

ヒト赤血球の形態変化に及ぼすニコチンの影響

Influence of nicotine on the shape change of human erythrocytes

片岡あい子、金子和美、渡部恵子、西口栄子

Aiko Kataoka, Kazumi Kaneko, Keiko Watabe, Eiko Nshiguchi

(湘南短期大学 歯科衛生学科)

〔キーワード〕ニコチン、赤血球

〔導入・目的〕

喫煙が生体に与える影響に関して、これまで疫学、病理学、免疫学的側面から多くの研究がなされている¹⁾。たばこの煙の中に含まれる各種の物質が、発癌性を持ち、喫煙者での咽頭癌や肺癌の発症・進行に関与することが示され²⁾、種々の生活習慣病、口腔内疾患の発症・進行に直接的または、間接的に有害な作用を及ぼすことが数多く報告され³⁾、更に、その他の循環系、呼吸器系疾患の発症との因果関係も強いことが、報告されている^{4), 5)}。

口腔への影響については、喫煙とさまざまな口腔疾患（歯周病、白色浮腫、ニコチン性口内炎、白板症、口腔癌、急性壊死性潰瘍性歯肉炎、難治性歯根膜炎、毛様舌など）との関係、口腔の変化（歯肉の変色、褐色、黒色化、創傷治癒の遅延、口臭、味覚障害など）との関係が免疫学的に明らかになるに伴い、歯周組織破壊の仕組みが歯周病原性微生物・免疫機能・微小循環系などの面から検討され⁶⁾、これまでは、微小循環障害の面では、皮下において、ニコチンの吸収量に応じて、細動脈の収縮、毛細血管の血流速度の低下、歯周組織への酸素や栄養素の供給障害が組織傷害につながるということが報告されている^{7), 8)}が微生物との関係、免疫機能の変化との関連での報告が多い。

血液の40~50%を占める赤血球は、内部にヘ

モグロビンを含み、各組織に酸素供給を行う酸素運搬細胞として機能をはたしている。この機能を遂行するためには、弾力に富み、自らの径よりも狭い毛細血管でも通過できるような性質でなくてはならない。赤血球が周囲の外力に応じて形を変える能力を変形能という^{9), 10)}。微小循環ができるような血球の変形能が維持されなければ、毛細血管内の通過速度が遅くなり^{9), 11)}、ヘモグロビン機能の障害を起し各組織の酸素欠乏やチアノーゼの原因となる^{12), 13)}。赤血球は正常の両面中くぼみの円盤型 (discocytes) は表面積にゆとりがあることから、変形能が維持される。内方陥没型 (stomatocytes)、外方突出型 (echinocytes)、球形 (spherocytes) など形態変化をおこした赤血球は変形能が低下するといわれている¹⁰⁾。変形能は補体、サイトカイン、微生物、微生物の産生物質、抗体、薬物などにより影響をうける^{14), 15)}ため、変形能に及ぼすさまざまな因子の影響を検索することは、微小循環障害が起こることが考えられる歯周疾患の病因を考察するうえで重要である。更に、喫煙による影響が、歯肉に直接局所的に影響するのか、間接的に影響を及ぼすのかを知る上でも重要な意味をもっていると考えられる。そこで、我々は喫煙による歯周疾患の病因解明を目的とし、市販ニコチン溶液、市販たばこ煙を赤血球に作用させて、赤血球の形態変化を観察した。

