

原 著

慢性歯周炎患者における喫煙および受動喫煙の
GCF エラスターゼ活性に及ぼす影響

伊藤 弘 沼部 幸博

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座
(受付日：2007年5月1日 受理日：2007年7月4日)

The Gingival Neutrophil Elastase Activity in Chronic Periodontitis Patients with
Active/Passive Smoking

Hiroshi Ito and Yukihiro Numabe

Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo, Department of Periodontology
(Received : May 1, 2007 Accepted : July 4, 2007)

Abstract : A relationship between periodontal degradation and smoking has been demonstrated by epidemiological evidence. While the mechanism of this effect remains unknown, it may be related to a host-response reaction. The aim of this study was to investigate the effects of smoking on gingival neutrophil elastase activity and biochemical markers of periodontal degradation in subjects with active/passive smoking. Sixty-eight subjects with moderate chronic periodontitis were examined. Clinical records of the periodontal probing depth (PD), plaque index (PII), gingival index (GI) and amount of gingival crevicular fluid (GCF) were made in each individual. The extracellular elastase activity was measured in GCF samples using a chromogenic low molecular substrate, while α 1-antitrypsin, elastase α 1-antitrypsin complex and saliva cotinine levels were measured using ELISA. The following results were obtained. 1) Smokers had a significantly lower GI than non smokers. 2) Based on the amount of saliva cotinine, 22 of the self-reported non-smokers were actually passive smokers, and 12 were actually non-smokers. 3) The non/passive-smokers had significantly lower extracellular elastase activities than the non-smokers. 4) No significant differences in the α 1-antitrypsin and elastase α 1-antitrypsin complex levels were observed between non-smokers, passive smokers, and smokers. 5) The amount of saliva cotinine was weakly correlated with the α 1-antitrypsin concentration in smokers. These results indicated that passive smoking/smoking altered the gingival neutrophil elastase activity and the amount of α 1-antitrypsin, suggesting that passive smoking/smoking may interfere with the periodontal host defense system. Furthermore, alterations in the amount of α 1-antitrypsin in the GCF appear to be a biochemical marker of periodontal degradation in individuals with a passive smoking/smoking habit. *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Periodontol)* 49: 198 – 206, 2007.

Key words : passive smoking/smoking, saliva cotinine, extracellular elastase activity

連絡先：伊藤 弘

〒102-8159 東京都千代田区富士見 1-9-20

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座

Hiroshi Ito

Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo, Department of Periodontology

1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan

E-mail: hiroshi@tky.ndu.ac.jp

要旨：歯周組織破壊と喫煙の関連は、疫学的に報告されているものの、そのメカニズムは不明であるが、宿主の反応が関与していると考えられている。本研究の目的は、喫煙および受動喫煙が顆粒球由来 GCF エラスターゼ活性に対する影響と歯周組織破壊に関連する生化学的マーカーの検索を目的とした。

被験者は、中等度慢性歯周炎患者 68 名(非喫煙者 34 名, 喫煙者 34 名, すべて男性)を対象とした。検索項目は、臨床パラメーターとして PD, PII, GI, GCF 量を、生化学的項目は、唾液中コチニン量、細胞外エラスターゼ活性、 α 1-antitrypsin(A1AT) 量、elastase A1AT complex (E-A1AT) 形成量とし、Enzyme assay と ELISA を用いた。

本研究の結果より以下の結論を得た。

- 1, 喫煙者は、非喫煙者と比較して GI は有意に低かった。
- 2, 唾液中コチニン量から、自己申告による非喫煙者中受動喫煙者は 22 名、非喫煙者は 12 名であった。
- 3, 非喫煙者に対して受動喫煙者・喫煙者は、細胞外エラスターゼ活性が有意に低かった。
- 4, 非喫煙者・受動喫煙者、喫煙者に対して、E-A1AT 形成量と A1AT 量は有意差を認めなかった。
- 5, 喫煙者の唾液中コチニン量に対し、A1AT 量は弱い負の相関を示した。

以上の結果より、受動喫煙・喫煙より顆粒球由来 GCF エラスターゼ活性が変化し、歯周組織防御機構の不均衡を示し、インヒビター量の変化が関与していると考えられた。すなわち、GCF 中におけるインヒビター量の変化が、受動喫煙・喫煙に対する歯周組織破壊の生化学的マーカーの一つと考えられた。

キーワード：受動喫煙・喫煙、唾液中コチニン、細胞外エラスターゼ活性

緒 言

喫煙は、Bergström をはじめとする臨床的な疫学報告^{1,2)}や、*in vitro* による歯周組織に及ぼす影響を検索した報告³⁾より、歯周組織破壊に対する最大のリスクファクターであることが明らかとなっている。現在まで喫煙が歯周組織に及ぼす影響については、

