

図15 禁煙後の歯肉血流量と歯肉溝滲出液の変化 (Morozumi et al, 2004)

の禁煙でも約10%までしか低下しません。このことは、若い年齢のうちに禁煙を始め、禁煙期間が長いほど、歯周病の予防に効果的であるといえます。以上のように、喫煙者への歯周治療により、ある程度の改善はみられますが、非喫煙者に比べると満足した結果を得るのは困難です。したがって、歯周治療やインプラント治療を行う場合には、禁煙をする価値のあることを詳しく説明し、禁煙を奨める必要があります。



禁煙支援と禁煙誘導

健康日本21での歯周病予防の目標に、禁煙、節煙を希望する者に対する禁煙支援プログラムを全ての市町村で受けられるようにすることが挙げられています。このことは、市町村などの行政にまかせておいておくのではなく、歯科医療を担う者に期待されているところも大きいです。なぜならば、歯科診療所には、歯周病をもつ喫煙者が多く通院しており、歯周疾患指導管理が日常的に行われており、医科よりも歯科のほうがより禁煙指導を行う環境が整っているといえるからです。しかしながら、歯科診療所でまだまだ日常的に禁煙指導が行われているわけではありません。それにはいくつかの理由が考えられます。ひとつの大きな理由として、日本では、近いうちにタバコをやめようと思っている人が欧米に比べて少ないといわれています。喫煙者が禁煙に至るステージには無関心期(禁煙することに関心がない)、関心期(禁煙することに関心があるが、1カ月以内に実行する気がない)、準備期(1カ月以内に禁煙しようと思っている)、実行期(禁煙開始2週間以内)、維持期(禁煙後1週間以内、1カ月、3カ月)に分けられ、多くの人は短期的には禁煙に成功しても、何かをきっかけに喫

比して、臨床アタッチメントレベルの獲得やその部位率はいずれも有意に低い値を示しました。図13は、基本治療、外科的処置とサポートタイプ歯周治療を行い、7年間長期的にモニターした研究です。いずれの期間でも、重度喫煙者に最も改善がみられず、次に中等度喫煙者でした。しかし、非喫煙者と元喫煙者の間には差がなく、タバコをやめることにより、歯周治療に対する改善度が良くなることを示しています。さらに、インプラント処置でも、喫煙者は非喫煙者に比べて、成功率が低く、合併症も多く、種々の不快症状が多くみられます。図14の研究は、インプラントの成功率が、非喫煙者では喫煙者より7倍近く高いことを示しています。そして、インプラント処置1週間前より8カ月後まで禁煙を続けることにより、その成功率は

非喫煙者のインプラント成功率とあまり変わらないくらい高くなりました。禁煙すると、図15に示すように、週単位でかなり短期間のうちに歯肉血流量や歯肉溝滲出液量が非喫煙者のレベルまで上昇し回復します。しかし、歯周病に対する喫煙のリスクを低下させるにはもう少し年月を要します。NHANESⅢのデータ解析(図16)では、禁煙期間が長くなるにしたがい、アタッチメントロスと歯周ポケットに対するリスクが低下し、0~2年の禁煙者のオッズ比が3.22であったのが、11年以上禁煙すると、そのオッズ比は1.15まで下がり、非喫煙者と同じレベルになると報告しています。また、20~49歳と50歳以上とに分けてみると、集団寄与危険度は、20~49歳では6年以上禁煙すると5%以下になるのに対して、50歳以上では13年以上

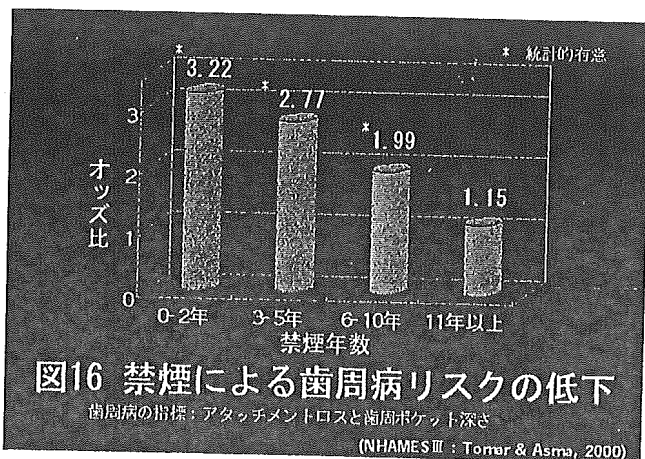


図16 禁煙による歯周病リスクの低下

歯周病の指標: アタッチメントロスと歯周ポケット深さ (NHANESⅢ: Tomar & Asma, 2000)

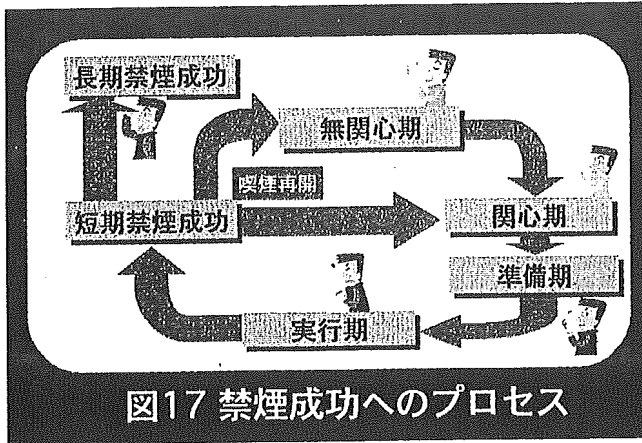


図17 禁煙成功へのプロセス

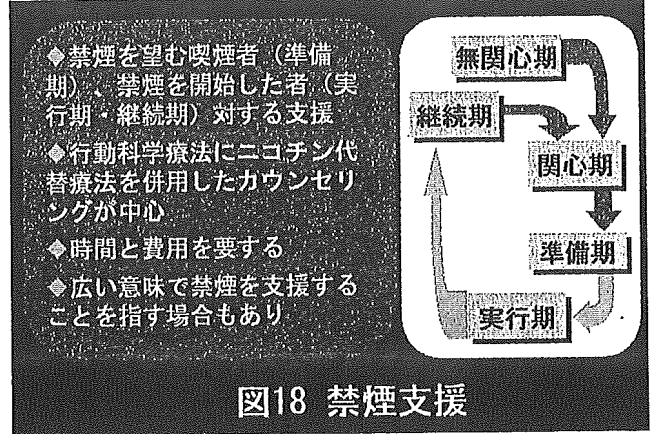


図18 禁煙支援

- ◆禁煙を望む喫煙者（準備期）、禁煙を開始した者（実行期・継続期）に対する支援
- ◆行動科学療法にニコチン代替療法を併用したカウンセリングが中心
- ◆時間と費用を要する
- ◆広い意味で禁煙を支援することを指す場合もあり

煙を再開し、このプロセスを何回か繰り返したのち、長期的に成功するのは、私たちが診療室で調べたところ、準備期の人は喫煙者の約20%ほどで、多くは無関心期か関心期の人々です。禁煙支援は準備期の人を実行期や維持期に至るよう支援するもので、禁煙プロセスの中心ではありますが、主として行動科学療法やニコチン代替療法などのカウンセリングを行うため、時間と費用がかかります（図18）。したがって、対象になる患者さんも少なく、しかも、忙しい診療の合間に禁煙支援の時間がなかなかとれないのが実情だといえます。しかし、最近、名古屋大学大学院医学系研究科の浜島信之先生が提唱されている禁煙誘導が注目されています。禁煙誘導とは、無関心期や関心期の喫煙者を

準備期に誘導する点に重点をおいた禁煙指導の方法のひとつです（図19）。これは、禁煙支援とは異なり、短時間であまり費用もかからず、そして、簡便で、多数の喫煙者が対象となる方法です。禁煙の実行をサポートするのではなく、無関心期や関心期の喫煙者に対して、ビデオやパンフレットを見せたりして、禁煙意欲を高めて禁煙行動を誘発させる方法です。呼気中のCO濃度や唾液中のコチニンを測定し、喫煙の体への影響を示したり、タバコの影響を受けやすい遺伝子型や歯周病が進行しやすい遺伝子型の喫煙者にその情報を知らせることなども禁煙誘導といえます。また、歯科ではタバコの口腔への悪影響について、診療中に患者さんに見せたり話したりする内容は沢山ありますし、日常の診

療の流れの中で、それらのことについて繰り返し話す機会があります（図20）。私たちの禁煙外来で行った禁煙誘導の結果も大変効果的であることがわかりました。

歯科では、保健指導のひとつとして口腔清掃指導がよく行われていますが、動機づけや習慣を変容するという点では共通点も多く、是非多くの歯科医師や歯科衛生士の方々が禁煙誘導に取り組むことをお奨めします。全国の歯科医師や歯科衛生士が禁煙誘導を行えば、それらの積み重ねにより、日本の喫煙率の低下に大きく貢献できることが期待されるからです。

参考文献
 聖石聡、小島美樹：口腔疾患のリスクファクター－喫煙習慣、DENTAL DIAMOND、28（8）：26-31,2003.
 聖石聡、永田英樹：喫煙は歯周病の最大のリスクファクターといえるか、歯周病と全身の健康を考える、財団法人ライオン歯科衛生研究所編、歯歯薬出版（東京）、90-100,2004.

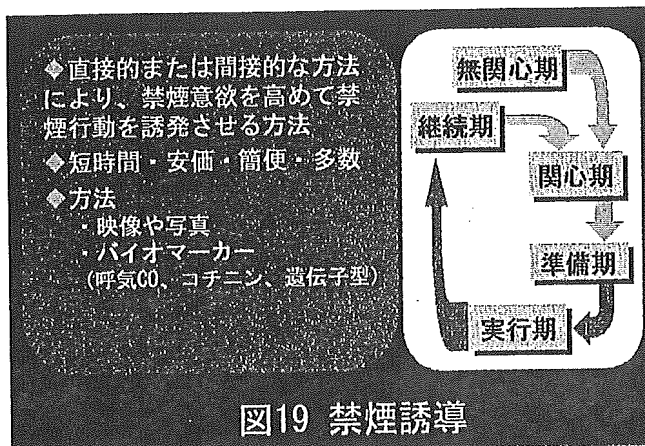
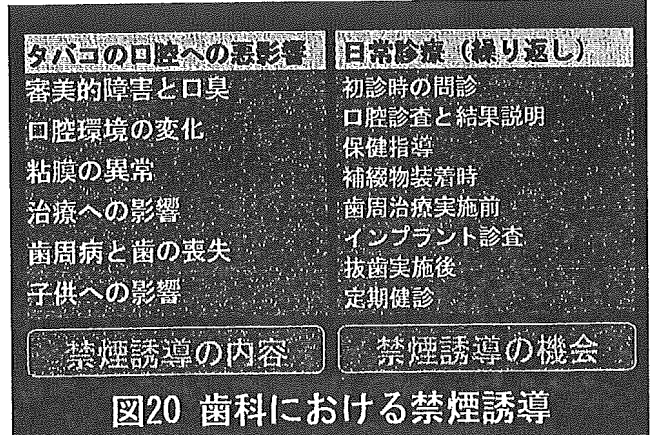


図19 禁煙誘導

- ◆直接的または間接的な方法により、禁煙意欲を高めて禁煙行動を誘発させる方法
- ◆短時間・安価・簡便・多数
- ◆方法
 - ・映像や写真
 - ・バイオマーカー（呼気CO、コチニン、遺伝子型）



タバコの口腔への悪影響

- 審美的障害と口臭
- 口腔環境の変化
- 粘膜の異常
- 治療への影響
- 歯周病と歯の喪失
- 子供への影響

日常診療（繰り返し）

- 初診時の問診
- 口腔診査と結果説明
- 保健指導
- 補綴物装着時
- 歯周治療実施前
- インプラント診査
- 抜歯実施後
- 定期健診

禁煙誘導の内容

禁煙誘導の機会

図20 歯科における禁煙誘導

論 説

タバコ規制条約における口腔保健医療の役割*

埴岡 隆 青山 旬** 小島 美樹*** 河端 邦夫[†] 結城 和生^{††}

口腔衛生会誌 55 : 74-82, 2005

(受付:平成16年12月20日/受理:平成17年2月28日)