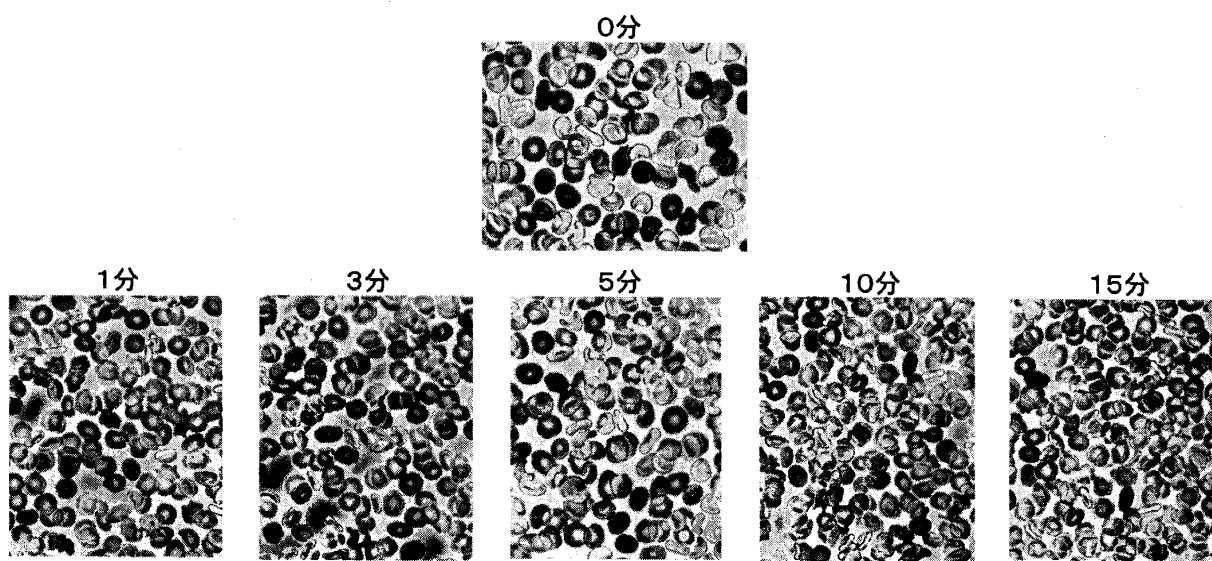


図1. 正常ヒト赤血球の形態変化の経時的監察

〔方法〕

- ①健康成人女子より採取した血液を5000r.p.m、20min 遠心して後、血漿 buffer coat を除去し、沈殿物（赤血球）を0.9% NaCl で、三度遠心洗浄（5000r.p.m、20min）した。
- ②洗浄赤血球に PBS(-)を加えて、赤血球容積(Ht)を約14%として赤血球懸濁液とした。これを以下の実験に用いた。
- ③ a) たばこ煙作用の方法

赤血球懸濁液を試験管に入れて MILD SEVEN EXTRALIGHTS®(ニコチン量0.3mg)、MILDSEVEN SUPERLIGHTS®(ニコチン量0.5mg)、Peace LIGHTS®(ニコチン量1.0mg)、hi-lite®(ニコチン量1.4mg)、PEACE®(ニコチン量1.9mg) 5種の市販たばこの煙をそれぞれ1分、3分、5分、10分間作用させた。そのときのヒト赤血球の形態変化を位相差型顕微鏡 (Nikon TE300) で観察し、撮影した。

b) 市販ニコチン溶液作用の方法

市販ニコチン溶液をニコチン濃度0.112mM、0.145mM、0.176mM、0.205mM、0.233mM、0.260mM をそれぞれ1分、3分、5分、10分、15分間作用させて後、ヒト赤血球の形態変化を位相差型顕微鏡 (Nikon TE300) で観察し、撮影した。

c) たばこ煙作用ヒト赤血球の洗浄方法

たばこ煙を3分間作用させて、変化を起こした赤血球を PBS buffer(-)で3回遠心洗浄して、ヒト赤血球のたばこ煙による形態変化に及ぼす洗浄の効果を位相差型顕微鏡 (Nikon TE300) で観察し、撮影した。

d) ニコチン溶液作用ヒト赤血球の洗浄方法

各種条件を3分間作用させた後、赤血球を PBS buffer(-)で3回遠心洗浄して、ヒト赤血球のニコチン溶液による形態変化に及ぼす洗浄の効果を位相差型顕微鏡 (Nikon TE300) で観察し、撮影した。

〔結果〕

- 1 洗浄正常ヒト赤血球(コントロール)を37°C に incubate して、1分、3分、5分、10分、15分時の形態変化を観察した結果、形態変化は観察されなかった (図1)。
- 2 洗浄ヒト赤血球に5種の市販たばこ煙を各時間作用させ、その形態変化を観察した結果、ニコチン量0.3mg / 本 (MILDSEVEN EXTRALIGHTS®) の場合は作用後約1分では形態変化は観察されず、作用後約3分で stomatocytes から echinocytes に変化し始め、作用後5分で echinocytes がさらに増加し、作用後10分ですべてが echinocytes に変化した (図3-a)。

