

歯髓の脂質に関する研究

II ラット切歯歯髓の脂質過酸化反応

岡山大学医学部口腔外科学教室（主任：西嶋克巳教授）

（指導：岡山大学医学部放射線医学教室山本道夫教授）

橋 本 郷 之 助

（昭和51年12月14日受稿）

I 緒 言

生体膜における脂質過酸化反応は生体膜の代謝調節に関係していると考えられ、特に加齢との関係は注目されている。過酸化反応を阻害する物質、即ち抗酸化物を動物に投与すると寿命の延長が認められ、培養細胞へのビタミンEの添加でも同様の現象が観察されている。生体内に生ずるフリーラジカルが各種の過酸化反応を誘起し、生じた過酸化物が細胞の代謝に影響を及ぼすことが考えられる。放射線によって生じるラジカルの生物学的効果として、直接、間接的に有機過酸化物の形成、脂質では脂質過酸化物形成、脂質過酸化反応の促進が認められている。^{1, 2} 形成された脂質過酸化物は有害であり、SH酵素系に影響を及ぼす。^{3, 4} その障害は放射線障害と類似しており、⁵ 放射線誘起の脂質過酸化が放射線障害の原因として注目されたが、⁶ 生体臓器における放射線感受性はその臓器のもつ脂質過酸化反応能と比例しないことなどから現在ほとんど否定的となった。しかし放射線感受性の高い分裂の盛んな細胞では、脂質過酸化反応能は極めて弱いか欠損しており、反応欠損は細胞分裂と密接な関係が考えられている。^{7, 8} 細胞代謝において逆に脂質過酸化反応能の高い細胞は、放射線誘起の脂質過酸化反応を放射線により細胞に生じた脂質過酸化物の分解作用としての回復活性として、反応活性の上昇を示し、その結果として生物学的障害の放射線感受性が低い一原因となるのかもしれない。一方過酸化物を通じて生体分子間の架橋がおれば細胞に有害である。⁹ いずれにしても放射線による脂質過酸化反応能の変動は障害、回復を考える上に重要な因子と考える。著者は先に歯髓の脂質を分析し、構成脂肪酸として脂質過酸化反応の基質とされている高級不飽和脂肪酸、特にアラキドン酸¹⁰

の存在を明らかにした。このことから歯髓においても脂質過酸化反応がみられることが予想される。また歯髓の脂質過酸化反応についての報告が全くみられない点からも、歯髓の脂質過酸化反応の研究は生体膜における脂質過酸化反応解析の一助となると考えた。

II 実験材料および方法

ラットの切歯歯髓の採取は前報の如くおこなった。¹¹ 一実験当たり3匹のラット上下4切歯より分離した歯髓を集め、0.15 M KCl, 0.01 M Tris-HCl 緩衝液、pH 7.4（以下KT液と略）中テフロンホモゲナイザーにてホモゲナイズした。歯髓ホモゲネートの脂質過酸化反応はKT液中37℃でFe⁺⁺（モル濃0.1 mM）を誘起剤としておこなった。反応終了後、反応液2 ml 当り40%トリクロール酢酸0.5 ml, 5 N 塩酸0.25 ml, 2%チオバルビツール酸（TBA）を加え、沸騰水中で10分間加温したのち、冷却、遠心、その上澄について島津分光光度計（UV-200）を用い、532 m μ と600 m μ の吸光度を測定した。反応システム当りの532 m μ の吸光度より600 m μ の吸光度を差し引いた値をTBA値として表わした。¹² 蛋白質の測定はビュレット法によった。¹³ ラットのエクソ線全身照射は前報の如くおこない、¹⁴ 1000R全身照射後3日目のものを照射歯髓として実験に供した。

歯髓よりの脂質の抽出および抽出した脂質の薄層クロマトグラフィーによる分画は前報の如くおこなった。¹⁵ 薄層上の脂質はヨードガスによってスポットを検出し、その部分をかきとって短試験管に入れ、これに2 mlのKT液を加え、以下ホモゲネート同様Fe⁺⁺（0.1 mM）による脂質過酸化反応を37℃、30分で測定した。

分画脂質の脂肪酸組成分析は前報の如くガスクロ

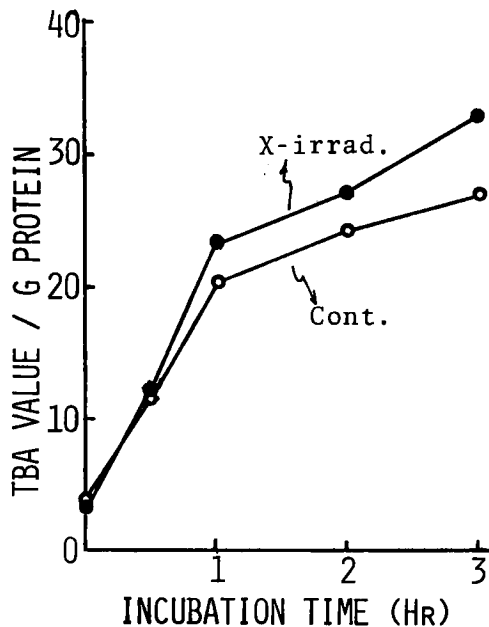


Fig. 1. Lipid peroxidation of dental pulp homogenate (from 3 rats) induced by Fe^{++} (0.1mM) in the medium composed of 0.15M KCl and 0.01M Tris-HCl buffer, pH 7.4.