はじめに

日本政府は2004年6月、WHOによるタバコ^{*1}規制条約(表1,正式名称は「たばこの規制に関する世界保健機関枠組条約」)に世界で19番目に批准した。11月29日に、40カ国目が署名したことで、2005年2月27日に条約が発効することとなった。

日本口腔衛生学会は2002年の大阪の総会で禁煙宣言を採択し、日本口腔外科学会、日本歯周病学会、日本歯科医学会が禁煙に関する宣言行っている。日本口腔衛生学会では、禁煙推進委員会を中心に「財務省タバコ箱警告表示への意見」「ガムタバコへの対応申し入れ」「9学会合同禁煙ガイドライン作成」など対外活動を行っており、2004年総会では「禁煙行動宣言—たばこのない世界を目指して行動を」が採択された。そして、禁煙推進委員会の働きかけで「口腔保健医療におけるタバコ対策—これからの日本口腔衛生学会の役割」と題したシンポジウムが開催され、地域・日本・世界の「口腔保健医療におけるタバコ対策」を振り返り、今後のタバコ対策を実効性の高いものとするための本学会の役割が提示された。本稿では、シンポジウムの内容などをとりまとめ、学会員がタバコ規制条約と口腔保健医療とのかかわりを理解し、新しい行動宣言に基づいたタバコ対策の推進を考える一助となれば幸いである。

タバコ規制条約発効の経緯

タバコ規制条約の批准により、日本政府内には「タバコ規制条約の内容を踏まえて関係省庁の密接な連携の下にタバコ対策を促進するため(外務省ホームページ)」に「たばこ対策関係省庁連絡会議」が設置されている。その事務局が厚生労働省(健康局総務課生活習慣病対策室)に設置されたことは、タバコ行政の転換の到来を象徴していると思われる。これまで、わが国でタバコに関する最も重要な法律として、「我が国たばこ産業の健全な発展を図り、もつて財政収入の安定的確保及び国民経済の健全な発展に資する(たばこ事業法)」ためのたばこ事業法があり、タバコ産業の発展を擁護する政策が行われてきた。タバコ規制条約は、文字どおりタバコを規制することが目的である。今後は「タバコの消費等が健康に及ぼす悪影響から現在および将来の世代を保護する(外務省ホームページ)」ためのバランスのとれた政策に転換されることとなる。

2004年11月27日には、「たばこ規制枠組み条約発効記念の催し—現在と将来の世代をたばこの害から守るために」が日本医師会館で開催された。この催しでは、厚生・外務に詳しい医系議員である武見敬三参議院議員が基調講演を行い、市民問題に詳しい小宮山洋子衆議院議員が進行を務めた。両議員は、超党派で構成される禁煙推進議員連盟に所属している。議員連盟には、タバコ規制条約発効後の国内法の整備や議定書の策定に関する政

* 第53回日本口腔衛生学会・総会(平成16年9月19日、盛岡市)において禁煙推進委員会(委員長:平石 聡)が企画したシンポジウムB「口腔保健医療におけるタバコ対策—これからの日本口腔衛生学会の役割」の発表を要約し、最新的话题を追加した。

福岡歯科大学口腔保健学講座口腔健康科学分野

** 栃木県立衛生福祉大学校歯科技術学部

*** 大阪大学大学院歯学研究科予防歯科学教室

[†] 広島県福祉保健部健康増進・歯科保健室

^{††} 山形市開業、山形県喫煙問題研究会

^{*1} 日本では、Tobaccoの日本語表記として、植物の場合に「タバコ」、製品は「たばこ」の使い分けが慣行として用いられてきた。しかし、Tobaccoは外来語であり、この論説では、公文書に記載される場合を除き、「タバコ」と表記する。たとえば、ガムたばこではなく、ガムタバコと表記する。

表1 たばこの規制に関する世界保健機関枠組条約の目的と基本原則 (外務省訳概要)

<p>(目的)</p> <p>この条約及び議定書は、たばこの使用及びたばこの煙にさらされることの広がりを継続的かつ実質的に減少させるため、締約国が自国において並びに地域的及び国際的に実施するたばこの規制のための措置についての枠組みを提供することにより、たばこの消費及びたばこの煙にさらされることが健康、社会、環境及び経済に及ぼす破壊的な影響から現在及び将来の世代を保護することを目的とする。</p>
<p>(基本原則)</p> <p>この条約及び議定書の目的を達成し及びその規定を実施するため、特に次に掲げる原則を指針とする。</p> <p>(1) すべての者は、たばこの消費及びたばこの煙にさらされることがもたらす健康への影響、習慣性及び死亡の脅威について知らされるべきである。</p> <p>(2) たばこの煙にさらされることからすべての者を保護するための措置をとる必要性、たばこ製品の使用の開始を防止し、その使用の中止を促進し及び支援し並びにその消費を減少させるための措置をとる必要性、性差に応じた危険性に対応するための措置をとる必要性等を考慮した強い政治的な決意が必要である。</p> <p>(3) たばこ製品の消費を減少させるための多くの部門における包括的な措置及び対応は、たばこの消費及びたばこの煙にさらされることにより疾病並びに早産による障害及び死亡が発生することを公衆衛生の原則に従って予防するために不可欠である。</p> <p>(4) 市民社会の参加は、この条約及び議定書の目的の達成に不可欠である。</p>

府への働きかけが期待されている。この働きかけには、市民団体の意見や学会などの提言が後押しをする。この催しでは、外務省・厚生労働省・文部科学省・警察庁の各担当官が、条約の意義と未成年者喫煙の現状と課題について、さらに、学術団体・保健医療団体・市民団体の代表者が講演した。タバコ規制条約に記されている民・官・学が一体となったタバコ規制運動の展開のはじまりを象徴した集いであり、歯科からは日本歯科医師会が主催団体として今後の活動についてのプレゼンテーションを行い、日本歯科医学会は後援団体となった。こうした条約批准の経緯を知ることは、日本口腔衛生学会などが行っているタバコ対策に関連した政策提言の理解に役立つであろう。

タバコ規制条約の概要と喫煙・禁煙の状況の変化

タバコ規制条約は保健分野における初めての多数国間国際条約である。この条約は、WHOの下でタバコ生産国や消費国あるいは日本など生産国・消費国の両者の特徴を備えた国など、さまざまな立場にある政府間による交渉を経て策定された。この条約は、発効により締約国が国内外で実施すべき規制の枠組みを提供することになる。次の段階として、より内容の濃いタバコ規制を規定するための議定書が策定される。

タバコ規制条約は11部より構成されており38の条文からなっている。このうち、条約の実効性を規定する核心部分は、一般的義務(第2部、第5条)、タバコの需要の減少に関する措置(第3部、第6～14条)、タバコの供

給の減少に関する措置(第4部、第15～17条)と思われる(表2)。とりわけ、タバコ産業重視の日本のタバコ対策からの転換という点で重要だと思われる点は、第5条に締約国が行う一般的義務として記されている、中央の調整機関の確立とタバコ産業の商業上の利益に対立する政策の擁護が挙げられる。

需要の減少措置では、まず、第6条で価格措置を謳い、特に年少者の消費の減少に効果的な措置の認識が記されている。第8条では、受動喫煙からの保護が述べられており、健康増進法の受動喫煙防止はこの条文を前提に策定されたと思われる。第9、10条は、タバコ含有物の規制と開示、第11条には包装とラベルが取り上げられた。有害性が低いという誤解を与えるライトなどの文言は原則禁止され、包装には健康に有害であることの警告表示が義務づけられた。第12条には、タバコ規制に関する問題の啓発の促進と強化が謳われており、保健医療関係者に関係が深い。第13条では、すべてのタバコ広告、販売促進および後援を包括的に禁止または厳しく制限することを謳っている。第14条は保健医療関係者に最も関連する条文で、タバコ依存の診断、カウンセリング、予防および治療のためのプログラムを立案・実施し、カウンセリングサービスを含めるとされる。第4部のタバコ供給の減少措置では、第16条に未成年者へのタバコ製品の販売を禁止するための措置について述べられ、特に、景品や自動販売機について具体的に触れられている。

このような包括的内容の条約発効に備えて、日本においてもいくつかの変化がみられた。外務省の説明では、

表2 タバコ規制条約に記される主な措置と条項

条項	措置の内容	
第三部 たばこの需要の減少に関する措置	第六条 たばこの需要を減少させるための価格及び課税に関する措置	
	第七条 たばこの需要を減少させるための価格に関する措置以外の措置	
	第八条 たばこの煙にさらされることからの保護	
	第九条 たばこ製品の含有物に関する規制	
	第十条 たばこ製品についての情報の開示に関する規制	
	第十一条 たばこ製品の包装及びラベル	
	第十二条 教育、情報の伝達、訓練及び啓発	
	第十三条 たばこの広告、販売促進及び後援	
	第十四条 たばこへの依存及びたばこの使用の中止についてのたばこの需要の減少に関する措置	
	第四部 たばこの供給の減少に関する措置	第十五条 たばこ製品の不法な取引
		第十六条 未成年者への及び未成年者による販売
		第十七条 経済的に実行可能な代替の活動に対する支援の提供

これらの変化は条約を署名・批准する条件としての法整備によるものである。2003年5月には、厚生労働省所管の健康増進法第25条に受動喫煙防止が謳われ、官公庁・学校・病院はもとより、公共の場や職場の禁煙が急速に広がりつつある。しかし、不完全分煙や家庭内での受動喫煙などの課題は残っている。また、現状では努力規定であることから、施設管理者が対策を講じなくても罰則はない。しかし、2004年7月には、江戸川区職員が職場の受動喫煙で健康被害を受けたとして損害賠償を求めた訴訟で、東京地裁は区の安全配慮が不十分として支払いを命じる判決が確定した。

たばこ事業法施行規則令36条の改正(財務省令, 2003年11月)では、2005年6月末までに、タバコ製品の外包装に肺がんなどの喫煙関連疾患と妊婦や未成年者に対する注意を含む8種類の文言を各1種ずつ両面の各30%の面積で入れることとなった。従来の文言に比べると進歩しているが、警告ではなく注意であること、絵や写真を用いた他国の表示に比べるとインパクトが弱いなどの指摘がある。また、たばこ事業法第40条および日本たばこ協会の自主基準により、タバコの広告は原則として2004年4月より、電波媒体やインターネット、公共性の高い場所では行わない、後援は成人を対象とした催しに限定することなどの指針が財務省より示された。しかし、販売場所や自動販売機の広告は規制されていない。

タバコ規制の取り組みが遅れていたわが国が、条約の諸対策の実現に向けて今後どのように動くか世界から注目されている。条約の批准はゴールではなく、今後、各省庁・関連組織・諸団体の相互の連携とそれぞれの専門性を生かした取り組みがさらに進められるべきである。

タバコ規制条約実施への口腔保健医療の対応

WHOが作成したタバコ規制枠組み条約の実施に向けたハンドブック¹⁾(図1)の表紙は、タバコ対策に向けて「ブロックを積み重ねる」というスローガンを採用している。右上のシンボルは、禁煙マークに似ているが、よくみると斜線部分はハンマーになっている。人々によるタバコ対策の推進を期待しているとみられる。ひとりが作ったブロック(タバコ対策に活用できる資源)ひとつだけでは、効果はみえてこないが、ブロック(資源)を積み重ねていくことで実効性がみえてくる。口腔保健医療というハンマーで築くことができる可能性のあるブロックの例を示す。

ハンドブックでは各国に「タバコ規制のための国家能力の構築」を求めている。日本で直接タバコを扱う法律は、これまで2つであった。未成年者喫煙禁止法(警察庁所管)は、最近強化されたが実効性は向上していない。たばこ事業法(財務省所管)はタバコ産業の健全な育成を目的としており、政府は日本たばこ産業株式の50%を保有している。2003年には、健康増進法(厚生労働省所管)第25条に受動喫煙防止が盛り込まれた。これまでは、タバコに関する政策の大部分が財務省による経済中心の視点で行われてきたが、今後は冒頭に述べたように「たばこ対策関係省庁連絡会議」に参加する厚生労働省、財務省をはじめ14の省庁等機関の代表者が対策を協議する。したがって、口腔保健医療は以下の理由で、厚生労働省、文部科学省、警察庁を後押しできる可能性は十分にある。日本口腔衛生学会が日本口腔外科学会と共同で財務省に対して意見を表明したガムタバコ問題では、厚

