歯周病関連細菌の磷脂質組成およびその量について

飯 塚 哲 也

日本大学歯学部歯周病学教室

(指導：村井正大教授)

(昭和61年12月11日受付)

Phospholipid Components in Some Subgingival Bacteria Which are Related to Periodontitis

Tetsuya IIZUKA

Department of Periodontology Nihon University School of Dentistry

(Director : Prof. Seidai MURAI)

The purpose of this study was to evaluate the components and the quantity of phospholipid in the whole cell or in its fractional portion of the cell envelope with the following bacteria strains: *Capnocytophaga* sp., *Fusobacterium nucleatum* or *Bacteroides gingivalis* which have been reported to be related to periodontitis, and two strains of *Escherichia coli*.

F. nucleatum strain ATCC25586, *E. coli* strains K12C600 and ATCC11775 were incubated for 48 hours at 37°C anaerobically with the BHI broth. *Capnocytophaga* sp. strain DT19 and *B. gingivalis* 381 strain were also incubated with ABCM broth under the same condition. Following the incubation, they were separated into the cell envelope fraction by a mechanical disintegration of different centrifugations. The Bligh and Dyer's method was used to extract the cellular lipids of each bacteria. The phospholipid component of each bacteria was determined by the two-dimensional thin-layer chromatography and a flame ionization detector (FID) thin-layer. FID thin-layer was used for the quantitative determination of phospholipids because of its reliability, reproducibility, or sensitivity for their quantitative analyses.

Therefore, the following results were obtained :

1. *Capnocytophaga* sp. strain DT19

Both of the whole cell and the cell envelope included phosphatidyl ethanolamine (PE) of the main part of phospholipid. Phosphatidyl inositol (PI) was also recognized, however, cardiolipin (CL), phosphatidyl glycerol (PG) and other unidentified substance were slightly recognized.

2. *F. nucleatum* strain ATCC25586

Both of the whole cell and the cell envelope were occupied the major part of the phospholipid with PE and PG. The majority of phospholipid was PE in the whole cell, and PG was in the cell envelope. Phosphatidyl choline (PC), CL and PI were slightly contained.

3. *B. gingivalis* 381 strain

PG, CL, PE and phosphatidyl serine (PS) composed the major part of phospholipid in the whole cell, in particular, the quantity of PG was most. PI was recognized slightly. The cell envelope was mainly occupied by PG, PS, and CL, although PI and PE were slightly recognizable.

4. The total amounts of phospholipid of the three bacteria strains, which are related to periodontitis, exceeded that of the two *E. coli* strains.

Key words : Periodontitis, Phospholipid, Bacteria, Whole cell, Cell envelope

要旨 : 歯周病関連細菌として *Capnocytophaga* sp. DT 19, *F. nucleatum* ATCC25586, *B. gingivalis* 381 の3菌株と *E. coli* K 12 C600, ATCC 11775 の2菌株を用い, whole cell および cell envelope 画分の磷脂質組成とその量の検討を試みた。各細菌の磷脂質組成は二次元薄層クロマトグラフィーおよびシンクログラフィーにより同定し, 定量した。

いずれの菌株でも CL, PG, PE, PI の存在を認めた。*Capnocytophaga* sp. では1つの未同定物質を認め, whole cell と cell envelope 共に PE が最も多く, ついで PI であった。*F. nucleatum* では PC も認め, whole cell では PE が最も多く, ついで PG が, cell envelope では PG が最も多く, ついで PE であった。*B. gingivalis* では PS も認め, whole cell では PG が最も多く, ついで CL が, cell envelope では PG が最も多く, ついで PS であった。

whole cell および cell envelope 中の総磷脂質量は歯周病関連細菌である3菌株が *E. coli* に比較して多かった。

索引用語 : 歯周病, 磷脂質, 細菌, 菌体, 細胞表層

緒 言

歯周病の発症因子として歯垢細菌が重要な役割を演じていることは周知の事実である。とくに歯周病が進行し重症になるにしたがい歯肉縁下歯垢中に嫌気性のグラム陰性菌が増加することが報告されている¹⁻⁶⁾。また歯石形成過程にも細菌の磷脂質が関与しているとの報告⁷⁻¹²⁾から, 著者はグラム陰性菌の膜成分, とくに磷脂質が歯周組織破壊と何らかの役割を演じているのではないかと考えている。しかし歯周病に関係のある細菌体の磷脂質についての報告はすくなく, *Streptococcus mutans*¹³⁾, *Capnocytophaga sptigena*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga gingivalis*¹⁴⁾, *Bacteroides melaninogenicus*¹⁵⁾ についての報告があるにすぎず, 歯周病関連細菌に関する磷脂質の組成および量については資料がすくなく。

