

肺胞マクロファージの炎症反応に及ぼすニコチンの影響

平 林 玲 子* 西 田 昌 司**

The Effect of Nicotine on Inflammatory Response of Alveolar Macrophages

HIRABAYASHI Reiko* NISHIDA Masashi**

Abstract

Cigarette smoke contains more than 4,000 chemical substances and causes deleterious effects on various human organs. As the lung is the first organ that is exposed to these substances, cigarette smoking induces respiratory diseases such as inflammation, remodeling and cancer in high incidence. We examined whether nicotine, one of the major bioactive substances in cigarette smoke, disrupts lung immune function against respiratory diseases. We tested the effect of nicotine on antimicrobial activity of alveolar macrophages (AMs) by evaluating nitric oxide (NO) production and phagocytosis. NO production was assessed by measuring $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ concentration using Griess reagent method and phagocytosis was evaluated by the intake of fluoroprobe-labeled latex beads. Rat AM harvested by bronchoalveolar lavage (BAL) and mouse AM cell line (AMJ2-C11) were treated with 0–500 μM of nicotine for 24h. Nicotine in high concentration (250, 500 μM) enhanced phagocytosis of latex beads in both AMs significantly. In addition, the high concentration of nicotine (over 100 μM) increased NO production by AMs. These results suggest that nicotine enhances inflammatory function of AMs in high concentration. The over activation of inflammatory response by nicotine may contribute to the induction of respiratory injury by cigarette smoking.

キーワード: ニコチン、肺胞マクロファージ、貪食能、喫煙、一酸化窒素

Key words: nicotine, alveolar macrophages, phagocytosis, smoking, nitric oxide

*本学人間科学研究科博士前期課程修了生

**本学人間科学部環境・バイオサイエンス学科教授

連絡先: 西田昌司 〒662-8505 西宮市岡田山4-1 神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科
mnishida@mail.kobe-c.ac.jp

1. 背景

喫煙は悪性腫瘍、虚血性心疾患、慢性呼吸器疾患など、全身の諸臓器に障害をもたらすことが解明されてきている。とりわけ肺・気管支肺胞系は喫煙による刺激に直接曝露されるため、喫煙は呼吸器感染症や近年、特に多発している肺気腫、慢性気管支炎、肺癌の発症において重要な役割を果たしていると考えられている。

肺は、いくつかの防御メカニズムの活性によって外因性の刺激や感染症の原因となる病原微生物、あるいは粒子などの病原体から保護されている。これらの外的因子に対する肺の防御メカニズムにおいて最も重要な役割を果たしているのが、肺胞内に常在する炎症細胞、肺胞マクロファージである。肺胞マクロファージは肺胞腔の肺胞被覆層と呼ばれる液相に存在している細胞で、多様な機能を発揮して肺の恒常性・無菌性を維持している^[1]。特に肺胞マクロファージ特有の有害な病原体を細胞内に摂取する貪食作用と貪食した異物を分解する殺菌作用の2種類の抗菌作用によって、肺の無菌性は維持されている。例えば、気道から侵入してくるガス、粉塵、ウイルス・細菌・真菌などの病原微生物が異物として肺胞マクロファージを刺激すると、マクロファージ内では一酸化窒素（NO）合成を誘導する酵素、iNOSの発現が活性化される。iNOSは細胞内でL-アルギニンを基質としてNOを合成する酵素で、細胞外に分泌されたNOは異物を分解し、消去する働きを持つ。貪食作用によって活性化されたマクロファージは異物を分解するために、NOの他にも活性酸素種を産生するなど、種々の経気道的吸入物質の第一線の処理細胞として機能している。さらに肺胞マクロファージは肺の免疫応答の重要なエフェクター細胞であり、経気道的吸入物質の他、肺胞腔や血液中に含まれる免疫グロブリン、免疫複合体などの刺激を受けて免疫応答を調節するサイトカインなど炎症促進性の仲介物質を産生・分泌し、肺への他の炎症細胞動員や局所における炎症反応を促進させるシグナル伝達機能を持つ^[2~3]。従って、肺胞マクロファージの炎症作用が異常に低下すると、肺炎など感染症に対する抵抗力が低下する原因となる^[4~7]。一方、これら肺胞マクロファージの生体防御能が過剰になると、異物のみならず肺細胞自身にも障害を引き起こし、肺気腫や気管支炎の原因となったり肺癌を誘発するリスクが高まる原因ともなっている。

一般的に喫煙は肺の防御機構を阻害し、免疫能を弱めるといわれている。In vitroにおいて、タバコ煙によって肺胞マクロファージの細菌貪食能や殺菌能が低下^[8]し、また、喫煙者では非喫煙者の細胞に比べて貪食活性レベルが低下しているとの報告^[9~10]があることから、タバコ煙は肺胞マクロファージの機能を障害すると考えられている。一方、in vivoにおいて、タバコ煙を曝露したヒト肺胞マクロファージでは貪食作用に影響がなかったとの報告や貪食能を亢進させたとの報告もあり、現在までの肺胞マクロファージを使ったタバコ煙による実験では貪食機能に関しては一定の知見が得られていない^[11~15]。

このようなタバコ煙による肺の免疫機能の低下の原因として、ニコチンが関与している可能性が報告がされている。ニコチンはタバコで合成される小型有機植物塩基として第三級のコリ

