

モルモット慢性喘息モデルにおける気道壁肥厚の検討 —反復抗原曝露および非特異的反復刺激との比較—

獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科

中野康弘 戸田正夫 吉田 稔 相良博典

気管支喘息の基本的病態は、単なる気道の可逆性攣縮ではなく、好酸球、活性化Tリンパ球、肥満細胞などの様々な炎症性細胞が関与する慢性の気道炎症であり、炎症によって気道反応性が亢進し、さらに不可逆的な気道の器質的変化（リモデリング）が生じると考えられている。すでに我々は卵白アルブミン(OA)24週にわたる長期曝露により気道壁肥厚を伴う慢性喘息モデルを確立している。今回、アセチルコリン(ACH)による反復刺激を行い気道形態に与える影響を検討した。Hartley系雄モルモットを3群に分け、1群は、OA10日間連続吸入による感作の後、週1回同様に反復吸入曝露を24週間継続した。2群はACH313 μ g/ml、2分間吸入を週1回、24週曝露し、さらに3群はコントロールとして、溶媒の生食のみ同期間、同様に吸入曝露した。最終曝露5日後に気管、肺を摘出し、気道横断面積を計測した。長期抗原反復曝露では、コントロールと比較し、気道の上皮・上皮下層および平滑筋層と共に、基底膜層の肥厚が認められた(それぞれ 0.079 ± 0.014 , $p=.0083$; 0.137 ± 0.026 , $p=.0008$; $0.0024 \pm 7.975 \times 10^{-5} \mu\text{m}$, $p<.0001$)。ACH反復曝露では、上皮・上皮下層および平滑筋層の肥厚はコントロールと比較し有意差は認めず、基底膜層の肥厚も認めなかった(それぞれ 0.051 ± 0.008 , $p=.4453$; 0.059 ± 0.013 , $p=.5168$; $0.0017 \pm 5.034 \times 10^{-5} \mu\text{m}$, $p=.0807$)。以上の結果より基底膜層肥厚だけでなく、気道平滑筋層の肥厚は機械的反復収縮反応だけでは生じず、これらの肥厚には抗原を介したアレルギー性炎症の存在が重要であることが示唆された。

Key words : airway remodeling — airway smooth muscle — bronchial asthma
— thickness of basement membrane

はじめに

気管支喘息の概念は、気道の可逆性気管支平滑筋収縮から気道における慢性炎症へと大きく変遷した^{1)~3)}。近年喘息の病態が解明されるにつれて、上皮の剥離を伴う慢性的な気道傷害と、傷害部位における気道上皮の修復に伴う気道の再構築(リモデリング)が注目されてきている⁴⁾⁵⁾。気道のリモデリングには、線毛上皮の剥離、上皮杯細胞増殖、上皮基底膜固有層下網状層(Lamina reticular)の肥厚、気管支平滑筋の肥大増殖、粘液腺の肥大などがある。このような気道のリモデリングが気道過敏性や喘息の慢性化、難治化に関連していると考えられている⁶⁾⁷⁾。

今回我々は、モルモット長期抗原曝露により、気道壁肥厚を伴うリモデリングモデルを作成し、これらモデルを用いて抗原を介した刺激が及ぼす気道形態の変化を、アセチルコリンによる非特異的気道収縮によってもたらされる気道形態の変化と比較検討した。

材料及び方法

1. ハートレー系、雄性モルモット、約300g、4週齢(埼玉実験動物供給所)を用いた。
2. 試薬：
卵白アルブミン(OA; Sigma, Grade V)は生理食塩水にて10mg/mlに溶解した。
アセチルコリン吸入には、塩化アセチルコリン(ACH; 第一製薬株式会社)を生理食塩水に溶解し313 μ g/mlに希釈したものを使用した。

