HClによるモルモット気道上皮障害の 平滑筋収縮に与える影響について

佐賀医科大学 小児科

浜崎雄平 松本重孝 市丸智浩
宮崎澄雄

Key words : epithelium derived relaxing factor (EpDRF).HCl, 気道上皮, PGI₂, 6keto-PGF₁α

要 旨

気道上皮の物理的脱落により, 各種収縮物質に対する, 気道平滑筋の反応性が亢進することが知られている。そのメカニズムとして, 上皮由来の relaxing factor (EpDRF) の関与が報告されている。我々はモルモットを使用し, 1N HCl 100μl, 300μl, 500μl を10ml の organ bath に加えることにより化学的上皮障害を作成し, 気道平滑筋の反応性がいかなる変化を示すかを検討した。1N HCl 100μl 処理では, 有意の差を認めなかったが, 300μl 処理ではアセチルコリン10⁻⁴M に対する収縮は7.1×10⁻²g から8.9×10⁻²g (N=9, p<0.05)へ, 500μl では, 9.2×10⁻²g から13.0×10⁻²g (N=6, p<0.05) へと有意に収縮が増加を示した。1N HCl 300μl 処理前後のアセチルコリンおよびヒスタミンに対する濃度収縮曲線を検討したところ, 有意の曲線の左方への移動と, 最大収縮の増加を認めた。モルモットにおいては, EpDRF のひとつとしてアラキドンサン代謝物の関与も示唆されているので, 拡張性プロスタグランディンのうち PGI₂ の代謝産物 6keto-PGF₁α を測定した。organ bath 中の 6keto-PGF₁α の値は1N HCl 処理により, 有意の差を認めなかった。以上より, HCl による上皮障害においても, 物理的障害とおなじく, 反応性は亢進すること, しかし, EpDRF の候補として, PGI₂ は関与していないとの結論を得た。

はじめに

喘息患者の気管および気管支の病理像として, 細胞内浮腫, 基底膜および平滑筋の肥厚, 粘液腺の増殖, 炎症細胞の浸潤とならんで, 上皮の脱落が重要な所見として観察されている¹⁾。慢性の喘息患者では, 発作のない時期においても上皮の剥脱が生じており²⁾, ヒトをふくめた哺乳類の in vitro の実験モデルにおいて, 上皮の物理的剥離により, ヒスタミン, アセチルコリン, PGF₂α 等, 平滑筋収縮物質にたいする気道平滑筋の感受性が亢進することが報告されている³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。以上の事実は, 気道上皮の障害が, 気道過敏性の発現に密接な関連のあることを示している。しかしながら, 気道上皮の障害による気道過敏性の発現の機序は明確ではな

い。仮説として, 血管の内皮細胞における endothelium derived relaxing factor (EnDRF) に相当する epithelium derived relaxing factor (EpDRF) を気道上皮が産生し, その産生低下が気道過敏性発現の機序として重要であるという報告が, 1985年頃より数多く出されてきた³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。EnDRF の本態のひとつは nitric oxide (NO) であることが明らかにされたが⁸⁾, EpDRF は NO とは無関係であるといわれ, いまだ本態は明確ではない。報告の多様性からすると, おそらく数種類の物質があると予想され, 動物の種による差も重要と考えられている。現在まで, EpDRF にかんしてのほとんどすべての実験が in vitro でなされ, また上皮障害は通常物理的な手段で作成されている⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁵⁾。我々は, モルモットにおいて, HCl による化学的上皮障害モデルを作成し, 気道平滑筋の収縮性がいかなる影響をうけるか検討した。モルモットにおいては, EpDRF に, cyclooxygenase 代謝産物が関与している可能性も報告されているので¹¹⁾¹²⁾¹⁶⁾, 拡張性 prostaglandin PGI₂ の

Abbreviations : EnDRF : endothelium derived relaxing factor EpDRF : epithelium derived relaxing factor NO : nitric oxide PG : prostaglandin RIA : radioimmunoassay

