原 著

歯肉縁上歯石および歯肉縁下歯石の脂質量に関する研究

奥 村 勲

日本大学歯学部歯周病学教室

(指導: 村井正大教授)

(昭和57年11月25日受付)

Lipid in the Supragingival Calculus and Subgingival Calculus

Tooru OKUMURA

Department of periodontology, Nihon university school of dentistry

(Director: Prof. Seidai MURAI)

To the author's knowledge, there have been few reports dealing with the constituents of dental calculus. For these reason, the present study was concerned with lipids detected in supragingival calculus and subgingival calculus.

By way of study material a total of 37 patients (19 males and 18 females) who visited the department of periodontics, Nihon university dental hospital, were selectively used. A extraction of lipids from dental calculus was carried out in accordance with the method by FOLCH et al.

The extracted matter was dry fixed under nitrogen at 45°C and was resolved in a 0.05 ml solution of chloroform: methanol (2:1 v/v) to render it availa-

ble for the purpose Thinchrography. As a result of the study, the author arrived at the following.

1. The lipids existing supragingival calculus and subgingival calculus were identified as cholesterol ester, free fatty acid, cholesterol and phospholipid.

2. Lipids of supragingival calculus was followed in order by free fatty acid, cholesterol ester, cholesterol and phospholipid.

3. Lipids subgingival calculus were followed in order by free fatty acid, phospholipid, cholesterol ester and cholesterol.

4. There was no appreciable difference in lipids between supragingival calculus and subgingival calculus.

Key words: Lipid, Supragingival calculus, Subgingival calculus.

要旨: 歯石中の脂質と歯周疾患との関連については不明な点が多く、詳細な研究がなされていないのが実情である。そこで著者は、歯石を歯肉縁上および歯肉縁下歯石に分け、歯周炎罹患者から歯石を採取し、その中の脂質を同定し、その量を比較検討した。

その結果、歯肉縁上および歯肉縁下歯石中にコレステロールエステル、遊離脂肪酸、コレステロールおよび磷脂質の存在を認めた。量的には歯肉縁上歯石中の脂質は遊離脂肪酸が一番多く、コレステロールエステル、コレステロールおよび磷脂質の順であった。歯肉縁下歯石では遊離脂肪酸が一番多く、次いで磷脂質、コレステロールエステルおよびコレステロールの順であった。この中で興味あることは陳旧性の歯石では磷脂質量が異常に多かったことである。

索引用語: 脂質, 歯肉縁上歯石, 歯肉縁下歯石.

緒 言

歯石は、歯に付着した歯垢が厚さを増すと、その内部すなわち歯の表面に近い部分から石灰化がはじまり、歯の表面および義歯などに硬く沈着したものであり、歯周疾患の罹患率との間には強い相関関係があることは知られている。

歯石中の脂質と歯周疾患との関連については不明な点

が多く、詳細な研究がなされていないのが実情である。歯石中の脂質の分析については、Glock¹⁾ ら、Little²⁾ ら、Mandel^{3,4)} ら、Slomiany⁵⁾ らおよび伊藤⁶⁾ らの報告がある。また関連したものとしては歯石形成過程における脂質の役割について高添⁷⁻⁹⁾、竹島¹⁰⁾ および高添¹¹⁾ らが細菌の菌体石灰化に関与していることを報告しているにすぎない。

しかしながら、これらの報告はいずれも定性的か、歯肉縁上および歯肉縁下歯石を合併し脂質量を測定したも

のであったり、いくつかの試料を合わせて測定したものである。

そこで著者は、歯肉縁上および歯肉縁下歯石に分け、歯石中の脂質を同定し、その量を比較検討したので報告する。

材料および方法

1. 被検者

日本大学歯科病院歯周科において、歯周炎と診断された患者のうち、年齢26歳から63歳の男性19名、女性18名、計37名を対象とした。

被検者は、問診、視診、既往歴の調査および通常の臨床検査などにより、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。

2. 試薬

コレステロールエステル、パルミチン酸、コレステロールおよびホスファチジルコリンは東京化成社製のものを使用した。その他の分析用試薬は、すべて市販の特級規格のものをを用いた。