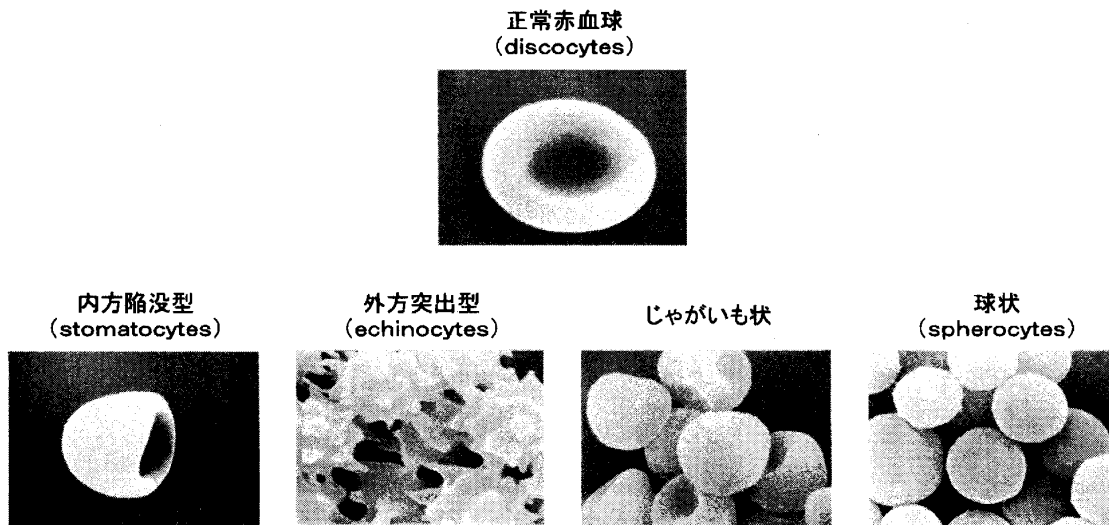


図 2. 赤血球の形態変化の拡大像

ニコチン量0.5mg / 本 (MILDSEVEN SUPER LIGHTS®) の場合は作用後 1 分での変化は観察されず、作用後 3 分では多くの赤血球が echinocytes に変化し、作用後 5 分ですべてが echinocytes に変化した。作用後 10 分ではそれらが更に収縮した echinocytes に変化した (図 3 - b)。

ニコチン量1.0mg / 本 (Peace LIGHTS®) の場合は作用後 1 分での変化は観察されなかった。作用後約 3 分ですべての赤血球が echinocytes に変化し、作用後 5 分では echinocytes と収縮した echinocytes が混在した。作用後 10 分ではそれらが spherocytes を呈し始めた (図 3 - c)。

ニコチン量1.4mg / 本 (hi-lite®) の場合は作用後約 1 分で echinocytes に変化し始め、作用後約 3 分ではほとんどの赤血球が echinocytes に変化した。作用後 5 分では echinocytes が収縮し、作用後 10 分では spherocytes に変化し始めた (図 3 - d)。

ニコチン量1.9mg / 本 (PEACE®) の場合は作用直後 echinocytes に変化し始め、作用後約 1 分でほとんどの赤血球が echinocytes に変化した。作用後 3 分では echinocytes と収縮した echinocytes が混在した。作用後 5 分ではほとんどが収縮した echinocytes に変化した。作用

後 10 分ではほとんどが spherocytes に変化した (図 3 - e)。

この現象は、たばこに含まれるニコチン量、作用時間に依存した。赤血球の形態変化の拡大像を図 2 に示した。

3 洗浄ヒト赤血球に各種市販ニコチン溶液を各時間作用させ、その形態変化を観察した結果、ニコチン濃度0.176mM の場合は、ニコチン作用後約 1 分で stomatocytes に変化し、作用後 3 分で echinocytes に変化し始めた。作用後約 5 分でさらに echinocytes が増加し、作用後約 10 分ではほとんどの赤血球が echinocytes に変化した。作用後約 15 分で spherocytes に変化した (図 4 - a)。

ニコチン量0.205mM の場合は作用後約 1 分で stomatocytes を経てほとんどが echinocytes に変化し、作用後約 3 分で echinocytes と丸みを帯びた形 (じゃがいも状) が混在し、作用後約 5 分でほとんどの赤血球がじゃがいも状に変化し、作用後約 10 分ではすべてが spherocytes に変化した (図 4 - b)。