関与についても検討をくわえた。

方法：ハートレイ系雄モルモット (200~250g) に卵白アルブミン50mg/ml+ 4 ml 水酸化アルミニウムをくわえた懸濁液0.2mlを1, 3, 4日めに腹腔内注射し能動感作した。この感作動物より、気管を摘出し、3 mm 幅のリング状に切除し、収縮が上下方向になるようにリングを開き、気道平滑筋標本とした。標本は37℃のkrebs液をみたしたorgan bath中につりさげ、上端をisometric force transducerに結合し収縮を測定した。initial tensionは0.2gで、base lineが安定した45-60分後に実験を開始した。

予備的な実験より、submaximal contractionをひきおこすアセチルコリンの濃度、 10^{-4} Mを使用し、種々の量の1N HClの作用を検討した。まず、最初に最終濃度 10^{-4} Mのアセチルコリンによる収縮をHCl処理前収縮とし測定し、1N HCl 100 μ l, 300 μ l, 500 μ lのいずれかを10mlのorgan bathに加えて、5分間作用させたのち、標本を新鮮なkrebs液で洗浄し、再び 10^{-4} M

のアセチルコリンによる収縮を測定し、HCl処理後の収縮とし、前値と比較検討した。organ bath中のkrebs液は、拡張性プロスタグランディン(PG)のひとつ PGI_2 の安定代謝産物である6keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ の測定のため、-20℃で保存した。使用したorgan bathはポリプロピレン製で血清中プロスタグランディン、トロンボキサン測定のための採血に使用されるシリンジと同じ材質のものである。6keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ のradioimmunoassay：測定はすでに発表した方法にしたがいおこなった¹⁷⁾。抗血清、 ^3H -6keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (10,000cpm), assay bufferをそれぞれ0.1mlずつ小試験管にとり (total 0.4ml), 室温でincubationした。2時間後に γ -グロブリンでコートしたチャコール0.5mlを加え、2,500rpmで5分間遠沈し、freeの6keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ と抗体結合物を分離した。上清0.65mlにシンチレーションカクテルを加えてカウントした。抗血清は最終濃度60,000倍希釈で30%の初期結合を示し、最終検出感度は5 pg/0.1mlであった。次に、HCl処理を1N HCl 300 μ l 5分間と固定し、その処理前後のアセチルコリン、およびヒスタミンにたいする気道平滑筋の濃度-収縮曲線を作成した。

結 果

図1に示すごとく、1N HCl 100 μ l 5分間処理前の収縮 $7.1 \pm 2.7 \times 10^{-2}$ gに比べて、処理後の収縮は $8.2 \pm 1.7 \times 10^{-2}$ g (N=9, mean $\pm$ SEM)であり、有意ではないが増強する傾向を示した。1N HCl 300 μ l処理では、処理前 $7.1 \pm 1.1 \times 10^{-2}$ g, 処理後 $8.9 \pm 1.2 \times 10^{-2}$ g (N=9, $p < 0.05$)と有意に収縮力の増加を認めた。1N HCl 500 μ l処理では、やはり処理前 $9.2 \pm 1.4 \times 10^{-2}$ g, 処理後 $13.0 \pm 1.3 \times 10^{-2}$ g (N=6, $p < 0.05$)とHCl処理後に有意の収縮増加を認めた。この結果をさらに明確にするために、1N HCl 300 μ l 5分間処理前後のヒスタミンおよびアセチルコリンに対する濃度-収縮曲線を作成し、検討した。図2にアセチルコリン 10^{-6} Mから 10^{-3} Mまでの濃度-収縮曲線を示した。処理前の最大収縮 $11.2 \pm 3.5 \times 10^{-2}$ gに比し処理後の最大収縮は $18.1 \pm 3.1 \times 10^{-2}$ gと増大し、また濃度-収縮曲線の左方偏位を認めた (5×10^{-5} M以上で有意, $p < 0.05$)。次にヒスタミン 10^{-7} Mから 10^{-4} Mまでの濃度-収縮曲線を図3に示した。ヒスタミンによる収縮はアセチルコリンより低い 10^{-7} Mよりはじまり、 10^{-4} Mで最大収縮に達した。1N HCl処理前の最大収縮は $14.8 \pm 5.0 \times 10^{-2}$ gであり、処理後の最大収縮は $20.8 \pm 4.2 \times 10^{-2}$ gとアセチルコリン同様最大収縮の増加と濃度-収縮曲線の左方偏位をみとめた (5×10^{-5} M以上で有意, $p <$

