水注入後における鼻粘膜上皮透過性の経時的变化について

東北大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：高坂知節教授）

大 平 裕 子, 高 坂 知 節

東北大学医学部第一病理学教室

沢 井 高 志

PERMEABILITY CHANGE OF GUINEA PIG NASAL EPITHELIUM AFTER EXPOSURE OF HYPOTONIC SOLUTION

HIROKO ODAIRA, M.D. and TOMONORI TAKASAKA, M.D.

Department of Otolaryngology, Tohoku University School of Medicine, Sendai

TAKASHI SAWAI, M.D.

The First Department of Pathology, Tohoku University School of Medicine, Sendai

One ml of tap water (hypotonic solution) was poured into the nasal cavities of 40 tracheostomized guinea pigs. After the time interval ranging from 0 to 8 hours, 2 ml of hoarseradish peroxidase saline solution (HRP Sigma type VI: 3 mg per ml in saline) was poured into the nasal cavity and septal mucosa was removed at five minutes after the HRP exposure. The mucous membranes were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer and were reacted for localization of peroxidase activity by the method of Graham and Karnovsky. After being postfixed with 2% OsO₄ in 0.1 M phosphate buffer, the blocks were dehydrated through graded ethanol. After embedding into epoxy resin, the 1 μ m thick sections and 80 nm ultrathin sections were made and observed under a light microscope and an electron microscope (HITACHI H-600) with the accelerating voltage of 50 KV.

The following results were obtained.

- 1) Immediately after hypotonic water exposure, the permeability of nasal epithelium became more accelerated.
- 2) HRP precipitates were present in the intercellular space and also in the cytoplasm of some goblet and ciliated cells.
- 3) It was also confirmed that HRP could enter the intercellular space through the tight junction.
- 4) The nasal mucosa remained permeable at least for 6 hours after the tap water exposure and its permeability gradually returned to normal thereafter.

Based upon the present experiments, it was concluded that hypotonic water exposure of the nasal cavity could change epithelial permeability although morphological changes of the junctional complexes were not obvious.

I. はじめに

最近、スイミングスクールに通う児童の増加に伴い、水泳後の鼻症状の悪化がしばしば問題となっている。前回、著者らは水によって生ずる鼻粘膜上皮の形態的变化について検討し、報告した¹⁾。その中で、条件を変えて種々の水を5分以上持続的にモルモット鼻腔へ注入すると、粘膜上皮細胞の空胞形成や細胞間隙の離開等著明な変化が生じ、注水時間を長くするに従い、上皮の脱落やさらにその後、粘膜上皮の再生が認められることを指摘した。しかも粘膜の変化は、水道水と、消毒剤である次亜塩素酸カルシウム（サラシ粉）溶解液で大差を認めなかった。すなわち、鼻粘膜上皮に浸透圧が大きな影響を与えることを示した。

今回、著者は少量の水道水をモルモット鼻腔へ注入後、HRPをトレーサーとして使用し、鼻粘膜の透過性の変化を調べた。

II. 対象及び方法

体重240～350gのハートレイ系白色モルモット40匹を使用した。ネムブタール25mg/kgにて麻醉後気管切開を行い、次いで左右鼻腔へそれぞれ1mlの水道水をone shotで注入した。

(実験1)

その後、所定の時間を置いてから、HRP 6mgを生理的食塩水2mlに溶解し、各鼻腔へ1mlずつ1分間かけて注入し、その5分後に断頭・鼻中隔粘膜を採取した。対照は、生理的食塩水で溶解したHRPのみを注入し、5分後に断頭した(図1)。

注水からHRP注入までの時間は、図2に示すごとく、直後・5分後・15分後・45分後・1時間後・2時間後・3時間後・4時間後・6時間後・8時間後とし、それぞれモルモットを3匹ずつ使用した。

(実験2)

HRPの鼻粘膜上皮細胞間隙への吸収経路を調べるため、前述のHRP液を、水注入後2分間で注入し、その直後に断頭し、同様に鼻中隔粘膜を採取した(N=2)。

採取した鼻中隔粘膜は、実験1・2とも4～6個に細断し、2.5%グルタルアルデヒドで2時間前固定した。次にペルオキシダーゼ活性を検出するため、Karovsky反応を加えてから、1%オスミニウム酸で2時間後固定した。次いで系列アルコールで脱水後、エポン包埋し、デュボン社製Sorval Ultra Microtomeを用いて、厚さ1 μ の光顕用切片を作製し、無染色のま

図1 実験方法

図2 実験内容

ま、及びトルイジンブルーで染色し、観察した。さらに超薄切片を作製し、日立H-600型電子顕微鏡で観察した。

III. 結 果

(実験1)

