原 著

好中球ペルオキシダーゼによる塩基性フクシンおよび 食用赤色 106 号の酸化分解

——ウ蝕検知剤の口腔内における代謝——

小田島 武志 尾西 みほ子
佐藤 尚子 市田 篤郎

東日本学園大学歯学部口腔生化学講座*

結城 重之

歯学概論・歯型彫刻*

高松 隆常

歯科保存学第一講座*

〔受付：昭和58年4月9日〕

Oxidative destruction of fuchsin basic and acid red No. 106 by neutrophil peroxidase

——Metabolism of the reagent detecting
dental caries in oral cavity——

Takeshi Odajima, Mihoko Onishi, Naoko Sato, and Tokuro Ichida

Department of Oral Biochemistry

Shigeyuki Yuki

Orientation in Dentistry & Tooth Caving

Takatsune Takamatsu

Department of Periodontology

School of Dentistry, Higashi Nippon

Gakuen University, Kanazawa 1757, Tobetsu, Hokkaido 061-02

〔Accepted for publication : April 9, 1983〕

Key words: caries detector / myeloperoxidase / peroxidase

Abstract: Fuchsin basic and acid red No. 106 known as probes for diagnosis of dental caries were oxidized by neutrophil peroxidase (myeloperoxidase), hydrogen peroxide and chloride in an acidic solution. The same reactions were also observed with polymorphonuclear leukocytes, hydrogen peroxide and chloride. By these reaction systems, myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system and white cell-hydrogen peroxide-chloride system fuchsin basic was completely decolorized. The product of acid red No. 106 oxidized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system had a light absorption peak at 586 nm (blueviolet), and this product was separable by high pressure reverse phase partition liquid chromatography. These results suggest that fuchsin basic and acid red No. 106 can be metabolized by the myeloperoxidase system in neutrophil.

* 北海道石狩郡当別町字金沢1757番地 (〒061-02)

緒 言

現在までに著者らは核酸とその構成成分¹⁾, ステロイド類²⁾, プロスタグランジンE₁^{3,4)}, ポルフィリン, ヘム, ヘムタンパク質⁵⁾, ベンジルペニシリン, パツリン, テトラサイクリンなどの抗生物質^{6,7)}, カラゲニン (起炎物質)⁷⁾, ペンタクロロフェノール, ポリクロロビフェニルなどの環境汚染物質⁷⁾, アフラトキシン B₁, 3-メチルコラントレン, ベンゾ [α] ピレンなどの発癌物質⁸⁻¹⁰⁾, トリプシン, リゾチームなどの加水分解酵素¹¹⁾が過酸化水素と塩素イオンの存在下で好中球に存在するミエロペルオキシダーゼの触媒する反応で酸化分解あるいは不活性化される事実を見出し, 報告している。また, ミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素-ハロゲンイオンが殺菌作用^{12,13)}をもつことも報告されている。本研究は, ウ蝕検知剤として知られている食用赤色 106 号¹⁴⁾および塩基性フクシン¹⁵⁾ (Fig. 1 に分子構造を示した) が治療過程において歯牙に付着したり, 口腔内に残存した際に, 歯周滲出液中の好中球のミエロペルオキシダーゼ系で酸化分解される可能性が考えられるので, 豚白血球から精製したミエロペルオキシダーゼおよびラット腹水から集めた白血球を用いて食用赤色 106 号と塩基性フキシンの酸化反応について検討したので報告する。

実験材料および方法

ミエロペルオキシダーゼ (donor : H₂O₂ Oxidoreductase, EC 1. 11. 1. 7) は豚の末梢血液の白血球から精製¹⁶⁾した RZ=0.8 の標品を用いた。白血球は体重 280 g のウィスター系雄性ラットの腹腔に 40ml の滅菌した 2% カゼイン (ハマルステ

