

24. ニコチン曝露によるストレスとクロモグラニンAの関連性についての報告

定岡 直、柳沢 茂、中根 卓、笠原 香、小口 久雄、八上 公利 (松本歯科大学 口腔衛生学講座)

要旨：昨年、本総会にて受動喫煙における環境曝露調査の結果を発表した。その中で非喫煙者が受動喫煙によりストレスを受けている状況を報告した。そこで、自律神経刺激により唾液中に放出されることが明らかになり、また近年、精神的ストレスの新しい指標として注目されているクロモグラニンA (CgA) を用いることで受動喫煙者が受けている精神的なストレスを具体的に数値化して示せるのではないかと考えた。今回、その前段階として市販されているヒト歯根膜繊維芽細胞を用いた、ニコチン処理による細胞レベルでのストレス感受性を測定した。結果としてニコチン処理による細胞はCgAを多く分泌させることが分かった。

キーワード：クロモグラニンA、受動喫煙、歯周病

A. 目的

申請者はこれまでに学会で受動喫煙における環境曝露の研究発表をしており、1) 受動喫煙者の唾液中のコチニン (ニコチン代謝産物) 濃度が上昇すること、2) 高性能粉塵測定器を用いた不完全分煙環境における粉塵量測定から、自覚の無い受動喫煙を引き起こす危険があること、そして、3) 受動喫煙状況に関するアンケートでは、元喫煙者を除く被験者全員がタバコの煙に対して、臭いや自覚の無い受動喫煙に対する健康被害への不安によるストレスを感じていることが明らかとなった。ストレスと全身・局所的疾患との関連性は細胞性免疫が抑制され、歯周組織破壊の亢進を引き起こすと言われており、歯周病もその1つである。これらのことから、受動喫煙による化学的ストレスとしてのタバコが、歯周組織局所において細胞傷害性のストレスを引き起こし、ストレスが歯周病の発症・進行に関与することを明らかにする。

クロモグラニンA (CgA) は、副腎髄質をはじめとした内分泌細胞や神経細胞に広く認められる糖タンパク質である。近年CgAが唾液中に放出されることが明らかになり、精神的ストレスの新しい指標として注目されている。また、自律神経系外である上皮組織にもCgAが局在していることが報告されている。これまでに口腔

分野からは唾液中のCgA測定による、診療時の患者のストレス、口腔乾燥症や高齢者の歯周疾患との関連性が報告されている。そこで硫酸ニコチンを用いた際の口腔内組織への影響の指標として歯根膜繊維芽細胞が細胞外に分泌するCgA量を測定することで、細胞レベルのストレス感受性を測定する。

B. 方法

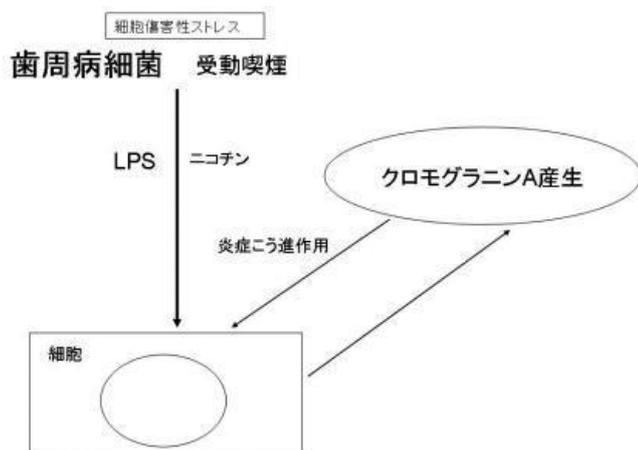
歯根膜線維芽細胞に硫酸ニコチンを作用させることで分泌顆粒に局在するCgAが細胞外に分泌されているのかを検討する。