Received : September 24, 1999

Accepted : December 9, 1999

Abbreviations : ACH acetylcholine ; OA ovalbumin ; SALN saline

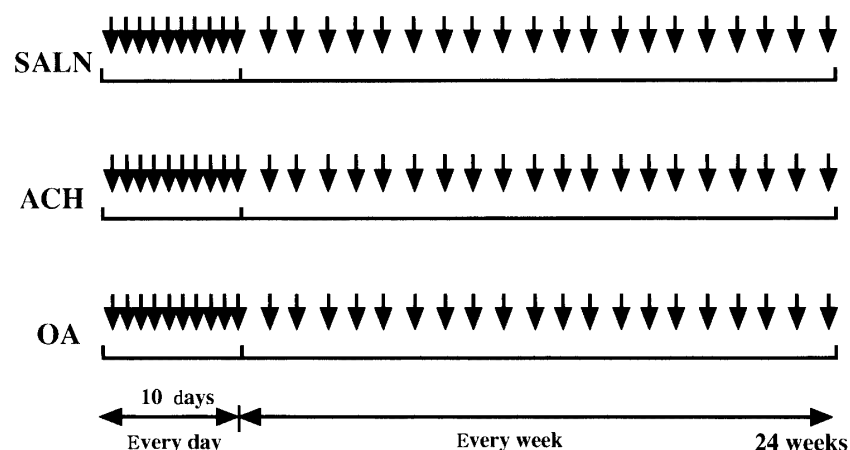


Fig. 1. Experimental protocol.

Three groups are made up as follows ;

(1) Ovalbumin group (OA)

Guinea pigs were sensitized with aerosolized one a day OA for 10 days successively and then once a week for 24 weeks.

(2) Acetylcholine group (ACH)

Guinea pigs were exposed to aerosolized an ACH at concentration of 313 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for ten days successively for 2 minutes, and followed by once a week for 24 weeks.

(3) Saline group (SALN)

Guinea pigs were exposed by saline the same determination for 10 days successively and followed by once a week for 24 weeks.

気道の組織の染色は、Turk solution (和光純薬工業), May-Gruenwald's solution modified (Merck), Giemsa solution (Merck) を用いた。

3. 実験方法：(Fig. 1)

a. 抗原曝露群

プラスチック製抗原吸入装置 (直径 41 cm, 高さ 8 cm の正十二角形, アスピレータで out-flow を同一に設定) 内にモルモット 10 匹を入れ, オムロン社製超音波ネブライザー NE-U 12 にて 1 日 1 回, 10 mg/ml の OA を 6 l/min の気流量で 10 分間, 10 日間連続反復吸入曝露して感作した。10 日間連続吸入感作終了後, 同一の吸入曝露を週 1 回ずつ 24 週目まで実施した。

b. ACH 曝露群

同様の装置を用いて ACH 313 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 分間を 10 日間連続吸入した後, 同様の ACH 吸入を週 1 回ずつ 24 週目まで実施した。

ACH の濃度に関しては, データには示さないが, 予備実験として, 156~5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの濃度に関して検討した結果, 625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度では半数以上が 2 分間の曝露で死亡し, 抗原投与と同等の気道収縮を認めた 313 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を, 至適濃度と決定した。

c. 生理食塩水曝露群

同様の装置を用いて, 抗原曝露群と同じ実験プロトコールにて, OA の代わりに生理食塩水を吸入曝露した。

抗原曝露群については, 10 日間連続吸入感作の 6 日目以降から抗ヒスタミン剤 (クロール・トリメトン) の 1 ml/kg 腹腔内注射を施行した。全ての群において OA の直接作用を否定するために, 最終曝露 5 日後に, 気管および肺を摘出してスライド標本作製し, 気道横断面積を画像解析ソフトを用いて計測した。

d. 計測法

James らの方法⁸⁾に準じ, 同程度の大きさの気道横断面を計測対象とした。気道横断面積は, 平滑筋層, 粘膜層, 内腔の 3 部位に分け, 測定した周長をそれぞれの円周とする正円面積へと補正し, それを拡張期面積として各々内腔面積で除して検討を行った。基底層は, エラスチカーワンギーソン染色標本により, 有軟骨気道の長軸に対し, 垂直横断切片が得られている粘膜部において, 5 箇所計測し, その平均値を算出した。

