原著

テトラヒドロフラ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**, 片平 卓 男**EXPERIMENTAL STUDIES ON THE MUCOSAL MEMBRANE
OF RESPIRATORY TRACTS OF RATS EXPOSED
TO TETRAHYDROFURANChanges in Ciliary Functions and Fine Structures with Time
by Electron MicroscopyYoshihiro OHASHI,* Yoshiaki NAKAI,* Hirohumi HARADA,*
Shun'ichi HORIGUCHI,** Keiko TERAMOTO** and Takao KATAHIRA**

Tetrahydrofuran (THF) is known to show high volatility as a physico-chemical characteristic. Therefore, workers in the plants using THF may be exposed to THF vapor at high concentrations in some cases. On the other hand, some disturbances and hazards of the respiratory system by exposure to THF have been reported. We have, therefore, performed a model experiment by using rats in order to prove the respiratory toxicity of THF. Rats were exposed to THF of about 100 and 5,000 ppm, and observations were made on the morphological changes and ciliary functions. As follows are the results.

1. Observation of ciliary beatings

1) In the case of exposure to THF of about 100 ppm for one day, number of ciliary beats of the tracheal mucous membrane was observed to be about 760 per minute, and that of the nasal mucous membrane was about 710. These values were nearly the same as in the control group.

2) In the case of exposure to THF of about 100 ppm for one week, the mean number of ciliary beats per minute of tracheal mucous membrane was about 720, which corresponded to about 5% decrease as compared with the control. Similarly, that of the nasal mucous membrane was about 640, being about 11% decrease as compared with the control.

3) The mean number of ciliary beats per minute of the tracheal mucous membrane exposed to THF of about 100 ppm for 3 weeks was about 680, which was about 11% decrease as compared with the control. That of the nasal mucous membrane was about 460, being about 39% decrease as compared with the control.

4) The number of ciliary beats of the tracheal mucous membrane exposed to THF of about 5,000 ppm for one day was about 750, which showed hardly any decrease as compared with the control. The number of ciliary beats per minute of the nasal mucous membrane was about 700,

* 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教室

昭和57年1月29日受付

* Department of Otorhinolaryngology, Osaka City University Medical School

** Department of Preventive Medicine, Osaka City University Medical School

Received for publication, January 29, 1982

which showed also hardly any decrease as compared with the control.

5) In the case of exposure to THF of about 5,000 ppm for one week, the number of the ciliary beats per minute of the tracheal mucous membrane was about 620, being about 18% decrease as compared with the control. Also, that of the nasal mucous membrane was about 520, being about 28% decrease as compared with the control.

6) The numbers of ciliary beats per minute of the tracheal mucous membrane exposed to THF of about 5,000 ppm for 3 weeks was about 580, being about 24% decrease as compared with the control. On the other hand, the ciliary actions of the nasal mucous membrane was mostly absent.

2. Morphological observation

1) Any morphological changes was not noted in the tracheal mucosal epithelium exposed to THF of about 100 ppm. On the other hand, vacuolation of cytoplasm, formation of compound cilia and ballooning of the cell membrane were observed in the nasal mucosal epithelium.

2) In the tracheal mucosal epithelium exposed to THF of about 100 ppm for 3 weeks, sthenia of mucous secretion and slight expansion of intercellular space were noted. In nasal mucosal epithelium, remarkable vacuolation of ciliated cells, increase of high-electron density granules, absence of cilia, and partial destruction of the cell membrane were found.

3) In the tracheal mucosal epithelium exposed to THF of about 500 ppm for one week, increased large granules of high-electron density of cytoplasm, and the decrease of cilia were observed. Defect of cellular wall and loss of cellular organella were noted in the nasal mucosal cells.

4) In the tracheal mucosal epithelium exposed to THF of about 5,000 ppm for 3 weeks, increased large granules of high-electron density and remarkable ballooning of the cytoplasm were noted. Absence of ciliated cells or goblet cells were found at the portion damaged most severely in the nasal mucosal epithelium.

