

原 著

ニコチン経口摂取がラット歯槽骨に及ぼす影響

後 藤 昌 彦 安 田 忠 司 澁 谷 俊 昭

Effects of nicotine for the rat alveolar bone resorption.

GOTO MASAHIKO, YASUDA TADASHI and SHIBUTANI TOSHIAKI

歯周病はプラークなどの細菌因子だけではなく、宿主因子、環境因子などが関与し歯周病の発症や進行を促進していると言われている。喫煙は環境因子の代表的なリスクファクターである。タバコに含まれる三大有害物質のニコチンは歯周治療後やインプラント治療後の創傷治癒に影響を及ぼすだけでなく破骨細胞を活性化させ、歯周組織の破壊を促進させる報告がある。

ラットにニコチン含有蒸留水を長期間経口投与することによりニコチンが歯槽骨に及ぼす影響を組織学的およびマイクロCTを用いた画像解析により観察した。

その結果、マイクロCT撮影の画像解析では頬側、口蓋側どちらも実験群（ニコチン摂取群）で有意に歯槽骨の吸収の増加を認めた。根分岐部の骨密度においてはコントロール群（蒸留水摂取群）と実験群を比較した結果、有意差は認められなかった。TRAP染色像の頬側においてはコントロール群と比較し、実験群においてTRAP陽性多核細胞が有意に認められた。

このことから、ニコチン摂取は破骨細胞数を増加させ歯槽骨吸収を促進させることが示された。

キーワード：ニコチン、マイクロCT撮影、TRAP染色

Periodontal disease is caused by host factors, environmental factors and bacterial plaque. Smoking is a one of the environmental factors. Nicotine is the most major hazardous substances in tobacco. it has been reported that enhances osteoclast activities and inhibit the wound healing in implant treatment and periodontal treatment.

The purpose of this study was to evaluate the effect of nicotine for periodontal tissue.

The experimental rats took of nicotine containing water up to 6 monthes. The fixed mandibular tissues were analyzed by micro CT and histochemical studies.

In result, the area of resorption of alveolar bone in the palatal side and buccal side increased significantly in the experimental group analyzed by micro-CT. Osteoclasts were increased significantly in the experimental group in buccal side by histochemical study.

Therefore, the intake of nicotine may cause the resorption of the alveolar bone loss.

Key words: Nicotine, Micro Computed Tomography, TRAP

緒 言

歯周病はプラークなどの細菌因子だけではなく、宿主因子、環境因子などが関与し歯周病の発症や進行を

促進させると言われている^{1~13)}。その中でも喫煙は環境因子の代表的なリスクファクターと言える⁴⁾。タバコに含まれる三大有害物質はニコチン、タール、一酸化炭素であり、その中でもニコチンについての研究が

脚注：本論文の要旨は、第119回朝日大学歯学研究科発表会（平成23年7月21日、岐阜）において発表した。本論文の一部は、第54回秋季日本歯周病学会（平成23年9月24日、山口）において発表した。朝日大学歯学部口腔感染医療学講座歯周病学分野 501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

Department of Periodontology, Division of Oral Infections and Health Sciences, Asahi University School of Dentistry Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0926, Japan (平成26年9月12日受理)

多く報告されている。ニコチンは歯周治療や歯科インプラント治療、あるいは抜歯後の創傷治癒に影響を及ぼし、成功率の低下や治癒を遅延させると言われている¹⁴⁻²³⁾。歯周組織において、ニコチンは歯肉線維芽細胞の増殖を抑制する²⁴⁾。また、ヒト歯根膜細胞においてニコチンを添加すると骨芽細胞分化マーカーと Osteoprotegerin (OPG) の発現の減少と Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) の発現の増加が認められる²⁵⁾。

歯槽骨については臨床的な研究は多いが、ラットなど動物を用いて歯槽骨の吸収を調べた研究は少ない。最近の *in vitro* での研究では、ニコチンは破骨細胞を活性化させ、骨の吸収を促進させるという報告がある²⁶⁾。歯周組織もニコチンによって同様な作用が起こる可能性があると考えられる。

本研究の目的はラットにニコチン含有蒸留水を6か月間経口摂取させることにより、ニコチンが歯槽骨に及ぼす影響を組織学的に観察し検討することである。

材料および方法

1. 実験動物と実験方法

実験動物には wistar 系雄性ラット (生後16週齢) 10匹を用いた。ラットは実験群5匹、コントロール群5匹に分けた。実験群にはニコチン (分子量162.23ナカライテスク株式会社, 京都) を加えた蒸留水を経口摂取させ、コントロール群には蒸留水を経口摂取させた。実験群のニコチン濃度は上野ら²⁷⁾の研究を参考に 0.1mg/L とした。各飲料水を経口摂取させた時点を実験開始とし、ベースライン (BL) とした。両群とも BL から屠殺まで飲料水を経口摂取させた。摂取に関しては自由摂取とした。観察部位は上顎左側第二臼歯とした。ニコチンを摂取させる期間は6か月間とした。