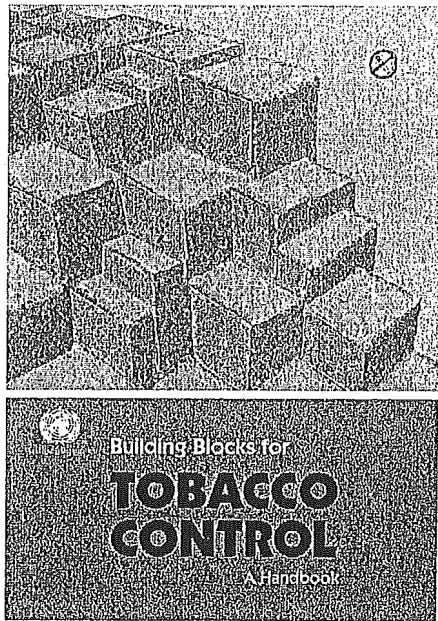


図1 タバコ規制条約の実施に向けてWHOが作成したタバコ対策ハンドブック日本語訳の作業が進められている

生労働省のホームページにタバコに関する健康情報「ガムたばこと健康に関する情報について」が掲示された^{*2}。

警察庁は、自動販売機の設置基準の見直しに関して開催された財務省審議会で、未成年喫煙者の補導と知情販売（未成年者と知りながらタバコを販売する）取締りの実態を説明し、タバコ自動販売機を「大人の利便のための装置」とした^{*3}。学校教育現場では、高校生への防煙教育と喫煙者の懲戒処分が常識だったが、小学生からの防煙教育開始と子どもの喫煙が依存症であるという健康問題の視点から、児童・生徒の禁煙支援が動き出した。口腔の健康を通じて、日常的に子どもの口腔に関心のある学校歯科医によるアプローチは口腔保健の専門家が、養護教諭など学校関係者に対して説明がしやすい。防煙を目的としたタバコ広告規制も条約に示される重要課題である。最近、タバコ広告が子どもの目に触れないように、ビル広告に続いて公共交通機関の規制（財務省指針の提示に基づく自主規制）が実施された。学校では敷地内禁

煙が進んでおり、学校での検診に従事する歯科医療従事者の喫煙（たとえば、子どもから見える場所での検診着を着用しての喫煙）への注意喚起は疾患（う蝕）予防に責任のある立場から重要である。

歯科国際機関は、WHOがタバコ対策を優先課題とした初期の段階からNGOの一員としてWHOのタバコ対策に参画している。IADR, IADE, FDIといった研究・教育・診療の国際歯科機関が早期にタバコ対策活動を始めた。IADRはシンポジウムを3回開催し²⁻⁵、^{*4}、IADEはタバコ教育特集号⁵を掲載した。FDIは禁煙宣言に続いて会員の行動規範を定め、世界医師会、看護師会、薬剤師会と共同歩調をとることとなった^{*4}。日本の口腔保健医療においても、研究・教育・医療の総合的な動きが期待される。

WHOの活動区域である西太平洋地域は、タバコ問題がこれから発展しやすい状況にある。西太平洋地域では男性喫煙者がとりわけ多く、若者と女性の喫煙者が急速に増加している。そして、日本においてようやく喫煙による健康被害が深刻な問題になってきた。日本では、1950年代には年間の肺がん死亡数がわずか1,000人であったものが、現在では5万人を越え、この50年間で50倍に増加した。この傾向は、喫煙が流行した男性で顕著である。そして、2000年における喫煙による超過死亡数は114,000人と推計されている^{*5}。これは総死亡の12%に相当し、この水準は欧米がタバコ対策を開始した1960年代の水準に達しているといわれる⁶。日本ほどタバコ消費が進んでいない西太平洋地域諸国は、これから健康被害が進む⁷。タバコ対策が遅れた日本人の健康被害状況は他国への警告になり、口腔がん⁸や歯周病⁹などにみられる日本人の口腔の健康被害状況を近隣の諸外国に発信することは重要である。大韓歯科医師会では2年前、医師会に先駆けて禁煙宣言を発し、民間の禁煙運動に先鞭をつけた形になった¹⁰。

タバコ問題が進まないのは、喫煙することは自由意志である、という意見がある一方で、多くの喫煙者は自己決定能力が十分に育たない時期に喫煙を開始しているインフォームドチョイスの問題が指摘されている。ところが、行政のタバコ対策は健康や経済などの面からの協議

^{*2} 健康局総務課生活習慣病対策室：ガムたばこと健康に関する情報について、<http://www.mhlw.go.jp/topics/tobacco/jouhou/index.html> (2004年12月1日アクセス)。

^{*3} 財務省財政制度等審議会：たばこ事業等分科会（第8回）議事録平成16年6月28日、<http://www.mof.go.jp/singikai/zaiseseido/top.htm> (2004年12月1日アクセス)。

^{*4} World Health Organization：New code of practice adopted during WHO informal meeting of health professionals、http://www.who.int/tobacco/events/30jan_2004/en/print.html (2004年12月1日アクセス)。

^{*5} Peto R, Lopez AD, Boreham J et al.：Mortality from smoking in developed countries 1950-2000 (2nd ed). <http://www.ctsu.ox.ac.uk/~tobacco> (2005年2月6日アクセス)。

が必要とされ、住民への健康情報の提供や禁煙希望者の禁煙支援に対策が限られている。一方、健康の専門家である医療従事者は、禁煙を勧める立場にある。日本医師会は、受動喫煙防止のCM^{*6}に「タバコをやめましょう」と、禁煙希望の有無にかかわらず健康面を基準にして、禁煙を勧める意見広告を行っている。医師と同様に健康に携わる職種の一員として口腔保健医療従事者は、患者や住民に禁煙を勧める立場にあると思われる。

健康日本21では、タバコと歯の健康の両部門でタバコ対策が謳われている。しかし、実際のところ市町村や都道府県における歯に関連したタバコ対策の実施状況はわかっていない。歯の健康は、歯の喪失に伴うQOLの低下防止が目標であるが、健康日本21は、早世と障害の防止のための危険状態低減や生活習慣改善が手段である。喫煙は歯周病の原因であることが、システマチックレビューを基本とする米国公衆衛生総監報告書で初めて示された¹¹。また、歯周病と全身性の疾患や症状との関連性も示され始めている。口腔保健医療によるタバコ対策の意義は、危険状態である歯周病を減少させることにより、歯の喪失防止によるQOL低下の阻止、すなわち、歯の健康の面と歯周病が関連する全身性疾患や症状の低減による早世と障害の防止の両面で直接的に貢献できると思われる。さらに、これは最も重要なことだと思われるが、口腔保健医療は、禁煙者の増加によるタバコ消費の減少を通じて、間接的に早世と障害に直結する肺がん、循環器疾患などの全身性の喫煙関連疾患の減少に貢献できる。

肺がん、循環器疾患など喫煙の自分自身への健康影響を喫煙者自身が直接見ることができるとは少ないが、口腔の影響は直接見える。米国では、1960年代から喫煙と飲酒をする者に、家庭での口腔癌のセルフチェックを勧めている。そして、喫煙は口腔保健医療が対象とする疾患や症状、審美性、治療効果と関係していることから、歯科医療のさまざまな場面で喫煙者にアプローチをすることができる。さらに、歯科受診者は喫煙の全身影響がまだ現れない若年者が多く、したがって、禁煙による健康回復への効果は高い。タバコ規制条約ではタバコの箱の警告表示に箱面積の30%の以上を用いることが義務づけられ、警告を画像で行うことが推奨されている。カナダでは口腔の画像が若者と女性に効果的であることが示され、以後、多くの国で口腔画像が採用されはじめた^{*7}。

以上、概略ではあるが、タバコ規制条約の発効に伴うタバコ対策の本格的実施に際して、日本の口腔保健医療

が積みあげることができる可能性のあるブロックを例示した。「タバコの消費及びタバコの煙にさらされることが健康、社会、環境及び経済に及ぼす破壊的な影響から現在及び将来の世代を保護する」ことに口腔保健医療の存在意義は大きく、口腔保健医療がタバコ対策に加わることにより、タバコ対策を実行する際に利用できる国家能力への寄与は大きい。

歯科医療の場における介入

Prochaskaらは「喫煙する」から「喫煙しない」という行動変容を1つのプロセスとしてとらえ、その変容過程を5つのステージ(無関心期、関心期、準備期、実行期、維持期)に分類した「行動変容のステージモデル」を提唱している¹²。準備期は、今すぐにも禁煙をしたいと考えており、禁煙のきっかけや支援を求めている段階である。1997年の大阪府府民調査¹³では、準備期の喫煙者の割合は3%であり、欧米諸国の10~20%に比べて明らかに少ない。健診や医療機関の受診時は、健康への意識が普段よりも高まっていると考えられるが、医科外来や歯科外来(大阪大学歯学部附属病院口腔保健科)を受診する喫煙者においても、準備期の割合は約20%であった。わが国の現状では、まず禁煙準備段階にいたっていない喫煙者を、準備期・実行期へと誘導する方策が必要である。そして、禁煙を準備・実行した者に対しては、積極的に支援することにより長期の禁煙成功に導かなければならない。

世界における喫煙介入研究のメタアナリシスによると、臨床医がタバコに関する簡単な助言(Brief advice)を行った場合は、何もしない場合に比べて禁煙率が1.3倍¹⁴になり、ニコチン代替療法剤を用いた場合は、用いない場合に比べて1.7倍禁煙しやすかった¹⁵。欧米では、歯科診療における喫煙介入研究も実施されており、簡単な助言やニコチン代替療法の効果が検証されている。英国の病院の歯周病診療室で行われた研究では、治療のみの対照群の1年後禁煙率は5.4%であり、簡単な助言も行った介入群では13.3%であった¹⁶。開業歯科医院54機関が参加した研究では、簡単な助言と必要に応じてニコチン代替療法を追加した方法により、9カ月後の禁煙率は11%であった¹⁷。米国で行われた研究では、歯科医師が喫煙者に簡単な助言だけを行った場合に比べて、ニコチンガムや診療録用喫煙者同定シールを用いた場合のほうが1年後の禁煙率は高かった¹⁸。異なる分野の臨床専門

*6 社団法人日本医師会：禁煙キャンペーンテレビCM「クマの唄」篇，<http://www.med.or.jp/nosmoke/cm.html> (2004年12月1日アクセス)。

*7 Canadian Cancer Society：Evaluation of new warnings on cigarette packages，http://129.33.170.32/ccs/internet/standard/0,3182,3172_334419_436437_langId-en,00.html, 2003。

家が、異なるタイミングと形態で介入を行った場合、単一分野の専門家だけが介入した場合と比べて、禁煙成功率が2.5倍以上高まる¹⁹⁾ことから、歯科において喫煙の介入をすることは意義がある。

禁煙支援は、禁煙を希望する準備期以降の者が対象となり、行動科学療法やニコチン代替療法を併用したカウンセリングが中心であり時間や労力を要するため、日常診療では実施が困難であることから、セルフヘルプ教材の手渡し、禁煙支援サービスや専門外来の紹介のみの場合も多い。一方、禁煙指導は喫煙者全般を対象とし「タバコは体に悪いから喫煙してはいけない」と押しつづ的に指示するだけであったため、特に無関心期の喫煙者には効果を期待することはできなかった。

禁煙誘導は、直接的または間接的に禁煙意欲を高めて禁煙行動を誘発させ、簡便に多数の喫煙者にアプローチする方法をさす。強い被指示性を伴わないことが禁煙指導と異なる。喫煙者全般が対象となるが、無関心期・関心期を準備期・実行期へと、また、喫煙再開者を関心期以降へと誘導することが主となる。禁煙誘導には、米国禁煙治療ガイドラインの「5A」²⁰⁾、映像や写真、呼気中一酸化炭素濃度や遺伝子型などのバイオマーカーが利用される。