1) 歯肉血流量の変化⁴⁾、2) 歯肉縁下細菌叢の相違⁵⁻⁷⁾、3) 歯肉溝内における生体防御機構の変化⁸⁻¹⁰⁾を対象として検討されてきている。我々は、喫煙者は非喫煙者と比較して歯肉の炎症状態は小さいのにもかかわらず、歯槽骨の吸収状態や付着の喪失が大きい報告^{11,12)}に基づき、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による破綻が関わっていると想定し、生体防御機構の最前線で活躍する歯肉溝内に存在する好中球の機能について焦点を絞り検索を行った。特に、喫煙の影響に対して好中球由来のエラスターゼの変化は、その活性や複合体の形成、そしてインヒビター量との関連が報告されている⁸⁻¹⁰⁾。しかし、歯周炎を伴う非喫煙者・喫煙者における、細胞外エラスターゼ活性の変化は、報告者により様々であり見解の一致は見られていない¹³⁻¹⁵⁾。一方、受動喫煙は、非喫煙者における歯周病の罹患率の上昇に關与する報告¹⁶⁾や、2003 年より我国で導入された健康増進法の施行により、受動喫煙防止に関する機運が加速度的に高まって

いる。受動喫煙とは、非喫煙者が、喫煙者のそばにいる、もしくは喫煙者と同じ部屋の共有より、他人の煙草の副流煙を自分の意志とは関係なく吸い込むことを指す。その副流煙は主流煙に対して刺激性は強く、発癌物質や有害成分の含有量も多いとされており、特にその為害作用として、肺癌の発症に対するコンセンサスが得られている¹⁶⁾。そして受動喫煙者は、ニコチンを含む 4000 種類以上の化学物質や少なくとも 40 種類の発癌性物質を暴露することとなる¹⁶⁾。現在、その成分であるニコチンの代謝産物であるコチニンは、生体内に 19 ~ 40 時間の半減期で停滞するとされており、喫煙習慣や受動喫煙を検索するための一つの指標として用いられている¹⁶⁻¹⁸⁾。このような背景から、喫煙習慣のある被験者では、コチニンが歯肉溝滲出液中や唾液中に存在する報告¹⁹⁾や、血清中コチニンと歯周組織破壊との関連性が報告されている²⁰⁾。

そこで、今回我々は、非喫煙者・受動喫煙者、そして喫煙者による歯周病の発症・進行に關わる歯肉溝滲出液中に観察される生化学的マーカーを検出することを目的として、唾液中コチニン量に対するエラスターゼ活性とその複合体の形成、そしてインヒビター量との関連性の検索を行った。

材料および方法

1. 被験者の選択

被験者は、日本歯科大学歯学部附属病院総合診療科へ来院し、全身的な疾患および特記すべき既往歴のない、慢性歯周炎と診断された男性患者68名(非喫煙者(34名, 63.35 ± 11.21 歳), 喫煙者(34名, 53.94 ± 10.65 歳, 1日 20.88 ± 12.15 本10年以上の喫煙歴))とした。また、過去3ヶ月間、抗生物質の投与がなく歯周治療が行われていない患者を選択した。研究開始前には、この研究の主旨をよく説明し、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歯学部倫理委員会の承認のもと行われた。

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。

- 1) Probing Pocket Depth; PPD
- 2) Gingival Index; GI (Löe²¹); 1967)
- 3) Plaque Index; PII (Silness & Löe²²); 1964)
- 4) 歯肉溝滲出液(gingival crevicular fluid; GCF)量 (Periotoron[®] 8000 値)

GCF量測定ならびに採取部位は、歯冠修復物のない単根歯を対象とし、GCF量は、測定値に対する calibration curve 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、Periotoron[®] 8000を用いて、ペーパーストリップスを歯肉溝内に3回挿入し採取を行った。そして、以下に述べる生化学的検索の試料は、1mlのリン酸緩衝液 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 -70°C 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²³⁾や、解析結果に対する濃度を用いたLenaらの報告^{8,9)}があるため、両者の方法で解析した。すなわち、濃度は1 μl に対する生化学的検索結果を、総量は採取したGCF総量における生化学的検索結果で表した。