両群のラットは BL から6か月目の屠殺時まで1か月毎に体重測定を行った。体重測定後、ソムノペンチル[®] (共立製薬株式会社, 東京) 腹腔内投与 (0.55ml/kg) にて全身麻酔を行い、Micro Computed Tomography (マイクロ CT, ScanXmate-RB 090SS, コムスキャンテクノ株式会社, 東京) を使用し、ダイナミック撮影を行った。屠殺後にラット上顎を採取し、正中で左右に分割し、上顎左側第二臼歯をマイクロ CT にて水平撮影を行った。マイクロ CT 撮影後、画像計測を行い、上顎組織は組織学的に観察した。本実験は朝日大学歯学部動物実験倫理委員会の承認 (No. 10-023) を得て施行した。

2. マイクロ CT 画像計測項目と撮影条件

計測項目はラット上顎第二臼歯遠心根におけるセメント・エナメル境 (CEJ) から歯槽骨頂 (AC) 間の距離 (CEJ-AC 間距離) と根分岐部の骨密度 (BMD) を測定した。撮影条件はダイナミック撮影では拡大率7倍、水平撮影では拡大率10倍になるように設定し撮影を行った。ダイナミック撮影と水平撮影の設定条件の詳細を表1に示す。

撮影した CT 画像はコーンビーム再構成ソフトウェア (ConeCTexpress, コムスキャンテクノ株式会社, 東京) により再構成を行い、画像解析ソフトウェア TRIBon (ラトックシステムエンジニアリング株式会社, 東京) と OsiriX (ニュートン・グラフィックス社, 北海道) を用いて計測を行った。

表1. ダイナミック撮影と水平撮影の設定条件

	ダイナミック撮影	水平撮影
管電圧 [kV]	65	75
管電流 [μ A]	66	76
管電力 [W]	4.3	5.7
倍率	7.0倍	10.0倍
Pixelサイズ	28.440 μ m/pixel	20.000 μ m/pixel
積算回数	1回	2回
積算レート	1.0フレーム/秒	1.0フレーム/秒
ピニングモード	2 \times 2	2 \times 2
マトリックス	608 \times 610	610 \times 608
プロジェクション	500	600

3. マイクロ CT 画像による計測方法

1) CEJ-AC 間距離の計測方法

ConeCTexpress により再構成された画像を TRIBon に取り込み断面画像の角度補正を行った。上顎右側第二臼歯頬側遠心根と口蓋根の中心を通る平面が頬側近心根と口蓋根を通る平面と垂直に交わるように画像を調整した。その断面画像を OsiriX に取り込み頬側遠心根と口蓋側遠心根の CEJ-AC 間距離を測定した。

2) 根分岐部における BMD 計測方法

同日に撮影した μ CTBMD 計測ファントムを用い BMD 検量線を作成した。CEJ-AC 間距離の計測方法と同様の基準で ConeCTexpress により再構成された画像を TRIBon に取り込み断面画像の角度補正を行った。図1に示すように根分岐部において縦 (近心根中心点から遠心根の中心点までの距離) \times 横 (頬側根中心点から口蓋根の中心点までの距離) \times 高さ (根分岐部中心から500 μ m) 立方体の範囲で直径200 μ m の円柱 (近遠心的) が占める BMD を計測した。

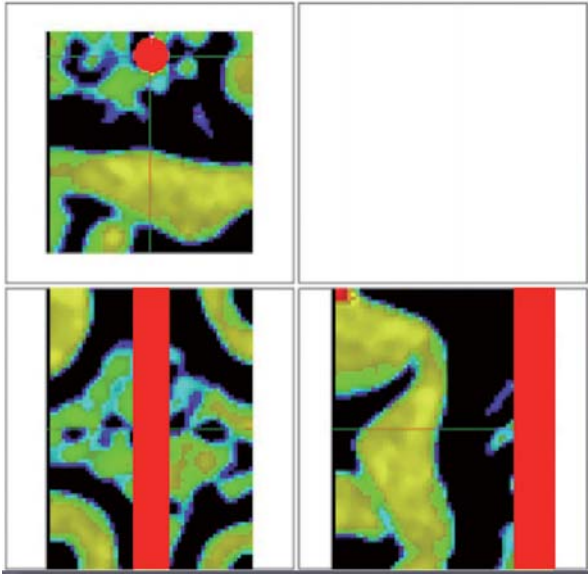


図1. 根分岐部におけるBMD計測範囲
赤で示す範囲の円柱におけるBMDを測定する。円柱は根分岐部から根尖までの距離の1/4に設定。

5. 標本作製

上顎組織を4%パラホルムアルデヒド固定液にて10日間固定した。固定後は10%エチレンジアミン四酢酸(EDTA)脱灰液(pH7.4)にて4週間脱灰し、パラフィンにて包埋した。その後、マイクロトームにて厚さ4 μ mの薄切切片(頬・口蓋側方向)を作製した。作製した薄切切片はヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色と酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色を行った。さらに、TRAP染色像で観察されるTRAP陽性多核細胞数を頬側、根分岐部、口蓋側において計測した。

1) TRAP陽性多核細胞数の計測方法

頬側近心根と舌側近心根の中心を通る断面の切片を選択し、TRAP染色を行った。CEJから半径1mm以内を計測範囲とした。1試料当たり1枚の切片を選択し、コントロール群(N=5)と実験群(N=5)のTRAP陽性多核細胞数を生物顕微鏡(CH2, オリパス株式会社, 東京)にて計測し比較検討した。