そこで著者は, 歯周病関連細菌として注目されている *Capnocytophaga* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides gingivalis* の3菌株と歯周病に関連のすくなくと考えられているが, 同じグラム陰性菌である *Escherichia coli* を用い, whole cell および cell envelope 画分の磷脂質組成とその量について検討を試みたので報告する。

材料および方法

1. 使用菌株, 培地および試薬

使用菌株としては, 日本大学歯学部細菌学教室保存の *Capnocytophaga* sp. DT 19 株, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 株, *Escherichia coli* ATCC 11775 株および

日本大学松戸歯学部生化学教室保存の *Bacteroides gingivalis* 381 株, *Escherichia coli* K 12 C 600 株を実験に供した。また使用培地は Brain heart infusion broth (Difco 社製; 以下 BHI broth と略記する) および ABCM broth (栄研化学社製) を用いた。authentic な磷脂質は cardiolipin, phosphatidyl glycerol, phosphatidyl serine, phosphatidyl choline, phosphatidic acid (Serdary Research Laboratories 社製; 以下それぞれ CL, PG, PS, PC, PA と略記する) および phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl inositol, liso-phosphatidyl ethanolamine (Avanti Polar Lipids 社製; 以下それぞれ PE, PI, L-PE と略記する) を用い, 内部標準物質は sphingomyelin (Avanti Polar-Lipids 社製; 以下 IS と略記する) を用いた。またその他の試薬は市販の特級のものをを用いた。

2. Whole cell 試料の調製

Fusobacterium nucleatum ATCC 25586 株, *Escherichia coli* K 12 C 600 株, *Escherichia coli* ATCC 11775 株を BHI broth で, *Capnocytophaga* sp. DT 19 株, *Bacteroides gingivalis* 381 株を ABCM broth で, 37°C 48 時間嫌気培養 (10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂) 後, 3,000×g, 15 分間遠心分離し, 集菌した。この菌体を 0.154 M NaCl 加 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) で 3 回, 脱イオン水で 2 回洗浄した。

3. Cell envelope 画分¹⁶⁾

各菌体を集菌洗浄後, 湿重量 7.5 g に対し, 1 M NaCl 加 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) を 22.5 ml とガラスビーズ (0.17~0.18 φmm; B. Braun Melsungen 社製) 30 g を加え, Ultrasonic Disruptor Model UR-200 P (Tomy Seiko 社製) で, 20 KHz 200 W で 90 秒間, 氷冷下で超音波処理を行い, 480×g で 20 分間遠心分離した。さらにその上清を 100,000×g で 1 時間遠心分離を行い,

表 1 混 合 標 準 試 料

試 料	燐 脂 質								
	SM (IS)	CL	PG	PE	PS	PC	PA	PI	L-PE
A	500(1.0)	50(0.1)	1600(3.2)	100(0.2)	800(1.6)	15(0.03)	1000(2.0)	50(0.1)	1000(2.0)
B	500(1.0)	100(0.2)	800(1.6)	300(0.6)	600(1.2)	30(0.06)	500(1.0)	100(0.2)	500(1.0)
C	500(1.0)	200(0.4)	400(0.8)	800(1.6)	300(0.6)	50(0.1)	300(0.6)	300(0.6)	300(0.6)
D	500(1.0)	400(0.8)	200(0.4)	1600(3.2)	200(0.4)	100(0.2)	100(0.2)	500(1.0)	100(0.2)
E	500(1.0)	800(1.6)	100(0.2)	3200(6.4)	100(0.2)	400(0.8)	50(0.1)	1000(2.0)	50(0.1)

(μg)

() : IS に対する重量比

その沈澱を 1 M NaCl 加 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) で懸濁し、100 型分光光度計 (日立社製) を用い 260 nm と 280 nm において吸光度を測定し、核酸の混在が認められなくなるまで同 buffer で洗浄した。その後、脱イオン水にて 3 回洗浄し、cell envelope 画分とした。

