

喫煙による肺胞マクロファージへの影響と 喫煙中止後の回復機構

中 田 帆 浪*
竹 内 実***

要 旨

喫煙による肺胞マクロファージ (AM) への影響と喫煙中止後の回復機構について、マウスに10日間喫煙させ、喫煙中止後の影響を検討した。AMの細胞数は、喫煙により有意に増加したが、喫煙中止後8週目で減少し、非喫煙群と同程度の回復が認められた。細胞形態は、喫煙により細胞の肥大化や空胞形成などの内部構造の複雑化が認められたが、8週目で回復した。超微形態構造は、喫煙により偽足の消失と細胞内に封入体が観察され、8週目でも封入体が残存し、回復は認められなかった。細胞内自家蛍光は、喫煙により増強したが、4週目、8週目で徐々に回復傾向が認められた。CD11c表面抗原発現は、喫煙による影響は認められなかった。TNF- α mRNA発現は、喫煙により有意に減少し、その後4週目、8週目でも回復は認められなかった。活性酸素 (H_2O_2) 産生は、喫煙により有意に増加し、4週目、8週目でも回復は認められなかった。DNA損傷は、喫煙により有意に増加しDNA損傷が引き起こされたが、中止後4週目、8週目で回復した。CAT mRNA発現は、喫煙により有意に増加し、その後4週目、8週目で回復した。CD206陽性細胞比率は、喫煙により有意に低下し、回復は認められなかった。AMの細胞数と細胞形態は、喫煙中止後8週目で回復が認められたが、免疫機能は抑制され、回復は認められなかった。その抑制機構の要因として、過剰な活性酸素産生による可能性が考えられた。喫煙中止によりAMの細胞数、細胞形態は回復したが、免疫機能の回復は認められなかった。またM1、M2型AMの機能は、喫煙中止により回復は認められなかった。喫煙によるAMへの影響が長期間持続し免疫機能が回復されないことが、喫煙関連肺疾患の発症に関与している可能性が示唆される。

キーワード：喫煙，喫煙中止，肺胞マクロファージ，免疫機能，活性酸素，回復

* 京都産業大学大学院 生命科学研究科

** 京都産業大学 生命科学部

1. 緒言

タバコ煙は、主流煙、副流煙、成長煙、拡散煙、流出煙、くすぶり煙及び主流煙を吸った後に喫煙者から吐き出される吹き出し煙（剰余煙）からなり、副流煙、成長煙、拡散煙、流出煙及び剰余煙は、まとめて環境タバコ煙（Environmental Tobacco Smoke : ETS）と呼ばれている。これらタバコ煙の中には、約 6000 種類の化学物質が含まれ、その中には約 200 種類の有害物質、60 種類の発癌物質が含まれている。また、物質の状態によりガス相と粒子相に分けられる。ガス相には、一酸化炭素、二酸化炭素、一酸化窒素、アンモニアなどが含まれ、粒子相には、タバコの主成分でもあるニコチン、タール、ベンツピレン、ジメチルニトロソアミン、ウレタンなど多種の発癌物質、発癌促進物質が含まれている (1,2)。その中でニコチンには依存性が認められているため、喫煙者は長期にわたり喫煙を繰り返し、発癌物質に曝露される。喫煙によって発症する癌としては、肺癌、喉頭癌及び食道癌などがある。また、喫煙による人体への影響は、癌だけではなく、慢性閉塞性肺疾患（Chronic obstructive pulmonary disease : COPD）、気管支喘息などの呼吸器疾患、歯周病、早産など妊娠に関連した危険因子でもある (3,4)。世界では、年間約 540 万人がタバコの使用により死亡しており、このうち 60 万人は非喫煙者の受動喫煙によるものである。ヒトの肺は約 6～8 億個の直径約 0.1mm の肺胞で構成され、その総面積は約 50～60m² であり、この肺胞を介して血液中の赤血球と空気中の二酸化炭素、酸素などのガス交換を行っている。また肺は常に外気に曝されており、空気中に含まれる細菌やウイルスなどを取り込むため、感染の危険性が高い臓器である。この肺の感染防御を担う重要な免疫細胞として肺胞腔に肺胞マクロファージ（AM）が常在している。喫煙によりタバコ煙粒子が肺胞に到達するため、AM が影響を受ける可能性がある。AM には、M1 型マクロファージと M2 型マクロファージの 2 種類の存在が知られている (5)。肺には、主に M1 型マクロファージが常在しており、肺の免疫機能を担っている。AM の主な機能は、貪食機能、抗原提示機能、活性酸素やサイトカイン産生機能などである (6,7)。また、M1 型マクロファージは CD11c 抗原を発現し、活性酸素と TNF- α を産生しており、癌の増殖抑制に関与している (5)。一方、M2 型マクロファージは、CD206 抗原を発現しており、活性酸素は産生せず、TGF- β を産生し、組織の修復や癌増殖の促進に関与している (8)。喫煙の免疫系に及ぼす影響に関しては、1965 年頃から実験動物あるいはヒトのレベルで、様々な報告がされている (9,10,11)。さらに、気管支肺胞洗浄（Bronchoalveolar Lavage : BAL）術の開発によって、BAL 液から容易に肺胞マクロファージなどの免疫細胞が得られるようになった結果、喫煙による AM の報告がされるようになった (12,13)。喫煙による AM への影響としては、細胞数の増加、細胞表面抗原の減少、活性酸素産生の増加による DNA 損傷が報告されている (14,15)。また、喫煙により IL-1 β や TNF- α などのサイトカインが低下することが報告されている (16)。しかし喫煙中止後における AM の回復機構の詳細については、まだ解明されていない。そこで、本研究ではマウスに 10 日間喫煙させ AM への影響と喫煙中止による回復機構について検討した。

2. 実験材料及び方法

(1) 実験動物

実験動物は、SPF (Specific Pathogen Free) の7～8週齢 C57BL/6 雌マウス (日本エスエルシー株式会社) を使用した。尚、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、本大学動物実験委員会により承認されたものである。

(2) タバコ主流煙のマウスへの曝露

タバコは、フィルター付き紙巻きタバコ (Research CIGARETTE 3R4F: ニコチン 0.73mg, タール 9.4mg, University of KENTUCKY) を使用した。本実験スケジュールは、図1に示した。タバコ主流煙曝露は、タバコ主流煙発生装置 (M.I.P.S) を用いて行った。マウスを一匹ずつチャンバーの中に入れ、装置に差し込み、1 puff/35ml/2秒の主流煙を1日20本、10日間、喫煙の間隔を3日間以上空けないようにしてマウスに喫煙操作を行った。これを喫煙群とし、喫煙させていないマウスを非喫煙群とした。

(3) 気管支肺胞洗浄 (Broncho Alveolar Lavage : BAL)