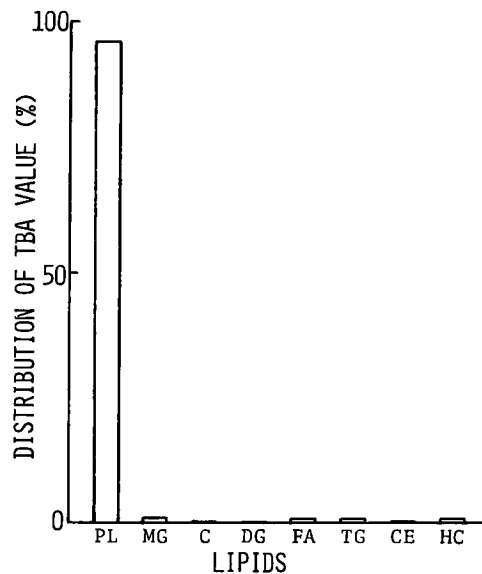


Fig. 2. Histogram of TBA value after Fe^{++} induced peroxidation of lipids extracted from rat incisor pulps and separated by thin-layer chromatography. Histogram is expressed as percentages of total TBA values. PL; phospholipid, MG; monoglyceride, C; cholesterol, DG; diglyceride, FA; fatty acid, TG; triglyceride, CE; cholesterol ester, HC; hydrocarbon.

マトグラフィーでおこなった¹³⁾

III 実験結果

ラットの切歯歯髓ホモゲネートにおける Fe^{++} 誘導脂質過酸化反応の経時曲線を図1に示す。 Fe^{++} 誘導前のホモゲネートにおいては若干のTBA値が見られ、誘導時間のlagはなかった。時間の経過とともにTBA値は直線的に増加し、その後ゆるやかな増加がみられた。エックス線全身照射歯髓での脂質過酸化反応は、非照射のそれに比してTBA値の増加即ち反応の促進がみられた。

歯髓より抽出した脂質を薄層クロマトグラフィーにて分画し、分画した脂質の Fe^{++} 誘導脂質過酸化反応によるTBA値を図2, 3に示す。図2にみられる如く、脂質過酸化反応はリン脂質(PL)分画にみられ、その他の単純脂質、モノグリセリド(MG)、コレステロール(C)、ダイグリセリド(DG)、トリグリセリド(TG)、コレステロールエステル(CE)、フリーの脂肪酸分画にはほとんどみられなかった。

リン脂質の構成脂質のうち Fe^{++} 誘導脂質過酸化反応の結果としてのTBA値は図3に示す如く、ホスファチジルエタノールアミン(PE)に最も高く、次いでホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルセリン(PS)に高くみられ、他の複合脂質、リゾホスファチジルコリン(LPC)、スフィンゴミエリン(Sph)、ホスファチジルグリセロール(PG)ではわずかであった。

ラット切歯歯髓でのリン脂質の構成脂質はPC 45%、PE 32%、PS 15%とこの三者がリン脂質全体の92%をしめる¹³⁾従って脂質量当りの反応はPEが最も高く、次いでPS、PCの順となった。

以上の如く脂質過酸化反応はリン脂質においてみられ、中性脂質ではみられなかった。その両者における脂肪酸組成の差を表1にしめす。リン脂質においてアラキドン酸をはじめ不飽和含量が多く、トリグリセリドではアラキドン酸がみられない。照射群のリン脂質脂肪酸ではアラキドン酸の増量があきらかである。

Table.1. Fatty acid compositions of phospholipid and triglyceride separated from rat dental pulps.

| Carbon number | Total lipid | | Phospholipid | | Triglyceride | |
|---------------|-------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
| | Cont. | Irrad. | Cont. | Irrad. | Cont. | Irrad. |
| 14:0 | 2.3 | 2.2 | 2.4 | 3.3 | 8.2 | 8.9 |
| 16:0 | 38.5 | 37.9 | 28.3 | 29.3 | 49.8 | 59.9 |
| 16:1 | 1.5 | 1.3 | 1.7 | 1.6 | 4.9 | 1.6 |
| 18:0 | 18.3 | 18.9 | 23.0 | 22.0 | 18.9 | 12.5 |
| 18:1 | 20.0 | 16.8 | 20.7 | 18.7 | 14.2 | 10.7 |
| 18:2 | 5.1 | 6.5 | 7.6 | 7.1 | 4.0 | 6.4 |
| 20:4 | 14.5 | 16.4 | 16.3 | 18.1 | — | — |

