フェノールおよびその誘導体の白血球遊走反応を 指標とした抗炎症作用について

横 山 智 則

朝日大学歯学部歯科薬理学教室（主任：高木順彦教授）

〔受付：昭和60年8月2日〕

Anti-inflammatory effect of phenolic compounds on leukocyte chemotaxis

Tomonori Yokoyama

*Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Asahi University,
1851-1 Hozumi, Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu 501-02, Japan.*

(Chief: Prof. Nobuhiko Takagi)

[Accepted for publication: August 2, 1985]

Key words: Phenolic compounds / anti-inflammatory action / leukocyte chemotaxis / free radical scavenger / prostaglandin

Abstract: Phenolic compounds are widely used in the treatment of inflammatory conditions of the dental pulp. Despite the extensive use of these drugs in dental clinics, studies on the mode of their action on the inflammatory response have been infrequent. Recently, it has been shown that some scavengers for oxygen free radicals are effective in inflammatory conditions. Phenolic compounds are known to possess a property of scavenger for oxygen free radicals. So, the mode of action of the phenolic compounds on the inflammatory response was examined in this study to define the anti-inflammatory mechanism of phenolic compounds as a scavenger for oxygen free radicals. Chemotactic activity of guinea pig peritoneal neutrophils and macrophages to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) were suppressed in a dose dependent manner by phenolic compounds. The relative order of inhibitory activity of phenolic compounds was as follows: eugenol > thymol > guaiacol $\geq$ *p*-cresol $\geq$ *o*-cresol > *m*-cresol > phenol. Phenol inhibited the leukocyte migration to FMLP at the concentration of 2 to 5 mM and this concentration was about one fiftieth to one twentieth of the concentration of phenol which brings about protein denaturation. The inhibitory effect of phenol on leukocyte chemotaxis was reversed by washing the cells before incubation with FMLP. A free phenolic hydroxyl group is essential for scavenging oxygen free radicals. Blocking the hydroxyl group by conversion to an ether markedly diminished antichemotactic activity, as is demonstrated by comparing guaiacol with veratrole, or eugenol with safrole. There was a consistent positive relationship between ID_{50} of PGE_2 synthesis and the inhibitory dose of leukocyte chemotaxis in phenolic compounds. These findings suggest that inhibition of prostaglandin synthesis was involved in the anti-inflammatory mechanism of phenolic compounds and the prevention of the production of oxygen free radicals by the leukocyte appears to be one of the anti-inflammatory actions of phenolic compounds.

緒 言

フェノールが、19世紀の中葉にはじめて歯科領域に応用されて以来、フェノールおよびその誘導

岐阜県本巣郡穂積町穂積1851-1 (〒501-02)

体は、象牙質消毒・歯髄鎮静薬として現在も広く用いられている。フェノールおよびその誘導体の歯科臨床における治療効果についての報告は数多いが、その作用機序についての研究は少ない。一般にフェノールの作用は、非特異的な蛋白凝固・

変性および疼痛性麻痺作用によるものと考えられているが、蛋白質の凝固あるいは変性をおこすためには、ある程度以上の濃度でなければならない。ところが、臨床歯髄組織において作用すると思われる濃度は、蛋白質変性を生じる濃度よりもかなり低い濃度である。したがって、フェノールおよびその誘導体の歯髄の炎症に対する抗炎症鎮痛作用を、非特異的な蛋白質変性による疼痛性麻痺作用のみで説明することは困難である。また低濃度でのフェノールの作用については、細胞の酵素系に影響を与えた結果発現されていると考えられているが¹⁻⁴⁾、その詳細な機序についてはまだ不明な点が多い。一方、活性酸素と呼ばれるフリーラジカルが炎症反応に関与していることが、活性酸素除去剤に抗炎症作用のあることから推測され、ラットのカラゲニン浮腫⁵⁻⁶⁾、逆受身アルサス反応⁵⁾、passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 反応⁷⁾および白血球遊走反応^{8,9)}を用いて証明されている。そこで、フェノールおよびその誘導体のもつ活性酸素除去作用に着目して、この性質に基づく低濃度での特異的な抗炎症作用により歯髄の炎症を抑制し、炎症にともなう疼痛を緩和しているのではないかと考え、これを確める目的で、白血球の遊走反応を用いて検討した。

実験材料ならびに実験方法

A. モルモット 好中球の分離

体重約400gの雄モルモットに1%グリコーゲン (Sigma) を含む生理食塩液40mlを腹腔内投与し、約16時間後に窒息致死させたのち、開腹して腹腔内を約100mlの20mM phosphate buffered saline (pH 7.2, 0.85% NaCl, 以下 PBS と略す) で洗浄することにより腹腔内の遊離細胞を採取した。腹腔細胞は、0.15M NH_4Cl , 0.001M KHCO_3 および0.001M EDTAを含むlysing buffer pH 7.2¹⁰⁾を用いて混入している赤血球を溶血させたのち、室温で750×g, 10分間の遠心分離を2回繰り返してPBSによる洗浄を行った。

