

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593072

研究課題名(和文) 禁煙前後の歯周組織変化の多角的解析

研究課題名(英文) Multiple analysis of periodontal condition changes before and after smoking cessation.

研究代表者

沼部 幸博 (numabe, yuihiro)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：90198557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周組織破壊と喫煙との関係は、疫学的に報告されている。しかし、そのメカニズムは不明であり、宿主の生体防御反応が関与していると考えられている。本研究の目的は、禁煙による歯周組織の生体防御機構の変化を多角的に検索することである。喫煙状況を知る唾液中コチニン量はELISAを用い、主として検索した歯周組織の炎症マーカーである歯肉溝滲出液中の好中球エラスターゼ活性については、顆粒球特異基質を用いて計測した。その結果、短期間の禁煙では歯肉溝滲出液のエラスターゼ活性が変化しないことが示された。すなわち、一時的な禁煙は歯周組織の改善に寄与せず、長期的継続が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The relationship between periodontal destruction and smoking has been demonstrated by epidemiological evidence. However the mechanism of this effect is unknown and it may be related to a host defense reaction. The aim of this study is to investigate the effects of smoking cessation on the host defense mechanism in gingival crevicular fluid (GCF) using multiple analysis. The neutrophil elastase activity in GCF (one of inflammation markers) was measured with a low molecular weight substrate and amount of cotinine in saliva was measured with ELISA. From the results, the elastase activity in GCF was not changed in short term smoking cessation. Furthermore it was shown that temporary smoking cessation does not contribute to an improvement of periodontal tissue and it needs more long period.

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：歯学・歯周疾患治療学

キーワード：禁煙 歯肉溝滲出液 好中球 エラスターゼ 唾液 コチニン 禁煙支援 免疫

1. 研究開始当初の背景

喫煙は、歯周病最大の環境因子であることを裏付ける Bergström をはじめとする疫学的な報告や、歯周組織に及ぼす影響を生化学的に検索した報告が多数蓄積されている。前者では、喫煙者における高い歯周組織の破壊程度、歯周治療の介入における低い治療成果、そして歯肉血流量の変化が臨床的に報告されている。一方後者における報告では、歯肉縁下細菌叢の相違や歯肉溝内における生体防御機構の変化を対象として検討されてきている。しかし、それ以外の検討はほとんど成されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

そこで我々は、喫煙者は非喫煙者と比較して口腔清掃は同程度であり歯肉の炎症状態は軽度であっても、歯槽骨の吸収や付着の喪失程度が大きいとの報告から、喫煙による歯周組織破壊の一因には、生体防御機構の不均衡が関わっていると想定した。特に、喫煙の影響に対して自然免疫系の第一線で活躍する歯肉溝滲出液 (gingival crevicular fluid; GCF) の好中球機能や、それ由来のエラスターゼの変化に注目して報告してきた。その結果、喫煙、もしくはタバコに含まれるニコチンやその代謝産物であるコチニンにより、エラスターゼ活性の変調が生じることを報告し、そのデータを蓄積してきた。そこで、禁煙により歯周組織免疫応答の変化として、好中球機能やエラスターゼ活性が変調する可能性を推察し、禁煙による歯周組織に対する改善を生化学的に解析した。さらに、唾液成分解析を加え喫煙習慣、もしくは禁煙効果の簡易検査への応用の可能性を考察した。

3. 研究の方法

(1) 被験者の選択

被験者は、附属病院臨床研究生とし、全身的な疾患および特記すべき既往歴のない男性喫煙者 5 名とした (平均年齢 ± 標準偏差 ; 26.6 ± 2.3 歳)。研究開始前には、この

研究の主旨をよく説明すると同時にファガーストロームのタバコ依存度テストを行い、同意を得た上で研究に協力参加してもらった。なお、本研究は日本歯科大学生命歯学部倫理委員会の承認のもと行われた (承認番号 08-21)。

(2) 臨床パラメーター

以下の項目について、臨床検査を行った。

Probing Pocket Depth; PPD

Gingival Index; GI (Löe; 1967¹⁶⁾)

Plaque Index; PII (Silness & Löe; 1964¹⁷⁾)

GCF 量 (Periotoron[®] 8000 値)

GCF 量測定ならびに採取部位は、歯冠修復物のない上顎左右犬歯近心部を対象とした。なお、対象とする歯が、修復もしくは欠損している場合は近心側の歯の同部位とした。GCF 量は、測定値に対する検量線を用いて算出した。GCF の採取は、歯肉縁上プラークの除去、コットンロールによる簡易防湿を行い、エアシリンジによる採取部位の乾燥後 Periotoron[®] 8000 (Oraflow, Plainview, NY, USA) を用いて、ペーパーストリップス (Oraflow, Plainview, NY, USA) を歯肉溝内に 3 回挿入し GCF 採取を行った。そして、以下に述べる生化学的検索の試料は、1ml リン酸緩衝液 pH7.4 (PBS) 中にペーパーストリップスを入れ、45 分間攪拌を行い遠心分離後の上清とし、解析を行うまで -80℃ にて保存した。なお、今回の生化学的解析は、各部位における総量を推奨する Lamster らの報告に準じて行った。

