

呼吸器の感染防御機構に関する研究

第4篇 マウス気管支洗浄液中液性成分および抗体産生 における喫煙の影響に関する研究

京都大学結核胸部疾患研究所 内科第二部門

門 政男, 泉 孝英, 大鳥 駿作

京都市立病院 呼吸器科

橋 本 圭 司

(昭和58年1月14日受付)

1. 緒 言

呼吸器系における細菌感染に対する防御機構として、全身性免疫の他に、いわゆる分泌型IgAに代表される局所免疫の存在が指摘されている。また、一種の溶菌酵素である lysozyme も、気管支分泌液中に多量に含まれており、感染防御機構の一端をになっているものと考えられている¹⁾。気管支分泌液中のこれらのIgA, lysozyme は、気道刺激が加わると気管支腺より分泌されるものと推定されるため、我々はラットを用いて実験を行ない、タバコ喫煙によって気管支を刺激すると、気管支分泌液中のIgA, lysozyme が増加することを報告し

た^{2),3)}。本報では、マウスを用いて喫煙により気管支を刺激し、気管支分泌液中のIgA, IgG, lysozyme が、ラットと同様に増加するかどうかを検討したので報告する。また、抗原としてヒツジ赤血球 (SRBC) を用いて、マウス脾臓における抗体産生細胞数 (plaque forming cell, PFC) を測定し、喫煙がマウスの免疫能、特に抗体産生能におよぼす影響についても検討した。