図1 1N HCl処理前後のモルモット気道平滑筋のアセチルコリン (10^{-4} M) に対する収縮を示す。1N HCl (100 μ l, 300 μ l or 500 μ l)を10mlのkrebs液がはいったorgan bath中に5分間作用させ化学的に上皮障害を作成した。* $p < 0.05$

図2 1N HCl 300 μ l 処理前後のモルモット気道平滑筋のアセチルコリン (10^{-6} – 10^{-3} M) に対する濃度-収縮曲線を示す。

実線：処理前 破線：処理後。左方への偏位と最大収縮の増加を示す。 5×10^{-5} M 以上で有意, $p < 0.05$ (N = 5, mean $\pm$ SEM)

図3 1N HCl 300 μ l 処理前後のモルモット気道平滑筋のヒスタミン (10^{-7} – 10^{-4} M) に対する濃度-収縮曲線を示す。

実線：処理前 破線：処理後。左方への偏位と最大収縮の増加を示す。 5×10^{-5} M 以上で有意, $p < 0.05$ (N = 5, mean $\pm$ SEM)

0.05)。

最初の実験において採取した krebs 液中に放出された拡張性 PG のひとつ PGI₂ の安定代謝産物 6keto-PGF₁ α の濃度を測定した結果を図4に示した。平滑筋標本のサスペンションのみでアセチルコリンによる刺激をおこなわずに採取したサンプルをコントロールとした。1N HCl 100 μ l 処理群では、コントロール、

図4 1N HCl (100 μ l, 300 μ l, 500 μ l) 処理前後の organ bath 中に放出された6keto-PGF₁ α の濃度を示す。 (N = 4, mean $\pm$ SEM)

図5 1N HCl 300 μ l 処理後のモルモット気道標本：上皮の破壊像を認める。HE 染色, 20x

処理前, 後の 6keto-PGF₁ α は 5.0 ± 0.82 , 11.0 ± 4.9 , 6.7 ± 1.4 pg/0.1ml であり, 1 N300 μ l 処理群では, コントロール, 前, 後はそれぞれ 9.0 ± 3.26 , 14.3 ± 3.29 , 15.8 ± 2.49 pg/0.1ml, 1N HCl 500 μ l 処理群では, コントロール, 前, 後はそれぞれ 5.7 ± 0.5 , 9.0 ± 1.5 , 8.0 ± 0.8 pg/0.1ml であった。これらはいずれも有意ではなかった。図5に1N HCl 300 μ l 処理後の組織像を示した。上皮組織の破壊が生じている。

考 察

物理的上皮剥離による平滑筋収縮物質に対して気管および気管支平滑筋の収縮性が高まることが知られている。今回の成績で、化学的な上皮の障害でも、アセチルコリン、およびヒスタミンに対して同様の効果があることが認められた。収縮気道上皮は、物理的な障壁として、アレルゲン、化学伝達物質の組織内への進入を防ぎ、粘膜下に分布している知覚神経末端の気道

