

〔原 著〕

能動感作ホルモット気管片の非アドレナリン 非コリン作動性神経性弛緩反応

神戸大学医学部第一内科

高月清宣 西村善博 前田 均 横山光宏

卵白アルブミン (ovalbumin : OA) による能動感作ホルモットの摘出気管平滑筋を用い、感作および抗原曝露による electrical field stimulation (EFS) およびアミノフィリンに対する弛緩反応の変化を検討した。OA 感作ホルモット気管平滑筋において抗原曝露後 EFS による弛緩反応は抗原非曝露群と比較し有意に弱まったが、アミノフィリンによる弛緩反応には変化は認められなかった。NG-monomethyl L-arginine (L-NMMA) 前処置にて、感作ホルモットにおける EFS による OA 曝露前の弛緩反応が減弱し、OA 曝露前後での有意差がなくなった。感作ホルモット気管平滑筋は非感作ホルモットと比較し、収縮性、弛緩性反応いずれにも有意差は認められなかった。以上より OA 能動感作ホルモット気管片において OA 曝露は抑制性非アドレナリン非コリン作動性神経反応による弛緩反応の低下を引き起こし、その原因の一部には NO が関与していることが示唆された。

Key words : electrical field stimulation — nitric oxide — nonadrenergic noncholinergic nerve — ovalbumin — sensitized guinea pig

はじめに

気道を支配する自律神経系には交感神経、副交感神経および非アドレナリン非コリン作動性神経 (non-adrenergic noncholinergic nerve : NANC) があり、NANC はホルモット及びヒトを含む多くの動物の気道壁に存在することが知られている¹⁾²⁾。摘出気管壁内に存在する神経を刺激するためにオーガンバス内にて双極白金電極の間隙に標本を挟み、電気刺激装置によりフィールド刺激を行う electrical field stimulation (EFS) を用いた実験が考案された。非常に短い電気パルスによるフィールド刺激は直接平滑筋に作用することなく気道壁内神経を刺激することが知られている²⁾。EFS による NANC 刺激での気道平滑筋反応は

気道のトーンに依存しており、気管支収縮と気管支拡張の両方を引き起こすことが知られている^{3)~6)}。この NANC における相反する作用は気道のトーンを制御する上で重要な役割を担い、気道平滑筋の最大収縮時の抑制に関与しているものと考えられている³⁾。しかし、気道過敏性における NANC の役割、気管支喘息患者における NANC の機能障害については不明な点も多い⁷⁾。気道平滑筋の収縮反応を起こす exciting NANC の伝達物質として substance P, neurokinin A, 気道平滑筋の弛緩反応を起こす inhibitory NANC (iNANC) 神経の伝達物質として vasoactive intestinal polypeptide (VIP) 及び nitric oxide (NO) が知られている^{8)~10)}。

今回我々は、NO により惹起される NANC を介した弛緩反応が抗原刺激により変化するかどうかを調べるために、能動感作および非感作ホルモットにおいてヒスタミンによる等尺性収縮時の EFS による弛緩反応を検討した。また L-NMMA 投与により感作気道弛緩反応における NO の役割について検討を加えた。

Received : December 6, 1999

Accepted : April 18, 2000

Abbreviations : **EFS** electrical field stimulation ; **iNANC** inhibitory NANC ; **L-NMMA** NG-monomethyl L-arginine ; **NANC** nonadrenergic noncholinergic nerve ; **OA** ovalbumin ; **VIP** vasoactive intestinal polypeptide nitric oxide

対象と方法

気管片の準備

雌ハートレー系モルモット（体重 400～800 g）を用い、頸椎脱臼処置後心臓穿刺にて脱血、直ちに気管を取り出し modified Krebs-Henseleit solution (KHS) の中で処理した。気管周囲の結合組織を取り除いた後、約 2 mm 長の円筒状気管リングを作成し、気管膜様部の反対部分を切開し実験用気管片とした。気管の部位による影響を小さくするために、作製した気管片は無作為に使用した。KHS を入れた 30 ml のガラス製オーガンバス内で、気管片の片方は糸でバス内に固定し、他方はトランスデューサー (RJB 4024, 日本光電) と糸で結び、ペンレコーダー (RJB 4008, 日本光電) を用いて等尺性の張力を記録した。KHS は pH 7.4 で、組成は NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.2, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, グルコース 10.0 (mM) とし¹¹⁾, 37 °C にて 95% O₂ と 5% CO₂ の混合ガスを通気させた。KHS には副交感神経、交感神経の影響を取り除くためにアトロピン (3 μM), プロプラノロール (1 μM) を、プロスタグランディンの影響を取り除くためにインドメサシン (2 μM) を、VIP の影響を除くために α-キモトリプシン (1 U/ml) を加えた。実験前 60 分間は、気管片を至適の実験前張力である 0.5 g になるように 20 分毎に KHS を入れ替え調節した。

