Formalin による蛋白質の hapten 修飾 阻止効果に関する実験的研究

好 川 正 孝 土 井 昭 勝
新 井 徹 戸 田 忠 夫

大阪歯科大学 口腔治療学教室 (主任: 戸田忠夫教授)

[受付: 昭和60年6月20日]

Inhibitory effect of formalin on the hapten modification of protein antigens

Masataka Yoshikawa, Masakatsu Doi,
Tohru Arai and Tadao Toda

Department of Endodontics, Osaka Dental University

(Director: Prof. Tadao Toda)

1-47, Kyobashi, Higashi-ku, Osaka 540

[Accepted for publication: June 20, 1985]

Key word: formalin / cross-link / hapten / cresol / protein

Abstract: Formocresol is widely used in endodontic therapy as a root canal disinfective and pulp tissue fixative. Recently, it has been mentioned that autologous soluble components of the dental pulp which are modified by the agent can be rendered antigenically active to the host. Several investigators suggest that such alternative may be due to modification of the components by cresol.

On the other hand, the clinical effect of formalin consists primarily in the action to many sorts of proteins in the root canal system. It is a well known fact that cross-links between protein end-groups are formed when formalin acts on proteins. Cross-linking of proteins may prevent hapten reaching susceptible group.

This study was performed to estimate the inhibitory effect of formalin on the hapten modification of proteins.

Sodium dinitrobenzene sulfonate was used for haptenation of bovine γ -globulin (BGG). A product containing about 50 dinitrophenyl groups per molecule of BGG is normally yielded by this procedure.

A lower degree of modification was accomplished when BGG had been treated with formalin.

It was confirmed that formalin had an inhibitory effect on the conjugation of dinitrophenyl groups to BGG.

緒 言

1904年に Buckley によって処方されて以来, formocresol (F.C.) は最も頻用されている根管

治療薬剤で, その臨床的価値はいまだに高く評価されている¹⁾。しかし, F.C. の修飾を受けた歯髄組織中の可溶性蛋白質に対する免疫応答が成立する可能性を示唆した報告がみられ²⁾, 歯内治療に携わる者にとって見過ごすことのできない問題

となっている。自己蛋白質が F.C. の修飾を受けて自己に対する抗原性を示すようになる可能性について、F.C. が hapten となったためと考察されており、また、最近の報告では蛋白質と cresol との結合に formalin が介在して cresol が hapten になり生体を感作すると推論している³⁾。この推論に基くと、根管内に formalin 合剤を応用する結果として、薬剤や変性分解産物などの hapten になる可能性のある物質が異種または自己蛋白質との間に formalin を介在して結合し、多様な hapten-carrier 系が成立することにもなる。したがって、formalin は2次的に根尖歯周組織に疾患を惹起させる原因のひとつになり得ると判断しなければならない。

ところで、各種蛋白質と formalin との反応についてはこれまでに多くの研究がおこなわれ、その反応様式は明らかになっている⁴⁾。これらの報告からすれば、formalin はむしろ蛋白質と hapten 物質との結合を阻止するように作用すると思う方が妥当であるかも知れない。そこで我々はこの点を明らかにするために hapten-carrier 系の実験によく用いられる bovine γ -globulin (BGG) の 2, 4-dinitrobenzene sulfonic acid sodium salt (DNBS) による hapten 化を利用して、その反応に formalin を介在させたときに BGG 1 mol あたりに結合する dinitrophenyl (DNP) 基の数の変化を検索した。その結果、formalin が carrier である蛋白質と hapten 物質との結合を阻止するものであることが確認されたので報告する。

材料および方法

本実験における BGG の formalin 処理は次のようにおこなった。

BGG (Miles Lab. Inc.) を 20mg/ml となるように 0.15M 炭酸カリウム (半井化学薬品 K.K.) 溶液 180ml に完全に溶解した。この BGG 溶液を 30ml づつとり、そのそれぞれに、最終濃度が 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, および、1.0% となるように中性 formalin を添加し、マグネティックスターラーで緩やかに攪拌した。残った BGG 溶液 30ml は control として formalin 添加

群と同じ室温下に置いた。マグネティックスターラーで緩やかに攪拌を続けながら formalin 添加群と control の溶液とから 6, 24, 48, 96, そして、228時間を経過するごとにそれぞれ 5ml をとり、4°C で3日間0.001M リン酸緩衝液に対して透析することによって未反応の formalin を除去した。