ニコチン量0.259mM の場合は作用直後は echinocytes を少量含み、ほとんどの赤血球がじゃがいも状を呈した。作用後 3 分では多くの赤血球がじゃがいも状に変化し、作用後 5 分では、ほ

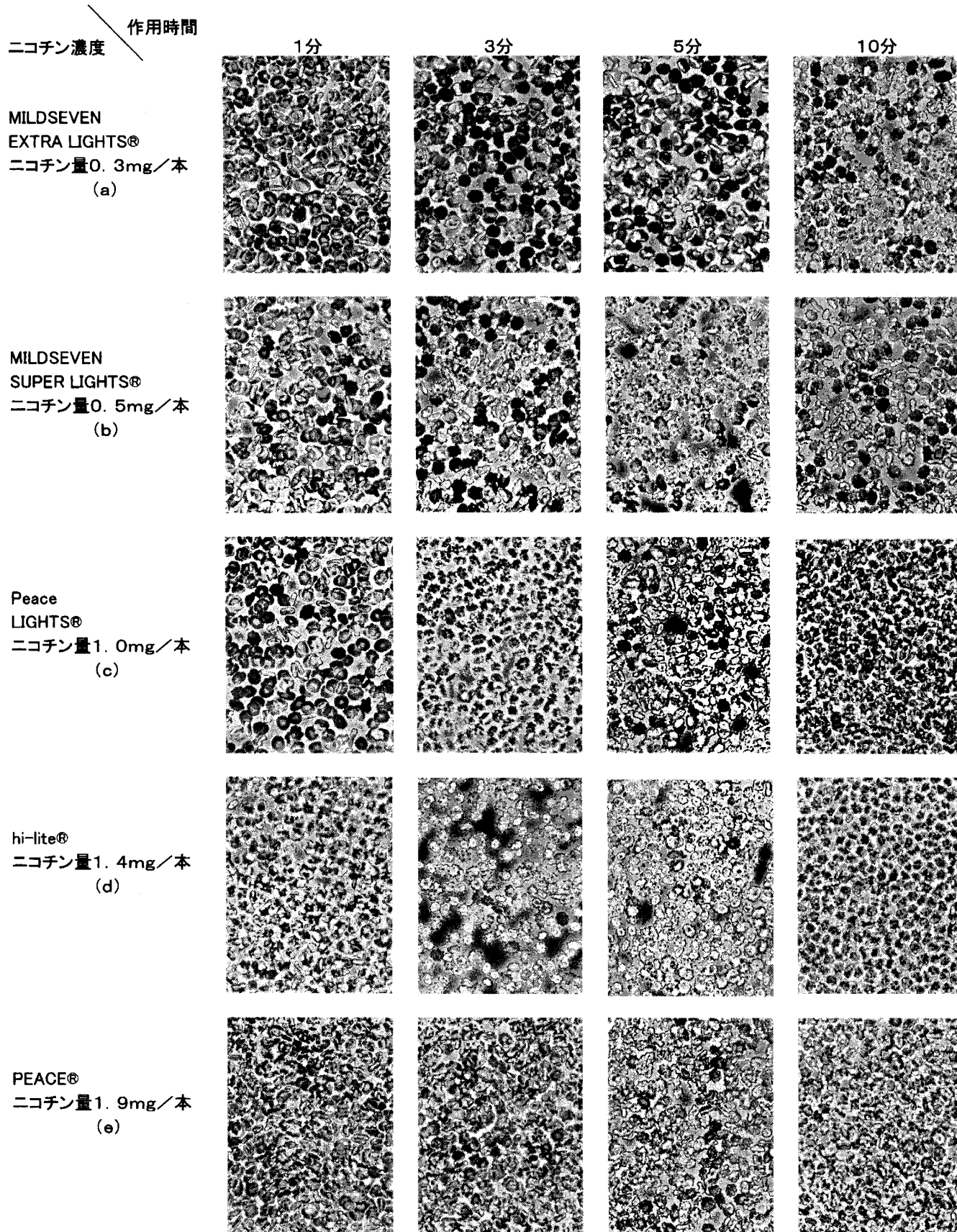


図3. 各種市販たばこの煙を作用させた場合のヒト赤血球の形態変化の観察

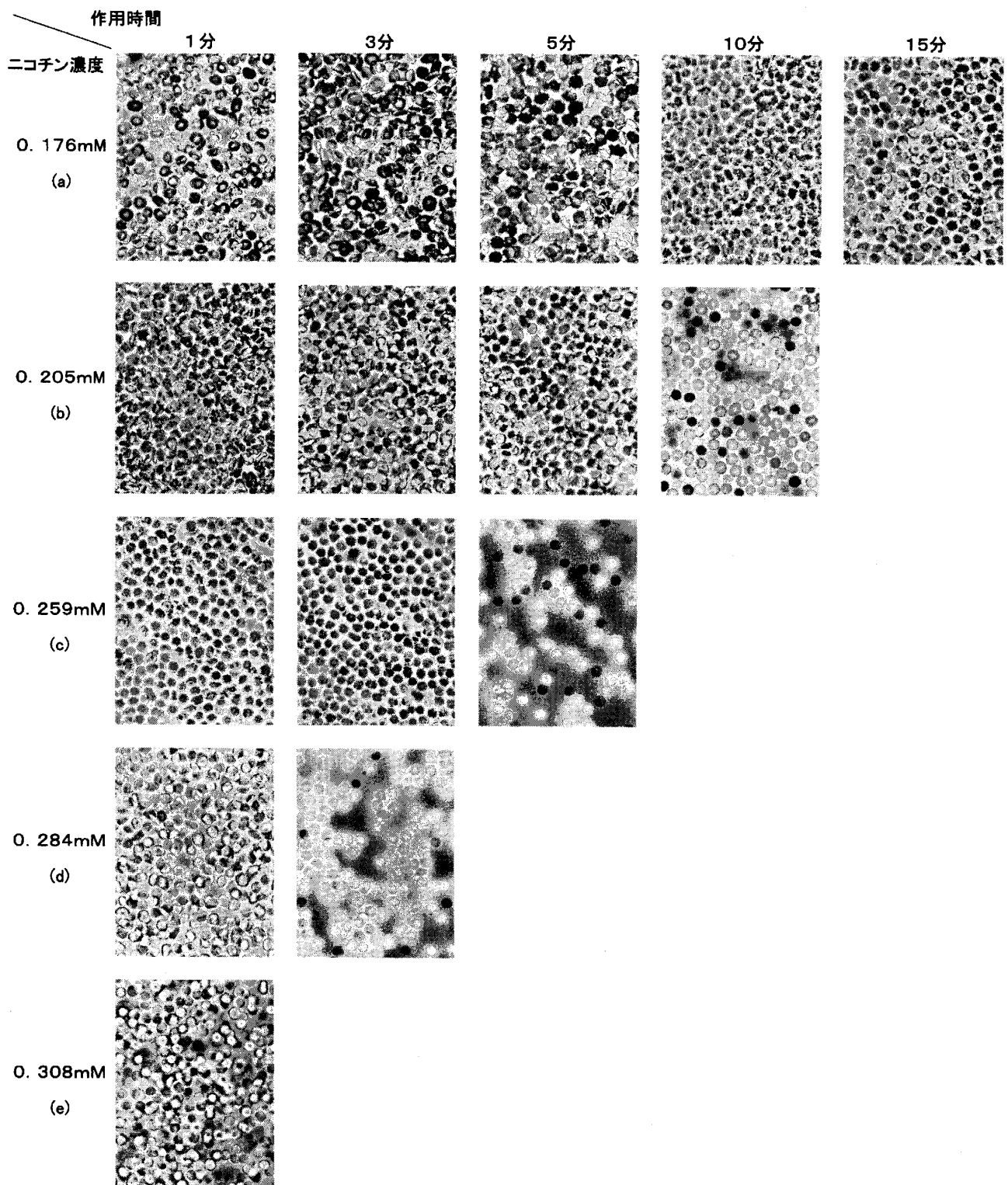


図4. 市販ニコチン溶液を作用させた場合のヒト赤血球の形態変化の観察

とんどが spherocytes に変化した (図4-c)。ニコチン量0.284mM の場合は作用直後 echinocytes からじゃがいも状に変化し、作用

後3分ではほとんどの赤血球が spherocytes に変化した (図4-d)。ニコチン量0.308mM の場合では作用直後 spherocytes を呈し、1分