面への露出を防ぐことにより気道平滑筋の異常な収縮を抑えていると考えられている¹⁸⁾。また、気道上皮細胞を通して、物質の組織内外の移送をおこなうことも上皮の大事な役割である¹⁹⁾。これら、physiological な役割のほかに、metabolic な役割として、上皮細胞そのものが、走化因子や endopeptidase 等の活性物質の産生、放出をおこなうことが知られている²⁰⁾²¹⁾²²⁾。それらの活性因子のひとつとして、いわゆる epithelium derived relaxing factor (EpDRF) を合成し、放出しているという報告が、近年数多くなされてきている³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾¹⁰⁾。1985 年 Barnes らはウシの気道平滑筋切片を用いた実験で、物理的な上皮の破壊により、ヒスタミン、セロトニン、アセチルコリンに対する平滑筋の最大収縮が増加し、濃度-収縮曲線が左方へ偏位することを報告したが、その理由として、上皮から、EpDRF が放出されていると考えた³⁾。Vanhoutte らはイヌの気道平滑筋をもちいた実験系で、上皮の物理的破壊により、やはりヒスタミン、セロトニン、アセチルコリンに対する濃度-収縮曲線が左方偏位することを示した。彼らは、平滑筋作動物質のみならず、電流による神経刺激でも、上皮剥離標本では収縮が増強することを示した⁴⁾²³⁾。上皮の物理的障壁としての役割が消失したために、収縮性物質の平滑筋への到達が容易になったのではないかとの疑問にたいして、拡張性物質イソプロテレノールの弛緩作用を検討し、上皮の剥離により、弛緩が正常コントロールに比し減弱していることを示し、やはり EpDRF が放出されていると結論している。ヒトの気管支道上皮を使用した Aizawa らの実験でも、収縮性物質についてはヒスタミン、アセチルコリンおよび $\text{PGF}_1\alpha$ に対して、拡張性物質についてはイソプロテレノールに対して同様の結果を認めている²⁴⁾。ウサギでは、Butler らは上皮剥離により、bethanechol 刺激に対する反応が上昇することを示した。彼らは、上皮が正常の場合にインドメサシン処理することで濃度-収縮曲線の左方偏位を証明し、更に上皮が正常である場合にのみアラキドン酸の投与で、平滑筋の弛緩が生ずることを観察し、ウサギでは EpDRF の本態のひとつが拡張性 PG である可能性を示唆した⁷⁾。しかし、Barnes らはウシにおいては、アラキドン酸シクロオキシゲナーゼ産物は無関係であると述べており³⁾、イヌではシクロオキシゲナーゼ産物がなんらかの関係があるという説とないという報告とがあり一定していない⁴⁾²⁵⁾。しかしながら、EpDRF の存在は、多くの哺乳類の気道上皮で確認されており、我々の結果もそれを支持するものである。その本態は

いまだ明確なものではないが、単独の物質ではない可能性がある。また動物の種により、異なっている可能性が示唆されている²³⁾。過去の報告でモルモットにおける成績を検討すると、Holroyde らは、上皮の物理的破壊でセロトニン、アセチルコリンによる収縮が増強することを示し、イソプロテレノールによる弛緩は他の種と同様に減弱すると述べている¹⁰⁾。刺激物質として感作モルモットに抗原(卵白)刺激を使用した場合もまったく同様の結果が報告されている²⁶⁾。

我々の 1N HCl による処理でも結果に示したごとく、上皮の破壊が生じ、平滑筋の最大収縮は増加し、濃度-収縮曲線は左方偏位を示した。これは物理的に上皮の破壊をおこした場合と同様である。すなわち、障害の方法は異なっても上皮の機能が失われると、同じ反応を示すことを意味している。モルモットにおいてはウサギとおなじく、インドメサシン処理で、上皮の正常な気道平滑筋が上皮の傷害時と同じような反応を示すことが報告されており、EpDRF の作用発現にシクロオキシゲナーゼ代謝産物がなんらかの役割をはたしている可能性が示唆されている⁵⁾¹⁰⁾¹¹⁾²⁷⁾。

PGE_2 もしくは PGI_2 が関与している可能性も指摘されているが¹²⁾、今回の我々の成績ではすくなくとも PGI_2 の関与は否定的であった。血管内皮細胞が拡張性物質として PGI_2 および NO を、収縮性物質としてエンドセリンを合成、放出することが近年明確にされたが²⁸⁾、気道上皮も数種類の拡張性物質を産生することはおおいに考えられることである。血管内皮とおなじく収縮性物質も同時に産生していることも予想され、これらの産生は、刺激の種類および動物種により異なるかもしれない。刺激物質の種類および濃度を変化させたときに、気道上皮の反応性が変化することが指摘されており¹¹⁾、その可能性を示唆するものといえる。今回の成績では、HCl による化学的障害によっても気道平滑筋の収縮性は上昇することがあきらかとなった。さらに、モルモットの気道上皮から産生される EpDRF は PGI_2 ではないことが示された。