3. 生化学的検索

1) 唾液中コチニン量の測定

ELISA kit(DRG inc., Germany)を用いた。測定する唾液は、咀嚼により細菌性プラークや歯肉の炎症による出血などの外来因子の混入を可及的に排除するために、開口にした状態にて舌下唾液腺より自然に排出され舌下部に貯留した唾液を採取し、遠心分離後の上清を測定に用いた。また、自己申告による非喫煙者の測定により、唾液中にコチニンが検出されない被験者を非喫煙者と、検出された被験者を受動喫煙者とした。

2) 細胞外エラスターゼ活性の測定

測定方法は、Gustafssonら²⁴⁾の方法に従い、以下にその概略を示す。

(1) 細胞外エラスターゼ活性に対する Standard の作製

Mono-Poly resolving medium (Flow Laboratories Inc., USA)を用いて、健康な被験者の前腕における皮膚脈より好中球を分離した。分離後、1ml中に 5×10^6 個に調製した好中球浮遊液を、水中下にて超音波破碎を3回行い、PBSにて洗浄後 granulocyte エラスターゼ基質、L-pyroglutamyl-prolyl-valine-p-nitroanilide (S-2484[®], CHROMOGENIX, SWEDEN) (S-2484)を用いた Enzyme Assayにて、マイクロプレートリーダー(日本バイオラッド ラボラトリーズ株式会社)を用い、405nmの波長にてその活性の確認を行い Standard とした。なお、その活性は、milliabsorbance (mAbs)で表した。

(2) 細胞外エラスターゼ活性の測定方法

試料を、96穴マルチウエルディッシュ(NUNC/NONCLON 167008, NUNC Brand Products, Denmark)に100 μl に加え、dimethyl sulfoxide と滅菌蒸留水にて希釈し、2mmol/lとしたS-2484を添加した。 37°C にて4時間インキュベートした後、Standardと共にその活性の測定を行った。

3) エラスターゼ A1AT 複合体(E-A1AT)の測定

測定方法は Figueredoら²⁵⁾の方法に従い、以下にその概略を示す。

(1) E-A1ATに対する Standard の作製

前述の細胞外エラスターゼ活性に対する Standard 50 μl に、1mg/mlに希釈したA1AT(SIGMA, USA)を10 μl 添加後、 37°C にて1時間インキュベート、S-2484を用いた Enzyme Assayにてその活性の抑制されていることの確認を行い、Standardとした。なおその形成量は、任意の単位(arbitrary units; au)で表した。

(2) E-A1ATの測定方法

E-A1ATの測定は、Sandwiched ELISAを用いて行った。すなわち、96穴マルチウエルディッシュ(NUNC/IMMUNO PLATE 439454, NUNC Brand Products)に、一次抗体として Polyclonal antibody against α -1-antitrypsin (DAKO, Denmark)を加え、 4°C にて一昼夜インキュベートを行った。各ウエルを、0.05% Polyoxyethylenesorbital monolaurate (Tween20, SIGMA)を含むPBS(Tween/PBS)にて洗浄後、各群により調製、遠心分離した上清と Standard を加え 37°C にてインキュベートを行った。洗浄後、二次抗体として Alkaline phosphatase - conjugated poly-

表 1 各被験者群における年齢と臨床的パラメーターの比較 (mean ± SD)

	非喫煙者 (n=12)	P1	受動喫煙者 (n=22)	P2	喫煙者 (n=34)	P3
年齢	67.17 ± 7.00	NS	61.27 ± 12.60	NS	53.94 ± 10.65	NS
PPD (mm)	4.63 ± 1.03	NS	4.38 ± 1.18	NS	4.63 ± 1.67	NS
PII	1.17 ± 0.72	NS	0.81 ± 0.66	NS	1.24 ± 0.65	NS
GI	1.83 ± 0.39	NS	1.36 ± 0.66	NS	1.47 ± 0.61	p < 0.01
GCF 量 (μl)	1.86 ± 0.80	NS	1.38 ± 0.86	NS	1.46 ± 0.79	NS
唾液中 コチニン量 (ng/ml)	0 ± 0	-	2.56 ± 1.67	p < 0.01	58.23 ± 9.85	-

P1: 非喫煙者と受動喫煙者との比較

P2: 受動喫煙者と喫煙者との比較

P3: 喫煙者と非喫煙者との比較

clonal sheep antibody against elastase (The Binding Site, UK) を添加, 再度 37°C にてインキュベートを行った。洗浄後, 三次抗体として Anti-sheep immunoglobulins alkaline phosphatase (CHEMICON international, USA) を添加, 再度 37°C にてインキュベートを行った。そして, 最終洗浄後, P-nitro-phenyl-phosphate (2.7mmol/l) (4-Nitrophenyl phosphate, JANSEN, USA) を添加, マイクロプレートリーダーを用い, 405nm の波長にて Standard とともに測定を行った。