4. 脂質の抽出

脂質の抽出は Bligh and Dyer の方法¹⁷⁾を用いた。すなわち whole cell の場合は湿重量で約 180~260 mg, cell envelope 画分の場合は湿重量で約 30~70 mg とり、それぞれ共栓つきスピッツグラスに蒸留水 1.0 ml で懸濁し、さらに 2.5 ml のメタノールおよび 1.2 ml のクロロホルムを加え、2 分間激しく振とうし、約 10 分間室温に放置した。ついで 1.2 ml のクロロホルムを加え、再度 30 秒間激しく振とうし、さらに 1.2 ml の蒸留水を加え、同様に振とうした。その後、1600×g 15 分間遠心分離しクロロホルム層を回収し、この可溶部に脂質が検出できなくなるまで同様の操作を繰り返し行った。回収した可溶部を窒素気流下で減圧乾固し、薄層クロマトグラフィーおよびシンクログラフィー用試料とした。

5. 薄層クロマトグラフィー

試料を一定量のクロロホルム : メタノール (2 : 1 v/v) に溶解し、あらかじめ活性化された薄層 (Kieselgel 60 F Merck 社製, 20×20 cm, 厚さ 0.2 mm) の左側下端より 2 cm のところにスポットした。同様に他の薄層に CL, PG, PE, PS, PC, PA, PI, L-PE を authentic な試料としてスポットした。その薄層を一次元展開溶媒クロロホルム : メタノール : 水 (70 : 25 : 4 v/v) で 1 時間展開した後、室温で 5 分間風乾し、ついで二次元展開溶媒クロロホルム : メタノール : アンモニア (65 : 35 : 5 v/v) で 1 時間展開し、一次元の場合と同様に室温で風乾した後、Dittmer-Lester 試薬¹⁸⁾を薄層上に均一に噴霧し発色させ authentic な CL, PG, PE, PS, PC, PA, PI,

L-PE に一致するスポットを同定した。また ninhydrin 試薬¹⁹⁾および dragendorff 試薬²⁰⁾を用いてスポットを発色させ再確認した。

6. シンクログラフィー^{21, 22)}

試料を一定量のクロロホルム : メタノール (2 : 1 v/v) 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 (クロマロッド S-II, ヤترون社製 ; 以下薄層棒と略記する) の下端から 2 cm のところにスポットした。同様に他の薄層棒に authentic な CL, PG, PE, PS, PC, PA, PI, L-PE をそれぞれスポットした。その薄層棒を展開溶媒クロロホルム : メタノール : 水 : アンモニア (40 : 20 : 2 : 0.25 v/v) で 45 分間展開を行い、110°C 5 分間風乾した後、Dittmer-Lester 試薬¹⁸⁾を薄層棒上に均一に噴霧し発色させ authentic な CL, PG, PE, PS, PC, PA, PI, L-PE 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 TH-10, ヤترون社製) を用いて、相対保持時間 (以下 rRT と略記する) を求め同定ならびに定量も行った。水素炎イオン化検出器の測定条件は、水素流量 160 ml/min, 空気流量 2,000 ml/min, scanning speed 30 sec/scan, chart speed 120 mm/min とした。

検量曲線作製にあたり、表 1 に示す IS, CL, PG, PE, PS, PC, PA, PI, L-PE の含有率の異なる 5 種類の混合標準試料を調整し、IS のピーク面積に対する CL, PG, PE, PS, PC, PA, PI, L-PE のピーク面積と重量比とから検量曲線を作製した (図 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)。

authentic な CL, PG, PE, PS, PC, PA, PI, L-PE を用いて抽出操作を通して行い、回収率を検討したところ CL 92.3%, PG 95.1%, PE 94.6%, PS 90.2%, PC 94.4%, PA 92.6%, PI 96.5%, L-PE 93.7% であった。そこで試料中の各燐脂質量は回収率を考慮して算出し、以上の全操作を各菌株について 5 例行い、その平均値および標

a/a : IS のピーク面積に対する CL のピーク面積の比
w/w : 混合標準試料における IS の重量に対する CL の重量の比

図 1 CL の検量曲線

a/a : IS のピーク面積における PE のピーク面積の比
w/w : 混合標準試料における IS の重量に対する PE の重量の比

図 3 PE の検量曲線

a/a : IS のピーク面積に対する PG のピーク面積の比
w/w : 混合標準試料における IS の重量に対する PG の重量の比

図 2 PG の検量曲線

準偏差を求めた。また各菌株の whole cell および cell envelope の磷脂質量はそれぞれ各磷脂質の総和である。

成 績

1. 薄層クロマトグラフィーおよびシンクログラフィー

a/a : IS のピーク面積に対する PS のピーク面積の比
w/w : 混合標準試料における IS の重量に対する PS の重量の比

図 4 PS の検量曲線

ーによる authentic な磷脂質の Rf 値と rRT 値
薄層クロマトグラフィーおよびシンクログラフィーによる authentic な磷脂質の Rf 値と rRT 値は表 2 に示した。

