歯周ポケット滲出液中 diglyceride および monoglyceride について

江 澤 敏 光 郷 家 英 二 上 木 貴 弘 渡 邊 和 仁

日本大学歯学部歯周病学教室

(指導: 村井正大教授)

(昭和56年3月20日受付)

On the Diglyceride and Monoglyceride in Pocket Fluid of Patients with Chronic Marginal Periodontitis.

Toshimitsu EZAWA, Eiji GOUKE, Takahiro UEKI,
Kazuhito WATANABE

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry.

(Director: Prof. Seidai MURAI)

They say that the increase of pocket fluid combine with aggravation of periodontal disease. This mechanism and component are generally considered, however, the lipid substance in exudate still remains unknown, except for the report of WATANABE. His report contained that the amount of triglyceride in human serum and pocket fluid tend to increase, on the other hand in human gingiva was tend to decrease in proportion to the aggravation of the disease.

From his report, the authors investigate about the amount of diglyceride (DG) and monoglyceride (MG).

By way of study material, a total of 29 patients (13 males and 16 females) who visited the Department of Periodontology, Nihon University Dental Hospital, were selectively used. The subjects, who ranged from 20 to 72 years in age, were free from any systemic disease except for some kind of periodontal complaint.

The areas of pocket fluid collection (facial of $3-3$ or $3-3$) studied according to PMA index. In collecting the exudate from the periodontal pockets, filter paper strips (Whatman Co., No.2, 1×12 mm) was used. Total lipids were extracted with chloroform/methanol (2:1 v/v). The separation of the extract was achieved by thin-layer chromatography. The amount of diglyceride and monoglyceride in them was determined by the enzyme method-the endpoint method (reagents: Boehringer Mannheim) using the ultraviolet absorption spectrophotometry.

As a result of the study, the authors arrived at the following conclusions:

1. In this study identified that DG and MG were concluded in pocket fluid by use of thin-layer chromatography.
2. The amount of DG and MG were inclined to increase in proportion to the aggravation of the disease.

緒 言

慢性辺縁性歯周炎（以後歯周炎と略す）の原病巣である歯周ポケット中の滲出液を検討することにより、適切な診断および歯周炎の進展増悪を臨床的な判定に応用しようとするところみがなされ、歯周組織が病的状態になると歯周ポケットへの滲出液の量および成分に変動をきたすことは多くの研究者¹⁻¹⁷⁾によって報告されている。しかし不明な点が多い。教室の渡邊¹⁸⁾は歯周炎罹患者の血清、歯肉および歯周ポケット滲出液中の triglyceride（以後 TG と略す）につき検討し歯周炎が増悪するにしたがい血清および滲出液中の TG が増大し、歯肉中の TG は罹患程度の増悪により減少していることを報告している。

TG は乳化されながらリパーゼにより triglyceride→diglyceride→monoglyceride→glycerol に分解される。一方 monoglyceride（以後 MG と略す）はリン酸化されることなく、直接エステル化されて TG の形成にあずかる。acyl CoA が欠乏している場合には diglyceride（以後 DG と略す）を形成することができず、むしろ脂肪酸と glycerol に分解される。また TG の合成は主としてミクロソーム分画で行われ、 α -glycerphosphate からの合成経路および MG より生合成の二つの経路が見出されている。

このような TG の合成、分解が歯周ポケット滲出液中でどのように変動するのか、DG および MG 量につき検討したので報告する。

材料および方法

1. 材 料

1) 検査対象

被検者は、日本大学歯科病院歯周病科において、歯周炎と診断された患者のうち年齢 20 歳から 72 歳の男性 13 名、女性 16 名、計 29 名である。被検者は問診、視診、既往歴の調査および血液、尿を中心とした一般的臨床検査などによって、歯周炎以外に疾患を有していないと判定されたものである。

本研究における被検者の歯周炎罹患程度を PMA 指数に準じた歯肉の炎症程度に従い、P 群（肉眼的に見て炎症症状が歯間乳頭部に局限しているもの）、M 群（肉眼的に見て炎症症状が辺縁歯肉まで波及しているもの）および A 群（肉眼的に見て炎症症状が付着歯肉まで波及

しているもの）に大別した。

2) 歯周ポケット滲出液の採取

被検者に水で軽く洗口させた後、3-3 または 3-3 の歯周ポケットを滲出液の採取部とし、該当歯および歯肉を精製水で軽く拭い、簡易防湿を施し、エアーシリンジで採取部を乾燥させて 5 分間放置した。次いで試料の採取はろ紙（Whatman 社製、No.2.1 mm×12 mm）20 枚を前記 6 前歯の歯周ポケットにポケット底へ達するように挿入し 10 分間放置後、ただちに重量を測定した。この採取は、被検者にスクーリングなどの歯周疾患処置を行うことなく実施した。