なお、禁煙期間は、被験者がストレスなどの日常生活の支障を来さない 3 日間とした。

(3) 生化学的検索

GCF 成分検査

a. エラスターゼ活性の測定

測定方法は、Gustafsson らの方法を一部変更して行った。

b. エラスターゼ A1AT 複合体 (E-A1AT) の測定

測定方法は Figueredo らの方法に従った。

c. A1AT 量の測定

A1AT 量の測定方法は Figueredo らの方法に従い、ELISA を用いて行った。

唾液成分検査

以下に記載する a~c の試料である唾液は、無味無臭の滅菌したガムを用いて 5 分間噛んで頂き、貯留した唾液を遠心分離後の上清を測定に用いた。

a. コチニン量の測定

ELISA kit (DRG inc., Germany) を用いた。その量は ng/ml で表した。

b. エラスターゼ活性の測定

GCF におけるエラスターゼ活性と同じ基質である S-2484[®] を用いた。検索方法は 0.9mM の基質濃度を用いた伊藤らの方法に準じた。なおその活性は IU で表した。

c. Aspartate aminotransferase (AST)活性の測定

溶存酸素の存在下でピルビン酸オキシダーゼの作用により酸化縮合させて発色させる POP・TOOS 法 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. JAPAN) を応用した。なおその活性は IU で表した。

(4) 統計処理

禁煙前後の臨床的検索結果は *paired t-test* を、生化学的検索結果は Mann-Whitney *U* 検定を用いた。なお、統計解析は統計解析用ソフト Stat View J-4.5 を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) ファガーストロームのタバコ依存度テストの結果

各被験者のタバコ依存度は “普通” であった。

(2) 禁煙期間

患者が日常生活に支障のない禁煙期間は 7.0 ± 2.8 日であった。なお、全被験者が共通に達成できた最短禁煙期間は 3 日であったため臨床パラメーターと GCF と唾液に対する生化学的検索は禁煙 3 日後の試料を用いた。

(3) 臨床パラメーターの変化

禁煙 3 日間では臨床パラメーターの変化に、統計学的有意差は認められなかった (表 1)。

表1 臨床パラメータの変化

	禁煙直前		禁煙3日目
PPD	2.0±0.0	NS	2.0±0.0
PII	0.9±0.6	NS	0.4±0.5
GI	0.2±0.4	NS	0.1±0.6

(4) 生化学的検索結果の変化

禁煙 3 日での変化は、GCF の生化学的検索では統計学的有意差は認められなかった (表 2-1)。

表2-1 禁煙前後の生化学的变化

	禁煙直前		喫煙開始時
GCF量(μl)	0.31±0.20	NS	0.32±0.20
エラスターゼ活性(cells/sites)	7.68±5.96	NS	7.53±7.28
活性型E-A2MG (cells/sites)	2.25±1.21	NS	1.89±0.74
フリーエラスターゼ (cells/sites)	5.47±4.88	NS	5.64±6.69
A1AT量 (pg/sites)	18.75±18.26	NS	14.73±8.96
E-A1AT (au/sites)	4.06±1.93	NS	3.55±3.11
唾液中コチニン量(ng/ml)	62.54±6.68	P<0.05	48.17±12.93
唾液エラスターゼ活性(IU)	0.08±0.07	NS	0.05±0.04
AST(IU)	2.07±3.08	NS	1.27±0.68

表2-2 コチニン量が0ng/mlとなった時点での生化学的变化

	禁煙直前		喫煙開始時
GCF量(μl)	0.56	→	0.32
エラスターゼ活性(cells/sites)	15.87	→	9.52
活性型E-A2MG (cells/sites)	4.09	→	1.97
フリーエラスターゼ (cells/sites)	11.78	→	7.56
A1AT量 (pg/sites)	23.16	→	9.35
E-A1AT (au/sites)	2.26	→	1.05
唾液中コチニン量(ng/ml)	74.44	→	0.00
唾液エラスターゼ活性(IU)	0.04	→	0.01
AST(IU)	0.48	→	1.78

一方、唾液に対する生化学的検索は、コチニン量は統計学 5%で有意差を認めたものの、エラスターゼ活性と AST 活性は有意差を認めなかった。なお、10 日間の禁煙で唾液中コチニン量は 0ng/ml となった (表 2-2)。