このあと Good ら⁵⁾の記載に準じて BGG および formalin 処理 BGG の DNBS (東京化成工業 K.K.) による hapten 化をおこなった。その方法は次のとおりである。

BGG 溶液および各 formalin 処理 BGG 溶液のそれぞれ 5ml に対して、加温蒸留水に 100mg/ml の濃度に溶解した DNBS 溶液 1ml を滴下、攪拌した。遮光して室温でさらに一夜攪拌を続けたあと、0.001 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で約1週間透析 (4°C) をおこなって未反応の DNBS を除去した。外液 (0.001M リン酸緩衝液) は1日に2~3回交換した。透析を終える基準としては、自記分光光度計 (島津 UV-240) を使用して外液の 360 nm における吸光度を測定し、その吸光度が 0.005 以下になったときとした。透析をおこなったのち、不溶物があればそれを除去する目的で 13,000g で遠沈した。そのあと、蛋白質の濃度が約 0.1~0.2mg/ml となるように各試料を 0.001M リン酸緩衝液で 30 倍に希釈した。次いで自記分光光度計と Graphic Printer (島津 PR-1) を使用して 280nm と 360nm の吸光度を求め、Fig. 1 に示した式から BGG 1 mol あたりに結合した DNP 基の平均数を算出するとともに、[BGG] の式から得られた mol 濃度に BGG の分子量を乗じて希釈した試料中の BGG 濃度が 0.1~0.2mg/ml の範囲にあることを確認した。なお、本実験は triplicate でおこなった。

$$[\text{BGG}] = \frac{(\text{OD}_{280}) - (0.316)(\text{OD}_{360})}{2.33 \times 10^5} \text{ (mol/liter)}$$

$$[\text{DNP}] = \frac{(\text{OD}_{360}) - (0.01)(\text{OD}_{280})}{1.73 \times 10^4} \text{ (mol/liter)}$$

$$\left(\begin{array}{c} \text{The average number} \\ \text{of DNP groups} \\ \text{per BGG molecule :} \end{array} \right) = [\text{DNP}] / [\text{BGG}]$$

Fig. 1 Calculations for obtaining the average number of DNP groups per BGG molecule

Table 1 Effect of formalin on DNP-BGG conjugate

Formalin treatment time (hour)	Concentration (%)	Absorbance at 360nm (A)	Absorbance at 280nm (A)	Average number of DNP/BGG
0	0	2.082	1.179	54
	0.01	1.649	0.972	49
	0.05	0.955	0.976	19
6	0.1	0.782	0.939	15
	0.5	0.161	0.820	3
	1.0	0.089	0.805	1
	0.01	1.856	1.069	52
	0.05	1.250	1.044	26
24	0.1	1.144	1.114	20
	0.5	0.168	1.092	2
	1.0	0.116	0.972	2
	0.01	2.137	1.263	49
	0.05	1.187	1.070	23
48	0.1	0.990	0.999	19
	0.5	0.147	1.017	2
	1.0	0.109	0.911	2
	0.01	2.031	1.362	38
	0.05	0.902	0.941	18
96	0.1	0.879	0.910	19
	0.5	0.219	1.068	3
	1.0	0.109	0.884	2
	0.01	1.359	0.908	38
	0.05	0.961	0.889	22
228	0.1	0.609	0.851	19
	0.5	0.206	1.000	3
	1.0	0.105	0.915	1

結 果

Good らの記載⁵⁾に従って BGG に対する DNBS による hapten 化をおこなった結果, BGG 1 mol あたりに結合した DNP 基の平均数は 54 であった。

BGG を formalin で処理したのち DNBS による hapten 化をおこなって 280nm と 360nm における吸光度を測定した。その結果は Table 1 に示した。また, その吸光度曲線を formalin による BGG の処理時間別に Fig. 2 から Fig. 6 に示した。この吸光度から BGG 1 mol あたりに結合した DNP 基の平均数を算出した。その結果は Ta-

ble 1 に示したとおりである。BGG に作用させた formalin の濃度と作用時間および結合した DNP 基の平均数との関係を Fig. 7 に示した。

BGG の DNBS による hapten 化は, BGG を 0.01% formalin で処理したことで約 29.6% 阻止され, 0.05%~0.1% formalin で約 64.8%, 0.5%~1.0% formalin では約 97.2% が阻止された。DNBS による BGG の hapten 化は BGG を処理した formalin の濃度に大きく影響されていた。

