

機関番号：33602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792161

研究課題名（和文） 受動喫煙モデルを用いた齲蝕増加メカニズムの解明

研究課題名（英文） Analysis of the expanding caries area mechanism by cigarette smoke exposure

研究代表者

藤波 義明 (FUJINAMI YOSHIKI)

松本歯科大学・歯学部付属病院・助手

研究者番号：80392801

研究成果の概要（和文）：

タバコ煙の曝露は唾液量、*Streptococcus mutans* の活動性・増殖および再石灰化部分の組成に影響を与えなかった。タバコ煙の曝露は、唾液中の Amylase 活性、Peroxidase 活性を一時的に減少させ、唾液腺の血管を拡張および充血傾向にしたが、炎症性細胞の浸潤は見られなかった。また、耳下腺では空胞変性が多数見られた。齲蝕面積は齲蝕群に比べてタバコ煙曝露齲蝕群の方が有意に大きかった。

タバコ煙の曝露は唾液成分を変化させ、齲蝕を進行させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The exposure of cigarette smoke did not change amount of saliva, activity and growth of *Streptococcus mutans* and component of re-calcification part. The exposure of cigarette smoke temporarily decreased the Amylase and Peroxidase activity in saliva. In the cigarette smoke-exposed rats, vasodilation and hyperemia in the parotid gland and submandibular gland were observed by histological analysis. Inflammatory cells were not found infiltrating the salivary glands. The area of caries in the cigarette smoke exposure caries rats were significantly increasing compared with the caries rats.

These results suggest that cigarette smoke exposure changes salivary component and expands caries area in the maxillary molars of rat.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：社会系歯学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：環境タバコ煙、受動喫煙、唾液、小児、齲蝕、Cotinine、唾液腺、*Streptococcus mutans*

1. 研究開始当初の背景

近年、喫煙は現代の人類にとって有病率の最も高い疾患の1つである齲蝕の発生に対するリスク因子として考えられるようになった。日本における喫煙率は、減少傾向ではあるものの29.2%あり(2005年「全国たばこ喫煙者率調査」要領)、喫煙者本人に対する各種団体の圧力はあまり功を奏していない。理由の1つには基礎研究成果の少なさが挙げられると考える。

喫煙時におけるタバコ煙には点火部からタバコ・フィルターを通して喫煙者が吸い込む「主流煙」と、点火部から立ち昇る「副流煙」および喫煙者の呼気から排出される「呼出煙」がある。「副流煙」と「呼出煙」を合わせたものを「環境タバコ煙」と言う。受動喫煙者とは、自分の意思とは無関係に環境タバコ煙に曝されている者と言える。

古くから能動喫煙は多くの口腔疾患のリスク因子であり、口腔内の環境を悪化させることが知られている。近年、喫煙・受動喫煙の害に関する医歯薬学的データが急速に蓄積され、考えられていた以上に受動喫煙は深刻な健康被害を与えることが明らかとなってきた。これに伴い、社会的な受動喫煙への関心が高まり、世界的に禁煙へと進んでいる。わが国においても、2002年に健康増進法が制定され、その第25条に「受動喫煙の防止」が盛り込まれるに至った。

喫煙者の周りで生活する人が老若男女を問わず受動喫煙に曝されている。その中で特に問題とされるのは、成長発達過程にある乳幼児や小児、胎児(妊婦)である。受動喫煙の程度をコチニン濃度で判定した疫学調査では、コチニン濃度と乳歯の齲蝕面・充填面の数の増加に相関性が認められたと報告されている(Aligne et al., *Jama* 2003; 289:1258-1264, Tanaka et al., *J Public Health Dent* 2006; 66: 279-281)。しかし、能動喫煙・受動喫煙における齲蝕歯数増加についての基礎的研究は未だ報告されておらず、その機序も解明されていない。

これまでの喫煙に関する研究の多くは「能動喫煙」についてであり、喫煙についての研究のほとんどが疫学調査であった。数少ない基礎的研究の中には、は数千種類あるタバコ煙成分の中の一成分でしかないニコチンが *Streptococcus mutans* の増

