

原 著

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

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

The effect of nicotine on the proliferation and morphology of gingival fibroblasts

SHIBUTANI TOSHIAKI, KANAYAMA KEIICHI, UENO KENICHIRO, KIMURA YOUKO, GOTO MASAHIKO,
MOMIYAMA MASAYUKI, KITAGO MITSUNOBU and SHIRAKI MASAFUMI

歯周組織に及ぼす喫煙の影響を検討する目的で、歯肉線維芽細胞へのニコチンの影響について検討した。歯肉線維芽細胞は通常の培地で24時間培養され、次に1 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.01 µg/mlのニコチン含有培地で培養した。細胞増殖能を測定するために培養終了24時間前に³H-Thymidineを添加した。培養終了後に放射能計測を行い、細胞分裂能を観察した。さらに同様の培養後に細胞形態を観察した。また細胞骨格の観察の目的でFITC Phalloidinで染色し、ストレスファイバーの観察をおこなった。ニコチン添加1 µg/ml群では有意に細胞増殖能が低下した。また1 µg/ml群では細胞形態は紡錘型を呈していた。さらに細胞骨格のストレス線維は収縮し、粗になっていた。

これらの結果から、歯肉線維芽細胞の増殖にニコチン摂取が抑制的に関与することが示唆された。

キーワード：ニコチン、歯肉、線維芽細胞

The present study investigated the effects of nicotine on the proliferation activity and morphology of gingival fibroblasts. Gingival fibroblasts were culture in regular medium with ³H thymidine for 24 hour and then the medium was changed to that containing nicotine (1 µg/ml, 0.1 µg/ml and 0.01 µg/ml) and ³H thymidine for 24 hours. After culture was stopped, the cells were harvested and radioactivity was measured. Identical sets of culture cells were used for morphological examination. After fixation, the cytoskeletal stress fibers were visualized by FITC conjugated Phalloidin staining. The numbers of cells were significantly decreased in the 1 µg/ml group compared to that in the control group. The morphology of the cells changed to a spindle shape in the 1 µg/ml group.

These findings suggested nicotine can inhibit proliferative activity and change the morphology of gingival fibroblasts in culture.

Key words: Nicotine, Gingiva, Fibroblast

緒 言

歯周炎の発症や進行にはプラークや歯石をはじめとする歯周病原性細菌の関与や咬合性外傷などの局所的要因のみならず、宿主側の要因も重要視されている。リスクファクターとしての全身疾患や喫煙、ストレスについての報告が疫学的研究を中心に解明されつつあ

る¹⁻⁹⁾。口腔内は最も早期にタバコに含まれる各種の物質や喫煙に伴って発生するタバコ副産物に曝される組織である^{3,4,9,10)}。歯周疾患に対する喫煙者のリスクは約2~9倍と高く、禁煙するとそのリスクは非喫煙者と同等となることが報告されている¹¹⁻¹³⁾。

歯周疾患への影響については喫煙量とアタッチメントロスに相関がある¹⁴⁾。喫煙者の歯周疾患の臨床的特

徴としては歯肉の炎症が軽度であるにもかかわらず、歯槽骨吸収やアタッチメントロスの程度が大きいことである¹⁵⁻¹⁷。また歯周疾患治療における非外科的療法や外科的療法においても喫煙による治療の遅延や創傷治療障害が報告されている^{18,19}。さらに歯周組織再生療法や歯科インプラント療法においても喫煙者は成功率が低下することも数多く報告されている²⁰⁻²²。喫煙者では歯周治療後もメンテナンス時期のアタッチメントの獲得が少ないことも知られている^{23,24}。