0.01% の formalin で BGG を処理した場合には, DNBS による hapten 化は formalin の作用時間が長くなるにつれて阻止される傾向にあった

Fig. 2 Absorbance of DNP-BGG at 280nm and 360 nm (Formalin treatment of BGG for 6 hours)

Concentration of formalin for preparation of BGG

—○— control
□..... 0.01%
 - - -△- - - 0.05%
●..... 0.1%
 - - -▲- - - 0.5%
■..... 1 %

Fig. 3 Absorbance of DNP-BGG at 280nm and 360 nm (Formalin treatment of BGG for 24 hours)

が、0.05%および0.1%濃度の formalin 処理の場合には formalin の作用時間と hapten 化阻止とはほとんど相関は認められなかった。また、0.5%および1.0%の濃度の formalin を作用させた場合には6時間ですでに228時間処理と同じ程度にまで hapten 化が阻止されていた。なお、0.01%、0.05%、そして、0.1%濃度の formalin を6時

Fig. 4 Absorbance of DNP-BGG at 280nm and 360 nm (Formalin treatment of BGG for 48 hours)

Fig. 5 Absorbance of DNP-BGG at 280 nm and 360 nm (Formalin treatment of BGG for 96 hours)

間作用させた BGG に結合した DNP 基の平均数は、いずれも24時間 formalin を作用させたのちのそれぞれの DNP 基の平均数より少ない傾向が認められた。

考 察

蛋白質に formalin を作用させると、蛋白質の遊離 amino 基とまず反応して amino-methylol 基を形成する。この反応は可逆的で、透析したり希釈したりすると蛋白質はふたたび formalin を分離すると言われている。蛋白質に formalin を

Fig. 6 Absorbance of DNP-BGG at 280nm and 360 nm (Formalin treatment of BGG for 228 hours)

Fig. 7 Inhibitory effect of formalin on the reaction of BGG with DNBS

長時間作用させると第一の反応に続いて methylene 誘導体の形成がおこる。この反応はゆっくりと進行し、非可逆的であるという。このときに、amino 基が消失して methylene bridge が形成されることが明らかにされている。Formalin は amino 基どうしだけでなく、amino 基と amido 基、guanidyl 基、phenol 基、imidazole 基、そして、indole 基などとの間にも分子間または分子内 cross-link を生じさせることが alanine と

acetamide, threonine と 2,4-dimethylphenol, methylene-tyrosine 重合体と methylguanidine などでの反応から確認がなされている⁴⁾。

このような formalin の作用によって組織蛋白質と血漿蛋白質との間に、あるいは、数種の血漿蛋白質の間に分子間 cross-link が形成されることによる影響について、免疫組織学領域での報告⁶⁾があり、歯内療法的な立場からの報告⁷⁾もおこなわれている。血漿蛋白質の存在下で組織標本を formalin 固定すると組織中の抗原決定基が血漿蛋白質と分子間 cross-link を形成し、蛍光抗体法による抗原の検出が困難になると報告されている⁶⁾。また、ある種の血漿蛋白質は他の血漿蛋白質と共存しているときに formalin の作用を受けても分子間 cross-link を形成せずに、分子内 cross-link が優先して生じる可能性が推測されている⁷⁾。

本実験において、0.01%~1.0%の formalin を作用させた BGG に DNBS を反応させたところ、0.5%および1.0%の濃度の formalin では BGG と DNP 基の結合がほぼ阻止されることがわかった。すなわち、BGG 1 mol に対して formalin を 507 mol~1,013 mol 作用させたとき、formalin が BGG の側鎖の遊離末端基と結合したことによって DNP 基が結合するべき BGG の基がほとんどすべてふさがれたものと考えられるが、BGG の遊離基が formalin と反応した結果 amino-methylol 基が形成されたのか、methylene 誘導体の形成が生じたものか、あるいは、methylene bridge の形成まで反応が進行したのかは本実験系から明らかにすることはできない。なお、0.01%~0.1% formalin, すなわち、BGG 1 mol に対して formalin を約10mol~100mol 作用させた場合には、DNP 化されるべき BGG の基をすべてふさぐことは不可能であったことになる。

BGG に対する formalin の作用時間と結合した DNP 基数との関係は本実験の結果から次のように考えられる。第1に、0.01%, 0.05%, および、0.1%濃度の formalin を BGG に6時間作用させた場合と24時間作用させた場合とを比較すると、6時間作用させた場合の方が BGG に結合した DNP 基の数がやや少ない傾向にあ