I. 緒 言

われわれは衛生学教室において有機溶剤の健康障害に関する実験的研究を進めており、また耳鼻咽喉科学教室において気道粘膜上皮の生理と病態に関する研究を進めている¹⁻³⁾。

ところで、有機溶剤に共通する作用の一つとして、皮膚、粘膜に対する刺激性が挙げられる。この場合、溶液の状態ではかなり刺激性の強い溶剤があるが、蒸気の状態では気道粘膜などへの刺激作用はさほど著しくないとみなされている。しかし、われわれは動物をスチレンやテトラヒドロフラン (THF) に吸入暴露させて、その気道粘膜を電子顕微鏡的に観察したところ、いずれの溶剤も許容濃度付近の暴露においても、微細構造に変化をきたすことを認めて、これを報告した¹⁻³⁾。

今回は前報⁵⁾に引き続き、気道粘膜におよぼす THF の影響について、許容濃度以下の吸入暴露をも行い、その影響を経時的に電子顕微鏡的に観察した。さらに、気道粘膜の役割のうち最も重要な機能の一つである線毛運動機能について、電気光学的方法によって観察したので、併せて報告する。

II. 実験材料および方法

1. 実験材料

SD 系ラット (日本クレア) を空気のみにも暴露した対照群、約 100 ppm (100 ± 18 ppm) の THF に暴露した低濃度暴露群、約 5,000 ppm ($5,000 \pm 384$ ppm) の THF に暴露した高濃度暴露群の 3 群に分け、それぞれ 4 時間/日、5 日/週の吸入暴露を行った。

2. 線毛運動機能の観察

対照群、低濃度暴露群、高濃度暴露群の各群の鼻粘膜および気管粘膜の線毛運動機能を前報³⁾と同じ Fig. A* に示すような装置を用いて、すでにわれわれが報告している方法で直接的かつ定量的に観察した¹⁻³⁾。なお、線毛運動機能の観察は各暴露濃度で、暴露 1 日後、暴露 1 週後、暴露 3 週後の動物について検討した。

3. 形態学的観察

各群の暴露後 1 週および 3 週における鼻粘膜および気管粘膜を採取し、これを 2.5% グルタルアルデヒドと 2% オスミウム酸による二重固定の後に Epon 812 にて包埋し、ウルトラミクロームで作製した超薄切片をウランおよび鉛の二重染色を施し、日立 HS-9 透過電子顕微鏡で観察した。なお、観察は部位による差を除外する

* 24 巻 4 号掲載の図と同じであるが、読者の便宜上再掲載した。

Fig. A. Apparatus for observing ciliary functions. A slice of exfoliated mucosa was enclosed in the chamber shown at the upper left and observed by a light microscope at 400 magnification. A cluster of ciliated cells on the crease of the mucosal epithelium was brought into focus, of which ciliary movement varied the amount of light. The light had been transmitted through a pinhole to a photoreceptor of cadmium sulfide. Electrical pulses thus produced were, via a ciliary pulse pick-up and highly sensitive direct current amplifier, led to an oscilloscope and a thermosensitive oscillograph. Wave thus obtained were used for the calculation of the rate of ciliary beats.

Fig. B. The ciliary beats per minute of the trachea exposed to THF of lower concentration. One day after exposure to THF, no marked differences in ciliary beats per minute were observed between the treated and the control groups, but one week later, a nearly 5% decrease was observed in the THF-exposed group. Three weeks later, an approximately 10% reduction in ciliary function was observed.

Fig. C. The ciliary beats per minute of the nose exposed to THF of lower concentration. Although no significant differences in ciliary beats per minute were seen between the group one day after exposure and the control, approximately 11% and 40% reductions were noted in the treated group one and three weeks later, respectively.

Fig. D. The ciliary beats per minute of the trachea exposed to THF of higher concentration. No significant reduction in ciliary function was observed between the group one day after exposure and the control, but one and 3 weeks later, treated group showed decreases of about 18% and 24% in ciliary beats per minute, respectively.