対照例では、上皮細胞間隙にはHRPは認められず、まれに上皮細胞内の細胞遊離縁に近くHRPを含むライソゾームが存在した(写真1)。

注水直後にHRPを注入し、その5分後には上皮細胞間隙にかなり大量のHRPが認められ、一部は基底

写真 1

写真 2

写真 3

写真4

写真5

写真6

写真 7

写真 8

写真 9

写真 10

表1 水注入後モルモット鼻粘膜の HRP に対する透過性の経時変化（光顕による観察）

水注入 ～HRP 注入 までの時間	Ⅰ 細胞間隙への HRP の取り込み の程度		Ⅱ 黒染細胞の 有無				水注入 ～HRP 注入 までの時間	Ⅰ 細胞間隙への HRP の取り込み の程度		Ⅱ 黒染細胞の 有無			
	モルモット No. 1		No. 2		No. 3			モルモット No. 1		No. 2		No. 3	
Ⅰ. 対照	Ⅰ—	Ⅱ—	Ⅰ—	Ⅱ—	Ⅰ—	Ⅱ—	Ⅵ. 1 時間	Ⅰ±	Ⅱ—	Ⅰ+	Ⅱ+	ⅠⅡ	Ⅱ—
Ⅱ. 直後	+	Ⅱ	Ⅱ	+	+	+	Ⅶ. 2 時間	+	±	+	±		
Ⅲ. 5 分	+	Ⅱ	Ⅱ	+			Ⅷ. 3 時間	+	±	+	±		
Ⅳ. 15 分	+	+	+	+	+	±	Ⅸ. 4 時間	—	±	±	±		
Ⅴ. 45 分	+	+	+	+	Ⅱ	+	Ⅹ. 6 時間	—	—	+	+	—	±
							Ⅺ. 8 時間	—	—	—	—		

—: なし
±: わずかにあり
+: あり
Ⅱ: 多量 (多数) あり

膜にまで及んでいた(写真2)。電顕で観察すると、上皮細胞遊離縁に近い細胞間隙の所々に大量の HRP の存在が認められた(写真3)。

注水15分後・45分後・1時間後・2時間後・3時間後・4時間後に HRP を注入し、その5分後に観察すると、やはり HRP が鼻粘膜上皮細胞間隙に認められたが、時間の経過とともに取り込みは徐々に減少する傾向にあった(写真4・5)。

注水6時間後には細胞間隙への HRP の取り込みはかなり減少したが、所々 HRP が観察される部位もあった。

注水8時間後には上皮細胞間隙に HRP は認められなかった(写真6・7)。

また、微絨毛及び纖毛も含めて細胞質全体に多量の HRP 侵入が認められる纖毛細胞(写真2・8)や、やはり細胞質全体が HRP 侵入により黒染している杯細胞(写真9)が、注水例で所々認められた。しかし注水後、時間の経過とともに黒染細胞は減少し、注水8時間後には認められなかった。

実験1の結果を表1に示す。

(実験2)

HRP の鼻粘膜上皮細胞間隙への侵入経路を調べるため、HRP 液注入直後に断頭すると、HRP が上皮細胞間の tight junction を通過している様子が観察され

た(写真10)。

IV. 考 察

本実験では、モルモット鼻腔へ水道水を one shot で注入し、鼻粘膜の透過性の経時変化を観察した。その結果、対照例では HRP はほとんど全く鼻粘膜上皮層に取り込まれなかったが、水刺激後は、鼻粘膜の透過性が亢進し、HRP は容易に上皮細胞間隙及び一部の上皮細胞の細胞質全体に取り込まれている状態が観察された。

水注入直後に HRP を注入すると、鼻粘膜上皮細胞間隙の遊離縁直下の HRP が認められた。HRP の侵入経路を明らかにするために実験の条件を変えると、HRP が tight junction を通過している様子が観察された。以上より、tight junction は水注入直後には大きく開大するものと思われた。tight junction は徐々に修復されるものの leaky な状態は数時間持続した。

tight junction は、遊離縁直下で上皮細胞間を結合し、細胞集団が外界と異なった内部環境を維持する役割を果たしている²⁾。しかし、タバコの煙³⁾ エーテル⁴⁾ ヒスタミン⁵⁾ 手術刺激⁶⁾ 浸透圧⁷⁾⁸⁾ 等が tight junction を変化させ、高分子物質を通過させるようになると報告されている。本実験においては、水道水と鼻粘膜の浸透差(水道水: 9 mos/l, ヒト血漿浸透圧: 275～290

mos/1) が tight junction に作用したものと思われる。

細胞質全体が黒染している細胞に関しては、杯細胞の分泌顆粒放出後の細胞膜断裂部よりの HRP 侵入、及び細胞膜の変性に伴う繊毛及び細胞質内への HRP 侵入と思われた。

