

喫煙によるマウス気管支平滑筋の収縮および 弛緩活性への影響

平成 26 年 4 月 24 日受付

棚 橋 靖 行*
川 原 瑞 穂*
遠 藤 英 輔*
竹 内 実*

要 旨

喫煙は慢性閉塞性肺疾患（COPD）をはじめとする多くの疾患のリスク因子としてよく知られている。COPD は、たばこ煙の吸入により持続性の換気障害が惹起される結果、咳や息切れ等の症状を引き起こす疾患である。同疾患の原因については未解明な点が多く残されているが、喫煙により生じる気道平滑筋の収縮過敏が原因の一つとして提唱されている。しかし、喫煙がどのようなメカニズムにより平滑筋の収縮過敏を引き起こすのかについては、いまだ十分に明らかにされていない。そこで、我々はマウスにタバコ煙を暴露することにより作製した喫煙モデルマウスを用い、上記の未解決問題に取り組んでいる。本研究では、マウス気管支平滑筋において、ムスカリン作動薬である carbachol による収縮反応および β アドレナリン作動薬である isoprenaline による弛緩反応への喫煙による影響について検討した。その結果、喫煙により惹起される気管支平滑筋の収縮過敏は、ムスカリン作動性収縮反応が増強されることに加え、アドレナリン作動性弛緩反応が減弱されることが原因であることが示唆された。

キーワード：喫煙，慢性閉塞性肺疾患（COPD），気道平滑筋，収縮過敏，喫煙モデルマウス

1. はじめに

世界保健機関（WHO）の報告によると、全世界における喫煙者の割合は総人口の 22% に及び、毎年、600 万人以上の人々がタバコ煙の暴露に関連した原因により死亡している [1]。わが国では、近年、健康意識の高まりやたばこ価格の上昇などにより、喫煙者の数は徐々に減少してきている。しかし、2013 年の厚生労働省の報告によると、未だ全人口の約 20% の喫煙者がいると推計されている [2]。また、子育て世代である 20 ~ 30 代の喫煙者が全体の約 30% を占め、特に若い女性の喫煙率はほぼ横ばいのままである [3]。これらの数値は、現在でも喫煙者自身だけでなく、胎児や子供への喫煙の影響

* 京都産業大学総合生命科学部

響を無視できないことを示している。

喫煙は慢性閉塞性肺疾患（COPD）をはじめとする多くの疾患のリスク因子としてよく知られている [4]。COPD は、たばこ煙の吸入により持続性の換気障害が惹起される結果、咳や息切れ等の症状を引き起こす [5]。同疾患の原因については未解明な点が多く残されているが、喫煙により生じる平滑筋の収縮過敏が原因の一つとして提唱されている [6], [7], [8]。平滑筋の収縮活性は交感神経から放出されるノルアドレナリンにより抑制的に、副交感神経から放出されるアセチルコリンにより興奮性に制御されている [9]。したがって、この収縮制御機構が喫煙により破綻する結果、平滑筋の収縮過敏が惹起されると考えられるが、その詳細は不明である。そこで、本研究では、タバコ煙を曝露させたマウス（喫煙マウス）と、タバコ煙の代わりに空気を曝露させたマウス（非喫煙マウス）から作製した気管支平滑筋標本を用いて、ムスカリン作動薬である carbachol (CCh) による収縮反応および β アドレナリン作動薬である isoprenaline (Iso) による弛緩反応への喫煙による影響について検討した。

2. 材料と方法

本研究の動物実験に関しては、京都産業大学動物実験規定に基づき、同大学動物実験委員会の承認を受け、実施した。

2.1 実験動物

実験には、C57BL/6N マウス（雄、10～15 週齢、体重 21.6 g～26.9 g、日本 SLC）を使用した。マウスは、明期と暗期がそれぞれ 12 時間ずつ、室温が 24 ± 2 °C の条件下にて飼育した。飼料は、飼育用固形飼料（DC-8、日本クレア）を用い、水および飼料は自由摂取とした。

2.2 マウスへのタバコ主流煙の曝露

タバコは研究用標準タバコである Research Cigarettes 3R4F（ニコチン:0.73 mg/本、タール:9.4 mg/本）（University of Kentucky）を使用した。喫煙は、マウスを一匹ずつチャンバーに入れ、Hamburg II 自動喫煙装置（Borgwaldt）を用いて、タバコ主流煙（空気:タバコ煙=7:3）を 35 ml/2 秒/puff にて、1 日に 20 本吸わせることにより行った（図 1）。この操作を計 10 日間、3 日以上間隔をあげないように実施し、喫煙マウス群とした。また、タバコ主流煙の代わりに空気だけを吸わせたものを非喫煙マウス群として作成した。