EFS の方法

ヒスタミンで気管片の張力を上げ EFS で刺激すると気管片は壁内に存在する神経を介して張力は低下する¹²⁾。5×10 mm のプラチナ板を 10 mm 間隔に平行におき、オーガンバス中でその 2 枚のプラチナ板の中央に気管片をセットし、EFS を行った。EFS の波形は矩形波で持続は 1 ms, 電圧 20 V, 周波数 5 Hz, 刺激回数は 300 とした。

能動感作の手順

体重 250～300 g の雌モルモットに卵白アルブミン (OA) を以前報告した方法にて吸入させて能動感作した¹³⁾。すなわち生理的食塩水に 1% の濃度に調節した OA を 10 日間連続で 1 日 10 分間超音波ネブライザーにて吸入させ、以後週 1 回連続 3 週間吸入させた。吸入は 8 L の四角いアクリル板で作成した箱の中で超音波ネブライザーの流量を毎分 6 L にして行った。感作開始後 8 日目以降の OA 吸入には急性気管支攣縮に

よる窒息を防ぐため H₁ 受容体拮抗薬のピリラミンを体重 1 kg あたり 10 mg 腹腔内投与した。この方法によりすべてのモルモットに即時型喘息反応が認められ、能動感作モルモットは感作後終了 7 日後実験に用いた。

プロトコール

KHS 中で 1 時間インキュベーション後、気管リングをヒスタミン 10⁻⁵M にて収縮させ、収縮の頂点で 8 分毎に 3 回の EFS を行い反応を調べた。予備実験では気道平滑筋の張力は EFS にて弛緩後、8 分以内に完全に弛緩前のレベルに戻り、その後 2 回目、3 回目の EFS にて一定の反応が得られたため、以後の実験において 3 回目の反応を適当な反応として選んだ。また EFS によるこの反応が NANC を介するものかどうかを調べるためアトロピン、プロプラノロール、インドメサシンに加え、テトロドトキシンの存在下に EFS の弛緩反応を調べた。アトロピン、プロプラノロール、インドメサシン存在下に、EFS はヒスタミンで収縮させたモルモットの気管片を弛緩させたが、この EFS による弛緩反応はテトロドトキシンの存在下で完全に消失した。

周波数依存性の検討

KHS 中で 1 時間インキュベーション後、気管リングをヒスタミン 10⁻⁵M にて収縮させ、1 Hz, 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 50 Hz にて 60 秒間 EFS を行った (Fig. 1 A)。

卵白アルブミン曝露後のヒスタミン収縮に対するアミノフィリンの効果

アミノフィリンによる気管平滑筋弛緩反応に対する抗原曝露刺激の影響を検討するために以下の実験を行った。感作モルモットの気管片に OA (5 μg/ml) を添加し 30 分間収縮させた後、KHS にて洗浄し 1 時間インキュベーション後、気管リングをヒスタミン 10⁻⁴ M にて収縮させた。収縮の頂点でアミノフィリンをオーガンバスの中に加え濃度依存性の弛緩反応を調べた。それぞれの気管片における最大の弛緩反応を決定し、50% の弛緩反応の得られるアミノフィリン濃度 (EC₅₀) を求めた。対照として抗原曝露による前収縮の影響を考慮し、抗原曝露刺激の代わりに感作モルモット気管片をヒスタミン 10⁻⁴M で収縮させた後、KHS にて洗浄し 1 時間インキュベーション後、気管リング