2. 実験の方法

実験I：ラット用 Hamburg II 型喫煙装置 (図1) のチャンバーに、プラスチック製の小型のマウス用チャンバーを内蔵し (図2)、その

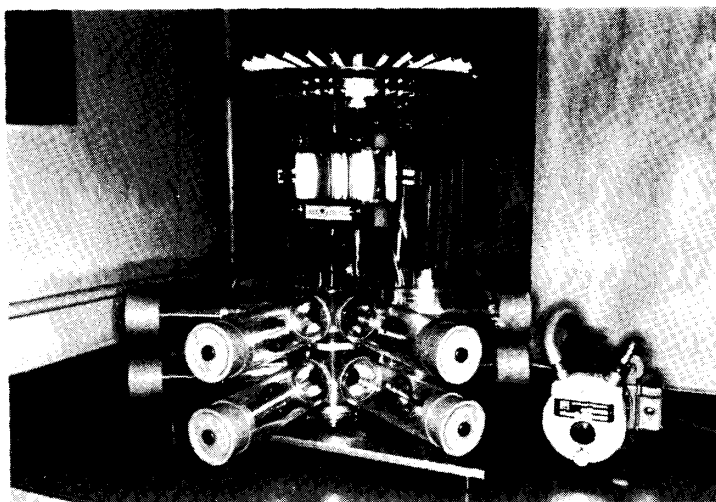


図1 Hamburg II 型喫煙装置

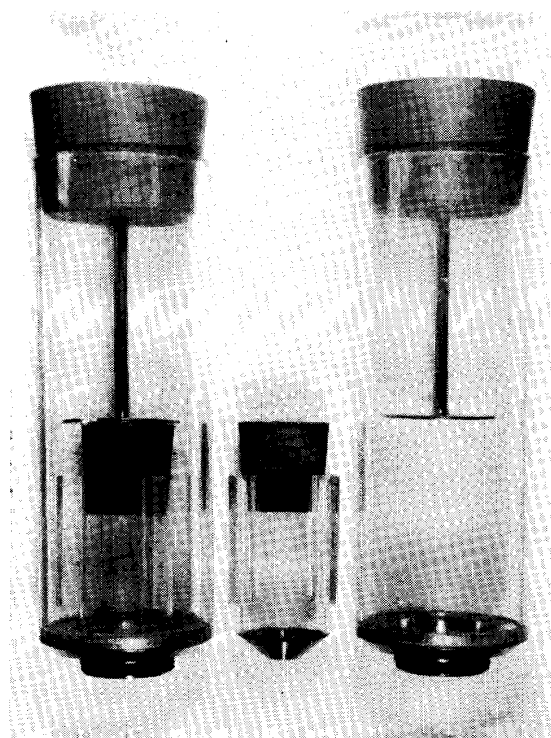


図2 マウス用小型チャンバー

ラット用の大型チャンバーに、プラスチック製のマウス用小型チャンバーを内蔵して Hamburg II 型喫煙装置に接続する。

中に ddy マウス (雌, 8 週令) を入れてハイライト煙 (空気: 煙 = 280 ml: 35 ml) を 10 分, 20 分, 30 分, 40 分間喫煙させ, 屠殺したのち滅菌生理的食塩水 2.0 ml で気管支を洗浄した。気管支洗浄は図 3 のごとく, テフロンチューブを気管に結紮固定して行なった。回収された約 1.0 ml の気管支洗浄液は, 直ちに 4°C, 1500 回転で 15 分間遠沈したのち, 上清中の IgA, IgG, lysozyme, 総蛋白量を測定した。また, Bromhexine 0.5 mg を尾静脈より静注し, 30 分, 60 分, 90 分後に屠殺して気管支を洗浄し, 洗浄液上清中の lysozyme, 総蛋白量を測定した。実験はすべてマウス 5 匹を 1 群として行なった。

IgA, IgG は, 医学生物学研究所 (名古屋市緑区鳴海町字四本木 16-3) に依頼して作製した immunoplate により, lysozyme は Salutinaleutea を使用した比濁法⁴⁾により, また, 総蛋白量は Lowry 法⁵⁾によって測定した。

実験 II: ddy マウス (雌, 8 週令, 12 週令) および C57 BL/6 マウス (8 週令) に Ham-

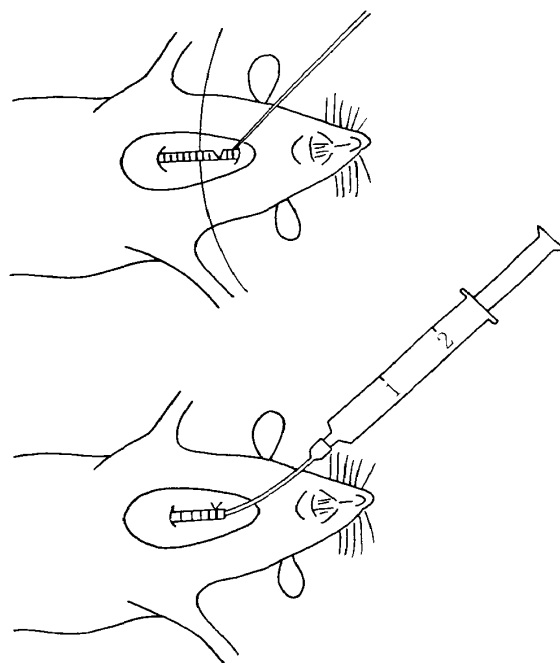


図3 マウス気管支洗浄法

マウスの気管を剥離して, カットダウンの要領で気管の口側に糸を結んで牽引し, 気管の一部をメスで切開する。この気管の切開口より, 短かく切断した ATOM 静脈カテーテル (4Fr) を挿入し糸で結紮固定したのち, 2ml の生食水を入れた注射器に接続して洗浄を行なう。

burg II 型喫煙装置を用いて 1 日 1 回, 20 分間連日喫煙させ, 喫煙開始 4 日目に SRBC 抗原 $10^7, 10^8, 10^9$ 個を尾静脈より静注にて投与した。SRBC 抗原投与後 4 日目に屠殺して脾臓を摘出し, Cunningham & Szenberg の方法⁶⁾ により, 脾臓中の抗 SRBC・IgM・PFC 数を算定した (図 4)。各群とも 5 匹を 1 群として実験を行なった。

3. 実験の成績

実験 I: タバコ喫煙によりマウスの気管支を刺激した時の気管支洗浄液中 lysozyme, 総蛋白量の経時的変動を表 1 に示す。lysozyme は喫煙前が $4.6 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ で, 喫煙 10 分が $4.8 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$, 20 分が $4.2 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$, 30 分が $3.7 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$, 40 分が $3.4 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ であった。総蛋白量は, 喫煙前が $452 \pm 18 \mu\text{g/ml}$ で, 10 分が $446 \pm 46 \mu\text{g/ml}$, 20 分が $374 \pm 69 \mu\text{g/ml}$, 30 分が $432 \pm 51 \mu\text{g/ml}$, 40 分が $398 \pm 74 \mu\text{g/ml}$ であった。lysozyme の総蛋白量に対する百分

