原著

工業スチレン中毒に関する研究 (XIII)

ラットにおけるスチレンの気道粘膜障害に関する実験的研究
—線毛運動機能と微細構造におよぼす影響の経時的観察—

大橋 淑 宏*, 中井 義 明*, 原 田 博 文*
堀 口 俊 一**, 寺 本 敬 子**

STUDIES ON INDUSTRIAL STYRENE POISONING (PART XIII)

Experimental Studies about the Damage on the Mucosal Membrane
of Respiratory Tracts of Rats Exposed to Styrene—Contemporary
Observations of the Changes in Ciliary Functions
and Fine Structures

Yoshihiro OHASHI,* Yoshiaki NAKAI,* Hirohumi HARADA,*
Shun'ichi HORIGUCHI** and Keiko TERAMOTO**

Styrene is known to have an irritating effect on the tracheal mucosa, but there are few reports that have demonstrated it histologically.

We carried out styrene-exposure experiments on rats, and made observations on morphological changes of the trachea with an electron-microscope. Observations on its functional aspects were also made by estimation of the ciliary movement per minute.

The present study has revealed a considerable damaging effect of styrene on the tracheal mucosa, which we have presented in this report in the hope that it could be used as an index in settling the maximum permissible concentration of styrene for the future.

I. 緒 言

スチレンをとり扱う作業者の上, 下部気道に刺激症状のみられることが知られている。しかし, これを立証するためのスチレンの粘膜刺激性, ことに気道粘膜に対する刺激による障害に関する研究は比較的に乏しいようである。前回の報告¹⁾において, われわれはラットにスチレンをくり返し暴露した場合の暴露中止3週間における気道粘膜の形態的变化を電子顕微鏡レベルで報告した。このなかでわれわれはスチレンは気道粘膜障害性を有し

ていることを明らかにしたが, 今回は暴露期間と暴露の量による障害性をさらに詳細に検討するとともに, 生体において気道粘膜が担っている機能のなかでも最も重要と考えられる線毛運動機能に与える影響についても実験的に検討した。

II. 実験材料および方法

1. 実験材料

生後20週齢のSD系ラットを用い, 対照群低濃度(スチレン約150 ppm)暴露群, 高濃度(スチレン約1,000 ppm)暴露群(各群10匹)に分け, それぞれ1週間および3週間にわたり毎日4時間スチレン暴露を行った。なお, スチレン濃度の測定はガスクロマトグラフィー法によった。

これらの動物を暴露中止翌日に空気塞栓にて死亡せしめ, 鼻粘膜および気管粘膜を採取した。

* 大阪市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室

** 大阪市立大学医学部衛生学公衆衛生学教室
昭和56年11月26日受付

* Department of Otorhinolaryngology, Osaka City University Medical School

** Department of Preventive Medicine and Public Health, Osaka City University Medical School
Received for publication, November 26, 1981

Fig. A. The apparatus for observing ciliary movement. A peeled mucous membrane was sealed in a chamber shown in the upper left part, and was observed by 400-power magnification. Focusing on the ciliary group of ciliary cells appearing on the fold of the epithelium of mucous membrane, changes of the light caused by the ciliary movement were detected by a cadmium sulfide photo detector plate through a pinhole. The detected light was fed into the oscilloscope and heat-sensitive oscillograph by way of ciliary pulsation pickup and high sensitivity DC amplifier, and ciliary beats/minute were counted on the drawn waveforms.

Fig. B. Groups of the control. In the groups of the control, the ciliary beats/minute were stable around 700 to 800.

2. 線毛運動機能の観察 (Fig. A)

得られた鼻粘膜および気管粘膜を 1 cm^2 程度に細分化し、線毛運動測定に用いた。細分化した粘膜を眼科用微細メスを用いてなるべく薄い切片として切り離し、これをローズチェンバー内に封入した。このローズチェンバー内の組織片は、セロファンシートで被うことにより観察中に移動することを防止した。またこのセロファンに

Fig. C. Groups exposed to styrene of lower concentrations (Trachea). When exposed for a week, changes in the ciliary movements were slight, but when exposed for three weeks, lowering of movements of about 15% was noted.

は針で多数の小孔をあけ、生食水がセロファンの下層に入りやすくした。

標本の封入装置の断面図は、Fig. Aに示すごとく、有窓金属板2枚、カバーガラス2枚、有窓ゴム板(厚さ4 mm)、セロファン1枚、注射針2本、温度測定用電極

Fig. D. Groups exposed to styrene of lower concentrations (Nose). After one-week exposure, the ciliary movements per minute lowered by about 40%, and after three-week exposure, the results dropped to about 55%.