4) A1AT 放出量の測定

A1AT 放出量の測定方法は Figueredo ら²⁵⁾の方法に従い, ELISA を用いて行った。すなわち, 96 穴マルチウェルディッシュ (NUNC-IMMUNO PLATE 439454, NUNC Brand Products) に, 各群により調製, 遠心分離した上清と Standard (μg/l) (Standard Human Serum Protein Calibrator, DAKO) を加え 37°C にてインキュベートを行った。洗浄後, Polyclonal antibody against α-1-antitrypsin (DAKO) を加え 37°C にて, 再度インキュベートを行った。洗浄後, Anti-rabbit alkaline phosphatase - conjugated swine anti-rabbit immunoglobulin (DAKO) を添加, 再度 37°C にてインキュベートを行った。そして, 最終洗浄後の測定方法は, E-A1AT の測定と同様の方法で測定を行った。なお, その放出量は, pg で表した。

5) エラスターゼ A2MG 複合体(活性型 E-A2MG) とフリーエラスターゼの測定

Figueredo ら²⁶⁾の方法に従い測定を行った。エラスターゼの活性は, 複合体を形成しないフリーエラスターゼと, 低分子基質の分解能を有する活性型 E-A2MG がある。なお, E-A1AT は A1AT と結合し

て複合体を形成することにより完全に活性を失うことから, 試料に A1AT(1mg/ml) を添加し, S-2484 を用いた enzyme assay により測定された活性は, 活性型 E-A2MG とした。なお, 細胞外エラスターゼ活性から活性型 E-A2MG を差し引いた残りの活性は, フリーエラスターゼとした。なお, その活性は, mAbs で表した。

4. 統計処理

非喫煙者・受動喫煙者そして喫煙者間における有意差検定は, 以下の方法を統計解析用ソフト Stat View J-4.5 を用いて解析した。年齢と臨床パラメータに関しては Student-*t* 検定を, 生化学的検査については Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* 検定を用いた。また, 唾液中コチニン量に対する, 生化学的検査項目の相関については Spearman の順位相関係数を用いた。

結 果

1. 非喫煙者・受動喫煙者, 喫煙者における年齢, 臨床的パラメーターの比較(表 1)

年齢, 臨床的パラメーターの比較を表 1 に示す。GI に関しては, 非喫煙者に対し喫煙者は有意に低かった。しかし, 年齢, その他の臨床パラメーターに関しては, 非喫煙者・受動喫煙者, 喫煙者ともに有意差は認められなかった。

2. 非喫煙者・受動喫煙者, 喫煙者における生化学的検査結果(表 2-1,2)

1) 唾液中コチニン量

非喫煙者と自己申告した被験者 34 名中 22 名の唾液

表 2-1 各被験者群における生化学的検索結果の比較 - GCF 総量における比較 (mean ± SD)

	非喫煙者 (n=12)	P1	受動喫煙者 (n=22)	P2	喫煙者 (n=34)	P3
細胞外エラスターゼ 活性 (mabs)	12.34 ± 17.19	p < 0.05	3.93 ± 8.61	NS	5.02 ± 7.47	NS
E-A1AT (au)	16.55 ± 0.90	NS	1.31 ± 1.01	NS	1.24 ± 0.89	NS
A1AT (pg)	8.28 ± 5.81	NS	5.94 ± 5.41	NS	5.50 ± 5.60	NS
活性型 E-A2MG (mabs)	5.88 ± 6.27	p < 0.05	2.12 ± 3.96	NS	3.25 ± 3.20	NS
フリーエラスターゼ (mabs)	6.46 ± 12.96	NS	1.80 ± 4.78	NS	1.77 ± 5.30	NS

P1: 非喫煙者と受動喫煙者との比較

P2: 受動喫煙者と喫煙者との比較

P3: 喫煙者と非喫煙者との比較

表 2-2 各被験者群における生化学的検索結果の比較 - GCF 中の濃度比較 (mean ± SD)

	非喫煙者 (n=12)	P1	受動喫煙者 (n=22)	P2	喫煙者 (n=34)	P3
細胞外エラスターゼ 活性 (mabs/μl)	5.22 ± 6.36	p < 0.05	1.77 ± 2.99	NS	2.71 ± 2.72	p < 0.05
E-A1AT (au/μl)	0.89 ± 0.32	NS	0.87 ± 0.23	NS	0.82 ± 0.23	NS
A1AT (pg/μl)	4.07 ± 2.21	NS	3.59 ± 1.98	NS	3.34 ± 1.82	NS
活性型 E-A2MG (mabs/μl)	2.57 ± 2.04	p < 0.05	1.04 ± 1.38	p < 0.05	1.91 ± 1.37	NS
フリーエラスターゼ (mabs/μl)	2.65 ± 4.85	p < 0.05	0.72 ± 1.70	NS	0.80 ± 1.97	NS

