HLCs2N-K4DT を樹立した。HLCs2N-K4DT 細胞は、肺上皮細胞としての特徴を保持し、安定した増殖能を有していたことから、増粘剤の *in vitro* 毒性評価に用いる代表的なヒト肺由来不死化細胞株として選択した。次に、PAH および架橋度の異なる CLPAH 系列である 1CLPAH、10CLPAH、20CLPAH および 100CLPAH について、A549 肺癌細胞および HLCs2N-K4DT 細胞を用いた Neutral Red Uptake (NRU) アッセイを実施し、LC50 を指標として細胞毒性を評価した。A549 細胞における PAH、1CLPAH、10CLPAH および 20CLPAH の LC50 は 6.25～7.70 mg/mL であったのに対し、HLCs2N-K4DT 細胞では 2.72～3.09 mg/mL であり、HLCs2N-K4DT 細胞は A549 細胞と比較して高い感受性を示した。一方、100CLPAH については、いずれの細胞株においても最高濃度 2.5 mg/mL で明らかな細胞毒性は認められなかったが、高濃度ではゲル化により均一な調製および添加が困難であったため、評価可能な濃度範囲に制限があった。以上より、PAH、1CLPAH、10CLPAH および 20CLPAH では、本実験条件下において、架橋度の違いによる急性の直接細胞毒性の差は限定的である一方、使用する細胞株により毒性検出感度が異なることが示された。HLCs2N-K4DT 細胞は、正常肺由来細胞に近い性質と不死化細胞株としての実験的安定性を併せ持つことから、CWAAP および類縁増粘剤の *in vitro* 肺細胞毒性評価に有用な評価系となる可能性が示された。今後は、物理化学的特性の異なる増粘剤について検討を拡大し、ミニブタモデルやレオロジー特性評価の結果と統合することで、CWAAP の肺毒性発現機序の解明および呼吸器有害性評価法の高度化を目指す。

A. 研究目的

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物（cross-linked water-soluble acrylic acid polymer: 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。また、ヒトへの吸入ばく露が想定される化合物の有害性評価には吸入試験が重要であるが、全身ばく露法には大規模なばく露装置を要し、実施可能な施設が限られている。さらに近年では、動物実験の 3R の観点からも、肺障害リスクを効率的に評価可能な *in vitro* 評価手法の確立が求められている。

本分担研究は、CWAAP 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よる呼吸器疾患発症リスクについて、ヒト肺由来細胞を用いた *in vitro* 評価系により解析し、増粘剤のヒト肺細胞に対する直接的な有害性を明らかにすることを目的とする。

具体的には、ヒト肺由来細胞に対する増粘剤の直接的な細胞毒性を評価するため、ヒト肺がん A549 細胞を用いた Neutral Red Uptake (A549-NRU) アッセイを実施し、令和 7 年度に選定された 5 種類の増粘剤について、LC50 を指標とした毒性評価を行う。さらに、日本人肺由来の新規不死化肺細胞株を樹立し、増粘剤の毒性評価に応用することで、従来の A549-NRU アッセイとの感度および反応性の比較を行う。これにより、増粘剤のヒト肺細胞に対する直接的影響をより鋭敏に検出できる評価系の構築を目指す。

本研究で得られる *in vitro* 毒性データは、本研究班で同時に実施されている被験物質のレオロジー特性評価およびブタを用いた個体レベルの肺障害評価と統合することで、増粘性粉体の呼吸器有害性をカテゴリー評価するための基盤情報となる。最終的には、CWAAP および類縁増粘剤の肺障害リスクを、物質の構造、物理化学的特性および細胞毒性の観点から総合的に評価し、労働現場における呼吸器疾患の予防ならびに有害性情報の高度化に資することを目指す。

B. 研究方法

1. ヒト肺由来不死化細胞株の樹立

日本人肺由来細胞を用いた増粘剤毒性評価系を構築するため、ヒト肺由来細胞 HLCs2N に対して、hTERT、CDK4R24C、Cyclin D1 を導入し、不死化細胞株およびその亜株を樹立した。作製した細胞株は、TERT を導入した HLCs2N-T、TERT、CDK4R24C および Cyclin D1 を導入した HLCs2N-K4DT、TERT および CDK4R24C を導入した HLCs2N-K4T、TERT に加えて EpCAM promoter-TetOff システムにより CDK4R24C および Cyclin D1 を発現する HLCs2N-Tet-K4DT、ならびに TERT に加えて EpCAM promoter-TetOff システムにより CDK4R24C を発現する HLCs2N-Tet-K4T である。樹立した各細胞株について、増殖能および肺由来細胞としての性質を確認し、その後の毒性評価に用いる細胞株を選定した。

2. Western blot 法による細胞特性の解析

樹立したヒト肺由来不死化細胞株について、肺細胞としての特徴および導入遺伝子の発現を確認するため、Western blot 法を実施した。解析対象として、Cyclin D1、CDK4、基底細胞マーカーである p63、肺上皮 lineage マーカーである TTF-1、細胞周期制御因子である p16/INK4a を用いた。また、内部対照として Vinculin を用いた。一次抗体として、Cyclin D1 は Cell Signaling Technology 社製 2922S、rabbit monoclonal antibody を 1:1000 希釈で用いた。CDK4 (D9G3E) は Cell Signaling Technology 社製 12790S、rabbit monoclonal antibody を 1:1000 希釈で用いた。p63 (EPR5701) は Abcam 社製 ab124762、rabbit monoclonal antibody を 1:1000 希釈で用いた。TTF-1/NKX2-1 (SPT24) は Leica/Novocastra 社製 NCL-L-TTF-1、mouse monoclonal antibody を 1:500 希釈で用いた。p16/INK4a (G175-405) は BD Biosciences 社製 BDB550834、mouse monoclonal

antibody を 1:1000 希釈で用いた。Vinculin は Sigma-Aldrich 社製 V9264、mouse monoclonal antibody を 1:1000 希釈で用いた。

Western blot の結果に基づき、p63 および TTF-1 の発現を含む肺由来細胞としての特徴、ならびに CDK4R24C および Cyclin D1 の発現を確認した。これらの結果を踏まえ、以後の増粘剤毒性評価には HLCs2N-K4DT 細胞を用いた。

3. A549 細胞および HLCs2N-K4DT 細胞を用いた Neutral Red Uptake (NRU) アッセイ

ヒト肺由来細胞に対する増粘剤の直接的な細胞毒性を評価するため、A549 細胞および HLCs2N-K4DT 細胞を用いて、Neutral Red Uptake (NRU) アッセイを実施した。被験物質として、PAH、1CLPAH、10CLPAH、20CLPAH および 100CLPAH の 5 物質 (Fujifilm, Japan) を用いた (Table 1)。

Day 0 に、6 well プレートへ A549 細胞を 2×10^5 cells/well、HLCs2N-K4DT 細胞を 1×10^5 cells/well の密度で播種した。Day 1 に、各被験物質を基礎培地で 15 mL チューブ内に調製し、vortex により約 5 秒間混和した。あらかじめ培養しておいた A549 細胞および HLCs2N-K4DT 細胞から培地を除去し、PBS で 1 回洗浄した後、調製した被験物質含有培地を添加した。その後、37°C、5% CO₂ 条件下で 15 分間インキュベーションした。

細胞毒性は Neutral red の細胞内取込みを指標として評価した。被験物質処理後、顕微鏡観察を行い、被験物質含有培地を除去した。細胞を PBS で 2 回洗浄した後、Neutral red 含有 RPMI 培地を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 3 時間インキュベーションした。インキュベーション後、培地を除去し、PBS で 2 回洗浄した。続いて、酢酸-エタノール溶液 (50% エタノール、49% Milli-Q 水、1% 氷酢酸) を各 well に 1 mL 添加し、振盪により細胞内に取り込まれた Neutral red を溶出させた。得られた溶出液を 96 well プレートに 180 μ L ずつ分注し、吸光度計を用いて 540 nm における吸光度を測定した。

4. LC50 の算出

NRU アッセイにより得られた吸光度データを用いて、各被験物質の細胞毒性を解析した。解析には GraphPad Prism 10 (GraphPad Software) を使用した。各被験物質について、投与濃度を対数変換した値を用い、非線形回帰解析 (log[agonist] vs. normalized response – variable slope) により濃度反応曲線を作成した。得られた近似曲線から、細胞生存率が 50% となる濃度を LC50 として算出した。A549 細胞および HLCs2N-K4DT 細胞で得られた LC50 を比較し、新規ヒト肺由来不死化細胞株の毒性検出感度を評価した。

(倫理面の配慮)

ヒト肺由来不死化細胞株の樹立については施設の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. ヒト肺由来不死化細胞株の樹立および特徴解析

正常初代培養ヒト肺細胞 HLCs2N を用いて、TERT、CDK4R24C および Cyclin D1 を組み合わせて導入し、複数のヒト肺由来不死化細胞株を樹立した。樹立した各細胞株における導入遺伝子の発現および肺上皮細胞としての特徴を確認するため、Western blot 法により Cyclin D1、CDK4、p63、TTF-1、p16INK4a および Vinculin の発現を解析した。その結果、導入した各遺伝子の発現が確認され、目的とする不死化細胞株が樹立されたことが示された(Figure 1)。

まず、HLCs2N、HLCs2N-K4DT および HLCs2N-K4T のいずれにおいても、気道上皮基底細胞マーカーである p63 の発現が認められた。このことから、樹立した HLCs2N 由来不死化細胞株は、肺上皮由来細胞としての性質を一定程度保持していることが示唆された。

次に、各細胞株の増殖速度を比較したところ、HLCs2N-K4DT および HLCs2N-K4T が同程度に高く、HLCs2N-T が最も低かった。この結果から、HLCs2N-K4DT および HLCs2N-K4T は、毒性評価に必要な細胞数の確保および実験再現性の面で有用な細胞株であると考えられた。

さらに、TTF-1 および p16INK4a の発現はいずれの細胞株においても認められたが、HLCs2N-K4DT では、HLCs2N および HLCs2N-K4T と比較して、これらの発現が相対的に高い傾向がみられた。TTF-1 は肺上皮細胞の分化形質に関連するマーカーであることから、HLCs2N-K4DT は肺上皮細胞としての特徴を比較的良好に保持している可能性が考えられた。また、p16INK4a は細胞周期抑制因子であり、細胞老化やストレス応答に伴って発現が上昇することも知られている。そのため、HLCs2N-K4DT における p16INK4a 発現は、細胞周期制御やストレス応答に関連する性質が完全には消失していない可能性を示すものと考えられた。

以上より、HLCs2N-K4DT は、肺上皮細胞としての特徴を一定程度保持し、毒性評価に必要な安定した増殖能を有するとともに、TTF-1 および p16INK4a の発現も比較的明瞭であったことから、本研究では CWAAP の *in vitro* 肺細胞毒性評価に用いる代表的なヒト肺由来不死化細胞株として選択した。

2. PAH および CLPAH の *in vitro* 毒性

PAH および架橋度の異なる CLPAH 系列について、A549 細胞および HLCs2N-K4DT 細胞を用いて細胞毒性を評価した (Table1, Figure 2)。A549 細胞における PAH、1CLPAH、10CLPAH および 20CLPAH の LC50 は、それぞれ 7.70、7.01、6.94 および 6.25 mg/mL であり、概ね同程度の値を示した。一方、HLCs2N-K4DT 細胞では、それぞれ 3.09、2.72、2.73 および 2.76 mg/mL であり、HLCs2N-K4DT 細胞内では概ね同程度であったものの、A549 細胞と比較して低値を示した。これらの結果から、本実験条件下では、HLCs2N-K4DT 細胞は A549 細胞よりも PAH および CLPAH に対して高い感受性を示すことが示唆された。

100CLPAH については、A549 細胞および HLCs2N-K4DT 細胞のいずれにおいても、最高濃度である 2.5 mg/mL で明らかな細胞毒性は認められず、LC50 は 2.5 mg/mL を超えると判断された。なお、100CLPAH では、2.5 mg/mL を超える濃度でゲル状となり、均一な調製および細胞への添加が困難であったため、本試験では 2.5 mg/mL を最高濃度とした。

以上より、PAH、1CLPAH、10CLPAH および 20CLPAH では、架橋度の違いによる急性の直接細胞毒性の差は限定的であった一方、使用する細胞株によって感受性が異なることが示された。

D. 考察

本研究では、正常初代培養ヒト肺細胞 HLCs2N より樹立した不死化ヒト肺細胞株 HLCs2N-K4DT を用い、PAH および架橋度の異なる CLPAH 系列の *in vitro* 肺細胞毒性を評価した。従来、肺細胞毒性評価には A549 細胞などのヒト肺腺癌由来細胞株が広く用いられているが、A549 細胞は腫瘍由来であるため、細胞死抵抗性、代謝特性、ストレス応答などが正常肺上皮細胞とは異なる可能性がある。そのため、A549 細胞のみを用いた評価では、正常肺細胞における毒性応答を十分に反映できない可能性がある。

本研究で樹立した HLCs2N-K4DT は、正常初代培養ヒト肺細胞に由来する不死化細胞株であり、p63 や TTF-1 などの肺上皮関連マーカーの発現を一定程度保持していた。また、安定した増殖能を有することから、初代培養細胞で問題となる細胞数の制限、ロット差、継代に伴う性質の変化などを軽減し、再現性の高い毒性評価に利用できる可能性がある。したがって、HLCs2N-K4DT は、初代培養細胞の生物学的特徴と、不死化細胞株としての実験的安定性を併せ持つ評価系として有用であると考えられる。

PAH、1CLPAH、10CLPAH および 20CLPAH は、A549 細胞および HLCs2N-K4DT 細胞のいずれにおいても細胞毒性を示した。各細胞株内ではこれら 4 種類の LC50 値は概ね同程度であり、少なくとも本実験条件下における急性の直接細胞毒性については、PAH から 20CLPAH までの架橋度の違いによる影響は限定的である可能性が示唆された。一方、100CLPAH については、いずれの細胞株においても最高濃度 2.5 mg/mL で明らかな毒性は認められなかったが、高濃度ではゲル化により試験濃度範囲が制限されたため、その毒性評価には慎重な解釈が必要である。

さらに、A549 細胞における PAH および CLPAH 系列の細胞毒性を、我々が A549-NRU assay を確立した際に評価した 49 化学物質 (Toxicology Letters 415, 2026, 111803) と比較することで、本物質群の相対的な毒性強度を把握することができる。本研究で検討した 5 物質をこれら 49 物質と並べて比較すると、20CLPAH、10CLPAH、1CLPAH および PAH は、A549 細胞における LC50 値に基づき、それぞれ全 54 物質中 22 位、23 位、25 位および 27 位に位置づけられた。これらの LC50 値は Aniline (GHS 政府分類の急性毒性 (吸入: 蒸気) 区分 2、粉じん・ミスト: 区分 4) や 1,2-Dichloroethane (蒸気: 区分 2) に近く、強毒性物

質ではなく、中等度の細胞毒性を示す物質群に分類されたと考えられた。なお、100CLPAH については、最高濃度 2.5 mg/mL においても LC50 に到達しなかったため、正確な毒性順位を決定することは困難である。ただし、LC50 が 2.5 mg/mL 以下であった 12 物質よりは毒性が弱いと判断されることから、順位としては少なくとも 13 位以降に位置づけられる。一方、同じ比較において、強毒性側には chloroacetone (蒸気：区分 2)、tert-butylbenzene (蒸気：区分 3)、1-hexyl mercaptan (蒸気：区分 3)、xylene (蒸気：区分 4)、sodium arsenite (粉じん・ミスト・蒸気：分類できない) などが位置し、弱毒性側には acetone (蒸気：区分外)、1,4-dioxane (蒸気：区分 4)、N,N-dimethylacetamide (蒸気：区分 3、粉じん・ミスト：区分 4)、2-methoxyethanol (蒸気：区分 4) などが位置していた。したがって、PAH および 1CLPAH～20CLPAH の A549 細胞に対する直接細胞毒性は、既知の強毒性化学物質ほど強くはないものの、明確な細胞毒性を有する中等度レベルの毒性として評価できる。