禁煙誘導は、日常歯科診療（特に予防歯科診療）にも導入しやすいと考えられる。その理由として、①タバコに関連する口腔への悪影響とそれを話題にできる診療機会が豊富にある（表3）、②口腔保健指導では動機づけや助言が日常的に行われている、③プラーク除去の動機づけの手段として、患者自身の口腔で染色プラークをみせたり、位相差顕微鏡像を示す方法がよく使われている、などが挙げられる。歯科診療では、禁煙支援と禁煙誘導を診療室の状況に応じて組み合わせながら実施することが推奨される。そして、タバコ規制条約で示されるような禁煙治療の制度に歯科における介入が組み込まれるためには、歯科臨床における介入効果が実証される必要がある。

保健医療従事者が3分間の短い禁煙の助言をすることによって、6カ月以上の禁煙率は2%増加し、ニコチン代替療法を追加すると6%増加するとされる²¹⁾。わずかな増加ではあるが、全国の歯科診療施設を受診する喫煙者に日常的な介入が行われれば、大きなインパクトが得られる。口腔保健医療従事者の一人ひとりが、歯科診療所のみならず病院歯科や健診の場など喫煙者に接するさまざまな場面で、禁煙誘導や禁煙支援を積み重ねることは、

表3 歯科患者への禁煙誘導の内容と機会

(内容)	(機会)
口腔および治療への喫煙の悪影響の会話	日常診療の機会をとらえて繰り返し行う
審美的障害	初診時の問診
口臭	口腔診査の結果説明
口腔環境の変化	保健指導・疾患管理指導
粘膜の異常	補綴物装着時の管理指導
治療への影響	歯周治療実施前の説明
歯周病	インプラント予後の説明
歯の喪失	抜歯の術後の注意
将来の世代への影響	定期健診の経過説明

ほかのタバコ対策と連動して禁煙実行者を増加させることにつながると考えられる。ひいては、口腔疾患や歯の喪失を減少させることに貢献するだけでなく、タバコによる全身の健康被害を食い止めることになる。

地域における禁煙活動への歯科医師の参加

タバコ規制条約の基本原則の説明（表1）の4番目には、「市民社会の参加は、この条約及び議定書の目的の達成に不可欠である」とある。ここでは、組織として喫煙問題に取り組む以前から、喫煙問題に関心のある個人が自主的に問題に取り組み、その活動に複数の歯科医師が発起人となり、積極的な活動を続け重要な役割をはたしている事例を紹介する。

山形県では、男性の平均喫煙率が全国平均よりも高く²²⁾、がん・脳卒中・心臓病に代表される生活習慣病による死亡が常に全国のワースト10以内にランクされる現状²³⁾がある。そこで、今後喫煙対策の推進はますます重要となるであろうと考え、喫煙に関するさまざまな問題を解決すべく、研究会が発足した。

山形県喫煙問題研究会²⁴⁾の目的は、山形県における喫煙の問題点を明らかにし、山形県民の健康増進のため禁煙の啓発を行い、喫煙対策や防煙教育を推進することにある。また、これらの目的を達成するため、①喫煙問題に関する調査研究、②喫煙防止教育を推進するための事業、③会員相互の親睦を図るための事業、の諸活動を行っている。

山形県内で喫煙問題に関心を持ち、かつ本会の趣旨に賛同する者が会員となり、全国禁煙教育研究会開催、青少年の喫煙問題への対応、禁煙指導研修会・公開シンポ

¹⁹⁾ 山形県健康福祉部保健業務課：山形県の喫煙の現状(平成11年)，<http://www.pref.yamagata.jp/kf/hoken/688700/kituennogenjou%202.pdf> (2004年12月1日アクセス)。

²⁰⁾ 山形県健康福祉部保健業務課：主な死因の死亡数・死亡率都道府県別順位(平成14年)，<http://www.pref.yamagata.jp/kf/hoken/344800/2004yamagata%20no%20seikatusyuukanbyou4.pdf> (2004年12月1日アクセス)。

ジウム開催などの活動と行ってきた。副会長である山形大学教授をはじめ、世話人 11 名のうち 4 名が歯科医師である。医科も歯科も同じ目線で喫煙問題に日常的に取り組んでいる。

会の構成は、医師、歯科医師、薬剤師、保健師、助産師、看護師、養護教諭、警察官、行政職員、一般市民と幅広い職種の集まりになっていて、メーリングリストなどでの情報交換も盛んになってきた。学校での防煙授業に使用する教材づくりのための教育グループ、学校・団体・企業などの講演や臨床相談を企画担当する禁煙支援グループ、各施設における積極的な禁煙を推進するための健康増進法グループ、それぞれの班が役割分担して活動を行った。また、県医師会への働きかけから禁煙推進委員会が設置されて、2003 年 10 月には医師会・歯科医師会・薬剤師会・看護協会で四師会禁煙推進委員会を立ち上げ、積極的な活動が始まった。

広島県の歯科からの禁煙支援対策と 職種組織間連携

次にタバコ規制条約の基本原則である市民社会の参加に関連して、歯科医師会が積極的に活動に参画し、医療組織間の活動の連携を行政が仲介した事例を紹介する。

広島県では、2001 年度から歯科からの禁煙支援対策に取り組んでいる。まず、「歯科からの禁煙支援プログラム構築事業」を実施し、口腔状況と喫煙などとの関連を調査した。広島県で実際に禁煙支援を進めていくうえで、広島県の情報が必要であったからである。調査対象は県内の事業所従業員 819 名で、口腔状況調査と質問紙調査を 2001 年 9 月に行った。

事業所男性の喫煙の状況は、50% が喫煙者、30% が非喫煙者、20% が禁煙者（過去にタバコを吸っていたがやめた人）であり、年代別にみると 35 から 44 歳で喫煙者の割合は高かった。喫煙と歯周病との関係では、喫煙者で進行した歯周病に罹患している者の割合が高く、喫煙者・非喫煙者・禁煙者の間で有意差が認められた。ニコチン依存度が低い者は 10% 程度と少なく、禁煙のステージは 55 歳以上の年代を除くと、どの年代も 30% ほどが未企画期であり、全体で 67% に禁煙の意志が認められた。これらの調査結果から、歯科診療所を受診する喫煙者の 67% に積極的な禁煙支援のアプローチが必要であると考えられた。これらの割合から広島県における歯科受診者に占める喫煙者数を推計し、全体の喫煙者数をもとに計算すると、歯科診療所において効果的な禁煙支援

が期待できる企画期および準備期の者が禁煙に成功した場合、喫煙率が最大 10% 低下する可能性が示された。このことから、かかりつけ歯科医である地域の歯科保健医療従事者は、口腔保健医療の観点から喫煙対策の役割を担う必要があると考え、次年度以降、①禁煙支援もできる歯科診療所のイメージアップ、②地域の歯科医師の喫煙と禁煙支援に対する意識と意欲の調査、③かかりつけ歯科医を対象とした禁煙支援に関する研修、④歯科だけで完結することではないので、他職種との連携づくりの観点から、禁煙の専門家に紹介できる連携システムの構築、⑤歯科診療所における禁煙支援の効果の確認と禁煙支援マニュアルの作成、といった 5 つの対策について優先順位をつけ、できることから行った。

2002 年度は、「歯科医師の喫煙と禁煙支援に関するアンケート調査」を県歯科医師会会員 1,536 名に行った（図 2）。回収率は 42.6% (655 名) で喫煙者が回答しなかった可能性が考えられた。喫煙状況は、20% が喫煙者、50% が禁煙者、30% が非喫煙者であり、年代があがるに従い、喫煙者の割合は低下した。禁煙に関する考えでは、禁煙支援を「全ての喫煙者にすすめる」が 40%、「療養上必要な人のみ」が 30%、「介入すべきではない」が 20% だった。歯科診療所における禁煙支援に関する考えは、「積極的に取り組む」と「希望する患者のみ」がいずれも 30%、「情報提供のみ」が 40% であった。

さらに、歯科からの禁煙支援ができる体制を整えるため、禁煙支援指導ができる歯科医師および歯科衛生士を養成する「禁煙支援指導歯科医等養成事業」を実施した。歯科医師コースは、連続 2 日間の研修を行い、次いで、歯科医師コースを受講した歯科診療所に所属する歯科衛生士に対し 2 日間の研修を行った。研修会を受講した 55 の歯科医療機関を禁煙支援指導歯科医療機関として認定し、認定ステッカーが診療所内に掲示され、県歯科医師会ホームページから住民がアクセスできるようになっている。また、下敷きに禁煙支援指導内容を記したマニュアルを作成し、歯科医師が診療室の机に置いていつでもみることができるようにした。

2003 年度は、これまでの事業結果を踏まえ、他職種などとの連携に主眼をおいた「歯科診療所における禁煙支援指導モデル事業」を実施した。1 つの地区歯科医師会をターゲットにして、モデル事業 5 カ月間の対象者 62 名のうち、禁煙達成者は 22 名で、禁煙成功率は 35% であった。この事業では、ニコチン製剤の処方が必要な場合に医科への紹介を行う連携を重視した事業であったが、医

*10 山形県喫煙問題研究会：<http://www.y-smokefree.com/> (2004 年 12 月 1 日アクセス)。

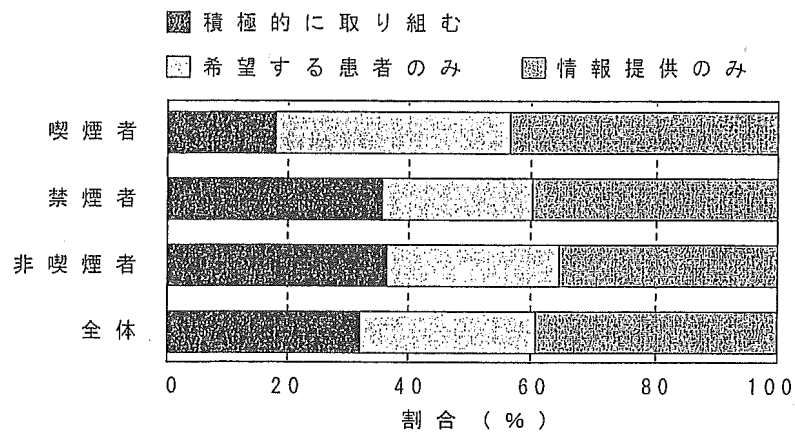


図2 歯科診療所における禁煙支援に関する考え（歯科医師の喫煙歴別）

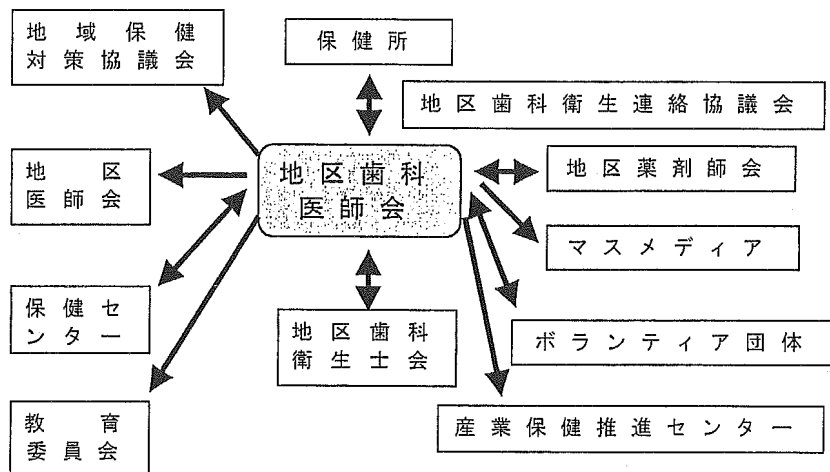


図3 歯科からの禁煙支援における連携のイメージ

科への紹介がなかなかうまくいかなかったり、薬局との連携も難しかったりするなど、医療機関連携に関して多くの課題が浮き彫りとなった。

このモデル事業の実施に際して、まず、歯科からの連携のイメージ(図3)づくりを行った。イメージでは、禁煙支援指導歯科医(研修により養成された歯科医師)だけでは全てに対応できないので、禁煙支援協力歯科医を募った。広島県では、医科には禁煙クリニック、薬剤師会には薬剤師禁煙支援アドバイザーが設置されている。このようなほかの医療従事者との連携に重点をおいた取り組みは、今回十分機能しなかったため、今後さらに検討する必要がある。また、医師会、歯科医師会、薬剤師会の連携をさらに発展・強化させていくという観点から、企業、教育委員会、市町村、ボランティア団体などとの連携も考えていく必要があると思われる。