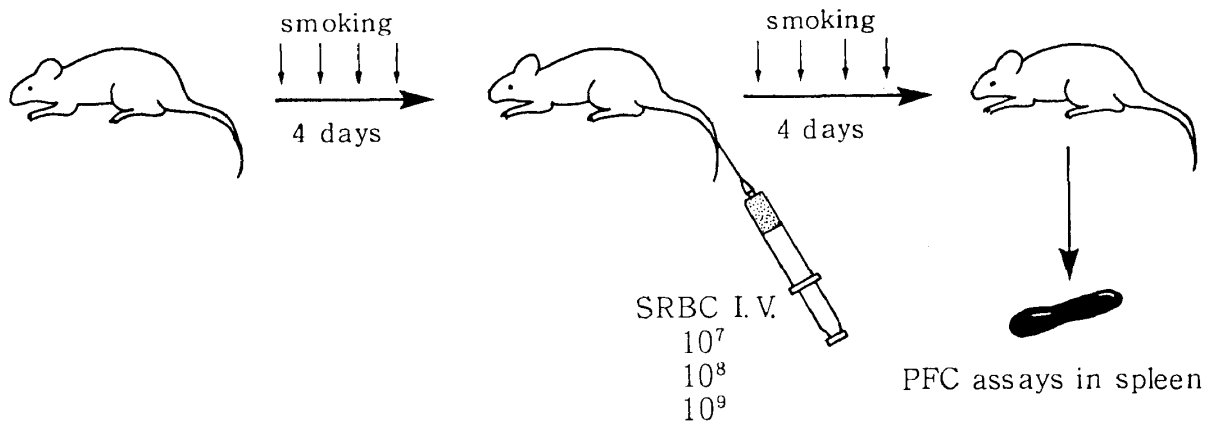


図4 Protocol for determining effect of smoking on the splenic PFC response to SRBC

表1 タバコ煙刺激によるマウス気管支洗浄液中 Lysozyme 濃度

| | Lysozyme (μg/ml) | 総蛋白量 (μg/ml) | Lysozyme 総蛋白量 ×100 |
|-----|------------------|--------------|---------------------|
| 前 | 4.6±0.4 | 452±18 | 1.01±0.06 |
| 10分 | 4.8±0.7 | 446±46 | 1.08±0.20 |
| 20分 | 4.2±0.9 | 374±69 | 1.14±0.20 |
| 30分 | 3.7±0.5 | 432±51 | 0.85±0.06 (p<0.005) |
| 40分 | 3.4±0.3 | 398±74 | 0.88±0.13 (p<0.1) |

比で比較すると、喫煙前が 1.01±0.06% で、10分が1.08±0.20%、20分が1.14±0.20%と軽度上昇しており、30分、40分ではそれぞれ0.85±0.06% (p<0.005)、0.88±0.13% (p<0.1) と喫煙前より低い値を示した。

IgA, IgG を測定した immunoplate では、IgA はマウス血清の80倍稀釈まで、また、IgG は200倍稀釈まで測定可能であったが、気管支洗浄液中の IgA は検出不能であった。気管支洗浄液中の IgG については、各々の群についてほとんど変動がなく、およそマウス血清の160倍稀釈程度の濃度であった。

Bromhexine 0.5 mg を静注した場合の気管支洗浄液中 lysozyme の総蛋白量に対する百分比は、静注前が1.01±0.06%、30分が0.86±0.26%、60分が0.94±0.28%、90分が0.92±0.37%で、経時的な変化は認められなかった(表2)。

実験Ⅱ：8週令、雌の ddy マウスに連日喫

表2 Bromhexine (0.5mg) 静注によるマウス気管支洗浄液中 Lysozyme 濃度

| | Lysozyme (μg/ml) | 総蛋白量 (μg/ml) | Lysozyme 総蛋白量 ×100 |
|-----|------------------|--------------|--------------------|
| 前 | 4.6±0.4 | 452±18 | 1.01±0.06 |
| 30分 | 4.2±0.6 | 505±126 | 0.86±0.26 |
| 60分 | 5.0±0.9 | 547±112 | 0.94±0.28 |
| 90分 | 4.1±0.9 | 481±140 | 0.92±0.37 |