6. 統計学的分析

測定値は平均 \pm 標準偏差(SD)で表し、統計分析はすべてMann-Whitney's U testを用いて有意差検定を行った。P値が0.05以下で有意差ありと判定した。

結果

1. ラット体重の経時的変化

BLから6か月間、1か月毎にラット体重を測定し

た。BLでは平均450gでコントロール群は経時的に増加傾向を示し、実験群はほぼ変化は認められなかった。3~6か月目でコントロール群と有意差を認めた(図2)。

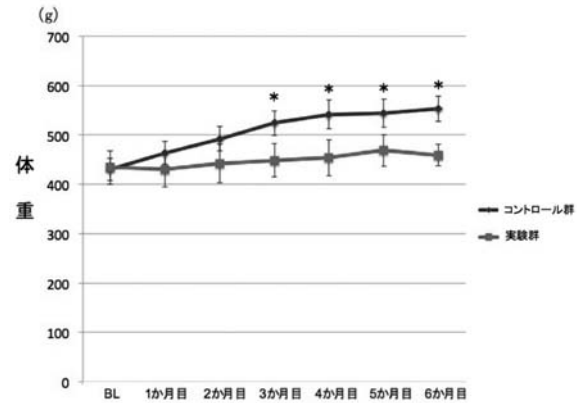


図2. ラット体重の経時的変化
平均 \pm SD (N=5) *P<0.05

2. マイクロCT画像によるCEJ-AC間距離計測結果

マイクロCT撮影後、ConeCTexpressによる再構成とTRIBon, OsirixによりCEJ-AC間距離の計測を行った(図3~6)。図3はコントロール群のCEJ-AC間距離の計測例であり、図4は実験群のCEJ-AC間距離の計測例である。頬側におけるCEJ-AC間距離の比較では4~6か月目においてコントロール群より実験群の方が大きく有意差が認められた(図5)。また、口蓋側におけるCEJ-AC間距離の比較では6か月目においてコントロール群より実験群の方が大きく有意差が認められた(図6)。

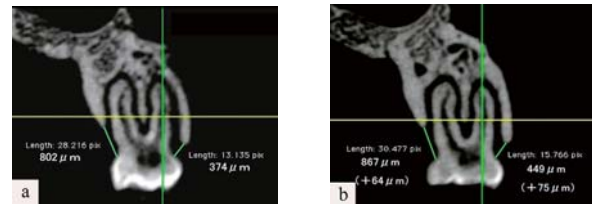


図3. コントロール群のCEJ-AC間距離の計測例
a: ベースライン b: 6か月目

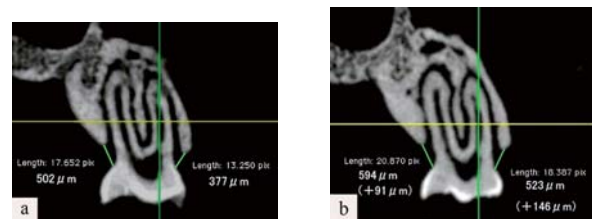


図4. 実験群のCEJ-AC間距離の計測例
a: ベースライン b: 6か月目

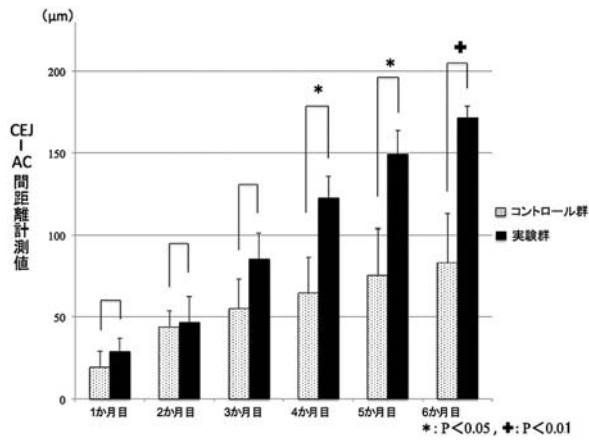


図5. 頬側における CEJ-AC 間距離の比較
平均±SD (N = 5)

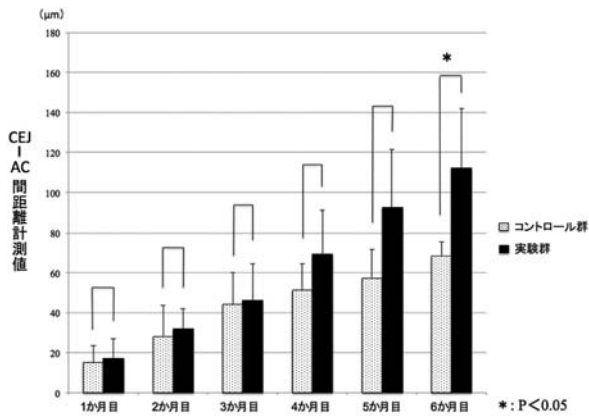


図6. 口蓋側における CEJ-AC 間距離の比較
平均±SD (N = 5)