細胞株間で比較すると、HLCs2N-K4DT 細胞における LC50 値は A549 細胞よりも低値を示した。この結果から、HLCs2N-K4DT 細胞は A549 細胞よりも PAH および CLPAH による肺細胞障害に対して高い感受性を有することが示唆された。すなわち、A549 細胞では、腫瘍由来細胞としての細胞死抵抗性やストレス耐性により毒性が低く評価される可能性があるのに対し、正常肺由来不死化細胞である HLCs2N-K4DT は、より生体内のヒト肺細胞に近い毒性応答を反映する可能性がある。したがって、HLCs2N-K4DT を用いた評価系は、CWAAP のヒト肺への影響を評価するうえで、A549 細胞を用いた従来の評価系よりも外挿性を高める可能性がある。

また、CWAAP の肺毒性は、細胞への直接毒性のみで説明できるものではないと考えられる。実際の吸入曝露では、粒子の肺内沈着、粘性の変化、肺内クリアランスの遅延、マクロファージ応答、炎症および線維化反応などが複合的に関与する可能性がある。したがって、*in vitro* 細胞毒性試験は CWAAP 類縁物質の初期スクリーニングや評価優先順位付けに有用である一方、肺毒性全体を評価するためには、本研究で同時に進行中のミニブタモデルの結果や物性評価などを含め、総合的に評価する必要がある。

E. 結論

本研究では、正常初代培養ヒト肺細胞 HLCs2N より、肺上皮細胞としての特徴を保持し、かつ安定した増殖能を有する不死化ヒト肺細胞株 HLCs2N-K4DT を樹立した。HLCs2N-K4DT は、A549 細胞のような腫瘍由来細胞株と比較して、正常肺由来細胞に近い性質を保持している可能性があり、CWAAP の *in vitro* 肺細胞毒性評価に有用な評価系となる可能性が示された。

本年度は、PAH および CLPAH 系列の *in vitro* 細胞毒性に関する知見を得た。今後は、種々の物理化学的特性を有する増粘剤を対象に検討を拡大し、本評価系の有用性をさらに検証するとともに、ミニブタモデル

や物性評価の結果と併せて解析することで、CWAAP の肺毒性発現機序を明らかにする予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Vachiraarunwong A, Fujioka M, Alexander DB, Suzuki S, Guo R, Qiu G, Kawamura Y, Shibano K, Noura I, Praseatsook K, Akane H, Takasu S, Tsuda H, Ogawa K, Wanibuchi H, Gi M. Developing a novel *in vitro* toxicity assay for predicting inhalation toxicity in rats. *Toxicol Lett*. 2026 Jan;415:111803. doi:10.1016/j.toxlet.2025.111803. Epub 2025 Dec 10. PMID: 41386503.
- 2 Maeda-Tateishi T, Nagata Y, Imanishi Y, Hirakawa T, Tan SS, Emoto M, Gi M. Evaluation of tumor clonality with chemical carcinogenesis in a mouse model of visualized X chromosome inactivation. *J Toxicol Pathol*. 2026 Jan;39(1):31-38. doi: 10.1293/tox.2025-0075. Epub 2025 Oct 17. PMID: 41583343; PMCID: PMC12826865.
- 3 Gi M, Suzuki S, Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander WT, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Guo R, Qiu G, Noura I, Kakehashi A, Xie XL, Tsuruoka S, Hirose A, Naiki-Ito A, Tsuda H, Wanibuchi H. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways. *Nanomaterials (Basel)*. 2025 Nov 29;15(23):1806. doi: 10.3390/nano15231806. PMID: 41369478; PMCID: PMC12693446.
- 4 Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Ogawa K, Gi M, Naiki-Ito A, Abdallah S, Tsuda H. Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment. *J Appl Toxicol*. 2025 Oct 9. doi: 10.1002/jat.4940. Epub ahead of print. PMID: 41067725.
- 5 Guo R, Gi M, Kiyono T, Vachiraarunwong A, Suzuki S, Fujioka M, Qiu G, Praseatsook K, Kawamura Y, Kakehashi A, Noura I, Xie X, Wanibuchi H. Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in Toxicity Assessment of Arsenicals. *Toxics*. 2025 Sep 29;13(10):828. doi: 10.3390/toxics13100828. PMID: 41150527; PMCID: PMC12568184.
- 6 Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, Takase H, Taquahashi Y, Hojo M, Maeno A, Fukamachi K, Gi M, Hirose A, Tsuruoka S, Takahashi S, Tsuda H, Naiki-Ito A. Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs. *Nanomaterials*

- (Basel). 2025 Sep 11;15(18):1402. doi: 10.3390/nano15181402. PMID: 41003038; PMCID: PMC12472363.
- 7 Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Uehara S, Yokota Y, Noura I, Fujioka M, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. Metabolism and effects of acetoaceto-*o*-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J Toxicol Pathol*. 2025 Jan;38(1):59-67. doi: 10.1293/tox.2024-0042. Epub 2024 Sep 18. PMID: 39839725; PMCID: PMC11745495.
 - 8 Kakehashi A, Suzuki S, Nishidoi Y, Hagihara A, Ikenaga H, Shiota M, Qiu G, Noura I, Kuwae Y, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Gi M, Kawada N, Wanibuchi H. The Impact of Peroxiredoxin 3 on Molecular Testing, Diagnosis, and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*. 2025 Jul 1;17(13):2212. doi: 10.3390/cancers17132212. PMID: 40647510; PMCID: PMC12249400.
 - 9 Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Sato K, Dissook S, Wanibuchi H, Taya S, Wongpoomchai R, Dejkriengkraikul P, Gi M, Yodkeeree S. Chemopreventive Effects of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae Protein Hydrolysates in a Rat Model of Early-Stage Colorectal Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2025 Jun 20;26(13):5955. doi: 10.3390/ijms26135955. PMID: 40649735; PMCID: PMC12249673.
 - 10 Noura I, Suzuki S, Gi M, Fujioka M, Matsue T, Kakehashi A, Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J Toxicol Pathol*. 2025 Apr;38(2):147-154. doi: 10.1293/tox.2024-0069. Epub 2024 Dec 10. PMID: 40190623; PMCID: PMC11966118.
 - 11 Turner MC, Godderis L, Guénel P, Hopf N, Quintanilla-Vega B, Soares-Lima SC, Chaiklieng S, Da Silva J, Fustinoni S, Gi M, Heck JE, Huaux F, Johanson G, Kirkeleit J, Kirsanov K, Richiardi L, Teixeira JP, Terron A, Topinka J, White MC, Benbrahim-Tallaa L, Facchin C, Kunzmann A, Madia F, Pasqual E, Wedekind R, Deng X, Suonio E, Viegas S, Barry A, Dolatkhah R, Dongoran RA, Gonzalez-Gil EM, Onyije FM, Mattock H, de Conti A, Schubauer-Berigan MK. Carcinogenicity of automotive gasoline and some oxygenated gasoline additives. *Lancet Oncol*. 2025 Mar 20:S1470-2045(25)00165-2. doi: 10.1016/S1470-2045(25)00165-2. PMID: 40127668; PMCID: PMC12303572.
 - 12 Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Taya S, Setthaya P, Sato K, Wanibuchi H, Wongpoomchai R, Dejkriengkraikul P, Gi M, Yodkeree S. Anticancer and Antioxidant Effects of Bioactive Peptides from Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*). *Nutrients*. 2025 Feb 11;17(4):645. doi: 10.3390/nu17040645. PMID: 40004973; PMCID: PMC11858422.
 - 13 Nakano M, Gi M, Toyooka T, Suzuki S, Wanibuchi H, Takebayashi T. Occupational health topics series on the effects of chemicals: epidemiological and toxicological risk assessments of ortho-toluidine for bladder cancer. *J Occup Health*. 2025 Jan 7;67(1):uiaf005. doi: 10.1093/joccuh/uiaf005. Erratum in: *J Occup Health*. 2025 Jan 7;67(1):uiaf024. doi: 10.1093/joccuh/uiaf024. PMID: 39930727; PMCID: PMC11858003.
 - 14 Uchibori Y, Suekuni M, Kokaji Y, Yoshida K, Kiyono T, Kasahara Y, Fujita M. AmNA-Modified Antisense Oligonucleotide Targeting MCM8 as a Cancer-Specific Chemosensitizer for Platinum Compounds. *Cancer Sci*. 2025 May;116(5):1405-1416. doi: 10.1111/cas.70024. Epub 2025 Mar 17.
 - 15 Inoko A, Soga N, Suzuki M, Kiyono T, Ikenouchi J, Kojima T, Sato Y, Saito D, Miyamoto T, Goshima N, Ito H, Kasai K. Long-term expansion of basal cells and the novel differentiation methods identify mechanisms for switching Claudin expression in normal epithelia. *Sci Rep*. 2025 Apr 9;15(1):12172. doi: 10.1038/s41598-025-95463-3.
 - 16 Yamaji M, Nakahara T, Nakanishi T, Aoyama-Kikawa S, Yamaguchi K, Furukawa Y, Nakamura M, Okada T, Tabata H, Fuse R, Shimizu E, Kasajima R, Imoto S, Kukimoto I, Saito I, and Kiyono T: Disruption of Human Papillomavirus 16 E6/E7 Genes Using All-in-One Adenovirus Vectors Expressing Eight Double-Nicking Guide RNAs. *International journal of molecular sciences* (IF=4.9) 2025 Sep 5;26(17):8685. Doi: 10.3390/ijms26178685 PMC: 12429375.
 - 17 Otsuka A, Shimazoe M, Watanabe S, Minami K, Tamura S, Kiyono T, Takeshita F, Maeshima K: Single-nucleosome imaging uncovers biphasic chromatin dynamics in inducible human transformed cells. *Cell Struct Funct* (IF=2.2) 2025 Dec 23. PMID: 41443834 DOI: 10.1247/csf.25147.
 - 18 Bai L, Takahashi M, Kobayashi J, Eitsuka T, Matsusaka H, Ozaki T, Sugano E, Tomita H, Xu Y, Kawamura K, Nakagawa K, Kiyono T, Fukuda T: Engineering Immortalized Bovine Granulosa Cells Using a Triple-Gene Approach: Mutant CDK4, Cyclin D1, and TERT. *Cell Biology International* (IF=3.1) 2026 Jan 21: 50(2) e70126. PMID: 41562311 PMCID: PMC12821082 DOI: 10.1002/cbin.70126.
 - 19 Otsuka A, Shimazoe MA, Watanabe S, Minami K,

Tamura S, Kiyono T, Takeshita F, Maeshima K. Single-nucleosome imaging uncovers biphasic chromatin dynamics in inducible human transformed cells. *Cell Struct Funct*. 2026 Feb 7;51(1):37-53. doi: 10.1247/csf.25147. Epub 2025 Dec 23. PMID: 41443834.

2. 学会発表

- 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、梯アンナ、鰐渕英機. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん. 第114回日本病理学会総会、宮城（2025年4月17-19日）
- Arpamas Vachiraarunwong、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、邱桂鈺、郭潤傑、野浦郁恵、梯アンナ、Kwanchanok Praseatsook、鰐渕英機. ラットの急性吸入毒性を予測する新規 in vitro 毒性試験系の開発. 第52回日本毒性学会学術年会、沖縄（2025年7月2-4日）
- 郭潤傑、Arpamas Vachiraarunwong、鈴木周五、藤岡正喜、Guiyu Qiu、河村百合菜、梯アンナ、鰐渕英機、魏民. DMH投与ラットにおける大腸発がん初期の遺伝子発現変動. 第84回日本癌学会学術総会、石川（2025年9月25-27日）
- 邱桂鈺、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、Runjie Guo、野浦郁恵、河村百合菜、鰐渕英機. カーボンナノチューブ誘発ラット肺発がんにおける物性の違いを踏まえた遺伝子発現変化の比較. 第84回日本癌学会学術総会、石川（2025年9月25-27日）
- Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Kawamura Yurina, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Structure-Dependent Hepatotoxicity and Carcinogenic Potential of PFASs in Immortalized Human Liver Cells. 第84回日本癌学会学術総会、石川（2025年9月25-27日）
- Arpamas Vachiraarunwong, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Runjie Guo, Guiyu Qiu, Ikue Noura, Kawamura Yurina, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi, Min Gi. Comparative hepatotoxicity of carboxylate and sulfonate per- and polyfluoroalkyl substances in immortalized human hepatocytes. 第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、大阪（2025年10月24-25日）
- 清野透、中原知美、青山(木川)聖美、山口貴世志、古川洋一、中村真理子、山地恵、岡田只士、田畑裕貴、布施涼子、清水英悟、笠島理加、井元清哉、柊元巖、斎藤泉、中西友子: 8個の gRNA と Cas9 nickase を発現するアデノウイルスベクターによるがん細胞内での HPV16 の E6E7 遺伝子破壊. 第84回日本癌学会学術集会. 2025年9月25日 金沢
- 長谷川舞瑠、中村俊平、佐々木怜、白蘭蘭、菅野江里子、富田浩史、尾崎拓、清野透、瀬川亮、福田智一: Immortalization of Japanese Black Cattle derived myoblast with expression of cell cycle regulators. 日本畜産学会 133 回大会. 2025年9月13日 岐阜
- 皆川丈和、森本素子、白蘭蘭、富田 浩史、菅野江里子、清野透、福田智一: ミニチュアダックスフント由来線維芽細胞に対するプレドニゾン処理が誘発する遺伝子発現変化. 第31回日本野生動物医学会大会. 2025年9月27日 盛岡
- 松倉華美、佐々木怜、富田浩史、菅野江里子、白蘭蘭、片山雅史、清野透、大沼学、福田智一: 四国のツキノワグマ線維芽細胞の無限分裂化. 第31回日本野生動物医学会大会. 2025年9月27日 盛岡
- Himari Matsusaka, Eiko Uno, Kazuma Suda, Lanlan Bail, Eriko Suganol, Hiroshi Tomital, Tohru Kiyono, Sayo Kashiwagi, Takashi Shimizu, Tsuyoshi Ishii, Tomokazu Fukuda: Functional characterization of immortalized human adipose-derived mesenchymal stem cells. 日本動物細胞工学会 2025 年度大会 2025 年 12 月 8 日～11 日 大阪
- 河村百合菜、ワチラアルンウオン アルパマス、藤岡正喜、鈴木周五、邱桂鈺、郭潤傑、野浦郁恵、梯アンナ、山口貴嗣、鰐渕英機、魏民. ヒト肺腺がん由来細胞株 A549 を用いたニュートラルレッドアッセイによる化学物質吸入毒性の in vitro 代替評価法の開発. 第42回日本毒性病理学会総会及び学術集会、愛知（2026年1月22-23日）
- 郭潤傑、Arpamas Vachiraarunwong、鈴木周五、藤岡正喜、Guiyu Qiu、河村百合菜、潘軍成、梯アンナ、鰐渕英機、魏民. Oncomodulin as an early marker in rat models of urinary bladder carcinogenesis. 2025 年度文部科学省 学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会、滋賀（2026年2月19-20日）
- Suzuki S, Fujioka M, Qiu GY, Vachiraarunwong A, Kakehashi A, and Gi M. Evaluation of the Hepatotoxic Effects of Various PFAS in a Short-Term Rat Study. Society of Toxicology 2026 Annual Meeting and ToxExpo, San Diego, U.S.A. (Mar. 22-25, 2026)
- Gi M, Vachiraarunwong A, Fujioka M, Kawamura Y, Kakehashi A, Wanibuchi H, Suzuki S. A novel in vitro toxicology assay for predicting inhalation toxicity in rats. Society of Toxicology 2026 Annual Meeting and ToxExpo, San Diego, U.S.A. (Mar. 22-25, 2026)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