表3 喫煙の ddy マウス (8週令) の SRBC に対する抗体産生におよぼす影響

| SRBC量 | 喫煙 | PFC/Spleen | |
|-----------------|-----|--------------|--------|
| 10 ⁷ | (-) | 21450±4349 | NS |
| | (+) | 49170±15567 | |
| 10 ⁸ | (-) | 223300±53785 | P<0.05 |
| | (+) | 451500±81441 | |
| 10 ⁹ | (-) | 249600±54788 | NS |
| | (+) | 212400±42663 | |

煙させ、SRBC に対する抗体産生能を脾臓の PFC でみた実験では、表3に示すように、SRBC 10⁷個では、喫煙(-)群の21450±4349に対して、喫煙(+)群では49170±15567と2倍以上に増加していたが、推計学的には有意差を認めなかった。SRBC 10⁸個では、喫煙(-)群の223300±53785に比べて喫煙(+)群は451500±81441であり、p<0.05の危険率で有意の増加を認めた。しかし、SRBC 10⁹個では、両群に差は認められなかった。

表4 喫煙の ddy マウス (12週令) の SRBC に対する抗体産生におよぼす影響

| SRBC量 | 喫煙 | PFC/Spleen | |
|-----------------|-----|--------------|----|
| 10 ⁷ | (-) | 7600±2812 | NS |
| | (+) | 2500±979 | |
| 10 ⁸ | (-) | 295200±69388 | NS |
| | (+) | 178800±64661 | |
| 10 ⁹ | (-) | 319600±48169 | NS |
| | (+) | 186600±47835 | |

表5 喫煙の C57BL/6 マウス (8週令) の SRBC に対する抗体産生におよぼす影響

| SRBC量 | 喫煙 | PFC/Spleen | |
|-----------------|-----|--------------|---------|
| 10 ⁷ | (-) | 50250±6286 | P<0.001 |
| | (+) | 14060±5378 | |
| 10 ⁸ | (-) | 151200±14800 | P<0.02 |
| | (+) | 93800±15210 | |
| 10 ⁹ | (-) | 81600±13060 | NS |
| | (+) | 72700±10366 | |

12週令, 雌の ddy マウスを用いた実験では, 表4に示すように, SRBC の多寡にかかわらず, 喫煙(+)群の PFC は喫煙(-)群の約1/2~1/3位までに減少していたが, 推計学的には有意の差は認められなかった。

8週令雌の C57BL/6 マウスでは, 表5に示すように, SRBC 10⁷個の喫煙(-)群の PFC が 50250±6286 であるのに対して喫煙 (+)群は 14060±5378であり, p<0.001 の危険率で有意に低下していた。SRBC 10⁸個でも, 喫煙(-)群の 151200±14800 に比べて喫煙 (+)群では 93800±15210と抑制されていた (p<0.02)。しかし, SRBC 10⁹個では RFC に差異は認められなかった。

4. 考 察

気道の感染防御に重要な役割を持っている気管支分泌液中の lysozyme, IgA は, 気管支漿液腺より分泌されると推定され, 気管支を刺激して気管支腺分泌を促進させると, 分泌液中に増量するものと考えられている。我々がラット

を用いて喫煙刺激による気管支腺分泌を促進させた実験では, IgA, lysozyme とも喫煙20分をピークとする増加を認め, IgG は喫煙40分で急激に上昇することを認めている³⁾。今回は実験動物をマウスにかえて, タバコ喫煙による気管支刺激により, マウス気管支分泌液中の lysozyme, IgA, IgG の変動を検討した。気管支洗浄液は濃淡があるため, 総蛋白量との百分比を求めて経時的に比較すると, マウス気管支洗浄液中の lysozyme はラットと同様に喫煙20分で軽度増加しているものの, 推計学的に有意ではなく, 30分, 40分では喫煙前より低値を示した (p<0.05, p<0.1)。マウスの気管支洗浄液中の lysozyme 濃度は, ラットのおよそ10分の1程度で非常にうすく, また, 総蛋白量は, ラットの約半分の濃度であったため, タバコ煙で気管支を刺激した際に血液から流入した総蛋白量に大きく影響された結果, 30分, 40分で低下したものと考えられた。

マウス気管支洗浄液中の IgA 量は, マウス血清中 IgA 量の80分の1以下の低濃度であり, 今回作製した immunoplate では測定不可能であり, IgG については, 喫煙前から40分まではほとんど変動がなく, マウス血清中 IgG の160分の1位の濃度であった。従って, マウス気管支洗浄液中の免疫グロブリンは, 濃度が非常に低いため, 経時的な変動は不明であった。