った。一定温度の環境下で BGG と formalin または formalin 処理 BGG と DNBS の反応をおこなうことができなかったことなど、反応系の control が十分ではなかったために考察を加えることは困難ではあるが、0.01%~0.1% 濃度の formalin の場合には BGG との反応開始後 6 時間を経過した時点では透析によって formalin が BGG からふたたび分離するような可逆反応の段階にあった可能性もあるかも知れない。第 2 に、0.05% および 0.1% 濃度の formalin で処理した BGG と DNBS とを反応させたところ、formalin の作用時間が 24 時間以上になると結合した DNP 基の平均数にほとんど変動が認められなかった。0.01% 濃度の formalin で処理した BGG の場合には formalin の作用時間が 96 時間以上になってほぼ変動が認められなくなった。また、0.5% および 1.0% formalin を 6 時間以上作用させた BGG にはほとんど DNP 基の結合はみられなかった。このような結果から、DNP 化されるべき BGG の基の大部分をふさぎ得るだけの十分な量の formalin が存在しさえすれば、その反応はかなり速やかに進行して hapten 化がほぼ完全に阻止されるようである。

ところで、formalin が BGG の DNBS による hapten 化を阻止した事実から、歯内療法学領域で論議されている F.C. による蛋白質の hapten 化が生じる可能性について考察するためには DNBS と蛋白質、そして、cresol と蛋白質との反応性を比較しなければならない。まず、DNBS は蛋白質と結合する際に phenol 基の形をとってその水酸基の部分で蛋白質の amino 基と結合することが明らかにされている⁵⁾。一方、cresol は蛋白質と結合する場合にその水酸基が蛋白質の官能基と反応することが報告されている^{8,9)}。したがって、DNBS も cresol も水酸基が蛋白質との反応に関与することから蛋白質の官能基は共通の基である可能性が強いと思われる、今回の実験結果から蛋白質と F.C. または cresol との反応による蛋白質の hapten 化について推論し、考察を加えることは妥当であると言える。

そこで、本実験で得られた結果から、相当量の formalin の修飾を受けた蛋白質では cresol の結

合し得る基が formalin によってふさがれているために cresol による蛋白質の hapten 化はおこらず、formalin は cresol による hapten 化を阻止するように作用すると推測される。しかしながら、F.C. は等量の formalin と cresol の合剤であり、同時に蛋白質と作用するためにそれぞれが蛋白質に対してどのような反応性を示すのかが歯内療法的に重要な点である。すなわち、蛋白質に F.C. を作用させると、蛋白質-cresol、蛋白質-formalin-cresol、蛋白質-formalin-蛋白質、そして、formalin による蛋白質の分子内 cross-link と、4 通りの反応生成物が生じることが考えられる。このうち、同一蛋白質分子相互での分子間 cross-link や分子内 cross-link が生じても蛋白質の抗原性には変化のないことがすでに明らかにされている¹⁰⁾。しかし、蛋白質-cresol は cresol を hapten とする抗原性を有する可能性が大きいことは Miwa ら¹¹⁾の報告のとおりである。Formalin と cresol とを同時に蛋白質に作用させたとき、蛋白質に対して formalin が cresol と比較して速やかに反応すれば本実験の結果のとおり蛋白質と cresol との結合が formalin によって阻止されることになる。Cohen ら¹²⁾は amino 基と水酸基を有する catecholamin に対して formalin が 1~2 分で縮合をおこさせること、そして、amino 基と反応して tetrahydroisoquinoline を形成させることを報告している。このような phenol 系の hapten 物質と formalin との反応を考えると蛋白質-cresol の生成は formalin で阻止されるように思われる。同じ理由から、蛋白質-formalin-cresol の生成も、蛋白質と F.C. を作用させたときに生じる可能性は少ないように考えられる。また、種類の異なる蛋白質分子相互に分子間 cross-link が生じることによって複雑な免疫応答が惹起される可能性も考えられるが、異なる 2 種の蛋白質に formalin と glutaraldehyde とをそれぞれ作用させて抗原性の変化を検索した Habeeb¹⁰⁾の報告では、formalin の場合に抗原性の変化を認めていないようである。