これら滲出液からの脂質の抽出は、Folch らの方法に準じて行い溶媒を減圧乾固し、薄層クロマトグラフィー用試料とした。

3) 測定試薬（Boehringer Mannheim 社製）

溶液 I 0.1M triethanolamine buffer (pH 7.6),
4 mM MgSO₄

溶液 II 6 mM NADH, 33 mM ATP, 11 mM phosphoenol pyruvic acid

溶液 III 500 U/ml lactate dehydrogenase 200 U/ml pyruvate kinase

溶液 IV 60 U/ml glycerol kinase

溶液 V 0.5 N エタノール性水酸化カリウム液

溶液 VI 0.15M MgSO₄

4) 薄層クロマトグラフィー

Silicagel G (Merck 社製) 100 g を 500 ml のメタノールに懸濁し、室温にて 30 分間放置後上清を捨て、さらに 5 倍量のメタノールで 2 回洗浄後、75°C、1 時間湯浴上で加温し、室温で 2 時間放置後、吸引ろ過し、110°C 1 時間乾燥し、Silicagel G の前処理を行った。

この Silicagel G 40 g に蒸留水 80 ml を加え均一に混ぜ、20 cm×20 cm のガラス板 5 枚に厚さ 0.5 mm（定性用には厚さ 0.3 mm）の薄層とし、110°C、1 時間半活性化したものを使用した。展開溶媒には、予備実験の結果、分離性の良かった石油エーテル、エチルエーテル、酢酸（80：30：1 v/v）を用いた。

2. 方 法

試験を一定量のクロロホルム、メタノール（2：1 v/v）溶液に溶解し、あらかじめ活性化した薄層の下端より 2 cm のところに約 20 個の直径 4 mm 前後の円状となるようにスポットし、あわせて両端の同位置に authentic な DG および MG を指標としスポットした。その薄層を前記展開溶媒で 50 分間展開した後、室温に風乾し、1

表 1 歯周ポケット滲出液中の DG および MG 量

P 群					M 群					A 群				
患者名	年齢	性別	D G	M G	患者名	年齢	性別	D G	M G	患者名	年齢	性別	D G	M G
■	20	F	0.109	0.129	■	27	M	0.081	0.106	■	25	F	0.111	0.139
■	21	F	0.042	0.054	■	31	F	0.063	0.101	■	28	M	0.075	0.100
■	21	F	0.088	0.119	■	34	M	0.068	0.089	■	32	F	0.124	0.148
■	28	M	0.052	0.068	■	36	F	0.101	0.125	■	37	F	0.088	0.127
■	36	M	0.061	0.101	■	37	M	0.094	0.128	■	44	M	0.069	0.098
■	37	M	0.059	0.110	■	42	M	0.077	0.103	■	45	M	0.091	0.122
■	42	F	0.090	0.120	■	45	F	0.082	0.130	■	46	F	0.071	0.109
■	52	M	0.092	0.162	■	46	F	0.089	0.113	■	51	F	0.104	0.128
■	54	F	0.111	0.157	■	49	F	0.101	0.149	■	54	F	0.092	0.149
					■	64	M	0.123	0.156	■	72	M	0.124	0.169
X			0.078	0.113	X			0.088	0.120	X			0.095	0.129
S. D.			0.025	0.036	S. D.			0.018	0.021	S. D.			0.020	0.023

単位：μmol/100mg

図 1 DG および MG の検量曲線

%ヨードメタノール溶液を薄層上に均一に噴霧，発色させ，スポット分離帯を確認後，authentic な DG の Rf 値 (0.36) および MG の Rf 値 (0.04) に一致する各々

の分離帯をスパーテルにてかきとり，クロロホルム，メタノール (2 : 1 v/v) 溶液に懸濁し，DG および MG の再溶出を行った。

各々の溶出液を減圧乾固したのち，0.2 ml の溶液 V を加えよく振盪し，パラフィルムで栓をし，37℃ で 1 時間放置し，その後室温まで冷却して 0.40 ml の溶液 VI を加えよく振盪した。その後，5 分間 1,200×g で遠心分離し，この上清液の 0.2 ml に 1.0 ml の溶液 I，0.05 ml の溶液 II，0.01 ml の溶液 III を加えキュベットに入れ混和し，室温に 10 分間放置後，日立 100-20 型デジタル分光光度計を用い 340 nm で吸光度 E₁ を測り，ついで 0.01 ml の溶液 IV を加え，混和し 10 分後に吸光度 E₂ を測定した。なお authentic な DG および MG を用いて求めた検量曲線は図 1 に示した通りである。

成 績

歯周ポケット滲出液中の DG および MG を薄層クロマトグラフィーを用い検討した結果 Rf 値 0.33 前後のものは DG，Rf 値 0.05 前後のものは MG であることを認めた。