B. モルモットマクロファージの分離

マクロファージも好中球の場合と同じ操作により分離した。但しグリコーゲン投与から腹腔細胞採取までの時間は、4日間とした。

C. 細胞分布および viability の測定

血球数は、得られたモルモット好中球およびマクロファージの浮遊液をTürk液(和光純薬)で希釈および染色したのち、Bürker Türk血球計算盤を用いて算定し、細胞分布は、好中球およびマクロファージ浮遊液の塗抹標本をDiff-Quick (Harleco)を用いてdifferential stainingを行い判定した。

Viabilityはtrypanblue dye exclusion法を用いて測定した。

D. 標準遊走因子の調製

標準遊走因子としては、合成遊走因子であるN-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine¹¹⁾ (Sigma, 以下FMLPと略す)を用いた。FMLPはエタノール中に 10^{-2}M となるように溶解したものをFMLP原液として -30°C の冷凍庫中で保存し、使用時に Ca^{2+} および Mg^{2+} を加えたGelatin Veronal Buffer¹²⁾ (pH 7.0, 以下GVB⁺と略す)により希釈して使用した。

E. 遊走試験被験薬物

フェノールおよびその誘導体として、フェノール(和光純薬)、ユーギノール(半井化学)、チモール(和光純薬)、グアヤコール(半井化学)およびo-, m-, p-クレゾール(和光純薬)の7種類を用いた(Fig. 1)。また対照薬として、サフロールおよびベラトロール(和光純薬)を用いた。なお、それぞれの薬物は、実験開始直前に遊走因子

Compounds	2	3	4	6
Phenol				
Eugenol	-OCH ₃		-CH ₂ CH:CH ₂	
Thymnl		-CH ₃		-CH(CH ₃) ₂
Guaiaicol	-OCH ₃			
o-Cresol	-CH ₃			
m-Cresol		-CH ₃		
p-Cresol			-CH ₃	

Fig. 1 Chemical structure of phenolic compounds.

溶液および細胞浮遊液に、同じ濃度となるように溶解して供試した。

F. 細胞浮遊液の調整

好中球およびマクロファージは、2% bovine serum albumin (Sigma) と 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES, 同仁化学) を含む Gey's balanced salt solution¹²⁾ (pH 7.0, 以下 Gey's BSA と略す) に浮遊し、好中球およびマクロファージの細胞濃度は、遊走試験を行って決定した。

G. 好中球およびマクロファージの遊走試験

培養は、25 μ l の遊走因子溶液または GVB⁺ を 48 well microchemotaxis chamber^{13,14)} (Neuro Probe) の bottom well に満たし、好中球の場合には polyvinylpyrrolidone (PVP) free 3 μ m pore size の polycarbonate membrane filter (Nuclepore) を、マクロファージの場合には 5 μ m pore size の polycarbonate membrane filter (Nuclepore) を用い、シリコン製 gasket を装着したのち Top plate を取り付け、top well に 50 μ l の細胞浮遊液を満たし、飽和水蒸気、空気相の条件下 37°C で行った。

遊走試験の培養時間は、種々の時間の培養を行って決定した。

H. Membrane filter の固定および染色

Membrane filter の固定および染色は Falk らの方法¹³⁾に従って行った。すなわち、培養終了後 chemotaxis chamber から取り外した membrane filter を 37°C の PBS 中で静かに洗浄したのち、Diff-Quick の固定液、第 1 液および第 2 液にそれぞれ 45 秒間浸漬して固定染色した。

I. 遊走能の測定

固定および染色を行った membrane filter を slide glass 上で風乾したのち、immersion oil を滴下して cover glass で密封し、光学顕微鏡を用いて membrane filter 下面まで遊走した好中球またはマクロファージの数を倍率 1,000 で観察した。すなわち 5 mm, 5 等分の正方形 grid を刻んだ接眼レンズ grid 内の遊走細胞数を at random に 20 視野計測し、1 視野平均の遊走好中球または遊走マクロファージ数 (cells/oil immersion field¹²⁾) を算出してこれを遊走能とした。なお、