HRP 透過性亢進の第一の要因として、水による粘液層の損失が考えられたため、正常鼻粘膜の粘液を染めてみようとしたが、困難であった(未発表データ)。今後さらに、粘液層の検討が必要である。

さて、前回の実験¹⁾では、プール水がその浸透圧により鼻粘膜を障害する可能性があることを指摘した。さらに、本実験から、水道水(プール水と浸透圧はほぼ等しい)の接触により、鼻粘膜の形態的变化が起こる以前に透過性に変化が生ずることが明らかになり、抗原や細菌がより容易に鼻粘膜に侵入する可能性が考えられた。

V. ま と め

水泳時の水が、鼻粘膜上皮の透過性に与える影響を調べるため、モルモット鼻腔に 1ml の水道水を注入し、HRP をトレーサーとして使用して光顕及び電顕で鼻粘膜を観察、以下の結果を得た。

1) 注水直後、鼻粘膜上皮の HRP 透過性は著明に亢進した。

2) HRP は上皮細胞間隙及び一部の杯細胞や繊毛細胞の細胞質全体に認められた。

3) 上皮細胞間隙への HRP 侵入は tight junction を介してなされた。

4) 鼻粘膜上皮の透過性亢進は注水後、約数時間持続した。

参 考 文 献

- 1) 大平裕子, 小池修二, 高坂知節 他: 種々なる液体、特にその浸透圧の鼻粘膜上皮に与える形態学的影響について。日耳鼻90: 1951-1962, 1988。
- 2) Staehelin LA, Hull BE: Junctions Between Living cells. 別冊サイエンス。膜と運動: 77-86, 1980, 日本経済新聞社, 東京。
- 3) Boucher RC, Johnson J, Inoue S et al: The Effect of Cigarette Smoke on the Permeability of Guinea Pig Airways. LABORATORY INVESTIGATION 43: 94-100, 1980。
- 4) Richardson J, Bouchard T, Ferguson CC: Uptake and Transport of Exogenous Proteins by Respiratory Epithelium. LABORATORY INVESTIGATION 135: 309-314, 1976。
- 5) Boucher RC, Ranga V, Pare PD et al: Effect of histamine and methacholine on guinea pig tracheal permeability to HRP: the American Physiological Society 45: 939-948, 1978。
- 6) Rhodes PS, Karnovsky MJ: Loss of Macromolecular Barrier Function Associated with Surgical Trauma to the Intestine. LABORATORY INVESTIGATION 25: 220-229, 1971。
- 7) Wade JB, Karnovsky MJ: Fracture Faces of Osmotically Disrupted Zonulae Occludentes: The Journal of cell Biology 62: 344-349, 1974。
- 8) Humbert F, Grandchamp A, Pricam C et al: Morphological changes in Tight Junctions of Necturus Maculosus Proximal Tubules Undergoing Saline Diuresis: The Journal of cell Biology 69: 90-96, 1976。
- 9) 遠藤朝彦: 慢性疾患・管理における鍛練—アレルギー性鼻炎とスポーツの関わり—。JOHNS 1: 773-778, 1985。

(原稿受付 昭和63. 3. 16日)

別刷請求先 〒980 仙台市星陵町 1-1

東北大学医学部耳鼻咽喉科学教室 大平裕子

付 図 説 明

写真1, 2, 4, 6は、左側が無染色、右側がトルイジンブルー染色。

写真1: 対照例。(×400) 上皮層に HRP は認められない。

写真2: 注水直後に HRP 注入。その5分後。(×400) 上皮細胞間隙に多量の HRP が認められる。HRP 侵入により黒染した繊毛細胞も認められる。

写真3: 注水直後に HRP 注入。その5分後。(×6000) 細胞間隙に大量の HRP が認められる。

写真4: 注水4時間後に HRP 注入。その5分後。(×400) 細胞間隙にごくわずかに HRP が認められる。HRP 侵入により黒染した杯細胞も認められる。

写真5: 注水4時間後に HRP 注入。その5分後。(×4000) 細胞間隙に少量の HRP が認められる。

写真6: 注水8時間後に HRP 注入。その5分後。

(×400) 上皮層に HRP は認められない。

写真 7：注水 8 時間後に HRP 注入。その 5 分後、
(×4500) 細胞間隙に HRP は認められない。
細胞内に HRP を含むライソゾームが存在する。

写真 8：注水 5 分後に HRP 注入。その 5 分後。(×
6000) 微絨毛及び絨毛も含めて細胞質全体に
多量の HRP が侵入した絨毛細胞が認められ

る。

写真 9：注水 4 時間後に HRP 注入。その 5 分後、
(×5000) 細胞質全体に多量の HRP が侵入し
た杯細胞が認められる。

写真 10：注水 15 分後に HRP 注入。その直後、HRP
は上皮細胞の tight junction を介して細胞間
隙に取り込まれている。