ンアルカロイドに分類され、タバコ煙の主要構成成分の中で薬理的に最も活性のあるものの一つである。ニコチンは中枢神経や末梢神経に主として発見されたニコチン性アセチルコリン (ACh) 受容体 (nAChR) の作用薬として働くことが明らかとなった。そのためニコチンに関する研究は、今までは自律神経系などの末梢神経や中枢神経系における作用の解明が進んでおり、タバコの依存性の原因となることが明らかになっている^[16-17]。しかし最近では、免疫細胞を含む全身の多くの組織細胞においても nAChR が発見され、タバコ煙の免疫応答に対する影響にニコチンが大きく関与している可能性が注目されている。さらにニコチン処理によって、LPS などの菌体成分で刺激した肺胞マクロファージでは、炎症促進物質であるサイトカイン、インターロイキン-6 (IL-6) や IL-12、TNF- α の産生が有意に阻害されたとの報告や、ニコチン受容体を介してのサイトカイン産生の選択的阻害も示されている。このようにニコチンが免疫調節性物質であることが最近の研究で明らかになっている^[18]が、ニコチンの肺胞マクロファージの抗菌活性に及ぼす影響は、未だ十分には明らかになっていない。

2. 目的

タバコ煙が呼吸器疾患を引き起こすメカニズムには、肺の防御システムである肺胞マクロファージの炎症作用が大きく関与していると考えられる。特に、タバコ煙の主要な構成成分であるニコチンが免疫調節性物質として肺胞マクロファージの炎症作用を促進あるいは低下させる可能性が重要である。従って、本研究では肺胞マクロファージの炎症反応におけるニコチンの影響を細胞・分子生物学的側面から検討することを目的とし、ラットから単離した細胞と肺胞マクロファージ細胞株の2種類を用い、ニコチンが炎症作用である肺胞マクロファージの貪食能、および活性化マクロファージの NO 産生能に及ぼす急性効果を検討した。

3. 方法

(1) 動物

実験には、8-10週齢、250-300g の Wister 系雄性ラット (日本動物社) を用い、12時間周期で昼夜を調節した環境で通常飼料と水は自由に摂取できるよう飼育した。

(2) 肺胞マクロファージの単離・培養

肺胞マクロファージはラットから気管支肺胞洗浄 (BAL) 法により単離した。

0.1%のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (関東化学/14097-00) を含む冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)) 10ml を入れた注射器を気管に挿入したカテーテルに接続し、PBS を静かに肺に注入した。胸部を軽くマッサージしてから注入した PBS を静かに吸引して回収した後、注射器を外して50ml 用遠心チューブ (ファルコン/35-2196) に洗浄液を回収する。この作業を10回繰り返すことにより肺胞内の細胞を回収した。回収した細胞は4℃で遠心 (3,000rpm、5分) をかけて分離した後、10%ウシ胎児血清 (FBS) (MP, Biomedical) および抗生物質 (Penicilin 100units/ml, Streptomycin 100 μ g/ml (インビトロジェン)) を含むフェノールレッド含 RPMI1640培地 (Sigma/R8758) を用いて、各実験時の細胞密度になるようにそれぞれ調整

した。単離した細胞は37℃、5%CO₂下で培養した。

(3) マクロファージの同定

雄性ラットから気管支肺胞洗浄法によって回収された細胞がマクロファージであることを確認するため、マクロファージが特異的にアセチル化 LDL 受容体を持つことを利用し、蛍光物質である1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indo-carbocyanine perchlorate で標識したアセチル化 LDL (Dil-Ac-LDL: BTI—和光純薬/L-3484) を取り込ませ、蛍光顕微鏡で観察することで同定を行った。回収した細胞液に Dil-Ac-LDL (10μg/ml) を添加して30分~1時間、37℃、5%CO₂インキュベーター内で反応させた後、蛍光顕微鏡を用いて波長514nm で励起し、発光波長550nm での蛍光を観察した。同一視野で観察した可視光像と蛍光像を撮影して比較し、マクロファージの純度を求めた。

(4) 肺胞マクロファージ細胞株の培養

肺胞マクロファージ細胞株は、マウス由来の AMJ2-C11 (American Type Culture Collection: ATCC 社) を使用した。AMJ2-C11は5%FBS および抗生物質 (Penicilin 100units/ml, Streptomycin 100μg/ml) を含むフェノールレッド含 DMEM 培地 (Dulbecco's modified Eagle medium: Sigma D6046) を用いて非接着細胞用100mm dish (山中化学) に播種し、37℃、5%CO₂インキュベーター内で培養した。

(5) ニコチン添加

それぞれの細胞を5×10⁵個/ml 調整し、播種後3時間目に細胞が接着したのを確認してからニコチンを濃度0-500μM (最終濃度) で添加し、24時間、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養した細胞を実験に用いた。

(6) 貪食能の検討

ニコチンが肺胞マクロファージの貪食能に及ぼす影響の検討には、蛍光物質である Polychromatic (PC Red) で標識した latex beads (Polysciences) の細胞内取り込みを指標とし、フローサイトメトリー (FCM) を用いて定量した。蛍光標識付 latex beads を50μl/well 添加し、2時間 CO₂インキュベーター内で反応させてから、フローサイトメーター (FACSCalibur™: Becton Dickinson) を用いて488nm の励起光による544nm の発光を観察した。データは Cellquest™ version 5.2 (Becton Dickinson) を用い、細胞10⁴個当たりの latex beads 貪食細胞数と、貪食細胞当たりの平均蛍光強度を測定し、latex beads の細胞内貪食量を解析した。