文 献

- 1) Cutz, E., Lewvison, H. and Cooper, D. H. : Ultrastructure of airways in children with asthma. *Histopathology* 2, 407-421, 1978.
- 2) Laitinen, L. A., Heino, M., Laitinen, A., Kava, T. and Hachtela, T. : Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127, 686-690,

- 1985
- 3) Barnes, P. J., Cuss, F. M. and Palmer, J. B. : The effect of airway epithelium on smooth muscle contractility in bovine trachea. *Br. J. Pharmacol.* 86, 685-691, 1985.
- 4) Flavahan, N. A., Aarhus, L. L., Rimele, T. J. and Vanhoutte, P. M. : Respiratory epithelium inhibits bronchial smooth muscle tone. *J. Appl. Physiol.* 58, 834-838, 1985.
- 5) Murcus, C. : Effects of mucosal removal on guinea-pig airway smooth muscle responsiveness. *Clin. Sci.* 70, 571-575, 1986.
- 6) Raevan, D., Hay, D. W. P., Farmer, S. G. and Feden, J. S. : Epithelium removal increases the reactivity of human isolated tracheal muscle to methacholine and reduces the effect of verapamil. *Eur. J. Pharmacol.* 123, 451-453, 1986.
- 7) Butler, G. B., Adler, K. B., Evans, J. N., Margan, D. W. and Szarek, J. L. : Modulation of rabbit airway smooth muscle responsiveness by respiratory epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 1099-1104, 1987.
- 8) Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S. : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526, 1987.
- 9) Gao, Y. and Vanhoutte, P. M. : Lowering PO_2 induces epithelium-dependent relaxation in isolated canine bronchi. *Am. J. Physiol.* 257, c1034-c1037, 1989.
- 10) Holroyde, M. C. : The influence of epithelium on the responsiveness of guinea-pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.* 87, 501-507, 1986.
- 11) Tschirhart, E., Frossard, M., Bertrand, C. and Landig, Y. : Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243, 310-316, 1987.
- 12) Nijkamp, F. P. and Folkerts, G. : Reversal of arachidonic acid-induced guinea-pig tracheal relaxation into contraction after epithelium removal. *Eur. J. Pharmacol.* 131, 315-316, 1987.
- 13) Goldie, R. G., Papadimitriou, J. M., Peterson, J. W., Rigby, P. J., Self, H. M. and Spina, D. : Influence of the epithelium on responsiveness of guinea-pig isolated trachea to contractile and relaxant agonists. *Brit. J. Pharmacol.* 87, 5-14, 1986.
- 14) Munakata, M., Mitzner, W. and Menkes, H. : Osmotic stimuli induce epithelial-dependent relaxation in the guinea-pig trachea. *J. Appl. Physiol.* 64, 466-471, 1988.
- 15) Lev, A., Christensen, G. L., Ryan, J. P., Wang, M. and Kelsen, S. G. : Epithelial modulation of tracheal muscle tension is calcium and temperature dependent. *J. Appl. Physiol.* 67, 713-719, 1989.
- 16) Hay, D. W. P., Farmer, S. G., Raeburn, D., Muccitelli, R. M., Wilson, K. A. and Feden, J. S. : Differential effects of epithelium removal on the responsiveness of guinea-pig tracheal smooth muscle to bronchoconstrictors. *Brit. J. Pharmacol.* 92, 381-388, 1987.
- 17) Hamasaki, Y., Ichimaru, T., Tasaki, H. and Miyazaki, S. : Studies on the effect of long term use of low dose aspirin in Kawasaki Disease. *Acta Paediatr. Jpn.* 30, 63-67, 1988.
- 18) Cuss, F. M. and Barnes, P. J. : Epithelial mediators. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, s32-s35, 1987.
- 19) Frizzell, R. A. : Role of absorptive and secretory processes in hydration of the airway surface. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138, s3-s6, 1988.
- 20) Sekizawa, K., Tamaoki, J., Nadel, J. A. and Borson, D. B. : Enkephaline inhibitor potentiates substance-P and electrically induced contraction in ferret trachea. *J. Appl. Physiol.* 63, 1401-1405, 1987.
- 21) Holzman, M. J., Aizawa, H., Nadel, J. A. and Goetzl, E. T. : Selective generation of leukotriene B_4 by tracheal epithelial cells from dogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 1071-1076, 1983.
- 22) Sigel, E. and Nadel, J. A. : Arachidonic acid 15-lipoxygenase and airway epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138 : s35-s40, 1988.
- 23) Vanhoutte, P. M. : Epithelium-derived relaxing factor(s) and bronchial reactivity. *J. Allerg. Clin. Immunol.* 83, 855-861, 1989.
- 24) Aizawa, H., Miyazaki, N., Shigematsu, N. and Tomooka, M. : A possible role of airway epithelium in modulating hyperresponsiveness. *Br. J.*