Immortalized human lung cells: HLCs2N cells

Cell line	Construction
HLCs2N-T	TERT
HLCs2N-K4DT	TERT/ CDK4R24C + Cyclin D1
HLCs2N-K4T	TERT/ CDK4R24C
HLCs2N-Tet-K4DT	TERT/ EpCAM promoter-TetOff (CDK4R24C + Cyclin D1)
HLCs2N-Tet-K4T	TERT/ EpCAM promoter-TetOff (CDK4R24C)

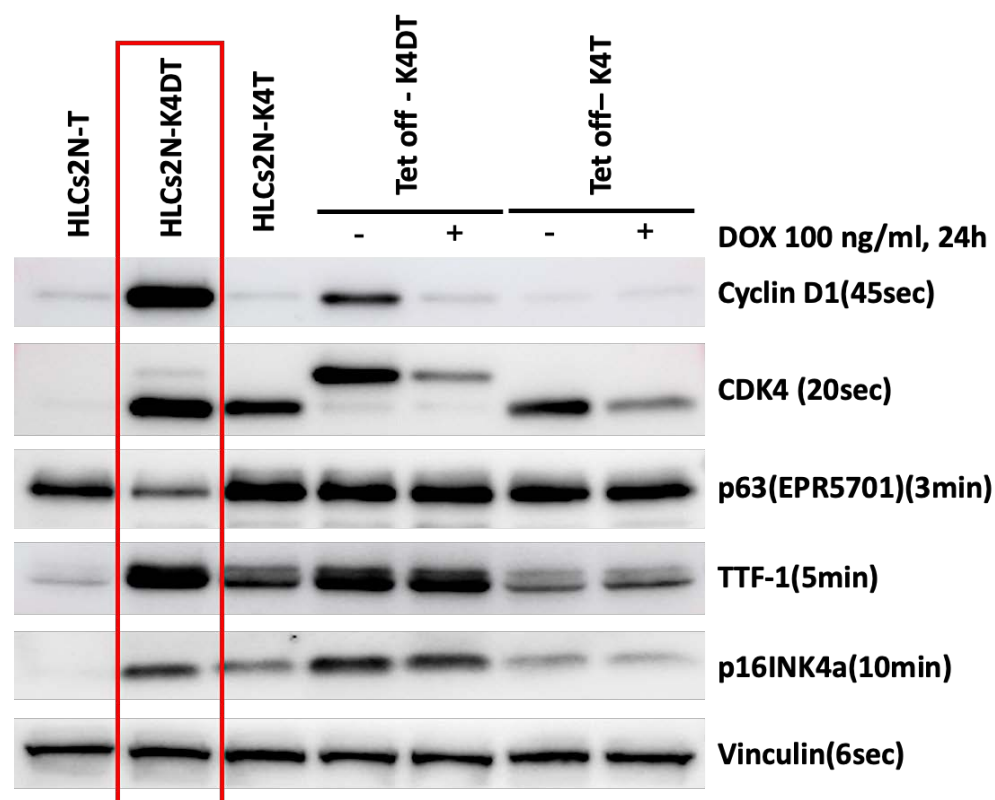


Figure 1. Characterization of HLCs2N-K4DT cells by Western blot analysis.

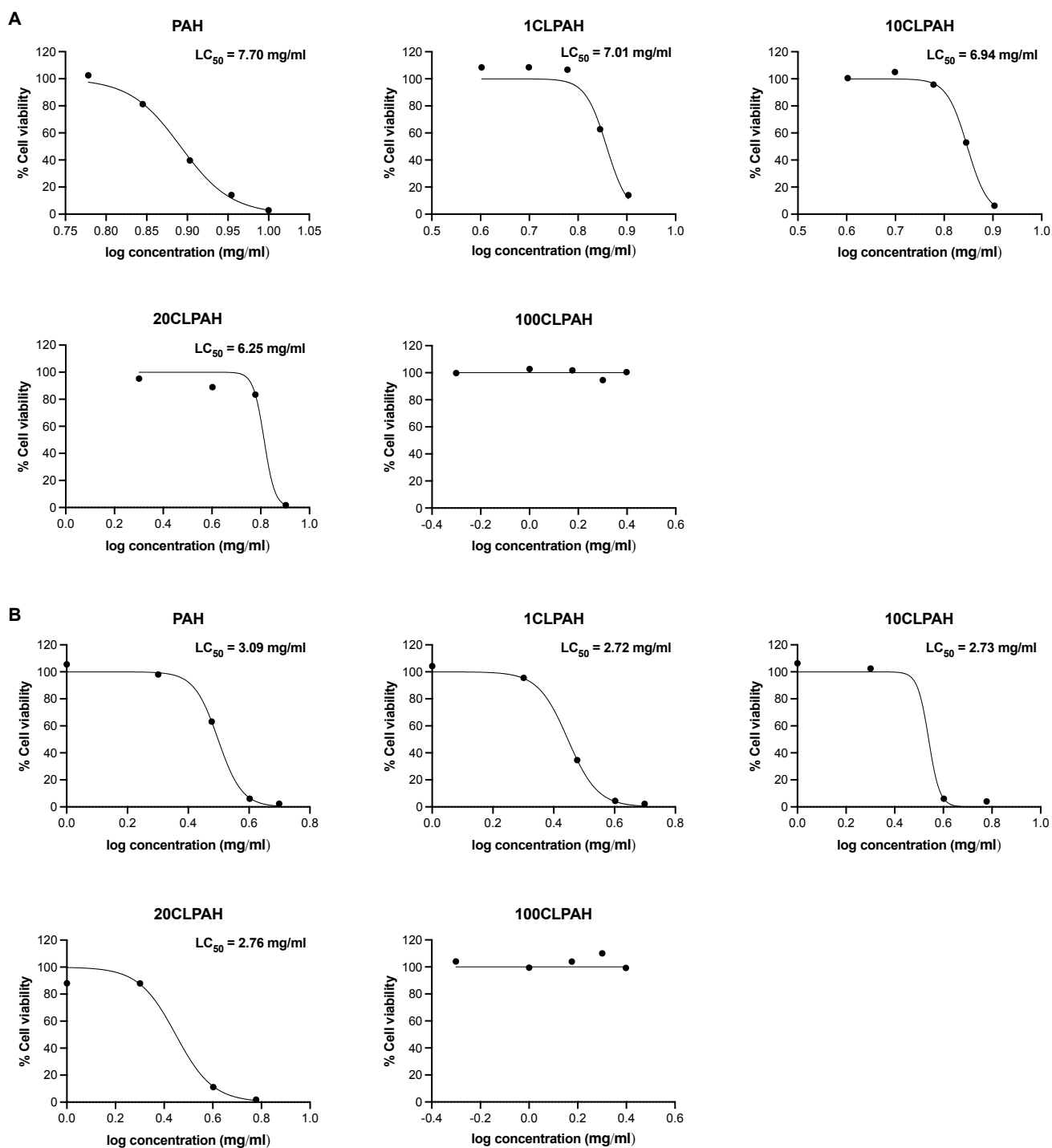


Figure 2. Dose–response curves and LC₅₀ values of all tested chemicals in (A) human lung adenocarcinoma cells (A549) and (B) immortalized human lung cells (HLCs2N-K4DT).

Table 1. Cytotoxicity of PAH and CLPAH in A549 and HLCs2N-K4DT cells

Chemicals	A549 cells		HLCs2N-K4DT cells	
	Concentration range (mg/ml) ^a	LC ₅₀ (mg/ml)	Concentration range (mg/ml) ^a	LC ₅₀ (mg/ml)
PAH	6 – 10	7.70	1 – 5	3.09
1 CLPAH	4 – 8	7.01	1 – 5	2.72
10 CLPAH	4 – 8	6.94	1 – 6	2.73
20 CLPAH	2 – 8	6.25	1 – 6	2.76
100 CLPAH	0.5 – 2.5	> 2.50*	0.5 – 2.5	> 2.50 [#]

^a Concentration range used for calculation of LC₅₀.

* Cell viability at 2.5 mg/mL was 100.4%.

[#] # Cell viability at 2.5 mg/mL was 99.3%.

PAH: polyacrylic acid, CLPAH: cross-linked polyacrylic acid.

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和7年度分担研究報告書

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物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 (250401-03)
分担研究項目：ブタ肺における疾患関連線維芽細胞の探索

研究分担者 山野 荘太郎 労働安全衛生総合研究所 病理グループ 上席試験研究員

研究要旨

架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物 (CWAAP) による職業性肺疾患の最大の特徴は、齧歯類モデルでは発達の乏しい「広義間質 (軸位間質、小葉間隔壁等)」を主座とする線維化進展にある。本分担研究では、ヒトと高度に相同な肺構造を有するマイクロミニピッグを用い、高感度シングルセル解析 (TAS-Seq) および空間オミクス解析 (Stereo-Seq OMNI) を駆使して、線維化病態の鍵となる間葉系細胞の特定を試みた。

まず、正常ブタ肺アトラスの構築により、13種の独立した間葉系サブセットを同定した。特筆すべきは、広義間質を構成する外膜線維芽細胞 (Adventitial Fibroblast: AdvF) 及び中枢域における AdvF の亜種である炎症応答線維芽細胞 (Inflammatory Fibroblast: InflamF) が、弾性線維アセンブリ (MFAP5, FBLN2) およびマトリックス架橋 (LOX ファミリー) に関わるヒト型機能遺伝子群を強力に保持していることを分子レベルで実証した点である。これは、ブタがヒト特有の強靱な間質構造を構築・維持するための分子的基盤を備えていることを示している。

さらに、CWAAP 誘発病変に対する空間オミクス解析の結果、著明に肥厚した軸位間質および小葉間隔壁の病変部において、COL3A1 及び PI16 陽性細胞が高度に集積・動員されている事実を同定した。一方、肺胞壁に局在する肺胞線維芽細胞 (AlvF) は病変形成への直接的な関与が限定的であった。

以上の成果は、特定の病的ニッチに動員された PI16 陽性細胞系譜が、CWAAP 誘発性線維化における主要な疾患責任細胞であることを強く示唆するものである。本研究は、齧歯類モデルにおける解剖学的・分子的制約 (Biological Mask 現象) を克服し、ヒト職業性肺疾患の病態解明および外挿性の高いリスク評価においてブタモデルが不可欠かつ極めて有用な解析基盤であることを実証した。

【研究成果の概要】

A. 研究目的

近年、架橋型アクリル酸系水溶性高分子化合物 (以下 CWAAP) の吸入曝露に伴う急進的な間質性肺炎および肺線維症が、製造現場の労働者において相次いで報告され、労災認定に至っている。ヒトの CWAAP 肺、結晶質シリカによる珪肺、石綿による石綿肺等吸入性エアロゾルによる職業性肺疾患の最大の病理組織学的特徴は、齧歯類モデルでは発達の乏しい「広義間質 (軸位間質、小葉間隔壁、胸膜下間質)」を主座とする線維化進展であり、特に細気管支壁在性線維化である。本分担研究の目的は、肺の解剖学的構造がヒトに極めて近似する大型動物 (ブタ) を用い、正常肺に存在する間葉系細胞の種類や特徴について網羅的に明らかにすると共に、CWAAP 曝露によって誘発される広義間質の疾患微小環境を影響する間葉系細胞を探索することである。

特に、線維化の実行部隊である線維芽細胞 (Fibroblast) の多様性を、先進的ゲノム解析技術である TAS-Seq (標的シングルセル RNA シークエンシング) および空間オミクス解析 (Stereo-Seq

OMNI) を駆使して網羅的に定義する。正常マイクロミニピッグの肺間葉系細胞の精密なアトラスを構築し、それを「物差し」として CWAAP 誘発病変の空間的な責任細胞系譜を特定することで、ヒト職業性肺疾患の病態機序解明および早期診断・治療標的の同定のための分子基盤を確立することを目指した。

B. 研究方法

1. 実験動物および CWAAP 誘発病変モデルの作製

実験動物には、ヒトへの外挿性が高く、広義間質の発達が著しいマイクロミニピッグ

(MicroMiniPig, 富士マイクラ株式会社, 静岡県, 日本) を用いた。正常肺アトラス構築用に健常雄性個体 (n=3) を使用し、疾患モデルには CWAAP (40 mg/m³ 相当懸濁液) を気管内単回投与し、3ヶ月間の回復期間を経て重篤な広義間質病変を形成させた個体 (n=2) を用いた。組織採取に際しては、肺の中枢から末梢に至る解剖学的勾配を反映させるため、末梢領域 (胸膜含有: Group A、非含有: Group B) および中枢気道・大血管領域 (Group C) の3部位から厳密なサンプリングを実施した。

2. TAS-Seq 法による高感度シングルセル RNA シークエンシング

なお、本報告書のうち正常マイクロミニピッグ肺の TAS-Seq 解析 (図 1~7、および結果 C-0~C-5) に用いた基盤データは、令和 7 年度労災疾病臨床研究事業費補助金 (課題番号: 240202-02) における分担研究 (石綿関連疾患研究) と共通のリファレンスアトラスとして構築・使用しているものである。

摘出した肺組織を、肺解離キット (Multi Tissue Dissociation Kit 1, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用い、37℃の恒温槽内で機械的・酵素的に消化し、シングルセル懸濁液を調製した。その後、死細胞除去および CD31+/CD45+細胞のソーティング (内皮・免疫系) と CD31-/CD45-細胞 (間葉系・上皮系) を 1:1 でソーティング

(FACS Aria III, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を行い、間葉系細胞を高純度に濃縮した。

細胞捕捉およびライブラリ調製には、BD Rhapsody Express システム (BD Biosciences) を用い、TAS-Seq 法 (Shichino et al., 2021) に従い、逆転写反応および cDNA 増幅を実施した。TAS-Seq 法は従来の全トランスクリプトーム解析と比較し、転写産物の捕捉感度が極めて高く低発現な転写因子やシグナル分子の検出に優れている。調整したライブラリは、NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いシークエンシングを行った。

3. データ解析パイプライン

得られた Raw データに対し、SAW (STOmics Analysis Workflow) および Seurat (v4.4.0, R v4.3.2) を用いて解析した。低品質な細胞 (Mito < 5%, nFeature < 200) を除去後、合計 25,305 細胞を統合した。さらに、間葉系細胞の核心部を抽出するため、COL1A1 陽性細胞 (7,643 細胞) に対してサブクラスターリングを実施し、Harmony アルゴリズムによるバッチ補正を経て、13 の独立した間葉系サブセットを同定した。

4. 空間オミクス解析 (Stereo-Seq OMNI)

CWAAP 誘発肺病変の FFPE (ホルマリン固定パラフィン包埋) ブロックから 10 μ m 厚の切片を作成し、脱パラフィン、親水化、脱架橋 (Decrosslinking) および透過処理 (Permeabilization) の前処理を行った後、Stereo-Seq OMNI V2 チップ

(BGI/STOmics, Shenzhen, China) 上にレジストレーションした。

Stereo-Seq (Spatio-Temporal Enhanced Resolution Omics-sequencing) は、DNB (DNA Nanoball) 技術を基盤とした高密度パターンニングア

レイを用いることで、プローブ間隔 500nm というナノスケールの解像度を実現しており、1 細胞あたり数百のキャプチャスポットを確保することで、真のシングルセルおよびサブセラー解像度での空間的遺伝子発現情報の捕捉を可能とする技術である。

特に、本研究で用いた OMNI プロトコル (Li et al., 2025) は、FFPE 組織における RNA の断片化やホルマリン架橋といった解析上の重大な課題を克服するために開発された手法である。従来の空間オミクスで主流であった Poly-A 配列を標的とする mRNA キャプチャとは異なり、ランダムプライマーを用いた in situ での Total RNA キャプチャ (Random primed in situ total RNA capturing) を採用している (図 8)。これにより、ホルマリン固定によって断片化した RNA であっても高効率かつ網羅的に捕捉し、組織切片上で cDNA 合成とチップへのライゲーションを完結させることが可能となった。