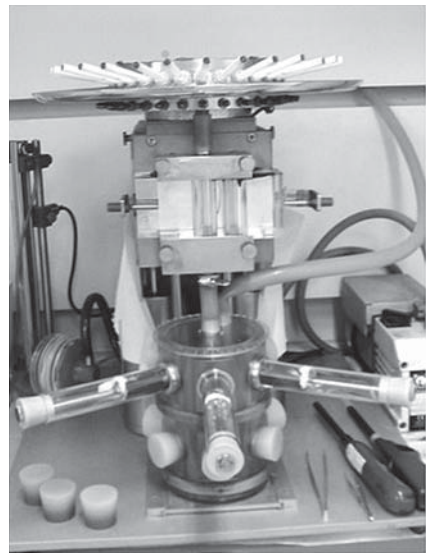


図 1 タバコ主流煙のマウスへの曝露
マウスをチャンバーに入れ、Hamburg II 自動喫煙装置を用いてタバコ主流煙を曝露させることにより喫煙マウスを作製した。

2.3 標本の作製

マウスを炭酸ガス吸入法により安楽死させた後、ただちに頸部を正中線に沿って切開し、気管および気管支を摘出した。摘出した組織をタイロード液（組成は以下に示す）の入ったシャーレの中に移し、右主気管支と左主気管支を2～3 mmほどの長さに切断した。切断した気管支片表面の結合組織を実体顕微鏡下（SZ61; Olympus）にて除去し、リング状の気管支平滑筋標本を作製した。右主気管支標本は、4% Paraformaldehyde phosphate buffer solutionにて固定し、病理組織学的検査に、一方、左主気管支標本は張力測定にそれぞれ供した。

2.4 病理組織学的検査

固定した右主気管支標本から常法に従い、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、生物顕微鏡（BX50; Olympus）を用いて観察した。組織画像はデジタルカメラ（DP70; Olympus）により撮影し、ソフトウェア（DP Controller; Olympus）を用いて、コンピューター（A-ELGTA-OL28R9/XJ; Olympus）に記録した。

2.5 張力測定

以前、我々が報告した方法により、標本の輪走筋方向に発生する張力を測定した[10]。作製した左主気管支標本はバス装置（容量約2 mL）の底面に固定し、絹糸を付けたトライアングル状ステンレスワイヤーを管腔内に挿入した。ワイヤーの絹糸を等尺性張力トランスデューサー（A&D, T7-8-240）のフックに連結することにより、標本を懸垂した。バス装置には、タイロード液を装置の一端から10 mL/minの流速で流入させ、他端から水流ポンプで吸引除去することにより灌流した。灌流用のタイロード液は、貯留槽として用いたビーカー内で通気し、温水を満たした恒温槽に設置した蛇管内を通過させることにより37℃に加温した。更に、底面に設置したホットプレート（WKN-CW-1100; ワケンビーテック）を用いてバス装置を加温することにより、バス溶液の温度を37℃に維持した。標本には約0.2 gの負荷をかけ、1時間、平衡化させた。標本に発生する張力は上述のトランスデューサーにより電気信号に変換し、増幅器（AS2503, NEC/Avio）により増幅した後、アナログ/デジタル変換器（PowerLab 2/26, ADInstruments, または、Digidata 1440A, Molecular Devices）を介してコンピューター（ThinkPad T520-1, Lenovo）に記録した。実験は、あらかじめ高濃度K⁺溶液（70 mM）を2～4回繰り返し適用し、発生する収縮反応が一定の大きさになったことを確認してから開始した。

2.6 使用した栄養液及び薬物

実験には、タイロード液（NaCl, 136.9; KCl, 2.7; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 2.1; NaH₂PO₄, 0.4; NaHCO₃, 11.9; glucose, 5.6 : (mM)）を使用した。高濃度K⁺溶液はタイロード液中のNaClをKClに置換して調製した。