ために、鼻粘膜は鼻中隔の中央部、気管粘膜では中央部でかつ軟骨部を中心に行った。

III. 成績

1. 線毛運動機能の観察 (Fig. B ~ E)

1) 対照群

空気のみを暴露した対照群の鼻粘膜および気管粘膜の分時線毛運動数は平均約 760 打で一定していた。

2) 低濃度暴露群気管粘膜 (Fig. B)

暴露 1 月後では対照群とほぼ等しい分時線毛運動数を示し、平均で約 760 打であった。暴露 1 週後の分時線毛運動数の平均は約 720 打で対照群と比較して、その低下率は約 5% であった。暴露 3 週後での分時線毛運動数の平均は約 680 打とやや低下の傾向を示したが、対照群と比較して、その低下率は約 11% と軽度であった。

3) 低濃度暴露群鼻粘膜 (Fig. C)

暴露 1 日後の分時線毛運動数は約 710 打で対照群と比較してもほとんど有意の変化は認められなかった。暴露 1 週後の分時線毛運動数の平均は約 640 打程度と軽度に低下していた。これは対照群と比較して約 11% の低下であった。暴露が 3 週間におよぶと、鼻粘膜の線毛運動

Fig. E. The ciliary beats per minute of the nose exposed to THF of higher concentration. One day exposure produced a mild decrease in ciliary beats per minute, a week-long exposure produced an approximately 22% drop. Three week long exposure caused nearly cessation of ciliary movements.

機能はさらに低下し、分時線毛運動数の平均は約 460 打となり、対照群と比較して約 39% の低下を示した。

4) 高濃度暴露群気管粘膜 (Fig. D)

暴露 1 日後の分時線毛運動数の平均は約 750 打で対照群と比較してもほとんど有意の低下は認めなかった。ところが、この濃度の暴露が 1 週間におよぶと線毛運動機能は軽度の低下を示した。すなわち、分時線毛運動数は約 620 打となり対照群の約 82% に低下していた。暴露 3 週後では線毛運動機能はさらに低下して、分時線毛運動数の平均は約 580 打となり、対照群の約 76% に減弱していた。

5) 高濃度暴露群鼻粘膜 (Fig. E)

暴露 1 日後の分時線毛運動数の平均は約 700 打で対照群と比較して、低下は軽度であった。暴露 1 週後では鼻粘膜線毛運動機能は中等度に低下し、その分時線毛運動数の平均値は約 520 打となり、対照群と比較して約 28% の低下を観察した。さらに暴露期間が 3 週間におよんだ場合には鼻粘膜の線毛運動機能は高度に障害されて、かなりの部分で線毛運動の廃絶を観察した。

2. 形態的観察

1) 100 ppm THF, 1 週間暴露群 (Fig. 1~3)

気管粘膜上皮にはほとんど変化を認めなかった。

Fig.1. Nasal epithelium exposed to THF of lower concentration for 1 week. Arrows A and B indicate atrophy and vacuolation of cytoplasm; arrow C, swelling projection of cell membranes.

Fig.2. Nasal epithelium exposed to THF of lower concentration for 1 week. Formation of compound cilia accompanied by swelling of cell membranes are visible.

鼻粘膜上皮では、Fig.1 に示すように上皮細胞の脱落などの高度の変化はまったく観察しなかったが、arrow A および B のような細胞質の萎縮や空胞化を認めた。また arrow C に示すような細胞膜の膨化突出像を観察した。Fig.2 に示すように細胞質の膨化に伴う複合線毛が観察された。また、細胞内に小空胞の増加も時に認めた (Fig.3)。

2) 100 ppm, THF, 3 週間暴露群 (Fig.4~5)

気管粘膜上皮では、杯細胞分泌顆粒の性状の変化や分泌亢進像 (Fig.4), 上皮細胞間における軽度の細胞間隙の拡大などの変化が観察された。

鼻粘膜上皮では上皮細胞に著明な空胞変性や高電子密度顆粒の増加を認めた。線毛細胞の細胞質にも変性に伴うと思われる電子密度の変化や頸部における線毛の脱落, および自由表面細胞膜の一部破綻, 細胞間隙の軽度拡大などの像を観察した (Fig.5)。

Fig.3. Nasal epithelium exposed to THF of lower concentration for 1 week. A great number of vacuolations are observable in the epithelial cells.