(7) 活性化肺胞マクロファージの NO 産生能の検討

ニコチンが肺胞マクロファージの NO 産生能に及ぼす影響の検討には、細胞外亜硝酸イオン濃度を指標として用いた。

①活性化肺胞マクロファージのモデル作成

肺胞マクロファージの活性化には、大腸菌の菌体成分であるリポ多糖分子 lipopolysaccharide (LPS) (SIGMA) を用いた。マクロファージを播種して3時間後、5% FBS 及び抗生物質 (Penicilin, Streptomycin) を含む IMEM 培地に交換してニコチンを添加したのと同時に、LPS (10 μ l/ml) を10 μ l/well 添加した。

②NO測定

NO は水中では酸化されやすく、マクロファージで産生されて細胞外に分泌された NO は、最終的に亜硝酸イオン (NO₂⁻) や (NO₃⁻) に代謝される。そのため代謝産物である NO₂⁻ や NO₃⁻ を定量することによって活性化肺胞マクロファージの細胞外 NO 産生量の指標とした。培養液中の NO₂⁻ / NO₃⁻ 生成濃度は Griess 試薬法を用いて測定した。ニコチンで24時間刺激した LPS 活性化肺胞マクロファージの培養上清を回収し、NO アッセイキット / Griess 試薬法 (Cayman) を用いて培養液中の NO₂⁻ / NO₃⁻ 生成濃度を測定した。標準検体として亜硝酸ナトリウムを用いた。まず、サンプル中の NO₃⁻ を NO₂⁻ に還元し、NO₂⁻ と Griess 試薬 (Sulphanilamide/N-(1-Naphthyl) ethylenediamine) を10分間反応させ、両者のカップリングより生成されたアゾ化合物の吸光度 (540nm) をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定した。標準検体より NO₂⁻ / NO₃⁻ 濃度の検量線を作成し、希釈倍率 (100/40) を掛けて培養液中の NO₂⁻ / NO₃⁻ 濃度を求めた。

(8) 統計処理

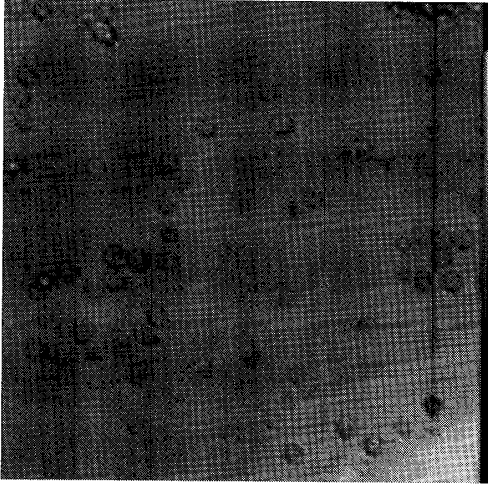
得られた結果は、統計ソフト JMP (SAS) を用いて解析した。ANOVA 検定を行った後に Tukey の HSD 検定を行い、p 値が0.05未満の場合に有意差有りと判定した。

4. 結果

(1) 肺胞マクロファージの単離・同定

雄性ラットから気管支肺胞洗浄 (BAL) 法により、1匹当たり 6 ~ 7 \times 10⁶ 個の細胞が回収された。蛍光物質 Dil で標識したアセチル化 LDL、Dil-Ac-LDL を用い、細胞による Dil-Ac-LDL の取り込みを観察することでマクロファージの同定を行った。同一視野で観察した可視光像 (図 1 (A)) と蛍光像 (図 1 (B)) を撮影して比較したところ、ほとんどの細胞が蛍光を発しているのが観察でき、細胞が Dil-Ac-LDL を取り込んでいるのが確認された。このことから、雄性ラットから BAL 法により回収した細胞は肺胞マクロファージであることが確認でき、純度は90%以上だった。

(A) 単離マクロファージの同定 (可視光像)



(B) 単離マクロファージの同定 (蛍光像)

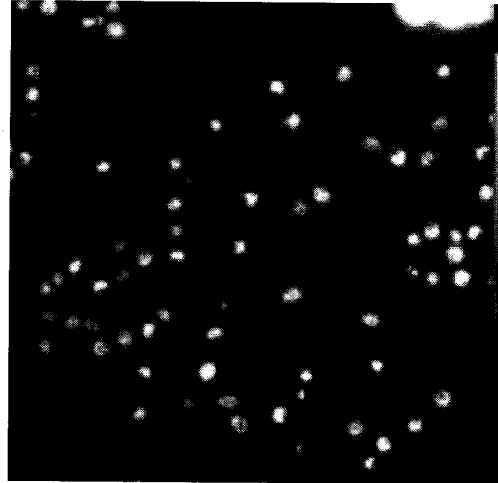


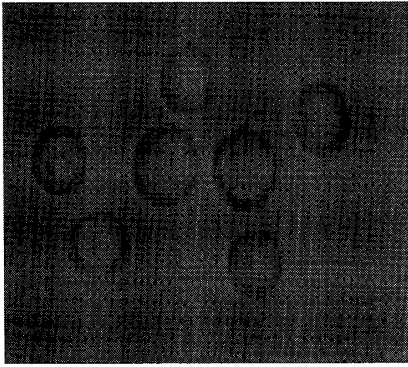
図1. 雄性ラットより気管支肺胞洗浄法によって単離した肺胞マクロファージの同定 (×200)

