

# Naphthalene投与によるマウス肺細気管支上皮細胞の障害 とその修復について

誌名	日本獣医畜産大学研究報告 = The bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College
ISSN	03738361
著者	原田, 隆彦 岩熊, 真理 桐澤, 朋子
巻/号	37号
掲載ページ	p. 84-87
発行年月	1988年12月

## Naphthalene 投与によるマウス肺細気管支上皮細胞の 障害とその修復について

原田隆彦・岩熊真理・桐澤朋子\*・長根万律子\*・畑中 純\*

日本獣医畜産大学・生物学教室

\* 日本特殊農薬製造株式会社農薬研究所・安全性評価研究部

**要約** Naphthalene (NP) をマウスに単回腹腔内投与し、2 時間から 14 日後まで経時的に肺細気管支における障害像とその修復について検索を行なった。投与後 2 時間ですでにクララ細胞の腫大、4 時間後ではその細胞質に空胞形成、それに続き、クララ細胞の変性、壊死および脱落像が観察された。線毛細胞は丈が低くなる傾向を示した。さらに、脱落細胞やマクロファージ等が管腔内に散在し、顕著な障害像は 12 時間をピークに 48 時間まで観られた。一方、12 時間から 24 時間までに細気管支内壁に線毛を持つ扁平な細胞が出現し、やがてこの細胞のみで管腔壁を構成し、24 時間後には管腔面に線毛は持たないが、微絨毛を持つクララ細胞類似の細胞が出現した。48 時間後にはクララ細胞の分裂、増生像等がみられ、投与後 7 日以降ではほとんど回復を呈した。クララ細胞の修復は扁平化した線毛細胞が主体を成した。Naphthalene 投与による細気管支上皮細胞の障害はクララ細胞のみでなく、少し遅れて軽度ではあるが線毛細胞にも認められた。また、一方、肺胞上皮細胞では障害像は認められなかった。

キーワード: Naphthalene, クララ細胞, 修復.

日獣畜大研報, 37, 84~87, 1988.

先に著者らは BHT (Butylated hydroxytoluene) によるマウス肺障害像の病理発生と BALF (Bronchoalveolar lavage fluid) の生化学的測定値との関連性について報告を行った<sup>4)</sup>。今回用いた Naphthalene (NP) は、モスボール (殺虫剤) の主成分であり、染料や消毒薬としてもその中間産物が用いられている。

NP 肺障害について Reid ら<sup>5)</sup> が報告して以来種々の報告が成されている。その特徴は BHT と対照的に肺細気管支上皮細胞のクララ細胞に対し選択的に障害を示すことが知られている<sup>6,10)</sup>。特に、マウスのクララ細胞は NP や 4-ipomeanol に対して高い感受性を持つことが報告されている<sup>1)</sup>。一方、この障害後の修復反応はもう一方の上皮細胞である線毛細胞が担うとの報告がある<sup>5)</sup>。

本実験では、NP をマウスに単回投与し肺障害と病理発生および障害後の修復反応について検討したので、ここに報告する。

### 材料および方法

#### 1. 使用動物, 使用薬物および投与方法

使用動物は ICR マウス (日本チャールスリバー社)

雄 5~6 週令で体重が 26~36 g のものを、温度 20~26 °C、湿度 40~60%、12 時間照明の動物室で、固形飼料 (CRF-1) および水道水を自由摂取させ、1 週間馴化飼育後、実験に供した。

NP (和光純薬工業株式会社) をコーン油で溶解し、2 m mol/kg を単回腹腔内投与した。

#### 2. 形態学的検索

マウスは NP 投与後 0 (対照群), 2, 4, 6, 12, 24, 48 時間, 7, 14 日にベントバルビツールナトリウム麻酔下で放血致死させ、それぞれ光顕用に 3 匹, 電顕用に 2 匹, 合計 45 匹用いた。

光顕用標本: 屠殺後、開胸し気管からシリコンカニューレを挿入、10% リン酸緩衝ホルマリンを気管支内注入した。肺を摘出し、同固定液で浸漬固定後、常法に従って標本作製し観察した。

電顕用標本: 屠殺後、気管支内注入固定の方法は同じだが、固定液には 0.1 M リン酸緩衝液で緩衝した 2.5% グルタルアルデヒドを前固定に用い、同緩衝液で緩衝した 1% 四酸化オスミウムで後固定した。常法に従って標本作製し、超薄切、電子染色後、JEM 100 cx-II で観察撮影した。