ン氏法) の生理食塩液を注射し, 16 時間後腹腔液を採取し, 700×g で 5 分間遠心分離し, 沈殿となる白血球を生理食塩水に懸濁させ, 再度 700×g で 5 分間遠心分離することによって白血球を洗浄する操作を 3 回繰返すことによって集め, 本実験に用いた。白血球量は Lowry ら¹⁷⁾の方法で測定したタンパク濃度で示した。1.0% 食用赤色 106 号のプロピレングリコール溶液から成るウ蝕検知液 (以上ウ蝕検知液と呼ぶ) はクラレ, 食用赤色 106 号は紅不二化学工業, 塩基性フクシンは Chroma-Gesellschaft の製品を用いた。吸収スペクトルの測定および Kinetics の実験には日立 200-20 型自記分光光度計, 日立 557 型二波長分光光度計を用いた。本研究に用いた高速液体クロマトグラフは, Waters Associates 6,000A 型高圧定流量ポンプ, U6K 型インジェクター, Z 型加圧モジュール, 島津 SPD-1 型高速液体クロマトグラフィー用紫外可視分光検出器, 日立 056 型記録計を組合せた装置である。担体 (カラム) はラジアルパック μ ボンダパック C₁₈ (逆相分配系, 8 mm×10 cm) を用いた。高速液体クロマトグラフィーによるウ蝕検知液および食用赤色 106 号の酸化物の分離実験はあらかじめ 0.45 μm のフィルターでろ過したろ液について行った。移動相溶媒はアセトニトリル/水/0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) (60/38/2) の混合液を用いた。流速は 1.0 ml/min であった。

結 果

Fig. 2 に示したようにミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素-塩素イオン系と塩基性フクシンとの反応でおよそ 6 分後には (Time Course 参照) 塩基性フキシンの可視部の吸収スペクトルはほぼ

Fuchsin Basic

Acid Red No. 106

Fig. 1 Chemical structure of fuchsin basic and acid red No. 106.

完全に消失し、無色透明に脱色された。この反応の至適 pH は弱酸性 (pH 5.25) にあり、中性以上の pH 領域ではほとんど活性が認められなかった (Fig. 3)。ミエロペルオキシダーゼー過酸化水素ー塩素イオン系による Fig. 2 でみられた塩基性フクシンの脱色反応はミエロペルオキシダーゼを白血球に代えても同様に観測された (Fig. 4)。

また、Fig. 5 に示したように“ウ蝕検知液”もミエロペルオキシダーゼー過酸化水素ー塩素イオン系によって酸化された。この反応では塩基性フクシンでみられた劇的な脱色ではなく、本来赤色であったウ蝕検知液が紫青色を呈する物質へと酸化された。即ち、ウ蝕検知液はこの反応系で酸化されるとき、未反応のウ蝕検知液にあった 525 nm の肩および 565nm の吸収極大が消失し、新たに 586nm に吸収極大をもつ物質に変換した。同様のスペクトル変化が Fig. 6 に示したように食用赤色 106 号とミエロペルオキシダーゼー過酸化水素ー塩素イオン系との反応でも観測されたの

で、ウ蝕検知液とミエロペルオキシダーゼ系との反応でみられた吸収スペクトルの変化はウ蝕検知液中の食用赤色 106 号に由来することは明らかである。また、Fig. 5 および 6 に示した Time Course からわかるように、これらの反応も塩基性フクシンと同様に塩素イオンの添加によって始めて反応が開始され、塩素イオン依存性がみられた。これらの反応の至適 pH も塩基性フクシンの場合と同様に pH 5.25 に極大があり、pH 7.0 以上では吸収スペクトルの変化からは全く活性が認められなかった (Fig. 7)。ウ蝕検知液は、Fig. 7 に示したようにミエロペルオキシダーゼー過酸化水素ー塩素イオンのミエロペルオキシダーゼを白血球に代えた反応系によってもミエロペルオキシダーゼ系と全く同様に酸化され、紫青色を呈する物質に変換した (Fig. 8)。

Fig. 9 および 10 はウ蝕検知液および食用赤色 106 号とミエロペルオキシダーゼー過酸化水素ー

Fig. 2 Decolorization of fuchsin basic by the myeloperoxidase (MPO)- H_2O_2 -chloride system. (a) fuchsin basic in 0.1M acetate (pH 5.0); (b) 0.1mM H_2O_2 , 7.6 nM MPO and 40mM NaCl were added to solution (a) as shown in time course (inset) and recorded after 10min.