(2) 肺胞マクロファージの貪食能に及ぼすニコチンの影響

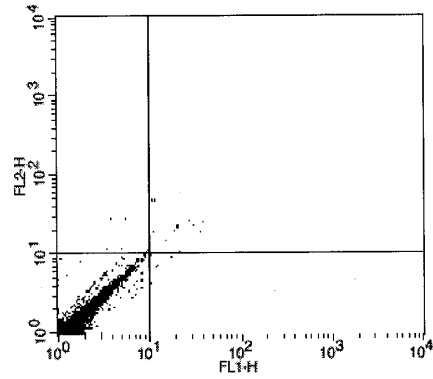
単離肺胞マクロファージ、肺胞マクロファージ細胞株 AMJ2-C11に蛍光物質 Pc Red で標識した latex beads を添加し、細胞内への beads 取り込みを指標としてニコチンが肺胞マクロファージの貪食能に及ぼす影響を検討した。図2 (C) は、肺胞マクロファージに latex beads を添加した後、2時間後に位相差顕微鏡で観察した結果である。図2 (C)に示すように、beads を添加すると、細胞内に beads を取り込んだマクロファージが確認できた。この画像を目視で解析して貪食能の定量を試みたがデータの誤差が大きいため、FACS を用いて解析を行った。

Beads を取り込んだ細胞は488nm 付近の励起波長で544nm 付近に蛍光波長のピークを持つため、FL-2フィルターを用いたFACSにより検出できる。従って、まず latex beads を取り込ませていない細胞集団 (図2 (A)) をFACSにかけ、蛍光強度を表すFL-1/FL-2二次元展開画面である Dot plot において蛍光検出フィルターFL-1/FL-2ともに蛍光強度が 10^1 以下になるように設定し、これをネガティブコントロールとした (図2 (B))。次に、その設定内で latex beads を取り込ませた細胞集団 (図2 (C)) をFACSにかけた。図2 (D) に示すように、FL-1/FL-2の Dot plot において、コントロールの設定範囲外である 10^1 以上に現れた細胞集団は蛍光 beads を取り込んで蛍光を発している集団と確認できる。さらに、個々の細胞の示す蛍光強度をFL-2の単一ヒストグラムで示した (図2 (E))。縦軸は細胞数を示し、横軸はFL2の蛍光強度を示す。棒線より左側 (10^1 未満) は蛍光 beads を取り込んでいない細胞、右側 (10^1 以上) は取り込んだ細胞で、beads の取り込みによりピークが分離している。このヒストグラムより 10^1 以上に現れた beads を取り込んだ細胞集団を解析してMΦの細胞10,000個あたりの貪食細胞数を計測した。さらに全体の蛍光強度を貪食細胞数で割った平均蛍光強度を求めることで細胞1個あたりの取り込んだ平均の beads 量を測定した。

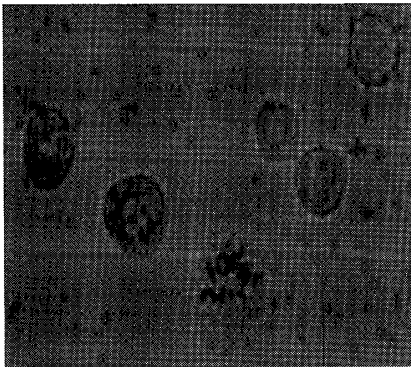
(A) latex beads を取り込ませていない細胞集団



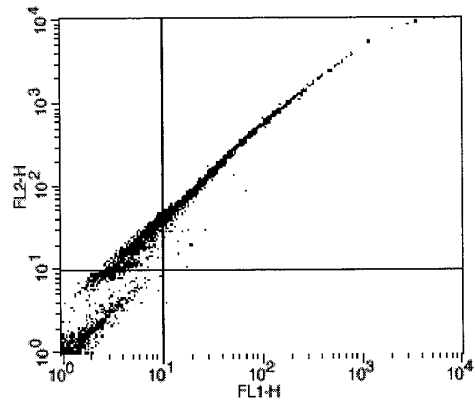
(B) 非貪食細胞の Dot Plot (コントロール)



(C) latex beads を添加し、細胞内に取り込ませた細胞集団



(D) 貪食細胞の Dot Plot



(E) latex beads 貪食細胞の蛍光強度ヒストグラム (ニコチン無) / (ニコチン有)

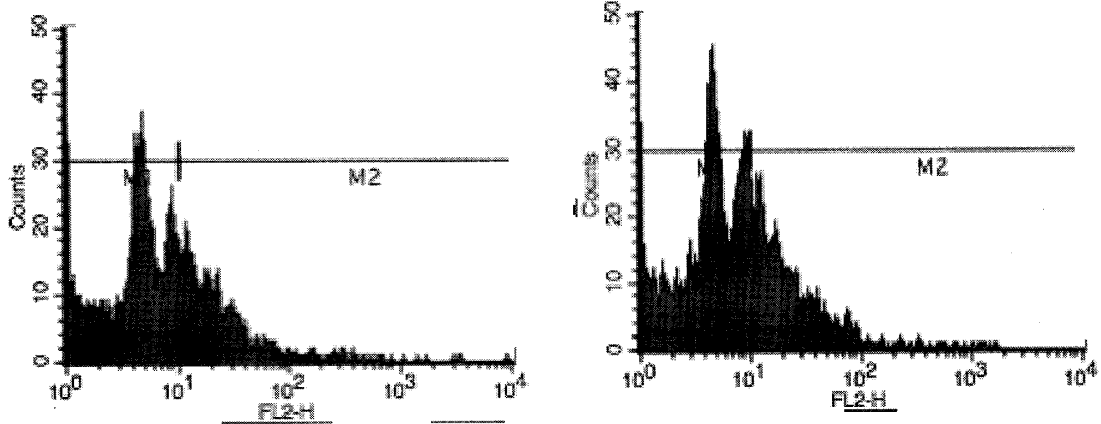


図2. FACS を用いた肺胞マクロファージにおける蛍光標識付 latex beads 貪食の解析

(2)-1. latex beads 貪食細胞数に及ぼすニコチンの影響

播種後3時間目にニコチン (50-500 μ M) を添加し、24時間刺激した細胞に Polychromatic latex beads (原液5倍希釈) を添加した。2時間後に FCM を用いて latex beads 総貪食細胞数を測定した。表1 (A) は M Φ 10,000個あたりの latex beads 貪食細胞数に及ぼすニコチンの影響の結果を示したものである。両細胞のニコチン濃度0 μ M の総貪食細胞数に対する%を表している。ニコチン濃度0 μ M をコントロール群として、ニコチン50-500 μ M の細胞群との総貪食細胞数を比較したが、上段に示す単離肺胞マクロファージ、下段に示す肺胞マクロファージ