遊走試験はすべて triplicate で行い、その平均値を求めるとともに standard error (SE) を求めた。

J. Prostaglandin (PG) 合成能の測定¹⁵⁾

PG 合成酵素として、ウシ精のうより分離した microsome fraction (Miles) を用いた。PG 合成能測定のための反応系は、反応液 1.5 ml 中に酵素蛋白 5 mg, 比活性 1.85 GBq/mmol の ¹⁴C-arachidonic acid (NEN) 2.7 μ M, 6.7 μ M hydroquinone (和光純薬), 10 μ M hemoglobin (Sigma), 33 μ M glutathione (和光純薬), 200 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 および被験薬物を含み、37°C で 10 分間培養した。0.2 M citric acid 1 ml を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出後、benzene, dioxane, acetic acid (20:20:1) の展開溶媒を用いて薄層クロマトグラフィーを行い、生成した ¹⁴C-PGE₂ をアロカラジオクロマトスキャナー JTC-203 型で測定し、PG 合成活性とした。なお標準物質として ³H-PGE₂ (小野) を用いた。また測定条件は、scanning speed 5 mm/min, range 1 Kcpm, 時定数 10 秒とした。

実験成績

A. 実験条件の検討

好中球およびマクロファージの遊走試験に最も適した条件を設定するために、細胞分布と viability, 細胞濃度、培養時間および標準遊走因子の濃度を検討し以下の結果を得た。

1. 細胞分布および viability の測定

グリコーゲン刺激 16 時間後にモルモット腹腔から採取した白血球における細胞分布は、顆粒球 96%, リンパ球 4% の比率で認められ、viability は trypanblue dye exclusion 法で測定した結果、98% 以上が non staining viable cell であった。

グリコーゲン刺激 4 日後にモルモット腹腔から採取した白血球における細胞分布は、顆粒球 4%, リンパ球 38% であり、マクロファージは 58% の比率で認められ、viability を測定した結果 95% 以上が viable cell であった。

2. FMLP 濃度の検討

FMLP 濃度は、10⁻¹⁰ から 10⁻⁵ M の濃度の FMLP に対する好中球およびマクロファージの

Fig. 2 Dose dependent neutrophil migration to FMLP. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 3 Dose dependent macrophage migration to FMLP. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

遊走能を検討して決定した。なお、好中球の遊走試験には 1.2×10^6 cells/ml の細胞浮遊液、マクロファージの遊走試験には 2×10^6 cells/ml の細胞浮遊液を用いて、好中球の場合には60分間、マクロファージの場合には90分間培養により行った。その結果、Fig. 2およびFig. 3に示したように、好中球およびマクロファージともに 10^{-8} M の

濃度の FMLP に対して最も高い遊走能を認めたので、以下の実験には 10^{-8} M 濃度の FMLP を使用した。

3. 細胞濃度の検討

実験に使用した好中球およびマクロファージ浮遊液の細胞濃度は、それぞれ4種類の濃度の細胞浮遊液を調製して、これらの 10^{-8} M の FMLP および対照として用いた GVB⁺ に対する遊走能を検討した。FMLP に対する遊走能は、好中球およびマクロファージでそれぞれ 1.2×10^6 および 2×10^6 cells/ml の細胞浮遊液を用いた場合に最も高い値を示し、対照の GVB⁺ に対する遊走が認められなかったことから、以後の遊走試験においては、好中球 1.2×10^6 cells/ml、マクロファージ 2×10^6 cells/ml の細胞浮遊液を使用した。

4. 培養時間の検討

FMLP に対する好中球およびマクロファージの遊走能と培養時間との関係は、Fig. 4およびFig. 5に示したように、好中球では60分で、マクロファージでは90分で plateau に達したので、以後の遊走試験における培養時間は、好中球は60分間、マクロファージは90分間とした。

B. フェノールおよびその誘導体の好中球遊走能におよぼす影響

1. フェノールによる影響

好中球の遊走に対するフェノールの影響は、フェノールを遊走因子液および細胞浮遊液に加え、遊走試験を行って検討した。その結果はFig. 6に示したように、FMLP に対する好中球の遊走能は、2~5 mM の濃度のフェノールで濃度依存的に抑制された。この濃度は約0.02~0.05%であり、蛋白質変性が認められる濃度1%の約1/50~1/20に相当する。なお対照の GVB⁺ に対する遊走能は、フェノールによって影響を受けなかった。

2. ユージノールによる影響

FMLP に対する好中球の遊走能は、Fig. 7に示したように $10 \sim 50 \mu$ M の濃度のユージノールで濃度依存的に抑制された。なお GVB⁺ に対する遊走能は、ユージノールによって影響を受けなかった。

3. チモールによる影響

Fig. 4 Kinetics of neutrophil migration to FMLP. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 6 Effect of phenol on neutrophil chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 5 Kinetics of macrophage migration to FMLP. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 7 Effect of eugenol on neutrophil chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

FMLP に対する好中球の遊走能は、Fig. 8 に示したように、200~500 μ M の濃度のチモールで濃度依存的に抑制された。なお GVB⁺ に対する遊走能は、チモールによって影響を受けなかった。