P1: 非喫煙者と受動喫煙者との比較

P2: 受動喫煙者と喫煙者との比較

P3: 喫煙者と非喫煙者との比較

中にコチニンが 2.56 ± 1.67 ng/ml 検出された。また、受動喫煙者と比較して喫煙者は唾液中にコチニンが 58.23 ± 9.85 ng/ml 検出され有意に高かった。

2) 細胞外エラスターゼ活性

総量を用いた解析では、非喫煙者において 12.34 ± 17.19 mAbs の活性に対し受動喫煙者は 3.93 ± 8.61 mAbs の活性となり有意に低かった。一方濃度を用いた解析では、非喫煙者において 5.22 ± 6.36 mAbs/μl の活性に対し、受動喫煙者と喫煙者の活性ではそれぞれ 1.77 ± 2.99 mAbs/μl, 2.71 ± 2.72 mAbs/μl の活性を示し有意に低かった。

3) E-A1AT 形成量

総量・濃度による解析において、非喫煙者・受動喫煙者、喫煙者間に有意差は認められなかった。

4) A1AT 放出量

総量・濃度による解析において、非喫煙者・受動喫煙者、喫煙者間に有意差は認められなかった。

5) 活性型 E-A2MG

総量を用いた解析では非喫煙者において 5.88 ± 6.27 mAbs に対し受動喫煙者は 2.12 ± 3.96 mAbs を示し有意に低かった。一方濃度を用いた解析では、非喫煙者 2.57 ± 2.04 mAbs/μl に対し受動喫煙者 1.04 ± 1.38 mAbs/μl を示し、さらに喫煙者 1.91 ± 1.37 mAbs/μl に対し受動喫煙者 1.04 ± 1.38 mAbs/μl を示し有意に低かった。

6) フリーエラスターゼ量

総量を用いた解析において、非喫煙者・受動喫煙者、喫煙者間に有意差は認められなかった。濃度を用いた解析では、非喫煙者において 2.65 ± 4.85 mAbs/μl に対し受動喫煙者は 0.72 ± 1.70 mAbs/μl を示し有

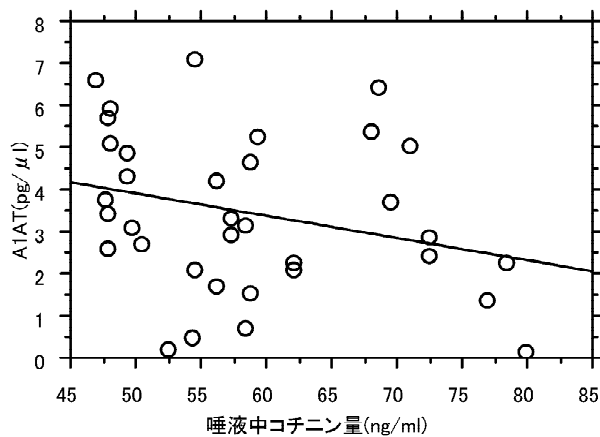


図1 唾液中コチニン量に対するGCF中のA1AT濃度との相関関係

意に低かった。

3. 唾液中コチニン量と生化学的検索結果との相関

1) 受動喫煙者

総量・濃度を用いた解析共に、唾液中コチニン量と各生化学的検索結果間に、相関は認められなかった。

2) 喫煙者

総量を用いた解析では唾液中コチニン量と各生化学的検索結果間に、相関は認められなかったものの、濃度ではA1AT放出量と唾液中コチニン量間に対して $p = 0.025$, $r_s = -0.383$ となり弱い負の相関が認められた(図1)。

考 察

現在施行されている健康増進法において、公共の場における煙草の暴露により健康が損なわれた場合、患者の生体内におけるコチニンの検出が受動喫煙の一診断基準としてあげられている。今回、34名の非喫煙者として採取した唾液中に、コチニンの存在が22名の被験者で検出され、受動喫煙者と認めた。非喫煙者と申告した被験者に唾液中コチニンが認められる報告^{17,27)}では、平均して2.5ng/mlの量が検出され、我々の報告した 2.5 ± 1.67 ng/ml とほぼ近似するものであった。受動喫煙の場合、非喫煙者のパートナー(最も親しい友人や配偶者)が喫煙者、またはほとんどの友人が喫煙者である場合に、受動喫煙が有意に多く認められる報告¹⁷⁾より、今回の非喫煙者と申告した被験者でも同様な生活環境の傾向が想定され、更に公共の場における受動喫煙が考えられた。