3. 歯石の採取

被検者に歯ブラシ（パイコペイS）を用い、ローリング法およびスクラッピング法により歯の表面のプラークを除去した。洗口後、簡易防湿を施し、肉眼的に歯肉辺縁頂から上の歯冠部に沈着している歯石を歯肉縁上歯石とし、また歯肉辺縁頂から下の歯根部に沈着している歯石を歯肉縁下歯石として、手用スケーラーを用いて採取した。なお、この歯肉縁下歯石は、その歯石沈着の状況から前回の歯石除去後6ヵ月に満たないグループ（I群）および歯石除去後6ヵ月以上経過した者と初めて治療を受ける者のグループ（II群）の2群に分類した。

これらの歯周ポケットの深さはいずれも5mm前後の

ものである。

4. 試料の調製

まず歯石に付着している血液を生理食塩水中で洗い落とし、濾紙で歯石表面の生理食塩水を除去し、ただちに湿重量を測定した。

脂質の抽出は、Folch¹²⁾らの方法に準じて行った。すなわち歯石をクロロホルム：メタノール（容積比2：1）混合溶液の5倍量中で、乳棒にてよく磨砕し、溶液を混和し、歯石中の脂質を溶解させた後、その溶液を濾過し、その不溶部に新たに5倍量の混和溶液を加え、ふたたび乳棒にてよく磨砕、混和し脂質を抽出した。不溶部にはさらに混合溶液で同様に操作し、可溶液に脂質が検出できなくなるまで抽出をくり返し、最後に可溶部を合併し、有機溶媒層をN₂気流下で減圧乾固し、シンクログラフィー用試料とした。

5. シンクログラフィー¹³⁾

試料を一定量のクロロホルム：メタノール（容積比2：1）に溶解し、あらかじめ活性化されたシリカゲル焼結薄層棒（以後薄層棒と略す。クロマロッドS-II、ヤトロ社製）の下端から2cmのところにスポットした。

同様にして他の薄層棒にコレステロールアセテート、遊離脂肪酸としてパルミチン酸、コレステロールおよび磷脂質としてホスファチジルコリンをそれぞれ authentic な試料としてスポットした。

その薄層棒を展開溶媒 n-ヘキサン：エチルエーテル：ギ酸（容積比80：20：10）で15分間展開したのち、室温で約5分間風乾したのち、0.1% ヨードメタノール溶液を薄層棒に均一に噴霧し発色させ、authentic なコレステロールエステル、パルミチン酸、コレステロールおよびホスファチジルコリンに一致するスポットを同定した。

さらに水素炎イオン化検出器（イアトロスキャン

Table 1 Composition of standard mixtures

Lipid Sample	cholesterol -acetate	cholesterol -ester	palmitic acid	cholesterol	phosphatidyl -choline
A	175 (1.00)	100 (0.57)	124.4 (0.71)	12 (0.14)	50 (0.28)
B	175 (1.00)	200 (1.14)	373.2 (2.13)	50 (0.28)	150 (0.85)
C	175 (1.00)	300 (1.71)	622 (3.65)	75 (0.42)	100 (0.57)
D	175 (1.00)	400 (2.28)	870.8 (4.97)	100 (0.57)	200 (1.14)
E	175 (1.00)	500 (2.85)	1119.6 (6.39)	125 (0.71)	250 (1.42)

μg. () : Weight ratio to cholesterolacetate.

Fig. 1 The influence of sample size on the ratio of peak area of cholesterol and palmitic acid to that of cholesterolacetate.

Fig. 2 The influence of sample size on the ratio of peak area of cholesterol and phosphatidylcholine.