4. データ処理法および統計解析法

統計学的処理は, Student unpaired t-test を用いて, P 値が 0.05 未満を有意とするか, 一元配置分散分析を

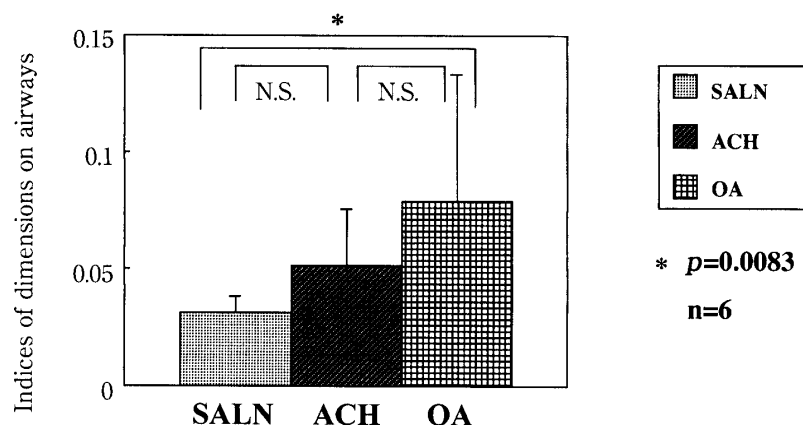


Fig. 2. Mucosal layer dimension.

Mucosal layer dimension of OA sensitized guinea pigs was statistically significant increased compared with saline exposed guinea pigs but not ACH.

There was no increased mucosal layer dimension between ACH and OA statistically. Data are expressed as mean ± SE (n=6).

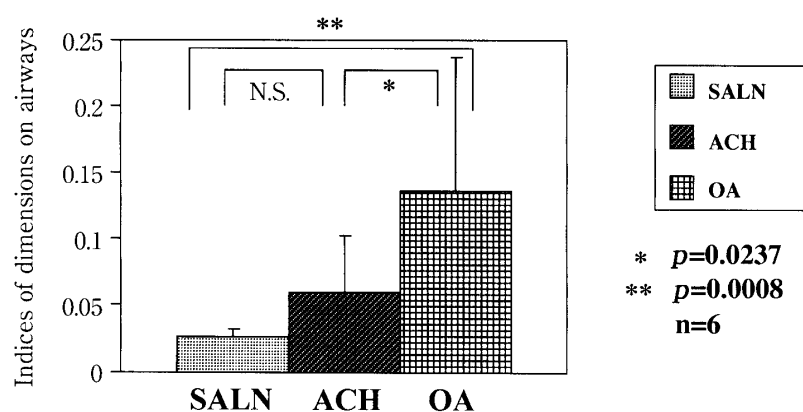


Fig. 3. Smooth muscle layer dimension.

Smooth muscle layer dimension of OA sensitized guinea pigs was statistically significant increased compared with both saline and ACH exposed guinea pigs.

There was statistically significant increased smooth muscle layer dimension between ACH and OA. Furthermore, there was no increased smooth muscle layer dimension between ACH and saline statistically. Data are expressed as mean ± SE (n=6).

行い, 正規分布を示した場合 (F 検定で P 値が 0.05 未満の時のみ), ひきつづき多重比較検定で P 値が 0.05 未満を有意とした。

結 果

a. 粘膜層

粘膜層の面積について, 生理食塩水曝露群, ACH 曝露群, 抗原曝露群の 3 群を比較した。Fig. 2 に示すご

とく粘膜層面積は, 抗原曝露群 (0.079 ± 0.014) において生理食塩水曝露群 (0.031 ± 0.002) と比較して有意 ($p=0.0083$) に大きかった。しかし, ACH 曝露群 (0.051 ± 0.008) では, 有意な変化は認められなかった。

b. 平滑筋層

Fig. 3 に示すごとく平滑筋層面積は, 抗原曝露群 (0.137 ± 0.026) において生理食塩水曝露群 (0.026 ± 0.002) および ACH 曝露群 (0.059 ± 0.013) と比較して有意 (それぞれ $p=0.0008$, $p=0.0237$) に大きかった。生理食塩水曝露群と ACH 曝露群との間には有意差は認