細胞株 AMJ2-C11 とともにコントロール群 $0\mu\text{M}$ とニコチン刺激した細胞群との間に有意な差は見られず、またニコチン濃度間でも有意な差は認められなかった。

(2)-2. マクロファージの貪食能に及ぼすニコチンの影響

次に、FL-2 単一ヒストグラムで設定した 10^4 以上の細胞集団における細胞 10^4 個当たりの FL-2 の平均蛍光強度を求めた。平均蛍光強度値は細胞 1 個当たりにおける latex beads の取り込み量を反映している。ニコチン濃度 $0\mu\text{M}$ の貪食細胞における平均蛍光強度に対する % を表 1 (B) に示す。両細胞ともに 50 から $100\mu\text{M}$ のニコチン添加により蛍光強度が増加し、上段に示す単離肺泡マクロファージでは $250\mu\text{M}$ 、下段に示す肺泡マクロファージ細胞株 AMJ2-C11 では $250\mu\text{M} \cdot 500\mu\text{M}$ で、ニコチン刺激をしなかった群との間に有意な差が認められた。

(A) latex beads 総貪食細胞数に及ぼすニコチンの影響 (貪食細胞 vs. $0\mu\text{M}$)

ニコチン濃度 (μM)	0	50	100	250	500
単離肺泡マクロファージ	100	103	107	102	99
AMJ2-C11	100	105	109	104	107

(B) マクロファージの貪食能に及ぼすニコチンの影響 (貪食細胞 vs. $0\mu\text{M}$)

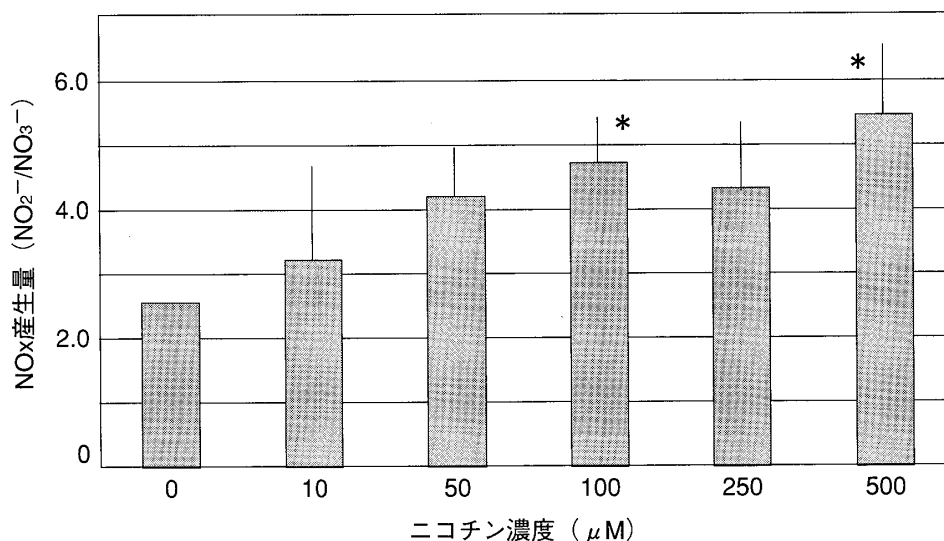
ニコチン濃度 (μM)	0	50	100	250	500
単離肺泡マクロファージ	100	104	109	106*	105
AMJ2-C11	100	98	116	121*	112*

* : $p < 0.05$ vs. ニコチン $0\mu\text{M}$

表 1. 肺泡マクロファージの貪食能に及ぼすニコチンの影響

(3) NO 産生能の検討

ニコチンが活性化肺泡マクロファージに及ぼす影響を、肺泡マクロファージ細胞株 AMJ2-C11 の NO 産生量を測定することで検討した。NO 産生量は細胞培養液中の $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ 生成濃度を指標として測定した。細胞を播種して 3 時間後にニコチン ($10\text{--}500\mu\text{M}$) および LPS ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した。24 時間後に Griess 試薬を用いて培養液中の $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ 生成濃度を測定し、NO 産生量の指標とした。ニコチンは投与量依存的に活性化マクロファージの NO 産生量を増加させ、ニコチン濃度 $0\mu\text{M}$ の細胞群と比較すると、 $100\mu\text{M}$ 以上のニコチンは、有意に NO 産生を増加させた。