Fig.4. Tracheal epithelium exposed to THF of lower concentration for 3 weeks. Changes in the properties of secretory granules of goblet cells and polyrrhea are noted.

Fig.5. Nasal opithelium exposed to THF of lower concentration for 3 weeks. This shows the marked vacuolar degeneration of the epithelium cells, the increase in higher electronic density, the change in electronic density of the ciliary cells, ciliary depilumation in the neck and partial disintegration of cell membranes.

Fig.6. Tracheal epithelium exposed to THF of higher concentration for 1 week. Increase in the number of large drops of higher electronic density and decrease in the number of cilia are shown.

Fig.7. Nasal epithelium exposed to THF of higher concentration for 1 week. Breakage of cell membranes on the free surface and accompanying loss of intracellular organella are seen.

Fig.8. Nasal epithelium exposed to THF of higher concentration for 1 week. Breakage of cell membranes on the free surface and accompanying loss of intracellular organella are seen.

Fig.9. Nasal epithelium exposed to THF of higher concentration for 1 week. Enlarged images of vacuoles containing a great deal of amorphous matrix are found in the epithelial cells.

Fig.10. Tracheal epithelium exposed to THF of higher concentration for 3 weeks. Ciliary cells containing increased numbers of large drops of higher electron density are shown.

Fig.11. Tracheal epithelium exposed to THF of higher concentration for 3 weeks. No decudation of the epithelial cells is noted, but swollen projection of cell membranes was frequently observed.

Fig.12. Tracheal epithelium exposed to THF of higher concentration for 3 weeks. Many compound cilia with the swelling of cell membranes are shown.

Fig.13. Nasal epithelium exposed to THF of higher concentration for 3 weeks. In mildly impaired regions, increases in intracellular granules of higher electronic density, vacuolation of large and small sizes, and partial cellular disintegration are observed.

Fig.14. Nasal epithelium exposed to THF of higher concentration for 3 weeks. In moderately impaired regions, moth-eaten disintegration and decudation of the epithelial cells are seen.

Fig.15. Nasal epithelium exposed to THF of higher concentration for 3 weeks. In severely impaired regions, degeneration of most ciliary and goblet cells is observed; only basal cells remaining unaltered.

Fig.16. Nasal epithelium exposed to THF of higher concentration for 3 weeks. In most severely impaired regions, even the remaining basal cells show severe impairment.

3) 5,000 ppm THF, 1週間暴露群 (Fig. 6~9)

気管粘膜上皮では Fig. 6 のような巨大な高電子密度物質の増加, 線毛の減少などを認めた。

鼻粘膜上皮では, Fig. 7, 8 のような自由表面細胞膜の破綻とこれに伴う細胞内小器官の脱失像を観察した。また Fig. 9 のような無定形基質を入れた小空胞の拡大像を多く観察した。

4) 5,000 ppm, THF, 週間暴露群 (Fig. 10~16)

気管粘膜上皮では線毛細胞内に巨大な高電子密度物質を多く観察した (Fig. 10)。

上皮細胞の脱落は認められなかったが, Fig. 11 のような線毛細胞自由表面の細胞膜の膨化突出像を認めた。また複合線毛も多く観察された (Fig. 12)。

鼻粘膜ではかなり高度な変化が観察された。病変の程度が比較的軽度な場合には上皮細胞の脱落などの変化は認められなかったが, Fig. 13 に示すような高電子密度顆粒の増加, 大小不同の空胞形成, 部分的な細胞の崩壊などの像を観察した。障害が中等度の部位では虫食い状に上皮細胞が崩壊脱落した像を観察した (Fig. 14)。これらの変化が高度に出現すると, Fig. 15 に示すように線毛細胞および杯細胞のほとんどが崩壊脱落して基底細胞のみが残存している像が観察された。さらに変化が著明な場合には Fig. 16 に示すように残存する基底細胞にも高度な障害が観察された。

