

マウス気管平滑筋標本における張力測定法の開発

平成 25 年 4 月 24 日受付

棚 橋 靖 行*
竹 内 実*

要 旨

喫煙は慢性閉塞性肺疾患(COPD)、および、喘息などのリスク因子として広く知られている。喫煙は気道組織に炎症を引き起こし、それに伴い、平滑筋の収縮過敏を誘発する。その結果、気道の狭窄が生じることにより、COPDや喘息などの病態発現に関与していると考えられている。しかし、喫煙がどのようなメカニズムにより気道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。今回、我々は手始めに、マウス気管平滑筋標本における張力測定法の確立に取り組み、70mM K⁺溶液や carbachol による収縮反応、および、isoprenaline による弛緩反応の記録に成功した。

キーワード：喫煙、気道平滑筋過敏反応性、炎症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、喘息

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]。我が国における喫煙者の数は健康意識の高まりから年々減少しつつある。しかし、平成23年度の報告によると、我が国の喫煙率は、現在でも全人口の20%に及ぶとされている。また、子育て世代である20~30代の喫煙者が全体の約25%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^{[2],[3]}。これらの数値は、現在でも、喫煙者自身だけではなく、胎児や子供への喫煙の影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)や喘息などのリスク因子として広く知られている^[4]。喫煙がこれらの疾患を誘発する原因はいまだ十分に解明されていないものの、喫煙により気道組織に炎症が惹起され、それに伴い起こる平滑筋の収縮過敏が原因の一つであると考えられている^[5]。このような平滑筋の収縮過敏の原因として、筋の収縮を調節しているコリン作動性神経やアドレナリン作動性神経などの神経の活動異常、筋細胞自身の過剰興奮などが考えられる。しかし、その病態メカニズムの詳細については、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

* 京都産業大学総合生命科学部

とにより作製した喫煙モデルマウスを用い、喫煙による気道平滑筋における収縮過敏の病態発現メカニズムの解明に取り組んでいる。しかし、実験に使用するマウスの気道組織は、モルモットやラットなどの他の実験動物のものと比べて著しく小さい(内径 1mm ほど)ため、平滑筋に発生する張力の測定には困難が予想された。マウスの気管のような微小管状組織に発生する張力を測定する方法として、市販のワイヤーミオグラフ装置を用いる方法^[6]もあるが、装置が比較的高価であるという欠点がある。そこで、我々は手始めに、マウス気管平滑筋標本において、ワイヤーミオグラフ装置を用いずに、比較的簡易にかつ安価に張力を測定する方法の確立を試みた。その結果、高 K⁺溶液やムスカリン受容体作動薬である carbachol による収縮反応、および、 β アドレナリン受容体作動薬である isoprenaline による弛緩反応の記録に成功したので、その概要を報告する。

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, 9~17 週齢, 体重 22.2g~31.4g, 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 の条件下で飼育した。飼料は、飼育用固形飼料(DC-8, 日本クレア)を用い自由摂取、水は自由飲水とした。

2.2 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、気管を 2~3mm ほどの長さに切断した。切断した気管片表面の結合組織を実体顕微鏡下にてピンセットにより除去し、気管リング標本を作成した。作製したリング標本は、タイロード液で満たしたバス装置(1ml)に移し、以下の実験に供した。

2.3 標本の設置と張力変化測定

作製したリング標本の管腔に、コの字型ステンレスワイヤ(長さ約 5mm, ϕ 0.20mm)を挿入し、バス装置の底面に敷いたシリコンに固定した。更に、絹糸を付けたトライアングル状ステンレスワイヤ(1 辺の長さ約 5mm, ϕ 0.20mm)を管腔内に挿入し、等尺性張力トランスデューサー(A&D, T7-8-240)のフックに絹糸を連結して、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 8ml/min の流量で流入させ、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°C に加温した。標本には 0.2g の負荷をかけ、約 1 時間、灌流タイロード液と平衡

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(AS 2503, NEC/Avio)により増幅した後、アナログ/デジタル変換器(A/Dコンバーター)(PowerLab 2/26, ADInstruments)を介してコンピューター(ThinkPad T520-1, Lenovo)に記録した。装置の概略を図1に示した。