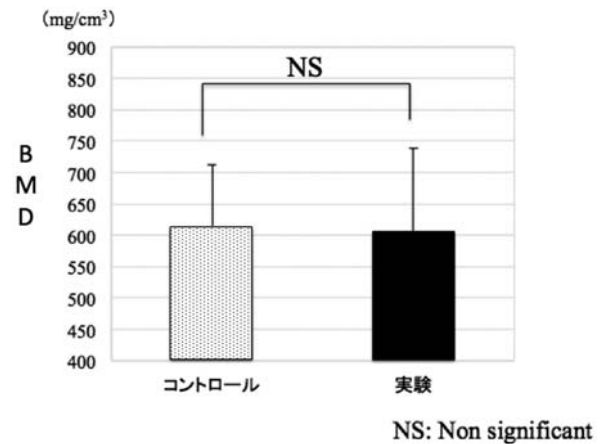


図7. 根分岐部における BMD 値の比較
平均±SD (N = 5)

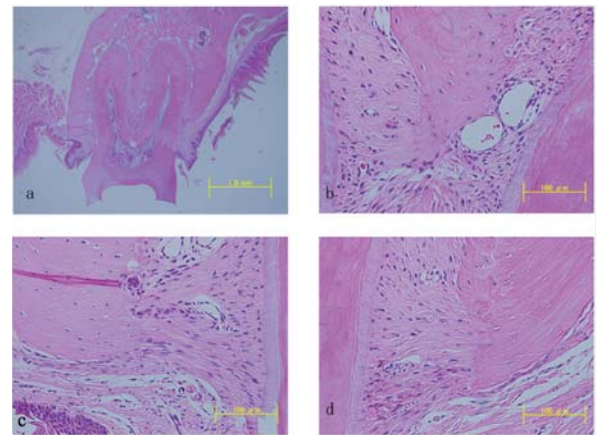


図8. コントロール群における H-E 染色像
a: 弱拡大像 b: 根分岐部強拡大像 c: 頬側強拡大像 d: 口蓋側強拡大像

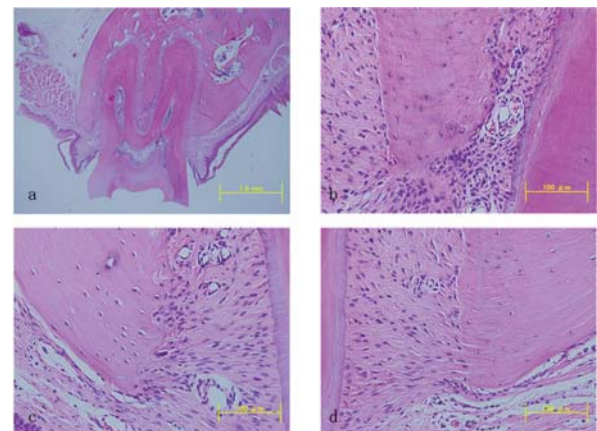


図9. 実験群における H-E 染色像
a: 弱拡大像 b: 根分岐部強拡大像 c: 頬側強拡大像 d: 口蓋側強拡大像

3. 根分岐部における BMD 計測結果

ラット上顎第二臼歯根分岐部における BMD を計測した結果、コントロール群と実験群を比較し有意差は認められなかった (図7)。

4. 組織学的所見

1) H-E 染色像

コントロール群では頬側、根分岐部、口蓋側、すべての部位において炎症性細胞の浸潤は認められなかった (図8 a, b, c, d)。実験群においても歯肉、歯根膜、セメント質および歯槽骨において炎症性細胞の浸潤は認められなかった (図9 a, b, c, d)。

2) TRAP 染色像

コントロール群では頬側、根分岐部において TRAP 陽性多核細胞が認められた (図10a, b, c)。しかしながら、口蓋側においては TRAP 陽性多核細胞は観察されなかった (図10d)。

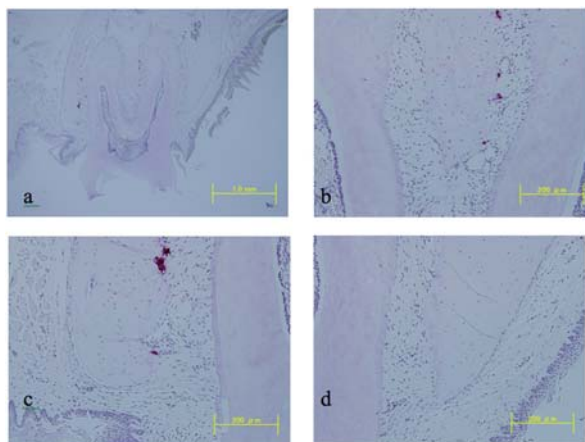


図10. コントロール群における TRAP 染色像
a: 弱拡大像 b: 根分岐部強拡大像 c: 頬側強拡大像 d: 口蓋側強拡大像

実験群では頬側、根分岐部において TRAP 陽性多核細胞が著明に認められた (図11a, b, c). しかしながら、口蓋側においては TRAP 陽性多核細胞は観察されなかった (図11d).