キャプチャした RNA 由来のライブラリは、DNBSEQ-G400 (MGI Tech, China) にてシークエンシングを実施した。取得された空間座標データと発現データは、Stereomap v4.0 (STOmics) を用いて解析を行い、高精細な細胞セグメンテーションを実施した。これにより、エラスティカ・ヴァンギーソン染色等で確認された病理組織学的な小葉間隔壁肥厚部位と、特定遺伝子シグネチャーの局在を 1 細胞レベルで正確に照合した。

C. 研究結果

C-0. 正常ブタ肺全細胞景観および系統特定 (図1, 2)

TAS-Seq 解析の結果、正常ブタ肺から得られた 25,305 細胞 (図1B) は、44 の独立したクラスターとして分離された。系統マーカーの検討 (図1D, E) により、EPCAM (上皮系)、COL1A1 (間葉系)、CLDN5 (内皮系)、PTPRC (免疫系) の発現を確認し、間葉系細胞及び上皮の境界を特定した。

C-1. 肺間葉系細胞における13サブクラスターの定義 (図2, 3, 4)

本解析では、COL1A1 陽性細胞を対象とした高解像度サブクラスター解析により、計 7,643 個の間葉系細胞を同定した。特筆すべき点として、マウスのシングルセル解析では肺泡領域由来の Alveolar_Fib が圧倒的多数を占めることが一般的であるが、本解析の結果では、最多の Ductal_MyoF (1,453 個) および 2 位の Adventitial_Fib (1,111 個) がいずれも Alveolar_Fib (805 個) を大きく上回る数で同定された。これは、ブタがヒトと同様に極めて発達した広義間質 (大血管や胸膜、気道周囲の鞘状組織) を保持していることを定量的に裏付けていた。

また、サンプリング領域 (領域A: 胸膜側、領域B: 実質末梢、領域C: 中枢側) を分けた実験デザインにより、共通の系譜に属しながら局在を異にする解剖学的亜種が明確に分離された。各クラスターの機能的

定義および分布特性を以下に記す。

14. **Ductal_MyoF** (1,453個) : 肺胞管入口部の括約筋的な構造を支える細胞であり、領域B (実質末梢) において最も優位に認められた。
15. **Adventitial_Fib (AdvF)** (1,111個) : 血管および気道の外膜を包む鞘細胞であり、領域AおよびB (末梢側) に広く分布し、弾性線維のアセンブリを担っていた。
16. **Bronchial_MyoF** (960個) : 気道平滑筋束に隣接して分布する物理負荷適応型の細胞であり、主に領域Bにおいて同定された。
17. **Alveolar_Fib (AlvF)** (805個) : 肺胞壁に常在し上皮支持を担うニッチ細胞 (MANC) であり、領域AおよびBの実質領域に集積していた。
18. **Chondrocyte** (786個) : 肺の骨格を成す軟骨細胞であり、発達した腺組織を伴う領域C (中枢側) にのみ特異的に認められた。
19. **Inflam_Fib (InflamF)** (550個) : **Adventitial_Fib** と多くのマーカー (PI16, DPT等) を共有する系譜であるが、領域Cに優位に認められた。UMAP上でも **Adventitial_Fib** と近接しており、中枢側における炎症応答型亜種として定義された。
20. **ASM** (449個) : 気道周囲を螺旋状に取り囲む平滑筋細胞であり、領域AおよびBの気道沿いに分布していた。
21. **Axial_MyoF** (422個) : 肺門部の気管支に特異的な筋線維芽細胞であり、免疫制御機能を備え、領域Cに極めて優位に局在した。
22. **Pericyte** (409個) : 毛細血管の内皮を裏打ちする周細胞であり、中枢側の血管系を含む領域Cにおいて高い割合で認められた。
23. **Vascular_Fib (VascF)** (283個) : **Alveolar_Fib** と同じ系譜 (NPNT, FGFR4陽性) に属するが、肺胞と小葉間隔壁や細動脈の接触部位という特殊なニッチに局在し、領域AおよびBにおいて同定された。
24. **Arterial_SMC** (229個) : 肺動脈中膜を構成する高度な収縮ユニットであり、領域Bを中心に末梢血管系において広く認められた。
25. **VSM** (104個) : 血管壁を構成する平滑筋細胞であり、今回の解析では領域A (胸膜側) において最も dominant に認められた。
26. **Schwann_cell** (82個) : 末梢神経を絶縁する神経随伴細胞であり、領域CおよびBの中枢寄り領域に局在していた。

C-2. 外膜系譜 (PI16陽性) : 弾性線維形成と免疫制御ハブの分業 (図4-6)

外膜系譜に属する AdvF と InflamF は、共通して PI16, LOX, HTRA3, ECM1, C4A, MFAP5 といった強力な遺伝子シグネチャーを共有しており、同一の細胞系統に属する「解剖学的亜種」であることが示唆

された。しかし、詳細な発現プロファイルの比較により、両者の間には以下の通り明確な機能的分業が認められた。

AdvFにおいては、弾性線維の主要構成成分である FBLN2 や、組織の機械的特性を維持する ASPN が優位に発現していた。特に MFAP5 と FBLN2 は弾性線維のアセンブリ (組み立て) に必須の糖タンパク質であり、これに加え、組織の硬化 (架橋) を直接担う LOX (Lysyl Oxidase) ファミリーや、細胞外マトリックス (ECM) の品質管理を司る HTRA3 や ASPN が集積していた。これは、AdvFが物理的な「鞘」として、大血管や気道の外膜構造を強固に構築・維持する役割に特化していることを裏付けていた。

対照的に、中枢側に優位に局在した InflamFにおいては、ブタにおいて極めて鋭敏な新規指標である CRABP1 (レチノイン酸結合タンパク質) や RARRES1 を獲得していた。機能面では、補体系の活性化因子である CFB, C2, C3, C4A や、免疫細胞の強力な遊走因子である CXCL12, CCL2 を高発現しており、単なる支持細胞を超えた免疫制御ハブとして、初期の炎症応答や免疫細胞の動員を司る特殊な機能を獲得した亜種であることが判明した。

外膜系譜に属する AdvF および InflamF は、先行研究において全身の多様な組織に普遍的に存在し、組織傷害時のリザーバーとして機能する「Universal fibroblast」に相当する遺伝子シグネチャーを提示した。本解析において、AdvF および InflamF はいずれも PI16, DPT, CD34 を高発現しており、これら幹細胞性に関連する共通マーカーを保持していることが認められた。特に DPT や CD34 は、ヒトの多様な臓器において線維芽細胞の前駆状態を定義する指標として知られており、ブタの肺外膜系譜が「未分化なリザーバー細胞」としてのポテンシャルを有していることが分子レベルで裏付けられた。

一方で、マウスの PI16+ 線維芽細胞において主要な指標とされる IL33, CCL11, ADH7, DPP4 の発現を詳細に検討したところ、本解析のブタ AdvF/InflamF クラスターにおいては、これらの遺伝子は完全に陰性あるいは極めて微弱な発現に留まっていることが判明した (図6B)。マウスを用いた先行研究では、外膜系細胞は IL33 等を介した 2型免疫応答の指示細胞としての側面が強調されてきたが、ブタにおいてはこれらのマウス型シグネチャーが欠如していた。

この結果は、ブタの肺外膜系譜が、マウス特有の免疫学的プロファイルとは明確に異なり、ヒトの「Universal fibroblast」により近い分子的特徴を保持していることを示唆している。すなわち、サンプリング領域 (領域A, B, C) を分けることで捉えられた AdvF (末梢側構造維持型) と InflamF (中枢側免疫制御型) の機能分化は、ヒト型 Universal fibroblast が局所のニッチに応じて専門分化した姿であると解釈された。

C-3. 肺胞・血管系譜 (NPNT陽性) : 代謝活性型ニッチと血管走行ガイダンス (図4, 5, 7)

肺胞壁を主座とする Alveolar_Fib (AlvF) と、血管随伴性の Vascular_Fib (VascF) は、いずれも ITGA8, COL13A1, FGFR4, CES1, SOD3, A2M, VEGFD を核とした共通の系譜として同定された。これらの共通因子は、肺胞領域における恒常性維持や脂質代謝、酸化ストレス保護という本系統の基盤的機能を象徴していた。

AlvFにおいては、肺胞上皮 (AT2) の接着を直接助ける NPNT (Nephronectin) や、上皮支持シグナルを担う FGFR4、および脂質代謝酵素 CES1 を強力に発現しており、ヒト型 MANC (Mesenchymal Alveolar Niche Cell) の形質を再現していた。さらに本解析では、心肺の発生に関与する GJA5 (Connexin 40) が AlvF 優位に認められた。これは、AT2 と密接に接触し、細胞間コミュニケーションを介して上皮の分化や恒常性を直接支持する機能を裏付けるものである。特筆すべきは、マウスで顕著な脂質貯蔵型 (Lipofibroblast) の指標である PLIN2, PPARG, LRAT, RBP1 がブタでは完全に陰性であった点である。しかし、脂質輸送を担う APOE, LPL, FABP4 の発現は認められ、ブタはヒトと同様に「貯蔵」ではなく「能動的な代謝・輸送」によって肺胞環境を制御する代謝活性型ニッチを有していることが判明した。

一方で、血管や隔壁境界部に局在する VascF においては、細胞骨格制御に関わる DOCK4 や、微小管モータータンパク質 KIF26B、マトリックス修飾酵素 UST、さらに血管走行の誘導に関わる受容体 GRID2, PTPRD、および ECM 微細調節因子である ADAMTSL1, ADAMTS17 の特異的な集積が認められた。これは、肺胞壁から血管走行路へと移行する微細な解剖学的境界において、血管ネットワークの構築や維持を物理的・分子的にガイドする専門的な役割を担っていることを示唆している。

C-4. 筋線維芽細胞系譜: 物理負荷適応とニッチ形成 (図4, 5)

Myofibroblast (MyoF) 系譜として同定された Ductal_MyoF と Bronchial_MyoF は、共通して WIF1, GREM1, CLDN11, WNT11, FGF18 といったシグナル調節因子を発現していた。両者は共に ACTA2, TAGLN, MYH11 といった収縮関連マーカーを豊富に保持する一方で、中間径フィラメントである DES (Desmin) が陰性であるという、成熟平滑筋細胞とは一線を画す「生理的筋線維芽細胞」としての共通シグネチャーを提示した。

Ductal_MyoF (肺胞管入口部の括約筋) においては、Hedgehogシグナルの抑制因子 HHIP や Wnt拮抗因子 WIF1 を高発現していた。これらは気道と肺胞の接続部において、幹細胞ニッチの恒常性を保つニッチとして機能していることが推測された。対照

的に、気道周囲に局在する Bronchial_MyoF においては、PDZRN4, KCNQ5, TRPC4 の特異的な発現が新規に同定された。これらの遺伝子群は機械刺激受容やカルシウムチャネル制御に関与しており、気道の収縮・拡張に伴う物理的な負荷に動的に適応するための専門的なプログラムを保持していることが示された。

C-5. 軸位間質系譜: 中枢気道領域の免疫制御ハブ (図4, 5)

Axial_MyoF (軸位間質線維芽細胞) は、主に領域 C (中枢気道・大血管領域) に極めて特異的に局在するクラスターとして同定された。本細胞は血管平滑筋細胞 (VSM) や周細胞 (Pericyte) と共通のシグネチャー (NOTCH3, DES 等) を呈する一方で、免疫細胞の動員を司るケモカイン CCL19, CCL2 を極めて強力に産生している点が最大の特徴である。

解剖学的に中枢側の太い気管支を包む軸位間質に位置する本細胞は、石綿等の有害物質吸入時に、リンパ系へと続く道筋でマクロファージやリンパ球を動員する免疫制御ハブとしての役割を担っていると推測される。これはヒトの太い気道で見つかっている IR-fibro と相同な細胞であり、中枢側における初動の免疫応答を統御する重要なニッチとして機能している。

C-6. 空間オミクスによる病変部位の分子動態 (図9-11)

マイクロミニピッグに CWAAP を肺内投与後 3 ヶ月回復期間をおいた後に解剖したホルマリン固定パラフィン標本を用いた。事前にエラスティカヴァンギーソン染色にて病変部を病理観察した結果、広義間質に線維性肥厚が観察される一方で、肺胞領域では著変は認められなかった (図 9A)。細気管支と細動脈で構成さえる軸位間質 (図 9B) 及び小葉間隔壁 (図 9C) では、顕著な膠原線維の増加が観察され間質の肥厚が認められると共に、弾性線維も散見された。また、これらの線維性肥厚病変は一部で繋がっており (図 9A)、臨床で散見される架橋線維化も生じていることが明らかとなった。

CWAAP投与後の病理組織において認められた病変部位を含む肺組織に対して、空間オミクス (図10) を解析した。その結果、肺組織からは病変部からも十分量遺伝子が検出されており、クラスター解析の結果、合計35のクラスターが同定された。さらに、クラスター毎に局在を検討した結果、クラスター 1 のマーカーであり、線維化の指標となる COL3A1 が病変部に局在し、さらに PI16 陽性細胞が高度に集積していることを同定した。これにより、外膜由来系譜が空間的な病変形成の中心的な役割を担っていることが実証された。次に個別の遺伝子局在について検討した (図11)。広義間質病変部 (ピンクのアノテーション内) では、クラスター 1 のマーカーで

あり、線維化のマーカーでもあるCOL3A1が局在していることが明らかとなった。さらにAdvF/InflamFのマーカーでもあるPI16が病変部で特徴的に発現しており、これらの結果から広義間質病変内にはPI16陽性細胞が増加し存在することが明らかとなった。一方でAlvF/VascularFの特徴的マーカーであるCOL13A1の発現は正常肺胞組織に局限して局在していた。さらに、DuctalMyoF, BronchialMyoF, AxialMyoF, ASM, VSM, ArtSMC, PericyteのブロードマーカーであるMYH11は、病変部にも正常肺胞組織にも同程度局在しており、疾患部位特異性は認められなかった。

以上の結果より、外膜由来系譜が空間的な病変形成の中心に存在することを確認した。

D. 考察

本研究における先進的ゲノム解析を駆使した「高精度ブタ肺間葉系アトラス」の構築、および空間オミクスによる線維化動態の実証は、既存の齧歯類（マウス・ラット）モデルが抱えていたヒト疾患への外挿性という限界を突破し、職業性肺疾患の病態解明に新たなパラダイムをもたらすものである。本研究成果が有する学術的・医学的意義を以下の3点から考察する。

1. 齧歯類モデルの解剖学的・分子的限界の克服と、ブタモデルの絶対的優位性

これまで、粉体等の吸入毒性およびそれに伴う線維化の機序解明には、遺伝子改変が容易なマウスやラットが多用されてきた。しかし、Travagliniら(2020)のシングルセル解析が示す通り、マウスはヒト肺を構成する細胞型の実に29%（58種中17種）を欠損しており、対応する細胞間でも数百に及ぶ遺伝子発現の乖離が存在する。さらに解剖学的な観点から、Umedaら(2025)が網羅的比較解剖で明らかにしたように、齧歯類はCWAAPなどによるヒト職業性肺疾患の病変主座となる「広義間質（小葉間隔壁および軸位間質）」や「呼吸細気管支」を完全に欠如している。この構造的欠如により、ラットモデルでは肺胞領域における過剰な炎症（Airspace-Dominant Phenotype）が引き起こされ、これがヒト病態の本質である間質性病変を物理的に覆い隠してしまう「Biological Mask（肺胞領域の過剰炎症による病態の不顕化現象）」現象が生じることが問題として指摘されている（Yamano et al., 2026）。

本研究で構築したブタ肺アトラスは、このMissing Linkを埋めるものである。ブタはヒトと同様に発達した広義間質構造を有し（Umeda et al., 2025）、本研究のCWAAP誘発モデルにおいても、ヒトの病態と強く一致する広義間質の著明な線維性肥厚が再現された。ブタを用いた本解析基盤は、齧歯類では原理的に到達不可能な「ヒト疾患微小環境