受動喫煙の影響に対する報告²⁷⁻²⁹⁾は、唾液中におけ

る好中球の機能変化や、深いポケット形成やGCF中におけるII-1 β やラクトフェリン値の上昇、および歯周ポケット内細菌叢の変化があげられるものの、細胞外エラスターゼ活性や複合体形成、インヒビター量に関する検索は不明であった。そこで、受動喫煙・喫煙による歯周組織破壊の発症・進行に関わる可能性のある生化学的マーカーが、この領域に存在し得るか否かを検索の焦点とした。

歯周組織破壊のメカニズムをGCF中における細胞外エラスターゼ活性を指標とした報告は多く、臨床パラメーターとの関連性、組織破壊に伴うフリーエラスターゼの増加などが報告^{24,26)}されており、その一方、歯周治療の成果の指標にE-A1AT量の測定の有効性も述べられている³⁰⁾。これら一連の報告は、細菌性プラークや細胞周囲の環境変化に対応する好中球の機能変化は、歯周組織の恒常性維持において重要性であることを示唆するものである。また、非喫煙者と喫煙者に対する同様の研究報告⁸⁻¹⁰⁾では、健康な歯周組織を有する被験者では両群とも細胞外エラスターゼ活性に差はないものの、歯周炎に罹患した被験者では、特に喫煙者において細胞外エラスターゼ活性の変化を示し、A2MG量やE-A1AT形成量の低下を示している。今回の解析結果より、非喫煙者は、受動喫煙者に対して細胞外エラスターゼ活性が高い結果となり、その活性の変化は低分子の基質を分解・活性を有しているE-A2MG量の変化によるものと考えられた。しかし、濃度を用いた解析では、フリーエラスターゼの変化も、細胞外エラスターゼの変化に寄与する結果となり、GCFにおける総量・濃度における解析では、両者で変化をもたらす結果となった活性型E-A2MGの変化は、細胞外エラスターゼ活性の変化に関わる重要な因子であることが推察された。すなわち、受動喫煙によりA2MG量が減少することにより、細胞外エラスターゼ活性の変化が生じ、その変化は、抗原に対する防御機構の低下を惹起させることが示唆された。

A1AT量に関しては、非喫煙者・受動喫煙者・喫煙者間では有意差は認められなかったものの、唾液中コチニン量に伴い、喫煙者はGCF中のA1AT濃度の低下が観察された。すなわち、喫煙量に依存してA1AT量の変化が考えられた。A1ATは、A2MGと異なり、細胞外に放出されたエラスターゼと複合体を形成するとその活性は完全に不活化され、A1ATと細胞外エラスターゼ活性のバランスの不均衡が、歯周組織破壊をもたらす一因となる²⁶⁾。一方、E-A1AT量は、非喫煙者・受動喫煙者・喫煙者ともに有意差がないものの、細胞外エラスターゼ活性については、非喫煙者で高くなった。インヒビター量や複合体量の差がないのにも

かわらず、活性が高い結果は、非喫煙者に対して受動喫煙者・喫煙者のGI値の低いことが一つの因子となりうると考えられる。すなわち、過去の報告^{4,11)}が示すように、喫煙によるニコチンの暴露による歯肉血流量の低下が、GI値を下げ、炎症反応に対するマスクング効果が本研究からも示された。その結果、血流量の一時的低下による、免疫担当細胞である好中球の歯周ポケットへの集積に対する一時的な低下を示し、喫煙による細胞外エラスターゼ活性の変化が示されたと考えられた。

今回検索対象とした細胞外エラスターゼ活性が発現するひとつの条件には、インヒビター量の低下、もしくは機能不全による複合体形成不全が考えられる。逆に、今回のデータのような非喫煙者に対し受動喫煙者・喫煙者における細胞外エラスターゼ活性の低下は、局所へ集積した過剰なインヒビター、もしくは好中球の機能不全・低下によるものとも考えられる。すなわち、GIの低値として現れた喫煙による血流量の低下が、様々な防御機構の変化を歯周ポケット内で生じさせているとも考えられ、GCF採取時における臨床的な状況が、生化学的検索結果に大きく左右するものと考えられた。すなわち、報告者¹³⁻¹⁵⁾により細胞外エラスターゼ活性に対する見解の相違の一つの根拠となるものと思われる。インヒビターの機能不全については、活性酸素によるA1ATの酸化による場合があり、好中球周囲に酸化型A1ATが形成され、その結果E-A1ATが形成できない環境形成に関わっていると報告されている^{31,32)}。また、喫煙により活性酸素産生能が上昇する報告³³⁾から、歯周ポケット内には多量の酸化型A1ATの存在が考えられ、好中球の活性酸素産生能と細胞外エラスターゼ活性との関わりに加え、酸化ストレスマーカーとしての酸化型A1AT量³⁴⁾との相互バランスの解明が、受動喫煙・喫煙による歯周組織破壊のメカニズム解明へ導く重要な鍵となるものと思われる。