4. グアヤコールによる影響

FMLP に対する好中球の遊走能は、Fig. 9 に示したように、200~500 μ M の濃度のグアヤコールで濃度依存的に抑制された。なお GVB⁺ に対する遊走能は、グアヤコールによって影響を受けなかった。

Fig. 8 Effect of thymol on neutrophil chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 10 Effect of *o*-cresol on neutrophil chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 9 Effect of guaiacol on neutrophil chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 11 Effect of *m*-cresol on neutrophil chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

5. *o*-クレゾールによる影響

FMLP に対する好中球の遊走能は, Fig. 10に示したように, 100~500 μ M の濃度の *o*-クレゾールで濃度依存的に抑制された。なお GVB⁺ に対する遊走能は, *o*-クレゾールによって影響を受け

なかった。

6. *m*-クレゾールによる影響

FMLP に対する好中球の遊走能は, Fig. 11に示したように, 300~700 μ M の濃度の *m*-クレゾールで濃度依存的に抑制された。なお GVB⁺ に

対する遊走能は、*m*-クレゾールによって影響を受けなかった。

7. *p*-クレゾールによる影響

FMLP に対する好中球の遊走能は、Fig. 12に示したように、200~500 μ M の濃度の *p*-クレゾールで濃度依存的に抑制された。なお GVB⁺ に対する遊走能は、*p*-クレゾールによって影響を受けなかった。

C. フェノールおよびその誘導体のマクロファージ遊走能におよぼす影響

1. フェノールによる影響

マクロファージの遊走に対するフェノールの影響は、好中球の場合と同じく、フェノールを遊走因子溶液および細胞浮遊液に加え、遊走試験を行って検討した。その結果は Fig. 13に示したように、FMLP に対するマクロファージの遊走能は、2~5 mM の濃度のフェノールで濃度依存的に抑制された。なお対照の GVB⁺ に対する遊走能は、フェノールによって影響を受けなかった。

2. ユージノールによる影響

FMLP に対するマクロファージの遊走能は、Fig. 14に示したように、10~50 μ M の濃度のユージノールで濃度依存的に抑制された。なお GVB⁺ に対する遊走能は、ユージノールによって影響を受けなかった。

3. チモールによる影響

FMLP に対するマクロファージの遊走能は、Fig. 15に示したように、200~500 μ M の濃度のチモールで濃度依存的に抑制された。なお GVB⁺ に対する遊走能は、チモールによって影響を受けなかった。

4. グアヤコールによる影響

FMLP に対するマクロファージの遊走能は、Fig. 16に示したように、200~500 μ M の濃度のグアヤコールで濃度依存的に抑制された。なお GVB⁺ に対する遊走能は、グアヤコールによって影響を受けなかった。

5. *o*-クレゾールによる影響

FMLP に対するマクロファージの遊走能は、Fig. 17に示したように、100~500 μ M の濃度の *o*-クレゾールで濃度依存的に抑制された。なお GVB⁺ に対する遊走能は、*o*-クレゾールによ

Fig. 12 Effect of *p*-cresol on neutrophil chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 13 Effect of phenol on macrophage chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

て影響を受けなかった。

6. *m*-クレゾールによる影響

FMLP に対するマクロファージの遊走能は、Fig. 18に示したように、300~700 μ M の濃度の *m*-クレゾールで濃度依存的に抑制された。なお

Fig. 14 Effect of eugenol on macrophage chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 16 Effect of guaiacol on macrophage chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 15 Effect of thymol on macrophage chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 17 Effect of *o*-cresol on macrophage chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

GVB[#] に対する遊走能は、*m*-クレゾールによって影響を受けなかった。

7. *p*-クレゾールによる影響

FMLP に対するマクロファージの遊走能は、Fig. 19に示したように、200~500 μ M の濃度の

p-クレゾールで濃度依存的に抑制された。なお GVB[#] に対する遊走能は、*p*-クレゾールによって影響を受けなかった。

D. フェノールおよびその誘導体の白血球遊走に対する作用の比較

Fig. 18 Effect of *m*-cresol on macrophage chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 19 Effect of *p*-cresol on macrophage chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Table 1 Effect of phenolic compounds on leukocyte chemotaxis