BALは、非喫煙および喫煙マウスの腹腔内にPBS (-) [Mg^{2+} , Ca^{2+} を含まない] で10倍希釈したソムノペンチル 64.8mg/ml を0.35ml注射し、深麻酔により安楽死させ、滅菌済みのハサミとピンセットを用いて腹部から頸部にかけて皮膚を切開し、肺及び気管支を露出し、27G注射針で気管支に穴を開け、そこにノンベベル針21Gを差し込み、気管支の下に手術糸を通して気管支に差し込んだ針が固定されるように結び、PBS (-) 1mlの入った1mlシリンジを針に付け、PBS (-) を肺へと注入し、回収する操作を計5回行い、この回収液を気管支肺胞洗浄液 (Broncho Alveolar Lavage Fluid : BALF) とした。

(4) AMの調製

AMの調製は、前述で得たBALFを1000rpm、10分間、4℃で遠心後、上清を取り除きR (+) [RPMI1640, 10% FCS, 100U/ml ペニシリンGカリウム, 100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む] 0.5mlを加えて懸濁した。この細胞浮遊液10 μ lに0.2%トリパンブルー10 μ lを加え、トリパンブルー色素細胞排除法にて、血球計算盤上で生細胞数を測定し、各細胞濃度に調製した。

(5) サイトスピン標本の作製

サイトスピン標本の作製は、前述で得たAMをR (+) で 1×10^6 個/mlに調製した後、100 μ lをスライドガラス上に滴下し、850rpm、6分間遠心し、細胞をスライドガラスに貼り付け、ドライヤーで乾燥させた。その後、メチルアルコールを滴下し、2分間固定し、メチルアルコールを乾燥させ、ギムザ染色液を用いて30分間染色した。染色後、スライドガラスの裏側から染色液を水道水で洗い

流し、乾燥させ、サイトスピン標本を作製した。

(6) 電子顕微鏡による AM の超微形態構造

走査電顕 (SEM) 像は方法 (4) で得られた AM 浮遊液を 1000rpm, 4°C, 10 分間遠心し, 1×10^6 個/ml となるように R (+) で希釈した。その後, 針なし 1ml シリンジに NANO-PERCOLATOR (JEOL) を装着し, 細胞浮遊液 100 μ l を滴下し, TI ブルー 100 μ l 滴下し, 20 分間静置した。シリンジで吸引後, 蒸留水で 3 回洗浄した。NANO-PERCOLATOR を MSP-1S Magnetron Sputter に入れ, 3 秒間, 白金コーティングを行い, 試料台にのせて Miniscope TM-1000 (HITACHI) で観察した。透過電子顕微鏡 (TEM) 像は方法 5 で得られた AM を 2.5% グルタルアルデヒド固定し, ポリカチオン処理したプレート (セルデスク, 住友ベークライト) 上に載せ, 10 分間静置後, 0.1M PBS で洗浄し, 1% 四酸化オスミウムを用いて室温で 20 分間, 後固定した。蒸留水で洗浄した後, エタノール上昇系列によって脱水し, 無水アセトンに 2 回浸した。その後, 細胞をエポン 812 樹脂に包埋し, 60°C で一晚重合させた。その後, 超薄切片 (厚さ 100nm) を作製し, 酢酸ウラニルと酢酸鉛で電子染色を行い, 透過電子顕微鏡 (HITACHI H-7100, 加速電圧 70kV) を用いて観察した。

(7) Dot Plots, 細胞表面抗原の発現と自家蛍光

方法 (4) で得られた AM に Lysis Solution 1ml を加えて 1000rpm, 5 分, 4°C で遠心し, PBS (-) を 6ml 加えて再び遠心し, 上清を取り除き, 沈渣に R (+) を加え, 5×10^5 個/ml となるように調製した。Dot Plots は, この細胞浮遊液 100 μ l を FACS Calibur (BD) で取り込み, FSC (Forward Scatter : 前方散乱光) 値と SSC (Side Scatter : 測方散乱光) 値の解析を行った。細胞表面抗原の発現は, この細胞浮遊液 100 μ l に, FITC (Fluorescein Isothiocyanate) 標識の抗 CD11c 抗体, 抗 CD206 抗体をそれぞれ 1 μ l 加え, PBS (-) を全量 200 μ l になるように加え, 45 分, 4°C, 暗所で反応させた。反応後, FACS Buffer 2ml を加え, 1000rpm, 10 分, 4°C で遠心し, 上清を取り除いた。その後, 沈渣に FACS Buffer 300 μ l を加え, FACS Calibur により各サンプル 5000 個の細胞を取り込み, FL-1 (Fluorescence-1 : 緑色蛍光) の値を測定し, 陽性細胞比率を求めた。AM の自家蛍光は FL-1 で測定し, 蛍光強度で示した。

(8) 肺胞マクロファージ (Alveolar macrophages : AM) の培養

96 穴細胞培養プレートに, 方法 (4) で得た AM を 5×10^5 個/ml となるように調製した細胞浮遊液 100 μ l を加え, R (+) 100 μ l を加えて全量を 200 μ l/well にし, 37°C のインキュベーター内で 24 時間培養した。培養後, 上清を取り除き, 沈殿した細胞に SolutionD 200 μ l を加え細胞を溶解させ, -20°C で冷凍保存した。

(9) TNF- α , CAT mRNA 発現

全 RNA は、方法 (8) で得られた AM 5×10^4 個から AGPC 法により抽出した。全 RNA に、Random Primer を用いて、MLV 溶液を加え逆転写反応により、cDNA を作製した。PCR は、前述で得た cDNA を使用しプライマーを加え、30 サイクルで PCR を行った。プライマーは、 β -actin (250bp) : 5'-GCATTGTTACCAACTGGGAC-3', 5'-TCTCCGGAGTCCATCACAAT-3', TNF- α (253bp) : 5'-AGTGGTGCCAGCCGATGGGTTGT-3', 5'-GCTGAGTTGGTCCCCCTTCTCCAG-3', CAT (368bp) : 5'-TTGACAGAGAGCGGATTCCTT-3', 5'-CCAGAAGTCCCAGACCATGT-3' を使用した。PCR 後、遺伝子定量解析システムを用いて PCR 増幅産物のバンドを検出し、Image J を使用して解析を行った。それぞれの mRNA の発現は、mRNA/ β -actin 比により半定量的に発現比率を求めた。