本検索結果より、受動喫煙者・喫煙者では、非喫煙者と比較して歯周ポケット内での生体防御機構の変化がもたらされることが示唆された。すなわち本検索結果は、受動喫煙の影響は全身のみならず歯周組織に対する有害作用を引き起こす可能性が考えられた。特に受動喫煙では、その兆候が細胞外エラスターゼ活性の変化という形で現れ、抗原に対する生態防御機構の不均衡が示唆された。また、唾液中コチニン量に対しては、喫煙者のGCF中のA1AT濃度のみに負の相関を示したものの、受動喫煙者では、明らかな相関は示されなかった。しかし、非特異的な免疫機構で異物を処理する細胞外エラスターゼ活性の増減において、

A1ATは重要な役割を演じている。つまり、細胞外エラスターゼ活性の亢進により自己破壊が、また、細胞外エラスターゼ活性不全・低下により抗原に対する生体防御機構の低下が生じることになる。すなわち、歯周組織破壊の一過程には、細胞外エラスターゼ活性の変調が関与しているため、そのインヒビターである歯周ポケット内のA1ATの量的な変化、もしくはその機能不全が、ひとつの生化学的な指標となる可能性が示された。

今後、受動喫煙・喫煙者の歯周組織の為害性のデータを蓄積することにより、チェアサイドにおいてGCFや唾液のような非侵襲的に採取できる試料から、受動喫煙・喫煙者の歯周病の発症・進行に関わる生化学的なマーカーの検出が期待できる。ひいては、歯周病に罹患した受動喫煙・喫煙者に対する歯周治療のより具体的な戦略的プログラムの構築が可能となり、国民の健康に対する貢献度は高いと考えられる。

本研究は、文部省科学研究費助成金：基盤研究C、課題番号：17592168の助成を受けて行われた。また、本論文の要旨は、日本歯周病学会50周年記念大会(平成19年9月22日)において発表した。

文 献

- 1) Bergström J, Preber H: Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol*, 65: 545-550, 1994.
- 2) Bergström J: Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*, 92: 1-8, 2004.
- 3) Almasri A, Wisithphrom K, Windsor LJ, Olson B: Nicotine and lipopolysaccharide affect cytokine expression from gingival fibroblasts. *J Periodontol*, 78: 533-541, 2007.
- 4) Morozumi T, Kubota T, Sato T, Okuda K, Yoshie H: Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 31: 267-272, 2004.
- 5) Boström L, Bergström J, Dahlén G, Linder LE: Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol*: 28, 212-219, 2001.
- 6) Haffajee AD, Socransky SS: Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*: 28, 377-388, 2001.
- 7) Velden UV, Varoufakl A, Hutter JW, Xu L, Timmerman MF, Winkelhoff AJV, Loos BG: Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora A retrospective study. *J Clin*