a/a : IS のピーク面積に対する PC のピーク面積の比
w/w : 混合標準試料における IS の重量に対する PC の重量の比

図 5 PC の検量曲線

a/a : IS のピーク面積に対する PI のピーク面積の比
w/w : 混合標準試料における IS の重量に対する PI の重量の比

図 7 PI の検量曲線

a/a : IS のピーク面積に対する PA のピーク面積の比
w/w : 混合標準試料における IS の重量に対する PA の重量の比

図 6 PA の検量曲線

a/a : IS のピーク面積に対する L-PE のピーク面積の比
w/w : 混合標準試料における IS の重量に対する L-PE の重量の比

図 8 L-PE の検量曲線

2. 各菌株の磷脂質組成および量

各菌株の磷脂質組成については表 2 の authentic な磷脂質の Rf 値および rRT 値より同定した。その結果と、各菌株の whole cell および cell envelope の湿重量 1 mg 中の各磷脂質量の平均値と標準偏差および重量パーセントを表 3 に示した。各菌株について述べると、

1) *Capnocytophaga* sp. DT 19 株

Capnocytophaga sp. DT 19 株では CL, PG, PE, PI

と 1 つの未同定物質の存在を認めた。

whole cell では PE が $10.20 \pm 0.06 \mu\text{g}$ で最も多く、PI が $4.88 \pm 0.42 \mu\text{g}$, ついで CL, PG の順であった。

cell envelope では PE が $11.48 \pm 0.64 \mu\text{g}$ で最も多く、PI が $5.05 \pm 0.48 \mu\text{g}$, ついで PG, CL の順であった。

2) *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 株

表 2 薄層クロマトグラフィーおよびシンクログラフィーによる authentic な磷脂質の Rf 値と rRT 値

			磷 脂 質							
展 開 溶 媒			CL	PG	PE	PS	PC	PA	PI	L-PE
薄層クロマトグラフィー	クロロホルム：メタノール ：水 (70：25：4 v/v)	authentic Rf 値	0.31	0.25	0.42	0.13	0.17	0.15	0.02	0.20
	クロロホルム：メタノール ：アンモニア (65：35：5 v/v)	authentic Rf 値	0.48	0.42	0.32	0.07	0.20	0.50	0.10	0.18
シンクログラフィー	クロロホルム：メタノール ：水：アンモニア (40：20：2：0.25 v/v)	authentic Rf 値	0.65	0.57	0.42	0.25	0.17	0.15	0.02	0.32
		rRT 値 (second)	9.0	13.2	16.2	19.8	21.0	22.2	26.4	18.0

Fusobacterium nucleatum ATCC 25586 株では CL, PG, PE, PC, PI の存在を認めた。

whole cell では PE が $5.97 \pm 0.21 \mu\text{g}$ で最も多く, PG が $2.33 \pm 0.24 \mu\text{g}$, ついで CL, PC および PI の順であった。

cell envelope では PG が $16.19 \pm 0.54 \mu\text{g}$ で最も多く, PE が $4.85 \pm 0.16 \mu\text{g}$, ついで CL, PC および PI の順であった。

3) *Bacteroides gingivalis* 381 株

Bacteroides gingivalis 381 株では CL, PG, PE, PS, PI の存在を認めた。

whole cell では PG が $2.92 \pm 0.29 \mu\text{g}$ で最も多く, CL が $2.10 \pm 0.04 \mu\text{g}$, ついで PE, PS および PI の順であった。

cell envelope では PG が $6.50 \pm 0.39 \mu\text{g}$ で最も多く, PS が $6.16 \pm 0.14 \mu\text{g}$, CL が $5.91 \pm 0.36 \mu\text{g}$, ついで PI, PE の順であった。