広島県で歯科における禁煙支援が円滑に実施できた理

由として、2002年7月に県歯科衛生連絡協議会(県、県歯科医師会、県教育委員会、広島市、広島大学で構成)の中に、「禁煙支援推進協議会」が設置されたことは重要である。協議会では、これまで述べた事業の評価・運営を行っている。また、広島県には、医師会、歯科医師会、薬剤師会、看護協会、環境保健協会、行政、企業などから構成された「広島県禁煙支援ネットワーク」がある。これは、健康日本21の地方計画の中の禁煙対策を積極的に推進するため、2002年8月に設立された組織で、未成年者喫煙率と妊産婦喫煙率0%を達成することを目標としている。歯科からの禁煙支援に取り組んでいくうえで、このネットワークの存在は非常に大きい。

今後、歯科からの禁煙支援をより一層推進していくためには、禁煙支援を行う歯科医療機関の拡大、医科や薬局などとの連携の強化、喫煙者に対する環境整備と情報提供、歯科医療機関でのニコチン製剤の処方制限の緩和

などが必要であろうと考えられる。

まとめ

2004 度中にタバコ規制条約が発効する。そして、翌年度には厚生労働省においてタバコ対策担当者の増員が要求されている。山形県の取り組みや、広島県の組織間の取り組みにみられるように、歯科を含む保健医療従事者間の連携を円滑に図ることが、タバコ規制条約を実効性のあるものにするために重要であることがみえてきた。

歯科は今、全身の健康づくりに口腔の健康が重要であることを住民・社会に向けて発信しはじめた。一方、タバコ対策の先進的な取り組み事例では、口腔の専門家と全身の専門家間の連携が重視されること、さらに、タバコ規制条約では市民団体との協調した対策推進も謳われている。したがって、タバコ対策は、口腔保健医療従事者自身が、現在まで培われてきた口腔の健康と全身の健康の視点の共有化と健康の専門家としての認識を、行動として目にみえる形で実践できる新しい機会になるかもしれない。そのためには、タバコ対策のブロックを積み上げる行動を始めようという認識を、口腔保健医療従事者ひとり一人が形成していくことが、行動の最初のステップとなるに違いない。

緊急の問題がひとつ増えた。2003 年秋にガムタバコが世界で初めて首都圏で発売されたが、関係者の迅速な抗議活動により拡大は一旦防止された。しかし、2004 年 12 月に東京都内でキャンペーンが再開された。配布サンプルには「かみたばこの使用は、あなたにとって口腔がんの原因の 1 つとなり、心筋梗塞・脳卒中の危険性を高めます」と新しい注意文言が採用された。ところが「成分はすべて日本の食品衛生法でその使用が認められた成分です」「虫歯の原因になりにくい甘味料(キシリトール)を使用しています」なども記載された。口腔がんの原因となるものに「う蝕の原因になりにくい」と併記してよいものか、口腔の専門家は問題とする必要がある。

文 献

- 1) World Health Organization, WHO Tobacco Free Initiative, Noncommunicable Diseases and Mental Health Cluster: Building blocks for tobacco control: A handbook. (Tools for advancing tobacco control in the 21st century). Publications of the World Health Organization, Geneva, 2004, p 1-289.
- 2) Tomar SL, Hanioka T, Wickholm S et al.: Tobacco use and oral health effects in different world populations. J Dent Res (Abstr. #165), 2001.
- 3) Burns D, Hatsukami D, Gelskey S et al.: Tobacco use, prevention and cessation. J Dent Res (Abstr. #4141), 2002.
- 4) Kaufman N, Connolly G, Gupta PK et al.: The impact of policies on tobacco use: An international perspective. J Dent Res

(Abstr. #690) 2003.

- 5) The American Dental Education Association: Tobacco and oral disease: Strategies for dental professional interventions. J Dent Educ 65: 301-384, 2001.
- 6) 中村正和: 禁煙治療の制度化の必要性と欧米の動向. 公衆衛生 68: 948-952, 2004.
- 7) 尾身 茂: Tobacco Free Japan 「ニッポンのたばこ政策への提言」の発刊によせて, 監修: 望月友美子, Tobacco Free Japan 「ニッポンのたばこ政策への提言」. 東京, インクス, 2004, 4-5 頁.
- 8) 古賀敏比古: 6. その他の口腔疾患とその予防 3) 口腔腫瘍, 宮武光吉, 末高武彦, 渡邊達夫ほか編, 口腔保健学第 2 版. 医歯薬出版, 東京, 2002, 181-182 頁.
- 9) Shizukuishi S, Hayashi N, Tamagawa H et al.: Lifestyle and periodontal health status of Japanese factory workers. Ann Periodontol 3: 303-311, 1998.
- 10) Korean Association of Smoking and Health: 12. Anti-smoking activities of medical doctors and dentists. In: Tobacco control policy and anti-smoking activities in Korea. Seoul, 2004, p 24-25.
- 11) USDHHS: Periodontitis. In: The health consequences of smoking: A report of the surgeon general. USDHHS, Washington DC, 2004, p 732-736.
- 12) DiClemente CC, Prochaska JO, Fairhurst SK et al.: The process of smoking cessation: An analysis of precontemplation, contemplation and preparation stages of change. J Consult Clin Psychol 59: 295-304, 1991.
- 13) いきいき府民健康づくり推進委員会: 健康おおさか 21, 大阪, 2001, 28 頁.
- 14) Fiore M C, Bailey WC, Cohen SJ et al.: Treating tobacco use and dependence: Clinical practice guideline. US Department of Health and Human Services, Rockville, MD, 2000, p 56-57.
- 15) Lancaster T, Stead L, Silagy C et al.: Effectiveness of interventions to help people stop smoking: Findings from the Cochrane Library. BMJ 321: 351-358, 2000.
- 16) Macgregor IDM: Efficacy of dental health advice as an aid to reducing cigarette smoking. Br Dent J 1996; 180: 292-296.
- 17) Smith SE, Warnalulaluriya KAAS, Feyerabend C et al.: A smoking cessation program conducted through dental practices in the UK. Br Dent J 185: 299-303, 1998.
- 18) Cohen SJ, Stookey GK, Katz BP et al.: Helping smokers quit: A randomized controlled trial with private practice dentists. J Amer Dent Assoc 118: 41-45, 1989.
- 19) Fiore MC, Bailey WC, Cohen SJ et al.: Treating tobacco use and dependence: Clinical practice guideline. US Department of Health and Human Services, Rockville, MD, 2000, p 61-62.
- 20) Fiore MC, Bailey WC, Cohen SJ et al.: Treating tobacco use and dependence: Clinical practice guideline. US Department of Health and Human Services, Rockville, MD, 2000, p 28-31.
- 21) Raw M, McNeill A, West R: Smoking cessation guidelines for health professionals. A guide to effective smoking cessation interventions for the health care system. Thorax 5(Suppl): 1-38, 1998.

著者への連絡先: 埴岡 隆 〒814-0193 福岡県福岡市早良区田村 2-15-1 福岡歯科大学口腔保健学講座

TEL・FAX: 092-801-0616

E-mail: haniokat@college.fdcnet.ac.jp

Reprint requests to T. HANIOKA, Department of Preventive and Community Dentistry, Fukuoka Dental College, 2-15-1 Tamura, Sawaraku, Fukuoka 814-0193, Japan

Research Library

第6回 どの生活習慣要因が歯周病にもっとも強く影響を及ぼすか

西田伸子、栗石 聡(大阪大学大学院歯学研究科予防歯科学教室)

キーワード：歯周病、生活習慣、喫煙、肥満

はじめに

口腔の健康を保つことは、食事や会話を楽しむなど、豊かな生活を送るために大切です。う蝕および歯周病などの歯科疾患は、発症、進行により歯の喪失につながることから、食生活や社会生活などに支障をきたし、ひいては全身の健康に影響を与えると考えられています¹⁾。近年、

拔牙の原因として歯周病が多くの割合を占めるようになり、歯周病を予防することが、今後ますます重要な課題となるものと考えられます。

歯周病は、多要因性疾患であり、歯周病細菌などの病原因子、免疫機能などの宿主因子とともに、環境因子として生活習慣の重要性も指摘さ

れています。

本研究では、企業従業員を対象に、歯周診査および喫煙、肥満、飲酒要因などの生活習慣を調査し、歯周病に対するリスク評価を行い、どの生活習慣要因が歯周病のもっとも大きいリスクとなっているかを検討しました。

対象・方法

1. 対象者

大阪府下某企業従業員372名(1998年度定期健康診断受診者、平均年齢40.5歳)。

2. 歯周診査

歯科医師が、人工照明下で圧力調整式歯周プローブを用い、対象者の第三大臼歯を除く全歯を診査し、3.5mm以上の歯周ポケット深さを有する歯を歯周病有病歯としました。歯周病有病歯数を現在歯数で割り、

百分率評価した歯周病有病歯率を解析に使用しました。

3. 生活習慣要因の調査

生活習慣要因は、森本らの生活習慣指数²⁾の項目に基づき、喫煙、飲酒、運動、朝食、栄養バランス、労働時間、睡眠時間、自覚的ストレスなどを含めた質問票により評価しました。喫煙関連要因は、現在喫煙または非・元喫煙といった喫煙習慣と、喫煙量としてpack-years(生涯喫

煙量)を調べました。飲酒関連要因は、飲酒の頻度、種類と量をもとに、1日あたりの純アルコール量に換算³⁾して評価しました。口腔保健行動は、歯磨き回数、歯頸部歯磨き方法、補助器具の使用などの口腔保健行動を含む34項目からなる質問票により評価しました。食生活関連要因としての肥満度は、Body Mass Index(以下、BMI)を算出し、WHO⁴⁾の肥満の定義を参考に評価しました。

結果・考察

歯周病と生活習慣要因との関連性を調べるために、多重ロジスティッ

ク回帰分析を行った結果、喫煙習慣、肥満度、アルコール摂取量および年

齢が、歯周病と統計的に有意な関連性を示しました(図1)。現在喫煙者

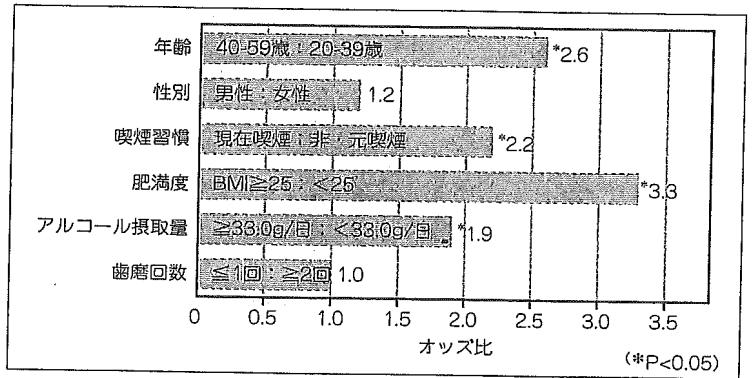


図1 各要因の歯周病に対するオッズ比(参考文献7より引用)。

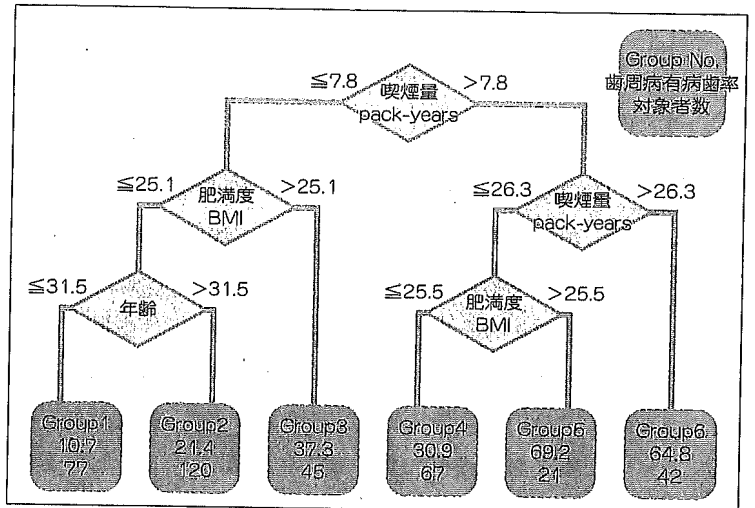


図2 CARTによる歯周病に対する生活習慣要因の探索(参考文献6より引用)。

は、非・元喫煙者の2.2倍、BMI 25以上の肥満者は、非肥満者の3.3倍、また、33g/日以上アルコール摂取者は、そうでない者の1.9倍の歯周病リスクを有していると考えられます。これらの結果は、喫煙などの生活習慣要因が、年齢や性別などを調整しても、歯周病に対し有意に独立して影響を及ぼしていることを示しています。