(10) DNA 損傷

DNA 損傷は、Comet 法を用いて、細胞を含むゲルを電気泳動し、蛍光染色して評価した。1% アガロース溶液を作成し、このアガロースゲル溶液を加熱して液状にし、42°C の温浴槽で放置した後、方法 (4) で得られた AM を PBS (-) で 2.5×10^5 個/ml にした細胞懸濁液 10 μ l と 1% アガロース溶液を 100 μ l をマイクロチューブ内で混合し、そのうち 75 μ l を Comet 用スライドガラス上にアガロースが平らになるように広げた。その後、4°C、暗所で 15 分間静置し、ゲル化した。上記のスライドガラス上のゲルに、室温で保存した Lysis solution に浸し、4°C、暗所で 60 分間静置した。反応後、Alkali solution に浸し、室温、暗所で 30 分間静置した。上記の反応後、ゲルを TBE Buffer に 5 分間浸し、洗浄操作を 2 回行った。その後、サブマリン泳動装置を用いて、30mA、10 分間電気泳動を行った。泳動後、慎重にスライドガラスを取り出し、ゲルを 70% エタノールに 5 分間浸して固定し、冷風で乾燥させた。固定後、SYBR green I 染色液 20 μ l をゲル上に滴下した。染色後、落射型蛍光顕微鏡により、染色された核の DNA 鎖を 350 ~ 500nm の波長で検出し、画像を取り込んだ。1 つのサンプルにつき、細胞を無造作に 30 ~ 40 個選び、Comet Analyzer で Tail Moment と Tail Length を測定した。Tail Moment は、損傷された DNA 量を示し、核の中心座標と尾の中心座標の距離 (尾の蛍光輝度 / 細胞全体の蛍光輝度) で算出した。また、Tail Length は、損傷された DNA 断片の大小の程度を示し、核を除く尾の部分の長さを測定し、DNA 損傷を評価し、Index で表した。

(11) 活性酸素 (H₂O₂) 産生

H₂O₂ 産生は、2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて測定した。BAL により回収した AM を R (+) で 5×10^5 /ml に調製した細胞浮遊液 100 μ l にさらに R (+) を加えて 990 μ l にし、ジメチルスルフォキシドで希釈した 2mM DCFH-DA を 10 μ l 加え、37°C、30 分間振揺反応を行った。反応終了後、FACS Calibur を用いて、H₂O₂ 産生の陽性細胞を測定し、陽性細胞比率で示した。

(12) 肺病理組織

NS, S 群のマウスを安楽死後、肺を採取した。肺を、10%中性緩衝ホルムアルデヒド液に浸透させ、固定した。固定した肺を、滅菌済みのメスとピンセットを用いてトリミングを行い、肺組織をコンニカルカセットに入れ、24時間水洗した。オートキネットを用いてアルコール脱水処理後、パラフィン包埋を行い、Tissue-Tekを用いて肺組織のパラフィンブロックを作製した。組織薄切切片的の作製には、マイクロームでパラフィンブロックから厚さ4 μ mの切片を作製し、伸展後乾燥させ、ヘマトキシ・エオジン染色を行い、ピオライトで封入し、一晚乾燥させ、顕微鏡で観察した。

(13) 有意差検定

有意差検定は、全ての実験で平均値 (mean) と標準誤差 (Standard Error: S.E.) を求め、student's t-testにより、非喫煙群と喫煙群を比較し、p値を求め、 $p < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

(1) 喫煙中止によるAM数への影響

AM数は、非喫煙群 $31 \times 10^4 \pm 2$ 個/mouse (mean \pm S.E.), 喫煙中止後1日目 $65 \times 10^4 \pm 8$ 個, 1週目 $71 \times 10^4 \pm 2$ 個, 2週目 $49 \times 10^4 \pm 1$ 個, 3週目 $42 \times 10^4 \pm 4$ 個, 4週目 $58 \times 10^4 \pm 17$ 個, 6週目 $38 \times 10^4 \pm 5$ 個, 8週目 $33 \times 10^4 \pm 4$ 個であった。AMの細胞数は、非喫煙群と比較して喫煙中止1日目 ($p < 0.001$), 1週目 ($p < 0.001$), 2週目 ($p < 0.001$), 3週目 ($p < 0.001$), 4週目 ($p < 0.01$), 6週目 ($p < 0.001$) で有意な増加が認められたが、8週目では非喫煙群と同程度まで回復した (図1)。

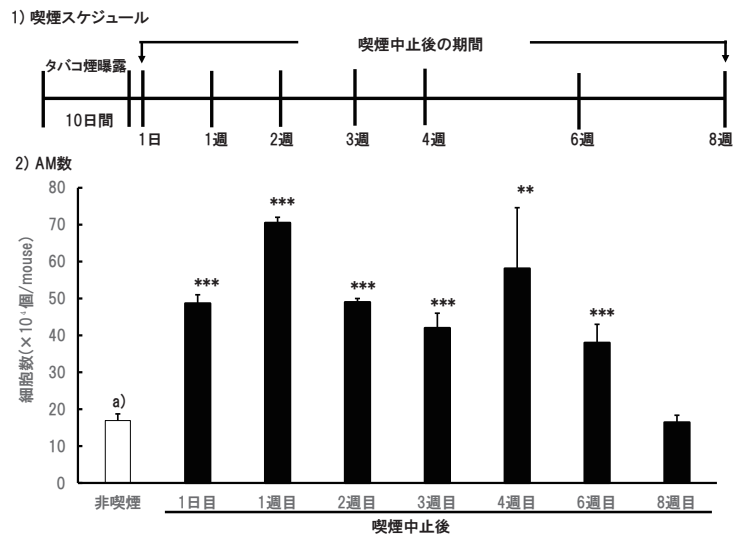


図1 喫煙中止によるAM数への影響

□ : 非喫煙, ■ : 喫煙, a) mean \pm S.E. ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, 非喫煙群と比較

(2) 喫煙中止による AM の Dot Plots への影響

AM の Dot Plots の SSC 値は、非喫煙群 150 ~ 560, 喫煙中止後 1 日目 280 ~ 1000, 1 週目 280 ~ 960, 2 週目 200 ~ 880, 3 週目 180 ~ 800, 4 週目 180 ~ 760, 6 週目 180 ~ 720, 8 週目 160 ~ 580 であった。喫煙中止後の AM の Dot Plots は、非喫煙群と比較して、中止後 1 日目から増加し、日数が経過すると徐々に SSC 値が減少し回復が認められた (図 2)。