このように喫煙の歯周疾患への関与は臨床的研究を中心に行われてきた。しかしタバコの成分に対する基礎的検討は多くはない。タバコには4000種類以上の化学物質が含まれている。ニコチン、タール、一酸化窒素をはじめとする有害物質が分かっているものだけでも200種類以上存在する。喫煙が生体組織に影響を及ぼす機序については組織の微小循環系の障害による低酸素状態、免疫系では多形核白血球機能障害、免疫グロブリンレベルの低下、Tリンパ球サブセット比の変化、線維芽細胞への障害が知られている²⁵⁻³⁰。タバコの主要成分であるニコチンの歯周組織への影響について、Nichitiら³¹はラット実験的歯周炎に、種々の濃度のニコチン含有生理食塩水を腹腔内投与したところ歯槽骨吸収を促進することを報告している。また星原³²はニコチンやその代謝物質であるコチニンを添加してマウス骨髄細胞を培養すると破骨細胞の前駆細胞が増加することを示した。

本研究は歯周組織に及ぼす喫煙の影響を検討する目的で、ニコチンの直接的影響を観察するためにニコチンを添加した場合の培養歯肉線維芽細胞の細胞活性について検討した。

材料および方法

培養細胞には歯肉由来線維芽細胞 (Gin-1, 大日本製薬) を5~10代継代して用いた。培地には10%FBS (GIBCOBRL, USA) 含有 α -MEM 培地 (GIBCOBRL, USA) を用いた。 $1 \times 10^4 \sim 10^5$ 個を24穴マルチプレート (スミロン, 住友ベークライト, 東京) に播種し、5%CO₂, 37°Cの条件下で48時間培養した。その後ニコチン (分子量162.23, 和光純薬, 大阪) 1 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.01 μ g/ml を含む調整培地に交換し、さらに24時間培養した。培養終了後に0.02%EDTA と0.25%トリプシン (和光純薬, 大阪) で細胞を回収して細胞数をビルケルチュルクの細胞算定板を用いて算定した。またミリセル (MILLIPORE, USA) 上に播種した細胞を同様の条件下で培養し、培養終了24時間前に1 μ Ci/ml の [Methyl-³H]Thymidine (Amersham Bioscience Co., Piscataway, USA) を添加した。培養

終了後10%ホルマリンで固定し、細胞を分離膜ごと回収した。膜は燃焼回収 (ASC-113B, ALOKA 東京) 後、液体シンチレーション (LSC-6100, ALOKA 東京) で放射線量を測定した。放射線量の算定は Tipson and Dabbous³³の方法に準じ、コントロール群を100として換算した。さらにカバーガラス (直径13mm, 松浪硝子, 東京) 上に播種した細胞について培養終了後に10%ホルマリンで固定し、位相差顕微鏡にて観察した。さらに細胞骨格の観察を目的として、-20°Cエタノールで5分間処理後にFITC標識Phalloidin (SIGMA, USA) (1:100) を反応させ、蛍光顕微鏡 (Nikon 東京) にて観察した。

測定値は平均 \pm 標準誤差 (S.E.) で表し、統計分析には Mann-Whitney-u-test を用い、有意差検定には p 値が0.05以下を有意差ありと判定した。

結果

72時間培養後の歯肉線維芽細胞の数はコントロール群で $18.4 \pm 1.02 \times 10^4$ 個, 0.01 μ g/ml ニコチン添加群で $19.0 \pm 1.33 \times 10^4$ 個, 以下同様に, 0.1 μ g/ml で $17.3 \pm 2.24 \times 10^4$ 個, 1 μ g/ml で $8.28 \pm 1.48 \times 10^4$ 個であった。コントロール群に比べ1 μ g/ml で有意に減少していた (図1)。

³H-Thymidine の取り込みの結果を図2に示す。コントロール群を100%にして換算すると, 0.01 μ g/ml で $91.8 \pm 6.1\%$, 0.1 μ g/ml で $88.2 \pm 10.3\%$, 1 μ g/ml で $73.2 \pm 9.26\%$ であった。コントロール群に比べ1 μ g/ml で有意に低下していた。培養後の細胞形態の位相差顕微鏡像を示す (図3 a, b)。コントロール群では線維芽細胞特有の良く伸展した形態がみられるのに対し (図3 a, b), 1 μ g/ml では特徴的に細胞