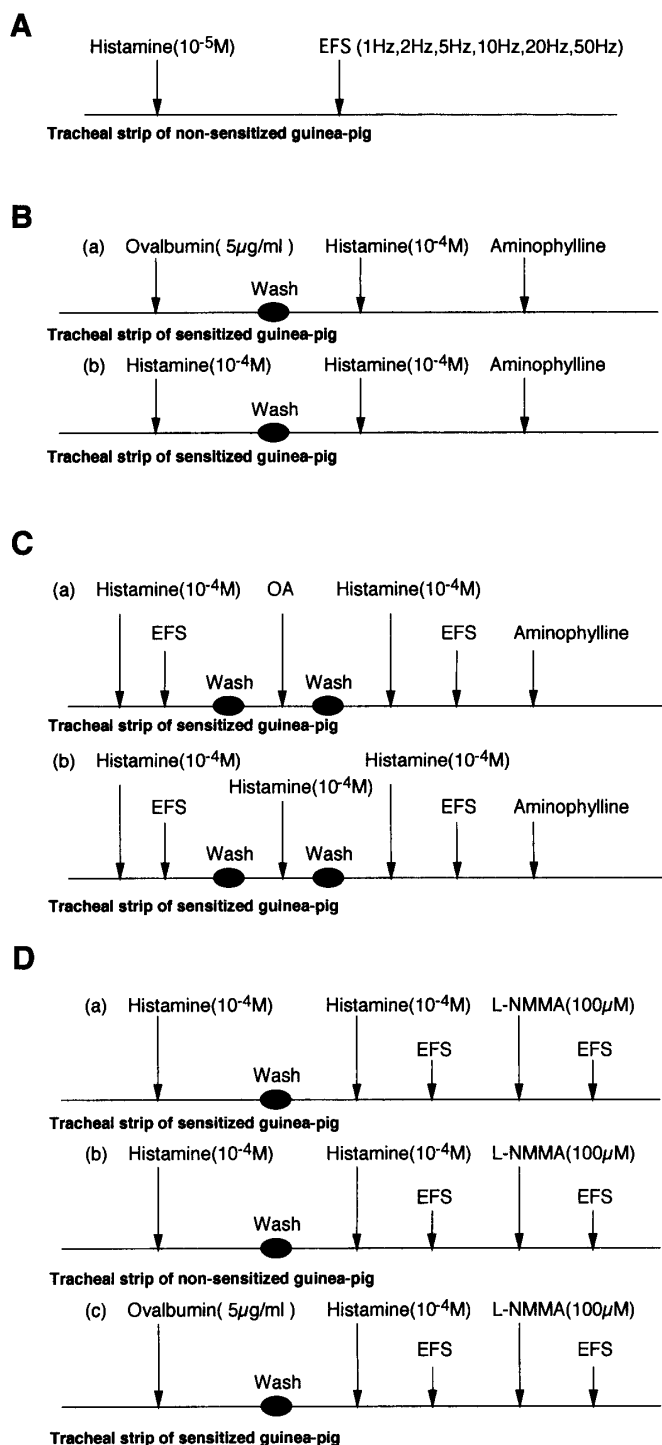


Fig. 1. (A) Protocol for the study of frequency-dependent relaxation responses to EFS (EFS: 20 V, pulse width 1 msec, duration 60 sec) (B) Protocol for the effects of ovalbumin challenge on aminophylline induced relaxations (C) Protocol for the effects of ovalbumin challenge on iNANC induced relaxations (D) Protocol for the effects of L-NMMA on iNANC induced relaxations (EFS: 20 V, 5 Hz, pulse width 1 msec, duration 60 sec).

をヒスタミン 10^{-4} M にて収縮させ収縮の頂点でアミノフィリンをオーガンバスの中に加え上記のアミノフィリンによる弛緩反応を調べた (Fig. 1-B).