気管支漿液腺の分泌を亢進させる薬剤である Bromhexine 0.5 mg を静注し, 経時的に気管支洗浄液中の lysozyme 濃度をみた実験でも有意の差は認められず, 気管支腺よりの lysozyme の分泌を示唆する成績は得られなかった。この理由として, マウスの気管支腺は, ラットに比較して数量的に少なく, 従って lysozyme の分泌量も少量であることと, マウスの気管支洗浄法が技術的に困難を伴うことが考えられよう。元来, 気管支分泌の研究のための実験動物としては家兎が最良といわれており, マウスの様な小動物は, 気管支腺分泌の研究には適当ではないと考えられた。

喫煙の血清抗体産生におよぼす影響に関しては, Thomas らが1974年に C57BL マウスを用

いて行なった報告がある⁷⁾。我々と同様の方法で、Hamburg II 型喫煙装置を使用して空気対タバコ煙が7対1の割合に混合されたものを1日7～8分間喫煙させ、 10^8 個のSRBCを気管支内へ投与したのち脾臓におけるPFCの変動を測定している。そしてSRBC投与後9日目にPFCがコントロールの250%に増加し、36日、182日では150%程度であったが294日では50%以下に抑制されていた。従って、喫煙の初期にはPFCは増加するけれども、喫煙を継続すれば抑制されると報告している。また、Thomasらは、 10^8 個のSRBCを腹腔内へ投与した場合に、喫煙が脾臓のPFCに与える影響についても研究しており⁸⁾、前述の気管支内投与実験と同様の方法で喫煙させると、17週ではPFCがコントロールに比べて $p < 0.01$ の有意差で増加するが、38週では $p < 0.1$ の有意差で減少したと述べている。

一方、Holtら⁹⁾は、Hamburg II 型喫煙装置を用いてC57BLマウスに低タールおよび高タールのタバコの煙を喫煙させ、 10^8 個のSRBCを腹腔内投与したのち血清中のhemagglutinating antibodyを測定し、低タール煙ではenhanceされるが高タール煙では抑制されることを報告している。従って、これらの成績からは、喫煙の期間やタバコの種類によって抗体産生能は高められたり抑制されたりするものと考えられる。我々の成績では、ddyマウスの8週令ではPFCが増加しているが、12週令では低下しており、週令によっても抗体産生能に差異を認めている。また、同じ8週令でもC57BL/6マウスではPFCは強く抑制されており、マウスの種類によっても影響を受けるものと思われる。さらに、C57BL/6マウスでの実験では、SRBC 10^9 個ではコントロールに比べて有意の差はないが、 10^8 、 10^7 個とSRBC量を減らしてゆくと抑制が順次強くなっており、SRBCの投与量によっても抗体産生における喫煙の影響は変化するものと考えられた。なお、我々の行なった実験では、ハイライトを用いたが、ハイライト1本のタール含有量は19mg、ニコチン量は1.2mgで、Holtらの報告して

いる高タールタバコとはほぼ同様の含有量であり、低タールのタバコを用いて実験を行なえば、異なった結果が得られたかも知れない。いずれにしても、喫煙によってマウスのSRBCに対する抗体産生抑制あるいは増加が脾臓レベルにおいても認められたことは、喫煙が単なる局所刺激のみならず、全身的な免疫反応にも影響をおよぼすことが明らかに示されたと思われる。

結 語

ddyマウスを用いて、喫煙あるいはBromhexine投与により気管支を刺激して、気管支洗浄液中のlysozyme, IgA, IgGの変動を測定した。また、喫煙がマウス脾臓における抗体産生細胞数(PFC)におよぼす影響についても検討し、以下の成績を得た。

1) lysozymeの総蛋白量に対する百分比で見ると、喫煙前が $1.01 \pm 0.06\%$ 、喫煙10分が $1.08 \pm 0.20\%$ 、20分が $1.14 \pm 0.20\%$ と軽度増加したが、推計学的な有意差は認められなかった。喫煙30分、40分では、それぞれ $0.85 \pm 0.06\%$ ($p < 0.005$)、 $0.88 \pm 0.13\%$ ($p < 0.1$)と喫煙前より低い値であった。