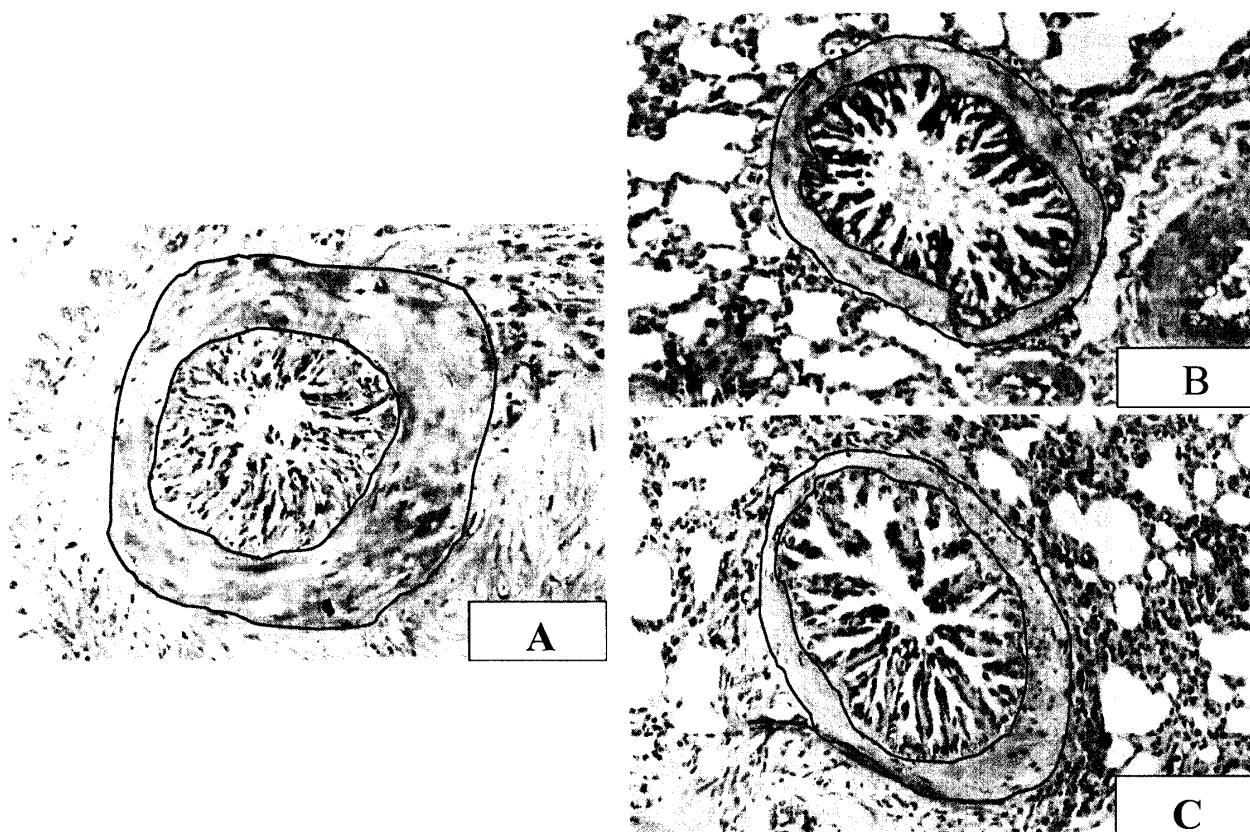


Fig. 4. This figure shows the typical lung tissue stain with HE.

A ; Ovalbumin group. B ; Saline group. C ; Acetylcholine group.