## 結果および考察

光顕観察では、終末細気管支には二種類の細胞、線毛細胞と無線毛細胞（クララ細胞）があり、これらは正常肺においてたやすく識別できる。

電顕観察では、無線毛細胞は円柱で、細胞質全体に多数の滑面小胞体をもち、細胞中央に核を有し、細胞を上下に二分して見られる。下部は粗面小胞体とクリステの少ないミトコンドリアが占有し、上部には同様の多くのミトコンドリアと電子密度の高い分泌顆粒が存在する。

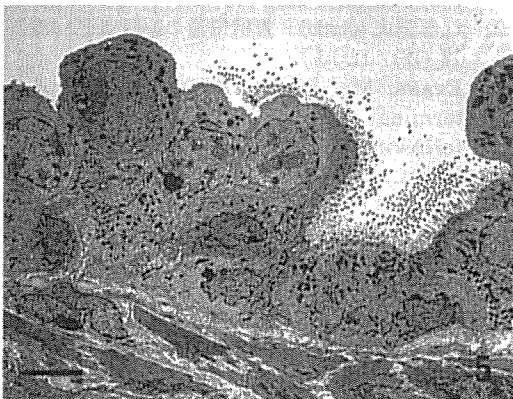
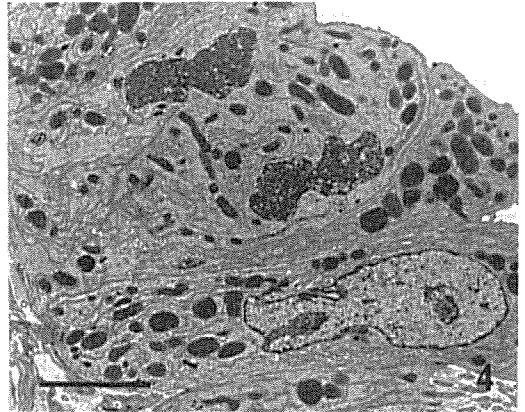
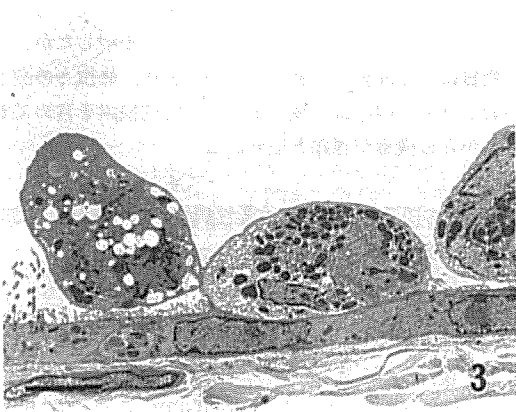
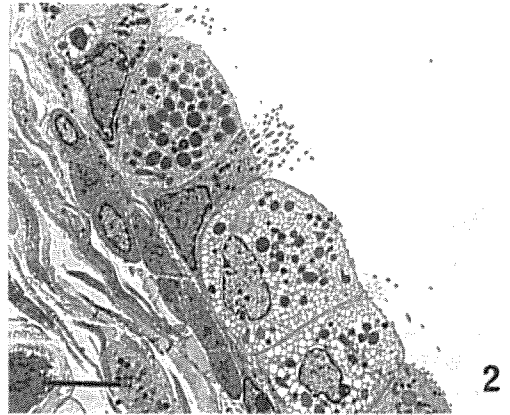
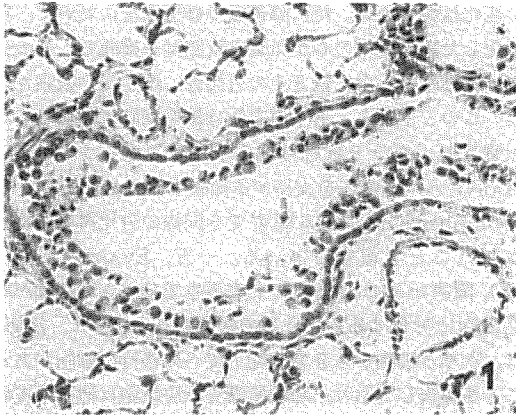


Fig. 1. Light micrograph. 12 hours after NP: Exfoliation of bronchiolar epithelium. ( $\times 80$ )

Fig. 2. Electron micrograph. 12 hours after NP: Ciliated cells get under damaged clara cells.