Experimental condition	Neutrophil chemotaxis (cells/oil immersion field $\pm$ 1SE)		Macrophage chemotaxis (cells/oil immersion field $\pm$ 1SE)	
	FMLP	Control	FMLP	Control
Control	238 $\pm$ 17	5 $\pm$ 2	120 $\pm$ 10	2 $\pm$ 1
Phenol (3 mM)	145 $\pm$ 12*	3 $\pm$ 1	62 $\pm$ 7*	3 $\pm$ 1
Eugenol (20 μ M)	163 $\pm$ 11*	4 $\pm$ 1	67 $\pm$ 10*	2 $\pm$ 1
Thymol (200 μ M)	135 $\pm$ 12*	5 $\pm$ 2	51 $\pm$ 8*	3 $\pm$ 1
Guaiacol (400 μ M)	143 $\pm$ 10*	4 $\pm$ 1	55 $\pm$ 12*	2 $\pm$ 1
<i>o</i> -Cresol (400 μ M)	168 $\pm$ 15*	5 $\pm$ 1	71 $\pm$ 10*	3 $\pm$ 1
<i>m</i> -Cresol (600 μ M)	120 $\pm$ 15*	3 $\pm$ 1	48 $\pm$ 8*	3 $\pm$ 1
<i>p</i> -Cresol (400 μ M)	153 $\pm$ 13*	4 $\pm$ 1	63 $\pm$ 7*	2 $\pm$ 1

Significant difference from the control: * $p < 0.01$

Table 1 は白血球の遊走に対するフェノールおよびその誘導体の作用をまとめたもので、好中球およびマクロファージの FMLP に対する遊走能は、ユージノールで最も強く抑制され、以下チモール、グアヤコール、*p*-クレゾール、*o*-クレゾール、*m*-クレゾール、フェノールの順に抑制作用は弱くなった。

E. フェノールの白血球遊走に対する作用の可逆性

フェノールの白血球遊走に対する作用の可逆性について検討するために、1～5 mM のフェノー

ールと37℃ で60分間培養した好中球または90分間培養したマクロファージを室温で750 $\times$ g、10分間の遠心分離を2回繰り返して PBS による洗浄を行い、フェノール非存在下で FMLP に対する遊走能を測定した結果、Fig. 20および Fig. 21に示したように、遊走能はほぼ対照のレベルまで戻った。また培養後の白血球の viability を trypan-blue dye exclusion 法で測定したところ90%以上が viable cell であった。

F. フェノール誘導体の白血球遊走に対する作用と活性酸素除去作用

Fig. 20 Reversible effect of phenol on neutrophil chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 21 Reversible effect of phenol on macrophage chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

フェノールおよびその誘導体が、活性酸素除去作用を発現するためには、ベンゼン核に付いた水酸基が必須であることが知られているので、グアヤコールおよびユーギノールの水酸基を置換したアナログすなわち活性酸素除去作用をもたないベラトロールおよびサフロールの白血球遊走に対す

Fig. 22 Chemical structure of veratrole and safrole.

Fig. 23 Effect of guaiacol and veratrole on neutrophil chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

る作用を検討した (Fig. 22)。その結果, Fig. 23 から Fig. 26に示したように、好中球およびマクロファージの FMLP に対する遊走能は、グアヤコールおよびユーギノールが抑制効果を発現する濃度のベラトロールおよびサフロールではまったく影響を受けなかった。

G. フェノールおよびその誘導体の白血球遊走に対する作用とフェノール係数

フェノールおよびその誘導体が FMLP に対する白血球の遊走能を抑制する濃度と、これらの薬物のフェノール係数とを比較した結果、両者の間に相関関係は認められなかった (Table 2)。

H. フェノールおよびその誘導体の PG 合成

Fig. 24 Effect of eugenol and saffrole on neutrophil chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 26 Effect of eugenol and saffrole on macrophage chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Fig. 25 Effect of guaiacol and veratrole on macrophage chemotaxis. Data represent the mean $\pm$ 1SE of triplicate filters (20 oil immersion fields/filter).

Table 2 Comparison of phenol coefficient and inhibition dose of leukocyte chemotaxis in phenolic compounds

Compound	Phenol coefficient*	Inhibition dose of leukocyte chemotaxis
Phenol	1	3000 μ M
Eugenol	8.6	20 μ M
Thymol	30	200 μ M
Guaiacol	0.9	400 μ M
<i>o</i> -Cresol	3.0	400 μ M
<i>m</i> -Cresol	5.0	600 μ M
<i>p</i> -Cresol	2.5	400 μ M

*: by *Salmonella typhosa*.