4) *Escherichia coli* K 12 C 600 株

Escherichia coli K 12 C 600 株では CL, PG, PE, PA, PI の存在を認めた。

whole cell では PE が $4.83 \pm 0.08 \mu\text{g}$ で最も多く, ついで PG, CL, PI および PA の順であった。

cell envelope では PE が $8.63 \pm 0.39 \mu\text{g}$ で最も多く, PG が $5.78 \pm 0.39 \mu\text{g}$, ついで CL および PA と PI の順であった。

5) *Escherichia coli* ATCC 11775 株

Escherichia coli ATCC 11775 株では CL, PG, PE, PA, PI の存在を認めた。

whole cell では PE が $5.00 \pm 0.20 \mu\text{g}$ で最も多く, ついで PG, CL, PI および PA の順であった。

cell envelope では PE が $6.20 \pm 0.54 \mu\text{g}$ で最も多く, PG が $3.53 \pm 0.19 \mu\text{g}$, ついで CL, PI および PA の順であった。

3. 各菌株の whole cell および cell envelope 中の総磷脂質量

各菌株の whole cell および cell envelope 中の総磷脂質量については表 4 に示すような結果を得た。すなわち whole cell および cell envelope 中の総磷脂質量は, 歯周病関連細菌である 3 菌株の方が *Escherichia coli* K 12 C 600 株と *Escherichia coli* ATCC 11775 株に比較して whole cell では約 1.2~2.8 倍, cell envelope では約 1.6~1.8 倍多かった。

総括および検討

歯周病の歯周組織破壊は, 歯周ポケット内に存在する細菌の菌体成分または産生物の直接的作用と間接的作用とによって進行していくとされている^{4,6,23~26)}。さらに菌体成分の中で磷脂質は, 複合多糖, 糖タンパクなどと共に重要な構成成分でもある^{27,28)}。また菌体磷脂質が歯

表 3 各細菌の磷脂質組成および量

		磷 脂 質							
細菌名	細胞画分	CL	PG	PE	PS	PC	PA	PI	L-PE
<i>Capnocytophaga</i> sp. DT19	whole cell	2.58±0.08 (13.1±0.4)	2.07±0.08 (10.5±0.4)	10.20±0.06 (51.7±0.2)				4.88±0.42 (24.7±2.1)	
	cell envelope	3.32±0.07 (14.0±0.8)	3.87±0.26 (16.3±1.1)	11.48±0.64 (48.4±2.7)				5.05±0.48 (21.4±2.0)	
<i>Fusobacterium</i> <i>nucleatum</i> ATCC25586	whole cell	1.02±0.18 (9.5±1.7)	2.33±0.24 (21.9±2.3)	5.97±0.21 (56.0±2.0)		0.93±0.03 (8.8±0.3)		0.41±0.03 (3.8±0.2)	
	cell envelope	3.03±0.03 (12.4±0.2)	16.19±0.54 (66.6±2.2)	4.85±0.16 (20.0±0.6)		0.26±0.03 (1.0±0.2)		trace (trace)	
<i>Bacteroides</i> <i>gingivalis</i> 381	whole cell	2.10±0.04 (25.4±0.5)	2.92±0.29 (35.4±3.5)	1.59±0.01 (19.3±0.2)	1.40±0.04 (17.0±0.5)			0.56±0.09 (6.8±1.1)	
	cell envelope	5.91±0.36 (26.2±1.6)	6.50±0.39 (28.8±1.8)	1.65±0.20 (7.3±0.8)	6.16±0.14 (27.3±0.6)			1.84±0.17 (8.1±0.8)	
<i>Escherichia</i> <i>coli</i> K12 C600	whole cell	0.57±0.02 (8.6±0.2)	1.65±0.07 (15.7±1.1)	4.83±0.08 (72.9±1.2)			trace (trace)	0.19±0.02 (2.8±0.2)	
	cell envelope	1.31±0.14 (8.3±0.8)	5.78±0.39 (36.7±2.5)	8.63±0.39 (54.9±1.3)			trace (trace)	trace (trace)	
<i>Escherichia</i> <i>coli</i> ATCC11775	whole cell	0.81±0.05 (10.9±0.7)	1.28±0.09 (17.2±1.3)	5.00±0.20 (67.0±2.6)			trace (trace)	0.37±0.07 (5.0±0.9)	
	cell envelope	1.26±0.11 (10.7±0.9)	3.53±0.19 (30.1±1.6)	6.20±0.54 (52.9±4.6)			trace (trace)	0.73±0.12 (6.2±1.1)	

上段：μg/mg・wet weight

下段：(重量パーセント)