Fig. 3. 24 hours after NP: Exfoliating clara cells and flat ciliated cells.

Fig. 4. 48 hours after NP: Mitotic figure of clara cells.

Fig. 5. 48 hours after NP: Proliferation of clara cells.

\*bars = 5  $\mu$ m

細胞表面は比較的平滑である。線毛細胞はクララ細胞に比べ丈が低く、細胞小器官に乏しい、管腔面に微絨毛および線毛の派生が見られる細胞である。

NP 投与したマウスの光顕像では、投与後 2~4 時間でクララ細胞の腫大が見られ、6 時間前には変性、壊死像を呈した。また、気管支管腔内には脱落細胞が観察された。このような変化は投与後 24 時間まで観察され、特に、投与後 12 時間において脱落細胞の増加が顕著であった。また、上皮細胞が脱落した跡の管腔壁には線毛を持つ立方から扁平な細胞がみられ (Fig. 1) 増加傾向を示した。48 時間後には著明な増生を呈し、投与後 7 日以降ではほとんど回復していた。

電顕像では、投与後 2 時間でクララ細胞の細胞質に滑面小胞体の顕著な増加や空胞がみられた。光顕像で見られた腫大が滑面小胞体の増加によるものと確認された。4 時間後では、クララ細胞の空胞は増加、増大の傾向を示し、細胞質はより腫大し滑面小胞体で占められていた。これはクララ細胞における薬物代謝活性の上昇を示唆し、Boyd<sup>1)</sup> の報告に一致する。投与後 6 時間ではクララ細胞の空胞は増加、増大し、線毛細胞はより丈が低くなる傾向を呈した。12 時間後では、空胞化したクララ細胞は泡沫細胞様となり、その基底部に線毛細胞が侵入する像 (Fig. 2) がみられた。これは、障害を強く受けたクララ細胞の脱落を扁平化した線毛細胞が促進させ管腔壁 (基底膜) の保護を積極的に行う、いわゆる線毛細胞の hyperactive の状態と考察した。更にこの像は、線毛細胞が分裂増生すること無く扁平化することにより管腔壁を被うことを示しており、MAHVI ら<sup>5)</sup> の報告を支持する所見である。24 時間後には、極端に扁平化した線毛細胞が管腔壁を構成する部位が散見され (Fig. 3)、一方管腔面に微絨毛を持つクララ細胞類似の細胞の出現が見られた。この細胞は RHODIN ら<sup>9)</sup> のいう刷子細胞とは形態的に違いがみられ、線毛細胞からクララ細胞への移行像と考察した。一部に、空胞化した線毛細胞が見られた。NP はクララ細胞を選択的に障害することが知られているが、近年、線毛細胞も障害をうけるとの報告<sup>5,7,10)</sup> が成され、本実験でも、クララ細胞の障害像が出現した後、遅れて線毛細胞にも障害像が観察されたことは、線毛細胞の薬物に対する反応機序を考察する上で重要と思われる。投与後 48 時間では管腔内は clear となり、管腔壁にはクララ細胞が散見され、また、その分裂像 (Fig. 4) および増生像 (Fig. 5) もみられ、投与後 7 日以降は光顕観察同様ほぼ回復した像を呈した。

先に著者ら<sup>4)</sup> が報告した BHT による肺障害では、主として、肺胞上皮細胞に障害像が見られ、OOS-TEP

(o, o, s-triethylphosphorothiolate) では肺胞上皮、細気管支上皮共に障害を示すことを見ている。今回の NP 投与マウスの障害像は終末細気管支上皮細胞にのみ限局され、肺胞上皮に障害は認められなかった。

クララ細胞の形態変化が腫大、空胞化そして脱落にいたり、さらに修復されるまでの過程において、線毛細胞の変化は興味深い。特に障害像の修復過程において、扁平化した線毛細胞のみが気管支管腔壁を構成し、その後クララ細胞の出現に続きその分裂像、増生像が観察された。このことから、再生の主体は線毛細胞であることが示唆され、クララ細胞は線毛細胞より分化するという MAHVI ら<sup>5)</sup> の報告を支持する結果を得た。上田ら<sup>11)</sup> は bromobenzene による障害でも同様の分化再生が観察されたことを報告している。一方、EVANS ら<sup>3)</sup> の、NO<sub>2</sub> 障害からの細気管支上皮再生ではクララ細胞が線毛細胞に分化するという逆の報告もある。また、江部<sup>2)</sup> は、クララ細胞から II 型肺胞上皮への移行型細胞があることを報告しており、肺細気管支上皮細胞は他の上皮細胞への高い分化能を有することを示唆している。