卵白アルブミン感作モルモット気管平滑筋弛緩反応

感作気管平滑筋に対し、抗原曝露後 EFS に対する弛緩反応に変化を示すか否かを検討するために以下の実験を行った。まず、ヒスタミン 10^{-4} M にて収縮後、収縮の頂点で EFS を行い、弛緩反応を確認した。さらに、感作モルモットの気管片に OA ($5\mu\text{g/ml}$) を添加し 30 分間収縮させた後、KHS にて洗浄し 1 時間インキュベーションし、再度気管リングをヒスタミン 10^{-4} M にて収縮させ、収縮の頂点で EFS を行った。OA の代わりにヒスタミン 10^{-4} M で前収縮させたものを対照とした (Fig. 1-C)。

L-NMMA 添加後の感作気道のヒスタミン収縮に対する EFS の効果

感作気道の NANC 弛緩反応減弱における NO の関与を明らかにするために Fig. 1-D に示す実験を行った。まず、感作モルモットの気管片をヒスタミン 10^{-4} M で一度収縮させた後、KHS にて洗浄し各々の気管片を OA ($5\mu\text{g/ml}$) で収縮させた。EFS を行い、L-NMMA ($100\mu\text{M}$) をオーガンバスに加え 10 分間インキュベーション後再度 EFS を行った。感作モルモットの気管片を OA ($5\mu\text{g/ml}$) の代わりにヒスタミン 10^{-4} M で再び収縮させた後上記と同様の実験を行ったものを対照とした。

OA 感作モルモット気管平滑筋の反応性の検討

感作気道の収縮および弛緩反応の特徴を明らかにするために検討を行った。まず、感作モルモット及び非感作モルモットの気管片をそれぞれヒスタミン 10^{-5} M で一度収縮させ収縮反応を検討後、KHS にて洗浄し各々の気管片をヒスタミン 10^{-4} M で再び収縮させ、EFS を行い、弛緩反応を検討した。

以下の薬剤を使用した：卵白アルブミン (Grade III シグマ)、テトロドトキシン (コーワ科学)、ルブピラミン、ヒスタミン、アミノフィリン、アトロピン、プロプラノロール、インドメタシン、 α -キモトリプシン、L-NMMA、L-アルギニン (シグマ)。

数値データは平均 $\pm$ 標準偏差で表した。有意差の検

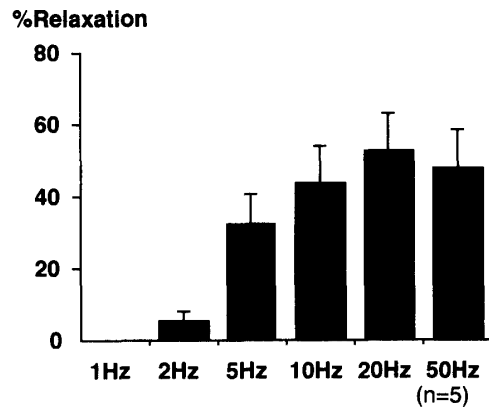


Fig. 2. Frequency-dependent relaxation responses to EFS (EFS: 20 V, pulse width 1 msec, duration 60 sec) in the tracheal strips of non-sensitized guinea-pig precontracted by 10^{-5} M histamine. Data are expressed as percentages of the maximum relaxation response by aminophylline as 100%.

Table 1 Threshold values, EC50 values of two isolated sensitized tracheal preparations for aminophylline in both the OA challenged group and histamine challenged group (data are expressed-log of the aminophylline concentration)

	OA challenge group (n = 5)	Histamine challenge group (n = 7)
Threshold values	5.90 ± 0.22	5.93 ± 0.19
EC50 values	4.85 ± 0.32	4.79 ± 0.34
Max relaxation (g)	1.58 ± 0.40	1.25 ± 0.31

定には, t-検定, Wilcoxon 検定, Mann-Whitney 検定を用いた. p 値が 0.05 未満を有意とした.

結 果

周波数反応関係の検討

ヒスタミン 10^{-5} M にて収縮させた気管片の EFS による弛緩反応は周波数依存性を示し, 20 Hz で最大反応が得られた (Fig. 2).