(5) まとめ

禁煙3日間において唾液中コチニン量が有意に減少したものの、エラスターゼ活性やその周辺産物の変化の統計学的有意差は認められず、短期間の禁煙ではGCFエラスターゼ活性の変化は観察されなかった。しかしながら、唾液中コチニン量が0ng/mlとなった被験者では、GCFエラスターゼ活性やその周辺産物の低下傾向が認められ、サンプルサイズの増加により、唾液中コチニン量とGCFエラスターゼ活性との関係が明らかになる可能性が示唆された。

一方、唾液による酵素活性の変化は、短期間の禁煙では認められなかったが、新たな唾液検査の候補マーカーとして、禁煙は、喫煙により抑制されていた炎症性変化の発現を促し、臨床的に炎症性変化の開放を生じさせる報告があることから、今後唾液中遊離ヘモグロビン検索が、成分解析の一つの候補として考えられた。

より長期間の禁煙の歯周組織への変化を臨床的・生化学的に検索することも課題で、その変化の解明が、歯科での禁煙支援をより強く推進する基盤となり、簡易検査開発の布石となると考えられた。

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5件)

Ito H, Sekino S, Murakashi E, Iguchi (Ishiguro) K, Hashimoto S, Numabe Y, Evaluation of bleeding on probing and gingival crevicular fluid enzyme activity for detection of periodontally active sites during supportive periodontal therapy, *Odontology*, 査読有, vol. 102, 2014, 550-561

伊藤 弘, 小川智久, 沼部幸博, 短期間禁煙がGCFエラスターゼ活性と唾液成分に及ぼす

影響、*歯科人間ドック学会会誌*、査読有、8巻、2013、61-67

沼部幸博, 喫煙の歯周組織環境に与える影響、-基礎的背景-、*臨床環境医学*、査読有、21巻、2012、183-191

伊藤 弘, 橋本修一, 沼部幸博, 歯科人間ドックにおけるGCF測定導入に向けて - 特にその酵素活性の安定を図るために -、*歯科人間ドック学会会誌*、査読有、6巻、2011、17-22

大森みさき, 両角俊哉, 稲垣幸司, 横田 誠, 沼部 幸博, 佐藤 聡, 伊藤 弘, 王 宝禮, 上田雅俊, 山田 了, 伊藤公一, ポジションペーパー 喫煙の歯周組織に対する影響、*日本歯周病学会会誌*、査読有、53巻、2011、40-49

[学会発表](計5件)

伊藤 弘, 関野 愉, 村瀬悦子, 石黒一美, 沼部幸博, 戸円智幸, 橋本修一, 佐々木大輔, 八重柏隆, 國松和司, 高井英樹, 目澤 優, 小方頼昌, 渡邊 久, 萩原さつき, 和泉雄一, 廣島佑香, 木戸淳一, 永田俊彦, 歯周疾患のスクリーニング検査としてアンケート調査および唾液検査の有用性、秋季日本歯科保存学会、10月17日、2013年、秋田

伊藤 弘, 沼部幸博, 橋本修一, 森田 学, 稲垣幸司, 埴岡 隆, 王 宝禮, 藤 井健男, 山本龍生, 両角俊哉, 喫煙は歯周治療における超過医療費因子となりうるか?, 秋季日本歯周病学会、9月22日、2013年、前橋

沼部幸博, 伊藤 弘, 石井マイケル大宜, 倉治竜太郎, 橋本修一, 歯肉溝滲出液(GCF)中Hemoglobin(Hb)検出を応用した歯周病迅速診断キットの概要、秋季日本歯周病学会、9月22日、2013年、前橋

Numabe Y, Ito H, Alterations of salivary PMN functions after cigarette smoking, *Japan China Dental Conference 2012*, April 27, 2012, Sichuan University, Chengdu, China

Ito H, Numabe Y, Smoking and GCF neutrophil activity, *Japan China Dental*

Ccnference 2012、April 27、2012、Sichuan
University, Chengdu, China

〔図書〕(計4件)

和泉雄一、沼部幸博、山本松男、木下淳博
編集主幹、分担執筆、医師訳出版株式会社、
ザペリオドントロジー第2版、2014、280

沼部幸博、東京法規出版、歯と口の力UP ナ
ビ いつまでも自分の歯で食べるために、2013、
32

沼部幸博、東京法規出版、高齢期の歯と口
の健康づくり、2013、12

沼部幸博、クインテッセンス出版株式会社、
禁煙 あなたのお口と全身の健康、2012、88

6. 研究組織

(1)研究代表者

沼部 幸博 (NUMABE YUKIHIRO)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号：90198557

(2)研究分担者

伊藤 弘 (ITO HIROSHI)
日本歯科大学・生命歯学部・准教授
研究者番号：30184683

石黒 一美 (ISHIGURO KAZUMI)
日本歯科大学・生命歯学部・助教
研究者番号：20508486

(3)連携研究者

なし