Table 3 Dual effects of phenolic compounds on prostaglandin synthetase from beef seminal vesicles

Compound	Half-maximal stimulation (μ M)	ID ₅₀ (μ M)
Phenol	180	3200
Guaiacol	25	153
Aminopyrine	57	21000

能におよぼす影響

活性酸素除去剤は濃度により PG 合成を促進または阻害することが知られているので、今回用いた系でのフェノールおよびその誘導体の作用を検討した結果、PGE₂ 合成に対してフェノールは100

~500 μ M の濃度で促進効果を示し、その half-maximal stimulation 値は、180 μ M であった。一方、3~5 mM の濃度では逆に阻害効果を示し、

Table 4 Inhibition of prostaglandin synthetase from beef seminal vesicles by phenolic compounds

Compounds	ID ₅₀ (μ M)
Phenol	3200
Eugenol	28
Thymol	52
Guaiacol	153
<i>o</i> -Cresol	235
<i>m</i> -Cresol	750
<i>p</i> -Cresol	192
Indomethacin	0.28
Aspirin	47

その inhibition dose fifty (ID₅₀) 値は 3200 μ M であった。グアヤコールの half maximal stimulation 値は 25 μ M, ID₅₀ 値は 153 μ M であった (Table 3)。フェノールおよびグアヤコールの PGE₂ 合成に対する ID₅₀ 値が, FMLP に対する白血球の遊走能を抑制する濃度とほぼ一致したので, 今回実験に用いたフェノール誘導体について, PGE₂ 合成に対する ID₅₀ 値を求めた。その結果, PGE₂ 合成に対する ID₅₀ 値は, ユージノールで 28 μ M, チモールで 52 μ M, *o*-クレゾールで 235 μ M, *m*-クレゾールで 750 μ M, *p*-クレゾールで 192 μ M となり, PGE₂ 合成に対する阻害作用も, ユージノールで最も強く, 以下チモール, グアヤコール, *p*-クレゾール, *o*-クレゾール, *m*-クレゾール, フェノールの順で, FMLP に対する白血球の遊走能抑制の場合と一致した (Table 4)。

考 察

フェノールおよびその誘導体は, 歯科臨床において, 歯髄の炎症を抑制し, 炎症にともなう疼痛をも緩和することが知られているが, 実際に歯髄組織で作用すると考えられる低濃度での作用機序についての報告はほとんどなく, バクテリアに対する低濃度での作用が報告されている¹⁻⁴⁾ にすぎない。また, バクテリアに対する作用も, バクテリア細胞の酵素系に影響を与えた結果発現されていると考えられているが, その詳細な機序については, ほとんど解明されていない現状である。フェノールの抗炎症作用についての研究が遅れて

いる最大の原因として, フェノールの抗炎症作用をその蛋白質変性作用に基づく非特異的な刺激作用によるものと考え, フェノールには特異的な抗炎症作用はないと考えられてきたからである。一方, フェノールは, 活性酸素と呼ばれるフリーラジカルに対する除去作用を有することが知られていた¹⁶⁾ が, 近年, 活性酸素に対する除去剤に抗炎症作用が認められることから, 活性酸素が炎症反応に關与していることが, ラットのカラゲニン浮腫^{5,6)}, 逆受身アルサス反応⁵⁾, PCA 反応⁷⁾および白血球遊走反応^{8,9)}を用いて証明されている。そこで, フェノールのもつ活性酸素除去作用に着目して, 低濃度でのフェノールの抗炎症作用機序を, 白血球の遊走反応を用いて検討した。炎症巣へ集積してくる白血球; 好中球やマクロファージは, 侵入細菌や異物, あるいは壊死組織を捕食除去することにより, 炎症過程において重要な役割を担っている。しかし, 生体の homeostasis を維持するための防御反応と考えられている炎症も, 外因性刺激以上に激しい反応が起こる場合には炎症そのものが生体にとって有害となることがしばしば起こる。このような場合, 当然有害反応である炎症を緩解, 除去して正常な機能を営ませることが必要となる。この目的のために, 臨床的には抗炎症薬が用いられている。一方, 1888年 Leber¹⁷⁾ によって, 初めて好中球の遊走が観察されて以来, 種々の方法¹⁹⁻²²⁾ が試みられてきたが, 1962年 Boyden の membrane filter 法²³⁾ が開発されたことにより, 遊走能の定量的測定が可能になり, その後の研究の結果, 現在, 臨床で用いられている抗炎症薬において, *in vitro* での遊走能抑制作用と *in vivo* での炎症局所への白血球浸潤抑制作用との間には強い相関関係のあることが明らかにされて^{24,25)}, これらの薬物の抗炎症作用の一部が炎症局所への白血球の集積を抑制することにより発現されるものと考えられている。今回, フェノールおよびその誘導体7種類の白血球遊走能におよぼす影響を, membrane filter 法により検討したところ, 今回用いた7種類の薬はいずれも, 合成遊走因子である FMLP に対する好中球およびマクロファージの遊走能を濃度依存的に抑制し, その抑制の強さは, ユージノール $\gg$ チモール $>$ グア