Fig. F. Groups exposed to styrene of higher concentrations (Nose). In one-week exposure, the ciliary function was considerably disturbed, and lack of ciliary movements was observed in about 1/2 portions. In three weeks of exposure, almost no ciliary function was recognized.

Fig. E. Groups exposed to styrene of higher concentrations (Trachea). When exposed for a week, the ciliary beats per minute lowered at about 46%. After exposure for three weeks, lack of ciliary movements was noted in about 1/3 portions.

から成り立っており、このチェンバー内の容積は約 3 ml である。ローズチェンバー内には採取した粘膜が十分浸漬される程度の生食水を注入した。温度測定用電極は安立計器製表面温度計 HP-4 F(R) に接続され、チェンバー内の温度の測定を継続して行った。

ローズチェンバーを載せた倒立顕微鏡の載物台は恒温装置の中に入れられているため観察中のローズチェンバー内の温度の測定を継続して行った。ローズチェンバーを載せた倒立顕微鏡の載物台は恒温装置の中に入れられているため観察中のローズチェンバー内の温度は常に $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に一定せしめ、これを厳密に確認するために、実験中は絶えず電気温度計による温度測定を続けた。

線毛運動測定装置は具体的には日本光学工業製の倒立顕微鏡 (M型) に位相差顕微鏡 (ニコン) を組みあわせて、倍率は対物レンズ 40 倍、接眼レンズ 10 倍で 400 倍で観察した。粘膜上皮の折れ目に出た線毛細胞の列を視野に入れ、目標とする一つの線毛細胞の線毛群に焦点を合わせ、この線毛細胞の線毛運動により生ずる光の変化をピンホールを通して硫化カドミウム受光板に受け、こ

れが線毛脈波ピックアップ（日本光電製）を経て、高感度直流増幅器（日本光電製）に接続される。これによりオシロスコープ（日本光電製 VC-8）、感熱式オシログラフに導くことにより線毛脈波を記録し、オシログラフ上に描かれた波形より線毛運動数（打/分）を計測した。

3. 形態学的観察方法

形態学的観察は主に透過電子顕微鏡にて観察した。2.5% glutaraldehyde にて4時間固定後、燐酸緩衝液（pH 7.4）にて洗浄、さらに2%オスミウム酸にて2時間の後固定、上昇系列アルコールで脱水し、プロピレンオキサイドで置換後、Epon 812 にて包埋し、ミクロームにて超薄切片を作製した。電子染色は酢酸ウラン、硫酸鉛による二重染色を行い、日立電子顕微鏡 HS-9 で観察した。

III. 成 績

1. 線毛運動機能の観察

1) 対照群における気管粘膜線毛運動

空気のみを暴露した対照群の気管粘膜における線毛運動機能を位相差顕微鏡下に観察した場合には、観察される粘膜のほぼ全域において活発な線毛運動を認めた。これらの運動の分時運動数を前述の電気光学的手法により計測すると、その平均値は約 760 打/分であった。

2) 対照群における鼻粘膜線毛運動の観察

空気のみに暴露した鼻粘膜の線毛運動機能を観察した場合、対照群の気管粘膜の線毛運動機能とほぼ同様であった。

3) 低濃度暴露群における気管粘膜線毛運動の観察

暴露1週間後では線毛運動機能は良好に保たれており、その分時線毛運動数の平均は約 750 打であった。

暴露期間が3週間におよぶと線毛運動機能はかなり低下して、障害が観察された。分時線毛運動数の平均は約 650 打となり、対照群と比較して 14.5% 程度の低下を認めた。

4) 低濃度暴露群における鼻粘膜線毛運動機能の観察

暴露1週間後では線毛運動機能は中等度に障害が観察された。その分時線毛運動数の平均は約 450 打で、対照群と比較して約 41% 程度の低下を観察した。さらに暴露が3週間におよぶと、線毛運動機能の障害はさらに高度となり、分時線毛運動の平均は約 340 打で対照群と比較して 55.3% の低下が観察された。

5) 高濃度暴露群における気管粘膜線毛運動機能の観察

暴露1週間後の気管粘膜の線毛運動機能は中等度に障害されていたが、線毛運動の消失はみられなかった。分

時線毛運動中の平均は約 410 打であり、対照群と比較して 46% の低下が観察された。暴露が3週間に至ると線毛運動機能にはかなり高度な障害が観察された。すなわち、位相差顕微鏡下に観察される領域の1/3において線毛運動の消失を認めた。また、その分時線毛運動数の平均は約 140 打であり、対照群と比較して約 82% の低下を認めた。なお、気管の部位による線毛運動の差異を観察した場合には、喉頭直下で最も障害が強く、下部では障害の程度は上部よりも軽度であった。