TH-10, ヤトロン社製)を用いて, 相対保持時間による同定ならびに定量を行った。なお水素炎イオン化検出器の測定条件は水素流量 160 ml/mm, 空気流量 2.0 l/mm, scanning speed 30 sec/scan, recorder range 50 mv である。

なお内部標準物質としてコレステロールアセテートを使用し, Table 1 に示すコレステロールアセテート, コレステロールエステル, パルミチン酸, コレステロールおよびホスファチジルコリンの混合標準試料を調製した。その混合標準試料, 約 1 μ l をマイクロシリジンを

用いて、薄層棒にスポットし、前述の展開溶媒で展開し、風乾したのち水素イオン化検出器で測定したところクロマトグラムに描かれたコレステロールアセートのピーク面積に対するコレステロールエステル、パルミチン酸、コレステロールおよびホスファチジルコリンのピーク面積は Fig 1 および 2 に示すように直線関係が得られた。

そこでAからEの試料によりコレステロールアセートのピーク面積に対するコレステロールエステル、パルミチン酸、コレステロールおよびホスファチジルコリンのピーク面積比とそれぞれの重量比とから検量曲線を作

製した。(Fig 3, 4, 5 および 6)

本操作を authentic なコレステロールエステル、パルミチン酸、コレステロールおよびホスファチジルコリンを用いて回収率を検討したところコレステロールエステル 93.6%, パルミチン酸 93.6%, コレステロール 97.7% およびホスファチジルコリン 85.8% であった。

そこでそれぞれの脂質量は回収率を考慮して算出した。

成 績

1. シンクログラフィーによる脂質の同定

歯肉縁上および歯肉縁下歯石中の脂質をシンクログラフィーにより同定した結果、展開溶媒 n -ヘキサン:エチルエーテル:ギ酸の場合、 R_f 値 0.84, 0.72, 0.25 および 0 前後のところにスポットを認めた。これを authentic な脂質から同定したところコレステロールエステル、パルミチン酸、コレステロールおよびホスファチジルコリンの R_f 値に一致した。

2. 歯肉縁上および縁下歯石中の脂質量について

歯肉縁上歯石中の脂質量については、Table 2 に示した。量的には遊離脂肪酸が一番多く、コレステロールエステル、磷脂質およびコレステロールの順であった。

歯肉縁下歯石中の脂質量については、Table 3, 4 に示した。歯石除去後 6 ヶ月に満たないグループ (I 群) でも歯石除去後 6 ヶ月以上経過したものと初めて治療を受

Fig. 3 Calibration curve of cholesterol ester.

Fig. 4 Calibration curve of palmitic acid

Fig. 5 Calibration curve of cholesterol

Fig. 6 Calibration curve of phosphatidylcholine.

Table 2 Lipid content of supragingival calculus

Lipid Name				
	cholesterolester	free fatty acid	cholesterol	phospholipid
	1.11	1.69	0.25	0.87
	0.94	1.27	0.18	0.72
	0.40	1.23	0.08	0.81
	0.50	1.37	0.12	1.13
	0.68	0.46	0.14	0.54
	0.77	0.66	0.16	0.56
	1.09	0.83	0.24	0.65
	0.86	0.62	0.21	0.57
	0.73	0.87	0.21	0.79
	1.24	0.80	0.16	0.42
	0.32	0.99	0.30	1.16
	0.32	0.95	0.10	0.61
	0.30	0.69	0.11	0.71
	0.72	0.61	0.07	0.35
	0.29	3.81	0.60	1.09
	0.30	0.62	0.11	0.31
X	0.56	1.01	0.09	0.47
	0.91	0.83	0.16	0.40
	0.87	0.93	0.28	0.60
	1.03	1.20	0.31	0.71
X	0.69	1.07	0.19	0.67
S D	0.30	0.71	0.12	0.24

μg/mg (Wet weight)

Table 3 Lipid content of subgingival calculus (I)

Lipid Name	cholesterolester	free fatty acid	cholesterol	phospholipid
	0.54	1.09	0.20	0.59
	0.32	0.58	0.15	0.75
	1.28	1.78	0.26	0.43
	0.70	0.84	0.27	0.60
	0.41	0.96	0.31	0.86
	0.44	0.99	0.29	1.00
	0.35	1.19	0.24	0.16
	0.61	1.05	0.17	0.65
	0.68	0.80	0.23	0.60
	0.94	0.67	0.26	0.90
	0.75	0.80	0.35	0.88
	1.06	1.40	0.10	0.40
	0.67	0.81	0.17	0.51
X	0.67	0.99	0.23	0.64
S D	0.27	0.30	0.06	0.22

µg/mg (Wet weight)

Table 4 Lipid content of subgingival calculus (II)