ヤコール $\geq$ *p*-クレゾール $\geq$ *o*-クレゾール $>$ *m*-クレゾール $\gg$ フェノールの順であった。またこの濃度では、いずれの薬物も好中球およびマクロファージのランダム運動に対して影響を与えなかった。次に、フェノールの白血球遊走能抑制作用の特異性について検討するために、白血球をフェノールと一定時間培養後、洗浄してフェノール非存在下で遊走能を測定した結果、ほぼ対照のレベルまで戻り、白血球の viability もほとんど低下しなかったことより、フェノールの白血球遊走能抑制作用は可逆的であり、細胞表面の蛋白質変性もしくは、細胞機能の非特異的な抑制によるものではないことがわかった。また、フェノールおよびその誘導体が、活性酸素除去作用を発現するためには、ベンゼン核に付いた水酸基が必須であることが知られている²⁶⁾。そこでグアヤコールおよびユージノールの水酸基を置換したアナログすなわち活性酸素除去作用をもたないベラトロールおよびサフロールの白血球遊走能に対する影響を検討したところ、好中球およびマクロファージの FMLP に対する遊走能は、グアヤコールおよびユージノールが抑制効果を発現する濃度のベラトロールおよびサフロールではまったく影響を受けず、グアヤコールおよびユージノールが、白血球遊走能抑制効果を発現するためにも、ベンゼン核に付いた水酸基すなわちフェノール骨格が必須であることがわかった。フェノールおよびその誘導体の白血球遊走能抑制作用と、これらの薬物の蛋白質変性作用との間にどの程度関連があるか検討した結果、これらの薬物の蛋白質変性作用と強い相関関係のあるフェノール係数と白血球遊走能を抑制する濃度との間には相関関係は認められず、従って、フェノールおよびその誘導体の白血球遊走能抑制作用は、これらの薬物の防腐消毒作用とは異なった機序によるものであることが示唆された。

Cyclooxygenase を介するアラキドン酸代謝における活性酸素の関与については、Pryor and Stanley²⁷⁾および O'Brien and Rahimtura²⁸⁾によって、アラキドン酸が cyclooxygenase の作用をうけて PGG₂ を産生する反応で、反応が進行するためには、アラキドン酸が活性酸素と反応してラジカル化することが必要であると報告されており、

一方、PGG₂ から PGH₂ が生成する反応の産物として生じる活性酸素が、cyclooxygenase を阻害して feed back inhibition をかけ、さらに prostacyclin synthetase をも阻害して、thromboxane A₂ 過剰状態をつくり、炎症を増悪させる²⁶⁾。このように cyclooxygenase を介するアラキドン酸代謝における一種の調節因子的作用をもつ活性酸素に対して、活性酸素除去剤としての性質をもつフェノールおよびその誘導体の PG 合成に対する作用を検討した。活性酸素除去剤は濃度により PG 合成を促進または阻害することがすでに報告されている^{29,30)}ので、今回用いた系でのフェノールおよびその誘導体の作用をみたところ、PGE₂ 合成に対してフェノールは100~500 μ M の濃度で促進し、3~5 mM の濃度では逆に阻害した。グアヤコールも、10~50 μ M の濃度で促進し、100~300 μ M の濃度で阻害した。フェノールおよびグアヤコールの PGE₂ 合成に対する ID₅₀ 値が、これらの薬物が白血球の遊走能を抑制する濃度とほぼ一致したので、今回実験に用いたフェノール誘導体の PGE₂ 合成に対する ID₅₀ 値を求めた。フェノールおよびその誘導体の PGE₂ 合成に対する ID₅₀ 値は、Table 4で示したように、これらの薬物が白血球の遊走能を抑制する濃度とほぼ一致し、PGE₂ 合成に対する阻害作用も、ユージノール $\gg$ チモール $>$ グアヤコール $\geq$ *p*-クレゾール $\geq$ *o*-クレゾール $>$ *m*-クレゾール $\gg$ フェノールの順であった。

以上の結果より、今回実験に用いたフェノールおよびその誘導体が低濃度で、活性酸素除去作用により、白血球の遊走能を抑制し、ほぼ同じ濃度で、cyclooxygenase を介するアラキドン酸代謝を阻害すること。実際にフェノール骨格をもち、活性酸素除去作用を有する新しいタイプの非ステロイド性抗炎症薬が開発され^{26,31-33)}その抗炎症作用機序が、活性酸素除去作用に基づくものであることが報告されている³³⁾こと。酸性非ステロイド性抗炎症薬の作用機序が、cyclooxygenase を介するアラキドン酸代謝の阻害で説明される³⁴⁻³⁶⁾ことなどより、フェノールおよびその誘導体の抗炎症鎮痛作用機序に、PG 合成阻害を介する特異的な作用が含まれることが示唆された。またフェノール

ルおよびその誘導体の白血球遊走能抑制作用は、その活性酸素除去作用により発現されたものであることが証明された。以上今回の実験結果より、フェノールおよびその誘導体の低濃度での抗炎症鎮痛作用の機序の一部が解明されたものと思われる。