MEAN±SD

N=5

表 4 各細菌の whole cell および cell envelope 中の磷脂質量

菌 種	whole cell	cell envelope
<i>Capnocytophaga</i> sp. DT19	19.73±0.39	23.72±1.18
<i>Fusobacterium</i> <i>nucleatum</i> ATCC25586	10.66±0.36	24.33±0.67
<i>Bacteroides</i> <i>gingivalis</i> 381	8.57±0.40	22.06±0.78
<i>Escherichia coli</i> K12 C600	6.64±0.14	15.72±0.66
<i>Escherichia coli</i> ATCC11775	7.46±0.31	11.72±0.86

(μg/mg・wet weight)

MEAN±SD

N=5

石形成過程に関与しているとの報告⁷⁻¹²⁾から、著者はグラム陰性菌の膜成分、とくに磷脂質が歯周組織破壊に何らかの役割を演じているのではないかと考えている。しかし歯周病関連細菌に関する磷脂質の組成および量についての資料はすくない¹³⁻¹⁵⁾。

そこで著者は、歯周ポケットの微生物叢の中で歯周病関連細菌として注目されている *Capnocytophaga* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides gingivalis* の各1菌株と、歯周病に関連の少ないと考えられているが同じグラム陰性菌である *Escherichia coli* を用い、これらの菌株間で磷脂質組成および量に特徴的な差があるのではないかと考え、各菌株の whole cell および cell envelope 画分の磷脂質組成および量についての検討を企画した。

磷脂質の同定は、薄層クロマトグラフィーの二次元展開およびシンクログラフィーによる authentic な磷脂質の R_f 値と rRT 値から行った。

また磷脂質の定量法としては、定量値の再現性、信頼度、感度などに優れた分析法²⁹⁻³³⁾であることが証明されている薄層クロマトグラフィーと水素炎イオン化検出器

とを組み合わせたシンクログラフィーを用いて各菌株の磷脂質組成とそれぞれの量について検討を試みた。

各菌株における各磷脂質の重量パーセントの比較を whole cell で行うと、

Capnocytophaga sp. DT 19 株では CL, PG, PE, PI および 1 つの未同定物質を認め、PE が約 52% と最も多く、ついで PI が約 25% と高い割合を示した。Holt ら¹⁴⁾ は *Capnocytophaga* sp. 3 菌株で PE, L-PE といくつかの未同定物質を認め、PE が約 62~67%, ついで L-PE が約 10~14% であったと報告しているが、著者は L-PE を同定できなかった。

Fusobacterium nucleatum ATCC 25586 株では CL, PG, PE, PC, PI を認め、PE, PG, CL, PI の割合が *Escherichia coli* 2 菌株と類似した値であったが、PC が約 9% で CL とほぼ同じ割合を示した。

Bacteroides gingivalis 381 株では CL, PG, PE, PS, PI を認め、PG が約 35% で最も多く、また PS が約 17% で PE とほぼ同じ割合を示した。Rizza ら¹⁵⁾ は *Bacteroides melaninogenicus* CR-2A1 株で CL, PG, PE, PS, PA を認め、PG と PE が共に約 45% で、PS が約 7% であったと報告しているが、著者の結果とは PG と PS が比較的高い割合を示す点で類似していた。

Escherichia coli 2 菌株では CL, PG, PE, PA, PI を認め、PE が約 67~73% で最も多く、PG が約 16~17%, CL が約 9~11%, ついで PI, PA の順であった。Kane-masa ら^{34, 35)} は *Escherichia coli* B 株で、Shibuya ら^{36, 37)} は *Escherichia coli* K 12 の近縁株とともに CL, PG, PE, PA を認め、また各磷脂質の割合も報告している。この割合については著者とほぼ同様であった。

歯周病関連細菌である 3 菌株と、*Escherichia coli* 2 菌株では CL, PG, PE, PI が共通して認められ、他に *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 株では PC が、*Bacteroides gingivalis* 381 株では PS が、*Escherichia coli* 2 菌株では PA が認められた点で異なっていた。

cell envelope の磷脂質組成と whole cell のそれを比較してみると、歯周病関連細菌である 3 菌株と *Escherichia coli* では PE の割合が少ない点で、また *Bacteroides gingivalis* 381 株以外では PG の割合が多い点で共通していた。しかし、*Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 株では PE と PG の割合が逆転し、cell envelope の方が PC の割合が少なく、*Bacteroides gingivalis* 381 株では cell envelope の方が PS の割合が多かった。