- Periodontol: 30, 603-610, 2003.
- 8) Persson L, Bergström J, Gustafsson A, and Åsman B: Tobacco smoking and gingival neutrophil activity in young adults. *J Clin Periodontol*, 26: 9-13, 1999.
 - 9) Persson L, Bergström J, Hiroshi I, Gustafsson A: Tobacco smoking and neutrophil activity in patients with periodontal disease. *J Periodontol*, 72: 90-95, 2001.
 - 10) Söder B, Jin LJ, Wickholm S: Granulocyte elastase, matrix metalloprotease-8 and prostaglandin E₂ in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and non-smokers with persistent periodontitis. *J Clin Periodontol*, 29: 384-391, 2002.
 - 11) Bergström J, Preber H: The influence of cigarette smoking on development of experimental gingivitis. *J Periodontal Res*: 21, 668-676, 1986.
 - 12) Haffajee AD, Socransky SS: Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol*: 28, 283-295, 2001.
 - 13) Alavi AL, Palmer RM, Odel EW, Coward PY, Wilson RF: Elastase in gingival crevicular fluid from smokers and non-smokers with chronic inflammatory periodontal disease. *Oral Diseases*: 1, 110-114, 1995.
 - 14) Aipagot T, Wolff LF, Smith QT, Tram SD: Risk indicators for periodontal disease in racially diverse urban population. *J Clin Periodontol*: 23, 982-988, 1996.
 - 15) Söder B: Neutrophil elastase activity, levels of prostaglandin E₂, and matrix metalloproteinase-8 in refractory periodontitis sites in smokers and non-smokers. *Acta Odontol Scand*, 57: 77-82, 1999.
 - 16) Arbes Jr SJ, Ágústsdóttir H, Slade GD: Environmental tobacco smoke and periodontal disease in the United States. *Am J Public Health*, 91: 253-257, 2001.
 - 17) Etter JF, Duc TV, Perneger TV: Saliva cotinine levels in smokers and nonsmokers. *Am J Epidemiol*, 151: 251-258, 2000.
 - 18) Jarvis MJ, Feyerabend C, Bryant A, Hedges B, Primates P: Passive smoking in the home: plasma cotinine concentrations in non-smokers with smoking partners. *Tobacco Control*, 10: 368-374, 2001.
 - 19) McGuire JM, McQuade MJ, Rossmann JA, Garnick JJ, Sutherland DE, Scheidt MJ, Van Dyke TE: Cotinine in saliva and gingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. *J Periodontol*, 60: 176-181, 1989.
 - 20) Gonzáles YM, De Nardin A, Grossi SG, Machtei EE, Genco RJ, De Nardin E: Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. *J Dent Res*, 75: 796-802, 1996.
 - 21) Løe H: The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol*, 38: 610-616, 1967.
 - 22) Silness J, Løe H: Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*, 22: 112-135, 1964.
 - 23) Lamster IB, Oshrain RL, Gordon JM: Enzyme activity in human gingival crevicular fluid: considerations in data reporting based on analysis of individual crevicular sites. *J Clin Periodontol*, 13: 799-804, 1986.
 - 24) Gustafsson A, Åsman B, Bergström K, Söder PÖ: Granulocyte elastase in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 19: 535-540, 1992.
 - 25) Figueredo CMS: Hyperreactive neutrophils-A mechanism of tissue destruction in periodontitis. From the department of odontology, division of periodontology and department of medical laboratory sciences and technology, division of clinical chemistry, Karolinska institutet, Stockholm, Sweden, 1999, 20.
 - 26) Figueredo CMS, Gustafsson A: Activity and inhibition of elastase in GCF. *J Clin Periodontol*: 25, 531-545, 1998.
 - 27) Nishida N, Yamamoto Y, Tanaka M, Maeda K, Kataoka K, Nakayama K, Morimoto K, Shizukuishi S: Association between passive smoking and salivary markers related to periodontitis. *J Clin Periodontol*, 33: 717-723, 2006.
 - 28) Numabe Y, Ogawa T, Kamoi H, Kiyonobu K, Sato S, Kamoi K, Deguchi S: Phagocytic function of salivary PMN after smoking or secondary smoking. *Ann Periodontol*, 3: 102-107, 1998.
 - 29) Yamamoto Y, Nishida N, Tanaka M, Hayashi N, Matsuse R, Nakayama K, Morimoto K, Shizukuishi S: Association between passive smoking and active smoking evaluated by salivary cotinine and periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32: 1041-1046, 2005.
 - 30) Buchmann R, Hasilik A, Nunn ME, Van Dyke TE, Lange DE: PMN responses in chronic periodontal disease: evaluation by gingival crevicular fluid enzymes and elastase-alpha-1-proteinase inhibitor complex. *J Clin Periodontol*, 29: 563-572, 2002.
 - 31) Matheson NR, Wong PS, Travis J: Enzyme inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by neutrophil myeloperoxidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 88: 402-409, 1979.
 - 32) Weiss SJ, Curnutte JT, Regiani S: Neutrophil-mediated solubilization of the subendothelial matrix: Oxidative and nonoxidative mechanisms of proteoly-

- sis used by normal and chronic granulomatous disease phagocytes. *J Immunol*, 136: 636-641, 1986.
- 33) Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J: The role of proteolytic enzymes in the development of pulmonary emphysema and periodontal disease. *American J Critical Care Med*, 150: 143-146, 1994.
- 34) Ueda M, Mashiba S, Uchida K: Evaluation of oxidized alpha-1-antitrypsin in blood as an oxidative stress marker using anti-oxidative α 1-AT monoclonal antibody. *Clinica Chemica Acta*, 317: 125-131, 2002.
-