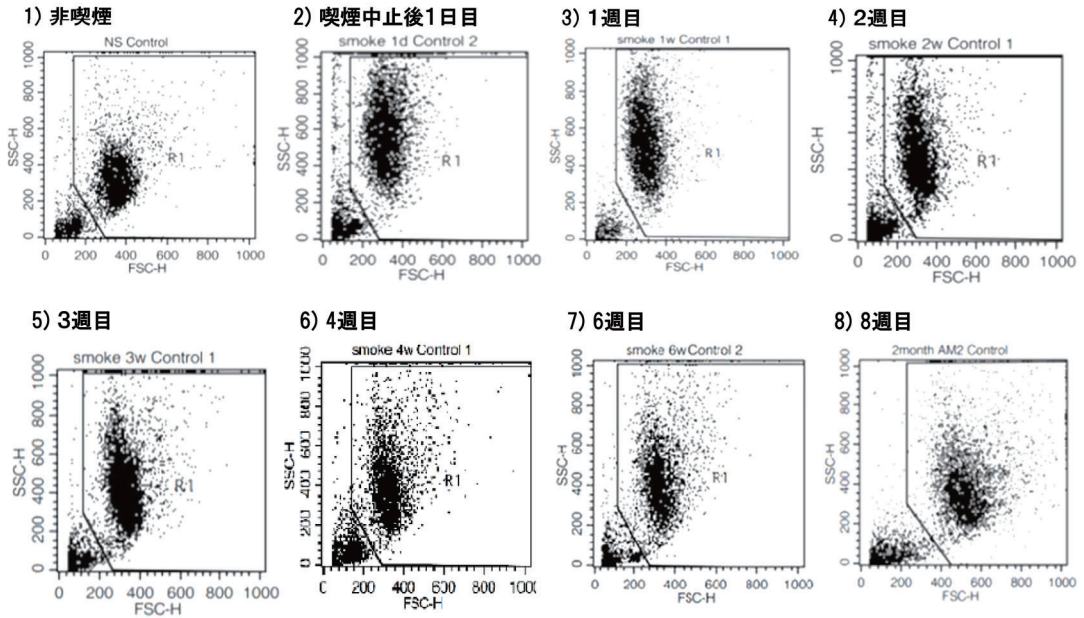


図 2 喫煙中止による AM の Dot Plots への影響

(3) 喫煙中止による AM の細胞形態への影響

細胞数と Dot Plots の回復が認められたため、これ以降の実験については、非喫煙群、喫煙によって影響が認められた喫煙中止後 1 日目、回復傾向が認められた 4 週目、回復が認められた 8 週目で観察した。AM の細胞形態は、非喫煙群と比較して、喫煙中止後 1 日目では細胞胞体の肥大化、細胞内に空胞形成が確認された。4 週目でも同様に AM の肥大化や空胞が観察され、回復は認められなかったが、8 週目で回復が認められた (図 3)。

(4) 喫煙中止による AM の超微形態構造への影響

AM の SEM 像は、非喫煙群では、細胞表面に発達したヒダ状構造の偽足が認められた。喫煙中止後 1 日目ではヒダの収縮と消失が確認され、4 週目で少しヒダの回復が認められ、8 週目で非喫煙群と同程度のヒダ状構造が観察され、回復が認められた (図 3)。AM の TEM 像は、非喫煙群と比較して、中止後 1 日目では、AM 内部にオスミウム酸で濃染された封入体が確認され、4 週目、8 週目で

も封入体が確認され、回復は認められなかった (図3)。

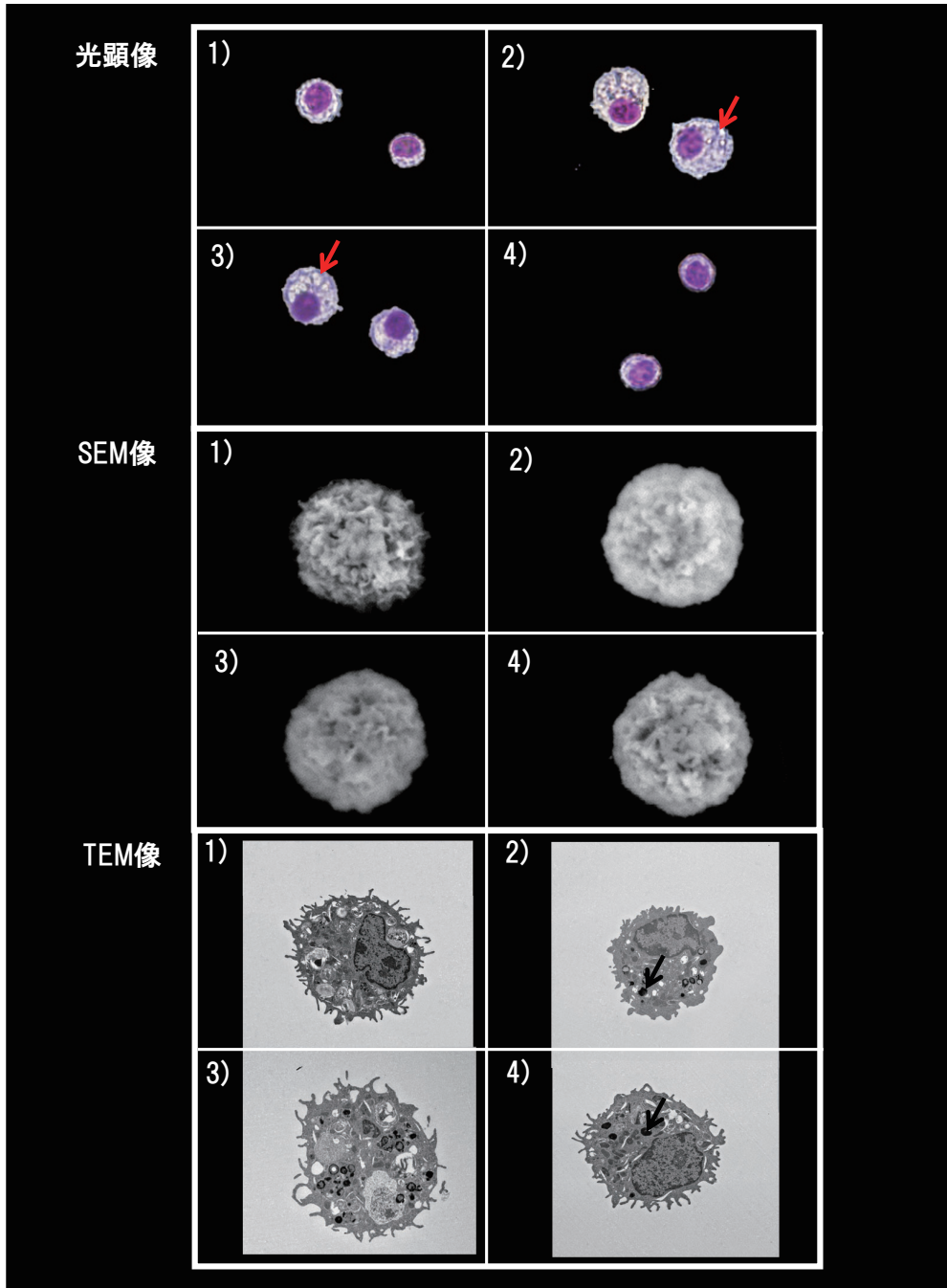


図3 喫煙中止によるAMの細胞形態への影響

1) 非喫煙, 2) 喫煙中止後1日目 3) 喫煙中止後4週目, 4) 喫煙中止後8週目, →: 空胞, ⇨: 封入体

(5) 喫煙中止による AM の自家蛍光への影響

AM の自家蛍光強度は、非喫煙群 3~4, 喫煙中止後 1 日目 20 ~ 30, 4 週目 10 ~ 12, 8 週目 7 ~ 8 で 4 週目, 8 週目で回復傾向を認めたが、完全な回復は認められなかった (図 4)。