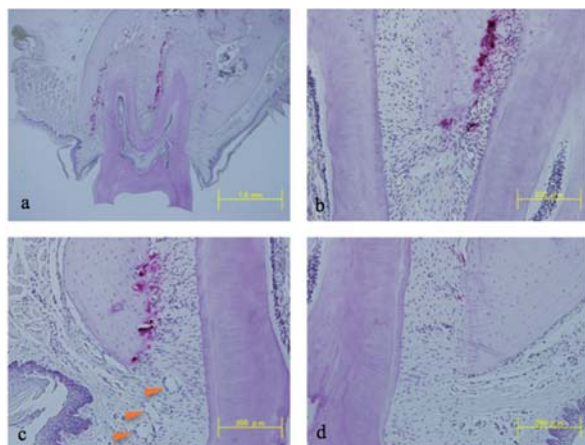


図11. 実験群における TRAP 染色像
a: 弱拡大像 b: 根分岐部強拡大像
c: 頬側強拡大像 d: 口蓋側強拡大像
矢頭: 血管拡張

3) TRAP 陽性多核細胞数の比較結果

頬側においてはコントロール群は平均 4.2 ± 1.9 個、実験群は平均 9.8 ± 4.1 個であり有意差を認めた。根分岐部においてはコントロール群は平均 3.2 ± 1.8 個、実験群は平均 6.2 ± 2.7 個であったが有意差は認められなかった。口蓋側においてもコントロール群は平均 1.2 ± 1.6 個、実験群は 3.0 ± 1.6 個であったが有意差は認められなかった (図12)。

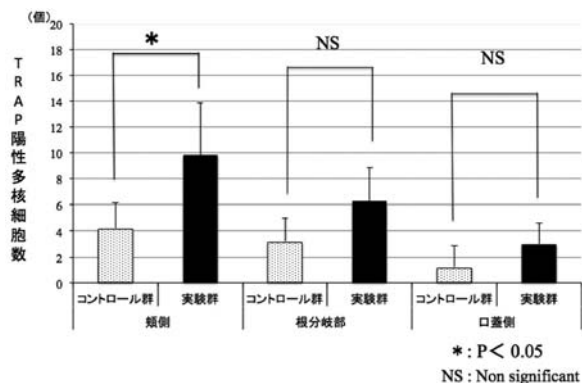


図12. TRAP 陽性多核細胞数の比較
平均 ± SD (N = 5)

考 察

本研究はニコチンがラット歯槽骨に与える影響を調べるために、ニコチン含有蒸留水を長期間経口摂取させたところ、マイクロ CT 画像においてニコチンは歯槽骨の吸収を促進させたことが示された。本研究で使用したニコチン含有蒸留水のニコチン濃度は 0.1 mg/l に設定した。上野ら²⁷⁾によると、ラットにおけるニコチン (0.1 mg/l) 経口摂取後の尿中コチニン量はおよそ $13 \mu\text{g/ml}$ であった。一般に成人におけるニコチン中毒量は $40 \text{ mg} \sim 60 \text{ mg}$ とされているためニコチン含有蒸留水の摂取量と体重差から妥当であったと報告されている²⁷⁾。また、喫煙時のコチニンの血中濃度はラットにおいては $30 \sim 80 \text{ ng/ml}$ で、ヒトにおいては 180 ng/ml であると報告されている^{28, 29)}。今回用いた濃度は $0.1 \mu\text{g/ml}$ であり、経口摂取したニコチンは体内でコチニンに代謝されるため血清中ではさらに低い濃度であると考えられる。これらの結果から本研究で設定した濃度はニコチン中毒量以下と考えられる。

ニコチン投与方法には、煙を吸入させる方法、皮下 (腹腔内) 投与、経口摂取させる方法など様々な方法がある。煙を吸入させる方法はニコチン以外の物質が含まれるためニコチンのみの評価ができない³⁰⁾。また、皮下 (腹腔内) 投与は規定時間に規定量を投与できる利点もあるが、口腔から直接歯周組織に吸収しない。通常、喫煙時のタバコの煙は口腔内を經由し肺へ移動し、速やかに粘膜や肺へ吸収される³⁰⁾。また、ニコチンは口腔内で唾液や滲出液に溶解し消化管を通過して吸収される経路も存在する。本研究では口腔から消化管を通過する経路から歯周組織への影響を検討した。

過去の *in vivo* の研究によると、非喫煙者より喫煙者にアタッチメントロスが多くみられることや歯槽骨の吸収の増加、骨密度の減少がみられるなどの結果が

報告されており、ニコチンは歯槽骨に対し有害作用を及ぼす結果が主であった^{8,9,15,16,31~37}。

最近の臨床的研究では歯周病に罹患していない健康なヒトの前歯のCEJ-AC間距離をCT撮影により計測を行い、被験者の喫煙の有無で比較検討しており、喫煙者は非喫煙者よりも有意に歯槽骨の吸収が認められた³⁸。また、ニコチンは歯周組織などの局所において末梢血管の収縮を起こし、血流を低下させ、歯肉そして歯周ポケット内の酸素低下をもたらし歯周病原菌の増殖を促進させることも明らかとなった^{39,40}。さらに、線維芽細胞のコラーゲン産生能を低下させ歯周組織の再生や修復に障害を与えることも報告されている⁴¹。

*in vitro*の研究では、骨の主な構成要素であるリン酸カルシウムがコーティングされているスライドにニコチンとブタの破骨細胞を播種すると、破骨細胞が分化促進し、スライド上のリン酸カルシウムの吸収を促進したと報告されている²⁶。