次に、どの生活習慣要因がもっとも大きい歯周病のリスクであるかを調べるために、回帰樹木統計解析法(以下、CART)⁵⁾による分析を行いました。CARTでは、影響力の強い順に枝分かれます。本研究におい

て、歯周病に対する影響力の強さは、喫煙量、肥満度、年齢の順でした(図2)。たとえば、Group 6には、26.3 pack-yearsより多い喫煙量の重度喫煙者が含まれますが、この集団は非常に高い歯周病有病歯率を示しました。一方、Group 4および5には、7.8~26.3 pack-yearsの中程度喫煙者が含まれますが、この集団はBMI 25.5をカットオフ値としてさらに分岐し、喫煙量の次に肥満度の影響を受けていることが示唆されました。また、Group 1、2および3には、7.8 pack-years以下の非・軽度喫煙者が含まれますが、これもBMI 25.1をカットオフ値としてさらに分

岐しました。これらの結果は、いずれも、喫煙量に次いで肥満度が歯周病に対し影響を及ぼしていることを示唆しています。ただし、Group 6のような重度喫煙者においては、もはや肥満度の影響を受けるまでもないということになります。

また、喫煙量や肥満度の増加とともに、歯周病に対するオッズ比も増加し、量-反応関係が認められました(P for trend < 0.05、図3および図4)。さらに、喫煙、肥満、飲酒要因の中で、2つ以上の悪習慣を持つ者では、歯周病に対するリスクが8倍も増加していました(図5)。

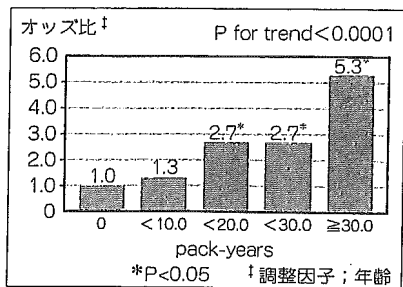


図3 喫煙量と歯周病との量-反応関係(参考文献6より引用)。

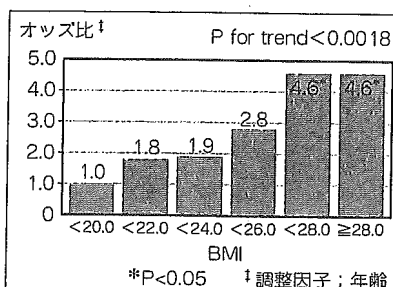


図4 肥満度と歯周病との量-反応関係(参考文献6より引用)。

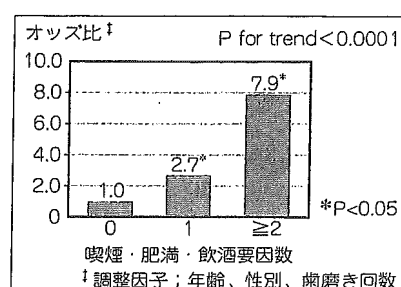


図5 喫煙・肥満・飲酒要因数と歯周病との関係(参考文献6より引用)。

まとめ

企業従業員の生活習慣と歯周診査を行い、それらの関連性を解析した結果、歯周病には種々の生活習慣関連要因が影響しており、中でも喫煙がもっとも大きいリスクであることが明らかとなりました。

生活習慣要因、特に、喫煙⁶⁾、肥満⁶⁾および飲酒習慣⁷⁾と歯周病との関連性について、さまざまな研究が行われてきました。肥満と密接に関連している糖尿病患者に歯周病有病者が多いことはすでに広く知られており、歯周病は糖尿病の第6番めの合併症であるといわれています⁸⁾。さらに、喫煙者や糖尿病患者の歯周治療に対する歯周組織の反応性は不

良であることもよく知られています。

歯周病の予防には、口腔清掃や歯石除去などのセルフケアおよびプロフェッショナルケアなど感染性因子への対策が欠かせません。しかし、歯周病は、喫煙や肥満のような生活習慣要因とも関連していることから、口腔衛生指導の際、患者さんの生活習慣の改善について行うことも重要です。たとえば、歯周病治療の一環として喫煙の悪影響を話したところ、患者さんが禁煙に取り組むきっかけになったという話も耳にします。

今、患者さんも医療従事者も、

「科学的根拠」の知識を持ち、それに基づいて話し合い、治療方針を決めていくというEBMが求められるようになってきています。本稿では、生活習慣と歯周病というトピックスを解説しましたが、「健康日本21」でも提唱されているように、現在、歯周病予防のための生活習慣の改善を実際の臨床現場で実施していくことが求められています。そのためには、歯科衛生士として、自分の得た知識、技術や態度を、患者さんに最大限還元していくふうや努力が必要となり、そのことが歯科衛生士としての専門性の向上にもつながるのではないかと思います。



歯周病の予防には、口腔清掃や歯石除去のみでなく、生活習慣の改善も大切なのです。

参考文献

- 健康日本21企画検討会. 歯の健康. 健康日本21(21世紀における国民健康づくり運動について). 東京:健康・体力づくり事業財団, 2000: 127-136.
- Kusaka Y, Kondou H and Morimoto K. Healthy lifestyles are associated with higher natural killer cell activity. *Prev Med* 1992; 21(5): 602-615.
- 健康日本21企画検討会. アルコール. 健康日本21(21世紀における国民健康づくり運動について). 東京:健康・体力づくり事業財団, 2000: 121-125.
- World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation of obesity. Geneva: World Health Organization, 1997.
- Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. Classification and Regression trees. Belmont: Wedsworth International Group, 1984: 216-265.
- Nishida N, Tanaka M, Hayashi N, Nagata H, Takeshita T, Nakayama K, Morimoto K, Shizukuishi S. Determination of Smoking and Obesity as Periodontitis Risks Using Classification and Regression Tree Method. *J Periodontol* 2005; 76(6): 914-919.
- Nishida N, Tanaka M, Hayashi N, Nagata H, Takeshita T, Nakayama K, Morimoto K, Shizukuishi S. Association of ALDH(2) genotypes and alcohol consumption with periodontitis. *J Dent Res* 2004; 83(2): 161-165.
- Löe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993; 16(1): 329-334.

第1回

一般開業歯科医院における
歯周病のリスクコントロール(前)

執筆コーディネーター：伊藤 中^{*1}

執筆：足本 敦^{*2} / 野崎剛徳^{*3} / 埴岡 隆^{*4} / 村上伸也^{*3} (50音順)

^{*1}大阪府開業 伊藤歯科クリニック

連絡先：〒567-0828 大阪府茨木市舟木町20-20 岩井ビル1F

^{*2}ワイエイオーラルヘルスセンター

連絡先：〒683-0853 鳥取県米子市両三柳107

^{*3}大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座

連絡先：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-8

^{*4}福岡歯科大学口腔保健学講座

連絡先：〒814-0193 福岡県福岡市早良区田村2-15-1

Periodontal Risk Assessment for the General Practitioner

Ataru Ito, Atushi Ashimoto, Takenori Nozaki, Takashi Hanioka, Shinya Murakami

コラム

喫煙の口腔影響が禁煙により改善するエビデンス

禁煙の効果については、研究で明らかになったものと常識的に考えられるものがある。禁煙の歯面着色への影響は後者の例である。EBMの普及により、科学的な根拠のレベルが研究デザインの質や報告数により異なることへの一般臨床医の理解が深まってきた。

図 C-1 は断面調査による歯肉メラニン色素沈着の有症者率を2つの事業所で比較したものである¹。工場勤務者の元喫煙者の有症者率が非喫煙者に近いことから、禁煙すると色素沈着が軽減することが考えられる。他の断面調査でも禁煙期間3年の者の有症者率が非喫煙者のレベルまで低下したことから、禁煙から3年するとメラニン色素沈着が軽減すると推測される。米国大規模断面調査の分析では、歯周病リスクは禁煙後11年以上と非喫煙者と同等のレベルであった。

なお、図 C-1 では歯肉メラニン色素有症者率は事務所勤務者の元喫煙者や非喫煙者で工場勤務者より高い。理由として、受動喫煙の影響が推測される²。このように断面調査では、禁煙後の他の影響が分析に反映されにくい。一方、たとえば英国医師の大規模追跡研究では、70歳での生存率が喫煙継続医師と比べて20%高かったが、30歳で禁煙した医師は非喫煙医師と同等になった。この追跡研究は信頼性の高い研究デザインだが、結果がわかるまでに実に40年が必要であった。

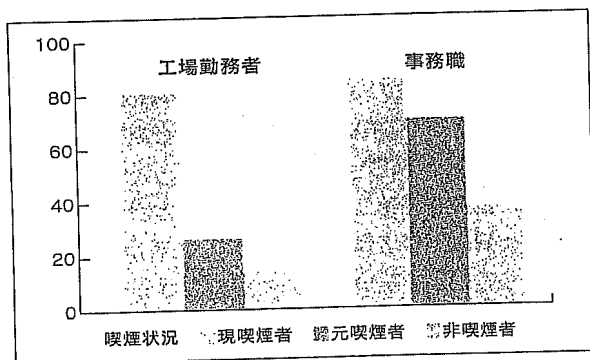
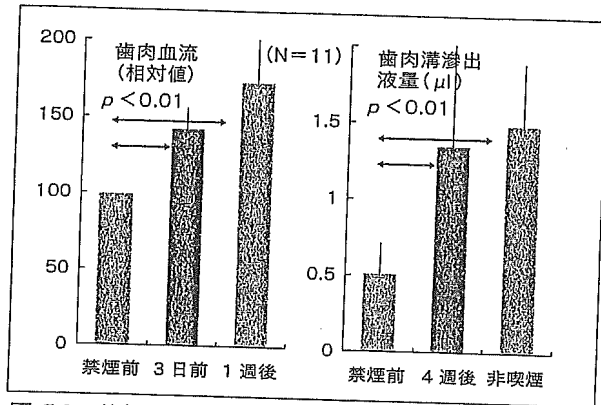


図 C-1 2つの作業形態が異なる事業所での歯肉メラニン色素沈着有症者(%)の比較。禁煙により有症者率は低下する。元喫煙者と非喫煙者での有症者率の違いの理由は、職場での受動喫煙が推定される(文献1より引用改変)。

さて、禁煙後の口腔への影響についての追跡研究は始まったばかりであるが、観察期間は短期でも信頼性のさらに高い無作為割付介入研究の成果が報告されている。①喫煙者ではプラークの蓄積が同等なのに血管性の炎症、具体的には歯肉出血、BOP、歯肉溝滲出液が抑制されることが示されている。これらが禁煙により回復するかどうか介入研究により調べられた。図 C-2 は、歯肉血流量が禁煙後増加したり、歯肉溝滲



図C-2 禁煙後の歯肉血流(左)と歯肉溝滲出液量(右)の変化。禁煙により血流量, 歯肉溝滲出液量ともに増加する。歯肉溝滲出液量は非喫煙者と同等レベルになる。(文献3より引用改変)