IV. 考 察

THF は古くから知られている有機溶剤の1種で, 近年合成化学工業の発展に伴ってさらに用途が拡大されている。THF は揮発性が大きく, これをとり扱う事業所では作業者に対する経気道暴露も無視できないと考えられる。

一方, ヒトに対する毒性としては前報で引用したごとく, Stoughton と Robbins (1936)¹⁰⁾, 堀内ら (1967)¹¹⁾, 堀内ら (1956)¹²⁾, 堀口ら (1968)¹³⁾, 堀口 (1981)¹⁴⁾, Emmett (1976)¹⁵⁾, などの報告がある。また動物を用いた実験的報告としては, Stoughton と Robbins (1936)¹⁰⁾, Lehmann と Flury (1943)¹⁶⁾ がある。これらの報告のなかでも, Emmett (1976)¹⁵⁾ は嗅覚錯誤 (Parosmia) と嗅覚減退 (hyposmia), および副鼻腔炎が THF 吸入によって発症したことを報告している。また最近, 片平ら (1981)¹⁷⁾ はラットに 5,000 ppm の THF を吸入暴露させた際に, 流涙, 流涎, 鼻さきの出血を認め, これらは粘膜刺激作用によるものであらうと述べている。

これらを通覧して THF が粘膜, とくに気道粘膜に対して刺激性を有していることが強く疑われる。このため

われわれは THF の気道粘膜障害性を立証するために, 前報⁷⁾において約 200 ppm と約 1,000 ppm の THF を 12 週間にわたってラットに暴露し, その気道粘膜の形態変化を電子顕微鏡を用いて観察した。このなかでわれわれは THF が気道粘膜に障害性を有していると述べたが, 今回は許容濃度以下の濃度 (約 100 ppm) とより高濃度 (約 5,000 ppm) の THF を前回と同様ラットに暴露し, 形態学的観察のみならず線毛運動機能についても検討した。また暴露期間の長短による障害発現の程度の差異をみるために, 各群の 1 日, 1 週および 3 週暴露について観察した。

今回の観察では 5,000 ppm THF に 3 週間にわたって暴露した鼻粘膜では Fig. 15, 16 に示したように広範囲におよぶ上皮細胞の脱落が形態学的に認められ, 機能的にも線毛運動機能の廃絶を認めた。気道粘膜は比較的再生能の旺盛なことが知られているが, 障害がこのように著明な場合には THF 暴露による刺激が中止された後もかなり長期にわたって障害の残ることが推察される。また 5,000 ppm の THF に 1 週間暴露された鼻粘膜でも Fig. 7, 8 に示すように線毛細胞の細胞膜の破綻などの非可逆性の形態学的変化を認めた。

一方, 100 ppm の THF に 1 週間および 3 週間暴露した鼻粘膜および気管粘膜, 5,000 ppm の THF に 1 週間および 3 週間暴露した気管粘膜での変化は比較的軽度であり, 暴露中止後には比較的速やかに粘膜上皮の修復は行なわれるものと推察される。

ところで現行の THF の許容濃度は 200 ppm であり, 今回の観察では約 100 ppm の暴露によっても気道粘膜には種々の障害が観察された。しかし前述のように約 100 ppm の暴露で観られた変化は比較的容易に修復されると推察される程度の変化であった。

このような点も考慮に入れると, 前報⁵⁾においてわれわれは許容濃度程度の暴露によっても侵入門戸である気道粘膜には障害が観察されたと述べたが, 気道粘膜での病態から許容濃度の設定を論じるためには暴露中止後の過程について検討することが重要であらうと思う。

さらに線毛運動機能の経時的変化を観ると, Fig. C, E に示したように鼻粘膜ではほぼ直線的に低下しているのに対して, 気管粘膜では Fig. B, D に示すようにその低下の程度は 3 週暴露時では軽度であった。これは鼻粘膜など上部気道が下部気道の障害を防御するために大きな役割りを果しているためであらうと推察される。この点に関してもラットに気管呼吸により直接に THF を吸入させるなどの実験を行なうことが今後必要であらうと考える。