本実験においても NP による細気管支上皮細胞の障害後の修復は線毛細胞が主体を成すことを示したが、化学物質による障害と、肺上皮細胞の分化、修復との関連性およびその機序は今後、更に生化学的検索を含めて多方面からの検索が課題と思われる。

本論文の要旨は第 4 回日本毒性病理学会 (浜松, 1988) において発表した。

## 文 献

- 1) BOYD, M.R. (1977). Evidence for the Clara cell as a site of cytochrome P 450-dependent mixed-function oxidase activity in lung. *Nature*, **269**, 713-715.
- 2) 江部達夫 (1980). 末梢気道の超微構造. *細胞*, **12** (13), 12-16.
- 3) EVANS, M.J. *et al.* (1976). Renewal of the terminal bronchiolar epithelium in the rat following exposure to NO<sub>2</sub> or O<sub>3</sub>. *Lab. Invest.*, **35**, 246-257.
- 4) 原田隆彦ら (1987). BHT によるマウス肺障害の形態発生と毒性学的指標. *日獣畜大研報*, **36**, 107-113.
- 5) MAHVI, D., BANK, H. and LONGO, N.S. (1977). Morphology of a naphthalene-induced bronchiolar lesion. *Am. J. Pathol.*, **86**, 559-572.
- 6) RASMUSSEN, R.E., WITTE, M.E. and

- ANDERSON, J. (1981). Effect of BHT and naphthalene on  $^3\text{H}$ -benzo (a)-pyrene metabolism in mouse lung. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., **22**, 101.
- 7) RASMUSSEN, R.E. *et al.* (1986). Comparative cyto-toxicity of naphthalene and its mono-methyl- and mononitro-derivatives in the mouse lung. J. Appl. Toxicol., **6**, 13-20.
- 8) REID, W.D. *et al.* (1973). Metabolism and binding of aromatic hydrocarbons in the lung: Relationship to experimental bronchiolar necrosis. Am. Rev., Resp. Dis., **107**, 539-551.
- 9) RHODIN, J. and DALHAMN, T. (1956). Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. Z. Zellforsch., **44**, 345-412.
- 10) TONG, S.S. *et al.* (1981). Clara cell damage and inhibition of pulmonary mixed function oxidase by naphthalene. Biochem. Biophys. Res. Commun., **100**, 944-950.
- 11) 上田忠司・平井圭一 (1988). マウス肺 Clara 細胞の bromobenzene 障害と再生機序および SKF 525-A による障害抑制. 第 4 回日本毒性病理学会講演要旨集. p. 45.

### Naphthalene-induced Bronchiolar Damage and its Renewal in Mice

Takahiko HARADA, Mari IWAKUMA, Tomoko KIRISAWA\*,  
Mariko NAGANE\* and Jun HATANAKA\*

Biological Laboratory, Nippon Veterinary & Zootechnical College

\* Department of Toxicology Agricultural Chemicals Institute  
Nihon Tokushu Noyaku Seizo K.K.

#### ABSTRACT

Mice were exposed to naphthalene by a single intraperitoneal injection. Naphthalene-induced bronchiolar damage in mice were observed from 2 hours to 14 days after the treatment. Naphthalene caused a swelling in cytoplasm of clara cells to 2 hours after the treatment, and continuously, it caused vacuolation of cytoplasm, degeneration, necrosis and exfoliation on clara cells. An appearance of exfoliated cells and macrophages were seen in the bronchiolar lumen. These damage were observed to 48 hours after the treatment and a maximal damage were caused at time 12 hours after the treatment. The other hand, the flat ciliated cells of bronchiolar epithelium-origin were observed in this stage. At time 24 hours after the treatment, bronchiolar epithelium were consisted of the cells which were flat and ciliated. Mitosis and proliferation of clara cells were seen 48 hours after the treatment. Bronchiolar epithelium was almost completely recovered 7 days after the treatment.

These results seem to show that naphthalene caused a damage on either of clara cells and ciliated cells, and the damaged clara cells were renewed by the cells which were flat and ciliated. Alveolar epithelium were not damaged by naphthalene.

Key wards: Naphthalene, Clara cell, Renewal.

Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll., No. 37, 84~87, 1988.