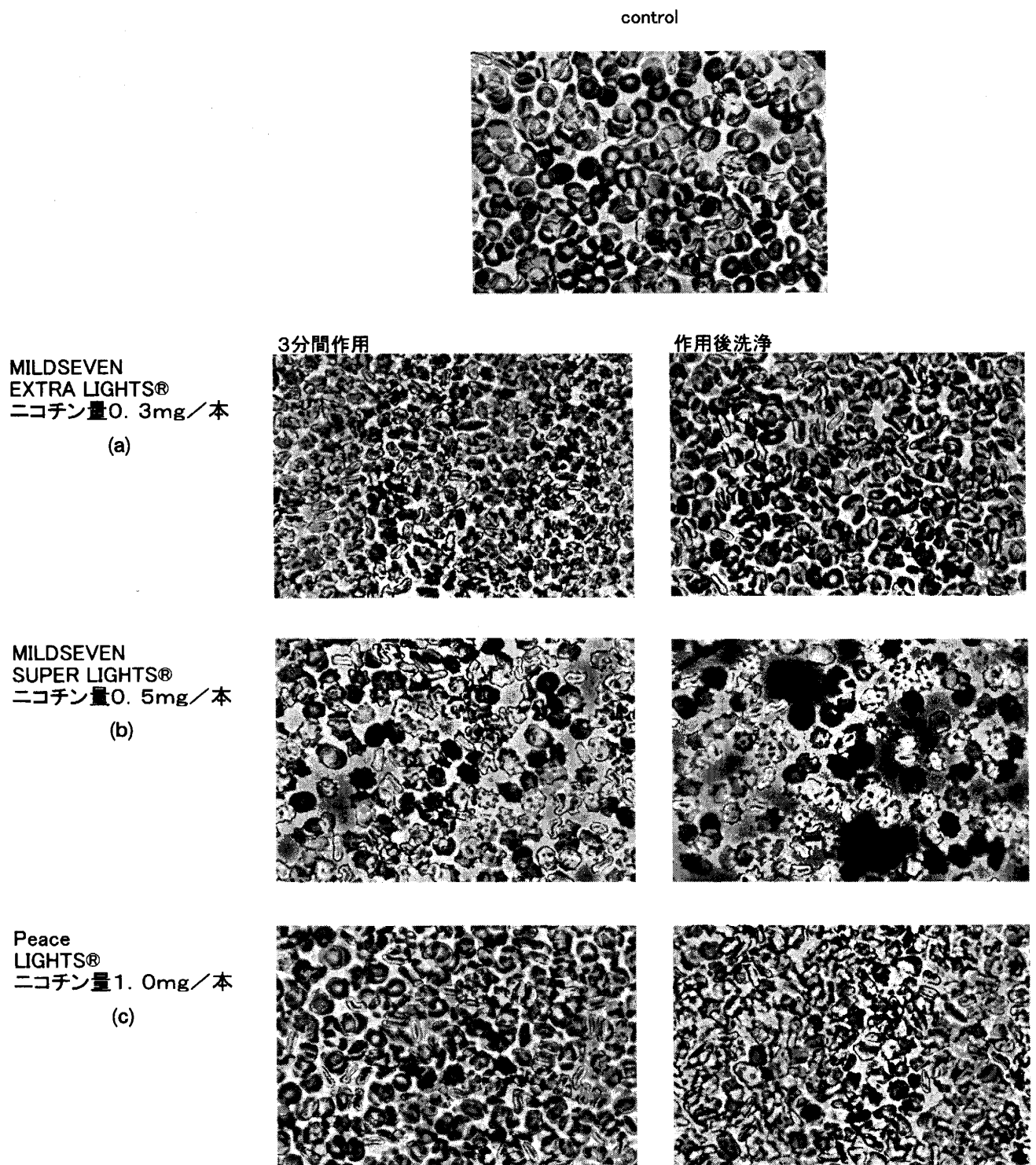


図5. 市販たばこの煙作用後のヒト赤血球の形態変化に及ぼす洗浄の効果

以内に細胞は破壊された (図4-e)。

この現象はニコチン濃度、作用時間に比例した。

4 たばこ煙を作用させて、形態変化が起こっている赤血球をPBS(-)で三度遠心洗浄した後、赤血球の形態変化を観察した結果、0.3mg

／本以下のニコチンを含むたばこ煙作用の場合の赤血球では正常の形態に復元した (図5-a)。0.5mg／本のニコチンを含むたばこ煙作用の場合、1.0mg／本のニコチンを含むたばこ煙作用の場合では、共に赤血球の形態