以上の結果、各菌株間における磷脂質組成およびそれぞれの量にやや違いが認められた。しかしながら磷脂質

の総量についてみると歯周病関連細菌である 3 菌株の方が *Escherichia coli* より 2 倍程度多いことが判明した。ここで明らかになった歯周病関連細菌と非関連細菌のそれぞれ菌体を構成する磷脂質組成の違い、その量的な差は歯周組織破壊と何らかの関連があることを示唆されるものであろう。

結 論

歯周組織破壊に何らかの役割を演じているのではないかと考えられる菌体磷脂質を歯周病関連細菌 3 菌株と *Escherichia coli* について二次元薄層クロマトグラフィーおよびシンクログラフィーを用いて同定し、さらにシンクログラフィーで定量も行い、以下の結果を得た。

1. *Capnocytophaga* sp. DT 19 株では CL, PG, PE, PI と 1 つの未同定物質の存在を認め、whole cell と cell envelope 共に PE が最も多く、ついで PI であった。

2. *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 株では CL, PG, PE, PC, PI の存在を認め、whole cell では PE が最も多く、ついで PG が、cell envelope では PG が最も多く、ついで PE であった。

3. *Bacteroides gingivalis* 381 株では CL, PG, PE, PS, PI の存在を認め、whole cell では PG が最も多く、ついで CL が、cell envelope では PG が最も多く、ついで PS であった。

4. Whole cell および cell envelope 中の総磷脂質量は、歯周病関連細菌である 3 菌株の方が *Escherichia coli* に比較して多かった。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導、御校閲を賜った村井正大教授に深く感謝いたします。

さらに、貴重な細菌を御提供、丁寧な御教授と鞭達をいただいた本学細菌学教室林 邦雄教授、日本大学松戸歯学部生化学教室我孫子宣光講師に深く感謝いたします。

最後に終始、御助言、御協力をいただいた伊藤公一教授をはじめとする歯周病学教室の各位に御礼申し上げます。

本研究は一部文部省科学研究費（昭和 61 年度奨励研究 A、課題番号 61771550）の補助により行われたことを付記する。

文 献

- 1) Slots, J.: The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. Scand. J. Dent.