ニコチンと骨芽細胞の関係については、ニコチンにより骨芽細胞の増殖が抑制されることも報告されている^{42~45}。

本研究における画像計測の結果からニコチンにより歯槽骨の吸収が促進されたことが示された(図5, 6)。また、TRAP陽性細胞群は実験群において多く認められた(図10~12)。しかしながら、組織学的所見から両群とも炎症性細胞の浸潤は認められなかった(図8, 9)。César-Netoらは喫煙者と非喫煙者の歯肉組織を生検し、IL-6とIL-10、TNF- α などのサイトカインやRANKLおよびOPGの発現に関する研究を行っており、IL-6とIL-10の比率、RANKLとOPGの比率を調べた結果、喫煙者は非喫煙者よりIL-6、RANKLの発現の割合が高かったと報告している⁴⁶。宿主細胞は炎症性サイトカイン(IL-1, IL-6など)を生産するとともに抗炎症性サイトカイン(IL-10, OPGなど)も生産して、生体応答を正負に調整している。炎症性関連分子が多くなれば、歯周組織の破壊は進行することになる。現在では骨の吸収にはリモデリング時に起こるようなRANKLによって誘導された破骨細胞による生理的骨吸収とTNF- α によって誘導された破骨細胞によって引き起こされる炎症性の骨吸収があると考えられている^{47,48}。本研究においてニコチン摂取により破骨細胞数の増加が認められたことや歯槽骨の吸収が促進されたにもかかわらず、組織学的所見から炎症性細胞が観察されなかったことについては、ニコチンが炎症性サイトカインの産生を促進させたというよりは、むしろOPG発現を抑制し、RANKL発現を促進させ破骨細胞を活性化させた結果、生理的に歯槽骨の吸収を促進させたのではないかと

と考えられる。

また、頬側のCEJ-AC間距離およびTRAP染色像によるTRAP陽性多核細胞数の比較では、どちらもコントロール群と実験群を比較し有意差が認められた。根分岐部におけるBMDの計測結果とTRAP染色像によるTRAP陽性多核細胞数の比較では、どちらもコントロール群と実験群を比較し有意差が認められなかった。したがって、頬側および根分岐部におけるマイクロCT画像解析の結果と組織学的結果は相関性を示した(図7, 10~12)。特に、頬側歯槽骨に著明な吸収活性が示されたことについては上顎第二臼歯の歯軸の傾斜や対合歯との咬合関係により頬一口蓋的に咬合性の外力を受けやすく、また、頬側歯槽骨の骨幅が薄いなどの歯周組織の構造状の問題により骨吸収が起こりやすい状態になっており、ニコチンを摂取することによりRANKLが活性化し骨吸収を促進させたのではないかと考えられる(図5)。

また、実験群の頬側と根分岐部の歯槽骨の口蓋側にTRAP陽性細胞が認められた理由として次の様に考えられる。ニコチンは中枢神経細胞のニコチン受容体に結合し活性化するが、ニコチン摂取を繰り返すことでニコチン受容体の感受性が低下し、ニコチンが欠乏すると精神的ストレスが加わる。したがって、ストレス性の咬合負荷が加わったことが原因ではないかと考えられる。過去にラットの臼歯に矯正力を加えると圧迫側にTRAP陽性細胞が増加するという報告がある^{49,50}。本研究においても歯の頬側方向に生理的以上の咬合力が加わり、矯正力を加えた場合と同様にTRAP陽性細胞が増加した可能性が考えられる。

本研究ではニコチンが歯槽骨に与える影響を調べたが、その他の骨組織においてもニコチンによる影響が疑われる。Hapidinらはラットにニコチンを腹腔内投与し、実験前後の血清中のIL-1, IL-6などのサイトカイン量の測定と大腿骨の海綿骨の厚みや骨吸収について組織学的に測定を行った。その結果、コントロール群より実験群においてIL-1, IL-6の増加を認め、さらに骨吸収も大きく有意差を認めた⁵¹。この研究からも示唆されるようにニコチンは歯槽骨以外の骨組織においても同様な作用を及ぼしていると考えられる。しかしながら、現在では環境因子自体は歯周病を発症させないと言われている⁵²。本研究に用いたラットの体重の変化からわかるように、ニコチンを摂取したラットは体重の増加が認められなかった(図2)。この原因はニコチンが苦いこともあり飲料水をあまり摂取しなかったことが考えられる。実験群ではコントロール群の摂取した飲料水の量の約半分であった。したがって、ニコチンが直接的にRANKLを活性化さ

せ、破骨細胞による骨吸収を促進させただけではなく、間接的に水分や食料摂取不足による栄養失調、またはストレスなどが関係し歯槽骨に影響を与えたのではないかと考えられる。また、本研究はニコチン濃度差による検討は行わなかったが、喫煙者の調査からニコチン濃度依存的に歯槽骨の吸収が多く認められることもわかっている⁵³⁾。したがって、ニコチン濃度が高くなれば生体に及ぼす影響も大きくなると予想される。