Fig. 3 Effect of pH on the decolorization of fuchsin basic by the myeloperoxidase (MPO)- H_2O_2 -chloride system. Fuchsin basic (O.D. = 0.3 at 546nm) + 0.1mM H_2O_2 + 7.6nM MPO + 40mM NaCl, in 0.1 M buffer solution at 25°C.

Fig. 4 Decolorization of fuchsin basic by the white cell- H_2O_2 -chloride system.

The samples containing fuchsin basic (O.D.=0.3 at 546nm), 40 mM NaCl, leukocytes (finally 172 μg protein/ml) with 0.1 mM H_2O_2 (b) and without H_2O_2 (a) were incubated for 7min at 25°C and centrifuged for 5min at 1,000 $\times$ g and those supernatants were recorded. pH 5.0.

塩素イオン系との反応で生じたウ蝕検知液および食用赤色 106 号の酸化生成物を逆相分配系のカラム（高極性物質がより速く溶出される）を用いた高速液体クロマトグラフィーで分離したクロマトグラムである。これらのクロマトグラムから、ウ蝕検知液および食用赤色 106 号の酸化生成物（クロマトグラム B）はともに未反応のウ蝕検知液および食用赤色 106 号（クロマトグラム A）よりも低極性物質に変換したものと結論できる。一方、ウ蝕検知液および食用赤色 106 号の酸化物中には全く未反応の食用赤色 106 号は検出されなかった。この結果は、Fig. 5 および 6 の実験条件では食用赤色 106 号がほぼ完全にミエロペルオキシダーゼ系によって酸化されたことを示しているものと考えられる。Fig. 9 および 10 のクロマトグラム C は未反応のウ蝕検知液および赤色 106 号とそれぞれの酸化反応物をほぼ等量混和した試料について高速液体クロマトグラフィーによる再分離を試みた結果である。このクロマトグラムからもウ蝕検知液および食用赤色 106 号の酸化生成物（ピー

Fig. 5 Oxidation of caries detector (1.0% acid red No. 106-propylene glycol solution) by the myeloperoxidase (MPO)- H_2O_2 -chloride system.

(a) 1 μl caries detector in 2.5ml of 0.1 M acetate (pH 5.5); (b) 0.1mM H_2O_2 , 7.6 nM MPO and 40 mM NaCl were added to solution (a) as shown in the time course (inset) and recorded after 10min.

ク 2) は未反応のウ蝕検知液および赤色 106 号（ピーク 1）より保持時間 (retention time) が長く、極性の低い物質であることが確認された。また、ウ蝕検知液の酸化生成物と食用赤色 106 号の酸化生成物とはその保持時間 (retention time) が一致したことから同一物質であると結論した。

考 察

塩基性フクシンはプロピレングリコール溶液としてウ蝕検索の probe として歯科臨床家によってごく最近まで使用されていたが、その発癌性が問題となり、現在では食用赤色 106 号のプロピレングリコール溶液が「ウ蝕検知液」として使用されている。本研究の目的はこれらの色素が歯科治療の際にウ蝕検索の目的で歯牙に塗布され、治療後歯牙に付着したり、口腔内に残存したとき生体

Fig. 6 Oxidation of acid red No. 106 by the myeloperoxidase (MPO)-H₂O₂-chloride system. (a) acid red No. 106 in 0.1 M acetate (pH 5.5); (b) 0.1 mM H₂O₂, 7.6 nM MPO and 40 mM NaCl were added to solution (a) as shown in the course (inset) and recorded after 10 min.

がどのような機構でこれらの色素（異物）を除去（代謝）しているのかを明らかにすることである。ミエロペルオキシダーゼは好中球にのみ存在する特異なペルオキシダーゼとして知られ、その生理作用としては殺菌や解毒が考えられている。今回の実験によって塩基性フクシンおよび食用赤色 106 号がミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素-塩素イオン系および白血球-過酸化水素-塩素イオン系によって容易に酸化分解されることが明らかにされたことから、これらの色素が歯科臨床に使用され歯牙に付着したり、口腔内に残存しても歯肉滲出液中の好中球のミエロペルオキシダーゼ系によって酸化分解される可能性が示唆された。しかし、生体内（白血球）でこのミエロペルオキシダーゼ系が必要とする過酸化水素がどのような系で産生されるのかという問題があるが、この過酸化水素源としてまず第一に挙げられるのは好