- Res., 85 : 114-121, 1977.
- 2) Slots, J., Moenbo, D., Langebaek, J. and Frandsen, A. : Microbiota of gingivitis in man. Scand. J. Dent. Res., 86 : 174-181, 1978.
 - 3) Slots, J. : Subgingival microflora and periodontal Disease. J. Clin. Periodontol., 6 : 351-382, 1979.
 - 4) Newman, M.G., Socransky, S.S., Savitt, E.D., Propas, D.A. and Crawford, A. : Studies of the microbiology of periodontitis. J. Periodontol., 47 : 373-379, 1976.
 - 5) Savitt, E.D. and Socransky, S.S. : Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. J. Periodont. Res., 19 : 111-123, 1984.
 - 6) Tanner, A.C.R., Haffer, C., Bratthall, G.T., Visconti, R.A. and Socransky, S.S. : A Study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J. Clin. Periodontol., 6 : 278-307, 1979.
 - 7) 奥村 毅 : 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. 日歯周誌, 25 : 1-8, 1983.
 - 8) 高添一郎 : 菌体石灰化における脂質の役割Ⅰ・抽出脂質の Ca 結合能と石灰化能 [抄録]. 歯科学報, 69 : 885-886, 1969.
 - 9) 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 [抄録]. 歯科学報, 69 : 886-887, 1969.
 - 10) 高添一郎 : 菌体石灰化における脂質の役割Ⅲ・Membrane system の形態学 [抄録]. 歯科学報, 69 : 887-888, 1969.
 - 11) 竹島弘道, 高添一郎 : Phospholipid による歯垢細菌の凝集 [抄録]. 歯科学報, 77 : 237-238, 1977.
 - 12) 山本綾子, 高添一郎 : 口腔内 *Bacteroides melaninogenicus* の Chemotactic activity [抄録]. 歯科学報, 77 : 238-239, 1977.
 - 13) Szabo, E.I., Amdur, B.H. and Socransky, S.S. : Lipid composition of *Streptococcus mutans*. Caries Res., 12 : 21-27, 1978.
 - 14) Holt, S.C., Doundoulakis, J. and Takacs, B. J. : Phospholipid composition of gliding bacteria : oral isolates of *Capnocytophaga* compared with *Sporocytophaga*. Infect. Immun., 26 : 305-310, 1979.
 - 15) Rizza, V., Tucker, A.N. and White, D.C. : Lipids of *Bacteroides melaninogenicus*. J. Bact., 101 : 84-91, 1970.
 - 16) Murayama, Y., Muranishi, K., Okada, H., Kato, K., Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Kawasaki, A. and Ogawa, T. : Immunological activities of *Capnocytophaga* cellular components. Infect Immun., 36 : 876-884, 1982.
 - 17) Bligh, E.G. and Dyer, W.J. : A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37 : 911-917, 1959.
 - 18) Dittmer, J.C. and Lester, R.L. : A simple specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. J. Lipid Res., 5 : 126-127, 1964.
 - 19) 太田勝之, 平塚欽也, 北条雅樹, 等々力正勝, 村井正大 : 歯周病患者の歯肉中の脂質について. 日保存歯誌, 12 : 280-283, 1970.
 - 20) Kate, M. : 山川民夫, 斎藤国彦, 林 陽訳 : 脂質研究法, 生化学実験法 5, 第1版, 東京化学同人, 東京, 1975, 122-145.
 - 21) 田中正康, 伊藤俊洋, 金子 弘 : シンクログラフィによる中性脂質の定量に関する研究. 油化学, 25 : 263-265, 1976.
 - 22) 田中正康, 伊藤俊洋, 金子 弘 : シンクログラフィによる極性脂質の定量に関する研究. 油化学, 25 : 454-457, 1977.
 - 23) Socransky, S.S. : Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J. Dent. Res. Supplement, 49 : 203-222, 1970.
 - 24) Genco, R.J., Evans, R.T. and Ellison, S.A. : Dental research in microbiology with emphasis on periodontal disease. J. Am. Dent. Assoc., 78 : 1016-1036, 1969.
 - 25) 浜田茂幸 : 歯周疾患と体液性免疫応答. 日歯評論, 441 : 101-111, 1979.
 - 26) 浜田茂幸 : 歯周疾患と細胞性免疫応答. 日歯評論, 442 : 89-99, 1979.
 - 27) Gibbons, R.J. and Houde, J.V. : Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annu. Rev. Microbiol., 29 : 19-44, 1975.
 - 28) Schlessinger, D. : adherence of bacteria to host tissue, Gibbons, R.J., Microbiology, American Society for Microbiology, Washington, D.C.,

- 1977, 395-406.
- 29) 植田 寛, 伊藤機一, 手嶋豊彦, 狩野元成, 只野寿太郎: シンクログラフによる血清脂質分析法の検討. 臨床検査, 19: 639-643, 1975.
 - 30) 狩野元成, 手嶋豊彦, 田中満直, 杉崎 誠, 成川正志, 伊藤機一, 植田 寛, 岡田 淳, 水口国雄, 只野寿太郎: シンクログラフによる血清リン脂質分析法に関する研究. 最新医学, 31: 2002-2009, 1976.
 - 31) 柴田 進, 武元良整, 柴田和子: Iatroscan の赤血球膜脂質分析への応用. Clinical Laboratory, 21: 837-844, 1980.
 - 32) 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—とくにホスファチジルコリン, ホスファチジルエタノールアミン, スフィンゴミエリン量について—. 日歯周誌, 23: 34-42, 1980.
 - 33) 汐見 登: 歯周炎罹患歯肉の磷脂質量に関する研究. 日歯周誌, 25: 185-194, 1983.
 - 34) Kanemasa, Y., Akamatsu, Y. and Nojima, S.: Composition and turnover of the phospholipids in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, 144: 382-390, 1967.
 - 35) Kanemasa, Y., Yoshioka, T., Ichikawa, H. and Takai, K.: Alteration of phospholipid at various growth phases of *Escherichia coli*. Acta Med. Okayama, 25: 255-260, 1971.
 - 36) Shibuya, I., Miyazaki, C. and Ohta, A.: Alteration of phospholipid composition by combined defects in phosphatidylserin and cardiolipin synthases and physiological consequences in *Escherichia coli*. J. Bact., 161: 1086-1092, 1985.
 - 37) Shibuya, I., Yamagoe, S., Miyazaki, C., Matsuzaki, H. and Ohta, A.: Biosynthesis of novel acidic phospholipid analogs in *Escherichia coli*. J. Bact., 161: 473-477, 1985.