の真の再現」を可能にする唯一無二のアプローチである。

2. PI16+ 外膜線維芽細胞（AdvF/InflamF）におけるヒト型機能遺伝子の保存と高度な組織化能

線維化の実行部隊である間葉系細胞の不均一性について、近年、PI16陽性線維芽細胞が全身の組織において普遍的な前駆細胞（Universal fibroblast）として機能し、組織傷害時に病的線維芽細胞へと分化することが報告されている（Buechler et al., 2021; McCartney et al., 2024）。しかし、ヒトとマウスのストローマ細胞の相違を論じたTsukui & Sheppard (2025)の指摘によれば、ヒト外膜線維芽細胞

（Adventitial Fibroblast: AdvF）を特徴づける特異的マーカーはMFAP5等であるが、マウスではこれら弾性線維アセンブリに関わる機能遺伝子群が保存されていない。

驚くべきことに、本研究の1細胞解析により、ブタの肺に存在するAdvFおよびInflam_Fibは、前駆細胞マーカーであるPI16に加え、MFAP5やFBLN2といったヒト型の遺伝子シグネチャーを極めて強力に保持していることが明らかとなった。網羅的な解析（図5, 6）の結果、ブタの外膜系線維芽細胞は、単にコラーゲン等の「材料」を供給するだけでなく、それらを機能的な組織構造へと編み上げる「アセンブリ（組み立て）」および「架橋（固める）」の全工程を遂行する高度なポテンシャルを有していた。

具体的には、主要な膠原線維（COL1A1）や弾性線維（ELN）が肺内の複数のクラスターで普遍的に発現しているのに対し、繊維形成を強力に促進するDPT（Dermatopontin）や、繊維同士を化学的に結合させ組織を硬化させる架橋酵素LOX（Lysyl Oxidase）ファミリー、さらにマトリックスの品質管理を担うHTRA3やASPNは、外膜系クラスター（AdvF/Inflam_Fib）に高度に集積していた。これは、ブタの外膜細胞が広義間質の構造形成の主役として特化していることを示しており、マウスモデルでは再現困難であったヒト特有の物理的に強靱かつ硬い線維化病変（小葉間隔壁の肥厚）を、ブタが分子・構造レベルで完全に再現し得る決定的な根拠となる。

さらに、外膜ニッチ内での明確な「機能分生」も、本モデルの特筆すべきポテンシャルである。Adventitial_Fibが純粋な構造維持（LOX+, HTRA3+）を担う一方で、近縁のInflam_Fibは、ブタ独自の鋭敏な指標であるCRABP1に加え、高度な補体系（CFB, C2, C3, C4A）や強力なケモカイン（CXCL12, CCL2）を産生する「免疫学的ハブ」としてのアイデンティティを有していた。

以上の結果は、ブタのストローマ細胞系譜が、解剖学的構造のみならず分子・機能レベルにおいても極めてヒトに近接していることを示している。遺伝

子改変マウスを用いた従来の機序解析では、これら「アセンブリと架橋」に関わるネットワークの欠損により見落とされてきたヒト肺病態の本質（広義間質の線維化進展）を、ブタモデルであれば統合的かつ動的に評価可能であることを強く実証するものである。

3. NPNT+ 肺胞線維芽細胞におけるヒト型シグネチャーの保持と代謝活性型ニッチ（MANC）としての実証

本研究における重要な発見は、ブタ肺胞線維芽細胞（Alveolar_Fib）の脂質代謝プロファイルが、マウスの「貯蔵型」ではなくヒトの「代謝・ニッチ維持型」に収束している点である。Zepp ら(2017)は、肺胞上皮の自己複製を支持する間葉系ニッチ細胞（MANC）を特定し、その主要因子として NPNT や FGFR4 を同定した。

本解析におけるブタの Alveolar_Fib は、これら NPNT, FGFR4 に加え、脂質代謝酵素 CES1 を強力に発現しており、Zepp ら(2017)や Sikkema ら(2023)が定義したヒト型 MANC の形質を極めて高度に再現していた。一方で、齧歯類で顕著な脂質貯蔵型（Lipofibroblast）の指標である PLIN2 や PPARG は陰性であった。これは、ブタがヒトと同様に脂質成分を能動的に代謝・輸送して肺胞環境を動的に制御する「代謝活性型ニッチ」を有していることを実証するものであり、肺胞虚脱から始まる複雑な職業性肺疾患の機序解明において、極めて高い外挿性を担保するエビデンスである。

4. 空間オミクスによる「Pathogenic Niche」の空間的実証と将来展望

本研究における空間オミクス解析（Stereo-Seq OMNI）の結果、CWAAP によって誘発された広義間質病変部、特に齧歯類モデルでは構造的に欠損している「小葉間隔壁」の肥厚部位において、シングルセル解析で定義した PI16 陽性の Adventitial_Fib（外膜線維芽細胞）系譜が著しく集積している事実を同定した。

筑井ら（2024, Nature）は、線維化を主導する特定の「病的な線維芽細胞（Pathogenic Myofibroblasts）」が特定の微小環境（Niche）から供給されるモデルを提唱している。本解析において、肥厚した広義間質内に PI16 陽性細胞が高度に集積していた事実は、大型動物であるブタの広義間質構造が、まさにヒト病態における「Pathogenic Niche（病的なニッチ）」として機能していることを空間的に実証するものである。

ただし、これら動員された PI16 陽性細胞が、その局所においてどのタイミングで病的筋線維芽細胞へと形質転換を遂げるのか、あるいは供給源としての役割に留まらず、自ら病的 ECM の架橋（LOX 等による修飾）やアセンブリを主導し、隔壁の物理的

肥厚に直接的に貢献しているのかについては、更なる研究による証明が必要である。

E. 結論

結論として、本分担研究により構築された『高精度ブタ肺間葉系アトラス』、および疾患肺の空間オミクス解析は、齧歯類モデルでは到達困難であったヒト職業性肺疾患の微小環境を分子レベルで再現し得る高度な解析基盤であることを実証した。特に、CWAAP 病変の主座である広義間質において、外膜由来前駆細胞（PI16 陽性細胞）の空間的な集積を特定したことは、難治性環境応答性肺疾患の進展機序を解明するための重要な知見である。今後は、時空間的な動態解析を深化させることで、早期診断マーカーの同定や治療標的の選定に資する高度なリファレンスとしての活用が期待される。

F. 引用文献

1. Zepp, J. A., et al. (2017). Distinct Mesenchymal Lineages and Niches Promote Epithelial Self-Renewal and Myofibrogenesis in the Lung. *Cell* 170: 1134-1148.
2. Travaglini, K. J., et al. (2020). A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* 587: 619-625.
3. Tsukui, T., et al. (2020). Collagen-producing lung cell atlas identifies multiple subsets with distinct localization and relevance to fibrosis. *Nat. Commun.* 11, 1920.
4. Shichino, S., et al. (2021). TAS-Seq is a robust and sensitive amplification method for single-cell RNA sequencing. *Commun. Biol.* 4: 156.
5. Sikkema, L., et al. (2023). An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nat. Med.* 29: 1563-1577.
6. McCartney, E. E., et al. (2024). Life of Pi: Exploring functions of PI16+ fibroblasts. *F1000Research* 13: 126.
7. Tsukui, T., et al. (2024). A fibroblast-rich niche identifies a pathogenic subset of myofibroblasts in fibrosis. *Nature* 630: 172-180.
8. Umeda, Y., Izawa, T., Yamano, S., et al. (2025). Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in mammals. *J. Toxicol. Pathol.* 38: 113-129.
9. Liu, K., et al. (2025). Fibroblast atlas: Shared and specific cell types across tissues. *Sci. Adv.* 11: eado0173.
10. Tsukui, T., et al. (2025). Stromal heterogeneity in the adult lung delineated by single-cell genomics. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 328: C1964-C1972.
11. Li, Z., et al. (2025). Spatial transcriptomics OMNI defines cellular heterogeneity in human FFPE tissues. *Cell* 188: 6554-6571.
12. Yamano, S., Schaudien, D., Umeda, Y., et al. (2026). The Pneumoconiosis Renaissance: Revisiting the Pulmonary Pathology of Poorly

Soluble Low Toxicity Particles. *Nanomaterials* 16, 230.

G. 研究発表

9. 論文発表

- 39) Yamano S, Schaudien D, Umeda Y. The Pneumoconiosis Renaissance: Revisiting the Pulmonary Pathology of Poorly Soluble Low Toxicity Particles: Insights from Rodent Inhalation Studies on Titanium Dioxide Nanoparticles. *Nanomaterials*. 2026 Feb 16(4):230. <https://doi.org/10.3390/nano16040230>
- 40) Yamano S, Sadakane K, Ichinose T, Umeda Y, Maki T. Mouse pulmonary pathological characteristics induced by Asian-mineral dust transported with *Coniothyrium fuckelii* at a high altitude of 2,000 meters. *Sci Rep*. 2025 Dec 8;16(1):1507. doi: 10.1038/s41598-025-31378-3.
- 41) Wu B, Shichino S, Ueha S, Matsukiyo R, Ishimura Y, Ogiwara H, Takasu M, Yamano S, Umeda Y, Matsushima K. Ex vivo lung-organoid model for aberrant basaloid cell induction and activation. *Inflamm Regen*. 2025 Oct 30;45(1):33. doi: 10.1186/s41232-025-00396-z.
- 42) Yamano S, Umeda Y. Fibrotic pulmonary dust foci is an advanced pneumoconiosis lesion in rats induced by titanium dioxide nanoparticles in a 2-year inhalation study. *Part Fibre Toxicol*. 2025 Apr 18;22(1):7. doi: 10.1186/s12989-025-00623-y.
- 43) Umeda Y, Izawa T, Kazama K, Arai S, Kamiie J, Nakamura S, Hano K, Takasu M, Hirata A, Rittinghausen S, Yamano S. Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in mammals. *J Toxicol Pathol*. 2025 Apr;38(2):113-129. doi: 10.1293/tox.2024-0071.

10. 学会発表

- 41) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 上空由来植物病原菌・黄砂の複合曝露が誘導する肺病理像の再定義 - 第16回本シンポジウムを契機とした共同研究成果-第17回大気バイオエアロゾルシンポジウム 2026年2月
- 42) 梅田ゆみ, 山野荘太郎. F344 ラットにおける酸化チタンナノ粒子吸入暴露によるじん肺病

変 第73回日本職業災害・医学会学術大会 2025年11月

- 43) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 産業衛生分野における次世代の健康影響基盤の創生 日本産業衛生学会 第52回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 2025年10月
- 44) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 1細胞解像度で紐解く大動物肺疾患アトラスの創出 フォーラム 2025 衛生薬学・環境トキシコロジー 2025年9月
- 45) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 呼吸器疾患研究を加速させる先端モデル動物とは? 文科省学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 2025年度 若手支援技術講習会 2025年9月
- 46) Y Umeda, K Kazama, S Arai, J Kmiie, S Nakamura, K Hano, M Takasu, A Hirata, M Saito, Y Goto, Y Ohtsuka, T Kishimoto, S Shichino, Y Yamamoto, S Yamano. Pioneering a Swine Platform for Cutting-Edge Pulmonary Disease Research. 59th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2025) 2025 Sep
- 47) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 大型動物×先進医学解析技術による 職業性肺疾患研究の新展開 第13回 日本繊維状物質研究学術集会 2025年8月 招待有り
- 48) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 二酸化チタンナノ粒子で誘発される齧歯類のじん肺病変 第42回 エアロゾル科学・技術研究討論会 2025年8月
- 49) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. 1細胞解像度で紐解く大型動物肺疾患アトラスの創出 第38回発癌病理研究会 2025年8月
- 50) 山野荘太郎, 梅田ゆみ. ミニブタモデルで職業性肺疾患を科学する 第98回 日本産業衛生学会 2025年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