殖に影響する(Keene and Johnson, *Miss Dent Assoc J* 1999; 55: 38-39)との報告がある。また、唾液タンパク質と *Streptococcus mutans* の関係には、アミラーゼがハイドロキシアパタイトへの連鎖球菌の付着を促進し(Scannapieco FA et al., *J Dent Res* 1995; 74(7): 1360-1366)、ペルオキシダーゼが *Streptococcus mutans* の増殖や代謝を阻害する(Lumikari M et al., *Arch Oral Biol* 1991; 36(2): 155-160)との報告や、ラクトフェリンが *Streptococcus mutans* の生育に必要な Fe イオンを奪うことにより静菌作用を示し(Lassiter MO et al., *J Dent Res* 1987; 66(2): 480-485)、ラクトフェリン由来ペプチドが *Streptococcus mutans* などに對し殺菌作用を示すことが報告されている(Groenink J et al., *FEMS Microbiol Lett* 1999; 179(2): 217-222)。

喫煙の口腔環境への影響について基礎的研究を行うにあたり必要となるモデル動物は、幾種類か存在する。ニコチンを投与するモデルが最も簡素だが、これはニコチンの作用を見ているに過ぎず、その他のモデルは大掛かりな施設・機器を必要とする。しかしながら、これらは「能動喫煙」のモデルとして作成されており、「受動喫煙」のモデルではない。本研究では数少ない受動喫煙モデル動物の中で、簡便かつ詳細に報告されている Nogueira-Filho Gdara の報告を参考にモデル動物を作成し、齲蝕に対する受動喫煙の影響について解析する。受動喫煙と齲蝕の関係が明らかとなれば、齲蝕の低減に貢献するに止まらず、喫煙者が自身の子どもの齲蝕罹患低減のために禁煙する、あるいは喫煙者しない、させないようにする動機になり得る。

2. 研究の目的

本研究では、受動喫煙の直接的あるいは間接的作用が齲蝕の発生に関与しているとの仮説を立てた。環境タバコ煙を曝露して受動喫煙モデル動物を作成し、口腔内清掃や防御に関わる唾液について着目、解析することとした。受動喫煙モデル動物の唾液の機能変化や唾液腺の組織変化について解析を行った。次に、齲蝕モデル動物について同様の受動喫煙操作を行い、その齲蝕歯数の増減や重症度などについて解析を行った。以上の結果より、受動喫煙齲蝕モデル動物を用いた齲蝕歯数増加メカニ

ズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) タバコ煙曝露による喫煙モデルの作成と個体観察

① 喫煙モデル作成

7週齢の Wistar 系雄性ラットを用いて、Nogueira-Filho Gda らの報告を参考にモデル動物を作成した(タバコ煙曝露群)。タバコ煙曝露装置は 45 x 25 x 20 cm³ のアクリルチャンバーを用いた。タバコ煙の曝露は1日3回31日間行い、タバコ煙曝露群とした。文献に従い、各回のタバコ煙曝露時にチャンバーに入れるラットは最大5匹までとした。対照群には期間中、タバコ煙曝露群と同じ回数と時間ケージの移動を行った。

唾液はペントバルビタール麻酔下で、Wang ら (*Jpn J Pharmacol* 1998; 78: 279-283) の方法に従って、タバコ煙曝露前、曝露15日後、30日後に刺激時唾液を採取した。唾液腺など口腔内組織は、深麻酔により屠殺し、タバコ煙曝露31日後に採取した。

② タバコ煙曝露状況の判定

能動・受動喫煙の指標として使用されるニコチンの代謝産物コチニンについて唾液中濃度を ELISA kit を用いて測定した。コチニン検出の有無をもってタバコ煙の曝露状況を判定した。