めなかった。

Fig. 4 に典型的な組織写真を示す。

c. 全層

Fig. 5 に示すごとく全層面積は、抗原曝露群 (0.216 ± 0.039) において生理食塩水曝露群 (0.058 ± 0.003) と ACH 曝露群 (0.110 ± 0.020) に比較して有意 (それぞれ $p=0.0016$, $p=0.0490$) に大きかった。生理食塩水曝露群と ACH 曝露群との間には有意差は認めなかった。

d. 基底層

Fig. 6 に示すごとく基底層の厚さは、抗原曝露群 ($0.0024 \pm 7.975 \times 10^{-5} \mu\text{m}$) において生理食塩水曝露群 ($0.0016 \pm 4.809 \times 10^{-5} \mu\text{m}$) および ACH 曝露群 ($0.0017 \pm 5.034 \times 10^{-5} \mu\text{m}$) と比較して有意 (それぞれ $p < 0.0001$, $p < 0.0001$) に肥厚していた。しかし、ACH 曝露群では、有意な肥厚は認めなかった。

考 察

近年、気管支喘息の基本病態の概念が、気管支平滑

筋の生理学的収縮から気道粘膜の炎症へと変遷し、慢性気道炎症の重要性、特に好酸球^{9) - 12)}、Tリンパ球^{13) - 15)}、肥満細胞^{16) - 18)}を中心とした細胞浸潤、さらにそれらが続いて引き起こす気道上皮傷害が主要徴候とされた。また、喘息患者の気道粘膜生検を安全に行うことが可能になり¹⁹⁾、今まで剖検肺で見られていた基底膜の肥厚の大部分は実際には気道上皮の基底膜でなく、主としてその直下の結合組織成分の肥厚に起因していることが明らかになった²⁰⁾。1993年 WHO を中心として発行された喘息の国際指針 (Global Initiative for Asthma)³⁾ は、これら病理学的変化が慢性・難治性喘息における不可逆的な気道閉塞の原因であると指摘し、気道壁リモデリングの概念が生まれた。この気道壁リモデリングに関し、各研究施設で様々な検討が行われており、その機序が徐々に解明されつつある^{21) 22)}。今回我々は、これら気道壁リモデリングが免疫学的機序を介したもののか、あるいは抗原非特異的な刺激においても起こりうるものかについて検討した。まず、モルモットに OA を長期反復吸入することにより気道壁肥厚を伴う慢性喘息モデルを作成し、さらに

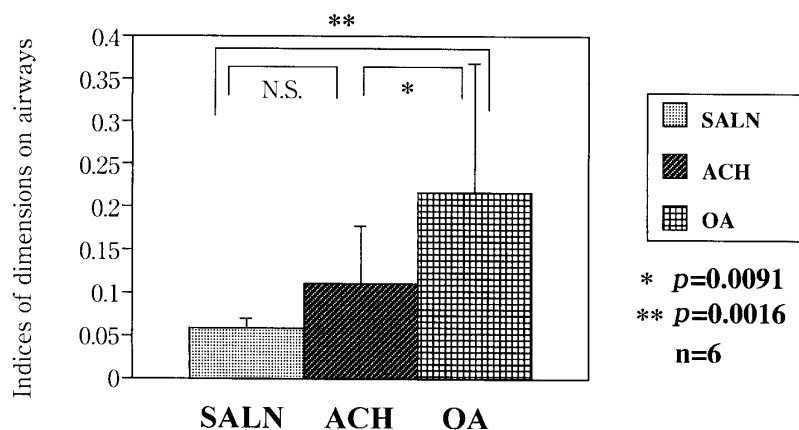


Fig. 5. Total wall dimension.

Total wall dimension of OA sensitized guinea pigs was statistically significant increased compared with both saline and ACH exposed guinea pigs.

There was statistically significant increased total wall dimension between ACH and OA. Furthermore, there was no increased total wall dimension between ACH and saline statistically. Data are expressed as mean $\pm$ SE (n=6).