歯周炎罹患程度，すなわち P 群，M 群および A 群について，DG および MG 量を測定した結果は表 1 に示す

とおりである。

P 群から A 群にいくにしたがい DG および MG が増量する傾向にあることを認めた。

考 察

歯周ポケット滲出液量については、多数の研究者により、歯肉の炎症の強さと相関性があることが報告¹⁻⁶⁾されている。またその組成についても検討されている。しかし歯周ポケット滲出液中の中性脂肪に関する報告は少なく、著者らの知る範囲では、わずかに渡邊¹⁸⁾が歯周炎罹患程度を分類し、軽症から重症になるにしたがい、歯周ポケット滲出液中の TG が増量することを認めた報告があるにすぎない。

著者らの測定した DG および MG 量でも渡邊の報告と同様の成績であった。

一般に炎症部位においては、脂質が減少し、その周辺部においては逆に脂質が増加すること、また炎症部の血液やリンパなどの組織液中に早期に脂質の増加¹⁹⁾することが認められるといわれている。この事実から考えると歯肉の炎症とその周囲、すなわち滲出液という関係で DG および MG の増量もありうると思われる。しかし DG および MG が歯周炎の進行にどのような役割をするのか、血清中から DG および MG 単味で歯周ポケット中に滲出してくるのか不明であり、今後それらにつき検討する予定である。

結 論

1. 薄層クロマトグラフィーにより歯周ポケット滲出液中に diglyceride および monoglyceride があることを認めた。

2. 辺縁性歯周炎罹患程度を分類し、DG および MG 量を測定した結果、罹患程度が増悪するにしたがい増量する傾向があった。

文 献

- 1) 水野克己, 大森 恒, 荻本増彦, 大森 靖, 伊藤振本, 奥村和道, 秋田有一, 横地 洋, 中静 正 : 歯周疾患患者の歯周ポケット浸出液量と主なる臨床所見との関係, 愛知学院大歯会誌, 13 : 234-239, 1975.
- 2) Brill, N. and Krasse, B. : The passage of tissue

fluid into the clinically healthy gingival pocket. Acta odontol. scand., 16 : 233-245, 1958.

- 3) Brill, N. : Gingival conditions related to flow of tissue fluid into gingival pockets. Acta odontol. scand., 18 : 421-446, 1960.
- 4) Mann, W.V. : The correlation of gingivitis pocket depth and exudate from the gingival crevice. J. Periodontol., 34 : 379-387, 1963.
- 5) 林 和夫, 護邦忠弘, 三瀬博司, 橋本光示, 藤本完次, 民上良徳, 上田雅俊, 今井久夫, 山岡 昭 : 歯周疾患における病態の推移とポケット浸出液量との関連性について (その 1). 日歯周誌, 19 : 231-238, 1977.
- 6) Hancock, E.B., Cray, R.J. and O' Leary, T.J. : The relationship between gingival crevicular fluid and gingival inflammation. J. Periodontol., 50 : 13-19, 1979.
- 7) 今野寿一 : 歯槽膿漏症患者, 盲嚢内容物のペーパークロマトグラフィーによる検索. 口腔病会誌, 27 : 392-410, 1960.
- 8) Egelberg, J. : Cellular elements in gingival pocket fluid. Acta odontol. scand., 21 : 283-287, 1963.
- 9) Attström, R. : Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae. J. Periodont. Res., 5 : 42-47, 1970.
- 10) Attström, R. and Egelberg, J. : Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices. J. Periodont. Res., 5 : 48-55, 1970.
- 11) 大森 恒 : 歯周疾患における歯肉浸出液中の Brady kininase 活性について. 日歯周誌, 16 : 305-312, 1974.
- 12) 奥村和道 : 歯周疾患と Histamine との関係 I. 歯周疾患患者の全唾液および歯周 pocket 浸出液中の Histamine 量. 日歯周誌, 17 : 208-215, 1975.
- 13) Hara, K. and Takahashi, T. : Hydroxyproline content in gingival exudate before and after periodontal surgery. J. Periodont. Res., 10 : 270-274, 1975.
- 14) Hasegawa, K. : Biochemical study on gingival fluid-lactic acid in gingival fluid-, Bull. Tokyo med. & dent. Univ., 14 : 359-372, 1967.

- 15) 石川 烈, Cimasoni, G. : 歯肉滲出液中のアルカリ性フォスファターゼとその由来について. 日歯周誌, 13 : 3-7, 1971.
 - 16) 石川 烈, 野口俊英, 木下四郎 : 歯周ポケット内の蛋白分解酵素について. 日歯周誌, 14 : 34-38, 1972.
 - 17) 秋吉正豊 : 歯周ポケットの形成機序. 歯界展望, 45 : 41-54, 1975.
 - 18) 渡邊和仁 : 慢性辺縁性歯周炎罹患者の血清, 歯肉および歯周ポケット滲出液中のトリグリセライドについて. 日歯周誌, 21 : 369-376, 1979.
 - 19) 田坂定孝, 荒木嘉隆 : 炎症の生理化学的機転—細胞の代謝と血管反応—. 最新医学, 13 : 137-146, 1958.
-