結 論

ニコチン含有蒸留水の長期経口摂取はラット歯槽骨の吸収を促進させることが示唆された。特に頬側の骨吸収を促進させることが示唆された。

文 献

- 1) Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ and Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997 ; 14 : 216-248.
- 2) Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K and Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol*. 1993 ; 64 : 16-23.
- 3) Van Dyke TE and Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol*. 2005 ; 7 : 3-7.
- 4) Bergström J and Preber H. Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol* 1994 ; 65 : 545-550.
- 5) Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ and Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol*. 1995 ; 66 : 23-29.
- 6) von Wowern N, Klausen B and Kollerup G. Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. *J Periodontol* 1994 ; 65 : 1134-1138.
- 7) Gomes-Filho IS, Passos Jde S, Cruz SS, Vianna MI, Cerqueira Ede M, Oliveira DC, dos Santos CA, Coelho JM, Sampaio FP, Freitas CO and de Oliveira NF. The association between postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *J Periodontol*. 2007 ; 78 : 1731-1740.
- 8) Benatti BB, Nogueira-Filho GR, Diniz MC, Sallum EA, Sallum AW and Nociti FH Jr. Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. An in vivo study in rats. *J Periodontol Res*. 2003 ; 38 : 351-353.
- 9) Peruzzo DC, Benatti BB, Ambrosano GM, Nogueira-Filho GR, Sallum EA, Casati MZ and Nociti FH Jr. A systematic review of stress and psychological factors as possible risk factors for periodontal disease. *J Periodontol*. 2007 ; 78 : 1491-1504.
- 10) Al-Khabbaz AK, Al-Shammari KF and Al-Saleh NA. Knowledge about the association between periodontal diseases and diabetes mellitus: contrasting dentists and physicians. *J Periodontol*. 2011 ; 82 : 360-366.
- 11) Xiong X, Elkind-Hirsch KE, Vastardis S, Delarosa RL, Pridjian G and Buekens P. Periodontal disease is associated with gestational diabetes mellitus: a case-control study. *J Periodontol*. 2009 ; 80 : 1742-1749.
- 12) Gurav A and Jadhav V. Periodontitis and risk of diabetes mellitus. *J Diabetes*. 2011 ; 3 : 21-28.
- 13) Nogueira-Filho GR, Frôes Neto EB, Casati MZ, Reis SR, Tunes RS, Tunes UR, Sallum EA, Nociti FH Jr, and Sallum AW. Nicotine effects on alveolar bone changes induced by occlusal trauma: a histometric study in rats. *J Periodontol*. 2004 ; 75 : 348-352.
- 14) Tonetti MS, Pini-Prato G and Cortellini P. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects. A preliminary retrospective study. *J Clin Periodontol*. 1995 ; 22 : 229-234.
- 15) Nassrawin NA. Effect of smoking on the response to nonsurgical periodontal therapy. *East Mediterr Health J*. 2010 ; 16 : 162-165.
- 16) Ah MK, Johnson GK, Kaldahl WB, Patil KD and Kalkwarf KL. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 1994 ; 21 : 91-97.
- 17) Haber J. Cigarette smoking: a major risk factor for periodontitis. *Compendium*. 1994 ; 15 : 1002, 1004-1008.
- 18) Preber H, Linder L and Bergström J. Periodontal healing and periopathogenic microflora in smokers and non-smokers. *JCI in Periodontol*. 1995 ; 22 : 946-952.
- 19) Carvalho MD, Benatti BB, César-Neto JB, Nociti FH Jr, da Rocha Nogueira Filho G and Casati MZ and Sallum EA. Effect of cigarette smoke inhalation and estrogen deficiency on bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *J Periodontol*. 2006 ; 77 : 599-605.
- 20) César-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H Jr and Nociti FH Jr. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol*. 2003 ; 74 : 1454-1459.
- 21) Saldanha JB, Casati MZ, Neto FH, Sallum EA and Nociti FH Jr. Smoking may affect the alveolar process dimensions and radiographic bone density in maxillary extraction sites: a prospective study in humans. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006 ; 64 : 1359-1365.
- 22) Machado GJ, Dias SM, Bosco AF, Okamoto T, Bedran de Castro JC and Dornelles RC. Action of nicotine and ovariectomy on bone regeneration after tooth extraction in rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 ; 68 : 2675-