卵白アルブミンによる曝露後のヒスタミン収縮に対するアミノフィリンの効果

ヒスタミンにより収縮させた摘出気管片は 10^{-3} M のアミノフィリンにより最大の弛緩反応を示した. 能動感作モルモットの摘出気管のアミノフィリンによる

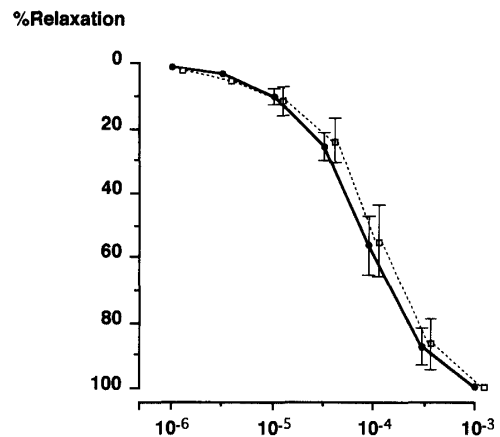


Fig. 3. Cumulative concentration-response curve for the relaxing effect of aminophylline in the isolated tracheal preparations from the OA sensitized guinea pigs (●OA challenge group, □histamine challenge group) precontracted by histamine (1×10^{-4} M). The ordinate shows the amplitude of relaxation as a percentage of the maximum relaxation induced by aminophylline (10^{-3} M). Each point represents the mean $\pm$ S.E.M.

弛緩反応に関しては抗原曝露後, EC₅₀ は ($-\log_{10}$ 表示にて) 4.85 ± 0.32 (n=5), 対照群では 4.79 ± 0.34 (n=7) であり両群間に有意差は認められなかった (Table 1, Fig 3).

卵白アルブミン曝露後のヒスタミン収縮に対する EFS の効果

能動感作モルモットの気管片への OA 曝露後, EFS による弛緩反応は OA 曝露前に比して 30.7% 減弱した (OA 曝露前: $38.6 \pm 16.3\%$ ・OA 曝露後: $26.5 \pm 11.7\%$, アミノフィリンによる最大拡張を 100% とした時の割合). 一方, 能動感作モルモットにヒスタミン刺激した後に EFS による弛緩反応を検討した対照群では, 弛緩反応の有意な減弱は認められなかった (ヒスタミン曝露前: $24.3 \pm 11.0\%$ ・ヒスタミン曝露後: $26.9 \pm 15.2\%$, アミノフィリンによる最大拡張を 100% とした時の割合) (Fig. 4).

L-NMMA 添加後の感作気道のヒスタミン収縮に対する EFS の効果

OA 曝露した能動感作モルモットの気管片の EFS による弛緩反応は L-NMMA 処理後 37.7% 減少し, ヒスタミン刺激した対照群の減少率 32.9% と比較し, 両群間に有意差は認められなかった.

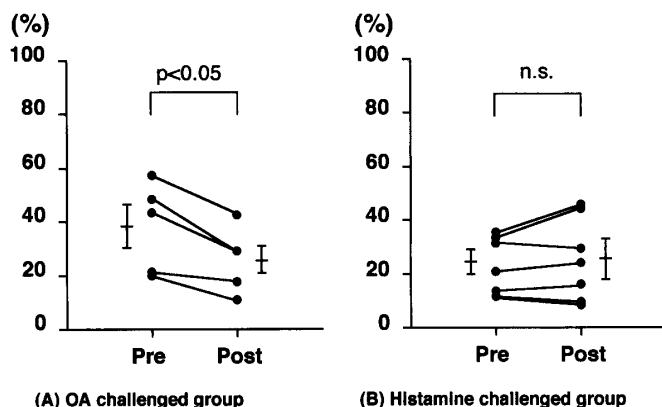


Fig. 4. The effects of OA challenge (A) compared with histamine challenge (B) of tracheal strips of OA sensitized guinea-pig on the NANC induced relaxations (EFS: 20 V, 5 Hz, pulse width 1 msec, duration 60 sec), data are expressed as percentage of maximal aminophylline relaxation as 100%.

OA 感作モルモット気管平滑筋の反応性の検討

能動感作モルモット気管片と非感作モルモット気管片におけるヒスタミン 10^{-5} M に対する収縮反応, EFS による弛緩反応ともに有意差は認められなかった (Table 2).