Lipid Name	cholesterolester	free fatty acid	cholesterol	phospholipid
	0.83	1.52	0.30	1.32
	0.46	1.09	0.24	0.99
	0.52	1.13	0.26	1.09
	0.69	0.47	0.18	1.13
	0.73	0.69	0.15	0.87
	0.90	0.94	0.10	0.65
	1.04	0.97	0.12	0.77
	0.33	1.20	0.20	0.78
	0.62	0.82	0.19	1.21
	0.32	0.61	0.18	1.01
	0.57	0.69	0.28	0.81
	0.95	1.03	0.34	0.49
	0.87	0.73	0.19	0.60
	0.41	0.70	0.11	0.97
	0.40	0.97	0.10	1.40
	0.65	1.21	0.23	0.60
	1.00	1.18	0.25	0.88
X	0.66	0.99	0.23	0.91
S D	0.23	0.30	0.06	0.25

µg/mg (Wet weight)

けるグループ（Ⅱ群）でも、脂質量が多いのは遊離脂肪酸で、次いで燐脂質、コレステロールエステルおよびコレステロールの順であった。

これらの脂質量を比較すると歯肉縁下歯石（Ⅰ群）では、歯肉縁上歯石との間に検出された4脂質とも差がなかったが、歯肉縁下歯石（Ⅱ群）では、歯肉上歯石および歯肉縁下歯石（Ⅰ群）にくらべ燐脂質量のみが多く、これらの間に有意差（ $P < 0.05$ ）が認められた。

総括および検討

歯石は、その器械的刺激によって歯周組織に充血、腫脹、上皮付着部の破壊および圧迫などの悪影響をおよぼし、炎症を増悪させ組織を傷害するものであり、歯石を除去することにより歯周疾患に良好な結果をもたらすことは臨床的に異論のないところである。

歯石中の脂質について Glock¹⁾ らは歯石成分のうち有機物は11.05%で、脂肪として2.71%であったと報告している。Mandel^{3,4)} らによれば歯石中の脂質は主としてコレステロールエステル、遊離脂肪酸、コレステロール、燐脂質およびトリグリセライドであると報告している。また伊藤⁶⁾ らは薄層クロマトグラフィーにより、コレステロールエステル、コレステロールおよび燐脂質の存在を認め、さらに燐脂質の中にはホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンのあることを同定している。

著者はシンクログラフィーに用いるケイ酸アルミナを石英棒に焼結した薄層クロマトグラフィー用シリカゲル焼結薄層棒をもちいて歯石中の脂質を同定したところコレステロール、遊離脂肪酸、コレステロールおよび燐脂質であることを認めた。しかし Mandel⁴⁾ らが報告しているトリグリセライドは検出できなかった。

歯肉縁上歯石および歯肉縁下歯石中の脂質量を測定したものとしては液体クロマトグラフィーを用いた Slomlany⁵⁾ らの報告がある。それによると歯肉縁上歯石では量的にはトリグリセライドが一番多く糖脂質、遊離脂肪酸、コレステロールエステル、コレステロールおよび燐脂質の順であり、歯肉縁下歯石では糖脂質が一番多く、遊離脂肪酸、トリグリセライド、コレステロールエステル、コレステロールおよび燐脂質の順であったとのべている。また Mandel³⁾ らは歯肉縁上および縁下歯石とも差異がなく、一番多いのは遊離脂肪酸であり、次にコレステロールエステル、燐脂質およびコレステロールの順であったと報告している。

著者は脂質の定量法としては、定量値の再現性、信頼度、感度などにおいて優れた分析法であることが証明されている^{13,14)} 薄層クロマトグラフィーと水素炎検出器とを組み合わせたシンクログラフィーを用いた。

その結果、条件や測定方法に違いがあり直接比較できないが著者の成績は Mandel⁴⁾ の報告に近似していた。しかし Mandel⁴⁾ らは、歯石形成の新旧に考慮をはらっておらず、著者の成績では歯肉縁下歯石、とくに初めて治療を受けた患者および以前治療を受けながら一年以上放置していた患者の歯石、すなわち陳旧性の歯石では燐脂質量が異常に多かったことである。この理由は本成績の範囲では不明であるが歯垢が成熟するにつれてグラム陰性嫌気性菌が増加¹⁵⁾ することから、ある種の菌が菌体凝集¹¹⁾ を起こした結果に基づくものではないかと思われる。しかし剝離上皮、貪食細胞および食物残渣なども混在しており、これらに由来する可能性もあるので、今後検討する必要があるう。