③ タバコ煙曝露モデル動物の唾液タンパク質の解析

唾液量: (1) ①で採取した刺激時唾液について、15分間唾液量を重さによって測定した。

タンパク質濃度: Bradford 法により唾液タンパク質濃度の測定、総量の算出を行った。

唾液タンパク質: アミラーゼ活性をキットを用いて測定した。

ペルオキシダーゼ活性を ELISA 検出系を利用した方法にて測定した。

④ タバコ煙曝露モデル動物の口腔内組織の解析

唾液腺について、パラフィン切片を作成した。これらについて組織学・形態学的に解析を行った。

(2) *Streptococcus mutans* 植菌による齲蝕モデルの作成

① 齲蝕モデル動物の作成

Higashi ら (*Journal of Hard Tissue Biology* 2000; 9: 33-40) の報告を参考に実験齲蝕モデル(齲蝕群)を作成した。齲蝕群についても(1) ①と同様の操作を行った。齲蝕モデル動物を作成するにあたり、実験期間を通して、高シューク

ローズ食およびシュークローズ水を自由摂取させた。

② 齲蝕モデル動物の唾液・口腔内組織の解析

(1) ③、④と同様に行った。加えて齲蝕病変を齲蝕検知液で確認するなど、本モデルでは齲蝕病変について詳細に解析を行った。

(3) 齲蝕モデル動物に対するタバコ煙曝露の影響を解析

① 齲蝕モデル動物に対するタバコ煙曝露

Streptococcus mutans の植菌と同時にタバコ縁の曝露を開始し、タバコ煙曝露齲蝕モデル(タバコ煙曝露齲蝕群)を作成した。*Streptococcus mutans* 植菌方法は(2) ①と同様、タバコ煙曝露は(1) ①と同様に行った。齲蝕群、タバコ煙曝露齲蝕群から(1) ①と同様にしてタバコ煙曝露前および曝露開始30日後に唾液を採取して比較・解析を行った。タバコ煙曝露開始31日後に屠殺し、顎を摘出、固定液にて浸漬固定した。

② タバコ煙曝露齲蝕モデル動物の唾液・口腔内組織の解析

(2) ①と同様に行った。加えて、口腔内に生着している *Streptococcus mutans* の菌数は(3) ①で採取した唾液から DNA を抽出し、これを用いて Real time-PCR を行い測定した。齲蝕活動性については、市販のキットを用い、左側上顎臼歯側面から歯垢を採取して付属プロトコルに従って測定した。比色法にて数値化し、統計処理を行った。

左側上顎臼歯咬合面を齲蝕検知液にて染色した。また、同臼歯を矢状方向に半割し、観察した。同様に、矢状方向の断面を EPMA (電子プローブマイクロアナライザー) にて元素分析を行った。

4. 研究成果

(1) 唾液タンパク質および唾液腺へのタバコ煙曝露の影響

体重は31日間で、対照群は49.3%、タバコ煙曝露群は30.1%増加した。タバコ煙曝露群のラットの体重は対照群に比べ、タバコ煙曝露開始1日後から31日後まで有意に少なかった。

タバコ煙を曝露されたラットは、実験期間31日間における1日あたりの食餌量が対照群に比べて少なかった。しかしながら、両群のラットについて、31日間の平均体重100gあたりの食餌量で比較すると、ほぼ同量が消費されていた。ラット1匹あたりの飲水量では、タバコ煙曝露群の方が対照群に比べて多く、平均体重100gあたりの消費量でもタバコ煙曝露群の方が多かった。

タバコ煙曝露群および対照群の 0、15、30 日の唾液量に有意な変化は見られなかった。

タバコ煙曝露の指標として使用される Cotinine はタバコ煙曝露群 15、30 日で検出され、それぞれタバコ煙曝露前および対照群に比べ有意な差を示した。対照群およびタバコ煙曝露群 0 日後の唾液コチニン濃度は 1 ng/mL 未満であった。

15 分間唾液中の Amylase 活性、Peroxidase 活性はタバコ煙曝露群 15 日のみが増加し、対照群に比べて有意な差を示した。しかし、タバコ煙曝露群 30 日の唾液では曝露前と同程度まで回復していた。

唾液腺は固定後、パラフィン切片を作成し、Hematoxylin・Eosin 染色を行った。タバコ煙曝露群では血管の拡張や充血傾向が見られたが、炎症性細胞の浸潤は見られなかった。また、耳下腺の中央部には空胞変性が多数見られた。