6) 高濃度暴露群における鼻粘膜線毛運動機能の観察

暴露1週間後においてすでに鼻粘膜の線毛運動機能には高度の障害が観察された。すなわち、位相差顕微鏡下に観察される領域の1/2以上の部で線毛運動は消失していた。また、その分時線毛運動数の平均は約 100 打であり、対照群と比較して約 87% の低下が観察された。

暴露3週間後に至ると、線毛運動機能はさらに著しく障害されており、ほぼ全域において線毛運動は消失していた。

2. 電子顕微鏡による観察

1) 低濃度暴露群における気管粘膜上皮の観察 (Fig. 1~5)

Fig. 1, 2 に1週間暴露後の気管粘膜上皮を示す。対照群と比較して、粘膜上皮構築に乱れや細胞の脱落などは観察されなかった。線毛細胞では細胞質内に大小不同の高電子密度顆粒 (Fig. 1 arrow A) の増加、小胞体の拡大像と推察される小空胞 (Fig. 1 arrow B および Fig. 2 arrow A)、ときに糸粒体の拡大像 (Fig. 2 arrow B) などが観察された。また、複合線毛の出現や線毛膜の消失などは観察されなかった。Fig. 2 の arrow C に示すような部分的な細胞質の膨化突出をときに認めた。

暴露が3週間におよぶと、高電子密度顆粒の出現、小胞体の空胞化などの変化に加えて、線毛構造にも変化を観察した。Fig. 3 に線毛膜の膨化を示す。この線毛膜の膨化が著しい場合には Fig. 4 および Fig. 5 に示すような複合線毛の形成を観察した。

2) 低濃度暴露群における鼻粘膜上皮の観察 (Fig. 6~11)

低濃度1週間暴露後の鼻粘膜上皮の形態を Fig. 6 に示す。鼻粘膜では同条件の気管粘膜と比較すると、著明な細胞間隙の拡大、胞体内の空胞化、高電子密度顆粒の増加などが観察された。Fig. 7 に示すように上皮内への遊走細胞の侵入もときに観察された。また、線毛細胞でも Fig. 8 に示すような高度の空胞化、Fig. 9 に示すような線毛膜の消失などの変化も観察されたが、上皮細胞の脱落は認めなかった。

暴露が3週間におよぶと、上細胞内の高電子密度顆粒の著明な増加 (Fig.10), 線毛細胞における線毛の減少 (Fig.10), また線毛細胞の減少 (Fig.11) が観察された。

3) 高濃度暴露群における気管粘膜上皮の観察 (Fig. 12~16)

高濃度1週間暴露後の気管粘膜上皮では線毛細胞の減少, 線毛細胞における線毛の減少, 高電子密度顆粒の増加, 小胞体の拡大像などが主たる変化として観察された (Fig.12)。また, 線毛細胞における胞体内の著明な空胞化も観察された (Fig.13)。

暴露が3週間におよぶと、上皮細胞の自由表面における線毛や微絨毛の消失 (Fig.14) 胞体内の巨大な空胞化や細胞間隙の著しい拡大像 (Fig.15), さらに自由表面の細胞膜の膨化と部分的な破綻 (Fig.15) などの変化が観察された。Fig.16 に示すように、広範囲にわたる線毛膜の消失も観察された。

このように高濃度暴露群ではかなりの障害が観察されたが、上皮細胞の脱落は観察されなかった。

4) 高濃度暴露群における鼻粘膜上皮の観察

1週間暴露の鼻粘膜では線毛細胞など上皮細胞の脱落が観察された (Fig.17~19)。また, Fig.19 の arrow A に示すように基底小体を残して線毛の消失や Fig.17 の arrow A, Fig.18 の arrow A, Fig.19 の arrow B に示すような核の濃縮も観察された。Fig.20 に遺残する線毛細胞と杯細胞とを示す。線毛細胞では糸粒体の破壊, 杯細胞では分泌顆粒の電子密度の変化が観察される。また, Fig.21 に示すような線毛細胞の新生像も観察された。この新生線毛細胞中には多数の基底小体と precentriole precursor body が認められた。

暴露が3週間におよぶと, Fig.22 に示すように線毛細胞はほとんど観察されず, 脱落しつつある上皮細胞の高度破壊像が観察された。Fig.23 の arrow に示すように, 線毛細胞では基底小体は認められたが, 上皮自由面に線毛は観察されなかった。また Fig.24 に示すように基底細胞の露出もかなりの頻度で観察された。