考 案

OA 能動感作モルモット気管片において OA 曝露は iNANC 反応による弛緩反応の低下を引き起こし, その原因の一部には NO が関与していることが示唆された。

モルモットの気管片を用いたこの実験系において神経毒であるテトロドトキシンを加えた後 EFS を行っても弛緩反応は認められなかった。このことより, EFS によって起こる弛緩反応は神経原性反応であると考えられる¹⁴⁾。この神経原性反応は副交感神経系及び交換神経系を介さない神経システム, つまり iNANC を介した弛緩反応と考えられる。また EFS の周波数に関しては 5 Hz より著明な弛緩反応が認められ, 周波数を増加させると 20 Hz で最大反応が得られた。今回の実験では繰り返し刺激することを考え, 5 Hz での刺激を採用した。

感作は OA の吸入により行った。最初の 10 日間は毎日, その後はブースター効果のために 1 週間に 1 回 OA 吸入を行った。予備実験においてこの感作方法を

Table 2 The effects of sensitization on tracheal smooth muscle contraction and NANC induced relaxations

	Sensitized guinea-pig (n = 7)	Non-sensitized guinea-pig (n = 10)
Max contraction by histamine (g)	1.39 ± 0.23	1.57 ± 0.28
Relaxation (g)	0.34 ± 0.23	0.29 ± 0.15

終了した動物はすべて即時型喘息反応を示した。

気道平滑筋への神経支配に関して Coburn らは, モルモットの気道平滑筋への神経支配には交換神経系が関与しているが, 全て又はほとんどの抑制性神経は非交感神経系に属していると述べている²⁾。しかし, 感作動物モデルの NANC 反応性の変化や, 喘息患者の NANC の役割についての報告は少ない⁷⁾。そこで OA 能動感作モルモットを用いて EFS による iNANC 反応を検討した結果, EFS による能動感作モルモット気管の iNANC 反応は OA 曝露により減弱するが, アミノフィリンによる弛緩反応には OA 曝露による有意な変化はないことが示された。iNANC の反応は EFS 時の気道平滑筋の前張力に依存しており, 強い気道平滑筋の収縮を防止していると考えられている³⁾。OA 曝露により iNANC による拡張反応が低下したことは, OA 曝露による NANC 弛緩反応の低下が気道過敏性の一因であるという可能性が示唆された。

能動感作モルモット OA 曝露後の iNANC 反応減弱の機序は明らかではないが, スーパーオキシドによる NO または VIP 分解の亢進による iNANC の弱化, NO synthase (NOS) 活性低下等が考えられる。NOS 活性低下の傍証としてマウスのマクロファージにおいて NO が NOS の活性を不可逆的に抑制することが知られている¹⁵⁾。NO は気道炎症に関与しており, 気管支喘息患者でも呼気 NO の増加が認められている¹⁶⁾。また, データを示していないが, L-NMMA 添加実験後オーガンバス内へアルギニンを加えても弛緩反応はコントロールレベルまで戻らないことより, NOS 活性の低下が推察される。炎症により産生された過剰の NO が NANC の NOS を抑制し, NANC による弛緩反応が低下した可能性も考えられた。

能動感作モルモットの気管片は OA 曝露後に EFS による弛緩反応の減少を示したが, L-NMMA を加えた後の NANC による弛緩反応の減少の割合は OA 曝露していない能動感作モルモットのそれに比して有意

差は認められなかった。つまり、感作がモルモット気道の拡張反応、特にNOを介する反応に何らかの影響を及ぼすことが考えられた。

ヒトにおいてBarnesは気道平滑筋にNANCによる気道拡張のシステムが存在し、NANC抑制系のシステムが唯一の神経原性拡張系であると報告している¹⁷⁾。NANC系においてBredtらは免疫組織化学的方法により神経の内部にNO合成酵素が存在することを報告した¹⁸⁾。またNOとVIPがiNANCの神経伝達物質として共存していることを多くの報告が示している。これらと今回の結果より、喘息患者の気道過敏性はiNANC反応の減弱が一つの原因であることが示唆された。

以上より抗原曝露がEFSによるNANCを介した弛緩反応を弱めることが示され、この弛緩反応の一部にはNOが密接に関係しており気道過敏性の一つの原因である可能性が示唆された。