横軸はニコチン濃度、縦軸は培養液中の NOx 濃度

* : $p < 0.05$ vs. ニコチン $0 \mu\text{M}$

図3. 24時間ニコチン刺激が LPS 刺激で活性化した肺胞マクロファージ cell line AMJ2-C11の NO 産生分泌に及ぼす影響

5. 考察

喫煙は慢性閉塞性肺疾患や肺炎を含む呼吸器疾患のもっとも強い危険因子である。タバコ煙物質の肺への直接的な傷害がその原因の一つであるが、一方で喫煙によって呼吸器系の免疫機能が低下していることも重要な要因の一つである。そこで、肺の免疫応答を担う炎症細胞である肺胞マクロファージを用いて、最近、喫煙による免疫能の低下への関与が注目されているタバコ煙の主要構成成分の一つであるニコチンが炎症反応に及ぼす影響を、マクロファージの貪食能と炎症仲介物質の産生に着目し、24時間ニコチン刺激の急性効果として検討した。細胞にはラットより単離した肺胞マクロファージと肺胞マクロファージ細胞株 AMJ2-C11の2種類を用いた。高濃度のニコチンは肺胞マクロファージの貪食作用を活性化して貪食能を亢進することが示された。また活性化肺胞マクロファージによる炎症・免疫反応と関連の深い生理活性因子である一酸化窒素 (NO) の産生においても、ニコチンは NO 産生を増強した。

(1) マクロファージの貪食能に及ぼすニコチンの影響

蛍光標識 latex beads を肺胞マクロファージに取り込ませ、FCM を用いて総貪食細胞数と、総蛍光強度を総貪食細胞数で割った平均蛍光強度 (マクロファージ 1 個あたりの貪食能) を検討した。総貪食細胞数においては、単離細胞と培養細胞ともに24時間ニコチン刺激による影響はみられなかった。しかし、マクロファージ 1 個あたりの貪食量では、両細胞共に濃度 $50 \sim 100 \mu\text{M}$ におけるニコチン刺激で beads 取り込み量が増加し、単離細胞では $250 \mu\text{M}$ 、培養細胞では $250 \mu\text{M}$ 、 $500 \mu\text{M}$ の高濃度でニコチン刺激なしとの間で有意な差が認められた。このことから、24時間ニコチン刺激は肺胞マクロファージの貪食細胞数に影響は及ぼさないが、マクロファージの貪食作用を活性化して取り込み量を増加させる効果があると考えられる。

可溶性物質や粒子などの微細な物質の取り込みは飲作用 (pinocytosis)、細菌などの生物あるいは顕微鏡的な物質の取り込みは食作用 (phagocytosis) と言い、これら異物を取り込む作用を合わせて貪食作用 (endocytosis) と言う。マクロファージによる細菌や粒子の除去効果は、粒子の大きさや負荷や貪食細胞であるマクロファージの運動性、貪食能力など、いくつかの要因に依存している^[19~21]。Latex beads は0.1~1.0 μm の粒子のため、マクロパイノサイトーシスと呼ばれる飲作用によって細胞内に取り込まれると考えられるが、本研究では主にマクロファージのマクロパイノサイトーシス、飲作用を貪食能と定義している。マクロパイノサイトーシスによる取り込みはおおむね受動的に行われる取り込みで、細胞の存在する環境内の物質の濃度や細胞膜の活動状態によって左右される。マクロファージでは白血球などの他の細胞に比べて、飲作用が特に旺盛で、食作用と共にマクロファージの特性とみなされている。滝嶋らの *in vivo* での肺胞マクロファージの細胞運動能とビーズ貪食能に及ぼす喫煙の影響を検討した報告によると、喫煙の影響は5本/5分までは用量依存的に肺胞マクロファージの細胞運動能およびビーズ貪食能を亢進 (コントロールの50%増) させるが、それ以上の刺激ではコントロール値に戻るという二相性のパターンが示されている^[22~23]。これらは、喫煙量が多くなると、アクロラインなどタバコから出る細胞毒性物質が細胞運動能を抑制するためと考えられた。タバコ煙中の主成分であるニコチンは細胞運動能には明らかな影響を及ぼさなかったとされている。

今回の実験では高濃度のニコチン刺激ほど肺胞マクロファージの貪食能を亢進するということが示された。ニコチンはマクロファージの遊走や走化性の増加などの細胞運動能には影響を及ぼさないが、マクロファージの吸着・取り込み機構など細胞膜における beads 取り込み作用に影響し、マクロファージの貪食能が活性化された可能性が考えられる。

(2) 肺胞マクロファージの NO 産生能に及ぼすニコチンの影響

(2)-1. マクロファージの NO 産生メカニズム

肺は好氣的環境下にあり、マクロファージから産生された O_2^- 、 $\text{OH}\cdot$ 、 H_2O_2 などの活性酸素種は肺障害の直接的エフェクター分子として知られているが、最近では窒素ラジカル、とくにパーオキシナイトライト (ONOO^-) が間質性肺炎などの肺障害に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、ヒトの急性肺障害においても ONOO^- の関与が Kooy らより初めて示された^[24~25]。一酸化窒素 (NO) は生物学的応答における重要な活性分子の一つであり、高反応性の多彩な機能を示す低分子のメディエーターである。異なる体組織に広範囲に発現する NADPH および L-アルギニン依存性酵素である NO 合成酵素 (NOS) によって産生される。NO 合成酵素には恒常的に発現しているものと誘導性のもの (iNOS) がある。哺乳類の内皮細胞や神経細胞の NO 合成と対比すると、肺胞マクロファージの NO 合成は誘導性であり、異物である細菌や病原性微生物の刺激によって活性化されると iNOS mRNA の発現増加、iNOS タンパク質の誘導に伴って比較的多量の NO を産生する。マクロファージにより産生される NO は炎症反応や組織傷害に関与する。 O_2^- や H_2O_2 などの活性酸素中間体の局所産生が起こり、 O_2^- は NO と急激に反応し、比較的長期間持続性のある細胞傷害性酸化物のパーオキシナイトライト