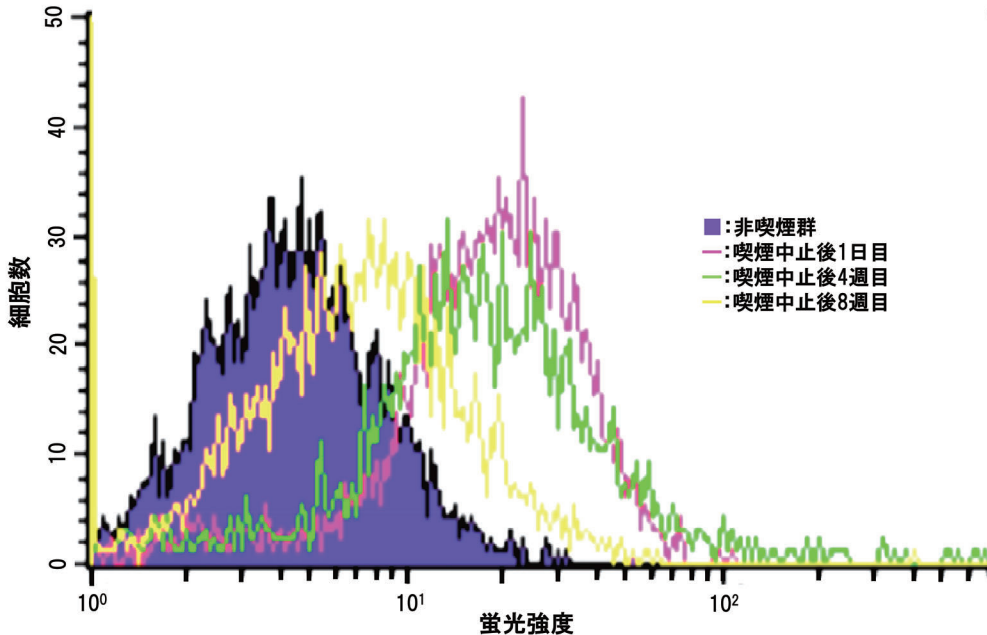


図 4 喫煙中止による AM の自家蛍光への影響

(6) 喫煙中止による AM の CD11c 陽性細胞比率と TNF- α mRNA 発現への影響

AM の CD11c 陽性細胞比率は、非喫煙群 $92.1 \pm 2.4\%$ (mean \pm S.E.), 喫煙後 1 日目 90.5 ± 0.6 , 4 週間目 93.3 ± 0.5 , 8 週目 85.6 ± 1.0 であった。CD11c 陽性細胞比率は、非喫煙群と比較して、喫煙中止後 1 日目, 4 週目, 8 週目でいずれも変化が認められなかった (図 5)。AM の TNF- α mRNA 発現比率は、非喫煙群 1.35 ± 0.08 (mean \pm S.E.), 喫煙中止後 1 日目 0.27 ± 0.02 , 4 週目 0.32 ± 0.06 , 8 週目 0.40 ± 0.07 であった。AM の TNF- α mRNA 発現は、非喫煙群と比較して、喫煙中止後 1 日目, 4 週目, 8 週目でそれぞれ有意な ($p < 0.001$) 低下が認められ、回復は認められなかった (図 5)。

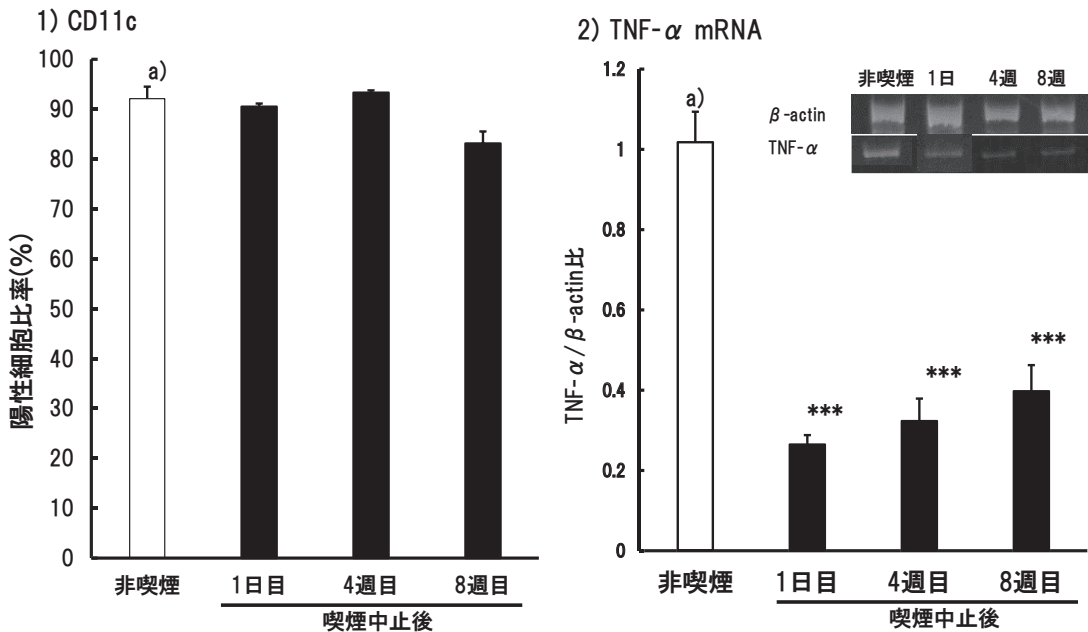


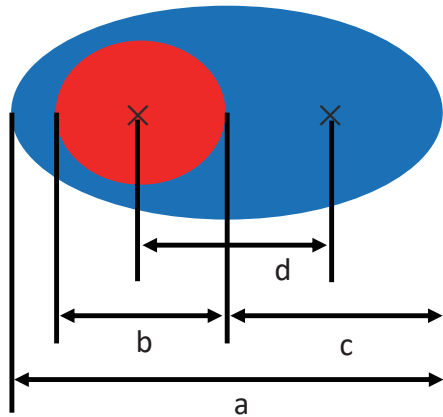
図5 喫煙中止によるAMのCD11c陽性細胞比率とTNF- α mRNA発現への影響

□：非喫煙，■：喫煙，a) mean \pm S.E. ***: $p < 0.001$ ，非喫煙群と比較

(7) 喫煙中止によるAMのDNA損傷への影響

DNA損傷はTail MomentとTail Lengthを用いて評価した(図6)。Tail Momentは、非喫煙群 0.7 ± 0.3 (mean \pm S.E.)、喫煙中止後1日目 6.4 ± 1.8 、4週目 2.2 ± 0.8 、8週目 1.9 ± 0.6 であり、非喫煙群と比較して、喫煙中止後1日目では有意な($p < 0.01$)増加が認められたが、4週目、8週目では非喫煙群と同程度まで回復した。Tail Lengthは、非喫煙群 3.3 ± 0.4 (mean \pm S.E.)、喫煙中止後1日目 59.4 ± 11.9 、4週目 26.1 ± 12.6 、8週目 8.9 ± 0.3 であり、非喫煙群と比較して、喫煙中止後1日目では有意に($p < 0.01$)増加したが、4週目、8週目では回復傾向が認められた。これらの結果から、喫煙によってDNA損傷が引き起こされたが、喫煙中止後4週目、8週目で回復が認められた(図7)。