結 論

歯内療法学領域で頻用されている F.C. が生体

の蛋白質と反応して hapten となる可能性が論じられている。しかし、F.C. の主成分のひとつである formalin は蛋白質との反応性に関するこれまでの報告から蛋白質と hapten との結合を阻止するように反応するものと考えた。そこで carrier と hapten との反応におよぼす formalin の影響を検討するために BGG と DNBS とを用いて実験をおこなった。

その結果、次のような結論を得た。

1. 0.5%~1.0%の濃度の formalin の作用を受けた BGG に対する DNBS による hapten 化は約97%阻止され、蛋白質に対する hapten 化を阻止する formalin の著しい効果が示された。

2. Formalin による BGG の hapten 化の阻止は formalin の濃度に大きく影響され、BGG に対する formalin の作用時間にはほとんど相関しないことが明らかになった。

3. 0.01%~0.1%の濃度の formalin では BGG に対する hapten 化を阻止する効果は少なく、この濃度では DNP 化され得る BGG の基のすべてと反応するためには formalin 量が少ないことが示唆された。

4. BGG の DNBS による hapten 化を formalin ではほぼ完全に阻止するためには BGG 1 mol について約500mol 以上の formalin を作用させる必要があった。

抄録：歯内療法領域で頻用されている F.C. は自己蛋白質である歯髓組織成分に作用すると hapten となって自己を感作する可能性があることを示唆する報告がみられる。このような自己歯髓成分の変化は cresol による修飾で生じると考えられているようである。

ところで、臨床的に formalin の効果は本来根管系に存在する多種類の蛋白質に作用するところにある。Formalin が蛋白質に作用した場合に蛋白質の遊離基の間で cross-link を形成することは周知のとおりである。この cross-link は hapten 物質が結合するべき基に結合することを妨げるように機能するのではないかと考えられる。

そこで、BGG と DNBS とを用いて hapten-carrier の結合を formalin が阻止することを確認するために本実験をおこなった。その結果、BGG 1 mol に対して約500 mol 以上の formalin を作用させたときに、BGG と DNBS の結合がほぼ完全に阻止されることが明らかになった。

文 献

- 1) 真泉平治：新臨床歯科薬理学，149-164，永末書店，京都，1980。
- 2) Block, R. M., Lewis, R. D., Sheats, J. B. and Fawley, J.: Cell mediated immune response to dog pulp tissue altered by formocresol within the root canal. *J. Endod.* 3: 424-430, 1977.
- 3) 信田周一：歯内疾患における修飾歯髓成分の免疫病理学的意義について。日歯保誌 26: 772-795, 1983.
- 4) Feldman, M. Y.: Reactions of formaldehyde with nucleoproteins. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 13: 30-35, 1973.
- 5) Good, A. H., Wofsy, L., Henry, C., and Kimura, J.: Selected methods in cellular immunology (Mishell, B. B. and Shiigi, S. M.) 347-350, W. H. Freeman and company, San Francisco, 1980.
- 6) Hed, J. and Eneström, S.: Detection of immune deposits in glomeruli. The masking effect on antigenicity of formalin in the presence of proteins. *J. Immunol. Methods* 41: 57-62, 1981.
- 7) 好川正孝，至田宗泰，富塚正敏，辻 一郎，戸田忠夫：Formalin による血漿蛋白質の電気泳動的变化に関する研究。日歯保誌 27: 209-214, 1984.
- 8) Shiga, T. and Imaizumi, K.: Generation of phenoxy radicals by methemoglobin-hydrogen peroxide studied by electron paramagnetic response. *Arch. Biochem. Biophys.* 154: 540-547, 1973.
- 9) Trotta, R. J., Sullivan, S. G. and Stern, A.: Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. *Biochem. J.* 212: 759-772, 1983.
- 10) Habeeb, A. F. S. A.: A study of the antigenicity of formaldehyde- and glutaraldehyde-treated bovine serum albumin and ovalbumin-bovine serum albumin conjugate. *J. Immunol.* 102: 457-465, 1969.
- 11) Miwa, A., Yoshioka, M., Shirahata, A. and Tamura, Z.: Preparation of specific antibodies to catecholamines and L-3, 4-Dihydroxyphenylalanine. I. Preparation of the conjugates. *Chem. Pharm. Bull.* 25: 1904-1910, 1977.
- 12) Cohen, G. and Collins, M.: Alkaloids from catecholamines in adrenal tissue: Possible role in alcoholism. *Science* 167: 1749-1751, 1970.