結 論

1. 歯肉縁上歯石および歯肉縁下歯石中にコレステロールエステル、遊離脂肪酸、コレステロールおよび燐脂質の存在を認めた。

2. 歯肉縁上歯石中の脂質は、量的に遊離脂肪酸が一番多く、コレステロールエステル、コレステロールおよび燐脂質の順であった。

3. 歯肉縁下歯石の脂質は、歯石除去後6ヵ月に満たないグループでも歯石除去後6ヵ月以上経過したものと初めて治療を受けるグループでも、脂質量が多いのは、遊離脂肪酸で、次いで燐脂質、コレステロールエステルおよびコレステロールの順であった。

4. 脂質量を比較すると歯肉縁下歯石（Ⅰ群）では歯肉縁上歯石との間に検出された4脂質とも差がなかったが、歯肉縁下歯石（Ⅱ群）では歯肉縁上歯石および歯肉縁下歯石（Ⅰ群）に比して燐脂質量が多く、その間に有意差（ $P < 0.05$ ）が認められた。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った村井正大教授に心より深謝を捧げると共に、御協力を頂いた教職員各位に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Glock, G.E. and Murray, M.M. : Chemical In-

- vestigation of Salivary., J. dent. Res., Vol 17 : 257-264, 1938.
- 2) Little, M., Bowman, L. and Dirksen, T. : The lipids of Supragingival Calculus, J. dent. Res. Vol 43 : 836, 1964.
 - 3) Mandel, I.D. and Levy, B.M. : Studies on Salivary Calculus. [1] Histochemical and Chemical Investigations of Supra-and Subgingival Calculus, Oral. Surg. Oral, Med., Vol 10 : 874-884, 1957.
 - 4) Mandel, I.D. and Eisenstein, A. : Lipid in human Salivary secretion and Salivary Calculus, Archs Oral. Biol., Vol 14 : 231-233, 1969.
 - 5) Slomlany, A., Slomlany, B.L. and Mandel, I. D. : Lipid Composition of Human Parotid Saliva from Light and Heavy dental Calculus-Formers, Archs Oral Biol., Vol 26 : 151-152, 1981.
 - 6) 伊藤公一, 大谷一好, 金森誠二, 芹沢千洋, 村井正大 : 歯石中の脂質について, 日歯周誌, 15 卷 : 223-226, 1973.
 - 7) 高添一郎 : 菌体石灰化における脂質の役割. 1. 抽出脂質の Ca 結合能と石灰化能, 歯学報, 69 卷 : 885-886, 1969.
 - 8) 高添一郎 : 菌体石灰化における脂質の役割. II. 抽出脂質の化学的性状, 歯学報, 69 卷 : 886-887, 1969.
 - 9) 高添一郎 : 菌体石灰化における脂質の役割. III. Membrane syrtem の形態学, 歯学報, 69 卷 : 887-888, 1969.
 - 10) 竹島弘道, 高添一郎 : Phospholipid による 歯垢細菌の凝集, 歯学報, 77 卷 : 237-238, 1977.
 - 11) 高添一郎, 松久保隆, 加藤登志子 : 歯垢細菌のリン脂質による菌体凝集, 日細菌誌, 32 卷 : 256-257, 1977.
 - 12) Folch, J., Lees, M. and Sloanestanley, G.H : A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissue, J. biol. Chem. Vol 226 : 497-509, 1957.
 - 13) 田中正康, 伊藤俊洋, 金子 弘 : シンクログラフィーによる中性脂質の定量に関する研究, 油化学, 25 卷 : 263-265, 1976.
 - 14) 大屋修治 : 歯周ポケット滲出液中の磷脂質量の変動に関する研究, 日歯周誌, 23 : 34-42, 1981.
 - 15) Löe, H., Theilade, E. and Jensen, S.B. : Experimental Gingivitis in Man, J. Perio., Vol 36 : 177-187, 1965.
-