Fig. 7 Effect of pH on the oxidation of caries detector and acid red No. 106 by the myeloperoxidase (MPO)-H₂O₂-chloride system. (a) (—○—), 1 μ l caries detector (1.0 % acid red No. 106-propylene glycol solution) + 0.1 mM H₂O₂ + 7.6 nM MPO + 40 mM NaCl. (b) (—●—), acid red No. 106 (O.D.=1.17 at 565 nm) + 0.1 mM H₂O₂ + 7.6 nM MPO + 40 mM NaCl. In 0.1 M buffers.

中球自身が異物の刺激に誘発されて産生する 超過酸化酸素 (O₂⁻) である。即ち、この O₂⁻ の不均化反応 (式 1) で生成する過酸化水素がミエロペルオキシダーゼ系で利用され得る可能性も考えられる。

一方、ミエロペルオキシダーゼ系が要求する塩素イオン量は基質によって異なるが、約 10 mM から 50 mM であり、この濃度範囲の塩素イオン量は生体に存在する塩素イオン量 (約 100 mM) で充足されると考えられる。

更に口腔内清掃作用には白血球ペルオキシダーゼのみならず唾液ペルオキシダーゼ^{18,19)} も関与している可能性があるので現在検討中である。

Fig. 8 Oxidation of caries detector by the white cell- H_2O_2 -chloride system.

The reaction and experimental conditions were the same with those of the experiments in the Fig. 4 except the substitution of substrate. One microliter of caries detector was used.

Fig. 9 High pressure reverse phase partition chromatogram of the product of caries detector oxidized by the myeloperoxidase- H_2O_2 -chloride system.

(A) caries detector; (B) product; (C) samples (A)+(B). The mobile phase used was acetonitrile/deionized water/0.5M acetate (pH 5.5) (60/38/2).

Fig. 10 High pressure reverse phase partition chromatogram of the product of acid red No. 106 oxidized by the myeloperoxidase- H_2O_2 -chloride system.

(A) acid red No. 106; (B) product; (C) samples (A)+(B). The mobile phase used was the same with that of experiment in the Fig. 9.

結 論

好中球に存在するミエロペルオキシダーゼ、過酸化水素、塩素イオンによって、ウ蝕検知剤として知られている塩基性フクシンおよび食用赤色106号が容易に酸化分解された。これらの反応の至適 pH は5.25にあった。これらの反応はミエロペルオキシダーゼを白血球に代えても同様に観測された。ウ蝕検知液（食用赤色106号）および食用赤色106号のミエロペルオキシダーゼ系による酸化物中には未反応の食用赤色106号より低極性の物質が含まれていることが高速液体クロマトグラフィーによって確認された。

以上のことよりウ蝕検知の目的で歯牙に塗布された食用赤色106号が治療後口腔内に残存しても歯肉滲出液中の好中球によって捕捉され、ミエロペルオキシダーゼ系によって分解代謝される可能性が考えられる。

謝辞：稿を終えるに臨み、ウ蝕検知液を提供された株

式会社クラレに深謝する。また本研究の一部は昭和57年度北海道科学研究補助金で行われた。ここに謹んで北海道に感謝の意を表す。

抄録：ウ蝕検知剤として 歯科臨床家によって 使用されていた 0.5 % 塩基性フクシンのプロピレングリコール溶液からなる “ウ蝕検知液” 中の主成分である塩基性フクシンおよび 現在専ら 使用されている 1.0 % 食用赤色106号のプロピレングリコール溶液からなる “ウ蝕検知液” 中の食用赤色106号が 好中球から 精製したミエロペルオキシダーゼー過酸化水素ー塩素イオン系によって 容易に酸化された。いずれの反応も至適 pH は 5.25 にあった。ウ蝕検知液中の食用赤色 106 号および食用赤色 106 号のミエロペルオキシダーゼ系によって 酸化された生成物中に、逆相分配系カラムを使った高速液体クロマトグラフィーによってそれぞれ未反応のウ蝕検知液中の食用赤色 106 号および食用赤色 106 号より低い極性をもつ物質が検出された。両者の酸化物はそれらの保持時間 (retention time) が一致することから同一物質であると結論された。