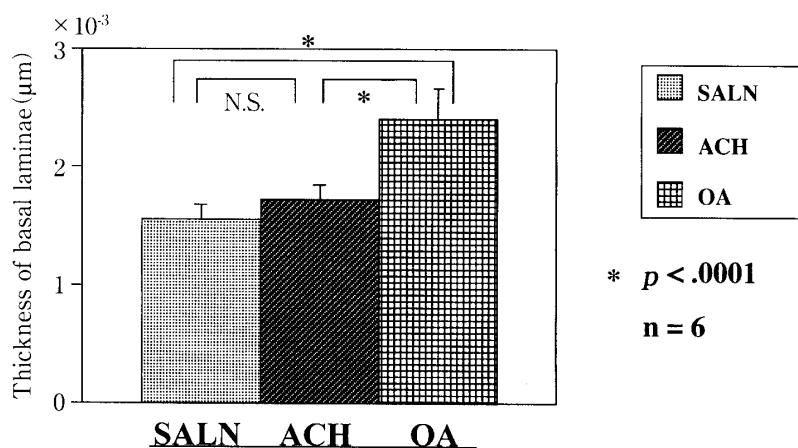


Fig. 6. Basal lamina.

Basal lamina of OA sensitized guinea pigs was statistically significant increased compared with both saline and ACH exposed guinea pigs.

There was statistically significant increased basal lamina between ACH and OA.

Furthermore, there was no increased basal lamina between ACH and saline statistically. Data are expressed as mean $\pm$ SE (n=6).

ACH による抗原非特異的反复刺激が気道形態に与える影響について検討した。基底膜, 粘膜層, 平滑筋層, 全層に分けてそれぞれ壁の肥厚について検討した結果, OA 曝露群には気道壁の肥厚が認められたが, ACH 曝露群では全てにおいて有意な肥厚は見られなかった。OA, ACH 両者とも気道収縮を起こすが, 壁の肥厚に関して大きな相違が見られた。二つの違いは, 一方はアレルギー性炎症を介しているのに対し, もう

一方は ACH 受容体を介した気道平滑筋の直接刺激による収縮であるという点である。これらの結果は気道壁の肥厚にはアレルギー性炎症の存在が重要であることを強く示唆させるものであった。一方, Nagai らの報告²³⁾では, ACH 吸入による気道壁肥厚を認めているが, 我々と比較して高濃度の ACH を用いており, また投与回数も多く, ACH 吸入方法の違いにより結果が異なった可能性も示唆され, 更に検討の必要がある。今

回我々の実験においては、各種サイトカインの関与や浸潤細胞の性状に関する検討を行っていないが、気道壁肥厚と炎症細胞浸潤の関係は興味ある問題であり、今後の検討課題である。

気道壁の肥厚に関しては、非喘息対照群に比較し、喘息患者では10～100%、喘息死患者では、50～300%の横断壁面積の増加があり、平滑筋断面積に限れば同様に25～150%、50～230%の増加が見られたという報告があり²⁴⁾、気道壁肥厚の程度が強くなるとともに喘息が重症化すると考えられる。気道壁肥厚は、気道収縮による呼吸機能の変化に重大な影響を与えることが知られており、Jamesらは40%の平滑筋収縮では、非発作時における気道抵抗の上昇率は15%にすぎないが、喘息死患者においては、それが290%にも及ぶことを、理論上計算された気道抵抗の変化率から算出した⁸⁾。平滑筋層より外側の壁肥厚もまた、気道収縮性の増大に影響していると言われている²⁵⁾。それは、外層の肥厚に伴って起こる平滑筋の収縮と周囲の肺胞の弾性収縮張力による拡張障害のためとされている。それらの結果、気道壁の肥厚は、気道閉塞を増強させ、かつ気道反応性を亢進させると考えられている²⁴⁾。