- Pharmacol. 93, 139-145, 1988.
- 25) Barnett, K., Jacoby, D. B., Nadel, J. A., and Lazarus, S. C. : The effects of epithelial cell supernatant on contractions of isolated canine tracheal smooth muscle. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138, 780-783, 1988.
- 26) Hay, D. W. P., Muccitelli, R. M., Horstemeyer, D. L., Wilson, K. A. and Raeburn, D. : Demonstration of the release of an epithelium-derived inhibitory factor from a novel preparation of guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.* 136, 247-250, 1987.
- 27) Hay, D. W. P., Farmer, S. G., Raeburn, D., Robinson, V. A., Fleming, W. W. and Feden, J. S. : Airway epithelium modulates the reactivity of guinea-pig respiratory smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 129, 11-18, 1986.
- 28) Brenner, B. M., Troy, J. L. and Ballermann, B. J. : Endothelium-dependent vascular responses. *J. Clin. Invest.* 84, 1373-1378, 1989.

EFFECT OF HCL-TREATMENT ON THE CONTRACTILITY OF GUINEA-PIG TRACHEAL SMOOTH MUSCLE

Yuhei Hamasaki, M. D., Shigetaka Matsumoto, M. D., Tomohiro Ichimaru, M. D., Sumio Miyazaki, M. D.

Department of Pediatrics, Saga Medical School

It has been known that responsiveness of airway smooth muscle to various contracting substances is enhanced by destruction of epithelium. One of the proposed mechanism is impairment of production of epithelium derived relaxing factor (EpDRF) which is supposed to be produced in epithelial cells. Contraction of guinea-pig airway smooth muscle against acetylcholine (10^{-4} M) was examined before and after the treatment of 1N HCl. One normal HCl (100 μ l, 300 μ l or 500 μ l) was added to 10 ml organ bath for 5 min in order to cause chemical damage to epithelial cells. No difference was demonstrated in contraction of airway smooth muscle against acetylcholine after the treatment of 100 μ l 1N HCl. However, contraction was increased from 7.1×10^{-2} g to 8.9×10^{-2} g ($N=9$, $p<0.05$) after the treatment of 300 μ l 1N HCl and from 9.2×10^{-2} g to 13.0×10^{-2} g ($N=6$, $p<0.05$) after the treatment of 500 μ l HCl. Dose-response curve against acetylcholine (10^{-6} – 10^{-3} M) and histamine (10^{-7} – 10^{-4} M) shifted to the left and the maximal contraction increased after the treatment of 300 μ l 1N HCl. As arachidonic acid metabolite has been reported to be involved in this phenomena, 6keto-PGF_{1 α} , a stable metabolite of PGI₂ and one of the relaxing prostaglandins, in the organ bath was measured by radioimmunoassay. No significant change in the concentration of 6keto-PGF_{1 α} was demonstrated after the treatment of 1N HCl, which indicates that PGI₂ is not involved in this phenomenon as EpDRF.

(Accepted : September 26, 1990)