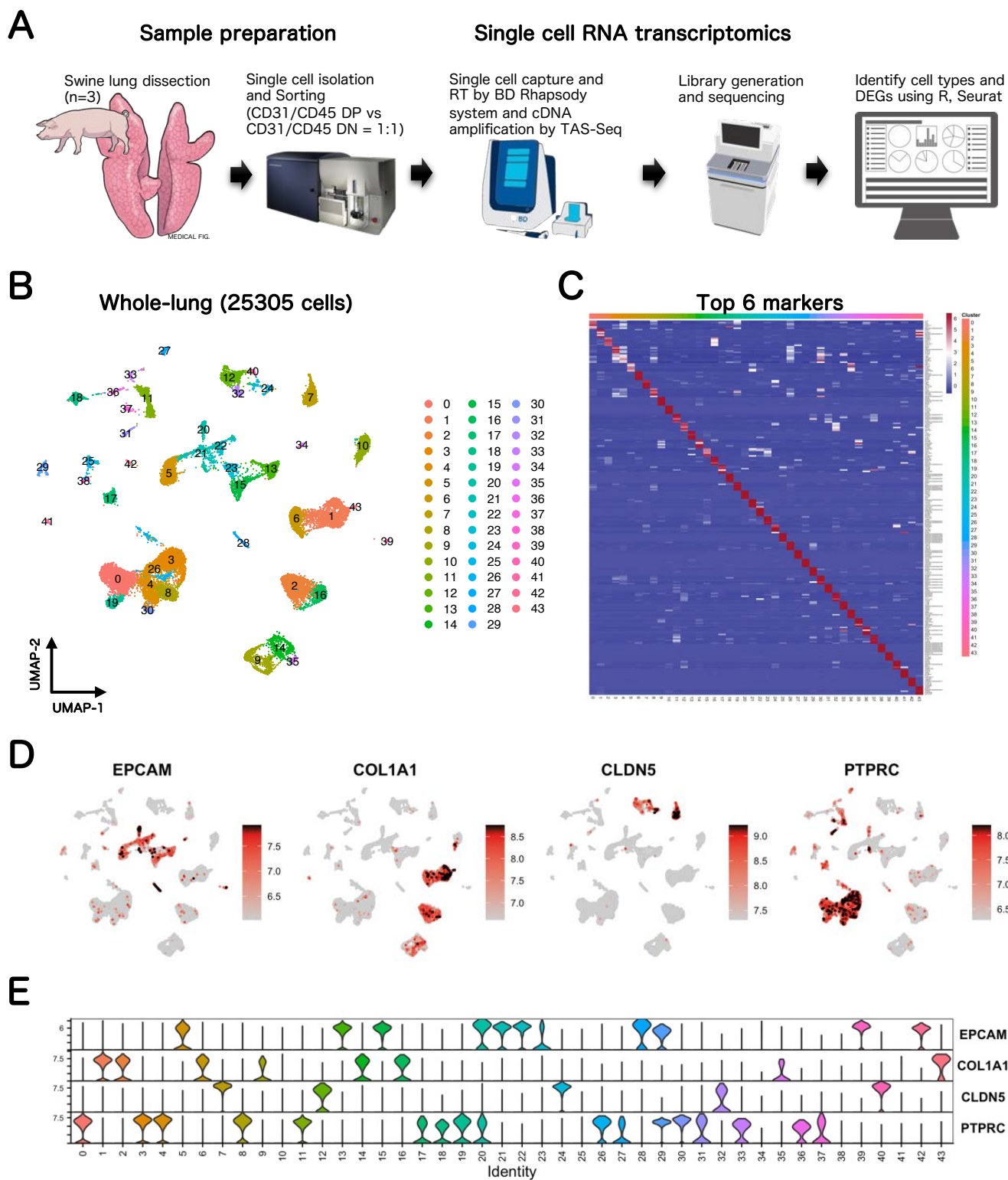


図1 正常マイクロミニピッグ肺の1細胞解析概要

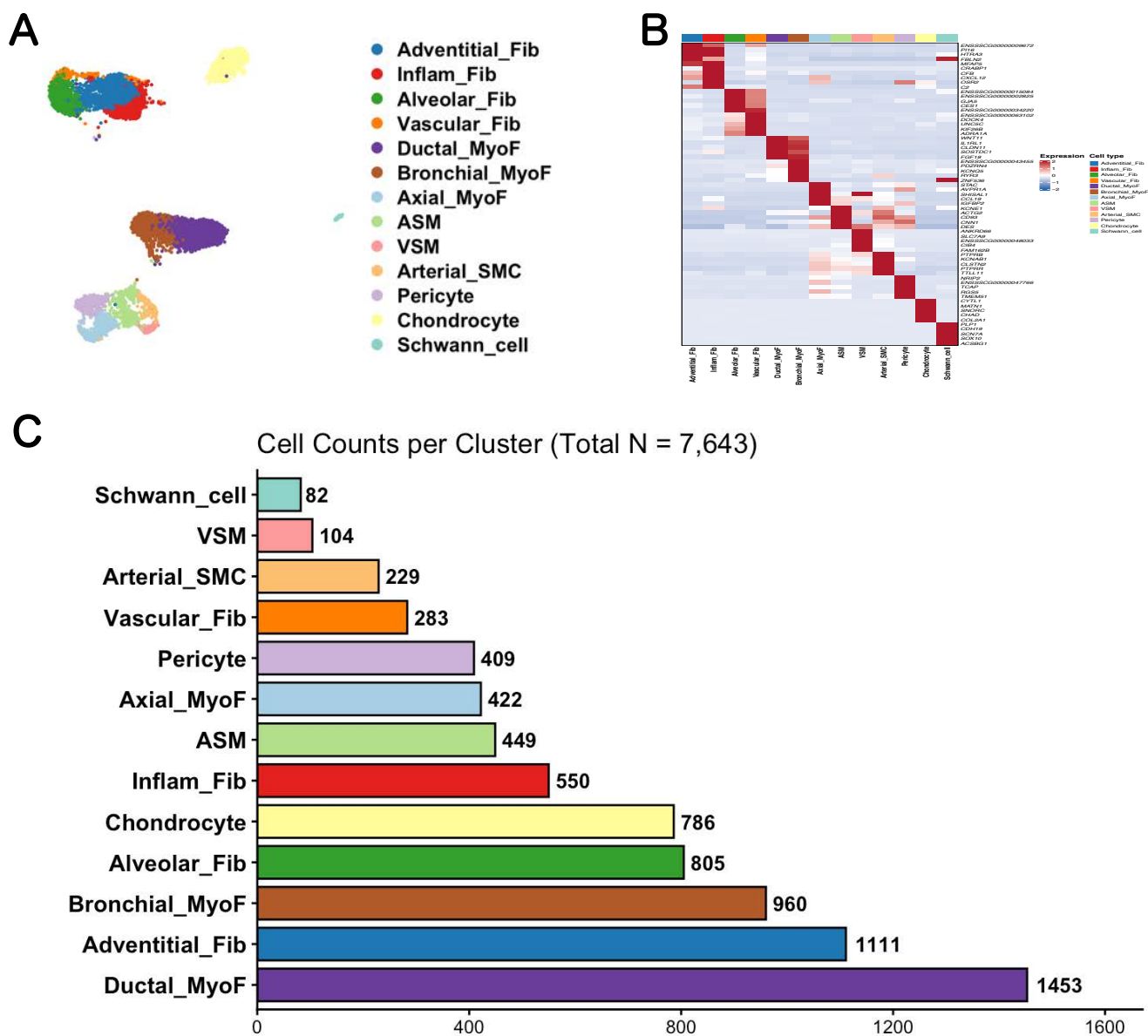
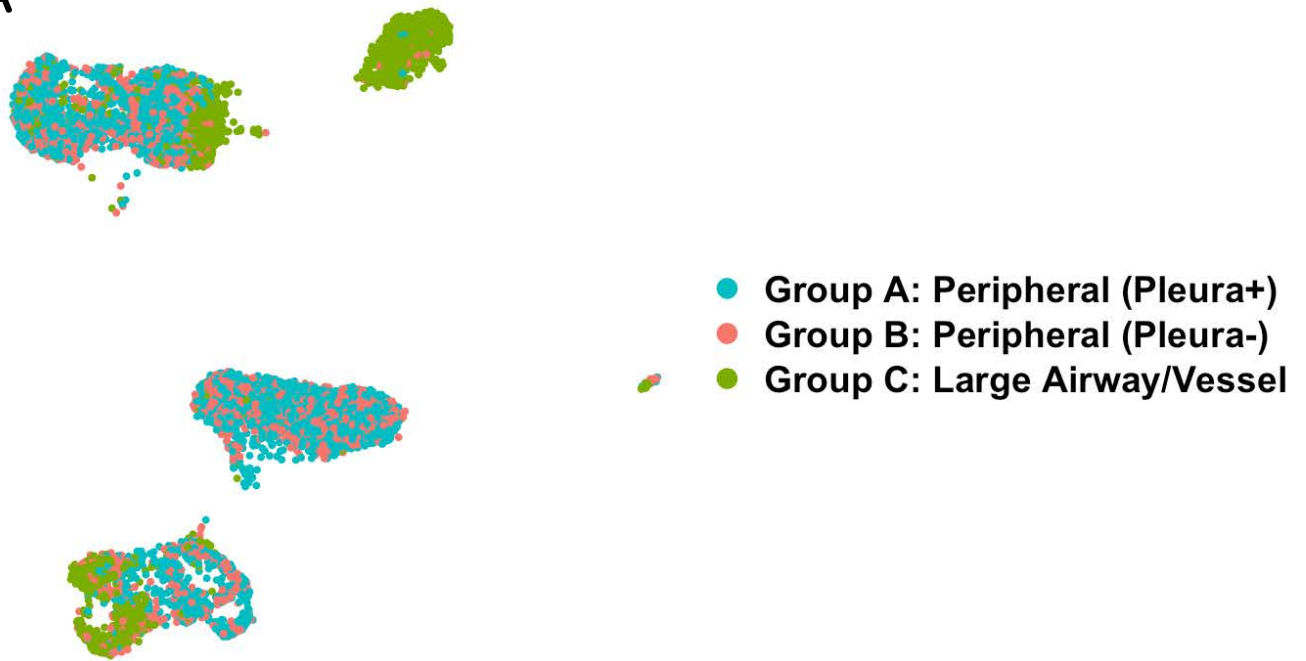
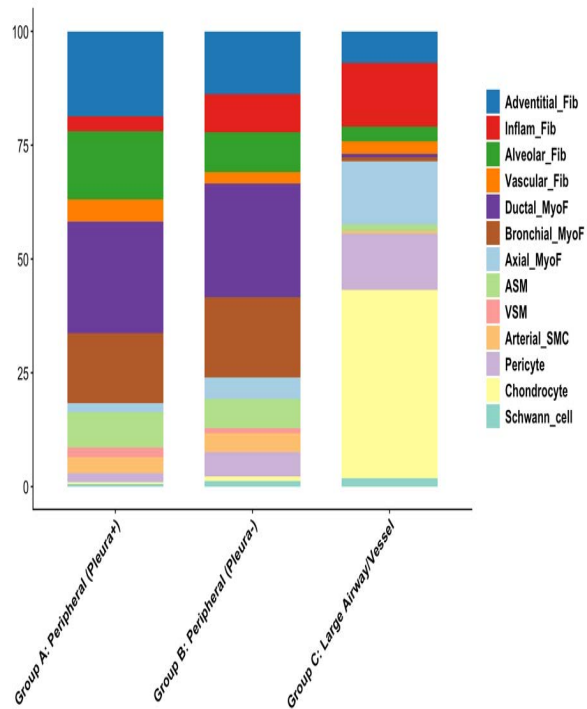


図2 COL1A1陽性細胞のSub-Clustering解析結果の概要

A



B



C

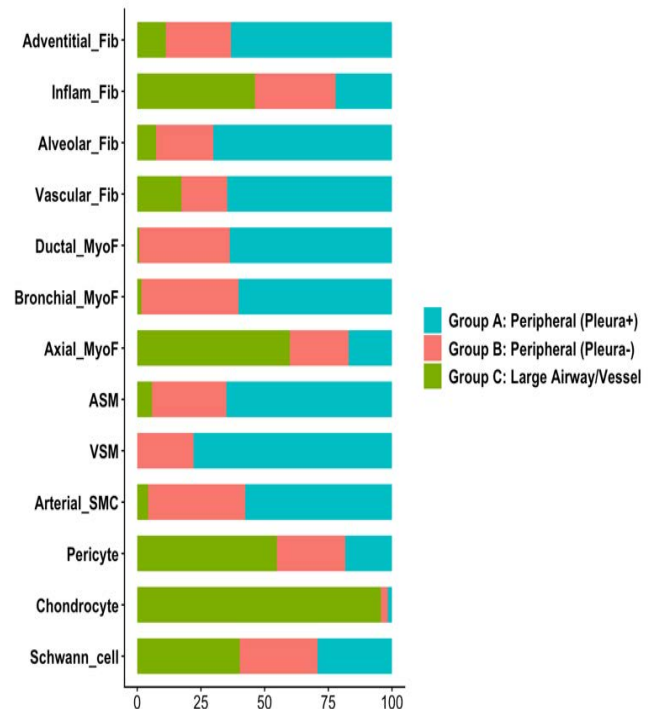


図3 サンプリング領域ごとの割合

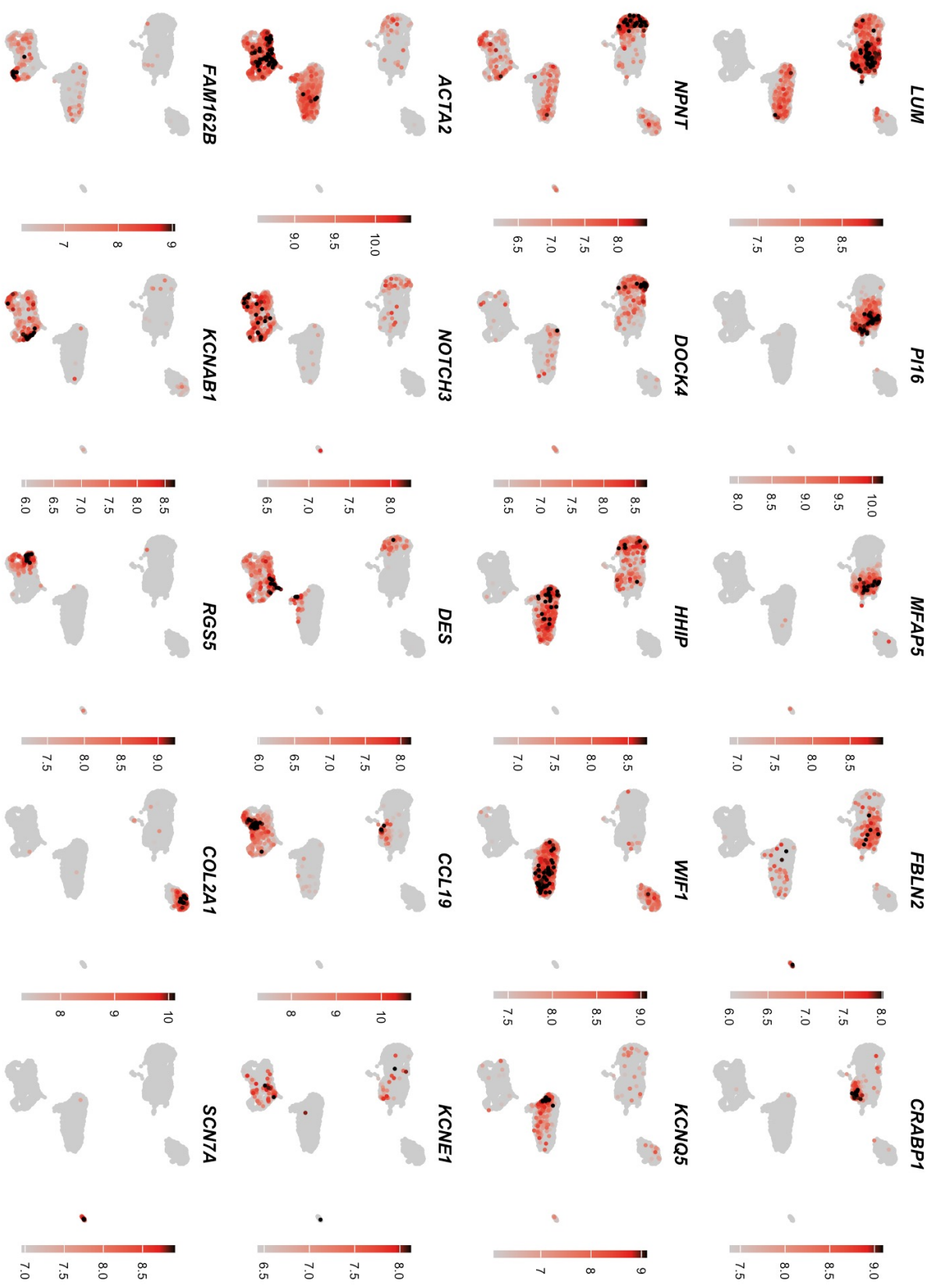


図4 マーカ一遺伝子を用いたFeaturePlot

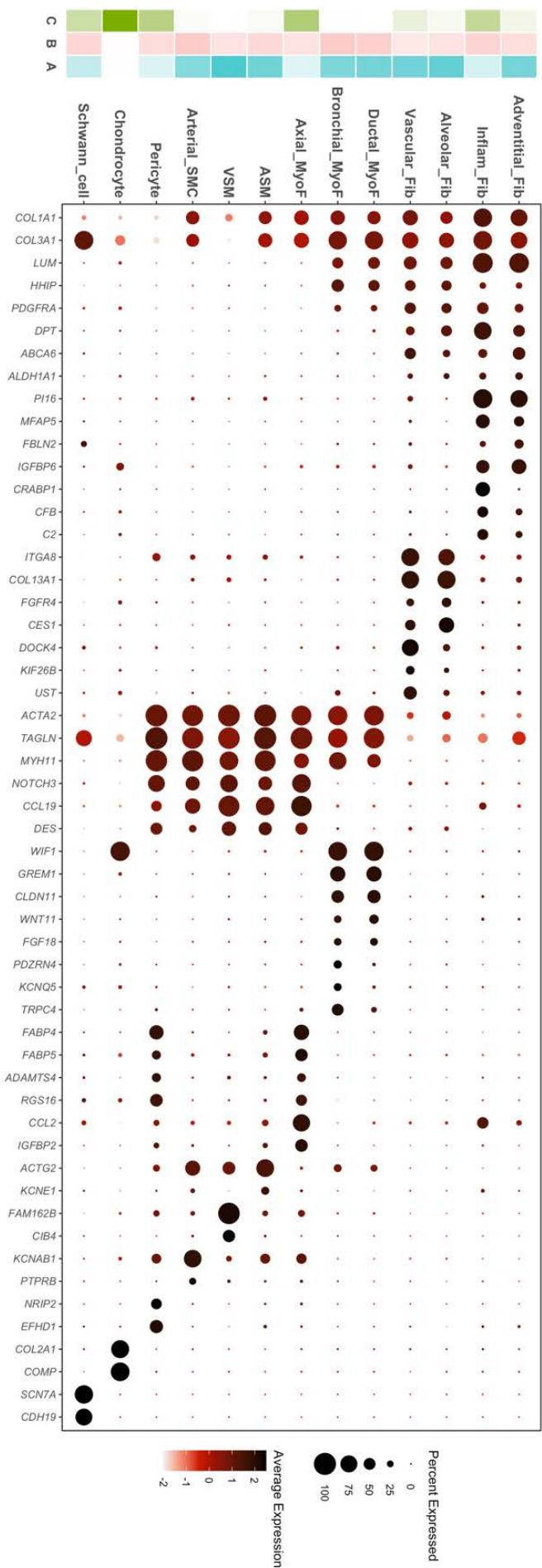
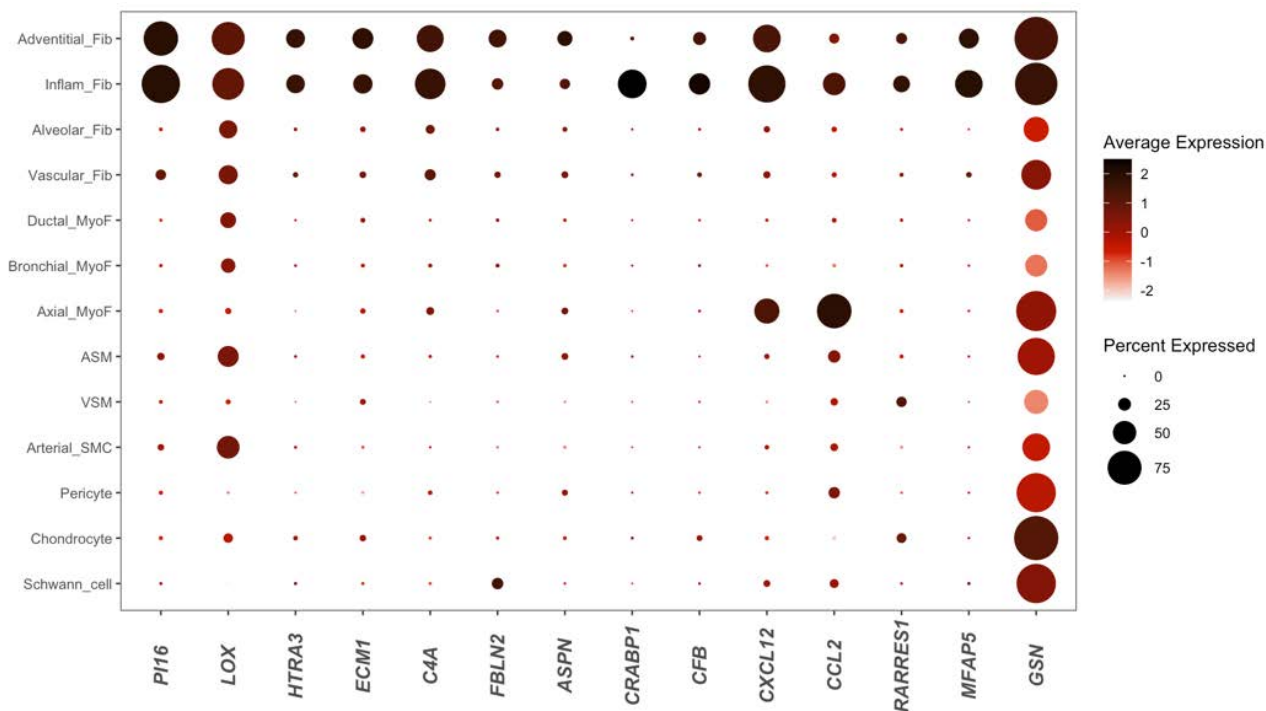