文 献

- Richardson, J.B. : Nerve supply to the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* **79**, 785-802, 1979.
- Coburn, R.F. and Tomita, T. : Evidence for nonadrenergic inhibitory nerves in the guinea pig trachealis muscle. *Am. J. Physiol.* **224**, 1072-1080, 1973.
- Linden, A. : The non-adrenergic, non-cholinergic response counteracts changes in guinea-pig airway tone with and without sympathetic activation. *Br. J. Pharmacol.* **106**, 616-622, 1992.
- Rhoden, K.J. and Barnes, P.J. : Potentiation of nonadrenergic neural relaxation in guinea pig airway by a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **252**, 396-402, 1990.
- Aikawa, T., Sekizawa, K., Morikawa, M., Itabashi, S., Sasaki, H. et al. : The role of cyclic AMP in non-adrenergic non-cholinergic contraction in guinea-pig bronchi. *Br. J. Pharmacol.* **105**, 609-612, 1992.
- Verleden, G.M., Belvisi, M.G., Rabe, K.F., Miura, M. and Barnes, P.J. : β_2 -adrenoceptor agonists inhibit NANC neural bronchoconstrictor responses *in vitro*. *J. Appl. Physiol.* **74**, 1195-1199, 1993.
- Miura, M., Inoue, H., Ichinose, M., Kimura, K., Katsumata, U. et al. : Effect of nonadrenergic non-cholinergic inhibitory nerve stimulation on the allergic reaction in cat airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**, 29-32, 1990.
- Barnes, P.J. : Asthma as an axon reflex. *Lancet* **1**, 242-244, 1986.
- Ellis, J.L. and Farmer, S.G. : The effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) antagonists, and VIP and peptide histidine isoleucine antisera on non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **96**, 513-520, 1989.
- Moore, P.K., al-Swayeh, O.A. and Chong, N.W. : L-NG-nitro arginine, a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilation *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* **99**, 408-412, 1990.
- Yamane, K. and Kobayashi, T. : Endogenous AA metabolites and their possible role in tracheal smooth muscle tone in guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* **69**, 26-32, 1990.
- Aikawa, T., Sekizawa, K. and Itabashi, S. : Nonadrenergic inhibitory nerves attenuate neurally mediated contraction in cat bronchi. *J. Appl. Physiol.* **69**, 1594-1598, 1990.
- 前田 均, 八幡知之, 里内美弥子, 竹中和弘, 横山光宏 : モルモット喘息モデルにおける低分子ヘパリンの抗原曝露後気道収縮反応に対する抑制効果. *アレルギー* **44**, 1282-1289, 1995.
- Li, C.G. and Rand, M.J. : Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulations is mediated by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* **102**, 91-94, 1991.
- Assreuy, J., Cunha, F.Q., Liew, F.Y. and Moncada, S. : Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 833-837, 1993.
- Satouchi, M., Maeda, H., Yu, Y. and Yokoyama, M. : Clinical significance of the increased peak levels of exhaled nitric oxide in patients with bronchial asthma. *Int. Med.* **35**, 270-275, 1996.
- Barnes, P.J., Baraniuk, J.N. and Belvisi, M.G. : Neuropeptides in the respiratory tract. Part I. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, 1187-1198, 1991.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M. and Snyder, S.H. : Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347**, 768-770, 1990.

OVALBUMIN SENSITIZATION AFFECTS NONADRENERGIC NONCHOLINERGIC RELAXATION
RESPONSE ON GUINEA-PIG TRACHEAL SMOOTH MUSCLE

Kiyonobu Takatsuki, Yoshihiro Nishimura, Hitosi Maeda and Mitsuhiro Yokoyama
First Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine

We investigated the effects of anaphylactic challenge on nonadrenergic noncholinergic (NANC) relaxation response to electrical field stimulation (EFS) or to aminophylline in sensitized guinea pig tracheal smooth muscles. An anaphylactic challenge with ovalbumin (OA) reduced the relaxation response to EFS (20 V, 5 Hz, 300 pulse, duration 1 msec.), but the relaxation response to aminophylline was not affected by OA exposure. NG-monomethyl L-arginine, a nitric oxide (NO) synthesis inhibitor, reduced the relaxation response to EFS in the OA sensitized guinea pig. While the relaxation response to EFS on the sensitized guinea pig tracheal smooth muscle was significantly attenuated compared with that on the non-sensitized guinea-pig, there was no significant difference between the tracheal strip of OA challenge group and that of control group in sensitized guinea-pig under the existence of NO synthesis inhibitor. These results suggest that the attenuation of NANC relaxation response associated with sensitization plays an important role in airway hyperreactivity and is responsible for the decrease in NO amount.