IV. 考 察

産業現場でスチレンに暴露される労働者に鼻をはじめとする気道粘膜の刺激症状が認められるという報告は多い。前報で記載したごとく, ヒトでは Stewart ら²⁾, Oltramare ら³⁾, Pokrowskij⁴⁾ などの研究があり, これによるとヒトの気道粘膜に対して濃度, 期間, 個体差は認められるが, スチレンが悪影響を有することは想像するにむずかしくない。一方, 動物実験では, Spencer

ら⁵⁾, Wolf ら⁶⁾ の報告がある。

これらの文献的考察よりヒトおよび動物の気道粘膜におよぼすスチレンの刺激作用は明らかであるが, われわれの今回の報告を除けば, このスチレンの気道粘膜障害性についての組織学的研究は, 著者の知る範囲ではみられない。前回のわれわれの報告では1日4時間, 週5日で連続12週間, 30 ppm, および800 ppm のスチレンを暴露し, 暴露中止3週間後における鼻粘膜および気管粘膜の変化を透過ならびに走査電子顕微鏡を用いて観察し, 30 ppm, 暴露群の気管粘膜ではほとんど変化を認めなかったが, 30 ppm 暴露群の気管粘膜および800 ppm 暴露群の気管および鼻粘膜では対照群と比較して変化を観察した。ときに800 ppm 暴露群の鼻粘膜では上皮細胞の脱落が観察された。しかし, 前回の報告は暴露中止3週間後の気道粘膜の状態を観察したものであり, 一部に回復の過程も入っていたものと考えられる。

このため暴露中止直後の気道粘膜について電子顕微鏡観察を行った。また, 生体内で気道上皮が担っている機能のなかでも最も重要と思われる線毛運動機能についても観察し, その線毛運動機能の障害された程度を客観的に比較検討するためにすでにわれわれが報告している電気光学的方法によって定量的に分時線毛運動数を測定した^{7,8)}。

この結果, 気道粘膜にはスチレン吸入によると思われる障害を機能的にも形態的にも認めた。とくに150 ppm 程度の暴露によってもかなりの障害を認めたため, ヒトとラットにおける気道粘膜の易受傷性の差異を差し引いても, スチレンをとり扱う事業所の健康管理を考えるうえで, 本研究の成績は意義あるものと考えられる。なお, 全例において鼻腔粘膜での障害が気管粘膜よりも高度であった点に関しては組織における易障害性の差よりも組織に到達する濃度差が大きいであろうと推察される。すなわちエアロゾルの状態で鼻腔内に侵入した後に, 鼻腔の加湿作用により液化したスチレンが鼻粘膜に停滞し, より下部気道へはあまり到達しなかったためと考える。

今後の問題としては, スチレンによって障害された気道粘膜の回復の可逆性について考えねばならない。すなわち, 暴露濃度および暴露期間の軽重により, 回復過程に差が生じるかどうかなどについて検討することも重要な因子と考える。この点については, 今回と同様に機能と形態の両面より今後さらに検討していく予定である。