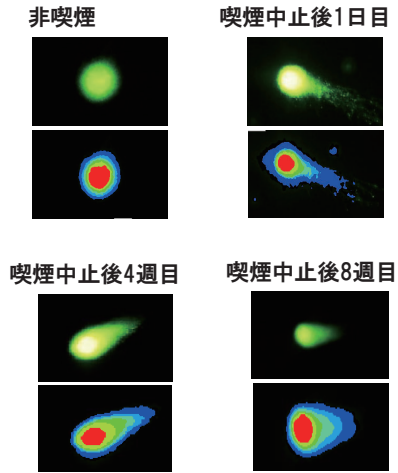
1) DNA損傷の評価



a) Total Length b) Tail Length
c) Nuclear Diameter d) Tail Distance

Tail Moment = Tail Distance × 尾の輝度の合計/細胞全体の輝度の合計
図6 喫煙中止によるAMのDNA損傷像への影響

2) コメット像



(8) 喫煙中止によるAMの活性酸素 (H₂O₂) 産生への影響

AMのH₂O₂産生は、非喫煙群 65.2 ± 1.0% (mean ± S.E.), 喫煙中止後1日目 87.5 ± 0.9, 4週目 88.4 ± 0.5, 8週目 80.7 ± 1.6であった。非喫煙群と比較して、1日目, 4週目, 8週目でそれぞれ有意に (p<0.001) 増加しており, 回復は認められなかった (図7)。

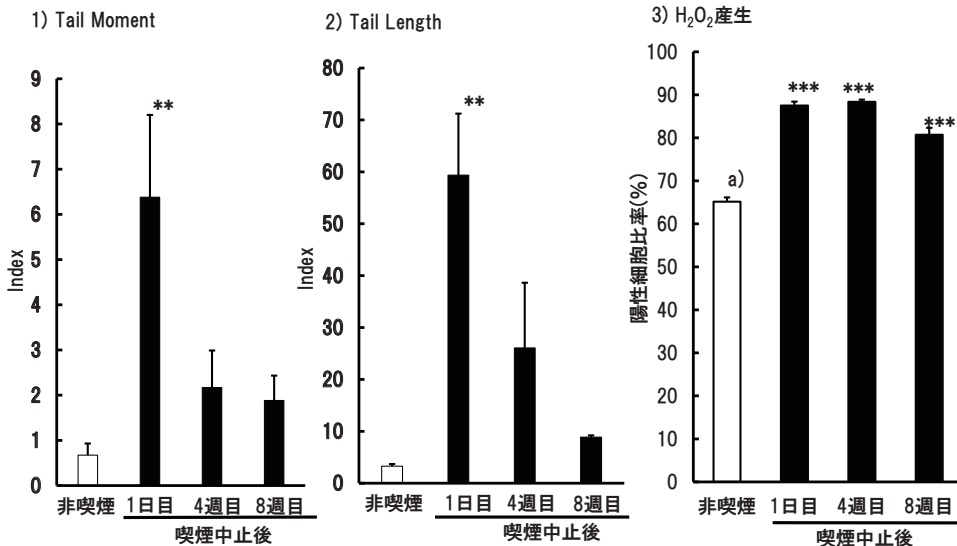


図7 喫煙中止によるAMの活性酸素 (H₂O₂) 産生とDNA損傷への影響

□ : 非喫煙, ■ : 喫煙, a) mean ± S.E. **: p<0.01, ***: p<0.001, 非喫煙群と比較

(9) 喫煙中止による AM の CAT (Catalase) mRNA 発現への影響

AM の CAT mRNA 発現比は、非喫煙群 0.39 ± 0.03 (mean \pm S.E.), 喫煙中止後 1 日目 0.84 ± 0.22 , 4 週目 0.52 ± 0.14 , 8 週目 0.36 ± 0.09 であった。非喫煙群と比較して、中止後 1 日目で有意な ($p < 0.05$) 増加が認められたが、4 週目、8 週目で回復した (図 8)。

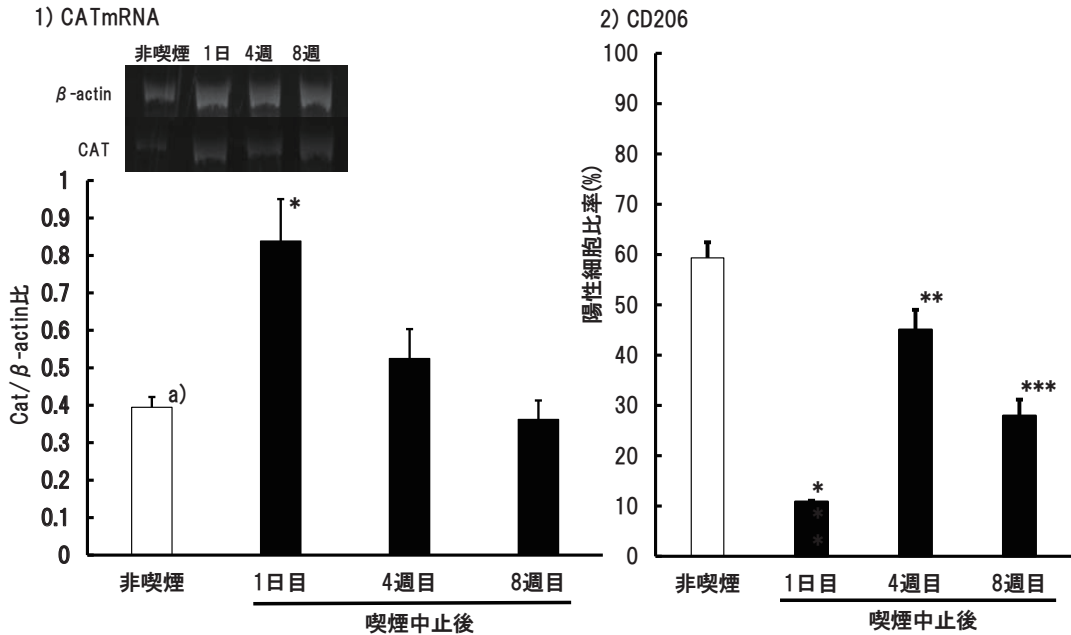


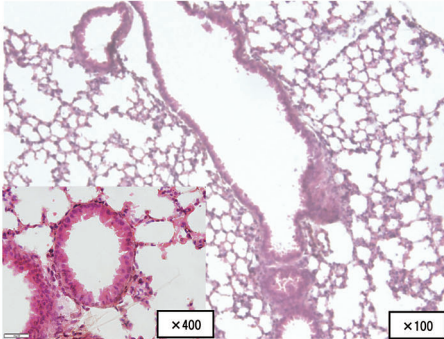
図 8 喫煙中止による AM の CAT(Catalase) mRNA 発現と CD206 陽性細胞比率への影響

□ : 非喫煙, ■ : 喫煙, a) mean \pm S.E., *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, 非喫煙群と比較