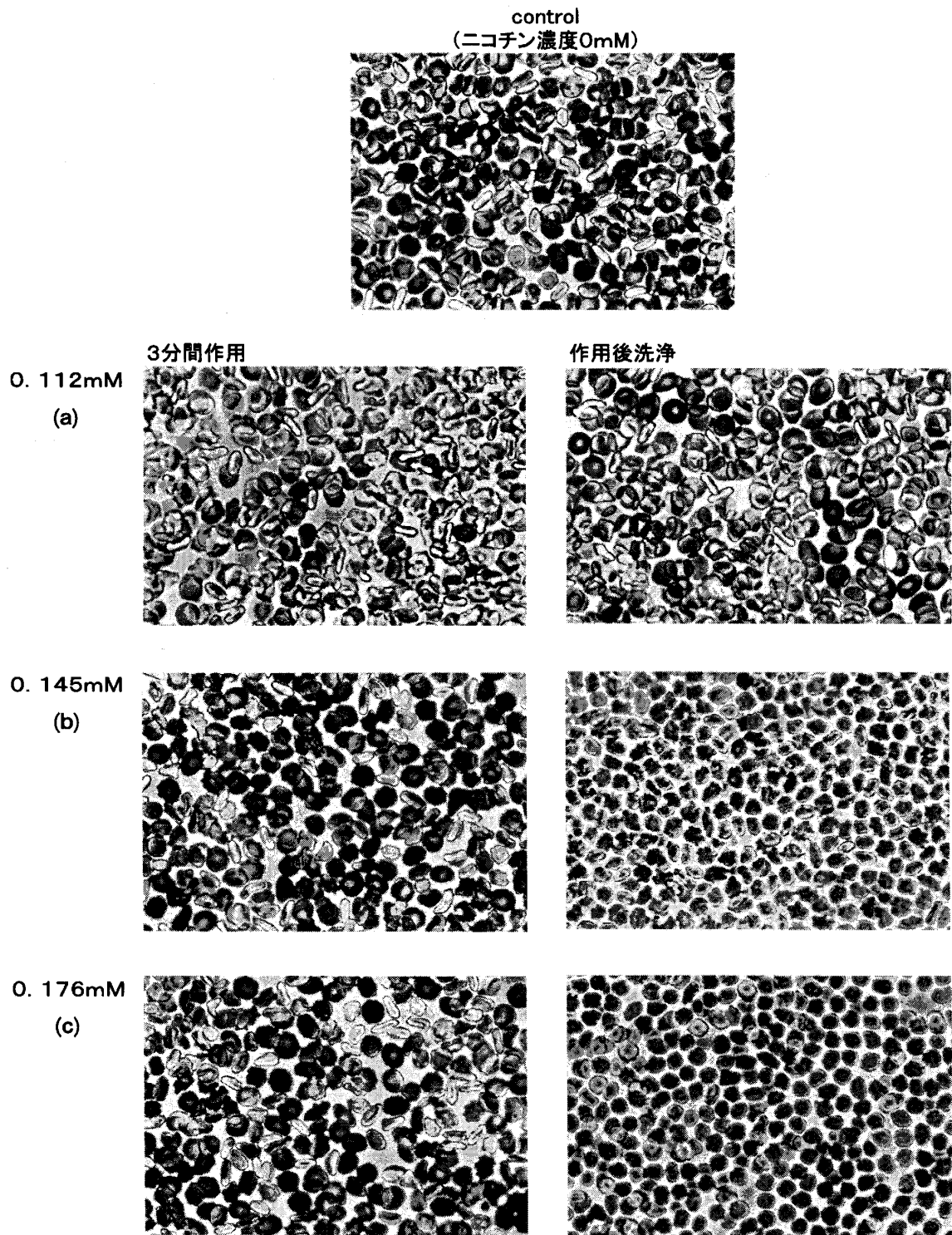


図 6. 市販ニコチン溶液作用後のヒト赤血球の形態変化に及ぼす洗淨の効果

は、正常の形態に復元しなかった (図 5 - b、c)。

5 市販ニコチン溶液を作用させて、形態変化が起こっている赤血球を PBS (-) で三度遠心洗淨した後、赤血球の形態変化を観察した結

果、ニコチン濃度 0.112mM 以下では正常の形態に復元した (図 6 - a)。しかし 0.145mM、0.176mM 作用させた場合、共に赤血球の形態は、正常の形態に復元しなかった (図 6 - b、c)