を作る。パーオキシナイトライトは脂質過酸化を起こすことも示唆されている。NOは血管や気道平滑筋の弛緩を引き起こすことが知られているが、NOやパーオキシナイトライトのようなNOから生成される二次的過酸化物は、組織に存在する過酸化物のレベル、あるいは反応性酵素の中間体により担われる組織傷害の程度に依存して細胞傷害性になることが考えられる。NOの過剰産生はマクロファージ誘導性細胞傷害活性や細胞増生の調節にも関与し、組織傷害のみならず傷害治癒にも関与する^[26-28]。

(2)-2. 活性化肺胞マクロファージのNO産生能に及ぼすニコチンの影響

本研究では、異物により活性化された肺胞マクロファージのNO産生能に及ぼすニコチンの影響をみるために、グラム陰性細菌の菌体成分であるLPSで肺胞マクロファージを刺激し、これを活性化肺胞マクロファージのモデルとした。次に活性化肺胞マクロファージに直接ニコチンを添加し、ニコチン入り培地で24時間培養したときの肺胞マクロファージのNO産生量に及ぼす影響を、培養液中のNO₂⁻/NO₃⁻生成濃度測定することによって検討した。測定にはGriess試薬法を用いた。

24時間ニコチン刺激は、投与量依存的に活性化肺胞マクロファージのNO産生レベルを増加させ、ニコチン濃度100μM以上ではニコチン刺激しない場合と比較して有意にNO産生を増加させた。このことから、ニコチンはLPS誘導型活性化肺胞マクロファージのNO産生レベルを亢進することが示された。どの段階でニコチンがLPS誘導型活性化肺胞マクロファージのNO産生レベルの亢進に関与しているのかはまだ明らかではないが、肺胞マクロファージのNOは誘導型のNO合成酵素(iNOS)によって合成されることから、遺伝子レベルでiNOSの発現に影響を及ぼしてNO産生を増強している可能性が考えられる。マクロファージは炎症仲介物質である生理活性物質の他にも様々な炎症促進物質を産生・分泌している。例えばTNF-αやIL-6、IL-12などのサイトカインが代表的である。ニコチンは、これらのサイトカインを、mRNA発現を減少させることで選択的に阻害するという報告があり、タバコ煙によるマクロファージの免疫能低下にニコチンが免疫調節性物質として関与しているということも示されている^[8]。さらに今回の実験からは、ニコチンがサイトカイン産生の抑制により免疫機能を低下させるだけでなく、肺胞マクロファージのNO産生能やその他の外的刺激系の活性酸素種など生理活性物質の産生を促進し、炎症性仲介物質の過剰産生が肺細胞の傷害および呼吸器系の免疫能を破壊して感染症に対する抵抗力を低下させている可能性が考えられる。

(3) ニコチンの添加濃度の妥当性

今回実験で使用したニコチン濃度は喫煙時の血中濃度に比べかなり高い。喫煙時のニコチン最高血中濃度は4nM~10nMとされる。この血中濃度は喫煙のパターン、たとえば深く吸い込むか、浅くとどめるかで個体差が大きい。一般に、常習喫煙者では自分に至適なニコチンの血中濃度に保つ喫煙パターンが見られるといわれる。ニコチン依存者の血中ニコチン濃度は、起床時には低くなっているが、朝の初回の喫煙によって急激に上昇する。ニコチンは体内に拡散し、主に肝臓で代謝され腎臓から排出されるので、血中ニコチン濃度は続いて速やかに下降

する。いずれにしても喫煙によるニコチンの血中濃度は従来、動物実験で薬理作用を検討するために用いられてきた濃度よりかなり低い。たとえば、モルモット、ウサギ、ネコおよびサルにおいて明らかに陽性を示すニコチンの濃度は $5\mu\text{M}$ ~ $50\mu\text{M}$ 程度であるといわれている。しかし、肺胞マクロファージでのニコチン刺激は血中内での作用ではなく、直接肺胞内に到達した煙中に含まれるニコチン、つまり血中よりかなり高濃度のニコチンが影響を及ぼすと思われる。1本のタバコには $5\sim 15\text{mg}$ 程度のニコチンが含まれているが、喫煙によって体内に吸収されるのはその20%程度である。致死量からははるかに少ない量だが、強力な刺激作用を示す。タバコ煙中に存在するニコチン量は約 1mg ($0.8\sim 1.9\text{mg}$)で、喫煙による肺より速やかに吸収され、静脈内投与したときとほとんど変わらない。吸収されたニコチンは8秒以内に脳に到達するとされている。今回の実験で、肺胞マクロファージの炎症反応におけるニコチン刺激の影響で有意な差が認められたのはいずれも $100\sim 500\mu\text{M}$ の高濃度においてであるが、今後 nM あるいは mM 単位の濃度においても検討することが重要であると考えられる。