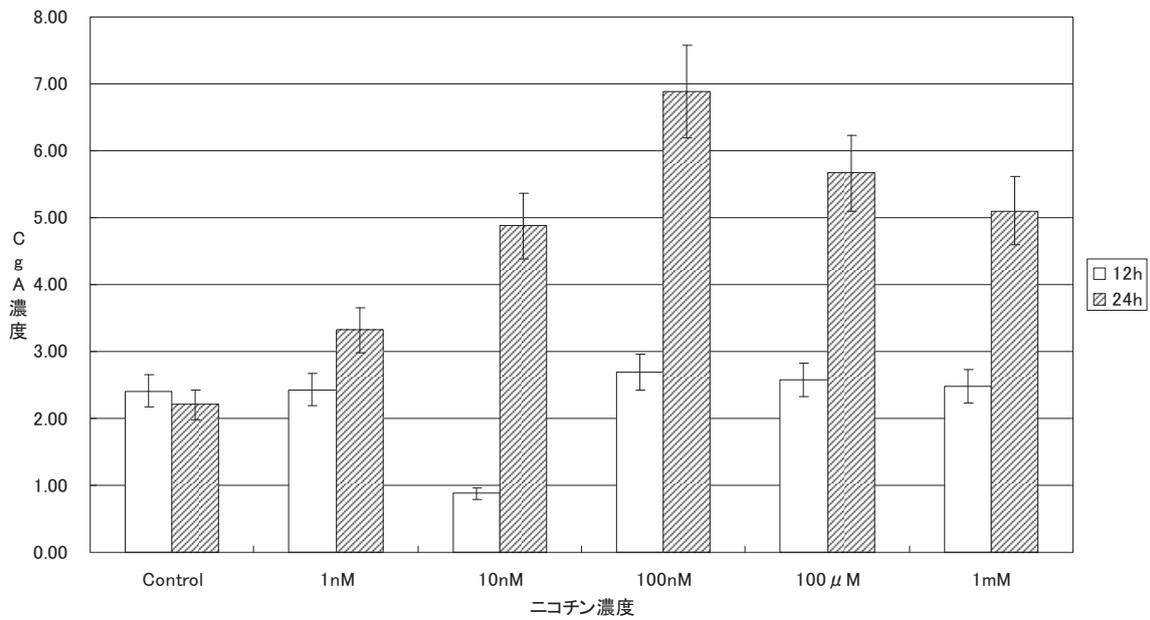
正常ヒト歯根膜線維芽細胞 (Lonza社) をφ100mm細胞培養プレートを用いて、37℃、5.0% CO₂環境下でSub confluentの状態になるまで培養した。その後採取した細胞は12-well Microplateにconfluentの状態になるよう播種し、実験に使用した。

実験は、硫酸ニコチンを1mM、100μM、100nM、10nM、1nM (n=2) で培養液中に添加し、37℃、5.0% CO₂環境下で一定時間培養した。また、Controlとして同時間・同条件で通常の培養液で培養した細胞とその培養液も用意した。終了後、*Human Chromogranin A EIA kit* (矢内原研究所) を用いて培養液中に含まれるCgA濃度を測定した。測定値に対しては、培養細胞のDNA量から割り出した総細胞数により補正した。

C. 結果

対照と比較し、12h培養のCgA値に大きな差は見られない。しかし、24h培養後には高濃度のニコチン培養液ほど、12hと比較した際のCgA値に著しい上昇が認められた。そして100nMでは対照の2倍に増加していた。ニコチンの添加によりDNA量から割り出した細胞数は12hより24hで減少した。





D. 考察とまとめ

100nMの濃度は喫煙者、10nMは受動喫煙者の唾液中のニコチン代謝産物濃度と同等の濃度である。今研究によってニコチン曝露によるCgA産生上昇が確認された。これは、受動喫煙による細胞傷害性ストレスとの関連を示唆すると考える。100nMの硫酸ニコチンで培養された歯根膜芽細胞に著しい値の上昇が見られた理由は引き続いて研究していく必要がある。今後はCgAがサイトカインを含め、歯周組織に対して口腔内組織に対してどのような影響を与えているのかを研究していく考えである。