おわりに

現在気道リモデリングに伴う気道壁の肥厚と臨床症状、呼吸機能障害、および気道過敏性亢進との関連性を示す報告²⁶⁾があり、リモデリングの改善が喘息の病態、予後、治療に与える影響は大きい。最近、抗原回避もしくはステロイド投与により気道壁肥厚が改善するとの報告もあり^{27)–30)}今後、気道リモデリングにより肥厚した気道壁を標的とした治療法の開発が望まれる。

本研究に際し、御指導いただきました獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科福田 健教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Bousquet, J., Charez, P., Lacoste, J.Y., Barneon, G., Ghavanian, N., et al. : Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1033–1039, 1990.
- 2) Scheffer, A.L. (Chairman) : International consensus report on diagnosis and treatment asthma. *Clin. Exp. Allergy* 22(suppl 1), pp. 1–72, 1992.
- 3) Global Initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention : NHLBI/WHO work-shop report. National Institute of the Health. Publication No. 95–3569, 1995.
- 4) Holgate, S.T. : The mechanisms of intractable asthma. *Allergology International* **45**, 23–34, 1996.
- 5) Bousquet, J., Lacoste, J.Y., Charez, P., Vic, P., Godard, P., et al. : Bronchial elastic fibers in normal subjects and asthmatic patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 1648–1654, 1996.
- 6) Bousquet, J., Vignola, A.M., Chanwz, P., Campbell, A.M., Bonsignore, G., et al. : Airway remodeling in asthma. ; no doubt, no more? *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **107**, 211–214, 1995.
- 7) Corrigan, C.J. and Kay, A.B. : The role of inflammatory cells in the pathogenesis of asthma and of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* **143**, 1165–1168, 1991.
- 8) James, A.L., Pare, P.D. and Hogg, J.C. : The mechanism of airway narrowing in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**, 242–246, 1989.
- 9) De, Monchy, J.G., Kauffman, H.F., Venge, P., Koeter, G.H., Jansen, H.M., et al. : Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* **131**, 373–376, 1985.
- 10) Wardlaw, A.J., Dunnette, S., Gleich, G.J., Collins, J. V. and Kay, A.B. : Eosinophils and mast cell's in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**, 62–69, 1988.
- 11) Capron, M., Tomassini, M., Torpier, G., Kusnierz, J. P., MacDonald, S., et al. : Selectivity of mediators released by eosinophils. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **88**, 54–58, 1989.
- 12) Gleich, G.J., Flavahar, N.A., Fujisawa, T. and Vanhoutte, P.M. : The eosinophils as a mediator of damage to respiratory epithelium. : A model for bronchial hyperreactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **81**, 776–781, 1988.
- 13) Azzawi, M., Bradley, B., Jeffery, P.K., Frew, A.J., Wardlaw, A.J., et al. : Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**, 1407–1413, 1990.
- 14) Jeffery, P.K., Wardlaw, A.J., Nelson, F.C., Collins, J. V. and Kay, A. B. : Bronchial biopsies in asthma. : An Ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**, 1745–1753, 1989.