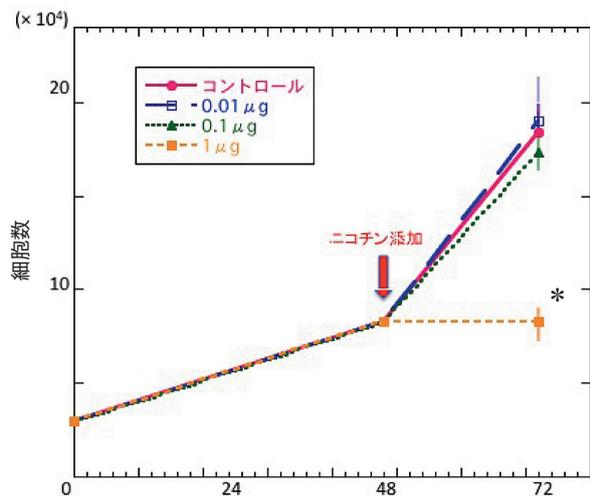


図1: 72時間培養後の細胞数。
(培養終了24時間前にニコチン添加, * : p<0.05)

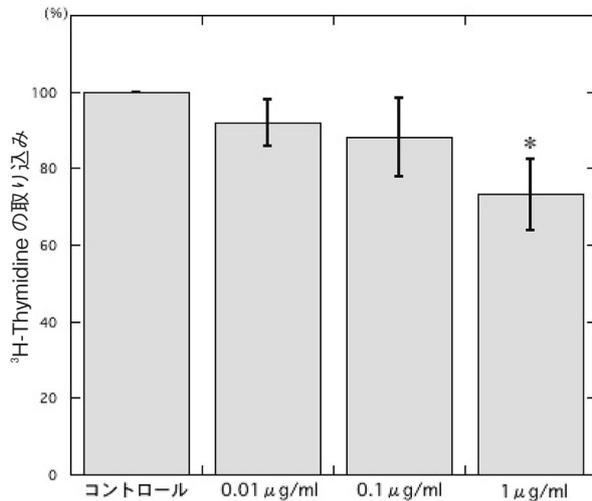


図2： ^3H -Thymidine の取り込み。
(平均 \pm 標準誤差 SE, (n = 5) * : p < 0.05)

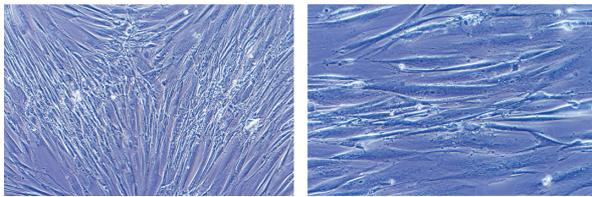


図3：72時間、培養歯肉線維芽細胞の位相差顕微鏡像。
a : ($\times 5$), b : ($\times 10$)

内に空胞変性がみられ、細胞形態も紡錘状を呈していた (図4 a, b)。

また細胞の付着能が低下し、剥離したことで細胞数が低下していた。0.01 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ではコントロール群に比べ明らかな形態的差違は見られなかった。Phalloidin に反応する細胞内のストレスファイバーの蛍光顕微鏡像を示す (図5 a, b) コントロー

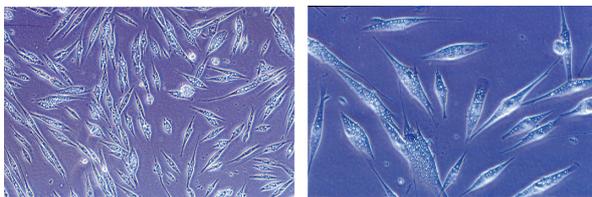


図4：培地中ニコチン濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ の培養歯肉線維芽細胞の位相差顕微鏡像。a : ($\times 10$), b : ($\times 20$)

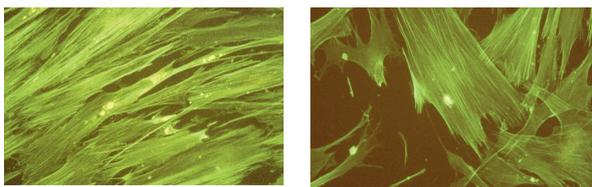


図5：コントロール群の培養歯肉線維芽細胞ストレスファイバー染色像。a : ($\times 10$), b : ($\times 20$)