文 献

- 1) Odajima, T.: Mechanism of the microbicidal (detoxication) effect of the myeloperoxidase H_2O_2 -halide system, III. Oxidative degradation of the nucleic acid and its constituents by the myeloperoxidase. *Jpn. J. Oral Biol.* 24 : 777-787, 1982.
- 2) Odajima, T., Onishi, M. and Sato, N.: Metabolism of steroid by myeloperoxidase. *Jpn. J. Oral Biol.* 23 : 489-497, 1981.
- 3) Odajima, T., Onishi, M. and Sato, N.: Study on the oxidation of chemical and biological substances by the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/halide system. in VII International Biophysics Congress and III Pan-American Biochemistry Congress, Abstract, p. 346, 1981.
- 4) Odajima, T., Onishi, M. and Sato, N.: Study on the physiological role of myeloperoxidase. in 12th International Congress of Biochemistry, Abstract, p. 273, 1982.
- 5) Odajima, T., Onishi, M. and Sato, N.: Oxidative destruction of the porphyrin derivatives and hemoproteins by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system. *Jpn. J. Oral Biol.* 24 : 243-248, 1982.
- 6) Odajima, T., Sato, N. and Onishi, M.: Mechanism of the microbicidal (detoxication) effect by the myeloperoxidase- H_2O_2 -halide system, V. Oxidation of benzylpenicillin. *Jpn. J. Oral Biol.* 23 : 498-502, 1981.
- 7) Odajima, T., Sato, N. and Onishi, M.: Mechanism of the microbicidal (detoxication) effect by the myeloperoxidase- H_2O_2 -halide system, VII. Oxidation of carrageenin, parathion, pentachlorophenol, polychlorobiphenyl, patulin and tetracycline. *Jpn. J. Oral Biol.* 24 : 32-39, 1980.
- 8) Odajima, T.: Mechanism of the microbicidal (detoxication) effect by the myeloperoxidase- H_2O_2 -halide system, II. Oxidative destruction of carcinogenetic mycotoxin by the myeloperoxidase- H_2O_2 -chloride system. *Jpn. J. Oral Biol.* 22 : 174-180, 1980.
- 9) Odajima, T.: Oxidative destruction on the microbial metabolite aflatoxin by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system. *Archs Oral Biol.* 26 : 339-340, 1981.
- 10) Odajima, T., Onishi, M. and Sato, N.: Mechanism of the microbicidal (detoxication) effect by the myeloperoxidase- H_2O_2 -halide system, VI. Oxidation of benzo [α] pyrene and 3-methylcholanthrene. *Jpn. J. Oral Biol.* 23 : 718-724, 1981.
- 11) 小田島武志, 尾西みほ子, 佐藤尚子: ミエロペルオキシダーゼの生理活性物質代謝: 加水分解酵素の不活性化について. *生化学* 8 : 765, 1982.
- 12) Klebanoff, S. J.: Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol.* 95 : 2131-2138, 1968.
- 13) Lehrer, R. I.: Antifungal effect of peroxidase systems. *J. Bacteriol.* 99 : 361-365, 1969.
- 14) Fusayama, T., Takatsu, T., Itoh, K., Yamauchi, J. and Shibatani, K.: New composition of caries detector. *Jpn. J. Conser. Dent.* 22 : 37-40, 1979.
- 15) 総山孝雄: 齲蝕象牙質 2 層の診断と処置. *歯界展望* 52 : 771-784, 1978.
- 16) Odajima, T.: Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood. Nature of the prosthetic group of myeloperoxidase. *J. Biochem.* 87 : 379-391, 1980.
- 17) Lowry, O. H. Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- 18) Iwamoto, Y., Inoue, M., Tsunemitsu, A.

and Matsumura, T. : Some properties of the salivary antibacterial factor (S. A. Factor). *Archs Oral Biol.* 12 : 1009-1012, 1967.

19) Tsunemitsu, A. and Iwamoto, Y. : Antibacterial substances in saliva. *J. Hiroshima Univ. Dent. Soc.* 2 : 91-106, 1970.