V. ま と め

テトラヒドロフランの気道粘膜におよぼす障害を立証するためにラットを約 100 ppm および約 5,000 ppm のテトラヒドロフランに暴露し、その気道粘膜の形態的变化と線毛運動機能の変化を経時的に観察し、次に示す成績を得た。

1) THF は線毛運動機能に対する障害を有しており、5,000 ppm に3週間暴露した際には線毛運動機能の廃絶を観察した。

2) THF は気道粘膜に障害性に作用し、分泌亢進、分泌顆粒の性状の変化、細胞の空胞化、線毛の脱落、複合線毛の形成などを観察した。また障害の著しい場合には上皮細胞の脱落崩壊を認めた。

本論文の要旨は、1981年第33回日本気管食道科学会総会（札幌）および第197回日本耳鼻咽喉科学会大阪地方連合会において報告した。

文 献

- 1) 堀口俊一, 寺本敬子, 大橋淑宏, 中井義明: ラット気道粘膜に及ぼすスチレン暴露の影響に関する実験的研究, 生活衛生, 25: 34-35, 1981.
- 2) 大橋淑宏, 中井義明, 堀口俊一, 寺本敬子: 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 (工業スチレン中毒に関する研究Ⅻ), 産業医学, 23: 513-529, 1981.
- 3) 大橋淑宏, 中井義明, 原田博文, 堀口俊一, 寺本敬子: 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—, 産業医学, 24: 360-372, 1982.
- 4) 堀口俊一, 寺本敬子, 片平卓男, 大橋淑宏, 中井義明: ラット気道粘膜に及ぼすテトラヒドロフラン暴露の影響に関する実験的研究, 生活衛生, 25: 176-177, 1981.
- 5) 大橋淑宏, 中井義明, 原田博文, 堀口俊一, 寺本敬子, 片平卓男: テトラヒドロフランの気道粘膜障害性に関する電子顕微鏡的研究, 産業医学, 24: 141-162, 1982.
- 6) 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, 日気食会報, 32: 422-432, 1981.
- 7) 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.
- 8) 中井義明, 山本 馨, 張 寛正, 森本明子, 長谷川寛治, 天津 享: クロム化合物による気道粘膜障害, 耳鼻臨床, 69: 1197-1205, 1976.
- 9) 中井義明: 気管粘膜線毛細胞—発生及び電子顕微鏡的組織化学的研究—, 日気食会報, 21, 89-00, 1970.
- 10) Stoughton, R. W. and Robbins, B. H.: Anaesthetic properties of tetrahydrofuran, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 58: 171, 1936.
- 11) 堀内一弥, 堀口俊一: 混合有害物質の許容度について, 住友産業衛生, 3: 32-48, 1967.
- 12) 堀内一弥, 堀口俊一, 長尾美昭, 和田 望, 平山昭夫: 合成化学工業の職業病に関する研究(第4報), 新しい有機溶媒 Tetrahydrofuran による中毒症例, 労働科学, 32: 273, 1956.
- 13) 堀口俊一, 宇都宮忠生, 品川興造, 中川達之, 高田文比古, 寺本敬子, 黒田義博, 岡田博行, 井上裕美: 有機溶剤 Tetrahydrofuran の工業毒性について (第2報), 住友産業衛生, 4: 93-100, 1968.
- 14) 堀口俊一: テトラヒドロフランによると考えられた健康障害の知見補遺, 住友産業衛生, 17, 1981.
- 15) Emmett, E. A.: Parosmia and hyposmia induced by solvent exposure, *Br. J. Ind. Med.*, 33: 196-198, 1976.
- 16) Lehmann, K. B. and Flury F.: Toxicology of Industrial Solvents, Williams & Wilkins, Baltimore, 1943.
- 17) 片平卓男, 寺本敬子, 堀口俊一: テトラヒドロフランの吸入暴露実験 (その1) 血液および骨に対する影響, 第54回日本産業衛生学会講演集, 1981.

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)