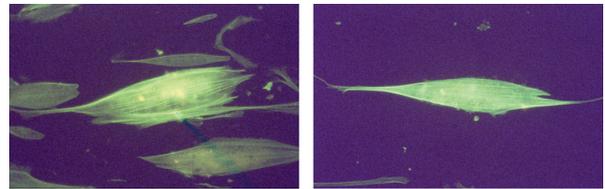


図6：培地中ニコチン濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ の培養歯肉線維芽細胞ストレスファイバー染色像。a : ($\times 10$), b : ($\times 20$)

ル群ではストレスファイバーの走行は長く明瞭である。1 $\mu\text{g/ml}$ では線維数は低下していた (図6 a, b)。

考 察

喫煙が歯周組織に及ぼす有害作用に関して、喫煙が宿主に対して免疫抑制作用を発揮し、宿主寄生体相互作用に有害作用を及ぼすことが知られている。末梢血中では、多形核白血球の運動性、化学走性、食作用が著明に低下する²⁵⁻²⁸。すなわち、歯肉縁下の細菌に対する最初の重要な防御機能が障害されることになる。また、喫煙者においては、抗体とくに IgG₂ の産生能が低下している²⁹。これらのサブクラスの抗体は、歯周病原性細菌に対するオプソニン作用において最も重要な役割を果たすものである。また、免疫機能を制御する T 細胞サブセット比も減少している²⁹。その結果、喫煙者の場合には歯周病原性細菌が特異的および非特異的免疫クリアランス機序を逃れて、歯肉縁下に定着することが示唆されている。歯肉縁下環境の物理的変化 (酸素分圧の低下等) は、嫌気性細菌の増殖を助長することになる^{34,35}。さらに、喫煙は上皮細胞への細菌の付着を促進する³⁶。非喫煙者と比較すると、喫煙中の者には *Bacteroides forsythus* や *Porphyromonas gingivalis* 等の感染者が多く認められる³⁷。

喫煙習慣を有する歯周疾患患者の場合、歯根表面からニコチンが検出される³⁸。ニコチンと接触した線維芽細胞は増殖³⁹、遊走能および歯根表面への付着能も低下する⁴⁰。さらに、線維芽細胞はニコチンを非特異的に結合して内部に取り込むため⁴¹、コラーゲン合成や蛋白質産生等の細胞代謝に変化が生じることが示唆されている²。このように喫煙が誘引となって免疫応答障害、嫌気性菌の歯肉縁下感染、結合組織の細胞毒性が発生し、最終的には重篤な歯周疾患および創傷治癒障害に至ると考えられている。

本研究では、ニコチンが *in vitro* において培養歯肉線維芽細胞に直接及ぼす影響について検討した。一般にタバコ一本には約 10mg のニコチンが含まれており、喫煙後には血中のニコチン濃度は 25~50 $\mu\text{g/l}$ になり、中毒量は 10mg/l であることが示されている²。今回の実験で使用した 0.1 $\mu\text{g/l}$ ~ 1 $\mu\text{g/l}$ のニコチン濃

度は、以前の報告で使用された濃度を考慮して設定したので^{31, 32, 33)} 妥当な範囲であり、またニコチンは水溶性のため口腔内で唾液中に溶解し、口腔粘膜から吸収することを考えれば、局所的にはさらに高い濃度になる可能性もあるものと考えられる。

歯肉線維芽細胞の数は1 $\mu\text{g/ml}$ で有意に減少した。さらに³H-Thymidine 加え24時間培養しDNAの合成活性を測定したところ、ニコチンはヒト歯肉線維芽細胞の細胞増殖を抑制した。この結果はTipsonとDabbous³³⁾のヒト歯肉線維芽細胞の初代培養での報告と一致した。