2) IgAは、マウス血清中IgA量の1/80以下で検出不能であり、IgGはマウス血清中IgG量の1/160程度の濃度で、喫煙前から喫煙40分まで変動は認められなかった。

3) Bromhexine 0.5 mgを静注した場合の気管支洗浄液中lysozymeの総蛋白量に対する百分比は、静注前が $1.01 \pm 0.06\%$ 、30分が $0.86 \pm 0.26\%$ 、60分が $0.94 \pm 0.28\%$ 、90分が $0.92 \pm 0.37\%$ で、経時的な変化は認められなかった。

4) ヒツジ赤血球(SRBC)に対する抗体産生能をddyマウス(8週令)脾臓のPFCでみた実験では、SRBC 10^8 個を用いた場合に、喫煙(-)群の 223300 ± 53785 に比べて喫煙(+)群は 451500 ± 81441 と増加した($p < 0.05$)。ddyマウス(12週令)では、SRBCの多寡にかかわらず、喫煙(+)群のPFCは喫煙(-)群の約1/2～1/3位までに減少していたが、推計学的には有意の差が認められなかった。

5) C57BL/6マウス(8週令)では、

SRBC 10^7 , 10^8 個で喫煙マウス群に有意の PFC 抑制が認められた。

文 献

- 1) 門 政男：呼吸器における局所免疫—気管支洗浄液中の免疫グロブリンおよび lysozyme について—, 日本胸部臨床, 35:893, 1976.
- 2) 門 政男：呼吸器の感染防御機構に関する研究 第2篇 呼吸器感染防御因子としての Lysozyme に関する研究, 京都大学結核研究所紀要, 13:32, 1980.
- 3) 門 政男：呼吸器の感染防御機構に関する研究 第3篇 呼吸器感染防御因子としての気管支洗浄液中液性成分に関する研究, 京都大学結核研究所紀要, 15:70, 1982.
- 4) 大島駿作他：感作家兎肺滲出細胞抽出液中の抗結核菌性物質リゾチームに関する研究, 京都大学結核研究所紀要, 9:154, 1961.
- 5) Lowry, O.H., et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
- 6) Cunningham, A. J., and Szenberg, A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells, Immunology 14: 599, 1968.
- 7) Thomas, W.R., et al.: Development of alterations in the primary immune response of mice by exposure to fresh cigarette smoke, Int. Arch. Allergy, 46: 481, 1974.
- 8) Thomas, W.R., et al.: Humoral immune response of mice with long-term exposure to cigarette smoke, Arch. Environ. Health, 30: 78, 1975.
- 9) Holt, P. G., et al.: Low-tar and high-tar cigarettes, Arch. Environ. Health, 31: 258, 1976.

STUDIES ON THE DEFENCE MECHANISMS IN THE RESPIRATORY SYSTEM

Report IV. Effect of Inhalating Cigarette Smoke on the Levels of Immunoglobulins and Lysozyme in Bronchial Lavage Fluid and the Antibody Production.

Masao KADO, Takateru IZUMI, and Shunsaku OSHIMA

The Second Department of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University

Keiji HASHIMOTO

Department of Internal Medicine, Kyoto City Hospital

In this study, changes in lysozyme, IgA and IgG found in bronchial secretions were examined from mice whose bronchi were stimulated by smoking inhalation. Because the bronchial secretions are irregular in density, when a comparison over time for percentage of total protein is measured, lysozyme in bronchial secretion increases, reacting a peak after 20 minutes. Thus lysozyme secretions from the bronchial gland were considered to have increased due to smoking inhalation. IgA found in bronchial secretions were extremely thin, less than 1/80 of the IgA found in mouse serum, so could not be measured. As for IgG, after 40 minutes of inhalation, there was hardly any change, density being 1/160 of that found in mouse serum.

In order to examine the influence of smoking on mouse immunity, especially regarding immunoglobulin production, as an antigen, sheep red blood cells (SRBC) were used, thus examining their effects on plaque forming cells (PFC) in ddy and C57BL/6 mouse spleens. The fact that smoking worked to suppress or enhance IgM PFC production was here confirmed.

Finally, recognition of the fact that smoking suppresses or enhances immunoglobulin production against SRBC at the mouse spleen level clearly indicates that smoking possesses not only local effects, but influences immunological reactions throughout the organism.