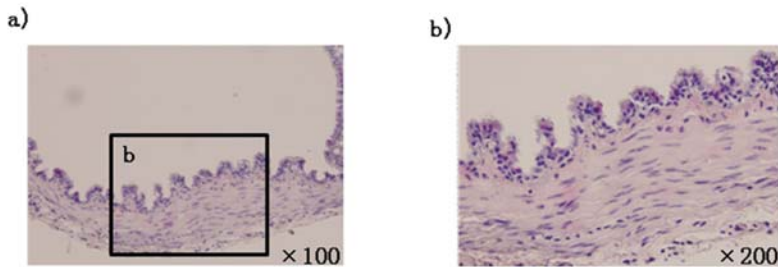
使用した carbamylcholine chloride (CCh) および isoprenaline hydrochloride (Iso) は Sigma から、atropine sulfate は Wako から、propranolol hydrochloride は Santa Cruz Biotechnology からそれぞれ購入した。これらの試薬は使用濃度の 1000 倍の高濃度溶液として調製し、 -20°C にて保存した。薬物の適用は、バス装置内のタイロード液を、薬物を含むタイロード液にて約 10 mL/min の速度で灌流することにより行った。薬物を洗浄除去する際には、同様の操作により、薬物を含まない新鮮なタイロード液に再び置換することにより行った。本文および図中の薬物濃度はバス装置内の最終濃度を示す。

3. 結果

3.1 気管支組織における喫煙による病理組織学的変化

喫煙による気管支組織への影響を明らかにするために、喫煙マウスから作製した気管支薄切標本においてヘマトキシリン・エオジン染色による病理組織学的検査を行い、非喫煙マウスの標本と比較した。非喫煙マウスの標本においては、顕著な変化は認められなかった (図 2A)。一方、喫煙マウスの標本では、上皮細胞の肥大化、混濁腫脹および過形成が認められた (図 2Ba および Bb)。一方、平滑筋組織には顕著な変化は認められなかった (図 2Ba および Bc)。これらの結果は、喫煙が気管支上皮細胞を障害することを示している。

A 非喫煙



B 喫煙

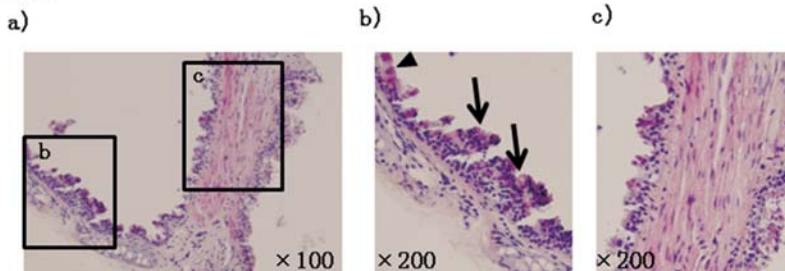


図 2. マウス気管支組織における喫煙による病理組織学的変化

非喫煙 (A) および喫煙 (B) マウスの気管支薄切標本において、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い顕微鏡下にて観察した。(Ab), (Bb および Bc) は (Aa), (Ba) 中の四角で囲った部分をそれぞれ拡大したものである。喫煙マウスの標本において、上皮細胞の肥大化、混濁腫脹および過形成が認められた (Bb, 矢印で示す)。また、上皮細胞内に粘液と思われる好酸性物質の貯留も認められた (Bb, 矢頭で示す)。しかし、喫煙マウス (Bc) と非喫煙マウス (Ab) 共に、平滑筋層において顕著な変化は認められなかった。

3.2 喫煙によるムスカリン作動性収縮反応への影響

喫煙によるムスカリン受容体を介した気管支平滑筋収縮機能への影響を明らかにするために、喫煙マウスから作製した気管支平滑筋標本において、ムスカリン受容体作動薬である CCh を適用した時に生じる収縮反応を記録し、非喫煙マウスのものと比較した。

喫煙マウスの気管支平滑筋標本において、CCh (0.1 ~ 100 μM) を単適用すると、非喫煙マウスの場合と同様、濃度依存的に一過性の収縮反応が生じた。CCh 誘発性収縮反応はムスカリン受容体の拮抗薬である atropine (2 μM) の存在下では発生しなかった。各濃度における収縮の振幅、最大反応の大きさ、および、50%有効濃度については、両群間において有意な差は認められなかった。しかし、喫煙マウスの標本では、CCh を適用してから最大反応に達するまでの時間が非喫煙マウスの場合に比べて短く、特に CCh (100 μM) では有意な差が認められた (図 3A)。これらの結果は、喫煙がムスカリン作動性収縮反応を増強することを示している。

次に、この喫煙による収縮増強効果に収縮タンパク質をはじめとするムスカリン受容体よりも下流の機能分子の異常が関与しているのかを調べるために、喫煙マウスの気管支平滑筋標本において、70 mM K^+ 溶液により細胞を脱分極させた時に生ずる収縮反応を記録し、非喫煙マウスのものと比較した。