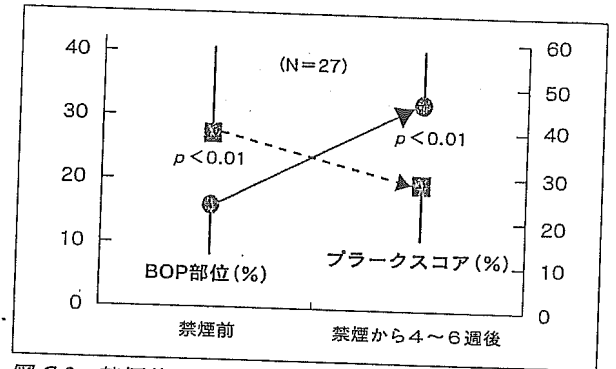
出液量が非喫煙者のレベルに回復したりすることを示している³。②図C-3は, 禁煙後4~6週にプラーク量が低下したにもかかわらず, BOPが増加することを示している⁴。禁煙に伴うこうした現象は一見して身体に悪いように受け止められるが, 炎症反応は生体の修復機能であり障害を受けていた機能が禁煙により正常化すると説明できる。③ラットに実験的に歯周炎を導入しタバコ煙を吸引させると歯槽骨の吸収が促進するが, タバコ煙の吸引を中止させると吸引を60日間継続させた場合と比べて骨吸収が少なくなり, 骨密度も向上した(図C-4)⁵。④喫煙者では歯周治療の効果が劣ることは知られているが, 歯周治療の開始前に禁煙すると, 喫煙を継続したり再開したりした場合より治療効果が向上することが初めて確かめられた(図C-5)⁶。

禁煙が困難であることをニコチン依存症と捉え, 医師による禁煙指導の保険適用が本年4月より認められようとしている。禁煙カウンセリングサービスの提供機会がある歯周治療は, 救命年延長への経済効率が優れている禁煙治療の普及の動きの中で, 重要な位置にあると思われる。

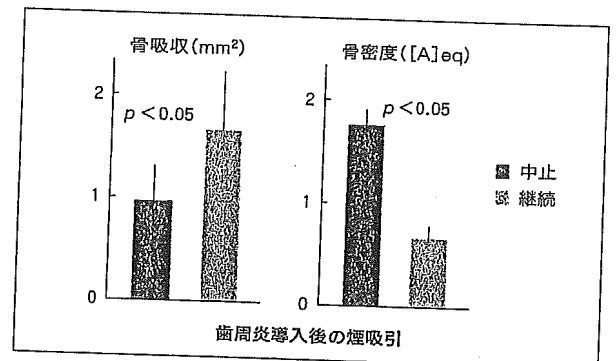
(埴岡 隆: 福岡歯科大学口腔保健学講座)

参考文献

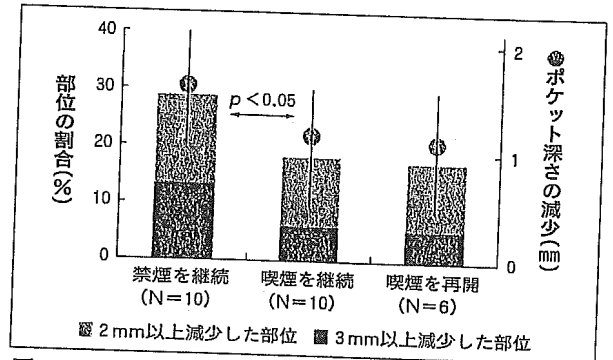
1. 埴岡隆, 田中宗雄, 玉川裕夫. 喫煙習慣が関係する歯肉メラニン色素沈着の疫学的研究. 口腔衛生学会雑誌 1993; 43(1): 40-47.
2. Hanioka T, Tanaka K, Yuuki K. Association of melanin pigmentation in the gingiva of children with parents who smoke. Pediatrics 2005; 116(2): 186-190.
3. Morozumi T, Kubota T, Sato T, Okuda K, Yoshie H. Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. J Clin Periodontol 2004; 31(4): 267-272.



図C-3 禁煙後のBOP変化。プラークが減少しても禁煙後に出血が増加する。(文献4より引用改変)



図C-4 タバコ煙吸引ラットの歯槽骨の骨吸収量と骨密度の吸引中止60日後の変化。タバコ煙中止により骨吸収が緩和される。(文献5より引用改変)



図C-5 歯周治療前に禁煙した場合と, 喫煙を継続および再開した場合との1年後の歯周治療効果の比較。禁煙を継続すると治療効果が向上する。(文献6より引用改変)



Short communication

Murine monoclonal antibody which can distinguish cystatins SA1 and SA2

Taichi Ito^{a,b}, Akiyo Komiya-Ito^{a,b}, Katsuji Okuda^{a,c}, Kiyoshi Minaguchi^{a,d},
Eiichi Saitoh^e, Satoru Yamada^{a,b}, Tetsuo Kato^{a,c,*}

^a Oral Health Science Center, Tokyo Dental College, 1-2-2 Masago, Mihama-ku, Chiba 261-8502, Japan

^b Department of Periodontics, Tokyo Dental College, 1-2-2 Masago, Mihama-ku, Chiba 261-8502, Japan

^c Department of Microbiology, Tokyo Dental College, 1-2-2 Masago, Mihama-ku, Chiba 261-8502, Japan

^d Department of Forensic Odontology, Tokyo Dental College, 1-2-2 Masago, Mihama-ku, Chiba 261-8502, Japan

^e Department of Biochemistry, Nippon Dental University, School of Dentistry at Niigata, 1-8 Hamaura-cho, Niigata 951-8580, Japan

Received 13 October 2004

Available online 8 January 2005

Abstract

To develop a diagnostic trial enabling the selective examination for a target cystatin in human body fluids, we attempted to prepare monoclonal antibodies against human cystatin SA1 (originally cystatin SA) and its variant form (cystatin SA2). BALB/c mice were immunized with recombinant (r-) cystatins SA1 and SA2. Two monoclonal antibodies designated Cys3F11 and Cys2E5 were selected. By ELISA analyses, the Cys2E5 was shown to react with r-cystatin SA2 but also somewhat with r-cystatin SA1 (22% cross-reactivity) and with plasma cystatin C (18% cross-reactivity), indicating a high specificity for cystatin SA2. The Cys3F11 reacted not only with r-cystatin SA1 but also with r-cystatin SA2 (89% cross-reactivity) and plasma cystatin C (47% cross-reactivity). This finding was further emphasized by immunoblotting of human submandibular–sublingual saliva samples. ELISA additivity test suggests that the two monoclonal antibodies bind to distinct epitopes. In conclusion, we have succeeded in producing two antibodies that discriminate the structural differences between salivary cystatins S and SN, which share more than 90% identity in amino acid sequence with cystatin SA.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cystatin SA; Saliva; Monoclonal antibody; Western blot

1. Introduction

The animal cysteine protease inhibitors belonging to the cystatin superfamily and comprised of at least three families (family 1, family 2, and family 3) are believed to regulate endogenous papain-like cysteine proteases such as the lysosomal cathepsins in order to prevent inappropriate proteolysis, which could be harmful or lethal (Turk et al., 2002). In addition to modulating such protease activities, these cystatins should also be capable of controlling the cysteine proteases released from various microorganisms and inflammatory cells (Turk et al., 2002).

The human cystatins of family 2 have been shown to consist of at least 11 members (SN, SA, S, C, D, E/M, F/leukocystatin, 8, 9/testatin, 11, and cystatin like 1 precursor protein), 10 of which are produced by the genes *CST1*, *CST2*, *CST3*, *CST4*, *CST5*, *CST7*, *CST8*, *CST9*, *CST11* and *CSTL1* clustered on chromosome 20p11.21 (Deloukas et al., 2001; GenBank no. NG000839)—the cystatin gene family (Saitoh et al., 1987). Cystatin E/M, however, is produced by the *CST6* gene on chromosome 11p13 (Stenman et al., 1997). Cystatins SN, SA, and S are predominantly expressed in human submandibular gland and sublingual gland (Isemura et al., 1984, 1986, 1987, 1991; Saitoh and Isemura, 1993); however, cystatin D is found in the parotid gland (Freije et al., 1993). Cystatin C and cystatin E/M are widely expressed ubiquitously in various human tissues (Abrahamson, 1994;

* Corresponding author. Tel.: +81 43 2703742; fax: +81 43 2703744.
E-mail address: tekato@tdc.ac.jp (T. Kato).

Abrahamson et al., 2003; Sotiropoulou et al., 1997; Ni et al., 1997), while cystatin F (leukocystatin) is abundant in spleen and peripheral blood leukocytes (Ni et al., 1998; Halfon et al., 1998). Three recently discovered inhibitors (cystatins 8, 9, and 11) are predominantly expressed in the male reproductive tract (Cornwall et al., 1999; Eriksson et al., 2002; Hamil et al., 2002).

In human saliva, five cystatins (S, SA, SN, C, and D) have been identified (Saitoh and Isemura, 1993; Freije et al., 1993; Abrahamson, 1994). Cystatins in saliva have been shown to inhibit the growth of microorganisms such as *Porphyromonas gingivalis* and infectious viruses including coronavirus, poliovirus, and herpes simplex virus, suggesting that salivary cystatins may play a role as defense factors (Blankenvoorde et al., 1996; Abrahamson et al., 2003). Furthermore, cystatins of this class have been demonstrated not only to induce interleukin-6 production by human gingival fibroblast via its surface molecules (Kato et al., 2000, 2002) but also interferon gamma expression in CD4 positive T cells (Kato et al., 2004). Defining levels of a target cystatin in human body fluids and detecting a specific cystatin in tissues are helpful tools for investigating the physiological roles of each cystatin. In the course of studying the roles of family 2 cystatin, we conceived of producing highly specific monoclonal antibodies that could discriminate the structural differences between human salivary cystatins S, SN, and SA. These promise to provide a clinical trail for the cystatins.

2. Materials and methods

2.1. Cystatins

Recombinant cystatin (r-cystatin) SA1 (originally cystatin SA), r-cystatin SA2 (a variant of cystatin SA harboring two amino acid substitutions: ⁵⁹Gly→Asp, ¹²⁰Glu→Asp) (Shintani et al., 1994; Haga and Minaguchi, 1999), and r-cystatin S were produced as described (Saitoh et al., 1998; Saitoh and Isemura, 1994). Cystatin A purified from human placenta and cystatin C from human plasma were purchased from BioPur AG, Bubendorf, Switzerland. Recombinant cystatin D and r-cystatin E/M were obtained from R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA. Chicken egg white cystatin was purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

2.2. Preparation of murine monoclonal antibodies

Female BALB/c mice, 5 weeks of age, were immunized with r-cystatin SA1 or r-cystatin SA2 as the immunogen. For the first immunization, they were subcutaneously administered 0.3 ml of either immunogen (0.4 mg/ml) emulsified with an equal volume of Freund's incomplete adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Thirty days later, the mice were given the same immunogen intraperitoneally; in all, five booster administrations were given. Three days after the final

immunization, the mice were bled, and the sera were separated by centrifugation. The reactivities and titers of antisera to cystatin SA1 or SA2 were confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hybridomas were produced by the polyethylene glycol (PEG 4000; Sigma Chemical) fusion of SP2 murine myeloma cells with splenocytes from the immunized mice as described previously (Kato et al., 1989). To produce antibody against cystatins SA1 and/or SA2, viable hybridomas were screened by ELISA and then cloned twice by the limiting dilution method. Monoclonal antibody isotypes were determined by using a monoclonal subtyping kit (American Qualex Company, San Clemente, CA, USA). The reactivities of the monoclonal antibodies were confirmed by an ELISA system. Large quantities of the monoclonal antibodies were produced by intraperitoneal injection of hybridoma cells into pristane-treated BALB/c mice. After 7–14 days, the ascites containing high concentrations of antibodies, were harvested. All of this study followed "A Guideline for the Treatment of Experimental Animals in Tokyo Dental College".