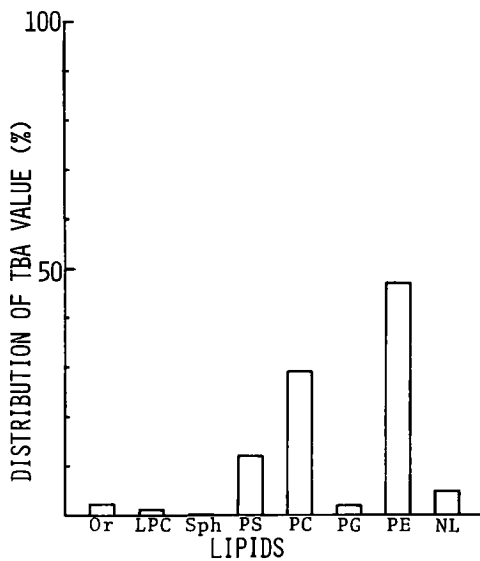


Fig. 3. Histogram of TBA value after Fe^{++} -induced peroxidation of lipids extracted from rat incisor pulps and separated by thin-layer chromatography. Histogram is expressed as percentages of total TBA values. Or ; origin, LPC ; lysophosphatidyl choline, Sph ; sphingomyelin, PS ; phosphatidyl serine, PC ; phosphatidyl choline, PG ; phosphatidyl glycerol, PE ; phosphatidyl ethanolamine, NL ; neutral lipid.

IV 考 察

エックス線全身照射した動物より分離した臓器の脂質過酸化反応活性は照射後経時的变化として3日目に最高となり、一過性に変化することがみられている^{15,16)} エックス線全身照射後3日目のラット切歯より分離した歯髓のホモゲネートにおいて、 Fe^{++} 誘導脂質過酸化反応は非照射歯髓ホモゲネートの反応

と比較して明らかに促進がみられる。しかし歯髓の脂質過酸化反応活性は、教室の渡辺⁶⁾が同じような条件下で測定した他の臓器肝、腎などの値と比較して低いと言える。又渡辺⁶⁾はエックス線照射後の反応液への Fe^{++} 添加による脂質過酸化反応の誘導から得られるTBA値は、 Fe^{++} 無添加反応液におけるエックス線照射によるTBA値の促進と平行することを認め、 Fe^{++} 誘導脂質過酸化反応の促進は内在性因子による促進と拡大解釈出来ると報告している。このことから歯髓でみられる Fe^{++} 誘導脂質過酸化反応のエックス線照射による促進は、歯髓細胞におけるエックス線照射による脂質過酸化反応の促進とみることが出来る。

ラット切歯歯髓脂質には、脂質過酸化反応の基質と示唆されている^{15,17,18)} アラキドン酸が存在すること、エックス線全身照射後3日目のラット切歯歯髓の脂肪酸組成比ではアラキドン酸比の上昇がみられることを第一報¹³⁾で明らかにした。このアラキドン酸即ち基質含量の増加がエックス線による脂質過酸化反応の促進の一因と考えられる。勿論、脂質過酸化反応の促進は基質だけでなく、阻害物質の存在、膜構成等他因子との関係より考えねばならない¹³⁾

分画脂質における脂質過酸化反応の結果、歯髓において反応を誘起する脂質はリン脂質であることが示された。そして脂質の中でもホスファチジルエタノールアミンにおいて反応が著しくみられることがわかった。このような傾向を教室の若林¹⁶⁾はラット肝ミトコンドリアにおいて認めている。しかし脂質過酸化反応のみられる脂質は動物種によっても若干異なるようである。教室の羽井佐¹⁹⁾は家兎(エックス線照射により脂血症をおこしやすい)の血清において、過酸化反応のみられやすい脂質はリン脂質の他にコレステロールエステルをあげ、エックス線による血清脂質過酸化物の増加はコレステロールエステルに由来することをみている。歯髓においてコレステ

ロールエステルのエックス線による量的変化が認められたが¹⁾脂質過酸化反応はほとんどみられなかった。更にその構成脂肪酸分析等を通じて検討した結果は、過酸化反応がみられるリン脂質ではアラキドン酸が認められ、過酸化反応がみられ難いトリグリセリドではアラキドン酸がみられなかった。このことから基質含量としてのアラキドン酸の増加がエックス線による脂質過酸化反応の促進の一因となりうることはあきらかである。