参考文献

- [1] Sandra Suarez, Masha Kazantseva, Meenakshi Bhat, Daniel Costa, Anthony j. Hickey. 2001. The influence of suspension nebulization or instillation on particle uptake by guinea pig alveolar macrophages. *Inhalation Toxicology*, 13: 773-788.
- [2] Sylvia Craig, Asfonso Lopez, David Hoskin, and Fred Markhan. 2005. Meconium inhibits phagocytosis and stimulates respiratory burst in alveolar macrophages. *International Pediatric Research Foundation, Inc.* Vol. 57, No. 6813-818
- [3] Green GM, Jakab G, Low RB, Davis GS. 1977 Defense mechanisms of the respiratory membrane. *Am. Rev. Respir. Dis.* Mar; 115(3): 479-514.
- [4] Fels, A. O. S., and Z. A. Cohn. 1986. The alveolar macrophage. *J. Appl. Physiol.* 60: 353-369.
- [5] Nathan, C. F. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326.
- [6] Ricevuti G. 1997. Host tissue damage by phagocytes. *Ann. NY. Acad. Sci.* 832: 426-448.
- [7] Ward PA. 1997. Phagocytes and the lung. *Ann. NY. Acad. Sci.* 832: 304-310.
- [8] Gareth M. Green, M. d., and Diana Carolin, B. Sc. 1967. The depressant effect of cigarette smoke on the in vitro antibacterial activity of alveolar macrophages. *N. Engl. J. Med.* Vol. 276, Num. 8, February 23.
- [9] Johan Thyberg and Jan Nilsson. 1982. Effects of nicotine on endocytosis and intracellular degradation of horseradish peroxidase in cultivated mouse peritoneal macrophages. *Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica.* Sect. A. 90: 305-310.
- [10] Laurenzi. G. A., Guarneri, J. J., Endriga, R. B., and Carey, J. P. 1963. Clearance of bacteria by lower respiratory tract. *Science* 142: 1572.
- [11] Henry Yeager, Jr., Steven M. Zimmet, and Sorell L. Schwartz. 1974. Pinocytosis by Human Alveolar Macrophages Comparison of Smokers and Nonsmokers. *J. Clin. Invest.* Volume 54 August. 247-251.
- [12] Harris, J. O., E.W. Sweson, and J. E. Johnson, III. 1970. Human alveolar macrophages. Comparison of phagocytic ability, glucose utilization, and ultrastructure in smokers and nonsmokers. *J. Clin. Invest.* 49: 2086-2096.
- [13] Bosken., C. H., J. Hards, K. Gatter, and J. C. Hogg. 1992. Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145: 911.
- [14] David B. Drath, Annabel Harper, JaneGharibian, Manfred L. Karnovsky and Gary L. Huber. 1978. The

- effect of tobacco smoke on the metabolism and function of rat alveolar macrophages. *Journal Cell. Physiol.* 95: 105-114.
- [15] Fisher GL., Mvneill KL., Finch GL., et al. 1982. Functional evaluation of lung macrophages from cigarette smokers and nonsmokers. *J. Reticuloendothel.* 32: 311-321.
- [16] Hiemke, C., M. Stolp, S. Reuss, A. Wevers, S. Reinhardt, and H. Schorder. 1996. Expression of α subunit genes of nicotinic acetylcholine receptors in human lymphocytes. *Neurosci. Lett.* 214: 171.
- [17] Drescher, D. G., K. M. Khan, G. E. Green, B. J. Morley, and R. L. Barretto. 1995. Analysis of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the cocnlea of the mouse. *Comp. Biochem. Physiol.* 112: 267.
- [18] Kazuto Matsunaga, Thomas W. Klein, Herman Friedman, and Yoshimasa Yamamoto. 2001. Involvement of nicotine acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to legeionella pneumophila infection by nicotine. *The Journal of Immunology.* 167: 6518-6524.
- [19] Gaiser, M., Baumann, M., Cruz-Orive, L., Im-Hof, V., and Waber, U. 1994. The effect of particle airways of hamsters. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 10(6): 594-603.
- [20] Oberdörster, G., Ferin, J., and Morrow, P. 1992. Volumetric loadin of alveolar macrophages (AM) : A possible basis for diminished AM-mediated particle clearance. *Exp. Lung Res.* 18(1): 87-104.
- [21] Snipes, M., Olson, T., and Yeh, H. 1998. Deposition and retention patterns of 3-, 9-, and 15-micron latex microspheres inhaled by rats and gunea pigs. *Exp. Lung. Res.* 14(1): 37-50.
- [22] 滝島 任、山谷陸雄、座安 清ほか 喫煙の粘液輸送機構に関する基礎的・臨床的研究—肺胞マクロファージに対するニコチンとアクロラインの影響— 昭和63年度喫煙科学研究財団研究年報：372-375.
- [23] 滝島 任、山谷陸雄、座安 清ほか 喫煙の粘液輸送機構に関する基礎的・臨床的研究—肺胞マクロファージ貪食能に及ぼす影響— 平成元年度喫煙科学研究財団研究年報：301-304.
- [24] Suga M, Okamoto T, Ando M. 1998. Nitric oxide and interstitial pneumonia. *Curr Opin Pilm Med.* 4: 251-255.
- [25] Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. 1995. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit Care. Med.* 151: 1250-1254.
- [26] Nathan C. 1997. Inducible nitric oxide synthase: What difference does it make? *J. Clin. Invest.* 100: 2417-2423.
- [27] Dugas B, Debere P, Moncada S. 1995. Nitric oxide, a vital poison inside the immune and inflammatory network. *Res. Immunol.* 146: 664-670.
- [28] Bredt D. S. and Snyder S. H. 1994. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 175-195.
- [29] 吉良 枝郎他編 喫煙科学研究財団「喫煙と呼吸器系」『喫煙科学研究財団 —10年の歩み—』1996, 4 pp. 93-107
- [30] 高橋潔、内藤眞、竹屋元裕編『生命を支えるマクロファージ』2001.
- [31] 高須賀直美、赤川清子「マクロファージの採取と精製」徳永徹、吉田彪、赤川清子編『マクロファージ実験マニュアル』1996. 18-21.
- [32] 森川實、原田直樹「マクロファージの機能測定—貪食—」徳永徹、吉田彪、赤川清子編『マクロファージ実験マニュアル』1996. 148-153.

(原稿受理 2008年3月24日)