さらに細胞形態を観察したところ、高濃度投与群では著明な細胞形態の変化が見られた。1 $\mu\text{g/ml}$ では細胞が紡錘形に変化し、底面への付着能が低下しているように見られた。Phalloidin に特異的に反応する細胞内線維はF-actin をはじめとする細胞内骨格を代表するストレスファイバー束であり、各細胞に特徴的な走行が見られる⁴²⁾。そこで細胞内の変化を観察する目的で行ったPhalloidin 染色ではニコチンの添加により、細胞形態の変化と同様にストレスファイバーの局在に明らかな差違が見られた。このことから、細胞数の測定値がニコチン添加群で減少した原因として、細胞接着能の低下が関連することが示唆される。このように、ニコチンは直接細胞活性に対する影響や細胞形態や細胞骨格にも影響することが明らかとなった。喫煙時や噛みタバコ摂取時には同様なニコチンによる影響が口腔内でも発生しているものと考えられる。

本研究ではタバコに含まれる主要成分としてのニコチンの歯肉への影響を検討したが、タバコにはその他に多量の有害成分が含まれることから、それら成分についての検討も必要であろう。本研究の結果から喫煙は呼吸器官や循環器官のみならず、歯周組織への為害性も示された。喫煙者への警鐘となることを期待する。

結 論

歯周組織に及ぼす喫煙の影響を検討する目的で、培養歯肉線維芽細胞の細胞活性に対するニコチンの直接的影響について検討した。培養液中に各種濃度のニコチンを添加して歯肉線維芽細胞を培養したところ、細胞増殖活性を低下させ、細胞形態を変化させたことから、ニコチンは直接歯肉線維芽細胞に作用することが示唆された。

文 献

1) Reed D R and Ryder M I; Willson T G and Kornman K S. Fundamentals of Periodontics. Chicago: Quintes-

sence; 1996: 241-278.

2) Mecklenburg R E and Grossi S G; Rose F L, Genco J R, Mealey L B, Cohen W D. Periodontal Medicine. London: B. C. Decker Inc; 1999: 111-137.

3) Burgan SW. The role of tobacco use in periodontal diseases. *Gen Dent.* 1997; 45: 449-460.

4) Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K and Kent R L. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol.* 1993; 64: 16-23.

5) Grossi S G, Zambon J J, Ho A W, Koch G, Dunford R G, Machtei E E, Norderyd O M and Genco R J. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol.* 1994; 65: 260-267.

6) Grossi S G, Genco R J, Machtei E E, Ho A W, Koch G, Dunford R, Zambon J J and Hausmann E. Assessment of risk for Periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol.* 1995; 66: 23-29.

7) Mandel I. Smoke signals. an alert for oral disease. *J Am Dent Assoc.* 1994; 125: 872-878.

8) Genco R J. Risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1996; 67: 1041-1049.

9) Bergstrom I. Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Dent Oral Epidemiol.* 1989; 17: 245-247.

10) Machitei E E, Dunford R, Hausemann E, Grossi S, Ho A, Davis G, Chandler J, Zambon J and Genco R J. Longitudinal study of prognostic factors in established periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 102-109.

11) Linden G J and Mullally B H. Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. *J Periodontol.* 1994; 65: 718-728.

12) Papapanau P N. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 1-36.

13) Haber J and Kent R L. Cigarette smoking in a periodontal practice. *J Periodontol.* 1992; 63: 100-106.

14) Grossi S G, Skrepinski F B, DeCaro T, Zambon J J, Cumminis D and Genco R J. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. *J Periodontol.* 1996; 67: 1094-1102.

15) Bergstrom J, Eliasson S and Preber H. Cigarette smoking and periodontal bone loss. *J Periodontol.* 1991; 62: 242-246.

16) Gonzales Y M, De Nardin A, Grossi S G, Machtei E E, Genco R J and De Nardin E. Serumcotinin levels, smoking, and periodontal attachment loss. *J Dent Res.* 1996; 75: 796-802.

17) Bolin A, Lavstedt S, Frithihof L and Henrikson C O. Proximal alveolar bone loss in a longitudinal radiographic investigation. *Acta. Odontol. Scand.* 1986; 44: 263-269.