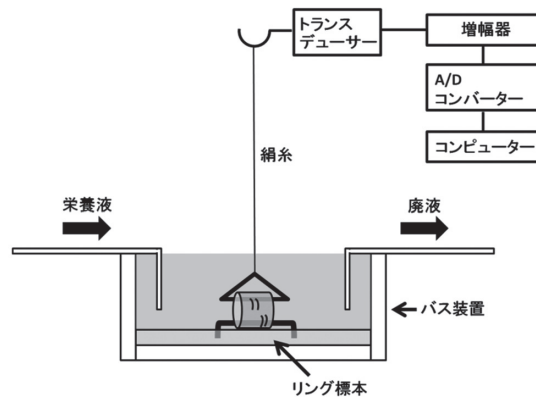


図1 張力測定装置

2.4 使用した栄養液及び薬物

実験には、タイロッド液(NaCl, 136.9; KCl, 2.7; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 2.1; NaHPO₄, 0.4; NaHCO₃, 11.9; glucose, 5.6: (mM))を使用した。高濃度 K⁺溶液はタイロッド液中の 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 より購入し、使用濃度の 1000 倍の高濃度溶液として調製した後、-20℃ で保存した。実験に使用する場合には、それぞれの保存液から一定量とり、必要な濃度となるようにタイロッド液に加えて使用した。薬物は、バス装置内のタイロッド液を、薬物を含むタイロッド液に急速に置換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ッド液に再び置換することにより行った。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 高濃度 K⁺溶液および CCh による収縮反応の測定

マウスから作製した気管リング標本において、細胞を脱分極させた時に生じる張力変化を測定した。標本に 70mM K⁺溶液を適用することにより細胞を脱分極させると、図 2a に示すように、薬物適用後 30 秒ほどで最大反応に達し、その後、徐々に張力が減少していくような一過性の収縮反応が生じた。バス装置内の高 K⁺溶液を洗浄すると、溶液を適用する前の張力レベルにまで戻った。

次に、マウス気管リング標本において、ムスカリン受容体を刺激した時に生じる張力変化を記録した。標本に CCh (10μM) を適用することにより、ムスカリン受容体を刺激すると、一過性に収縮反応

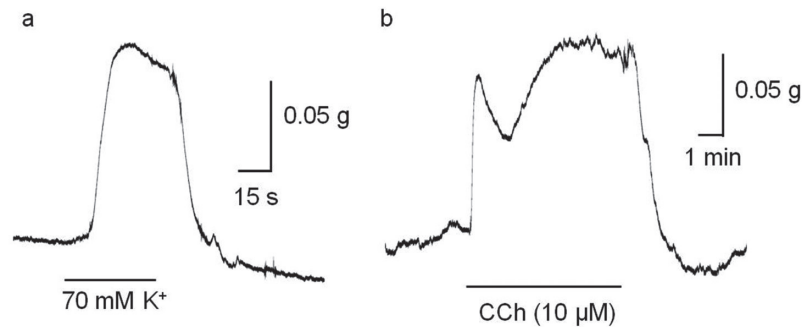


図2 マウス気管平滑筋における高 K^+ 溶液および CCh により誘発された収縮反応
 マウスから作製した気管リング標本において、70mM K^+ 溶液 (a) および CCh (100 μ M) (b) を適用した時の張力変化を表す。各薬物の適用期間は記録トレースの上に実線で示す。

が生じ、張力があるレベルまで減少した後、再び、徐々に張力が増加していくような二相性の収縮反応が生じた。この遅発性の収縮反応は、薬物適用約5分後に最大に達し、薬物の適用中、その張力レベルを維持した(図2b)。バス装置内の薬物を洗浄すると、薬物適用前の張力レベルにまで戻った。

3.2 Iso による弛緩反応の測定

マウス気管リング標本において、 β アドレナリン受容体を刺激した時の弛緩反応を記録した。弛緩反応をより大きく記録するために、CCh (10 μ M) を前処置することにより収縮反応を誘発させ、その反応がプラトーに達した後に β アドレナリン作動薬である Iso (1 μ M) を追適用した。図3に示すように薬物適用後1分ほどで最大反応に達するような弛緩反応が生じた。この弛緩反応はバス装置内の薬物を除去すると、元の張力レベルまで回復したことから、Iso の適用により生じた張力の低下は、CCh による収縮反応のランダウンによるものではないことが分かった。