2.3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

To elucidate the cross-reactivity of polyclonal and monoclonal antibodies against r-cystatins SA1 or SA2, the recombinant and authentic cystatins were used as coating antigens. These cystatins were diluted in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2) to a final concentration of 10 µg/ml. The wells of 96-well microtiter plates (Corning Glass Works, Corning, NY, USA) were coated with 50 µl of antigen solution and incubated overnight at 4 °C. Plates were washed twice with PBS 0.05% Tween 20 (PBS-T), blocked for 1 h with 3% skim milk (Difco Laboratories) at 37 °C, and washed. Antiserum serially diluted with PBS or monoclonal antibody was added to each well; plates were incubated for 1 h at 37 °C and washed with PBS-T. The plates were incubated for 1 h with peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulins (Cappel Laboratories, Cochranville, PA, USA), washed, and developed with 200 µl of *o*-phenylenediamine dihydrochloride (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) substrate solution containing hydrogen peroxide. After the reaction was stopped by the addition of 50 µl of 3 M H₂SO₄, the optical densities (OD) were measured at 490 nm using a microplate reader (model 3550, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

2.4. ELISA additivity test

In order to test the monoclonal antibodies recognize different epitopes, an ELISA additivity test was carried out as described by Friguet et al. (1983). The r-cystatin SA2 was first coated onto a 96-well microtiter plate (Corning Glass Works). Two monoclonal antibodies were then added either separately or simultaneously, and the amount of bound antibody was quantitatively measured. Additivity of the bound activity is observed when the monoclonal antibodies bind to

distinct epitopes. To quantitate the experimental results of the additivity test, an additivity index (AI) has been defined for a pair of antibodies as:

$$AI = \left[\left\{ \frac{2A_{1+2}}{(A_1 + A_2)} \right\} - 1 \right] \times 100$$

where A_1 , A_2 and A_{1+2} are the OD in the ELISA, with the first monoclonal antibody alone, the second monoclonal antibody alone, and the two antibodies together. When the two antibodies bind randomly at the same site, AI will be equal to zero.

2.5. Western blotting analysis

For the examination of the cross-reactivity of the polyclonal and monoclonal antibodies with S-type cystatins by Western blotting analysis, basic slab polyacrylamide gel electrophoresis was employed as described (Shintani et al., 1994). Human submandibular–sublingual saliva was collected by means of a universal cup (Shintani et al., 1994). The saliva samples were dissolved in the loading buffer and applied onto the gels. Following the gel electrophoresis, the separated proteins were transferred to nylon membranes (Millipore Co., Bedford, MA, USA) using Trans-Blot SD (Bio-Rad Laboratories). Each membrane was washed with PBS-T three times for 15 min and then placed in a blocking solution of PBS-3% skim milk and incubated for 1 h at room temperature. The membrane was incubated with the murine monoclonal antibodies or antisera overnight. After being probed with the antibody and washed with PBS-T, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulins (Cappel Laboratories). Finally, the membrane was developed.

3. Results and discussion

The anti-r-cystatin SA1 mouse antiserum (polyclonal) showed a strong cross-reactivity with cystatins of family 2 such as r-cystatin SA2, r-cystatin S, and plasma cystatin C or egg white cystatin, but not with cystatin A from human placenta (family 1 cystatin), as shown in Fig. 1. The antiserum against r-cystatin SA2 (polyclonal) revealed almost

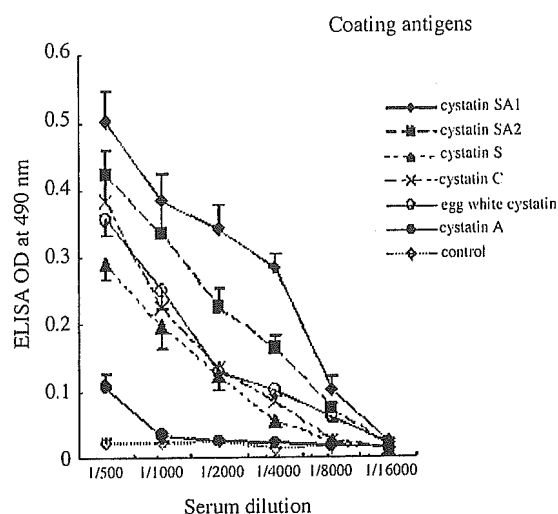


Fig. 1. ELISA reactivities of mouse antiserum against r-cystatin SA1. The recombinant and native cystatins were used as coating antigens. The wells of 96-well microtiter plates were coated with 10 μ g of either antigen. Antiserum was serially diluted with PBS.

the same cross-reactivity as the antiserum mentioned above. To obtain highly specific antibodies for human cystatin SA1 or its variant (SA2), we attempted to produce monoclonal antibodies using r-cystatin SA1 or r-cystatin SA2. Eventually, we were able to select two hybridomas harboring the monoclonal antibodies for r-cystatin SA1 and r-cystatin SA2, which are designated, respectively, as Cys3F11 and Cys2E5 (see Table 1). By ELISA, the antibody Cys2E5 (IgG1 isotype) was found to show a strong reactivity with r-cystatin SA2 and a weak cross-reactivity with r-cystatin SA1 (22% cross-reactivity) and plasma cystatin C (18% cross-reactivity). The Cys3F11 (IgG1 isotype) was demonstrated to react not only with r-cystatin SA1 but also with r-cystatin SA2 (89% cross-reactivity) and plasma cystatin C (47% cross-reactivity). Neither monoclonal antibody reacted with any other cystatin tested, including r-cystatins S, SN, D, and E/M or egg white cystatin, as shown in Table 1. The epitope specificity of the two monoclonal antibodies was then analyzed by ELISA additivity test. This assay requires that the antigen be saturated with each antibody tested. Accordingly, we determined the lowest concentration of each antibody at which saturation was achieved and used concentrations to perform ELISA with sin-

Table 1
Comparison of the percent cross-reactivity of monoclonal antibodies for S-type cystatins determined by ELISA

Antibodies	Cystatins (coating antigens)								
	SA1	SA2	S	SN	C	D	E/M	EWC	A
Cys2E5/SA2 ^a	22	100	–	–	18	–	–	–	–
Cys3F11/SA1 ^a	100	89	–	–	47	–	–	–	–
MAB1285/SN ^b	–	N	50	100	–	–	–	N	–
MAB1201/SA ^b	100	N	100	100	–	–	–	N	–
MAB1296/S ^b	100	N	100	–	–	–	–	N	–

Data are from two duplicate experiments. EWC, egg white cystatin; (–), does not show cross-reactivity; N, not shown.

^a Present study.

^b Monoclonal antibodies produced by R & D Systems, Inc.

Table 2
Additivity index for Cys2E5 and Cys3F11 monoclonal antibodies

Ascites and dilutions	ELISA OD	Additivity index (AI)
Cys2E5 1:100	0.421	–
Cys3F11 1:200	0.534	–
Cys2E5 1:100 + Cys3F11 1:200	0.785	64

Cystatin SA2 was used as a coating antigen.

Ascites dilutions correspond to the lowest concentrations at which saturation of antigen was achieved.

The additivity index (AI) is shown in %.

$AI = \{ [2A_{1+2} / (A_1 + A_2)] - 1 \} \times 100$, where A_1 and A_2 are the OD of each antibody alone and A_{1+2} is the OD obtained with the two antibodies in the same reaction.

gle and with mixed pair of antibodies. As shown in Table 2, AI for Cys3F11 and Cys2E5 was 64%. This result shows that the bindings of the two monoclonal antibodies are additive, suggesting that these antibodies bind to distinct epitopes.

Generally, the immunoblots of saliva samples by native gel with anti S-type cystatin antisera give five positive bands (for homozygotes of cystatin SA1 or SA2) or six bands (for the heterozygote of SA1 and SA2), as shown in Fig. 2. Fig. 2 (lanes A and B) clearly demonstrated that immunoblots with monoclonal antibodies do not provide positive signals for non-phosphorylated cystatin S, mono-phosphorylated cystatin S, di-phosphorylated cystatin S, or cystatin SN. The immunoblot with Cys3F11 showed two positive bands for cystatins SA1 and SA2 with almost the equal intensity; how-

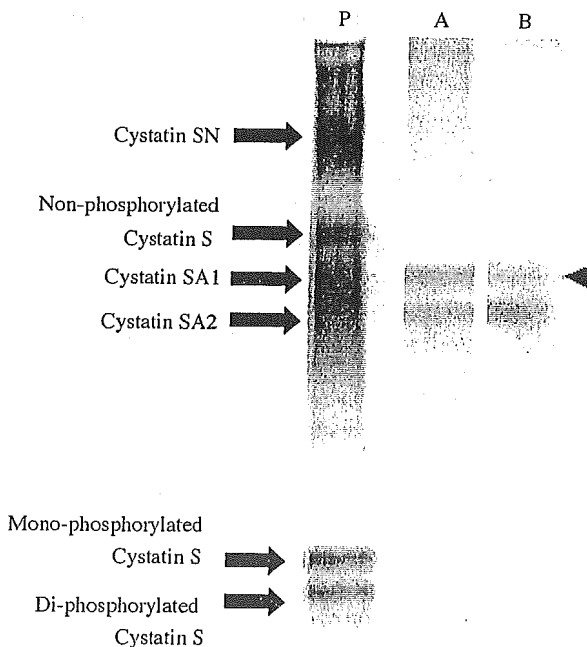


Fig. 2. Detection of S-type cystatins by Western blot. Western blot of human submandibular–sublingual saliva was performed as described by Shintani et al. (1994). The first antibodies used are: P; anti-r-cystatin SA1 antiserum, A; Cys3F11, B; Cys2E5.

ever, Cys2E5 formed a strongly reacting band with cystatin SA2 and a faint band (indicated by the arrowhead) with cystatin SA1, as seen in Fig. 2. These observations emphasize that the monoclonal antibody, Cys2E5, can discriminate the structural differences between cystatins SA1 and SA2, both of which are encoded by the CST2 locus. Neither monoclonal antibody showed a positive reaction with cystatin D in the immunoblot by acidic polyacrylamide gel electrophoresis (data not shown).

Recently, monoclonal antibodies have been produced from a hybridoma resulting from the fusion of a mouse immunized with r-human S-type cystatins expressed with a carboxyl terminal 10× His-Tag in a mouse myeloma cell line, NS0 (R & D Systems, Inc., catalog nos. MAB1296 for r-cystatin S, MAB1285 for r-cystatin SN, and MAB1201 for cystatin SA). As compared in Table 1, the commercially available antibodies do not show the ability to select r-human S-type cystatins. However, all the commercial monoclonal antibodies do discriminate the structural differences between r-human cystatin C and r-human S-type cystatins. It is noteworthy that the cross-reactivity of two monoclonal antibodies, Cys2E5 and MAB1201, is quite different.

Taken together, it can be concluded that there may be common epitopes and specific epitopes for the cystatins of this family.

Acknowledgement

This study was supported by Oral Health Science Center Grant 5A04 from Tokyo Dental College.

References

- Abrahamson, M., 1994. Cystatins. *Methods Enzymol.* 244, 685–700.
- Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M., Nathanson, C.M., 2003. Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.* 70, 179–199.
- Blankenvoerde, M.F.J., Henskens, Y.M.C., Van't Hof, W., Veerman, E.C.I., Nieuw Amerongen, A.V., 1996. Inhibition of the growth and cysteine proteinase activity of *Porphyromonas gingivalis* by human salivary cystatin S and chicken cystatin. *Biol. Chem.* 377, 847–850.
- Cornwall, G.A., Hsia, N., Sutton, G., 1999. Structure, alternative splicing and chromosomal localization of the cystatin-related epididymal *spermatogenic* gene. *Biochem. J.* 340 (Pt. 1), 85–93.
- Deloukas, P., Matthews, L.H., Ashurst, J., Burton, J.G.R., et al., 2001. The DNA sequence and comparative analysis of chromosome 20. *Nature* 414, 865–871.
- Eriksson, A., Töhönen, V., Wedell, A., Nordqvist, K., 2002. Isolation of the human testatin gene and analysis in patients with abnormal gonadal development. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 8–15.
- Freije, J.P., Balbín, M., Abrahamson, M., Verasco, G., Dalboge, H., Grubb, A., López-Otín, C., 1993. Human cystatin D. cDNA cloning, characterization of the *Escherichia coli* expressed inhibitor, and identification of the native protein in saliva. *J. Biol. Chem.* 268, 15,737–15,744.
- Friguet, B., Djavadi-Ohanian, L., Pages, J., Bussard, A., Goldberg, M., 1983. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site, application to hybridomas specific for the β 2-subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase. *J. Immunol. Methods* 60, 351–358.