

INFLUENCE OF NICOTINE ON THE FUNCTIONS OF HUMAN
POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES IN VITRO

試験管内ヒト多形核白血球の機能に及ぼす
ニコチンの影響

SUMIKO SASAGAWA, Ph.D. 笹川澄子

KAZUO SUZUKI, Ph.D. 鈴木和男

TATSUICHIRO SAKATANI, M.D. 坂谷達一郎

TOSHIO FUJIKURA, M.D. 藤倉敏夫



RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION

財団法人 放射線影響研究所

A Cooperative Japan - United States Research Organization

日米共同研究機関

A paper based on this report was accepted for publication by:

本報告に基づく論文は下記の雑誌に受理された。

Journal of Leukocyte Biology

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放影研業績報告書集

The RERF Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, and advisory groups. The Technical Report Series is not intended to supplant regular journal publication.

放影研業績報告書は、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は通例の誌上発表論文に代わるものではない。

The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.

放射線影響研究所(元ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足したもので、その経費は日米両政府の平等分担により、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学主院の補助金とをもって運営されている。

INFLUENCE OF NICOTINE ON THE FUNCTIONS OF HUMAN
POLYMPHONUCLEAR LEUKOCYTES IN VITRO試験管内ヒト多形核白血球の機能に及ぼす
ニコチンの影響SUMIKO SASAGAWA, Ph.D. (笹川澄子)¹; KAZUO SUZUKI, Ph.D. (鈴木和男)¹;
TATSUICHIRO SAKATANI, M.D. (坂谷達一郎)^{1,2}; TOSHIO FUJIKURA, M.D. (藤倉敏夫)¹*Departments of Pathology¹ and Medicine²*病理部¹, 臨床部²

SUMMARY

Effects of nicotine on migration, extracellular release of lysosomal enzymes, and superoxide anion (O_2^-) production of human polymorphonuclear leukocytes (PMN) were studied. Nicotine (5×10^{-6} to 5×10^{-4} M) had no effect on random migration, chemotaxis to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMet-Leu-Phe), nor on chemokinesis induced by fMet-Leu-Phe. Nicotine did, however, inhibit extracellular release of β -glucuronidase and myeloperoxidase from PMN which had been exposed to fMet-Leu-Phe and cytochalasin B (CB). Nicotine also inhibited the O_2^- production of PMN induced by fMet-Leu-Phe and CB. The nicotine inhibitions of enzyme release and O_2^- production were not affected by atropine, hexamethonium, or acetyl β -methylcholine, suggesting a direct action of nicotine on PMN functions. Nicotine, in concentrations of 5×10^{-6} to 5×10^{-4} M, was not cytotoxic to PMN. It may be presumed that although nicotine does not affect PMN migration to inflammation sites, it inhibits the ingestion and killing of foreign substances. When tobacco is smoked, PMN circulating in the respiratory organs will be exposed to a high concentration of nicotine. This could suppress PMN function and result in harmful influences on the host defense mechanism, including antitumor function.

要約

ヒト多形核白血球 (PMN) の遊走, ライソゾーム酵素細胞外放出及びスーパーオキシドアニオン (O_2^-) 産生に対するニコチンの効果を検討した。ニコチン (5×10^{-6} ~ 5×10^{-4} M) は自然遊走, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMet-Leu-Phe) に対するケモタキシス及び fMet-Leu-Phe によるケモカイネシスに何ら作用しなかった。しかしながら, fMet-Leu-Phe とサイトカラシン B (CB) で誘発された PMN からの β -グルクロニダーゼ及びミエロパーオキシダーゼの細胞外放出を抑制した。また, fMet-Leu-Phe と CB で誘発された PMN の O_2^- 産生も抑制した。ニコチンの酵素放出及び O_2^- 産生に対する抑制はアトロピン, ヘキサメソニウム, あるいはアセチル β -メチルコリンによって影響を受けなかった。このことはニコチンが PMN に直接作用することを示唆する。ニコチンは 5×10^{-6} ~ 5×10^{-4} M の濃度において PMN に対し細胞毒性を示さなかった。以上の結果, ニコチンは PMN の炎症部位への遊走には影響を与えないものの, 外来異物の消化殺菌を阻害することが考えられる。喫煙時, 呼吸器官を循環している PMN は高濃度のニコチンにさらされるだろう。これは PMN の機能を抑制し, 抗癌作用を含む PMN の宿主生体防御機構に悪影響を及ぼす結果になると推察される。

INTRODUCTION

PMN phagocytose and kill invading microorganisms, and play an important role in the host defense mechanism.¹⁻³ These are primary roles of PMN. Recently it has been reported that PMN kill tumor cells.^{4,5} Thus PMN are recognized as one of the important components in the surveillance and protection mechanisms for a broad spectrum of host defenses.

Smoking has been shown to be a contributing factor in various diseases. It causes a high incidence of bronchopulmonary diseases, including obstructive lung disease and emphysema.⁶⁻⁸ Its carcinogenic potential is especially noted, since smoking is widely known to be a risk factor in the development of lung cancer.^{9,10} Smoking causes a decrease in the number of leukocytes and depresses their functions.¹¹⁻¹³ It has been reported that tobacco smoke extracts inhibit the functions of normal human PMN and that nicotine is a potent inhibitor.¹⁴ Tobacco smoke contains a large number of components such as nicotine, aldehydes, benzopyrenes, tar, and phenols.^{15,16} Nicotine is a principal tobacco alkaloid and it is known as a cholinergic agonist. It may be assumed that nicotine could suppress the role of PMN in host surveillance and defense mechanisms.

In this report, the effects of nicotine, a principal component of tobacco, on human PMN functions of migration, lysosomal enzyme release, and O_2^- production in vitro are presented. The effects of nicotine are also analyzed pharmacologically.

MATERIALS AND METHODS

fMet-Leu-Phe (Protein Research Foundation, Osaka) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS). CB (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted with distilled water immediately before use. The final concentration of DMSO in the reaction was 0.1%. Nicotine bitartrate, atropine sulphate, and acetyl β -methylcholine chloride (Wako Pure Chemical Industries, Osaka), and hexamethonium bromide (Sigma Chemicals) were dissolved in PBS.

Preparation of PMN. Heparinized peripheral blood (20 U/ml of blood) was obtained from healthy volunteers (age 25-35) who were not

緒言

PMNは外来微生物を貪食・殺菌し、宿主の生体防御機構において重要な役割を担っている。¹⁻³ これはPMNの主な役割である。最近、PMNが腫瘍細胞を殺すことが報告された。^{4,5} このようにPMNは、宿主生体防御の監視・防護機構の重要な構成員になっている。

一方、喫煙は様々な疾病を引き起こす原因であると言われており、閉塞性肺疾患及び肺気腫などの気管支肺疾患の発生率を高めている。⁶⁻⁸ 喫煙はまた肺癌発生の危険因子として広く知られていることから、その発癌性は特に注目されている。^{9,10} 喫煙は白血球数を減少させ、またその機能を低下させる。¹¹⁻¹³ タバコの煙の溶液が正常なヒトPMNの機能を抑制し、ニコチンがその原因物質であることが報告されている。¹⁴ タバコの煙にはニコチン、アルデヒド、ベンツピレン、タール、フェノール類等多種多様の成分が含まれている。^{15,16} ニコチンは主要なタバコアルカロイドであり、アセチルコリン作働性物質として知られている。ニコチンが宿主監視防護機構におけるPMNの役割を抑制し得ることが推察される。

本研究では、タバコの主要成分であるニコチンの試験管内におけるヒトPMNの遊走能、ライソゾーム酵素放出能及び O_2^- 産生能に対する影響を検討した。またニコチンの作用を薬理学的に検討した。

材料及び方法

fMet-Leu-Phe(蛋白質研究奨励会、大阪)は燐酸緩衝生理食塩液(PBS)に溶解した。CB(Sigma Chemicals社、St. Louis, Missouri)はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、使用直前に蒸留水で希釈した。反応系におけるDMSOの最終濃度は0.1%であった。酒石酸ニコチン、硫酸アトロピン、塩化アセチル β -メチルコリン(和光純薬、大阪)、及び臭化ヘキサメソニウム(Sigma Chemicals社)はPBSに溶解した。

PMNの調製。 喫煙しない健康人(25-35歳)から得た末梢血をヘパリン処理(20U/ml)した。Böyum

smokers. A pellet containing PMN and erythrocytes was separated from whole blood on a Lymphoprep (Nyegaard Co., Oslo) density gradient by the method of Böyum.¹⁷ A PMN fraction was obtained by sedimentation of the pellet in a 1.5% (w/v) dextran (MW 177,000) PBS solution. Contaminating erythrocytes in the PMN fraction were removed by lysis with a 0.75% ammonium chloride solution containing 20 mM Tris-HCl buffer (final pH 7.2) and 0.25% autologous plasma, for 10 minutes at 37°C, with gentle shaking. Viability of PMN was tested by trypan blue exclusion and was greater than 96%.

Measurement of Migrating Activity. Migration was measured by a modification of Boyden chamber method¹⁸ involving incubation for 45 minutes at 37°C in a CO₂ incubator. PMN were suspended at a concentration of 2×10^6 cells/ml in Hank's balanced salt solution (HBSS) which contained 1% bovine serum albumin and 0.3% NaHCO₃. The migration distance (μ m) of the leading front of cells into a Millipore filter (3.0 μ m pore size; Millipore, Bedford, Massachusetts) was measured. This filter separated the upper PMN from the stimulant below in a Boyden chamber (Bio-Rad Lab, Richmond, California). The resulting value was used to determine random migration, and chemotaxis and chemokinesis in response to fMet-Leu-Phe (10^{-8} M). Following the method of Zigmond and Hirsch,¹⁹ duplicate chambers were used in each experiment and five fields were examined in each filter. Nicotine in each concentration was added both to the upper and lower compartments of the chamber immediately before assay.

Lysosomal Enzyme Release from PMN. Extracellular release of lysosomal enzymes, β -glucuronidase (β -GL), and myeloperoxidase (MPO) was effected in 200 μ l of PMN suspension. The PMN suspension at a concentration of 2×10^6 cells/ml in HBSS was incubated at 37°C for 15 minutes, immediately after the addition of fMet-Leu-Phe (10^{-5} M) and CB (5 μ g/ml). Nicotine (5×10^{-6} to 5×10^{-4} M), atropine (10^{-4} M), hexamethonium (10^{-4} M), and acetyl β -methylcholine (10^{-4} M) were also added to the cells, together with fMet-Leu-Phe and CB. The exposure time of PMN to nicotine, atropine, hexamethonium, or acetyl β -methylcholine was

法¹⁷によりリンホブレップ (Nyegaard 社, Oslo) 密度勾配上で、全血から PMN と赤血球を含むペレットを分離した。PMN 分画は 1.5% (w/v) デキストラン (MW 177,000) PBS 溶液中にペレットを沈降させて得た。PMN 分画に混在する赤血球は、20mM トリス塩酸緩衝液 (最終 pH 7.2) 及び 0.25% 自己血漿を含む 0.75% 塩化アンモニウム溶液中で、37°C で 10 分間静かに振動させて溶解除去した。PMN の生存率は、トリパン青排除によって検討した結果、96% 以上であった。

遊走能の測定。遊走能は CO₂ インキュベーター中で 45 分間、37°C でのインキュベーション過程を含む Boyden チェンバー法変法¹⁸ によって測定した。PMN は、1% ウシ血清アルブミン及び 0.3% 炭酸水素ナトリウムを含む Hank 平衡塩類溶液 (HBSS) 中に 2×10^6 個/ml の濃度で浮遊させた。Boyden チェンバー (Bio-Rad Lab, Richmond, California) 内の上室 PMN と下室刺激物質を分けているミリポアフィルター (孔径 3.0 μ m, Millipore 社, Bedford, Massachusetts) 内へ移動した最先端の細胞の移動距離 (μ m) を測定した。この値を自然遊走、並びに fMet-Leu-Phe (10^{-8} M) に対するケモタキシス及びケモカイネシスの測定に用いた。Zigmond 及び Hirsch の方法¹⁹ に従い、各試験には二つのチェンバーを用い、それぞれのフィルターについて 5 視野を観察した。ニコチンは試験直前にチェンバーの上室あるいは下室に加えた。

PMN からのライソゾーム酵素放出。ライソゾーム酵素の β -グルクロニダーズ (β -GL) 及びミエロパーオキシダーズ (MPO) の細胞外放出は、200 μ l の PMN 浮遊液を用いて行った。HBSS 中に 2×10^6 個/ml の濃度に浮遊させた PMN を、fMet-Leu-Phe (10^{-5} M) 及び CB (5 μ g/ml) 添加後直ちに 37°C、15 分間インキュベートした。ニコチン (5×10^{-6} ~ 5×10^{-4} M)、アトロピン (10^{-4} M)、ヘキサメソニウム (10^{-4} M) 及びアセチル β -メチルコリン (10^{-4} M) は、fMet-Leu-Phe 及び CB と同時に細胞に添加した。fMet-Leu-Phe 及び CB で誘発された PMN からの β -GL 放出は 15 分でプラトーに到達した

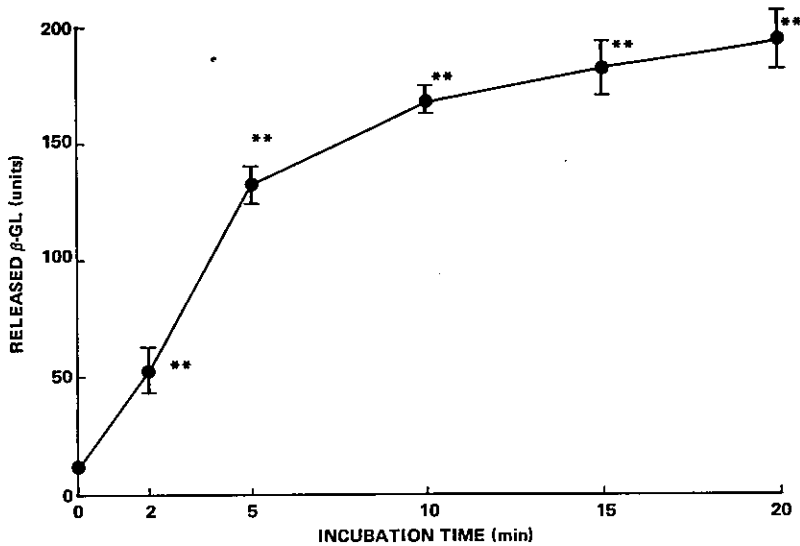


Figure 1. Time course of lysosomal enzyme release from PMN exposed to fMet-Leu-Phe and CB. To 200 μ l of PMN suspension (2×10^6 cells/ml) was added fMet-Leu-Phe (10^{-5} M) and CB (5 μ g/ml), and then incubated at 37°C for various times. The supernatant and PMN were separated by a centrifugation at 3,000 rpm for two minutes at 4°C. The β -GL released from PMN to surrounding medium was measured. Each point and vertical bar represents the mean and SE of four experiments. *** $p < 0.01$

図1 fMet-Leu-PheとCBにさらされたPMNからのライソゾーム酵素放出の経時変化。PMN (2×10^6 個/ml) 200 μ l に fMet-Leu-Phe (10^{-5} M) と CB (5 μ g/ml) を添加し、37°C で種々の時間インキュベートした。4°C で2分間3,000rpm の遠心により上清とPMNを分離した。PMNからメディアム中へ放出された β -GLを測定した。各点とたて棒は4回の実験の平均値と標準誤差を表す。*** $p < 0.01$

set at 15 minutes, since β -GL release from PMN induced by fMet-Leu-Phe and CB reached a plateau in 15 minutes (Figure 1). The supernatant and PMN were separated by centrifugation at 3,000 rpm for two minutes at 4°C. To the PMN pellet was added triton X-100 (0.1%, v/v) and homogenized. After centrifugation of the homogenate at 10,000 rpm for 20 minutes at 4°C, the supernatant (cell supernatant) was provided to measure the remaining enzyme activities in PMN.

Measurement of Enzyme Activity. β -GL released into the supernatant and that remained in the cells were measured according to the microassay method.²⁰ The reaction mixture consisted of supernatant (or cell supernatant), 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide, 0.1% triton X-100, 100 mM acetate buffer (pH 3.5) in a total volume of 100 μ l was incubated at

ので(図1), PMNを上記被検物質にさらす時間は15分とした。上清とPMNは4°C, 2分間, 3,000 rpmの遠心により分離した。PMNペレットにトリトンX-100(0.1%, v/v)を加えホモジナイズした。ホモジネートを4°C, 20分間, 10,000rpmで遠心し, 分離された上清(細胞上清)をPMNの細胞内残存酵素活性の測定に用いた。

酵素活性の測定。上清中に放出された β -GL及び細胞内残存 β -GLは微量定量法²⁰により測定した。上清(又は細胞上清), 1 mM 4-メチルウンベリフェリル- β -D-グルクロニド, 0.1%トリトンX-100, 100 mM 酢酸緩衝液(pH 3.5)から成る反応混合液100 μ l

37°C for 60 minutes. The reaction was terminated by addition of 2.4 ml of 50 mM glycine buffer (pH 10.4) containing 5 mM EDTA. Fluorescence was measured in a fluorometer at an excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 450 nm. The enzyme activity was expressed as 4-methylumbelliferone formation in pmol/min/ml of 2×10^6 PMN supernatant (units). MPO was measured according to a sensitive and simple assay method.²¹ The reaction mixture consisted of supernatant (or cell supernatant), 1.6 mM tetramethyl benzidine, 0.3 mM H₂O₂, 30 mM sodium citrate buffer (pH 5.4), 8% N,N-dimethyl formamide, and 40% PBS in a total volume of 500 μ l; which was incubated at 37°C for three minutes. The reaction was terminated by cooling in an ice bath and by adding 1.75 ml of 200 mM sodium citrate buffer (pH 3.0). The MPO product was measured in a spectrophotometer at a wavelength of 655 nm. The activity was expressed as $\Delta A_{655}/\text{min}/\text{ml}$ of 2×10^6 PMN supernatant (units).

Total enzyme activities of both β -GL and MPO were evaluated as the released activity from PMN and the one remaining in PMN. Presence of nicotine, atropine, hexamethonium, or acetyl β -methylcholine up to 5×10^{-2} M in the reaction mixtures of both β -GL and MPO did not affect the measurements of enzyme activities.

Measurement of O₂⁻ Production. O₂⁻ was assayed continuously by the reduction of ferricytochrome c, using a spectrophotometer at a wavelength of 550 nm.²² The PMN suspension, at a concentration of 1×10^6 cells/ml in HBSS, was pre-incubated for 10 minutes at 37°C in 1 ml polystyrene cuvettes, which respectively contain atropine (10^{-4} M), hexamethonium (10^{-4} M), and acetyl β -methylcholine (10^{-4} M). After the addition of ferricytochrome c (66 μ M, Sigma Chemicals, Type VI) and nicotine, then fMet-Leu-Phe (10^{-6} M) and CB (5 μ g/ml) were added to the cuvette to initiate the reaction, and the maximum reduction was recorded as ΔA_{550} . One unit was expressed as $\Delta A_{550}/\text{min}/1 \times 10^6$ PMN.

Cytotoxicity Test of Nicotine on PMN. PMN were incubated at 37°C for 15 minutes with each level of concentration of nicotine. Extracellular

を37°C, 60分間インキュベートした。5 mM EDTA を含む50 mM グリシン緩衝液 (pH 10.4) 2.4 ml を加え反応を停止させた。発生蛍光を蛍光光度計の励起波長365 nm, 発光波長450 nm で測定した。酵素活性は pmol/min/ml の 2×10^6 PMN 上清(単位)で、4-メチルウンベリフェロン形成として表現した。MPO は高感度簡便測定法²¹ により測定した。反応混合液は上清 (又は細胞上清), 1.6 mM テトラメチルベンジジン, 0.3 mM 過酸化水素, 30 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.4), 8% N,N-ジメチルホルムアミド, 40% PBS より成り, 全量500 μ l であった。この混合液を37°C, 3分間インキュベートした。反応は氷水中で冷却し, 200 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) 1.75 ml を添加して停止させた。MPO 反応生成物を分光光度計の波長655 nm で測定した。酵素活性は $\Delta A_{655}/\text{min}/\text{ml}$ の 2×10^6 PMN 上清 (単位)として表現した。

β -GL 及び MPO の全酵素活性は, PMN から放出された活性と PMN 内に残存する活性の和で評価した。 β -GL 及び MPO 両酵素反応混合液中にニコチン, アトロピン, ヘキサメソニウム, あるいはアセチル β -メチルコリンが存在した場合, 5×10^{-2} M まで酵素活性の測定に影響を与えなかった。

O₂⁻ 産生の測定. O₂⁻ 産生は分光光度計の波長550 nm を用い, フェリチクローム c の還元の連続的測定により行った。²² HBSS 中に 1×10^6 個/ml で浮遊させた PMN をアトロピン (10^{-4} M), ヘキサメソニウム (10^{-4} M), あるいはアセチル β -メチルコリン (10^{-4} M) を含む 1 ml のポリスチレンキュベット中で37°C, 10分間インキュベートした。フェリチクローム c (66 μ M, Sigma Chemicals 社, Type VI) 及びニコチンを添加した後, fMet-Leu-Phe (10^{-6} M) と CB (5 μ g/ml) をキュベットに添加し反応を開始させ, 最大還元を ΔA_{550} として記録した。1 単位を $\Delta A_{550}/\text{min}/1 \times 10^6$ PMN として表現した。

ニコチンの PMN に対する細胞毒性試験. PMN に各濃度のニコチンを添加し, 37°C, 15分間インキュベートした。ニコチンが PMN に損傷を与えるか否か

release of cytoplasmic enzyme, lactate dehydrogenase (LDH), through the damaged cell membrane was determined by the method of Wacker et al,²³ in order to examine whether nicotine induces damage to PMN. Enzyme activity in the supernatant of the cell suspension to which had been added the detergent, triton X-100 (0.1%, v/v) was expressed as percent of the total activity. The trypan blue exclusion test was carried out by microscopic count of cells. The outcome involved counting cells not stained by 1% trypan blue, and was expressed as percent of unstained cells to total cell number.

Statistical Analysis. The data were represented as the mean with standard error (SE) of the combined experiments and differences were analyzed for significance using t-test.

RESULTS

Effects of Nicotine on PMN Migration. Figure 2 shows the effects of nicotine on the migration of PMN. Random migration, chemotaxis to fMet-Leu-Phe (10^{-8} M), and chemokinesis induced by fMet-Leu-Phe (10^{-8} M) had respective migration distances of $40.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$, $79.8 \pm 5.3 \mu\text{m}$, and $45.9 \pm 6.5 \mu\text{m}$ (mean \pm SE), into Millipore filters. Addition of nicotine, in concentrations from 5×10^{-6} to 5×10^{-4} M, to the PMN did not effect migration activities.

Effects of Nicotine on the Extracellular Release of Lysosomal Enzymes. Lysosomal enzymes were released extracellularly from PMN which had been exposed to fMet-Leu-Phe (10^{-5} M) and CB ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$). The activities released were 222.98 ± 17.53 units for β -GL, and 20.93 ± 3.89 units for MPO. Nicotine (5×10^{-5} to 5×10^{-4} M) inhibited release of β -GL from PMN, and nicotine (10^{-4} to 5×10^{-4} M) inhibited release of MPO from PMN (Figure 3). On the other hand, Table 1 shows that the remaining enzyme activities in PMN tended to increase in contrast to the decrease in release of enzymes. Total enzyme activities in both β -GL and MPO, however, did not differ between control and nicotine-treated groups (Table 1). These results indicate that extracellular release of lysosomal enzymes from PMN is interfered by nicotine, but both enzyme activities released from PMN and remained in PMN are not affected by nicotine.

を調べるために、Wacker らの方法²³により、細胞質酵素である乳酸脱水素酵素 (LDH) の障害のある細胞膜を通った細胞外漏出を測定した。トリトン X-100 (0.1%, v/v) 添加の細胞上清の酵素活性を全活性に対する百分率で表現した。トリパン青排除試験は顕微鏡下の細胞数算定により行った。1% トリパン青に染まらない細胞の数を全細胞数に対する百分率で表現した。

統計処理. 実験値は平均値 (mean) と標準誤差で表現し、有意差検定は t-検定で行った。

結果

PMN 遊走に対するニコチンの影響. 図 2 に PMN の遊走に対するニコチンの影響を示す。自然遊走、fMet-Leu-Phe (10^{-8} M) に対するケモタキシス及び fMet-Leu-Phe (10^{-8} M) で誘発されたケモカイネシスにおいて、ミリポアフィルター内移動距離は各々 $40.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$, $79.8 \pm 5.3 \mu\text{m}$, $45.9 \pm 6.5 \mu\text{m}$ (平均 \pm 標準誤差) であった。ニコチンを PMN に加えた場合、 5×10^{-6} ~ 5×10^{-4} M まで遊走能は影響を受けなかった。

ライソゾーム酵素細胞外放出に対するニコチンの影響. ライソゾーム酵素は fMet-Leu-Phe (10^{-5} M) と CB ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) にさらされた PMN から細胞外へ放出させた。放出された酵素活性は β -GL の場合 222.98 ± 17.53 単位、MPO の場合は 20.93 ± 3.89 単位であった。ニコチン (5×10^{-5} ~ 5×10^{-4} M) の濃度は PMN から β -GL の放出を抑制し、 10^{-4} ~ 5×10^{-4} M の濃度は MPO の放出を抑制した (図 3)。表 1 に示すように、酵素放出の減少に伴って PMN 内残存酵素活性は増加する傾向にあった。 β -GL と MPO の全酵素活性については、対照群とニコチン処理群の間に差は認められなかった (表 1)。これらの結果はニコチンが PMN からのライソゾーム酵素細胞外放出を阻害することを示している。しかしながら PMN から放出された酵素及び細胞内残存酵素の両活性ともニコチンの影響を受けていない。

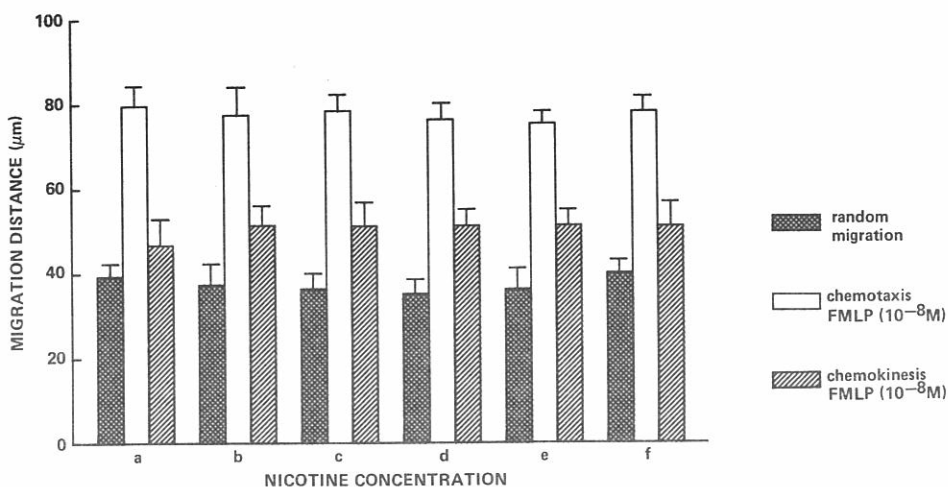


Figure 2. Effects of nicotine on PMN migration. PMN in a Boyden chamber were incubated at 37°C in a CO₂ incubator for 45 minutes. The distance migrated into a 3.0 μm pore-diameter Millipore filter was measured. a-f indicate concentration of nicotine; a: 0 M, b: 5 × 10⁻⁶ M, c: 10⁻⁵ M, d: 5 × 10⁻⁵ M, e: 10⁻⁴ M, f: 5 × 10⁻⁴ M. Each column and vertical bar represents the mean and SE of five experiments.

図2 PMNの遊走に対するニコチンの影響。Boyden チェンバー内のPMNをCO₂ インキュベーター中で45分間、37°Cでインキュベートした。孔径3.0μmのミリポアフィルター内への移動距離を測定した。a~fはニコチンの濃度を示す。a: 0 M, b: 5 × 10⁻⁶ M, c: 10⁻⁵ M, d: 5 × 10⁻⁵ M, e: 10⁻⁴ M, f: 5 × 10⁻⁴ M。各柱棒とたて棒は5回の実験の平均値と標準誤差を表す。

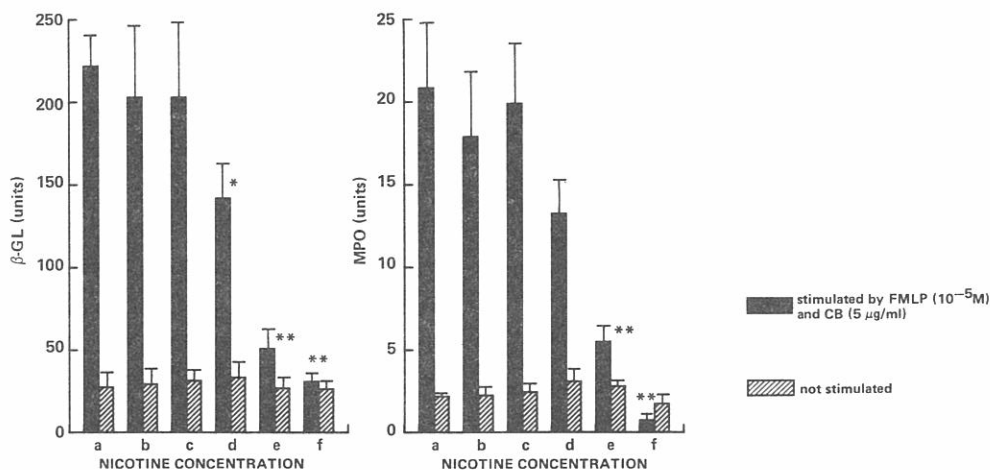


Figure 3. Effects of nicotine on the extracellular release of lysosomal enzymes from PMN. Left: β-GL. Right: MPO. Nicotine was added to PMN together with fMet-Leu-Phe (10⁻⁵ M) and CB (5 μg/ml). After incubation at 37°C for 15 minutes, enzymes released from PMN were measured. Each enzyme activity was expressed in units. a-f indicate concentration of nicotine; a: 0 M, b: 5 × 10⁻⁶ M, c: 10⁻⁵ M, d: 5 × 10⁻⁵ M, e: 10⁻⁴ M, f: 5 × 10⁻⁴ M. Each column and vertical bar represents the mean and SE of five experiments. *p < 0.05, **p < 0.01

図3 PMNからのライソゾーム酵素細胞外放出に対するニコチンの影響。左: β-GL。右: MPO。ニコチンはfMet-Leu-Phe (10⁻⁵ M)とCB (5 μg/ml)とともにPMNに添加した。37°C、15分間インキュベートした後、PMNから放出された酵素活性を測定した。各酵素活性は単位で表した。a~fはニコチンの濃度を示す。a: 0M, b: 5 × 10⁻⁶ M, c: 10⁻⁵ M, d: 5 × 10⁻⁵ M, e: 10⁻⁴ M, f: 5 × 10⁻⁴ M。各柱棒とたて棒は5回の実験の平均値と標準誤差を表す。* p < 0.05, ** p < 0.01

TABLE 1 LYSSOMAL ENZYME ACTIVITIES OF NICOTINE-TREATED PMN

表1 ニコチン処理 PMN のライソゾーム酵素活性

Concentration (M)	β -GL (units \pm SE)		MPO (units \pm SE)	
	Remaining	Total	Remaining	Total
0	371.9 \pm 60.4	594.9 \pm 73.7	33.65 \pm 7.27	54.58 \pm 10.57
5×10^{-6}	337.1 \pm 91.8	539.0 \pm 121.2	26.90 \pm 5.23	45.00 \pm 8.58
10^{-5}	335.5 \pm 82.1	538.1 \pm 126.9	32.35 \pm 6.00	52.41 \pm 9.46
5×10^{-5}	372.0 \pm 76.6	515.3 \pm 98.2	34.02 \pm 5.57	47.43 \pm 7.31
10^{-4}	481.6 \pm 153.6	533.5 \pm 158.0	50.04 \pm 9.12	55.65 \pm 9.27
5×10^{-4}	490.1 \pm 99.7	522.5 \pm 102.6	56.56 \pm 7.93	57.45 \pm 8.05

To PMN (2×10^6 cells/ml) in a volume of 200 μ l were added each concentration of nicotine together with fMet-Leu-Phe (10^{-5} M) and CB (5 μ g/ml), and then incubated at 37°C for 15 minutes. After centrifugation at 3,000 rpm for two minutes at 4°C, remaining enzyme activities in the cells were measured. Total enzyme activity was evaluated as the sum of released and remaining ones. Each value is the mean with SE of five experiments.

200 μ l の PMN (2×10^6 個/ml) に fMet-Leu-Phe (10^{-5} M) と CB (5 μ g/ml) とともに各濃度のニコチンを添加し、37°C、15分間インキュベートした。3,000rpm で 4°C、2分間、遠心分離した後、細胞内に残存する酵素活性を測定した。全酵素活性は放出活性と残存活性の和で評価した。各値は5回の実験の平均値と標準誤差である。

In order to analyze the inhibition of enzyme release due to nicotine, atropine (acetylcholine muscarinic antagonist), hexamethonium (nicotinic antagonist), and acetyl β -methylcholine (cholinergic agonist) were used. They were added in concentration of 10^{-4} M to PMN in both the presence and absence of nicotine (10^{-4} M). These agents did not prevent the inhibition by nicotine, which was determined to be 21.9% for β -GL and 29.5% for MPO release, in comparison to the control (Table 2). They also did not affect enzyme release induced by fMet-Leu-Phe and CB in the absence of nicotine (Table 3).

Effects of Nicotine on O_2^- Production. O_2^- production induced by fMet-Leu-Phe (10^{-6} M) and CB (5 μ g/ml) was 0.093 ± 0.011 units. Nicotine (5×10^{-5} to 5×10^{-4} M) inhibited O_2^- production (Figure 4). This inhibition by nicotine was also analyzed using the above-mentioned two cholinergic antagonists and one agonist. Addition of atropine (10^{-4} M), hexamethonium (10^{-4} M), or acetyl β -methylcholine (10^{-4} M) to PMN did not affect the

ニコチンの酵素放出抑制作用を検討するために、アセチルコリンのムスカリン性拮抗薬のアトロピン、ニコチン性拮抗薬のヘキサメソニウム、及びコリン作働性薬のアセチル β -メチルコリンを用いた。ニコチン (10^{-4} M) の存在下及び非存在下において 10^{-4} M の濃度で PMN に添加した。これらの薬物は、対照群に比べて β -GL の放出では 21.9%、MPO では 29.5% を示し、ニコチンの抑制作用を阻害しなかった (表 2)。またニコチン非存在下における fMet-Leu-Phe と CB 誘発の酵素放出にも影響を及ぼさなかった (表 3)。

O_2^- 産生に対するニコチンの影響。fMet-Leu-Phe (10^{-6} M) 及び CB (5 μ g/ml) で誘発された O_2^- 産生は 0.093 ± 0.011 単位であった。ニコチン (5×10^{-5} ~ 5×10^{-4} M) は O_2^- 産生を抑制した (図 4)。このニコチンの抑制作用を上記 2 種のアセチルコリン作用拮抗薬及び 1 種の作働性薬を用いて検討した。アトロピン (10^{-4} M)、ヘキサメソニウム (10^{-4} M)、あるいはアセチル β -メチルコリン (10^{-4} M) を PMN に

TABLE 2 EFFECTS OF CHOLINERGIC AGONISTS AND ANTAGONISTS ON
NICOTINE INHIBITION OF ENZYME RELEASE FROM PMN
表2 ニコチンのPMNからの酵素放出抑制に対するコリン作働性薬
及び拮抗薬の影響

Agent	β -GL	MPO
	Units \pm SE	Units \pm SE
None	48.73 \pm 8.04	5.18 \pm 0.96
Atropine (10^{-4} M)	53.20 \pm 8.64	4.57 \pm 0.58
Hexamethonium (10^{-4} M)	56.75 \pm 8.89	4.67 \pm 0.66
Acetyl β -methylcholine (10^{-4} M)	52.45 \pm 3.31	4.87 \pm 0.47

To a 200 μ l volume of PMN (2×10^6 cells/ml) each agent was added together with fMet-Leu-Phe (10^{-5} M) and CB (5μ g/ml) in the presence of nicotine (10^{-4} M). After incubation at 37°C for 15 minutes, the enzyme activities released from the PMN to the surrounding medium were measured. Each value is the mean with SE of four experiments.

各試薬はニコチン (10^{-4} M) 存在下で fMet-Leu-Phe (10^{-5} M) と CB (5μ g/ml) とともに PMN (2×10^6 個/ml) 200 μ l に添加した。 37°C , 15分間インキュベートした後, PMN からメディアウム中に放出された酵素活性を測定した。各値は4回の実験の平均値と標準誤差である。

TABLE 3 EFFECTS OF CHOLINERGIC AGONISTS AND ANTAGONISTS ON
THE ENZYME RELEASE FROM PMN
表3 PMNからの酵素放出に対するコリン作働性薬
及び拮抗薬の影響

Agent	β -GL	MPO
	Units \pm SE	Units \pm SE
None	253.15 \pm 22.15	22.27 \pm 2.16
Atropine (10^{-4} M)	263.60 \pm 24.24	21.69 \pm 3.11
Hexamethonium (10^{-4} M)	243.60 \pm 24.98	22.79 \pm 1.79
Acetyl β -methylcholine (10^{-4} M)	250.23 \pm 19.95	22.80 \pm 2.12

To a 200 μ l volume of PMN (2×10^6 cells/ml) each agent was added together with fMet-Leu-Phe (10^{-5} M) and CB (5μ g/ml) in the absence of nicotine. After incubation at 37°C for 15 minutes, the enzyme activities released from PMN to the surrounding medium were measured. Each value is the mean with SE of four experiments.

各試薬はニコチン非存在下で fMet-Leu-Phe (10^{-5} M) と CB (5μ g/ml) とともに PMN (2×10^6 個/ml) 200 μ l に添加した。 37°C , 15分間インキュベートした後, PMN からメディアウム中に放出された酵素活性を測定した。各値は4回の実験の平均値と標準誤差である。

inhibition due to nicotine (10^{-4} M) which reduced O_2^- production to 30% of the control (Table 4). In the absence of nicotine, they did not affect O_2^- production (Table 4).

Cytotoxicity of Nicotine on PMN. Table 5 shows the effect of nicotine on LDH leakage and trypan blue exclusion from PMN. There was no difference in LDH leakage and trypan blue exclusion between the PMN exposed to nicotine (5×10^{-6} to 5×10^{-4} M) and the nonexposed control cells, which suggests that nicotine is not cytotoxic to PMN.

添加しても, O_2^- 産生を対照群の30%に減少させるニコチン (10^{-4} M) の抑制作用に影響を与えなかった (表4)。ニコチン非存在下においても O_2^- 産生に影響を与えなかった (表4)。

ニコチンのPMNに対する細胞毒性。表5はPMNからのLDH漏出及びトリパン青排除に対するニコチンの影響を示している。ニコチン (5×10^{-6} ~ 5×10^{-4} M) にさらされたPMN群と, さらにされていない対照群との間に差は認められなかった。ニコチンがPMNに対し細胞毒性を有することは示唆されない。

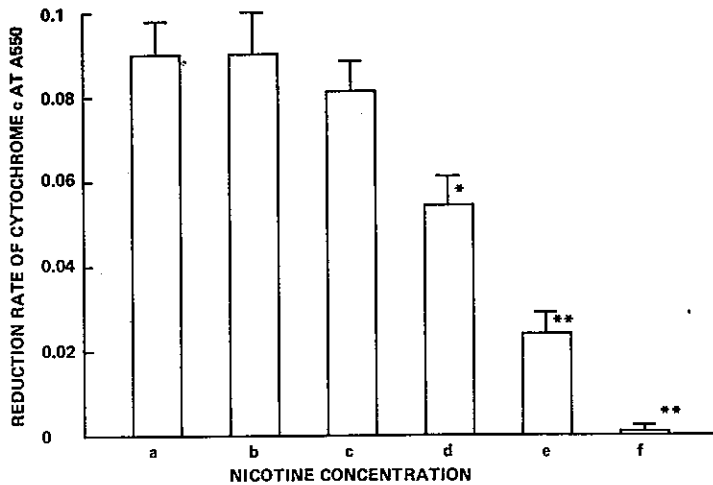


Figure 4. Effects of nicotine on PMN O_2^- production. Nicotine was added to PMN together with ferricytochrome c ($66 \mu M$). After two minutes, fMet-Leu-Phe (10^{-6} M) and CB ($5 \mu g/ml$) were added to PMN to initiate the reaction. Reduction rate of ferricytochrome c at A550 was expressed in units. a-f indicate concentration of nicotine; a: 0 M, b: 5×10^{-6} M, c: 10^{-5} M, d: 5×10^{-5} M, e: 10^{-4} M, f: 5×10^{-4} M. Each column and vertical bar represents the mean and SE of five experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図4 PMN O_2^- 産生に対するニコチンの影響。ニコチンはフェリチクロームc ($66 \mu M$) とともに PMN に添加した。2 分後、fMet-Leu-Phe (10^{-6} M) と CB ($5 \mu g/ml$) を PMN に添加し反応を誘発した。A550 におけるフェリチクロームc 還元速度を単位で表した。a~f はニコチンの濃度を示す。a: 0M, b: 5×10^{-6} M, c: 10^{-5} M, d: 5×10^{-5} M, e: 10^{-4} M, f: 5×10^{-4} M. 各柱棒とたて棒は 5 回の実験の平均値と標準誤差を表す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

TABLE 4 EFFECTS OF CHOLINERGIC AGONISTS AND ANTAGONISTS ON NICOTINE INHIBITION OF O_2^- PRODUCTION IN PMN

表4 ニコチンの PMN O_2^- 産生抑制に対するコリン作働性薬及び拮抗薬の影響

Agent	Units	
	With nicotine	Without nicotine
None	0.031 ± 0.006	0.093 ± 0.011
Atropine (10^{-4} M)	0.028 ± 0.006	0.093 ± 0.006
Hexamethonium (10^{-4} M)	0.031 ± 0.010	0.096 ± 0.015
Acetyl β -methylcholine (10^{-4} M)	0.028 ± 0.006	0.097 ± 0.011

PMN (1×10^6 cells/ml, 1 ml volume) were preincubated with each agent at $37^\circ C$ for 10 minutes. After the addition of nicotine (10^{-4} M) and of ferricytochrome c ($66 \mu M$), the PMN were stimulated by fMet-Leu-Phe (10^{-6} M) and CB ($5 \mu g/ml$) to produce O_2^- . Each value is the mean reduction rate of ferricytochrome c at A550 with SE of four experiments.

PMN (1×10^6 個/ml, 量 1 ml) を各試薬とともに $37^\circ C$, 10 分間インキュベートした。ニコチン (10^{-4} M) 及びフェリチクロームc ($66 \mu M$) を添加した後、fMet-Leu-Phe (10^{-6} M) と CB ($5 \mu g/ml$) により PMN を刺激し O_2^- 産生を誘発した。各値は 4 回の実験の A550 でのフェリチクロームc 還元速度の平均値と標準誤差である。

TABLE 5 CYTOTOXICITY OF NICOTINE ON PMN
表5 PMN に対するニコチンの細胞毒性

Nicotine concentration (M)	LDH leakage	Trypan blue exclusion
	% \pm SE	% \pm SE
0	8.6 \pm 0.9	96.3 \pm 0.5
5×10^{-6}	8.3 \pm 0.9	96.0 \pm 0.9
10^{-5}	9.1 \pm 0.4	96.0 \pm 1.1
5×10^{-5}	9.1 \pm 0.5	95.3 \pm 1.3
10^{-4}	8.6 \pm 0.3	96.0 \pm 1.1
5×10^{-4}	8.8 \pm 0.6	97.3 \pm 0.9

PMN (2×10^6 cells/ml) in a 200 μ l volume were exposed to each concentration of nicotine. Each experimental trial lasted for 15 minutes at 37°C. LDH leakage was expressed as percent of the leaked amount in relation to the total amount. Trypan blue exclusion was expressed as percent of the unstained cell number in relation to total cell number. Each value is the mean with SE of four experiments.

PMN (2×10^6 個/ml) 200 μ l は各濃度のニコチンにさらされた。各実験は37°C, 15分間なされた。LDH 漏出は全 LDH 量に対する漏出量の百分率で表した。トリパン青排除は全細胞数に対する染まらない細胞の数の百分率で表した。各値は4回の実験の平均値と標準誤差である。

DISCUSSION

In our findings, nicotine did not affect the migrating activities of PMN, their random migration, chemotaxis to fMet-Leu-Phe, or chemokinesis induced by fMet-Leu-Phe, all of which were assessed using the modified Boyden chamber method. Bridges et al²⁴ showed that the water-soluble fraction (WSF) of the particle phase of tobacco smoke inhibited both directional and random migrations. Corberand et al¹⁴ reported that the WSF obtained from tobacco smoke and nicotine depressed the capillary tube random migration of whole blood, but that agarose random migration of purified PMN exposed to WSF was normal. Results obtained using whole blood may reflect the effect of a plasma factor, as Corberand et al²⁵ indicated. And these results may indicate the effect of tobacco smoke on PMN in vivo.^{14,25} Our results, obtained using pure nicotine solution and purified PMN, are in agreement with the results of Corberand et al¹⁴ using WSF and purified PMN. Tobacco smoke components, including nicotine, do not seem to be effective as an influence on PMN migrating activities. Moreover, assay methods and/or test agents may be important factors, influencing the experimental results.