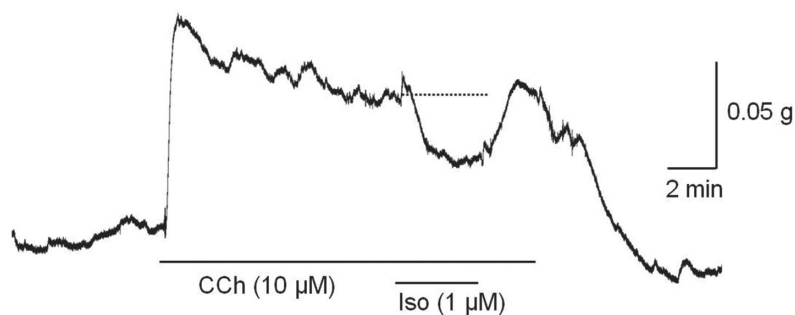


図3 マウス気管平滑筋における Iso により誘発された弛緩反応
 マウスから作製した気管リング標本において、CCh (10 μ M) を前処置することにより収縮を誘発した後、Iso (1 μ M) を追適用した時の張力変化を表す。各薬物の適用期間は記録トレースの上に実線で示す。点線は Iso 適用前の張力レベルを示す。

4. まとめ

今回、我々はマウスから作製した気管リング標本において、70mM K⁺溶液や CCh による収縮反応、および、Iso による弛緩反応を記録することに成功した。今回、確立した測定方法を用いることにより、市販のワイヤーミオグラフ装置を使用しなくとも、マウスの気管平滑筋標本における筋収縮機能を正確に評価することが可能となった。今後は、確立した張力測定法を用い、喫煙が気管平滑筋における収縮反応や弛緩反応にどのような影響を与えるのか検討していく予定である。具体的には、喫煙モデルマウスから作製した気管平滑筋標本において、70mM K⁺溶液や CCh による収縮反応、および、Iso による弛緩反応を記録し、非喫煙マウスのものと比較・解析することを計画している。現在、一部の実験についてすでに着手している。

今回確立した測定方法を用いれば、各種ノックアウトマウスや病態モデルマウスから作製した気管平滑筋標本においても、筋の収縮機能を評価することが可能となる。したがって、本研究にとどまらず、アトピー型喘息などの気道平滑筋の機能に異常をきたすような様々な疾患の病態解明や治療法の確立などの研究にも応用することができると考えられる。

参考文献

- [1] World Health Organization (WHO). WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: Warning about the dangers of tobacco. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011.
- [2] 厚生労働省編 平成 23 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
- [4] The 2004 Surgeon General's Report—The Health Consequences of Smoking. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, Atlanta, U.S.A., 2004.
- [5] Hulbert WM, McLean T, Hogg JC. (1985) The effect of acute airway inflammation on bronchial reactivity in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis.* 132, 7–11.
- [6] Safholm J, Lovdahl C, Swedin L, Boels PJ, Dahlen SE, Arner A, Adner M. (2011) Inflammation-induced airway smooth muscle responsiveness is strain dependent in mice. *Pulm Pharmacol Ther.* 24, 361–366.

Development of a method for recording the changes of tension in mouse tracheal smooth muscles

Yasuyuki TANAHASHI
Minoru TAKEUCHI

Abstract

It is well known that cigarette smoke is an important risk factor for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. It has been suggested that cigarette smoke exposure can induce airway hyperreactivity, which is associated with airway inflammation. The hyperreactivity can contribute to airway narrowing in patients with COPD and asthma. 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. In the present study, we developed a method for recording mechanical activity in mouse tracheal smooth muscles. We successfully recorded contractions induced by isotonic 70mM K^+ and carbachol and relaxations induced by isoprenaline in the mouse tracheal preparations with our recording method.

Keywords: cigarette smoke, hyperreactivity of airway smooth muscles, inflammation, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma