



Title	マウス実験的歯周炎モデルにおけるタバコ煙濃縮物およびニコチンの影響
Author(s)	久保田, 実木子
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52346
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

マウス実験的歯周炎モデルにおける
タバコ煙濃縮物およびニコチンの影響

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻（歯周病分子病態学）

久保田 実木子

（指導教官：村上 伸也教授）

緒言

歯周病は歯面と歯肉の境界部に蓄積したデンタルプラーク中の歯周病原性細菌により、歯肉の発赤および腫脹、歯槽骨の吸収といった歯周組織の破壊が引き起こされる慢性炎症性疾患である^{1,2}。歯周病の発症および進行の過程に関わる因子としては、原因としての細菌因子に加え宿主因子、環境因子といったリスク因子が挙げられる。宿主因子としては糖尿病や肥満等の全身状態、環境因子としては喫煙、ストレス、薬剤服用等、多様な要因が歯周病の病態形成や進行に関与している。とりわけ、喫煙習慣は歯周病の進行に大きな影響を及ぼす環境因子として多くの報告がなされている^{3,4}。

喫煙が歯周病のみならずさまざまな疾患の発症および進行と関連していることは多くの疫学研究を通して明らかになっている。喫煙が影響を及ぼす疾患としては、ガン、慢性閉塞性肺疾患、脳梗塞、虚血性心疾患、高血圧、糖尿病等が挙げられる⁵⁻¹⁰。タバコ煙は4000種以上の化学物質で構成されており、有害物質は200種以上、発ガン物質は60種程度含有する。その中でもニコチン（以下 **Nicotine** と記す）はタバコ煙の粒子相およびガス相のいずれにおいても高比率で含まれている主成分である。口腔は鼻腔とともに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。体内に吸引されたタバコ煙成分は主に肺から吸収されるが、タバコ煙を口腔内に吸い込んだ際には唾液に溶解し、長時間にわたってタバコ煙成分が口腔内に残存することが報告されている¹¹。

喫煙者は非喫煙者と比較して歯周病の罹患率が高く、経時的にも歯槽骨吸収がより進行していくことが知られている¹²。さらに喫煙者に対する歯周基本治療の効果は非喫煙者と比較して低く、喫煙は歯周治療後のアタッチメントの獲得を抑制し、歯周組織再生に対しても負の影響を及ぼすことが報告されている^{13,14}。喫煙が歯周組織破壊の程度および進行度に影響を及ぼす一因として、歯周組織構成細胞の細胞機能や宿主の免疫応答に変化を及ぼすことが挙げられる。例えば、タバコの煙成分を曝露させることによって歯周組織を構成する歯根膜細胞や歯肉線維芽細胞の細胞増殖や付着が抑制される^{15,16}。また、喫煙者の血清はヒト臍帯静脈内皮細胞における抗動脈硬化作用を持つ一酸化窒素の産生量を抑制することより、喫煙が血管内皮細胞の機能を低下させることが示唆されている¹⁷。さらに、当研究室では歯根膜細胞における石灰化関連遺伝子や骨芽細胞特異的な転写因子の発現が **Nicotine** 刺激により有意に抑制されることを報告している¹⁸。これらの知見は、喫煙により体内に吸収されるタバコ煙成分が歯周組織の恒常性維持に変調をきたし、さらに創傷治癒の遅延に大きく関与することを示唆している。

喫煙によるヒト体内へのタバコ煙成分は前述のように口腔、鼻腔粘膜、肺への直接曝露によって粘膜組織を経て吸収され循環系を介して全身に移行する。しかしながら喫煙により体内に吸収されるタバコ煙成分が歯周組織の破壊にどのように関与するのかの詳細はいまだ十分に明らかにされていない。

本研究では、マウス実験的歯周炎モデルを作製し、タバコ煙成分であるタバコ煙濃縮物 (cigarette smoke condensate ;以下 CSC と記す) および Nicotine の全身投与が歯槽骨の破壊をはじめとする歯周組織やその所属リンパ節にどのような影響を及ぼすかを解析することにより、喫煙が歯周病病態形成および進行にどのように関与するかについて検討した。

材料および方法

1. マウス実験的歯周炎モデルの作製

本研究におけるすべての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号：動歯 24-012-0）。マウスは雄性 5 週齢 C57BL/6（日本 SLC 株式会社、静岡、日本）を使用した。マウス実験的歯周炎モデルにおける CSC および Nicotine の影響を検討するにあたり、マウスを対照群として Phosphate buffered saline（以下 PBS と記す：和光純薬工業、大阪、日本）を腹腔内投与する群と、実験群としてマウス体重 20 g 当たり CSC (Murty Pharmaceuticals Incorporated, Kentucky, USA) 720 μg 腹腔内投与する群および Nicotine (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 16 μg 腹腔内投与する群の計 3 群に分けた。CSC はタバコ煙を専用機器で捕集し 40 mg/ml Dimethyl sulfoxide に溶媒転換しているものを用いた。本研究でマウスに投与した CSC および Nicotine 量は、ヒト成人が 1 日あたり 10 本喫煙した場合に相当する¹⁹。上記物質を 1 日 1 回 3 日連続で腹腔内投与後、マウス体重当たりの Pentobarbital sodium salt（東京化成工業株式会社、東京、日本）による全身麻酔下で Abe らの方法²⁰に従い上顎左側第二臼歯歯頸部に 5-0 絹糸（Johnson&Johnson, New Jersey, USA）で結紮を行い結紮側とし、上顎右側第二臼歯は処置を行わず非結紮側とした。なお、各群においてマウスの体重に有意な差はなかった。（データは示さず）具体的な結紮方法としては、絹糸をマウス上顎左側第二臼歯の近心側と遠心側に通した後、頬側で結紮した状態で 7 日間経過させることで、マウス実験的歯周炎モデルを作製した²¹。（図 1、2）

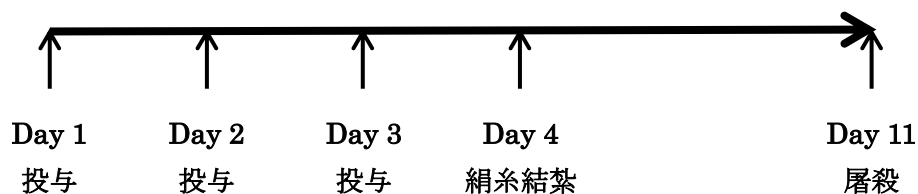


図 1 実験スケジュール

PBS 100 μl 、PBS 100 μl に CSC 720 μg を溶解させたもの、PBS 100 μl に Nicotine 16 μg を溶解させたものをそれぞれ 1 日 1 回 3 日連続で腹腔内投与し、その翌日に上顎左側第二臼歯歯頸部に絹糸を結紮した。結紮した状態で 7 日間経過させることで、マウス実験的歯周炎モデルとした。

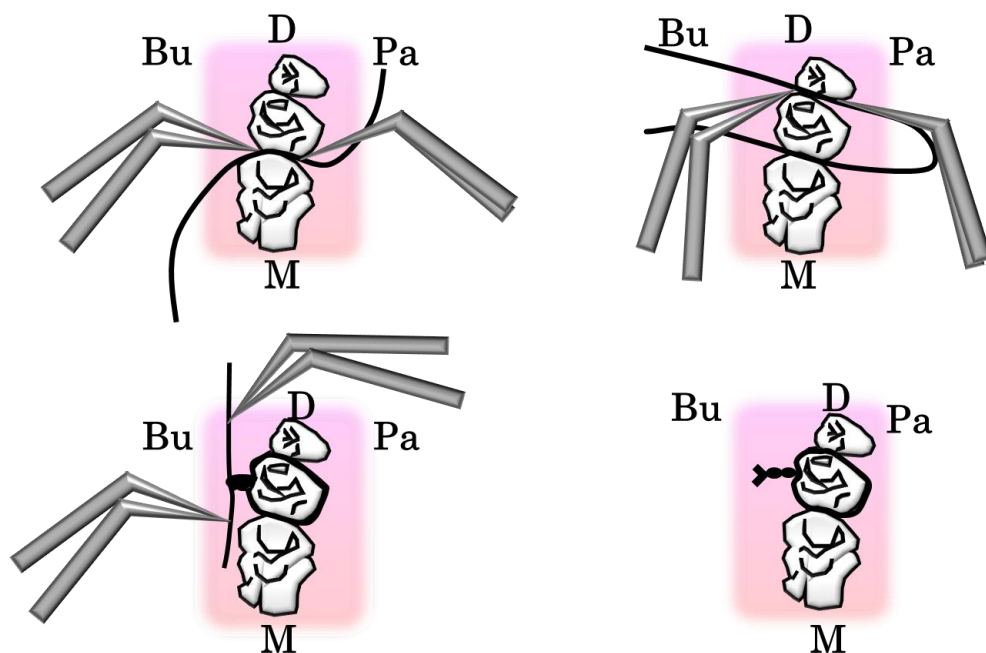


図2 マウス上顎左側第二臼歯歯頸部への絹糸結紮方法

5-0 絹糸をマウス上顎左側第二臼歯の近心側と遠心側に通し、頬側で結紮した。

文献²⁰より改変

2. micro Computed Tomography (以下 μ CT と略す) による歯槽骨吸収量の定量解析

絹糸結紮後7日目に全ての群のマウスを Pentobarbital sodium salt 麻酔下で屠殺し、結紮側および非結紮側の上顎第二臼歯周辺の歯槽骨を実験動物用3DマイクロX線CT R_mCT2 (リガク、東京、日本) を用いて観察した。 μ CTにより得られた画像データを三次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング、東京、日本) で処理することにより各群の歯槽骨吸収量の測定を行った。測定方法としては第一臼歯遠心根のセメントーエナメル境から咬合平面に垂直に歯槽骨頂までの距離(図2の①に相当する)、同様に第二臼歯近心根、第二臼歯遠心根、第三臼歯それぞれのセメントーエナメル境から咬合平面に垂直に歯槽骨頂までの距離(図2の②、③、④にそれぞれ相当する)を測り、その和(図2の①+②+③+④)を歯槽骨吸収量とした。

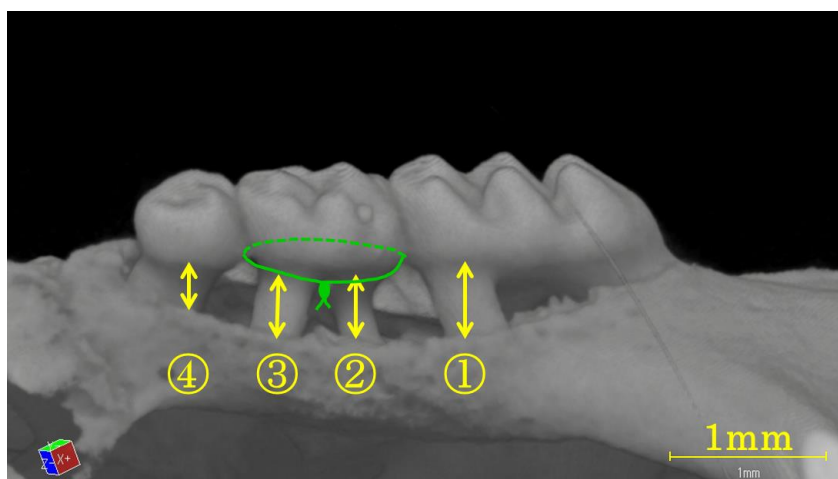


図3 歯槽骨吸収量の測定方法

緑の点線で示す部位に絹糸を結紮した。第一臼歯遠心根、第二臼歯近心根、第二臼歯遠心根、第三臼歯のセメントーエナメル境から咬合平面に垂直に歯槽骨頂までの距離を測り、その和（図2で示す①+②+③+④）を歯槽骨吸収量とした。

3. マウス歯周組織の組織学的解析

μCT 撮影後の歯周組織を 4% Paraformaldehyde phosphate buffer solution（和光純薬工業、大阪、日本）に 4℃にて一晩浸漬固定し、脱灰液B（和光純薬工業）にて一週間脱灰した後、パラフィンで包埋した。LEICA RA2245（Leica Microsystems、Wetzlar、Germany）を用いて矢状断で厚さ 5 μm の薄切標本作製した。薄切標本は、Mayer's hematoxylin solution（武藤化学株式会社、東京、日本）および 1% Eosin Y 液（和光純薬工業）を用いて Hematoxylin-eosin（以下HEと記す）染色を行い、光学顕微鏡 ECLIPSE Ci（Nikon、東京、日本）にて観察および写真撮影を行い、形態学的に評価した。また、1匹につき 5 枚の薄切標本の HE 染色を各群 6 匹行い、染色像を画像解析ソフトウェア WinROOF（三谷商事、福井、日本）に取り込み、第一臼歯遠心根に接着している最歯冠側の上皮、第一臼歯遠心根に最も近い歯槽骨頂、第二臼歯近心根に最も近い歯槽骨頂、第二臼歯近心根に接着している最歯冠側の上皮を各頂点とする四角形を炎症細胞浸潤部位とし、その部位中で炎症細胞が占める面積の定量を行い、平均化した。

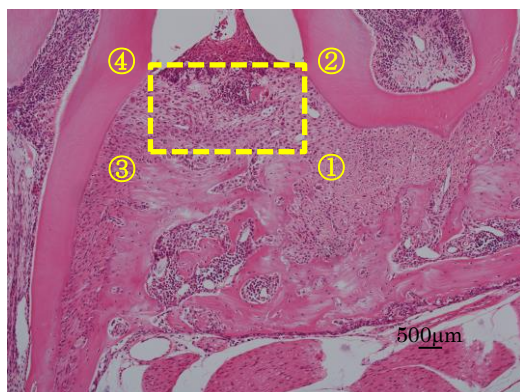


図 4 炎症細胞浸潤範囲の測定方法

①第一臼歯遠心根に接着している最歯冠側の上皮、②第一臼歯遠心根に最も近い歯槽骨頂、③第二臼歯近心根に最も近い歯槽骨頂、④第二臼歯近心根に接着している最歯冠側の上皮を各頂点とする四角形（黄色の点線で示す）を炎症細胞浸潤部位とし、その部位中で炎症細胞が占める面積の定量を行った。

さらに、破骨細胞のマーカー酵素として知られる **Tartrate-resistant acid phosphatase**（以下 **TRAP** と記す）を用いて 1 匹につき 5 枚の薄切標本の染色を各群 6 匹行い、絹糸結紮側および非結紮側の上顎第二臼歯周辺の **TRAP** 陽性細胞数を算定し、1 切片あたりで平均化した。**TRAP** 染色には **TRAP/ALP Stain Kit**（和光純薬工業）を使用した。

4. RAW264.7細胞の破骨細胞への分化誘導

Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand（以下 **RANKL** と記す）存在下で破骨細胞へと分化する **RAW264.7** 細胞を用いて次の実験を行った。すなわち **RAW264.7** 細胞を **CSC 15 μg/ml** および **Nicotine 10⁻⁵ M** 存在および非存在下にて **10% ウシ胎仔血清**（**Life Technologies, California, USA**）含有 **α-MEM**（和光純薬工業）に **Mouse recombinant RANKL**（**R&D Systems, Minnesota, USA**）**100 ng/ml** を添加して 6 日間培養することにより、タバコ煙成分が破骨細胞の分化誘導に及ぼす影響について検討した。破骨細胞への分化度は **TRAP** 染色陽性細胞数を算定することで評価した。

5. マウス顎下リンパ節における *Rankl* 遺伝子発現の解析

材料および方法 1.と同様に、雄性 5 週齢 C57BL/6 のマウスを対照群として PBS を腹腔内投与する群と、実験群としてマウス体重 20 g 当たり CSC 720 μ g 腹腔内投与する群および Nicotine 16 μ g 腹腔内投与する群の計 3 群に分けた。上記物質を 1 日 1 回 3 日連続で腹腔内投与後、Pentobarbital sodium salt による全身麻酔下で上顎左側第二臼歯歯頸部に 5-0 絹糸で結紮を行い結紮側とした。また、上顎右側第二臼歯は処置を行わず非結紮側とした。絹糸結紮 7 日目に全ての群のマウスを屠殺し、非結紮側（右側）および結紮側（左側）の顎下リンパ節を採取した。

6. 全 RNA の抽出

顎下リンパ節からの全 RNA の分離は RNA Bee™ (TEL-TEST, Inc, Texas, USA) を用いて行った。すなわち、顎下リンパ節を回収後 RNA Bee™ を加えホモジナイズし、1/5 容量の Chloroform (和光純薬工業) を添加後、遠心分離 (12000 g、4℃、15 分) した。分離された水層から RNA を 2-Propanol (和光純薬工業) の添加によって沈殿させ、75% Ethanol による洗浄の後、得られた全 RNA 沈殿を 20 μ l Diethyl pyrocarbonate (以下 DEPC と記す) 処理水 (和光純薬工業) に溶解し、全 RNA 量を NanoDrop ND-1000 (Life Technologies) を用いて計測した。

7. 相補鎖 DNA (以下 cDNA と略す) の作製

全 RNA をもとに逆転写を行って cDNA を作製した。すなわち 65℃で熱処理された各 RNA 検体 1 μ g に、52.5 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane (pH8.3)、3 mM MgCl₂、75.5 mM KCl、1 mM Dithiothreitol (Life Technologies)、1.1 U/ μ l Ribonuclease inhibitor (タカラバイオ、滋賀、日本)、0.5 mM dNTP Mixture (タカラバイオ)、5 U/ μ l Moloney-mouse leukemia virus 逆転写酵素 (Life Technologies)、55 ng/ μ l Random hexamers (pd(N)₆; Pharmacia Biotech, Wisconsin, USA) と最終濃度になるように調整した試薬を加え、DEPC 処理水で全量 40 μ l の反応液を調合した。反応液は 37℃にて 60 分間保温後、99℃にて 5 分間処理し残留酵素を失活させ、cDNA を調製した。

8. Real-Time PCR 解析

細胞の cDNA を鋳型として表 1 に示す各遺伝子特異的な Real-Time PCR 用プライマー（タカラバイオ）を使用し Real-Time PCR 解析を行った。PCR 反応は Power PCR SYBR® Master Mix（Applied Biosystems、California、USA）を用いて 7300 Fast Real-Time PCR System（Applied Biosystems）にて行った。mRNA 転写は、*Gapdh* 遺伝子を用いてノーマライゼーションし、定量化を図った。

表 1 本研究で使⽤した Real-Time PCR 用プライマーの一覧

遺伝子	プライマー
<i>Rankl</i>	5'- AAAGTGGTCGGGCAATTCTG -3'
	5'- AGGGTTGGACACCTGAATGCTA -3'
<i>Gapdh</i>	5'- TGTGTCCGTCGTGGATCTGA -3'
	5'- TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG -3'

9. 統計学的解析

実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2 群比較は Student's-t 検定を、多群比較は分散分析（ANOVA）を行った後に post-hoc として Tukey 検定を用いて行い、有意水準を 5 %に設定し、p 値が有意水準を下回る場合に有意差ありと判断した。

結果

1. CSC および Nicotine がマウス実験的歯周炎モデルの歯周組織に及ぼす影響 (μCT を用いた歯槽骨吸収量の変化の検討)

絹糸結紮後 7 日目のマウス実験的歯周炎モデルにおいて非結紮側および結紮側の歯周組織をμCT を用いて解析した。まず、CSC または Nicotine の腹腔内投与のみで歯槽骨に変化が認められるか否かを検討した。その結果、非結紮側において、PBS を前投与した対照群と CSC あるいは Nicotine を前投与した実験群ともに歯槽骨吸収はほとんど認められなかった(図 3 上段)。次に、絹糸をマウス上顎左側第二臼歯歯頸部に結紮することで歯槽骨に変化が認められるか検討した。その結果、PBS を前投与した対照群においても、結紮側で歯槽骨吸収が惹起された(図 3 下段左)。PBS を前投与した対照群の結紮側で認められた歯槽骨吸収は、CSC または Nicotine を前投与した実験群ではさらに進行した(図 3 下段中央、右)。

マウス歯槽骨吸収量を定量化したデータを図 4 に示す。非結紮側において PBS を前投与した対照群と CSC または Nicotine を前投与した実験群間には歯槽骨吸収量に有意な差は認められなかった。PBS を前投与した対照群において、非結紮側と比較して結紮側では歯槽骨吸収が惹起された。PBS を前投与した対照群の結紮側で認められた歯槽骨吸収は、CSC または Nicotine を前投与した実験群では有意に増加した。CSC あるいは Nicotine を前投与した群での結紮側における歯槽骨吸収量を群間で比較すると統計的に有意な差は認められなかった。

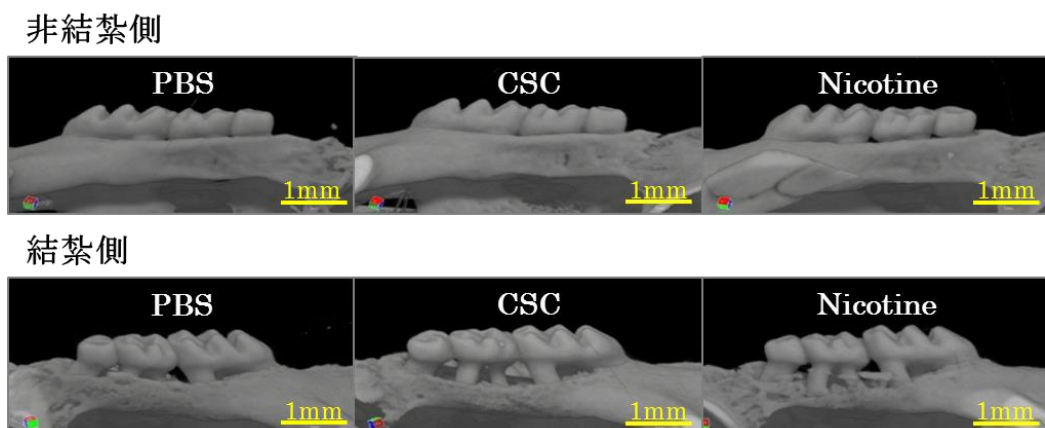


図 5 絹糸結紮後 7 日目における代表的なマウス歯槽骨の CT 画像

マウス上顎左側第二臼歯の歯頸部に絹糸を結紮して 7 日目の歯槽骨を頬側からμCT 撮影した。上顎右側第二臼歯は絹糸を結紮を行わず、非結紮側とした。

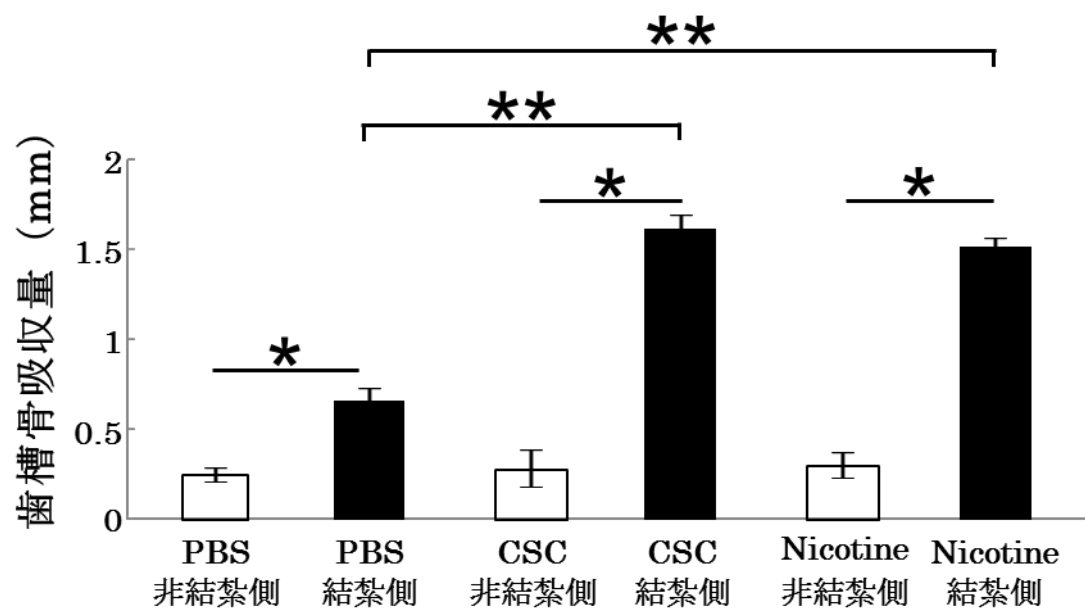


図 6 各群絹糸結紮後 7 日目におけるマウス歯槽骨吸収量

前述の計測方法に基づき、各群の歯槽骨吸収量を定量化した。

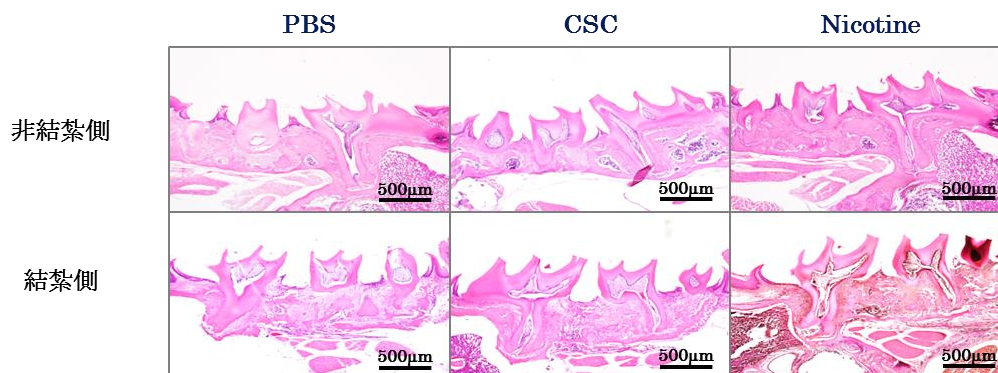
(n=6、*: $p<0.01$ vs 各群の非結紮側、**: $p<0.01$ vs 対照群 (PBS 投与群) の結紮側)

2. CSC および Nicotine がマウス実験的歯周炎モデルの歯周組織に及ぼす影響 (マウス歯周組織薄切標本における HE 染色を用いた歯槽骨吸収および炎症状態の検討)

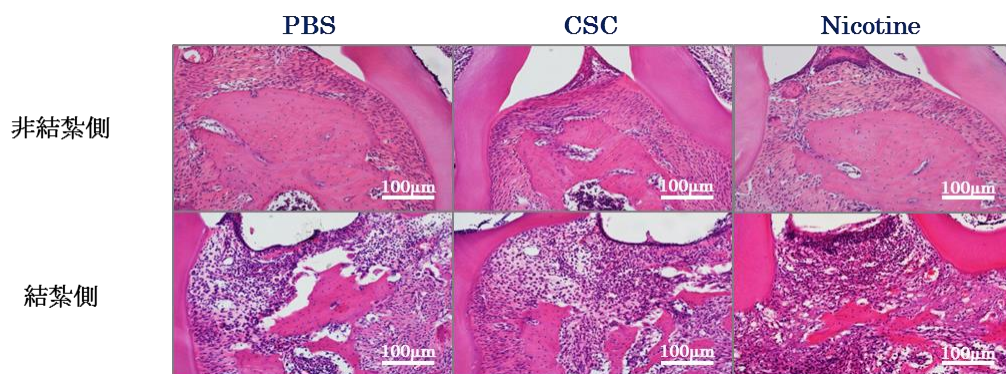
マウス実験的歯周炎モデルの歯周組織を組織学的に検討するため、HE 染色を行った。その結果、HE 染色像は μ CT 解析によって観察された歯槽骨吸収像と相関し、結紮側において歯槽骨吸収を認め、CSC または Nicotine を前投与した実験群においてその吸収は一層顕著であった (図 5 A)。非結紮側では全ての群において歯槽骨表面は平滑であるのに対して、結紮側の歯槽骨表面は不整であり、特に CSC または Nicotine を前投与した実験群でその傾向は顕著であった。非結紮側で認められる歯肉結合組織でのコラーゲン線維束が結紮側では消失し、非結紮側ではほとんど認められなかった炎症細胞の浸潤が結紮側において検出された (図 5 B)。結紮側に浸潤している炎症細胞の密度は PBS を前投与した対照群と CSC または Nicotine を前投与した実験群では差は認められなかった。さらに強拡大で歯槽骨表層部を観察すると、骨吸収窩に破骨細胞様細胞の存在を確認できた (図 5 C)。

HE 染色により認められた歯周組織における炎症細胞浸潤部位の面積を定量化したグラフを図 6 に示す。第一臼歯の歯肉縁、第一臼歯に最も近い歯槽骨頂、第二臼歯に最も近い歯槽骨頂、第二臼歯の歯肉縁を各頂点とする四角形を炎症細胞浸潤部位とし、その面積の定量化を行った。(図 4) 非結紮側には炎症細胞浸潤は認められなかった一方、結紮側においては全ての群で炎症細胞浸潤が認められた。しかしながら、PBS を前投与した対照群と CSC または Nicotine を前投与した実験群に統計学的に有意な差を認めなかった。

A.



B.



C.

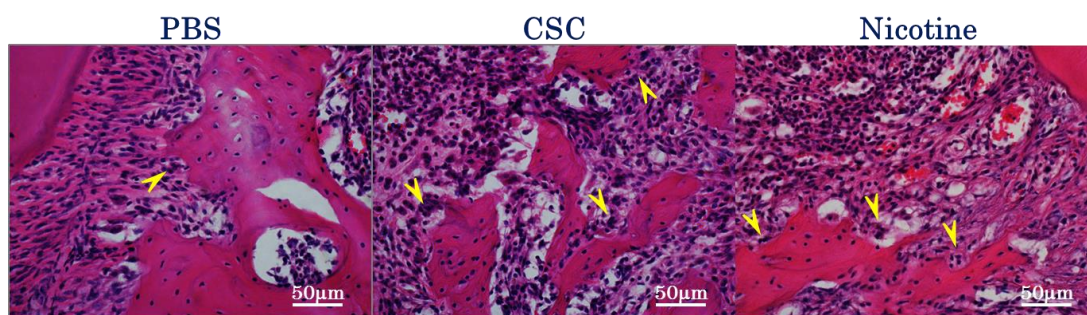


図 7 歯周組織の組織像

- A) 絹糸結紮後のマウス歯周組織より作製した矢状断薄切標本を HE 染色した。上顎第一臼歯、第二臼歯、第三臼歯と歯周組織の組織像を示す。 倍率 40 倍
- B) 第一臼歯と第二臼歯間の拡大像を示す。 倍率 200 倍
- C) 結紮側の拡大像を示す。黄矢印は破骨細胞様細胞を表す。倍率 400 倍

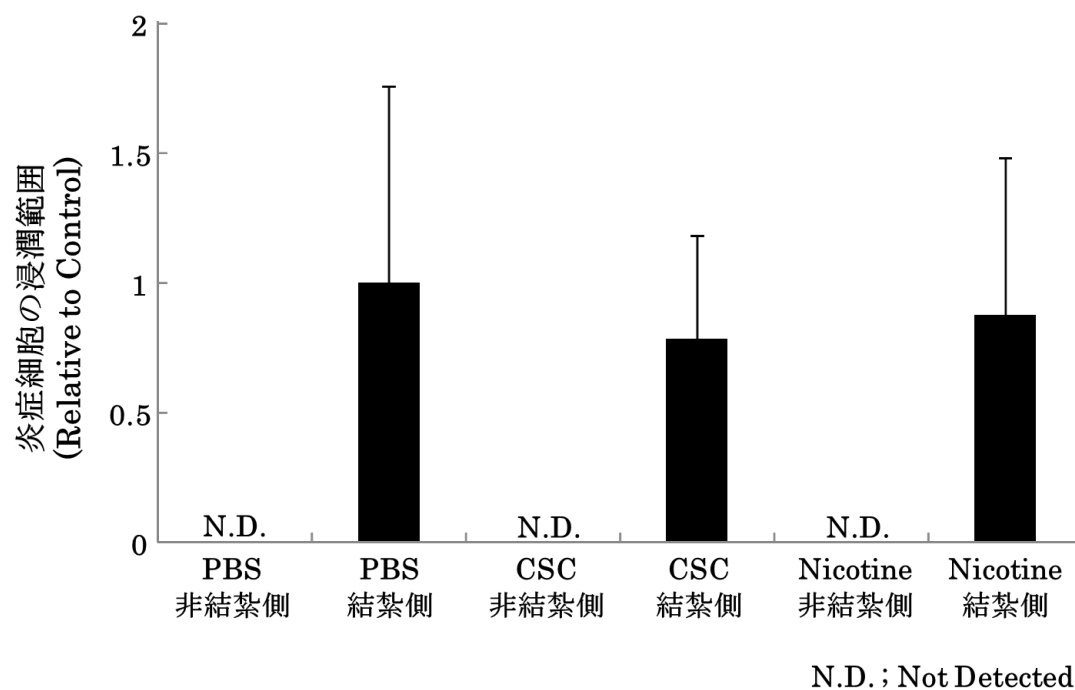


図 8 炎症細胞浸潤範囲の定量化

炎症細胞の浸潤範囲（上顎第一臼歯と第二臼歯間で、第一臼歯遠心根に接着している最歯冠側の上皮、第一臼歯遠心根に最も近い歯槽骨頂、第二臼歯近心根に最も近い歯槽骨頂、第二臼歯近心根に接着している最歯冠側の上皮を各頂点とする四角形）における炎症細胞が占める面積を定量化した。（n=6、Control: 対照群（PBS 投与群）の結紮側）

3. CSC および Nicotine 前投与が TRAP 染色陽性細胞数の変化に及ぼす影響

HE 染色像において骨吸収窩に破骨細胞様細胞の存在が確認されたことから、次に歯周組織における TRAP 染色²²による破骨細胞の存在および分布を検討した。薄切組織標本を TRAP にて染色した結果、PBS を前投与した対照群、CSC または Nicotine を前投与した実験群のいずれの群においても非結紮側の上顎右側第二臼歯周辺の歯槽骨表面には TRAP 陽性細胞をほとんど認められなかった。一方結紮側では、いずれの群においても上顎左側第二臼歯周辺の歯槽骨表面に TRAP 陽性細胞の存在が認められた (図 7)。さらに、CSC または Nicotine を前投与した実験群における TRAP 陽性細胞数は対照群と比較して有意に増加した (図 8)。以上の結果より絹糸結紮側において破骨細胞が分化誘導され、その細胞数は CSC、Nicotine の前投与により有意に増加することが明らかとなった。

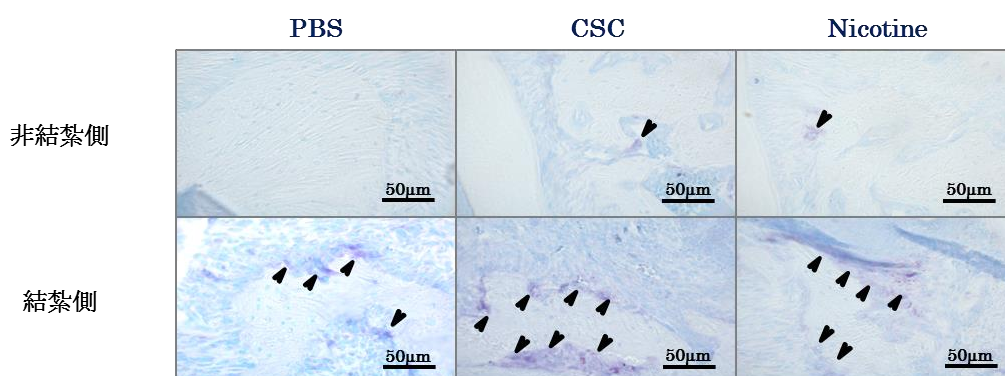
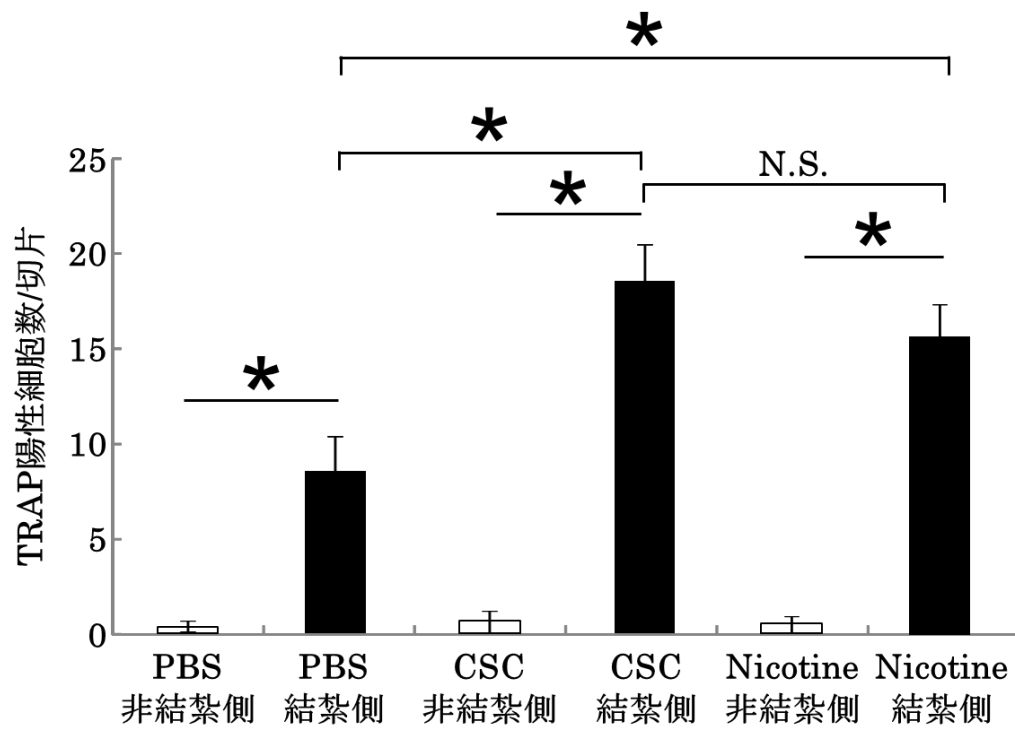


図 9 骨吸収部位にみられる TRAP 陽性細胞

上顎第一臼歯と第二臼歯間の拡大像を示す。黒矢印は TRAP 陽性細胞を表す。 倍率 400 倍



N.S. ; Not Significant

図 10 骨吸収部位に存在する TRAP 陽性細胞数の定量化

非結紮側および結紮側の第二臼歯近遠心に存在する TRAP 陽性細胞数を算定した。

(n=6、*: $p<0.01$ vs 各群の非結紮側、**: $p<0.01$ vs 対照群の結紮側)

4. CSC および Nicotine が破骨細胞への分化誘導過程に及ぼす影響

マウス実験的歯周炎モデルにおいて絹糸結紮側の歯槽骨表面に破骨細胞が分化誘導され、その傾向は CSC または Nicotine を前投与した実験群により顕著な傾向を示したことから、タバコの煙成分の全身投与が破骨細胞の分化に関与していることが考えられる。破骨細胞の活性化、生存、分化の過程において RANKL が主要な役割を果たすことが報告されている²³。*in vitro*の実験系において RAW264.7 細胞は RANKL 存在下で破骨細胞に分化することが知られている²⁴。そこで、CSC および Nicotine が破骨細胞の分化誘導にどのような影響を及ぼすかを *in vitro* で検討するため、RAW264.7 細胞を RANKL 含有培地で CSC または Nicotine 存在下および非存在下で培養し、TRAP 陽性細胞数を測定した。その結果、RAW264.7 細胞は RANKL 存在下において全ての群で TRAP 陽性細胞へと分化した。さらに CSC および Nicotine 存在下で RAW264.7 細胞を分化誘導すると、TRAP 陽性細胞数は、CSC および Nicotine 非存在下と比較して、有意に増加した (図 9)。

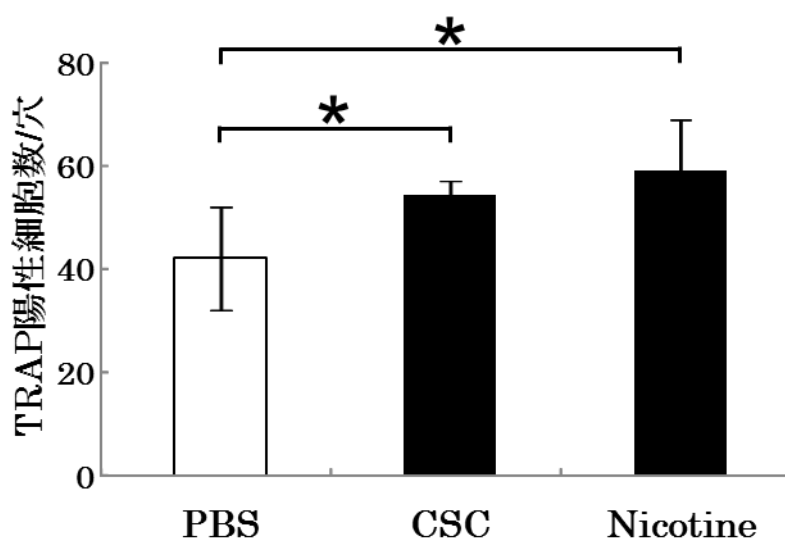


図 11 タバコ煙成分が RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化誘導に及ぼす影響

24 穴用培養プレートにて RAW264.7 細胞を CSC または Nicotine 存在および非存在下の RANKL 含有培地で 6 日間培養し、TRAP 染色にて破骨細胞への分化度を評価した。

(n=5、*: $p<0.05$ vs PBS 添加群)

5. CSC および Nicotine がマウス顎下リンパ節中における *Rankl* 遺伝子発現に及ぼす影響

前述したように、RANKL は破骨細胞の成熟過程に主要な役割を果たしており、海綿骨、リンパ節、胸腺、肺に多く発現している^{25,26}。マウス実験的歯周炎モデルにおいて、絹糸結紮側の歯槽骨表面に破骨細胞が分化誘導され、その傾向は CSC または Nicotine を前投与した実験群でより顕著な傾向を示した (図 8)。そこで、破骨細胞の成熟を促す RANKL の発現が結紮側および CSC または Nicotine を前投与した実験群では上昇しているのではないかと仮定し、結紮側および非結紮側すなわち左側および右側の所属リンパ節である顎下リンパ節に発現している *Rankl* 遺伝子発現量を比較検討した。その結果、顎下リンパ節中における *Rankl* 遺伝子発現は、CSC または Nicotine を前投与した実験群においてのみ、非結紮側の顎下リンパ節と比較して、結紮側の顎下リンパ節において有意に増強した。また、各群の結紮側の顎下リンパ節を比較した場合、PBS を前投与した対照群と比較して CSC または Nicotine を前投与した実験群において *Rankl* 遺伝子発現が有意に上昇した。(図 10)

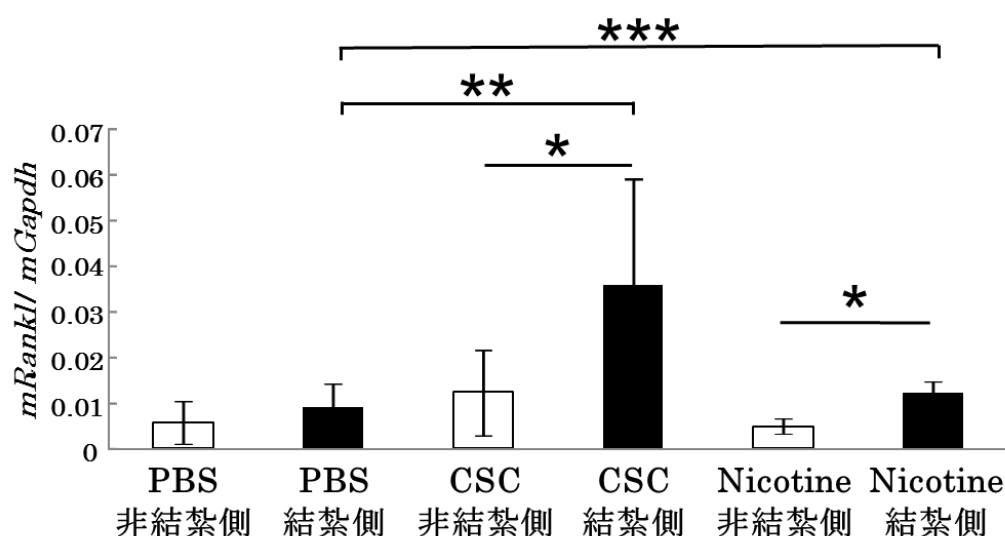


図 12 マウス顎下リンパ節における *Rankl* 遺伝子発現の変化

マウス上顎左側第二臼歯の歯頸部に絹糸を結紮して 7 日目の顎下リンパ節を摘出し、Real-Time PCR 解析を行った。

(n=7, *: $p < 0.01$ vs 各群非結紮側、**: $p < 0.01$ vs PBS 結紮側、***: $p < 0.05$ vs PBS 結紮側)

考察

本研究は喫煙による歯周組織の破壊、特に歯槽骨の破壊のメカニズムの一端を解明することを目的とした。はじめにマウス上顎左側第二臼歯の歯頸部に絹糸を結紮することで歯槽骨吸収を誘導するマウス実験的歯周炎モデルを確立した。そしてこのモデルを用いて、歯周病のリスク因子である喫煙により体内に吸収されるタバコ煙成分が歯槽骨の破壊に関与する可能性について検討した。

歯周病のリスク因子には細菌因子以外に宿主因子や環境因子が挙げられる。これらのリスク因子が歯周病の進行に及ぼす影響については多くの疫学研究がなされているが、リスク因子の介入の有無といった前向き研究はヒトでは非常に困難である。そのため、小型動物での実験的歯周炎モデルを用いて歯周炎の発症機序、病態解明が試みられている²⁷。マウス実験的歯周炎モデルとしては、代表的な歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* (以下、*P. gingivalis* と記す) 等を Carboxymethyl cellulose 水溶液に溶解したものをマウスに長期間経口接種して口腔内での細菌の定着をはかるものがあげられる^{28,29}。しかし、この方法の問題点としては歯周炎の原因であるプラークの堆積、バイオフィルムの形成が認められない。本研究で用いた絹糸結紮モデルでは、非結紮側と比較して、絹糸周囲へのプラークの堆積（データは示さず）および著明な歯槽骨の吸収が認められた（図 3、図 4）。本研究と同種マウスに結紮した絹糸の周囲ではパストレラ・ファミリーに属するグラム陰性γ-プロテオバクテリア綱の一種が蓄積して、マウスの歯槽骨吸収を促進すること、この細菌はヒト侵襲性歯周炎の進行に関与する *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* と遺伝子を共有することが報告されている³⁰ ことから、絹糸を結紮することで歯槽骨吸収に関与するマウス常在菌が勢力を増す可能性が考えられる。さらに HE 組織像では、結紮した絹糸下に好中球、リンパ球を中心とした炎症細胞の浸潤が認められた（図 5 B）。Abe らは本研究で用いた結紮方法と類似した方法で絹糸を結紮した後、マウスに抗菌剤含有飲料水を飲用させると、結紮側での骨吸収量が有意に減少すると報告しており²⁰、本絹糸結紮モデルは細菌感染による影響が関与する歯周炎モデルと考えられる。

喫煙がヒト体内に及ぼす影響としては、口腔、鼻腔、気管支、肺にタバコ煙が直接曝露し、局所粘膜の損傷、機能障害といった直接的な為害性と、粘膜面や末梢血液からタバコ煙成分が吸収され、全身的にタバコ煙成分が循環することにより、ヒト体内に為害性を及ぼす間接的な作用があげられる。喫煙の影響を検討するにあたり、動物実験にタバコ煙を吸入させる環境が喫煙の体内に及ぼす直接的および間接的作用の解析に最も適していることが明らかである。しかしながら、このような喫煙動物実験モデルを作製するための環境整備が容易

でないため、その代替策としてタバコ煙を専用機器で捕集し Dimethyl sulfoxide に溶媒転換しているもの (CSC) が多くの喫煙の影響を評価する研究で用いられている。そこで本研究においても CSC を実験に供することとした。また、タバコ煙成分中、Nicotine はタバコ煙のガス相および粒子相共に多く含有されており、その為害作用の強さからさまざまな疾患に対して喫煙が及ぼす影響を検討する際に最も注目されている物質である。Nicotine が全身に及ぼす影響としては、ラットに 90 日間タバコ煙を吸引させると、血中の一酸化炭素ヘモグロビン濃度の上昇が認められること³¹、さらに本研究と同系マウスである 5 週齢 C57BL/6 に Nicotine を腹腔内投与すると、同週齢同系マウスに生理食塩水を腹腔内投与した群に比較して体温が低下すること、5 週齢 C57BL/6 に Nicotine を腹腔内投与した群と比較して、10 週齢 C57BL/6 に Nicotine を腹腔内投与した群では血清中の Cotinine 濃度の上昇が観察されることが報告されている³²。これまでラットを用いた絹糸結紮による実験的歯周炎モデルにおいて、タバコ煙を吸引させる系³³、Nicotine を投与する系を用いて^{19,34,35}、タバコ煙成分が歯槽骨吸収に及ぼす影響について報告されている。しかし、喫煙で発生したタバコ煙成分が体内に吸収された後にどのようなメカニズムを介して歯周組織の破壊に関与するかは明らかになっていない。本研究は、マウス実験的歯周炎モデルに CSC あるいは Nicotine を腹腔内投与、すなわち喫煙により体内に吸収されたタバコ煙成分が歯周組織の破壊に及ぼす影響について初めて検討したものである。

その結果、非結紮側では、PBS を前投与した対照群、CSC または Nicotine を前投与した実験群のいずれの群においても歯槽骨吸収は認められなかった。一方、結紮側では PBS を前投与した対照群において歯槽骨吸収を認め、CSC あるいは Nicotine を前投与した実験群では PBS を前投与した対照群と比較して有意に歯槽骨吸収が促進された (図 3、図 4)。これらの結果よりタバコ煙成分はそれ単独では歯槽骨吸収を惹起しないが、本研究で用いたマウス実験的歯周炎モデルのように絹糸に付着したプラークによる細菌因子と絹糸結紮によるメカニカルストレスの存在下では、それら因子によって誘導される歯槽骨吸収をさらに促進することが示唆された。今回は、歯槽骨吸収量を絹糸結紮部位を含む周囲の歯のセメント-エナメル境から歯槽骨頂までの距離の和で評価した。しかしながら、喫煙により骨密度が低下する³⁶ことも報告されていることから、タバコ煙成分摂取による歯槽骨への影響に関して、骨吸収量だけでなく骨密度等の骨質に関連するパラメーターでの検討も今後必要となるものと思われる。

本研究において、前投与した CSC 内に含まれる Nicotine 量はもう一方の実験群に前投与した Nicotine 量に一致させている。CSC を前投与した群と Nicotine を前投与した群を比較すると、歯槽骨吸収量においては両群間に有意

差は認められなかったが、CSC を前投与した群の方が歯槽骨吸収量が大きくなる傾向を認めた (図 4)。このことは、Nicotine が歯槽骨破壊に関連する主成分であることに加えて、CSC に微量に含まれる Nicotine 以外の物質が Nicotine と協調して歯槽骨吸収を促進させる可能性が存在していることを示唆している。

組織学的観察による歯周組織での炎症細胞浸潤は、非結紮側においては、いずれの群でも認めなかった (図 5 B)。このことから、タバコ煙成分を腹腔内投与するのみでは歯周組織に炎症を惹起しないことが組織学的にも明らかとなった。結紮側では全ての群で炎症細胞の浸潤を認めたものの、炎症細胞の浸潤面積に有意差はなかった (図 5 B、図 6)。すなわち、各群の結紮側において有意な歯槽骨吸収量の差が認められたことと比較すると、炎症細胞浸潤については群間にほとんど差が認められなかった (図 6)。しかしながら、本研究では炎症細胞の浸潤面積の比較のみ検討し、浸潤している炎症細胞の質的变化については検討できてはいない。ヒトの歯周炎初期では好中球が増加し、少し遅れて T 細胞、後期では形質細胞および B 細胞が浸潤する。今回は絹糸を結紮して 7 日後の歯周組織を観察していることから、好中球や T 細胞が主と考えられる。今後、各群結紮側の歯周組織での炎症浸潤細胞中の細胞種の検討、および炎症性サイトカインの発現量の変化の検討を行う必要があると思われる。また、ヒトでは喫煙者と非喫煙者ではプラークの付着量^{37,38}やプラーク中に検出される細菌の量や種類に差異はないが、喫煙者の歯周ポケット中では歯周病に関連が強いと考えられている red complex と orange complex に属する菌比率の増加を認めるとする報告がある³⁹。本研究では、マウス口腔内にタバコ煙成分を直接曝露していないが、全身を循環するタバコ煙成分が口腔内に滲出し、マウス口腔内の構成菌種の比率に変化が生じている可能性が考えられる。この構成菌種の比率の変化が、本研究で認められたマウス歯槽骨吸収の変化に関与している可能性も想定される。

骨の代謝には骨芽細胞と破骨細胞の働きのバランスが保たれることが重要である。本研究では、結紮側において歯槽骨吸収が認められたこと、HE 染色像において骨吸収窩に破骨細胞様細胞の存在が認められたこと (図 5 C) から、結紮側における歯槽骨吸収には、結紮歯周囲の歯槽骨周辺での破骨細胞への分化誘導を伴うと考え、TRAP 染色を行い破骨細胞数を検討した。その結果、非結紮側ではいずれの群においても歯槽骨表面に破骨細胞を認めなかったのに対して、結紮側では全ての群で破骨細胞の存在を認めた (図 7)。さらに PBS を前投与した対照群と比較して、CSC または Nicotine を前投与した実験群では結紮側において有意に破骨細胞数が増加した (図 8)。以上の結果から、絹糸を結紮すると破骨細胞が分化誘導されること、さらに、CSC または Nicotine の前投与は破骨細胞への分化誘導を促進することが *in vivo* で推測された。そこで、タバコ煙成

分が破骨細胞への分化誘導にどのような影響を及ぼすかを、RANKL 存在下で破骨細胞へと分化誘導される RAW264.7 細胞を用いて検討を行った。その結果、CSC または Nicotine 存在下では分化誘導された TRAP 染色陽性細胞数、すなわち破骨細胞が増加した (図 9)。Nicotine が RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化誘導過程に及ぼす影響としては、Nicotine 様アセチルコリンレセプター (Nicotinic acetylcholine receptor: 以下 nAChR と記す) の一つである nAChR α 7 サブユニットの遺伝子発現が Nicotine 存在下では上昇することが報告されている⁴⁰。本研究ではこの報告と同様の細胞、経過時間、Nicotine の濃度で実験を行っているため、類似した現象を観察していると考えられる。また、前述の研究においては、Nicotine 刺激により破骨細胞数は増加すると報告されている⁴⁰。CSC にも Nicotine が含まれているため、ほぼ同様の機序を有すると考えられる。

前述のように絹糸結紮側での破骨細胞の出現、さらに CSC または Nicotine を投与することで破骨細胞数の増加が有意に促進されることに、破骨細胞の成熟に重要な役割を果たす RANKL が関与しているのではないかと考え、歯周組織の所属リンパ節である顎下リンパ節における *Rankl* 遺伝子発現を検討した。その結果、PBS を前投与した対照群と比較して CSC あるいは Nicotine を前投与した実験群において *Rankl* 遺伝子発現が有意に上昇した (図 10)。Nicotine は主に前述の nAChR α 7 サブユニットを介して、種々の細胞内シグナル伝達を誘導している。本研究においては、細菌感染およびメカニカルストレスに起因する歯周組織での炎症の惹起、さらにその局所情報を抗原提示細胞が感知し、所属リンパ節に遊走することにより伝達し、顎下リンパ節における *Rankl* 遺伝子発現を上昇させ、その *Rankl* 遺伝子発現の増強により結紮側での破骨細胞の分化を誘導したものと考えられる。CSC あるいは Nicotine の腹腔内投与により、顎下リンパ節においてさらに *Rankl* 発現が亢進するメカニズムとしては、リンパ節内の免疫系の細胞群あるいはリンパ節内のストローマ細胞が Nicotine や CSC に感作され、歯周組織からの情報と協調的に作用することが予想される。しかしながら少なくとも *in vitro* 条件下では nAChR α 7 を発現している T 細胞⁴¹、B 細胞⁴²、マクロファージ⁴³、樹状細胞⁴⁴は Nicotine 存在下では抗炎症性の免疫応答を示すことが知られており、RANKL 発現を誘導する IL-1 β 、IL-6、IL-11、IL-17 等の産生は少ないと考えられる⁴⁵。しかし、ヒト歯周病病変部において、T リンパ球、B リンパ球が RANKL の供給源とする報告、特に研究の進んでいるマクロファージでは nACh α 7 を介したシグナルは Janus-kinase 2 (JAK2) / signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) を活性化して NF- κ B の機能を抑制したり⁴⁶、interleukin-1 receptor-associated kinase M (IRAK-M) の発現を亢進させることで炎症性サイトカインの産生を

抑制することが報告されている⁴⁷。一方、リンパ節の微小構造を維持し、免疫細胞移動の足場ともなるストローマ細胞における **nAChR α 7** の発現についての報告は存在しない。しかし、間葉系細胞である歯根膜細胞¹⁸や線維芽細胞⁴⁸では **nAChR α 7** が発現しており、ヒト歯根膜細胞を Nicotine で刺激すると細胞内シグナルについては検討されていないが **RANKL** 遺伝子発現が上昇する報告⁴⁹⁻⁵¹がある。さらに最近の報告ではヒト歯根膜細胞において、Nicotine は **nAChR α 7** を介して **NF- κ B** を活性化させて **IL-1 β** や **IL-8** の産生を誘導する⁵²ことから、免疫系細胞と非免疫系細胞では **nAChR α 7** 下流に異なる細胞内シグナル伝達機構が存在している可能性が示唆される。これらの報告を踏まえた上で筆者は、マウスリンパ節内ストローマ細胞が **CSC** や Nicotine 刺激時の **RANKL** 発現亢進に何らかの役割を果たしていると考えている。さらに局所的には、*P. gingivalis* 感染ラットの歯肉破砕物中の soluble **RANKL** が非感染ラットと比較して有意に上昇している報告⁵³や、ヒト歯周病病変部において、**T** 細胞、**B** 細胞が **RANKL** の供給源とする報告⁵⁴もあり、本研究で検討した顎下リンパ節の他に、歯周組織構成細胞も **RANKL** の供給源である可能性は大いに考えられ、リンパ節での **T** 細胞および **B** 細胞の性質が局所病変部で変化する可能性がある。

これまで喫煙が歯周組織に及ぼす影響としては末梢循環を阻害すること^{55,56}、歯肉線維芽細胞からのコラーゲン産生量を減少させること^{57,58}、好中球の機能障害を引き起こすこと⁵⁹が報告されており、これらが歯周病の病態を修飾していると考えられてきた。本研究ではこれらの影響に加えて、タバコ煙成分が顎下リンパ節での *Rankl* 遺伝子発現を介して絹糸結紮周囲の歯槽骨表面での破骨細胞への分化誘導を促進している可能性が示唆された。このことより、喫煙による歯周病の進行が進むリスクの増大、特に歯槽骨吸収に関しては炎症とともに骨のリモデリングも複合的に作用することで生じていると考えられる。喫煙は歯周病の進行、歯周再生治療の効果不奏功のみならず、体躯全般の骨折治癒にも負の影響を及ぼすことが整形外科分野で明らかになっており⁶⁰、口腔局所のみならず、骨の健康問題としても捉えていく必要があると思われる。

結論

本研究により以下の結論を得た。

1. 絹糸結紮を行ったマウス実験的歯周炎モデルにタバコ煙成分を前投与すると、歯周組織での歯槽骨破壊が促進された。
2. 絹糸結紮側では CSC あるいは Nicotine 前投与により顎下リンパ節での *Rankl* 発現を増強させ、歯槽骨表面での破骨細胞数の増加が促進された。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご懇篤なるご指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の進行にあたり直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、柳田学助教に心より感謝申し上げます。

そして、本研究の遂行に対してさまざまな御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

1. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):7-19.
2. Johnson DA, Chen CL, Dombrowski JC, Nowotny A. Role of bacterial products in periodontitis. I. Endotoxin content and immunogenicity of human plaque. *J Periodontal Res*. 1976;11(6):349-359.
3. Bergström J, Preber H. Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol*. 1994;65(5 Suppl):545-550.
4. Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. *Periodontol 2000*, 2007;43:267-277.
5. Carbone D. Smoking and cancer. *Am J Med*. 1992;93(1A):13S-17S.
6. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 2011;378(9795):1015-1026.
7. Erhardt L. Cigarette smoking: an undertreated risk factor for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 2009;205(1):23-32.
8. Stämpfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(5):377-384.
9. Kilaru S, Frangos SG, Chen AH, Gortler D, Dhadwal AK, Araith O, Sumpio BE. Nicotine: a review of its role in atherosclerosis. *J Am Coll Surg*. 2001;193(5):538-546.
10. Targher G, Alberiche M, Zenere MB, Bonadonna RC, Muggeo M, Bonora E. Cigarette smoking and insulin resistance in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(11):3619-3624.
11. Palmer RM, Scott DA, Meekin TN, Poston RN, Odell EW, Wilson RF. Potential mechanisms of susceptibility to periodontitis in tobacco smokers. *J Periodontal Res*. 1999;34(7):363-369.
12. Do LG, Slade GD, Roberts-Thomson KF, Sanders AE. Smoking-attributable periodontal disease in the Australian adult population. *J Clin Periodontol*. 2008;35(5):398-404.
13. Preber H, Bergström J. The effect of non-surgical treatment on