考 察

本実験においてニコチンは、自然遊走、fMet-Leu-Phe に対するケモタキシス及び fMet-Leu-Phe 誘発のケモカイネシスの PMN の遊走能に何ら影響を与えなかった。測定はすべて Boyden チェンバー法変法によってなされた。Bridges ら²⁴ は、タバコの煙の粒子相の水溶性分画 (WSF) が方向性をもった遊走と自然遊走の両方を抑制することを報告した。Corberand ら¹⁴ は、タバコの煙から得た WSF 及びニコチンが全血の毛細管内自然遊走を抑制するが、WSF にさらされた単離 PMN のアガロース自然遊走は正常であることを報告した。Corberand ら²⁵ が示すように、全血で得た結果は血漿因子の影響を反映しているかもしれない。更に、生体内での PMN に対するタバコの煙の影響を示唆するものかもしれない。^{14,25} ニコチン溶液と単離 PMN を用いて得た今回の結果は、WSF と単離 PMN を用いた Corberand ら¹⁴ の結果と一致している。ニコチンを含むタバコの煙の成分は、PMN の遊走能に対し強い影響は及ぼさないと考えられる。更に、測定法や試薬は実験結果を左右する因子になり得るだろう。

It has been reported that human PMN release β -GL, acid phosphatase, and elastase and that they fail to exclude trypan blue when incubated in vitro with cigarette smoke condensate.²⁶ This smoke contains various toxic components. Such substances (other than nicotine) might induce release of lysosomal hydrolases from PMN and show cytotoxicity to PMN, since in the present study nicotine showed neither enhanced β -GL and MPO release from PMN in the absence of fMet-Leu-Phe and CB, nor cytotoxicity to PMN. In leukocyte cytochemical tests, alkaline phosphatase, and MPO activities of smokers' neutrophils are not different from those of nonsmokers.²⁵ This report from Corberand et al²⁵ suggested that lysosomal enzymes contained in the PMN are not changed by smoking. Nicotine does not appear to change the activities of β -GL and MPO, because nicotine did not affect the measurements of both enzyme activities in the present experiment, and because the total enzyme activities in nicotine-treated groups were the same as in the control group (Table 1). However, the lysosomal enzyme-releasing activity responsible for bactericidal function of PMN is presumed to be different between smokers and nonsmokers. Nicotine's suppression of lysosomal enzyme release from PMN exposed to fMet-Leu-Phe and CB, as shown in this study, may show that nicotine aids PMN through binding of PMN to nicotine-specific affinity sites,²⁷ and inhibits PMN activation by stimulants. Moreover, it is possible that nicotine permeating into the cell influences the process in which PMN are converted to secretory cells by CB.²⁸ Thus, nicotine could suppress the lysosomal enzyme-releasing activity of PMN.

Corberand et al¹⁴ demonstrated a suppressive effect of WSF on nitroblue tetrazolium reduction in the case of both stimulated and resting PMN in vitro; this effect was not nicotine dependent. However, nicotine showed marked suppression of O_2^- production in the present study. This suggests that nicotine impairs the O_2^- producing system in PMN which have been stimulated by fMet-Leu-Phe and CB. Nicotine could impair the NAD(P)H-oxidation enzyme system in the plasma membrane of PMN^{29,30} directly by permeated nicotine and/or indirectly through membrane-bound nicotine.

試験管内ヒト PMN がタバコ煙凝集液でインキュベートされた場合、 β -GL、酸性ホスファターゼ及びエラスターゼを放出し、トリパン青排除ができなくなることが報告されている。²⁶ この煙は種々の毒性成分を含んでいる。本研究でニコチンは fMet-Leu-Phe と CB が添加されない PMN で、 β -GL 及び MPO 放出の亢進も PMN に対する細胞毒性も示さなかったので、そのような毒性物質（ニコチン以外の）がライソゾーム水解酵素放出を促し、細胞毒性を発現することが推察される。白血球細胞化学実験では、喫煙者と非喫煙者の好中球アルカリホスファターゼ及び MPO の活性に差は認められていない。²⁵ Corberand らのこの報告²⁵ では、PMN 内のライソゾーム酵素は喫煙によって変化を受けないことが示唆されている。本実験では、ニコチンは β -GL 及び MPO の活性測定に影響せず、またニコチン処理群の全酵素活性が対照群のそれと同じであったので（表 1）、ニコチンは両酵素活性を変化させないと考えられる。しかし殺菌機能をもつライソゾーム酵素の放出には、喫煙者と非喫煙者の間に差異があることが推察される。本研究で示したように、ニコチンが fMet-Leu-Phe と CB にさらされた PMN からのライソゾーム酵素放出を抑制したことは、ニコチンが PMN のニコチン特異的親和性部位²⁷ への結合を介して PMN に作用し、刺激物による PMN の活性化を阻止することを示唆するかもしれない。更に、細胞内に侵透したニコチンが、CB によって PMN が分泌細胞に変化する過程²⁸ に影響している可能性もある。このようにニコチンは PMN のライソゾーム酵素放出能を抑制し得ると推察される。

Corberand ら¹⁴ は試験管内で刺激を受けた PMN 及び静的状態の PMN の場合、WSF がニトロブルーテトラゾリウム還元を抑制的効果を有することを示したが、この効果はニコチンに依存するものではなかった。しかし本研究ではニコチンは O_2^- 産生を顕著に抑制した。このことは、ニコチンが fMet-Leu-Phe と CB によって刺激された PMN の O_2^- 産生系に障害を与えることを示唆する。細胞内に侵透したニコチンによって直接的に、あるいは膜に結合したニコチンによって間接的に、膜内の NAD(P)H-酸化酵素系^{29,30} が障害を受ける可能性がある。

Nicotine, a tobacco alkaloid, binds to the nicotinic acetylcholine receptor sites of ganglia and neuromuscular junctions, and is involved in stimuli transmission.³¹ Human blood cells, lymphocytes³² and granulocytes³³ are known to possess cholinergic receptors. Davis et al²⁷ demonstrated that noncholinergic nicotine receptors exist on human PMN, and that these receptors can be occupied in solutions with the same concentration of nicotine as is found in the blood of smokers.

Nicotine's inhibitory effects on enzyme release and O_2^- production were analyzed using atropine, hexamethonium, and acetyl β -methylcholine in the present study. Atropine is acetylcholine muscarinic antagonist (muscarinic receptor blocker), hexamethonium acetylcholine nicotinic antagonist (nicotinic receptor blocker), and acetyl β -methylcholine acetylcholinergic agonist (receptor stimulant). Nicotine effects were not affected by these agents. It is presumed that nicotine acts directly on PMN through the nicotine-specific affinity sites. Furthermore, the evidence that the above three agents had no influence themselves on enzyme release and O_2^- production of PMN induced by fMet-Leu-Phe and CB indicates little or no responsibility of cholinergic effects in these functions of PMN.

Thus, the result here implies that nicotine is one tobacco component which could impair substantially the functions of PMN, but it was not cytotoxic to PMN, although tested concentration ranges in the present study were higher than the average nicotine level (203 nmol/l) in the blood of smokers.³⁴ During smoking, PMN circulating in the lung might be exposed to the nicotine permeating the lung parenchyma. Such PMN could be suppressed in their defense function, not only against foreign-invading substances but also against neoplasia which are reported to be involved in PMN surveillance.^{4,5} Nicotine introduced by smoking thus could provide conditions favorable for infection and cancer.