タバコ煙の曝露は唾液腺に影響し、唾液成分を変化させる可能性が示唆された。

(2) タバコ煙曝露による齲蝕面積の拡大についての解析

体重は 31 日間で、齲蝕群は 54.8%、タバコ煙曝露齲蝕群は 34.6%増加した。タバコ煙曝露齲蝕群のラットの体重は齲蝕群に比べ、タバコ煙曝露開始 1 日後から 31 日後まで有意に少なかった。

タバコ煙を曝露された齲蝕モデルラットは、実験期間 31 日間における 1 日あたりの食餌量が齲蝕群ラットに比べて少なかった。しかしながら、両群のラットについて、31 日間の平均体重 100 g あたりの食餌量で比較すると、ほぼ同量が消費されていた。ラット 1 匹あたりの飲水量では、タバコ煙曝露齲蝕群の方が齲蝕群に比べて多く、平均体重 100 g あたりの消費量でもタバコ煙曝露齲蝕群の方が多かった。

タバコ煙曝露齲蝕群および齲蝕群のタバコ煙曝露開始 0、30 日後の唾液量に有意な変化は見られなかった。

Cotinine はタバコ煙曝露群 30 日でのみ検出され、それぞれタバコ煙曝露前および齲蝕群に比べ有意な差を示した。齲蝕群およびタバコ煙曝露齲蝕群 0 日後の唾液コチニン濃度は 10 ng/mL 未満であった。

タバコ煙曝露齲蝕群および齲蝕群、またはそれぞれの 0、30 日後の齲蝕活動性試験には、差が見られなかった。

齲蝕検知液にて染色された部分を齲蝕と見なしたところ、齲蝕群、タバコ煙曝露齲蝕群ともにほぼ全ての裂溝が齲蝕となっていた。面積を測定した結果、齲蝕群に比べてタバコ煙曝露齲蝕群の齲蝕面積の方が有意に大きかった。

タバコ煙曝露齲蝕群および齲蝕群のタ

バコ煙曝露開始 0、30 日後の唾液中に存在する *Streptococcus mutans* の菌数は、それぞれにおいて有意差を認めなかった。

タバコ煙曝露齲蝕群の方が齲蝕群に比べ齲蝕面積が大きい結果となったが、EPMA による元素分析の結果からは、再石灰化された部分の組成に差は見られなかった。

タバコ煙の曝露は *Streptococcus mutans* の活動性・増殖には影響しないが、再石灰化を遅延させるなどして齲蝕を進行させる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Yoshiaki Fujinami, Tatsuya Fukui, Keisuke Nakano (他 7 名 1 番目), The effects of cigarette exposure on rat salivary proteins and salivary glands., Oral diseases, 査読有, 15, 2009, 466-471

[学会発表] (計 5 件)

- ① 藤波義明, タバコ煙による齲蝕進行の可能性, タバコ煙による齲蝕進行の可能性, 第 5 回 日本禁煙科学会 学術総会, 2010 年 11 月 21 日, 徳島
- ② Yoshiaki Fujinami, Changes of Salivary Glands and Components due to Cigarette Smoke., 10th Biennial Congress of the European Association of Oral Medicine, 23-25 September 2010, London (United Kingdom)
- ③ Yoshiaki Fujinami, The effect of cigarette smoke exposure on dental caries in animal model., 第 83 回 日本薬理学会年会, 2010 年 3 月 16 日, 大阪
- ④ 藤波義明, 齲蝕モデル動物へのタバコ煙曝露の影響, 第 4 回 日本禁煙科学会 学術総会, 2009 年 10 月 25 日, 金沢
- ⑤ 福井達也, タバコ煙曝露が及ぼすラット唾液・唾液腺への影響, 第 68 回 松本歯科大学学会(総会), 2009 年 7 月 11 日, 長野

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤波 義明 (FUJINAMI YOSHIAKI)
松本歯科大学・歯学部付属病院・助手
研究者番号：80392801

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：