- periodontal pockets in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol*. 1986;13(4):319-323.
14. Patel RA, Wilson RF, Palmer RM. The effect of smoking on periodontal bone regeneration: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2012;83(2):143-155.
 15. James JA, Sayers NM, Drucker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol*. 1999;70(5):518-525.
 16. Raulin LA, McPherson JC, McQuade MJ, Hanson BS. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces *in vitro*. *J Periodontol*. 1988;59(5):318-325.
 17. Barua RS, Ambrose JA, Eales-Reynolds LJ, DeVoe MC, Zervas JG, Saha DC. Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation*, 2001;104(16):1905-1910.
 18. Yanagita M, Kojima Y, Kawahara T, Kajikawa T, Oohara H, Takedachi M, Yamada S, Murakami S. Suppressive effects of nicotine on the cytodifferentiation of murine periodontal ligament cells. *Oral Dis*. 2010;16(8):812-817.
 19. Liu YF, Wu LA, Wang J, Wen LY, Wang XJ. Micro-computerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature- and nicotine-induced experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2010;45(6):714-719.
 20. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013;394(1-2):49-54.
 21. Nogueira-Filho GR, Fróes Neto EB, Casati MZ, Reis SR, Tunes RS, Tunes UR, Sallum EA, Nociti FH, Sallum AW. Nicotine effects on alveolar bone changes induced by occlusal trauma: a histometric study in rats. *J Periodontol*. 2004;75(3):348-352.
 22. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(18):7260-7264.
 23. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E,

- Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(7):3597-3602.
24. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(7):3540-3545.
 25. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003;423(6937):337-342.
 26. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006;12(1):17-25.
 27. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2008;35(2):89-105.
 28. Wilensky A, Polak D, Houry-Haddad Y, Shapira L. The role of RgpA in the pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* in the murine periodontitis model. *J Clin Periodontol*. 2013;40(10):924-932.
 29. Lam RS, O'Brien-Simpson NM, Lenzo JC, Holden JA, Brammar GC, Walsh KA, McNaughtan JE, Rowler DK, Van Rooijen N, Reynolds EC. Macrophage depletion abates *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone resorption in mice. *J Immunol*. 2014;193(5):2349-2362.
 30. Jiao Y, Darzi Y, Tawaratsumida K, Marchesan JT, Hasegawa M, Moon H, Chen GY, Núñez G, Giannobile WV, Raes J, Inohara N. Induction of bone loss by pathobiont-mediated Nod1 signaling in the oral cavity. *Cell Host Microbe*. 2013;13(5):595-601.
 31. Gaworski CL, Lemus-Olalde R, Carmines EL. Toxicological evaluation of potassium sorbate added to cigarette tobacco. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(1):339-351.
 32. Lopez M, Simpson D, White N, Randall C. Age- and sex-related differences in alcohol and nicotine effects in C57BL/6J mice. *Addict Biol*. 2003;8(4):419-427.

33. Nogueira-Filho GaR, Rosa BT, César-Neto JB, Tunes RS, Tunes UaR. Low- and high-yield cigarette smoke inhalation potentiates bone loss during ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78(4):730-735.
34. Breivik T, Gundersen Y, Gjermo P, von Hörsten S, Opstad PK. Nicotinic acetylcholine receptor activation mediates nicotine-induced enhancement of experimental periodontitis. *J Periodontal Res*. 2009;44(3):297-304.
35. Nociti FH, Nogueira-Filho GR, Primo MT, Machado MA, Tramontina VA, Barros SP, Sallum EA. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol*. 2000;71(9):1460-1464.
36. Yoon V, Maalouf NM, Sakhaee K. The effects of smoking on bone metabolism. *Osteoporos Int*. 2012;23(8):2081-2092.
37. Haber J, Kent RL. Cigarette smoking in a periodontal practice. *J Periodontol*. 1992;63(2):100-106.
38. Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R, Marcantonio RA. Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol*. 2006;77(9):1483-1490.
39. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 2001;28(5):377-388.
40. Tanaka H, Tanabe N, Kawato T, Nakai K, Kariya T, Matsumoto S, Zhao N, Motohashi M, Maeno M. Nicotine affects bone resorption and suppresses the expression of cathepsin K, MMP-9 and vacuolar-type H(+)-ATPase d2 and actin organization in osteoclasts. *PLoS One*, 2013;8(3):e59402.
41. Geng Y, Savage SM, Razani-Boroujerdi S, Sopori ML. Effects of nicotine on the immune response. II. Chronic nicotine treatment induces T cell anergy. *J Immunol*. 1996;156(7):2384-2390.
42. Skok M, Grailhe R, Changeux JP. Nicotinic receptors regulate B lymphocyte activation and immune response. *Eur J Pharmacol*. 2005;517(3):246-251.
43. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic

- acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 2003;421(6921):384-388.
44. Nouri-Shirazi M, Guinet E. Evidence for the immunosuppressive role of nicotine on human dendritic cell functions. *Immunology*, 2003;109(3):365-373.
 45. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(1):49-60.
 46. de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2005;6(8):844-851.
 47. Maldifassi MC, Atienza G, Arnalich F, López-Collazo E, Cedillo JL, Martín-Sánchez C, Bordas A, Renart J, Montiel C. A new IRAK-M-mediated mechanism implicated in the anti-inflammatory effect of nicotine via $\alpha 7$ nicotinic receptors in human macrophages. *PLoS One*, 2014;9(9):e108397.
 48. Roman J, Ritzenthaler JD, Gil-Acosta A, Rivera HN, Roser-Page S. Nicotine and fibronectin expression in lung fibroblasts: implications for tobacco-related lung tissue remodeling. *FASEB J*. 2004;18(12):1436-1438.
 49. Lee SK, Chung JH, Choi SC, Auh QS, Lee YM, Lee SI, Kim EC. Sodium hydrogen sulfide inhibits nicotine and lipopolysaccharide-induced osteoclastic differentiation and reversed osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J Cell Biochem*. 2013;114(5):1183-1193.
 50. Wu LZ, Duan DM, Liu YF, Ge X, Zhou ZF, Wang XJ. Nicotine favors osteoclastogenesis in human periodontal ligament cells co-cultured with CD4(+) T cells by upregulating IL-18. *Int J Mol Med*. 2013;31(4):938-942.
 51. Lee HJ, Pi SH, Kim Y, Kim HS, Kim SJ, Kim YS, Lee SK, Kim EC. Effects of nicotine on antioxidant defense enzymes and RANKL expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 2009;80(8):1281-1288.
 52. Wu L, Zhou Y, Zhou Z, Liu Y, Bai Y, Xing X, Wang X. Nicotine induces

- the production of IL-1 β and IL-8 via the $\alpha 7$ nAChR/NF- κ B pathway in human periodontal ligament cells: an *in vitro* study. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34(2):423-431.
53. Han X, Lin X, Yu X, Lin J, Kawai T, LaRosa KB, Taubman MA. *Porphyromonas gingivalis* infection-associated periodontal bone resorption is dependent on receptor activator of NF- κ B ligand. *Infect Immun*. 2013;81(5):1502-1509.
 54. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CW, Izumi Y, Taubman MA. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*. 2006;169(3):987-998.
 55. Baab DA, Oberg PA. The effect of cigarette smoking on gingival blood flow in humans. *J Clin Periodontol*. 1987;14(7):418-424.
 56. Meekin TN, Wilson RF, Scott DA, Ide M, Palmer RM. Laser Doppler flowmeter measurement of relative gingival and forehead skin blood flow in light and heavy smokers during and after smoking. *J Clin Periodontol*. 2000;27(4):236-242.
 57. Lahmouzi J, Simain-Sato F, Defresne MP, De Pauw MC, Heinen E, Grisar T, Legros JJ, Legrand R. Effect of nicotine on rat gingival fibroblasts *in vitro*. *Connect Tissue Res*. 2000;41(1):69-80.
 58. Giannopoulou C, Roehrich N, Mombelli A. Effect of nicotine-treated epithelial cells on the proliferation and collagen production of gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol*. 2001;28(8):769-775.
 59. MacFarlane GD, Herzberg MC, Wolff LF, Hardie NA. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking. *J Periodontol*. 1992;63(11):908-913.
 60. Patel RA, Wilson RF, Patel PA, Palmer RM. The effect of smoking on bone healing: A systematic review. *Bone Joint Res*. 2013;2(6):102-111.