V. ま と め

スチレンの許容濃度の設定の基礎的資料となることを目的として, ラットを用いた動物モデル実験を施行し

た。暴露実験により得られた気道粘膜について、主として電子顕微鏡による形態学的観察と線毛運動機能の観察を行い、以下の成績を得た。

1) 150 ppm 暴露群の気管線毛運動は対照群と比較して、あまり変化は観察されなかったが、鼻粘膜線毛運動はほぼ半減していた。

2) 1,000 ppm 暴露群の気管線毛運動はかなりの運動低下が観察され、鼻粘膜ではほとんど運動性が消失していた。

3) 気道粘膜はスチレン暴露の量と期間に応じて種々の変化が観察された。とくに鼻粘膜の障害は高度であり、基底細胞の露出も観察された。

文 献

- 1) 大橋淑宏, 中井義明, 堀口俊一, 寺本敬子: 工業スチレン中毒に関する研究 (XII) スチレン暴露ラットにおける気道粘膜の電子顕微鏡的観察, 産業医学, 23: 513-529, 1981.
- 2) Stewart, R. D., Hugh, C. D., Edward, D. B. and Arnold, W. S.: Human exposure to styrene vapor, *Arch. Environ. Health*, 16: 656-662, 1968.
- 3) Oltramare, M., Desbaumex, E., Imholff, C. et Michiels, W.: *Toxicologie du Styrene Monomere*, Edition Médecine et Hygiène, Geneve, 1974.
- 4) Pokrowskij, V. A.: La toxicologie du styrène, *Gig. Tr. Prof. Zabol.*, 5(5): 3, 1961.
- 5) Spencer, H. C., Irish, D. D., Adams, E. M. and Rowe, V. K.: The response of laboratory animals to monomeric styrene, *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, 24: 295-301, 1942.
- 6) Wolf, M. A., Rowe, V. K., McCollister, D. D., Hollingsworth, R. L. and Uyen, F.: Toxicological studies of certain alkylated benzenes and benzene, *A.M.A. Arch. Ind. Health*, 14: 387, 1956.
- 7) 大橋淑宏, 中井義明, 箕輪靖弘: 家兎胎生晚期気道線毛運動の特殊性に関する機能的並びに形態学的研究, 日食食会報, 32: 422-432, 1981.
- 8) 大橋淑宏, 中井義明: 鼻副鼻腔疾患の薬物療法に関する基礎的研究—硫酸テルブタリンの線毛運動賦活作用について—, 耳鼻臨床, 75: 93-104, 1982.

著者への通信先: 大橋淑宏, 〒545 大阪市阿倍野区旭町1丁目5-7 大阪市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室 *Reprint requests to* Department of Otorhinolaryngology, Osaka City University Medical School, 5-7, Asahimachi 1-chome, Abeno-ku, Osaka. 545 Japan (Y. Ohashi)

Legend of the Figures (Figs. 1~24)

Fig. 1. The tracheal mucosa in the group exposed to the low concentration for one week. There is no significant disorder in the epithelial structure, but granules with a higher electronic density (arrow A) and a magnified view of endoplasmic reticula (arrow B) may be seen.

Fig. 2. The same as the above. Swelling of mitochondria and partial projection of swollen endoplasm may be seen.

Fig. 3. The tracheal mucosa in the group exposed to the low concentration for three weeks, showing swelling of the membrane of cilia.

Fig. 4. The tracheal mucosa in the group exposed to the low concentration for three weeks, showing a vertical section of compound cilia indicated by the arrow.

Fig. 5. The same as the above, showing a cross section of compound cilia.

Fig. 6. The nasal mucosa in the group exposed to the low concentration for one week. Prominent dilation of intercellular spaces, appearance of granules with a higher electronic density (arrow A), vacuolization within endoplasm (arrow B) and interepithelial infiltration of wandering cells (arrow C) may be seen.

Fig. 7. The nasal mucosa in the group exposed to the low concentration for one week. Showing a view similar to Fig. 6.

Fig. 8. The same as the above. Showing remarkable vacuolization of ciliated cells within the cellular body and appearance of giant granules with a higher electronic density.

Fig. 9. The same as the above, showing reduction or disappearance of cilia.

Fig.10. The nasal mucosa in the group exposed to the low concentration for three weeks, showing a remarkable increase in the number of granules with a higher electronic density and a decrease in the number of cilia in ciliated cells.

Fig.11. The same as the above, showing a decrease in the number of ciliated cells.

Fig.12. The tracheal mucosa in the group exposed to the high concentration for one week, showing a decrease in the number of ciliated cells and an increase in the number of granules with a higher electronic density.

Fig.13. The same as the above, showing remarkable vacuolization of ciliated cells within the cellular body.

Fig.14. The tracheal mucosa in the group exposed to the high concentration for three weeks, showing a decrease in the number of cilia and an increase in the number of granules with a higher electronic density.

Fig.15. The same as the above. Swelling and partial disruption of cytoplasm may be seen.

Fig.16. The same as the above. Missing of the membrane of cilia may be seen over an extensive area.

Fig.17. The nasal mucosa in the group exposed to the high concentration for one week. Partial falling-off of the epithelial cells, disorder of the epithelial structure and nuclear pyknosis (arrow A) may be seen.

Fig.18. The tracheal mucosa in the group exposed to the high concentration for one week, showing disorder of the epithelial structure, falling-off of the epithelial cells and nuclear pyknosis (arrow A).

Fig.19. The same as the above. Intensive degeneration and damage may be seen on the remaining ciliated cells, too.

Fig.20. The same as the above, showing the remaining ciliated cells and gonocytes.

Fig.21. The same as the above, showing new formation of ciliated cells.

Fig.22. The nasal mucosa in the group exposed to the high concentration for three weeks. The epithelial cells are more intensively destroyed, and there are few, if any, normal ciliated cells. Besides, there are mild changes even under the epithelium.

Fig.23. The same as the above. No normal ciliated cells may be seen, but there are residual basal bodies as pointed out by the arrow.

Fig.24. The same as the above, showing the basal cells being exposed in association with falling-off of the ciliated cells and gonocytes.