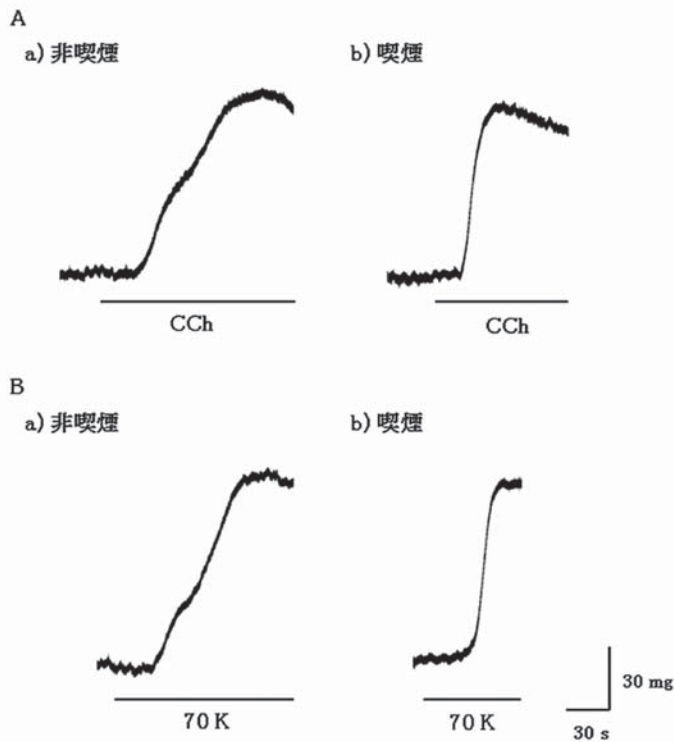


図 3. 非喫煙および喫煙マウスの気管支平滑筋標本における CCh および高 K^+ 誘発性収縮反応

非喫煙 (a) および喫煙マウス (b) から作製した気管支平滑筋標本において、CCh (100 μM) (A) および高 K^+ 溶液 (70 mM) (B) を単適用した時の張力変化を示す。薬物の適用期間を実線にて示す。

喫煙マウスの標本において、70 mM K⁺ 溶液を適用すると、非喫煙マウスの場合と同様、一過性の収縮反応が生じた (図 3B)。その振幅は両群間において有意な差は認められなかったものの、喫煙マウスでは、K⁺ 溶液の適用から最大反応に達するまでの時間が非喫煙マウスの場合と比べ有意に短かった。これらの結果は、喫煙によるムスカリン作動性収縮反応の増強には、ムスカリン受容体などの上流の情報伝達分子よりも、むしろ、収縮タンパク質などの下流の機能分子の異常が関与している可能性を示唆している。

3.3 喫煙によるアドレナリン作動性弛緩反応への影響

気管支平滑筋における β アドレナリン受容体を介した弛緩機能への喫煙による影響を明らかにするために、喫煙マウスの気管支平滑筋標本において、 β アドレナリン受容体作動薬である Iso を適用した時に発生する弛緩反応を記録し、非喫煙マウスのものと比較した。

喫煙マウスの標本において、70 mM K⁺ 溶液により収縮を発生させ、反応がプラトーに達した後に、Iso (0.1 ~ 100 μ M) を累積的に適用したところ、濃度依存的に弛緩反応が生じた。Iso 誘発性弛緩反応は β 受容体の拮抗薬である propranolol を前処置することにより抑制された。しかし、その弛緩の程度は、非喫煙マウスの場合に比べ小さく、特に Iso (10 および 30 μ M) において有意な差が認め