図5 マーカー遺伝子を用いたDotplot

A



B

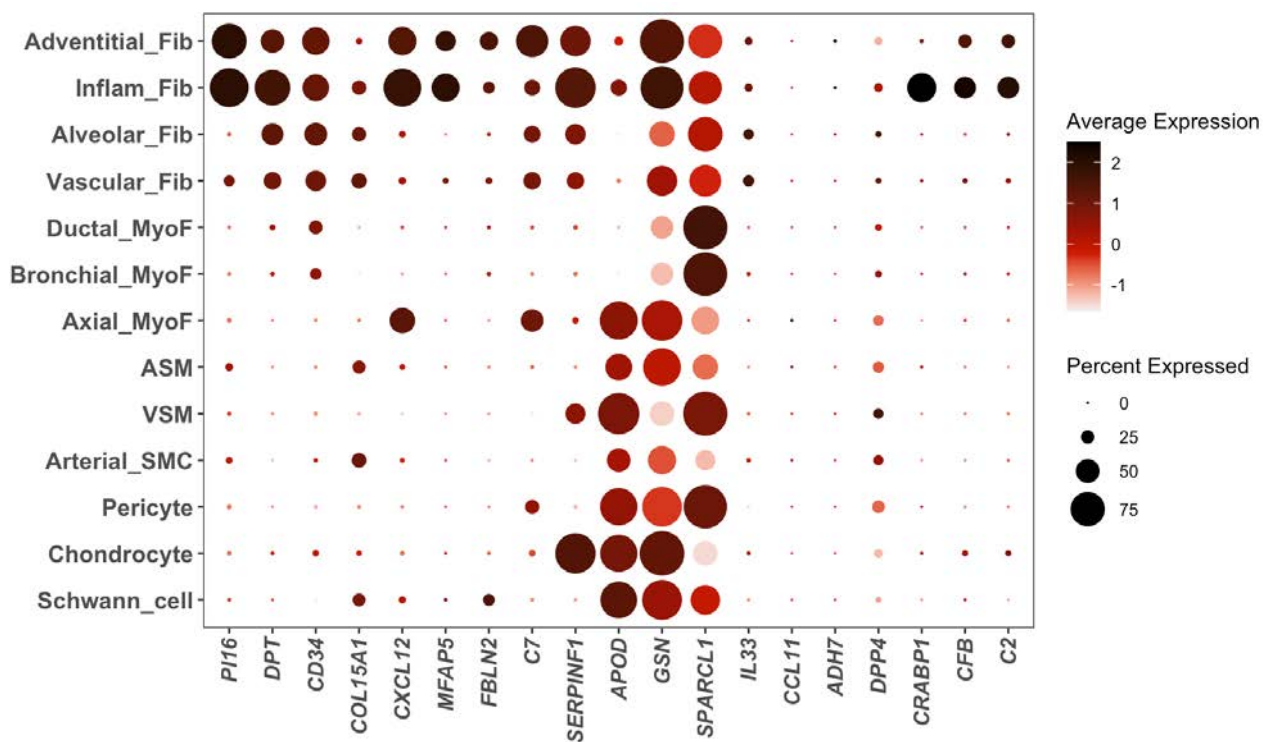


図6 AdvF/InflamFの遺伝子シグネチャー特徴

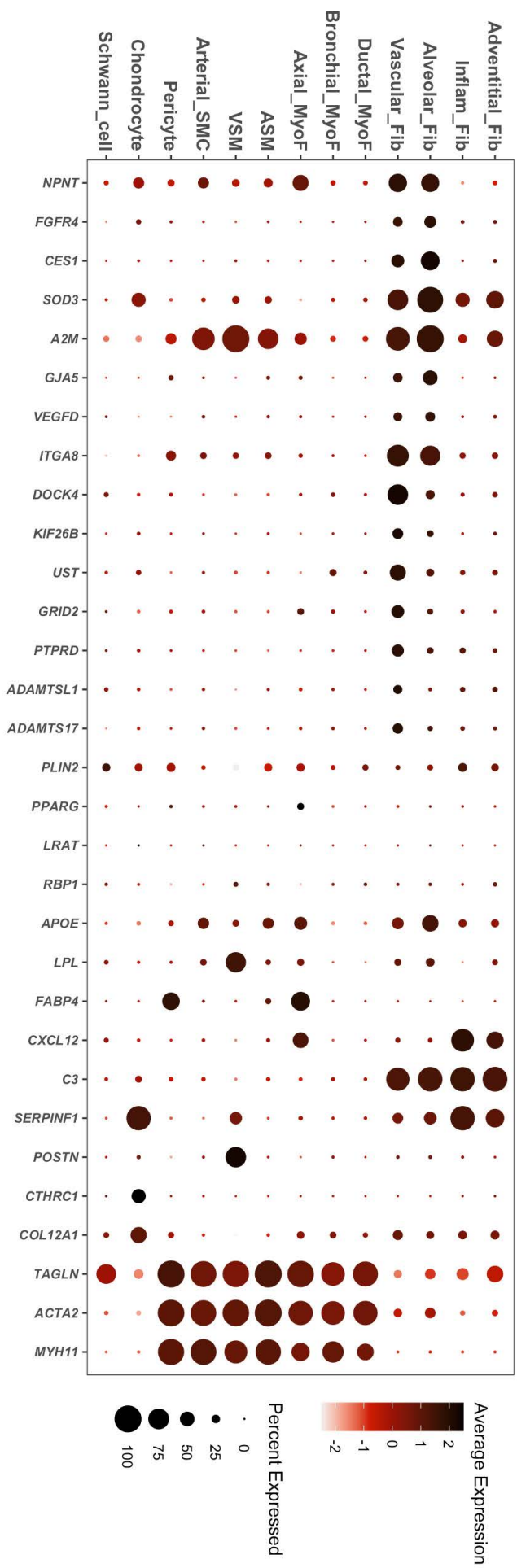


図7 AlVFの遺伝子シグネチャー特徴

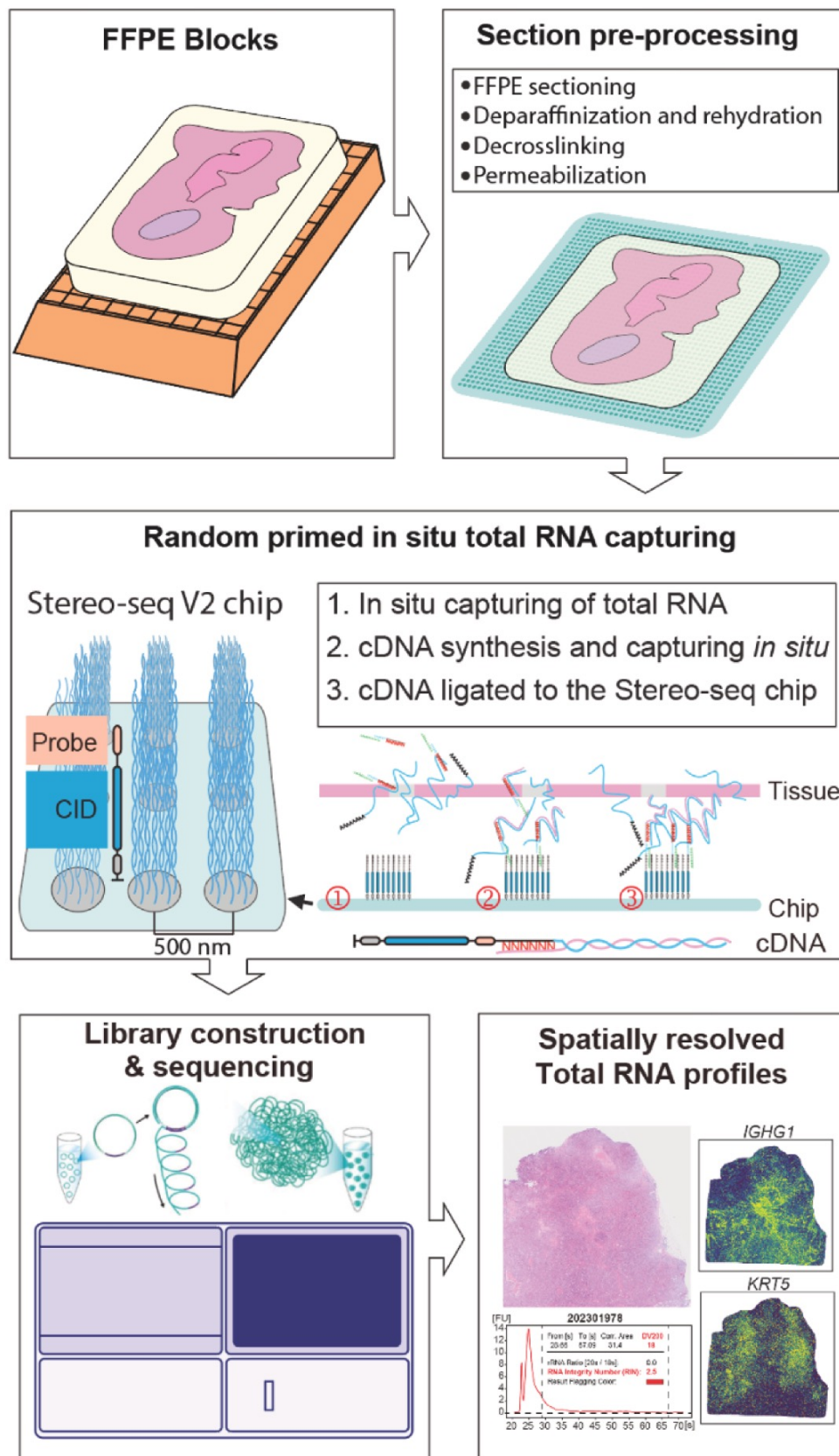


図8 Stereo-Seq OMNIのワークフロー

(出典: Li, Z., et al. (2025). *Cell*, 188(23), 6554-6571.e21.
doi:10.1016/j.cell.2025.08.008 より引用/改変)

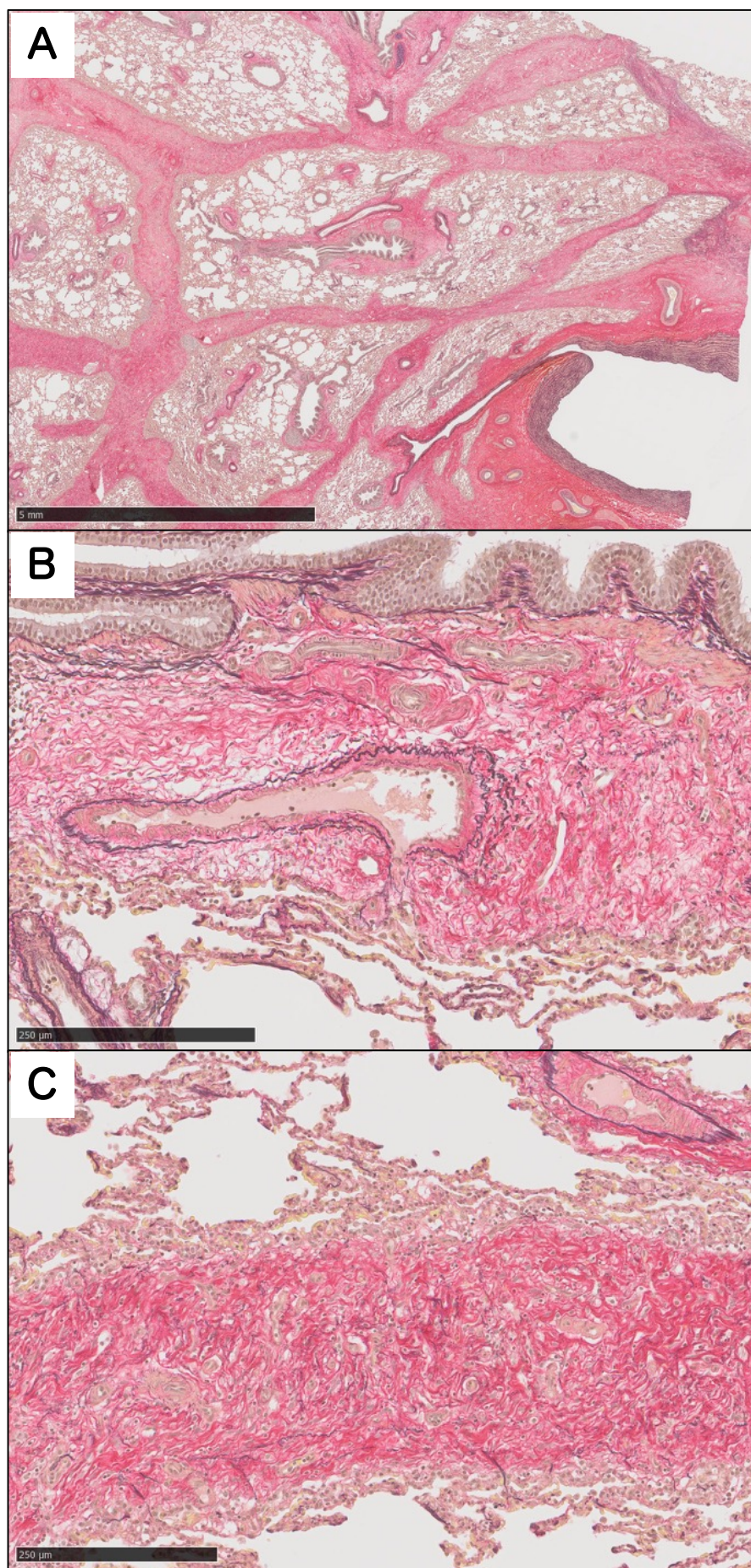
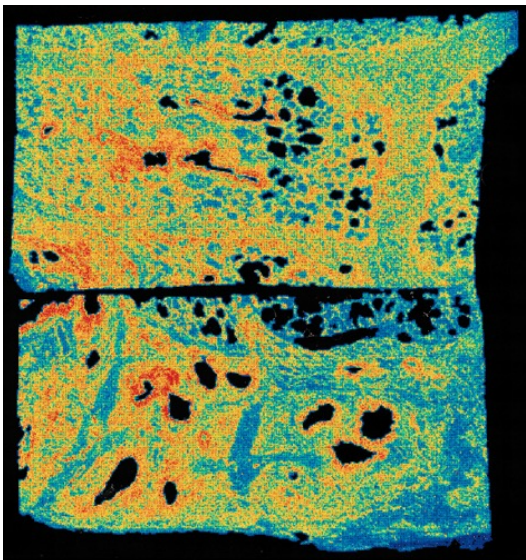
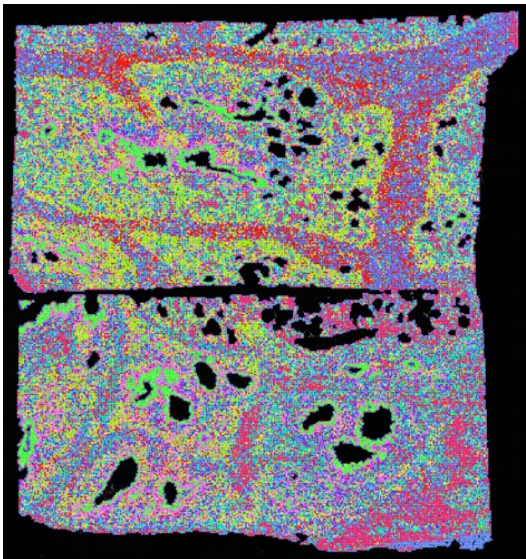