〔考察〕

微小循環阻害による歯周組織破壊のメカニズムを解明する目的で、ヒト赤血球の形態変化に及ぼす喫煙の影響を観察した。市販たばこの煙を作用させた場合、ヒト赤血球は市販たばこに含まれるニコチン、タール量に依存して形態変化を起こし、破壊された。たばこの煙には約4000種類の化学物質が含まれ、そのうちの約200種類が有害物質であるといわれている。そこで我々は、たばこの三大有害物質であるニコチン、タール、一酸化炭素のうちニコチンを取り上げて、ヒト赤血球に作用させた。その結果、市販ニコチン溶液を作用させた場合、市販たばこの煙を作用させた場合と同様の形態変化が観察され、その変化の程度はニコチン濃度・作用時間に依存した。次にニコチンによるヒト赤血球の形態変化は、一過性のものであるか持続性のものであるかを確認するためにPBS(-)を用いて洗浄を試みた。市販たばこ煙作用の場合は0.5mg/本以上のニコチンを含むたばこ煙で変化した赤血球の形態は正常の形態に復元しなかった。また、市販ニコチン溶液作用の場合は0.145mM以上の濃度で正常の形態に復元しなかった。形態変化を起こした赤血球は変形能が低下し、変形能の低下により微小循環阻害や、歯周組織への酸素や栄養素などの供給阻害を起こすことが考えられるため、歯肉の血流阻害を起こすことで歯周組織を損傷することも考えられる。したがって、喫煙による歯周組織の破壊はニコチンが歯肉に直接局所的に作用して起こると推測できる。

- 1) 厚生労働省：喫煙と健康 喫煙と健康問題に関する検討会報告書、保健同人社、35-36、2002
- 2) 厚生労働省：喫煙と健康 喫煙と健康問題に関する検討会報告書、保健同人社、109-121、2002
- 3) 厚生労働省：喫煙と健康 喫煙と健康問題

に関する検討会報告書、保健同人社、79-108、2002

- 4) 厚生労働省：喫煙と健康 喫煙と健康問題に関する検討会報告書、保健同人社、122-135、2002
- 5) 厚生労働省：喫煙と健康 喫煙と健康問題に関する検討会報告書、保健同人社、136-145、2002
- 6) 埴岡 隆、雫石 聰：喫煙と歯周病、先端医療シリーズ・歯科医学2 歯周病 新しい治療を求めて、先端医療技術研究所、405-415、2000
- 7) 沼部 幸博：歯周組織に対する喫煙の影響、日歯周誌、45、133-141、2003
- 8) マーク ライダー、沼部 幸博：歯周疾患と喫煙、QE、13、87-100、1994
- 9) 高桑 雄一：溶血性貧血における赤血球膜細胞骨格構造の変化、日本臨床、54(9)、2-5、1996
- 10) 前田 信治：赤血球の微小循環とレオロジー、ながれ21、129-134、2002
- 11) 松本 昇：赤血球の構造と機能 赤血球内エネルギー代謝と赤血球機能 赤血球の変形能維持に果たす赤血球内電解質の役割、日本臨床、54(9)、33-37、1996
- 12) 原野 昭雄、原野 恵子：赤血球の構造と機能 ヘモグロビンの構造と機能 ヘモグロビンの高次構造とその生理的意義、日本臨床、54(9)、7-12、1996
- 13) 大庭 雄三：ヘモグロビン異常症における赤血球崩壊亢進のメカニズム、日本臨床、54(9)、78-83、1996
- 14) 高桑 雄一、萬野 純恵：赤血球の構造と機能 赤血球膜の構造と機能 赤血球膜の細胞骨格構造、日本臨床、54(9)、43-49、1996
- 15) 高桑 雄一：赤血球膜の構造と機能、血液病学、文光堂、147-159、1995