- 15) Poulter, L.W., Pomer, C. and Burke, C. : The relationship between bronchial immunopathology and hyperresponsiveness in asthma. *Eur. Respir. J.* **3**, 792-799, 1990.
- 16) Arm, J.P., Spur, B.W. and Lee, T.H. : The effects of inhaled leukotriene E 4 on the airway responsiveness to histamine in subjects with asthma and normal subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* **82**, 654-660, 1988.
- 17) Casale, T.B., Wood, D., Richerson H.B., Trapp, S., Metzge, W.J., et al. : Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with methacholine bronchial hyperresponsiveness. *J. Clin. Invest.* **79**, 1197-1203, 1987.
- 18) Martin, T.R., Takeishi, T., Katz, H.R., Austen, K.F., Drazen, J.M., et al. : Mast cell activation enhances airway responsiveness to methacholine in the mouse. *J. Clin. Invest.* **91**, 1176-1182, 1993.
- 19) Holgate, S.T., Wilson, J.R., Howarth, P.H. : New insights into airway inflammation by endobronchial biopsy. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**, s 2-6, 1992.
- 20) Roche, W.R., Beasley, R., Williams, J.H., Holgate, S. T. : Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* **1**, 520-523, 1989.
- 21) Aubert, J-D., Dalal, B.I., Bai, T.R., Roberts, C.R., Hayashi S., et al. : Transforming growth factor β 1 gene expression in human airways. *Thorax* **49**, 225-232, 1994.
- 22) Hoshino, M., Nakamura, Y., Sim, J.J. : Expression of growth factors and remodeling of the airway wall in bronchial asthma. *Thorax* **53**, 21-27, 1998.
- 23) Nagai, A., Inano, H. and Takizawa, T. : Morphologic changes in the airway induced by recurrent exposure of acetylcholine in the guinea pig. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**, 172-176, 1990.
- 24) James, A.L. : Relationship between airway wall thickness and airway hyperresponsiveness. In "Airway Wall Remodeling in Asthma." (ed by Stewart, A.G.) CRC Press, Boca Raton, pp. 1-27, 1997.
- 25) Pare, P.D., Wiggs, B.R., James, A.L., Hogg, J.C. and Bosken, C. : The comparative mechanics and morphology of airways in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* **143**, 1189-1193, 1991.
- 26) Jeffery, P.K., Godfrey, R.W., Adelroth E., Nelson, F., Rogers, A., et al. : Effect of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticular collagen in asthma. A quantitative light and electron microscopic study. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**, 890-899, 1992.
- 27) Trigg, C.J., Manolitsas, N.D., Wang, J., Calderon, M.A., McAulay, A., et al. : Placebo-controlled Immunopathologic study of four months of corticosteroids in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **150**, 17-22, 1994.
- 28) Schwiebert, L.M., Beck, L.M., Stellato, C., Bickel, C. A., Bochner, B.S., et al. : Glucocorticosteroid inhibition of cytokine production ; relevance to antiallergic actions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 143-152, 1996.
- 29) Djukanovic, R., Wilson, J.W., Britten, K.M., Wilson, S.J., Walls, A.F., et al. : Effect of an inhaled corticosteroid on airway inflammation and symptoms in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**, 669-674, 1992.
- 30) Lundgren, R., Soderberg, M., Horstedt, P. and Stenling, R. : Morphological studies of bronchial biopsies from asthmatics before and after ten years of treatment with inhaled steroid. *Eur. Respir. J.* **1**, 883-889, 1988.

COMPARISON BETWEEN REPEATED ANTIGEN AND ACETYLCHOLINE-INDUCED
BRONCHOCONSTRICTION IN DEVELOPMENT OF AIRWAY WALL THICKNESS
IN A CHRONIC GUINEA PIG MODEL OF ASTHMA

Yasuhiro Nakano, Masao Toda, Minoru Yoshida and Hironori Sagara

Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine

Asthma is associated with a chronic remodeling of the airways, but it remains to be elucidated whether repeated bronchoconstriction (BC) influences any structural attributes of the lungs. To investigate the role of repeated BC on the morphology of the airways, we chronically exposed guinea pigs to an aerosol of acetylcholine (ACH) over a period of 6 months. The guinea pigs were challenged with either ACH or saline daily for 10 days and thereafter were challenged once a week. To compare repeated BC with a chronic model of allergic inflammation, an additional group of animals were sensitized to aerosolized ovalbumin (OA) and subsequently exposed with OA. The airway wall area and basement membrane (BM) thickness were measured by standard morphometric techniques. Both airway wall area and BM thickness were significantly increased in OA exposed guinea pigs compared with both saline control and AHC-exposed guinea pigs.

Our results suggest that persistent bronchoconstriction and/or allergic airway inflammation in asthmatics may contribute to the thickness of the airway wall observed in this disorder. However, repeated acute bronchoconstriction events may not contribute to the increase in the airway wall or BM thickness.