V 要 約

- 1) ラット切歯歯髓のホモゲネートにおいてFe⁺⁺誘導脂質過酸化反応活性が認められた。エックス線全身照射(1000R)したラットより分離した歯髓ホモゲネートのFe⁺⁺誘導脂質過酸化反応は非照射のそれに比して促進がみられた。
- 2) ラット切歯歯髓脂質の構成脂質中で、過酸化反応を誘起し易い脂質はリン脂質で、中性脂質ではほとんど誘起されなかった。
- 3) リン脂質中、そのリン脂質構成の大部分をしめる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、ホスファチジルセリンにおいて過酸化反応が誘起し得た。中でもホスファチジルエタノールアミンの脂質重量当りの比活性が最も高い値を示した。
- 4) リン脂質の脂肪酸組成では、アラキドン酸をはじめ、不飽和含量が多く、トリグリセリドではアラキドン酸はみられなかった。

謝 辞

本実験は岡山大学医学部放射線医学教室(主任山本道夫教授)でおこなった。

擧筆するにあたり、御指導御校閲を賜った岡山大学医学部放射線医学教室山本道夫教授ならびに実験を遂行するにあたり終始御懇篤な御指導を賜った山本剛禧博士ほか各位に深甚の謝意を表します。

又本実験を遂行するにあたり深い御理解、御助言を賜った西嶋克巳教授に心からの謝意を表します。

なお、本実験論文の要旨は、第35回日本医学放射線学会(昭和51年5月)ならびに第24回日本口腔科学会中国・四国・兵庫地方部会(昭和51年11月)において発表した。

文 献

- 1) Packer, L., Deamer, D. W. and Heath, R. L. : *Adv. Geront. Res.*, **2**, 77, 1967.
- 2) Harman, D. : *J. Gerontol.*, **23**, 476, 1968.
- 3) Packer, L. and Smith, J. R. : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4763, 1974.
- 4) Tappel, A. L. : *Fed. Proc.*, **24**, 73, 1965.
- 5) Wills, E. D. and Wilkinson, A. E. : *Radiat. Res.*, **31**, 732, 1967.
- 6) 渡辺節生 : *岡山医学会誌*, **85**, 129, 1973.
- 7) Horgan, V. J., Philpot, J. S., Porter, B. W. and Raddyn, D. S. : *Biochem. J.*, **67**, 551, 1957.
- 8) Cortes, R. and Privett, O. S. : *Lipids*, **7**, 715, 1972.
- 9) Wills, E. D. : *Biochem. Pharmacol.* **7**, 7, 1961.
- 10) 山本道夫 : *日医放会誌*, **23**, 313, 1963.
- 11) Feinstein, R. N. ed. : *Radiat. Res. Suppl.* **3** "Implications of Organic Peroxides in Radiobiology", 1963.
- 12) Barber, A. A. and Bernheim, F. : *Adv. Geront. Res.*, **2**, 353, 1967.
- 13) 橋本郷之助 : *岡山医学会誌*, **89**, 851, 1977.
- 14) Gornall, A. G., Basdawill, C. L. and David, M. M. : *J. Boil. Chem.*, **177**, 751, 1949.
- 15) Dawes, E. A. and Wills, E. D. : *Int. J. Rad. Biol.*, **22**, 23, 1972.
- 16) 若林弘 : *岡山医学会誌*, **88**, 197, 1976.
- 17) 渡辺節生 : *岡山医学会誌*, **85**, 137, 1973.
- 18) Dahle, L. K., Hill, E. G. and Holman, R. T. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 253, 1962.
- 19) 羽井佐芳雄 : *岡山医学会誌*, **87**, 637, 1975.

Studies on the lipid of rat dental pulp

II. Lipid peroxidation of rat incisor pulp

Gonosuke HASHIMOTO

Department of Oral Surgery, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Director : Prof. K.Nishijima)

Lipid peroxidation of dental pulp homogenate isolated from rat incisors was induced by ferrous ion. Lipid peroxidation of dental pulp homogenate isolated from rat 3 days after whole-body irradiation at 1000R x-ray was also induced by ferrous ion, and the activity was higher than that of control homogenate.

In the extracted lipid components of dental pulps, the peroxidation of phospholipid were marked, but those of cholesterol, cholesterol ester, mono-, di-, tri-glycerides, and fatty acid (non-esterified) were slightly or negligible. In the phospholipid components, the peroxidation was highly observed in lecithin, phosphatidyl ethanolamine and phosphatidyl serine, and the peroxidation of phosphatidyl ethanolamine showed the most value in them.

By the analysis of the fatty acid composition, arachidonic acid was included in the phospholipid but not in the triglyceride, suggesting arachidonic acid is substrate of the peroxidation of dental pulps.