図9 広義間質病変のEVG染色

遺伝子発現量



クラスター解析



クラスター1の局在

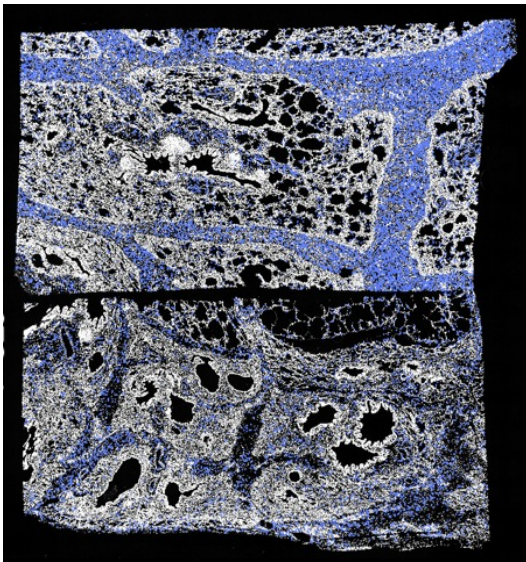
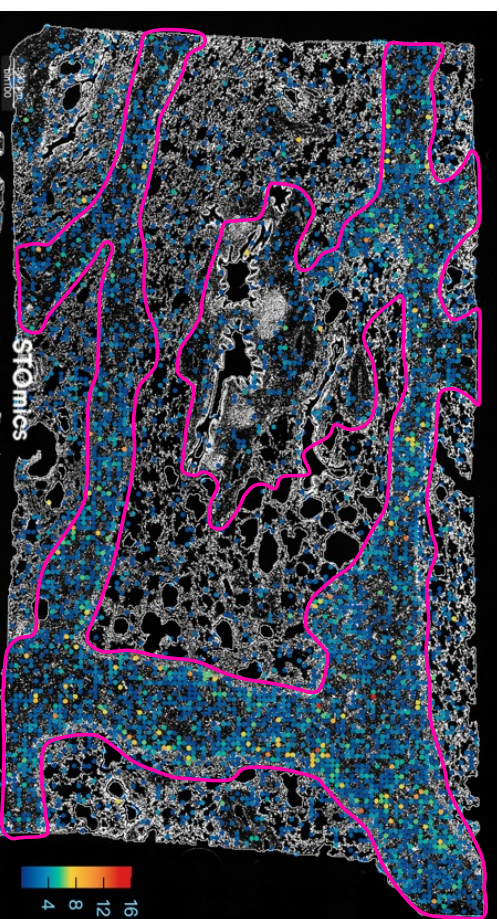
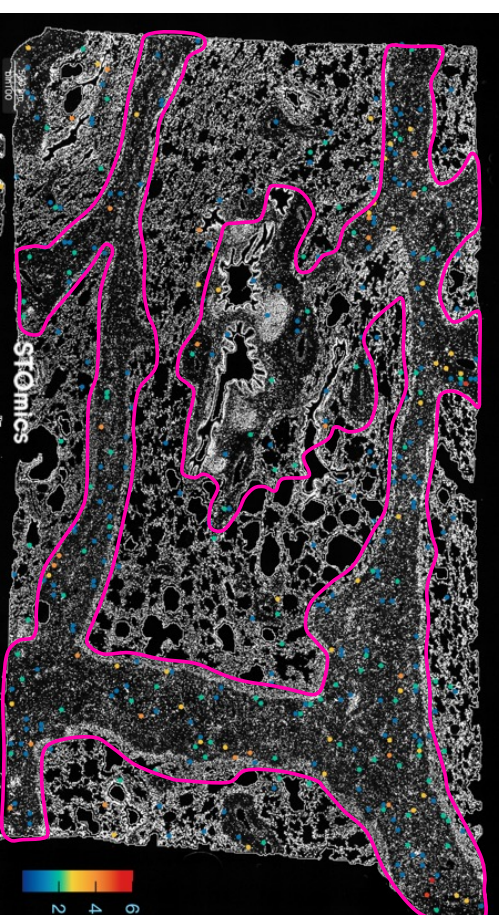


図10 CWAAP誘発ブタ広義間質病変の空間オミクス結果

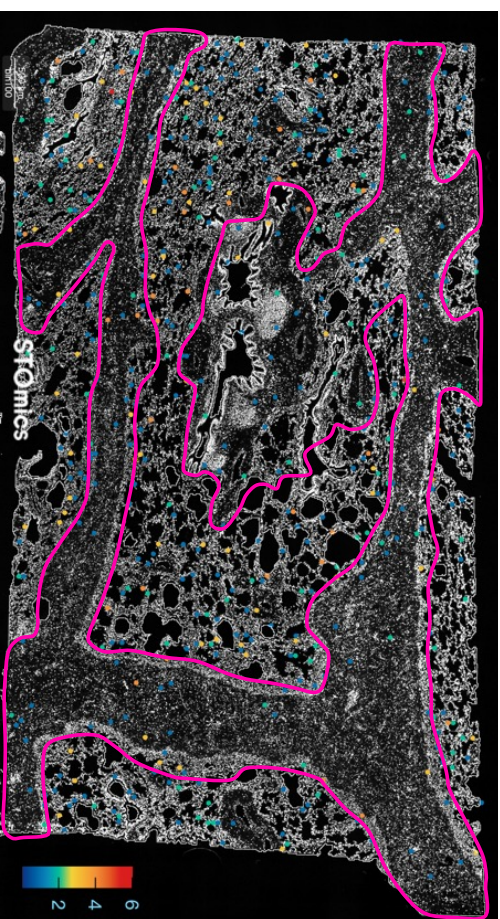
線維化マーカー (COL3A1)



Advマーカー (P116)



Alveマーカー (COL13A1)



MyoF/SMC/Periマーカー (MYH11)

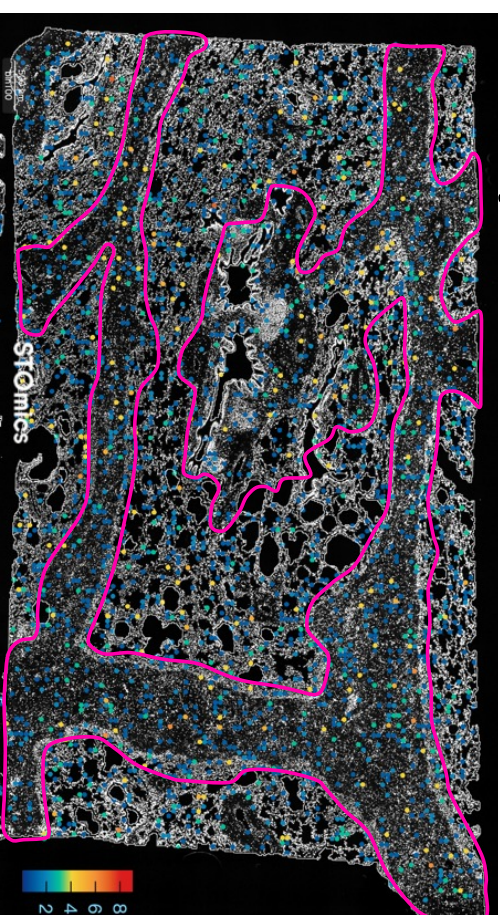


図11 代表的な4遺伝子の発現局在

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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

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
Otsuka A, Shimazoe MA, Watanabe S, Minami K, Tamura S, Kiyono T, Takeshita F, Maeshima K.	Single-nucleosome imaging uncovers biphasic chromatin dynamics in inducible human transformed cells.	Cell Struct Funct	51(1)	37-53	2026
Yamano S, Schaudien D, Umeda Y.	The Pneumoconiosis Renaissance: Revisiting the Pulmonary Pathology of Poorly Soluble Low Toxicity Particles: Insights from Rodent Inhalation Studies on Titanium Dioxide Nanoparticles.	Nanomaterials	16(4)	230	2026
Mizuno S, Teshima N, Yokota T, et al.	Genetic diversity and evolutionary relationships of porcine astroviruses from wild boars and domestic pigs in Japan.	Infect Genet Evol	137	105875	2026
Vachiraarunwong A, Fujioka M, Alexander DB, et al.	Developing a novel in vitro toxicity assay for predicting inhalation toxicity in rats.	Toxicol Lett	415	111803	2026
Maeda-Tateishi T, Nagata Y, Imanishi Y, et al.	Evaluation of tumor clonality with chemical carcinogenesis in a mouse model of visualized X chromosome inactivation.	J Toxicol Pathol	39(1)	31-38	2026
Bai L, Takahashi M, Kobayashi J, et al.	Engineering Immortalized Bovine Granulosa Cells Using a Triple-Gene Approach: Mutant CDK4, Cyclin D1, and TERT.	Cell Biology International	50(2)	e70126	2026

Kawada Y, Kazama K, Aihara N, et al.	A calf with concurrent infantile hemangioma and coronary artery fistula: notes on simultaneous onset.	J Vet Med Sci	-	-	2026
Yamano S, Sadakane K, Ichinose T, Umeda Y, Maki T.	Mouse pulmonary pathological characteristics induced by Asian-mineral dust transported with <i>Coniothyrium fuckelii</i> at a high altitude of 2,000 meters.	Sci Rep	16(1)	1507	2025
Gi M, Suzuki S, Saleh DM, et al.	Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats.	Nanomaterials (Basel)	15(23)	1806	2025
Wu B, Shichino S, Ueha S, et al.	Ex vivo lung-organoid model for aberrant basaloid cell induction and activation.	Inflamm Regen	45(1)	33	2025
Uchida Y, Mizukawa M, Kamiya Y, et al.	DAPI as a novel fluorochrome for amyloid staining that binds to β -pleated sheet.	Biotech Histochem	100(7)	440-449	2025
Saleh DM, Ahmed OHM, Alexander DB, et al.	Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment.	J Appl Toxicol	-	-	2025
Shiga T, Kakinuma Y, Takada M, et al.	Chronic bronchitis and bronchiolitis with prominent globule leukocyte infiltration in a cat with <i>Filobacterium felis</i> .	Vet Pathol	62(5)	762-766	2025
Guo R, Gi M, Kiyono T, et al.	Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in Toxicity Assessment of Arsenicals.	Toxics	13(10)	828	2025

Ahmed OHM, Saleh DM, Alexander WT, et al.	Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs.	Nanomaterials (Basel)	15(18)	1402	2025
Yamaji M, Nakahara T, Nakanishi T, et al.	Disruption of Human Papillomavirus 16 E6/E7 Genes Using All-in-One Adenovirus Vectors Expressing Eight Double-Nicking Guide RNAs.	Int J Mol Sci	26(17)	8685	2025
Kakehashi A, Suzuki S, Nishidoi Y, et al.	The Impact of Peroxiredoxin 3 on Molecular Testing, Diagnosis, and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.	Cancers (Basel)	17(13)	2212	2025
Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Sato K, et al.	Chemopreventive Effects of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae Protein Hydrolysates in a Rat Model of Early-Stage Colorectal Carcinogenesis.	Int J Mol Sci	26(13)	5955	2025
Uchibori Y, Suekuni M, Kokaji Y, et al.	AmNA-Modified Antisense Oligonucleotide Targeting MCM8 as a Cancer-Specific Chemosensitizer for Platinum Compounds.	Cancer Sci	116(5)	1405-1416	2025
Yamano S, Umeda Y.	Fibrotic pulmonary dust foci is an advanced pneumoconiosis lesion in rats induced by titanium dioxide nanoparticles in a 2-year inhalation study.	Part Fibre Toxicol	22(1)	7	2025
Umeda Y, Izawa T, Kazama K, et al.	Comparative anatomy of respiratory bronchioles and lobular structures in mammals.	J Toxicol Pathol	38(2)	113-129	2025
Inoko A, Soga N, Suzuki M, et al.	Long-term expansion of basal cells and the novel differentiation methods identify mechanisms for switching Claudin expression in normal epithelia.	Sci Rep	15(1)	12172	2025

Noura I, Suzuki S, Gi M, et al.	Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes.	J Toxicol Pathol	38(2)	147-154	2025
Turner MC, Godderis L, et al.	Carcinogenicity of automotive gasoline and some oxygenated gasoline additives.	Lancet Oncol	-	-	2025
Mineshige T, Takagi S, Shiga T, et al.	Acanthomatous ameloblastoma with mucinous glandular differentiation in a dog.	J Vet Med Sci	87(2)	194-197	2025
Praseatsook K, Vachiraarunwong A, Taya S, et al.	Anticancer and Antioxidant Effects of Bioactive Peptides from Black Soldier Fly Larvae.	Nutrients	17(4)	645	2025
Mizukawa M, Tanaka K, Kashimura A, et al.	Identification and characterization of spontaneous AA amyloidosis in CD-1 mice used in toxicity studies.	J Toxicol Pathol	38(1)	69-82	2025
Nakano M, Gi M, Toyooka T, et al.	Occupational health topics series on the effects of chemicals: risk assessments of ortho-toluidine for bladder cancer.	J Occup Health	67(1)	-	2025
Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, et al.	Metabolism and effects of acetoaceto-o-toluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice.	J Toxicol Pathol	38(1)	59-67	2025
Ushida K, Kamiie J, Kazama K, Onda K, Arai S.	Therapeutic effects of platelet-rich plasma on cartilage in experimental swine models of leg weakness.	J Vet Med Sci	-	-	2025
Kachi E, Kazama K, Murakami M, Onda K.	Opsin 3, encoding a non-visual photoreceptor, is a pseudogene in cattle.	Res Vet Sci	-	-	2025
Kurumisawa T, Kazama K, Gondaira S, et al.	Anti-inflammatory effects of glycyrrhizin on lipoteichoic acid and lipopolysaccharide-induced bovine mastitis.	Pol J Vet Sci	-	-	2025