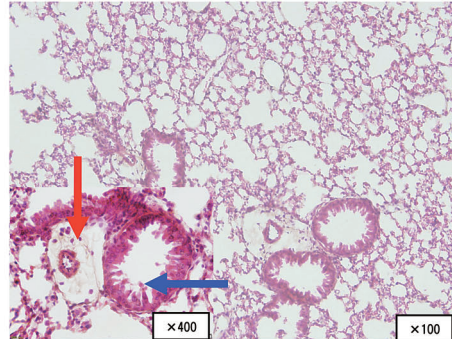
(10) 喫煙中止による肺病理組織への影響

非喫煙群と比較して、喫煙中止後 1 日目では細気管支の粘膜上皮細胞の剥離、毛細血管の浮腫が見られた。4 週目では、細気管支の粘膜上皮の肥厚が確認され、また 8 週目でも同様に、気管支周辺は肥厚しており、回復が認められなかった (図 9)。

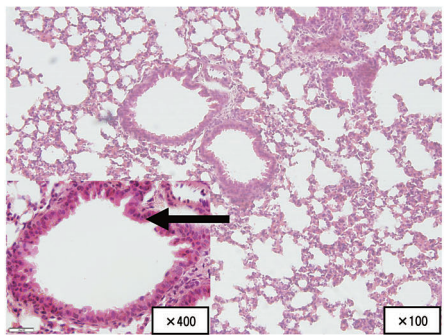
1) 非喫煙



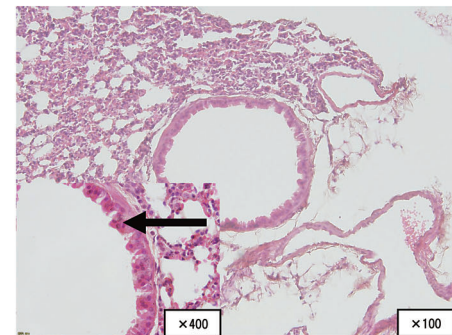
2) 喫煙中止後1日目



3) 喫煙中止後4週目



4) 喫煙中止後8週目



← : 剥離、 ← : 浮腫、 ← : 肥厚

図9 喫煙中止による肺病理組織への影響

(11) 喫煙中止による AM の CD206 陽性細胞比率への影響

肺病理組織所見の回復が認められなかったため、組織の修復に関与している M2 型マクロファージのマーカーである CD206 陽性細胞比率について検討した。非喫煙群 $59.3 \pm 3.1\%$ (mean \pm S.E.), 喫煙中止後 1 日目 10.9 ± 0.2 , 4 週目 45.1 ± 3.9 , 8 週目 30.2 ± 2.9 であった。CD206 陽性細胞比率は、非喫煙群と比較して、中止後 1 日目 ($p < 0.001$), 4 週目 ($p < 0.01$), 8 週目 ($p < 0.001$) で有意に低下しており、回復は認められなかった (図 8)。

4. 考察

喫煙による AM への影響と喫煙中止後の回復の免疫学的分子機構について検討した。喫煙による AM の細胞数は、非喫煙群と比較して、喫煙中止後 1 日目、1 週目～6 週目で有意に増加していたが、8 週目で非喫煙群と同程度のレベルまで回復した。AM 数の増加は、タバコ煙に含まれる粒子等の異物を貪食するために単球が末梢血から肺に流入し、増加したと考えられ、石田らの報告と一致した

(17)。AMの内部構造についてSSC値の増加した結果から、AMの細胞内部の複雑化が生じたが、喫煙中止後4週目でSSC値のわずかな減少が認められた。さらに、喫煙中止後8週目では、非喫煙群と同程度のレベルまで回復した。AMの細胞形態は喫煙中止後1日目、4週目で、肥大化と空胞形成が確認されたが、8週目で非喫煙群のレベルまで回復した。さらにAMの超微形態構造について観察を行ったところ、喫煙中止後1日目では、ヒダ状構造の消失と収縮が認められ、4週目でも回復は認められなかった。喫煙によるSEM像の構造変化については同様の報告がされている(18)。喫煙中止後8週目ではヒダ状構造が確認され、非喫煙群のレベルまで回復した。AMのTEM像は、非喫煙群と比較して、喫煙中止後1日目では、オスミウムに濃染される強酸化された電子密度の高い封入体の出現が確認され、4週目、8週目でも封入体は確認された。この封入体はタバコ煙に含まれる物質ではなく、むしろタバコ煙刺激によって生じた二次的な産物であると考えられる。また、AMの自家蛍光強度の増強が認められ、喫煙中止後4週目、8週目で徐々に回復したが、完全な回復は認められなかった。細胞数と細胞形態の回復が認められたため、次にM1型マーカーであるCD11c陽性細胞比率への影響について検討した。CD11c陽性細胞比率は、非喫煙群と比較して、喫煙中止後1日目、4週目、8週目いずれも変化が認められなかった。M1型マクロファージに参与しているTNF- α mRNA発現は、非喫煙群と比較して、喫煙中止後1日目、4週目、8週目で有意に低下しており、回復は認められなかった。好中球やマクロファージなどの食細胞は、異物を細胞内に取り込むとNADPHオキシダーゼを活性化することで活性酸素種(ROS)を産生し、異物を処理する。喫煙によりAMがタバコ煙粒子を異物として取り込み、ROSを産生することが考えられる。ROSの一種のH₂O₂産生細胞比率は、非喫煙群と比較して、喫煙中止後1日目、4週目、8週目で有意に増加しており、回復が認められなかった。ROS産生に関してはこれまでに、タバコ煙抽出物処理のAMやヒト肺繊維芽細胞のROS産生の増加が報告されており、同様の結果であった(19)。喫煙によるROS産生の増加は、AMが喫煙により吸入されたタバコ煙粒子を貪食し、それらを殺菌・除去するために過剰にROSを産生したためであると考えられる。過酸化水素(H₂O₂)などのROSはDNA損傷を誘導することが知られており、タバコ抽出物がDNA損傷の誘導に参与していることが報告されている(20)。そこで、喫煙中止後のAMのDNA損傷について検討した。DNA損傷の指標であるTail Moment及びTail Lengthの両方が、非喫煙群と比較して、中止後1日目で有意に増加したが、4週目、8週目では、非喫煙群と同程度のレベルまで回復した。DNA損傷の回復が認められたため、H₂O₂の消去酵素であるCAT(Catalase)mRNA発現について検討を行った。CAT mRNA発現は、非喫煙群と比較して、喫煙中止後1日目で有意な増加が認められたが、4週目、8週目で回復した。これらの結果から、喫煙中止後4週目、8週目でCATが回復したため、過剰産生されたROS(H₂O₂)を除去しきれず、喫煙中止後4週目、8週目でもH₂O₂の有意な増加が持続したと考えられる。喫煙による過剰なROSがTNF- α の遺伝子を傷害することで、TNF- α mRNA発現が低下すると考えられ、ROSが免疫機能の回復機構に参与していると考えられた。肺病理組織所見は、喫煙中止後1日目の細気管支は、非喫煙群と比較して、粘膜上皮細胞が剥離し、毛細血管の浮腫が見られた。4週目の気管支内