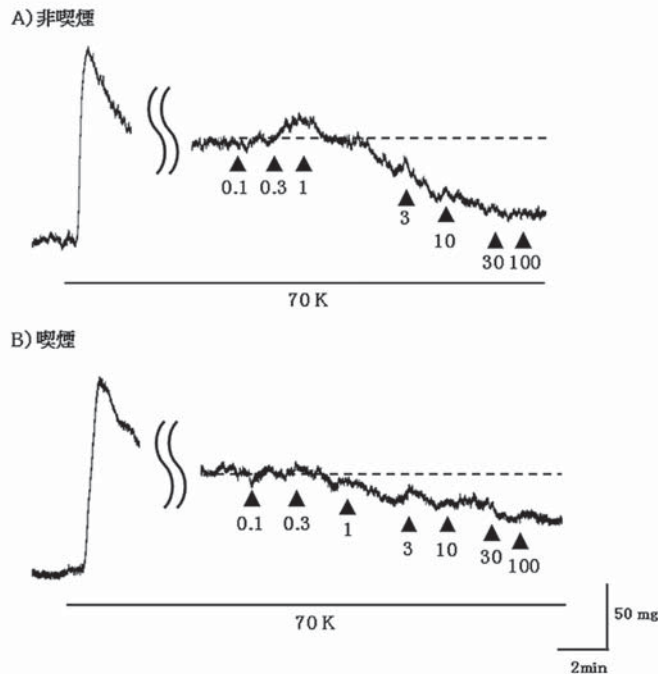


図 4. 非喫煙および喫煙マウスの気管支平滑筋標本における Iso 誘発性弛緩反応

非喫煙 (A) および喫煙マウス (B) から作製した気管支平滑筋標本において、70 mM K⁺ 溶液により収縮を誘発した後、Iso (0.1 ~ 100 μ M) を累積適用した時の張力変化を表す。70 mM K⁺ 溶液の適用期間を実線で、Iso の適用開始点を (▲) にてそれぞれ示す。点線は Iso 適用前の張力レベルを示す。

られた (図 4)。50%有効濃度および最大反応の大きさについては両群間において有意な差は認められなかった。これらの結果は、喫煙が β アドレナリン作動性弛緩反応を減弱させることを示している。

4. まとめ

以上の結果から、喫煙により惹起される気管支平滑筋の収縮過敏は、ムスカリン作動性収縮反応が増強されることに加え、アドレナリン作動性弛緩反応が減弱されることが原因であることが示唆された。また、この喫煙による平滑筋収縮機能の変化は、組織の炎症よりもむしろ、上皮細胞が障害を受け、たばこ煙中に含まれるニコチンなどの化学物質が平滑筋組織に容易に達するようになったことが原因として考えられた。今後は、より詳細な病態メカニズムの解明や関与する化学物質の特定に取り組んでいく予定である。

5. 参考文献

- [1] World Health Organization (WHO). WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: Warning about the dangers of tobacco. (2011) World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [2] 厚生労働省編 平成 24 年国民健康・栄養調査報告
- [3] 日本たばこ産業株式会社 (JT) 全国喫煙者率調査 (2013)
- [4] The 2004 Surgeon General's Report-The Health Consequences of Smoking. (2004) Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, Atlanta, U.S.A.
- [5] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. (2013) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease.
- [6] Rijcken B, Schouten JP, Xu X, Rosner B, Weiss ST. (1995) Airway hyperresponsiveness to histamine associated with accelerated decline in FEV1. *Am J Respir Crit Care Med.* 151 (5), 1377-82.
- [7] Verhoeven GT, Verbraak AF, Boere-van der Straat S, Hoogsteden HC, Bogaard JM. (2000) Influence of lung parenchymal destruction on the different indexes of the methacholine dose-response curve in COPD patients. *Chest.* 117 (4), 984-90.
- [8] Chiba Y, Murata M, Ushikubo H, Yoshikawa Y, Saitoh A, Sakai H, Kamei J, Misawa M. (2005) Effect of cigarette smoke exposure *in Vivo* on bronchial smooth muscle contractility *in Vitro* in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33 (6), 574-81
- [9] Canning BJ, Fischer A. (2001) Neural regulation of airway smooth muscle tone. *Respir Physiol.* 125 (1-2), 113-27.
- [10] 棚橋靖行, 竹内実. マウス気管支平滑筋標本における張力測定法の開発. 京都産業大学総合学術研究所所報, 第 8 号, 131-36

Effects of cigarette smoke exposure on contractile and relaxing activities in mouse bronchial smooth muscles

Yasuyuki TANAHASHI
Mizuho KAWAHARA
Eisuke ENDO
Minoru TAKEUCHI

Abstract

It is well known that cigarette smoke is an important risk factor for chronic obstructive pulmonary disease (COPD). COPD is characterized by sustained airflow limitation, leading to breathlessness and cough. It has been suggested that cigarette smoke exposure can induce airway hyperreactivity, which can be involved in the airflow limitation in COPD patients. However, little is known about underlying mechanisms of the airway hyperreactivity induced by cigarette smoke. Therefore, we are addressing the above issue using the mice that are exposed to cigarette smoke (CS mice). In the present study, we investigated carbachol-induced contractions and isoprenaline-induced relaxations in bronchial muscle ring preparations from the CS mice and compared with those from the control mice which were exposed to the air instead of cigarette smoke. The results suggested that exposure to cigarette smoke can augment muscarinic contractions and attenuate β adrenergic relaxations, which may be responsible for hyperreactivity in bronchial smooth muscles.

Keywords : cigarette smoke, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), airway smooth muscles, airway hyperreactivity, cigarette smoke-exposed mice