タバコアルカロイドであるニコチンは、神経節及び神経節接合部のニコチン性アセチルコリン受容体に結合し、刺激伝達に関与する。³¹ ヒト血液細胞のリンパ球³²と顆粒球³³は、コリン作働性受容体を有することが知られている。Davisら²⁷は非コリン作働性ニコチン受容体がヒトPMNにあり、喫煙者の血液中のニコチンと同濃度の溶液で占められてしまうことを報告している。

本研究ではアトロピン、ヘキサメソニウム及びアセチル β -メチルコリンを用い、酵素放出及び O_2^- 産生に対するニコチンの抑制作用を検討した。アトロピンはムスカリン性アセチルコリン拮抗薬(ムスカリン様受容体遮断薬)、ヘキサメソニウムはニコチン性アセチルコリン拮抗薬(ニコチン様受容体遮断薬)、アセチル β -メチルコリンはアセチルコリン作働性薬(受容体刺激薬)である。ニコチンの作用はこれらの試薬によって影響を受けなかった。ニコチンは、ニコチン特異的親和性部位を介してPMNに直接作用すると考えられる。更に、上記3種試薬がそれぞれ自体ではfMet-Leu-PheとCBで誘発されたPMNの酵素放出と O_2^- 産生に影響を与えなかったことは、PMNのこれらの機能にコリン作働性効果がほとんどあるいは全く関与しないことを示唆する。

今回の結果は、ニコチンがPMNの機能に障害を与える可能性のあるタバコ成分であることを示している。しかし実験で用いた濃度範囲が喫煙者の血液中の平均ニコチン濃度(203 nmol/l)より高かった³⁴にもかかわらずPMNに対し細胞毒性を有さなかった。喫煙時、肺を循環するPMNは肺実質に浸透したニコチンにさらされると考えられる。そのPMNは外来異物に対する防御機能ばかりか、PMN監視に関係しているといわれている悪性新生物に対する防御機能^{4,5}の低下をも来すと考えられる。喫煙によって体内に取り込まれたニコチンは、このようにして感染及び癌発生に適した状態を作り出すと推察される。

REFERENCES

参考文献

1. BAINTON DF: Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms. *J Cell Biol* 58:249-64, 1973
2. KLEBANOFF SJ: Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Semin Hematol* 12:117-42, 1975
3. FUJIMIYA Y, ROUSE BT, BABIUK LA: Human neutrophil-mediated destruction of antibody sensitized herpes simplex virus type I infected cells. *Can J Microbiol* 24:182-6, 1978
4. CLARK RA, KLEBANOFF SJ: Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity. *J Exp Med* 141:1442-7 1975
5. CLARK RA, KLEBANOFF SJ: Role of the myeloperoxidase-H₂O₂-halide system in concanavalin A-induced tumor cell killing by human neutrophils. *J Immunol* 122:2605-10, 1979
6. ANDERSON DO, FERRIS BG: Role of tobacco smoking in the causation of chronic respiratory disease. *N Engl J Med* 267:787-94, 1962
7. WENDEL VH: Beziehungen zwischen Nikotinabus und Lungenemphysem. *Zsche inn Med* 21:777-80, 1966
8. WENDEL VH: Zur Bedeutung des Rauchens für die Chronische Bronchitis. *Zsche inn Med* 23:147-51, 1968
9. DOLL R, HILL AB: Smoking and carcinoma of the lung. *Br Med J* 2:739-48, 1950
10. DOLL R, PETO R: Mortality in relation to smoking: 20 years' observation on male British doctors. *Br Med J* 2:1525-36, 1976
11. FISHER GL, McNEILL KL, FINCH GL, WILSON FD, GOLDE DW: Functional evaluation of lung macrophages from cigarette smokers and nonsmokers. *J Reticuloendothel Soc* 32:311-21, 1982
12. FRIEDMAN GD, SIEGELAUG AB, SELTZER CC, FELDMAN R, COLLEM MF: Smoking habits and the leukocyte count. *Arch Environ Health* 26:137-43, 1973
13. NOBLE RC, PENNY BB: Comparison of leukocyte count and function in smoking and nonsmoking young men. *Infect Immun* 12:550-5, 1975
14. CORBERAND J, LAHARRAGUE P, NGUYEN R, DO AH, DUTAU G, FONTANILLES AM, GLEIZES G, GYRARD E: In vitro effect of tobacco smoke components on the functions of normal human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 30:649-55, 1980
15. HOFFMAN D, WYNDER EL: Smoking of cigarettes and little cigars: An analytical comparison. *Science* 178:1197-9, 1972
16. WYNDER EL, HOFFMAN D: Tobacco and health: A social challenge. *N Engl J Med* 300:894-903, 1979
17. BÖYUM A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21(Suppl 97):77-89, 1968
18. CATE KL, RAY CE, QUIE PG: Modified Boyden chamber method of measuring polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. In *Leukocyte chemotaxis*. Ed by J.I. Gallin, P.G. Quie. New York, Raven Press, 1977. pp 67-71

19. ZIGMOND SH, HIRSCH JG: Leukocyte locomotion and chemotaxis: New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J Exp Med* 137:387-410, 1973
20. SUZUKI K, SWENSON C, SASAGAWA S, SAKATANI T, WATANABE M, KOBAYASHI M, FUJIKURA T: Age-related decline in lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes after N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine stimulation. *Exp Hematol* 11:1005-13, 1983 (RERF TR 9-82)
21. OTA H, SUZUKI K, SASAGAWA S, SAKATANI T, FUJIKURA T: A sensitive and simple assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Seikagaku* 54(8):544, 1982
22. KITAGAWA S, TAKAKU F: Effect of the chemotactic peptide on the subsequent superoxide releasing response in human polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett* 128:5-8, 1981
23. WACKER WEC, ULMER DD, VALLEE BL: Metalloenzymes and myocardial infarction. II. Malic and lactic dehydrogenase activities and zinc concentrations in serum. *N Engl J Med* 225:449-56, 1956
24. BRIDGES RB, KRAAL JH, HUANG LJT, CHANCELLOR MB: Effects of tobacco smoke on chemotaxis and glucose metabolism of polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 15:115-23, 1977
25. CORBERAND J, NGUYEN R, DO AH, DUTAU G, LAHARRAGUE P, FONTANILLES AM, GLEIZES B: Effect of tobacco smoking on the functions of polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 23:577-81, 1979
26. BLUE M-L, JANOFF A: Possible mechanisms of emphysema in cigarette smokers: Release of elastase from polymorphonuclear leukocytes by cigarette smoke condensate in vitro. *Am Rev Respir Dis* 117:317-25, 1978
27. DAVIS BD, HOSS W, LIN J-P, LIONETTI F: Evidence for a noncholinergic receptor on human phagocytic leukocytes. *Mol Cell Biochem* 44:23-31, 1982
28. SPOONER BS, WESSELS NK: Effects of cytochalasin B on microfilaments involved in morphogenesis of salivary epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 66:360-4, 1970
29. BABIOR BH, CURNUTTE JT, McMURRICH BJ: The particular superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *J Clin Invest* 58:989-96, 1976
30. DEWALD B, BAGGIOLINI M: Subcellular localization of the superoxide-forming enzyme in human neutrophils. *J Clin Invest* 63:21-9, 1976
31. VOLLER RL, KOELLE GB: Ganglion stimulating and blocking agents. In *The pharmacological basis of therapeutics, 5th Ed.* Ed by L.S. Goodman, A. Gilman. New York, Toronto, London, Macmillan Publishing Co., 1975. pp565-88
32. RICHMAN DP, ARNASON BGW: Nicotinic acetylcholine receptor: Evidence for a functionally distinct receptor on human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4632-5, 1979
33. LOPKER A, ABOOD LG, HOSS W, LIONETTI FJ: Stereoselective muscarinic acetylcholine and opiate receptors in human phagocytic leukocytes. *Biochem pharmacol* 29:1361-5, 1980
34. RUSSELL MAH, JARVIS M, IYER R, FEYERABEND C: Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. *Br Med J* 280:972-6, 1980