では、気管支の肥厚が確認され、8週目でも回復は認められなかった。肺病理組織所見で喫煙中止群の肺組織が回復していないため、組織の修復に関与しているM2型マクロファージであるCD206陽性細胞比率について検討した。非喫煙群と比較して、喫煙中止後1日目で有意に低下しており、4週目、8週目でも回復は認められなかった。この結果から、組織修復に関与しているM2型AMが喫煙により減少するため、修復に関わるTGF- β の低下が引き起こされることで、喫煙による肺組織病変の回復及び修復がされなかったと考えられる。以上の結果より、AMの細胞数と細胞形態は、喫煙中止後8週目で回復が認められたが、免疫機能の回復は認められなかった。AMのM1、M2型はともに喫煙により影響を受けたが、どちらのタイプも喫煙中止により機能回復は認められなかった。また、M2型AMのCD206発現低下により肺組織病変が修復されなかったと考えられる。喫煙中止後のAMの免疫機能が回復されないことが、喫煙関連肺疾患の発症に関わっている可能性が考えられる。

5. 謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 JP20K11615 の助成を受けたものです。透過電子顕微鏡像に関して、ご指導頂いた鳥取大学医学部稲賀すみれ博士に深謝致します。

6. 参考文献

1. Burns MD. (1991) Cigarettes and cigarette smoking. *Clin. Chest Med.* 12:631-642.
2. Rawbone G, Roger, Burns W, Patrick RA. (1987) The measurement of environmental tobacco smoke particulates. *Toxicology Letters.* 35:125-129.
3. 平山雄. (1990) 大規模コホート研究にもとづく部位別にみたライフスタイルとの関係. *癌の臨床.* 36:233-242.
4. Mathers CD, Loncar D. (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3:2011-2030.
5. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 164:6166-6173.
6. Miller K, Hudspeth BN, Meredith C. (1992) Secretory and accessory cell functions of the alveolar macrophage. *Environ Health Perspect.* 97:85-89.
7. Hocking WG, Golde DW. (1979) The pulmonary-alveolar macrophage. *N Engl J Med.* 301: 580-587.
8. Anderson CF, Mosser DM. (2002) A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol.* 72:101-106.
9. 竹内実. (2019) 喫煙を科学する .p1-109. 北隆館.
10. Takeuchi M, Nagai S, Nakajima A, Shinya M, Tsukano C, Asada H, Yoshikawa Y, Yoshimura M, Izumi T. (2001) Inhibition of lung natural killer (NK) cell activity by smoking: The role of alveolar macrophages. *Respiration* 68:262-267.
11. Kobayashi K, Hirono Y, Nakata H, Miyagawa M, Pinkerton KE, Takeuchi M. (2020) Cigarette smoke exposure inhibit antibody production via inhibition of alveolar macrophage. *Journal of Translational Science.*7:1-7.
12. Takeuchi M, Nagai S, Izumi T. (1989) The mechanism of inhibition of alveolar macrophages on autologous

- blood natural killer cell activity. *Chest*. 95:383-387.
13. 竹内実. (2001) 喫煙と免疫機能. *臨床免疫*, 36:843-850.
 14. Ishida T, Hirono Y, Yoshikawa K, Hutei Y, Miyagawa M, Sakaguchi I, Pinkerton KE, Takeuchi M. (2009) Inhibition of immunological function mediated DNA damage of alveolar macrophages caused by cigarette smoke in mice. *Inhalation Toxicology*. 21:1229-1235.
 15. Hirono Y, Tanahashi Y, Sasaki K, Konno K, Shirai Y, Kobayashi K, Someya A, Inaga S, Sakura M, Pinkerton KE, Takeuchi M. (2013) Alveolar macrophages functions and DNA damage in cigarette smoke-exposed mice. *Journal of Advances in Bioscience and Biotechnology*. 4: 1-7.
 16. Nagai S, Takeuchi M, Watanabe K, Aung H, Izumi T. (1988) Smoking and interleukin-1 activity released from human alveolar macrophages in healthy subjects. *Chest*. 94:694-700.
 17. Ishida T, Pinkerton KE, Takeuchi M. (2009) Alveolar macrophage from cigarette smoke-exposed mice inhibits B lymphocyte proliferation stimulated with LPS. *Respiration*. 77:91-95.
 18. Pratt SA, Smith MH, Ladman AJ, Finley TN. (1971). The ultrastructure of alveolar macrophages from human cigarette smokers and nonsmokers. *Laboratory Investigation*, 24: 331-338.
 19. Liu X, Conner H, Kobayashi T, Kim H, Wen F, Abe S, Fang Q, Wang X, Hashimoto M, Bitterman P, Rennard SI. (2005) Cigarette smoke extract induces DNA damage but not apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 33: 121-129.
 20. Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipollini M, Scatena F, Paggiaro P, Celi A, Giuntini C. (2003) Cigarette smoke extract induced oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 284: 955-963.

Effects of smoking on alveolar macrophages and the restoration mechanisms after smoking cessation

Honami NAKATA
Minoru TAKEUCHI

Abstract

The effects of smoking on alveolar macrophages (AM) and the restoration mechanism after smoking cessation were investigated by using AM from smoked mice for 10 days and after smoking cessation. The number of AM were significantly increased by smoking, but decreased and restored at 8 weeks after smoking cessation. In morphology of AM, the internal cell structure was complicated by vacuole formation, but restored at 8 weeks after smoking cessation. In the ultra-micromorphological structure of AM, the pseudopodia was disappeared and inclusion body was appeared by smoking, and the inclusion body was confirmed even at 8 weeks. Intracellular autofluorescence was enhanced by smoking, but the restoration gradually was observed at 4 and 8 weeks. CD11c-positive cell was not affected by smoking. TNF- α mRNA expression was significantly decreased by smoking, and the restoration was not observed even at 4 and 8 weeks after smoking cessation. H₂O₂ production was significantly increased by smoking, and the restoration was not observed by smoking cessation. DNA damage was caused by smoking, but restored after smoking cessation. CAT mRNA expression was increased significantly by smoking and then restored at 4 and 8 weeks. CD206-positive cell was significantly reduced by smoking and was not restored. Cell number and morphology of AM were restored at 8 weeks after smoking cessation, but immune function was not restored. In the restoration mechanism, there is a possibility of association with excess production of H₂O₂. Smoking cessation restored the number of AM and cell morphology, but did not restore immune function. In addition, the functions of M1 and M2 type AM were not restored by smoking cessation. The effects of smoking on AM persist for a long time and immune function is not restored. These results suggest that non-restoration of AM after smoking cessation may be involved in the development of smoking-related lung disease.

Keywords : Smoking, Smoking cessation, alveolar macrophages, immune function, Reactive oxygen, Restoration