- 18) Ah M K, Johnson G K, Kaldahl W B, Patil K D and Kalkwarf K L. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 1994; 21: 91-97.
- 19) Grossi S G, Zambon J, Machtei E E, Schifferle R, Andreana S, Genco R J, Cummins D and Harrap G. Effects of smoking and smoking cessation on healing of mechanical periodontal therapy. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128: 599-607.
- 20) Tonneti M S, Pini-Prato G and Correllini P. Effect of cigarette smoking on periodontal healing GTR in infrabony defects: a preliminary retrospective study. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 229-234.
- 21) Rosen P S, Marks M H and Reynolds M A. Influence of smoking on long-term clinical results of intra-bony defects with regenerative therapy. *J Periodontol.* 1996; 67: 1159-1163.
- 22) Jones J K and Triplett R G. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing. A review of evidence and implications for patient care. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992; 50: 237-240.
- 23) Kinane D F and Rafvar M. The effects of smoking on mechanical and antimicrobial periodontal therapy. *J Periodontol.* 1997; 68: 467-472.
- 24) Kaldahl W B, Johnson G K, Patil K D and Kalkwarf K L. Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1996; 67: 675-681.
- 25) Kenney E B, Kraal J H, Saxe S R and Jones I. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res.* 1977; 12: 223-234.
- 26) Noble R and Penny B. Comparison of leukocyte count and function in smoking and nonsmoking young men. *Infect Immun.* 1975; 12: 550-555.
- 27) Corberand J, Laharraghe P, Nguyen F, Dutau G, Fontanilles M, Gleizes B and Gyrard E. In vitro effect of tobacco smoke components on the function of normal human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* 1980; 30: 649-655.
- 28) MacFarlane G D, Herzberg M C, Wolff L F and Hardie N A. Refractory Periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte Phagocytosis and cigarette smoking. *J Periodontol.* 1992; 63: 908-913.
- 29) Tew J G, Zhang J B and Quinn S. Antibody of the IgG 2. Subclass, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 1996; 67: 317-322.
- 30) Costabel U, Bross K J, Reuter C, Ruhle K H and Mathys H. Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers: a phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest.* 1986; 90: 39-44.
- 31) Naciti F H, Nogueira-Filho G R, Primo M T, Machado M A, Tramontina V A, Barros S P and Sallum E A. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol.* 2000; 71: 1460-1464.
- 32) 星原英吉. 歯周疾患におけるリスクファクターの骨代謝に及ぼす影響. *日歯周誌.* 2000; 42: 151-161.
- 33) Tipson D A and Dabbous M K. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 1995; 66: 1056-1064.
- 34) Loeshe W, Gusberti F, Mettraux G, Higgins T and Syed S. Relationship between oxygen tension and subgingival bacterial flora in untreated human periodontal pockets. *Infect Immun.* 1983; 42: 659-667.
- 35) Mettraux G, Gusberti F and Gaf H. Oxygen tension (pO₂) in untreated human periodontal pockets. *J Periodontol.* 1984; 55: 516-521.
- 36) Venditto M A. Therapeutic considerations: lower respiratory tract infections in smokers. *J Am Osteopath Assoc.* 1992; 92: 897-900.
- 37) Zambon J J, Grossi S G, Machtei E E, Ho A W, Dunford R and Genco R J. Cigarette smoking and subgingival infection. *J Periodontol.* 1996; 67: 1050-1054.
- 38) Cuff M J, McQuade M J, Scheidt M J, Sutherland D E and Van Dike T E. The presence of nicotine on root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. *J Periodontol.* 1989; 60: 564-569.
- 39) Silverstein P. Smoking and wound healing. *Am J Med.* 1992; 93: 22-24.
- 40) Raulin L A, McPherson J C III, McQuade M J and Hanson B S. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. *J Periodontol.* 1988; 59: 318-325.
- 41) Hanes P J, Schuster G S and Lubas S. Binding, uptake and release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 1991; 62: 142-147.
- 42) Barak L S, Yocum R R, Nothnagel E A and Webb W W. Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazolephalloidin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980; 77: 980-984.