- 2681.
- 23) Pinto JR, Bosco AF, Okamoto T, Guerra JB and Piza IG. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. *Braz Dent J*. 2002 ; 13 : 3-9.
- 24) 渋谷俊昭, 金山圭一, 上野健一郎, 木村洋子, 後藤昌彦, 初山正敬, 北後光信, 白木雅文. ヒト歯肉線維芽細胞の細胞増殖および細胞形態に及ぼすニコチンの影響. 岐歯学誌. 2010 ; 37 : 91-95.
- 25) Lee HJ, Pi SH, Kim Y, Kim HS, Kim SJ, Kim YS, Lee SK and Kim EC. Effects of nicotine on antioxidant defense enzymes and RANKL expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 2009 ; 80 : 1281-1288.
- 26) Henemyre CL, Scales DK, Hokett SD, Cuenin MF, Peacock ME, Parker MH, Brewer PD and Chuang AH. Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *J Periodontol*. 2003 ; 74 : 1440-1446.
- 27) 上野健一郎, 金山圭一, 北後光信, 白木雅文, 渋谷俊昭. ラット歯肉切除後の創傷治癒に及ぼすニコチン経口摂取の影響. 日歯周誌. 2009 ; 51 : 162-168.
- 28) 田中健, 大前壽子, 森居京美, 大橋正孝, 安村浩平, 北田善三. HPLCによる喫煙ラットの血清中ニコチン及びコチニンの定量. 奈良保環研七年報. 2004 ; 38 : 67-71.
- 29) 種瀬若菜, 内山明, 竹内貴子, 福田由紀子, 唐誌陽, 中川武夫, 田中豊穂. 大学生の血清コチニン濃度と自己申告喫煙習慣との関連. 学校保健研. 2009 ; 51 : 33-38.
- 30) Yildiz D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol*. 2004 ; 43 : 619-632.
- 31) Johnson GK and Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol 2000*. 2007 ; 44 : 178-194.
- 32) Grossi SG, Zambon J, Machtei EE, Schifferle R, Andreana S, Genco RJ, Cummins D and Harrap G. Effects of smoking and smoking cessation on healing after mechanical periodontal therapy. *J Am Dent Assoc*. 1997 ; 128 : 599-607.
- 33) Sarfati A, Bourgeois D, Katsahian S, Mora F and Bouchard P. Risk assessment for buccal gingival recession defects in an adult population. *J Periodontol*. 2010 ; 81 : 1419-1425.
- 34) Bergström J, Eliasson S and Preber H. Cigarette smoking and periodontal bone loss. *J Periodontol*. 1991 ; 62 : 242-246.
- 35) César-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ and Nociti FH Jr. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontol Res*. 2006 ; 41 : 118-123.
- 36) César-Neto JB, Benatti BB, Neto FH, Sallum AW, Sallum EA and Nociti FH. Smoking cessation may present a positive impact on mandibular bone quality and periodontitis-related bone loss: a study in rats. *J Periodontol*. 2005 ; 76 : 520-525.
- 37) Nogueira-Filho Gda R, Rosa BT, César-Neto JB, Tunes RS and Tunes Uda R. Low-and high-yield cigarette smoke inhalation potentiates bone loss during ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*. 2007 ; 78 : 730-735.
- 38) Ghassemian M, Nowzari H, Lajolo C, Verdugo F, Pirronti T and D'Addona A. The thickness of facial alveolar bone overlying healthy maxillary anterior teeth. *J Periodontol*. 2012 ; 83 : 187-197.
- 39) Hanioka T, Tanaka M, Ojima M, Takaya K, Matsumori Y and Shizukuishi S. Oxygen sufficiency in the gingiva of smokers and non-smokers with periodontal disease. *J Periodontol*. 2000 ; 71 : 1846-1851.
- 40) Hanioka T, Tanaka M, Takaya K, Matsumori Y and Shizukuishi S. Pocket oxygen tension in smokers and non-smokers with periodontal disease. *J Periodontol*. 2000 ; 71 : 550-554.
- 41) Silva CO, de Lima AF, Sallum AW and Tatakis DN. Coronally positioned flap for root coverage in smokers and non-smokers: stability of outcomes between 6 months and 2 years. *J Periodontol*. 2007 ; 78 : 1702-1707.
- 42) Yuhara S, Kasagi S, Inoue A, Otsuka E, Hirose S and Hagiwara H. Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. *Eur J Pharmacol*. 1999 ; 383 : 387-393.
- 43) Papaioannou KA, Markopoulou CE, Gioni V, Mamalis AA, Vayouraki HN, Kletsas D and Vrotsos IA. Attachment and proliferation of human osteoblast-like cells on guided bone regeneration (GBR) membranes in the absence or presence of nicotine: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011 ; 26 : 509-519.
- 44) Ma L, Zwahlen RA, Zheng LW and Sham MH. Influence of nicotine on the biological activity of rabbit osteoblasts. *Clin Oral Implants Res*. 2011 ; 22 : 338-342.
- 45) 峯岸忠, 菅野直之, 岩崎宏泰, 蛭間重能, 小嶋大郎, 佐藤秀一, 伊藤公一. ヒト骨芽細胞様細胞に及ぼすニコチンの影響. 日歯保存誌. 2002 ; 45 : 837-840.
- 46) César-Neto JB, Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Sallum EA and Nociti FH Jr. Smoking modulates interleukin-6 : interleukin-10 and RANKL: osteoprotegerin ratios in the periodontal tissue. *J Periodontol Res*. 2007 ; 42 : 184-191.
- 47) 中村浩彰. 骨代謝における骨芽細胞と破骨細胞の細胞連関. 松本歯学. 2005 ; 31 : 131-137.
- 48) 北浦英樹. TNF- α の骨代謝作用. 骨粗鬆症治療. 2011 ; 10 : 10-14.

- 49) 甲斐哲也. 圧迫側歯根膜に出現するマクロファージと破骨細胞に関する酵素組織化学的研究. 日矯歯誌. 1991 ; 50 : 424-440.
- 50) 山本尚. ラット臼歯の矯正学的傾斜移動時の歯根膜における組織学的変化と部域差. 鶴見歯学. 2009 ; 35 : 21-30.
- 51) Hapidin H, Othman F, Soelaiman IN, Shuid AN, Luke DA and Mohamed N. Negative effects of nicotine on bone-resorbing cytokines and bone histomorphometric parameters in male rats. *J Bone Miner Metab.* 2007 ; 25 : 93-98.
- 52) 長谷川絃司, 眞木吉信, 野口俊英, 山田了, 花田信弘, 山崎洋治. 歯周病と全身の健康を考える. 東京医歯薬出版 ; 2004 : 57-58.
- 53) Jansson L and Lavstedt S. Influence of smoking on marginal bone loss and tooth loss a prospective study over 20 years. *J Clin Periodontol.* 2002 ; 29 : 750-756.
-