結 論

歯科臨床において歯髄炎鎮痛薬として広く用いられているフェノールおよびその誘導体の実際に歯髄組織で作用していると考えられる蛋白質変性を生じない低濃度での抗炎症鎮痛作用機序を、フェノールのもつ活性酸素除去作用に着目して検討し、以下の成績を得た。

1. 好中球およびマクロファージの FMLP に対する遊走能は、フェノールおよびその誘導体によって濃度依存的に抑制され、抑制作用の強さは、ユージノール ≧ チモール > グアヤコール ≧ *p*-クレゾール ≧ *o*-クレゾール > *m*-クレゾール ≧ フェノールの順であった。

2. 最も作用の弱いフェノールは、2～5 mM の濃度で FMLP に対する白血球の遊走能を有意に抑制したが、この濃度は、約 0.02～0.05% であり、蛋白質変性の認められる濃度 1% の約 1/50～1/20 に相当する。またフェノールの抑制作用は洗浄により消失し、可逆的なものであった。

3. 活性酸素除去作用を有しないグアヤコールおよびユージノールのアナログであるベラトロールおよびサフロールでは、FMLP に対する白血球の遊走能は影響を受けなかった。

4. フェノールおよびその誘導体の PGE₂ 合成に対する ID₅₀ 値と、これらの薬物が FMLP に対する白血球の遊走能を抑制する濃度とがほぼ一致した。

5. 以上の成績から、フェノールおよびその誘導体の低濃度での抗炎症鎮痛作用機序に PG 合成阻害を介する特異的な作用が含まれることが示唆された。またフェノールおよびその誘導体の白血球の遊走能抑制作用が、その活性酸素除去作用により発現されたものであることが証明された。以上今回の実験結果より、フェノールおよびその誘導体の低濃度での抗炎症鎮痛作用機序の一部が解明されたものと思われる。

謝辞：稿を終わるにあたり、ご懇篤なるご指導とご校閲を賜った高木順彦教授に深甚の謝意を表します。また、本研究に際し、終始ご指導、ご助力くださいました東幸雄講師はじめ歯科薬理学教室員各位に感謝いたします。さらに本研究に対して協力戴いた放射性同位元素研究施設の山口良三氏に感謝します。

なお、本論文の要旨は、第 25 回歯科基礎医学会総会（昭和 58 年 10 月、福岡）において報告した。

抄録：フェノールおよびその誘導体は、歯髄炎治療薬として広く用いられているが、その作用機序については不明な点が多い。活性酸素除去剤に抗炎症作用があり、フェノール系薬物に活性酸素除去作用のあることが知られている。そこでフェノール系薬物の活性酸素除去剤としての性質に着目して、抗炎症作用機序を検討した。FMLP に対するモルモット好中球およびマクロファージの遊走能は、フェノールにより濃度依存的に抑制された。フェノール系薬物の抑制作用は、ユージノール ≧ チモール > グアヤコール ≧ *p*-クレゾール ≧ *o*-クレゾール > *m*-クレゾール ≧ フェノールの順であった。フェノールは 2～5 mM の濃度で FMLP に対する白血球遊走を抑制した。またこの濃度は蛋白質変性を生じる濃度の約 1/50～1/20 に相当する。またフェノールの抑制作用は洗浄により消失し、可逆的なものであった。フェノール系薬物の PGE₂ 合成に対する ID₅₀ 値と白血球遊走能を抑制する濃度との間には相関関係があった。これらのことより、フェノールおよびその誘導体の低濃度での抗炎症鎮痛作用機序に PG 合成阻害を介する特異的な作用が含まれることが示唆された。またフェノールおよびその誘導体の白血球の遊走能抑制作用が、その活性酸素除去作用により発現されたものであることが示された。

文 献

- 1) Gale, E. F. and Taylor, E. S.: Assimilation of amino acid by bacteria. II. Action of ty-

rocidine and some detergent substance in releasing amino acid from the internal environment of *Streptococcus faecalis*. J. Gen. Microbiol. 1: 77-84, 1947.

- 2) Pulvertaft, R. J. V. and Lumb, G. D.: Bacterial lysis and antiseptics. *J. Hyg.* **46**: 62-64, 1948.
- 3) Maurice, P.: A substitute for measurement of viability in the evaluation of disinfectants. *Proc. Soc. Appl. Bact.* **15**: 144-154, 1952.
- 4) Haydon, D. A.: Surface behavior of *Escherichia coli*. II. Interaction with phenol. *Proc. Roy. Soc. Sect. B* **145**: 383-391, 1956.
- 5) McCord, J. M., Stokes, S. H. and Wong, K.: Superoxide radical as a phagocyte-produced chemical mediator of inflammation. *Adv. Inflammation Res.* **1**: 273-280, 1979.
- 6) Oyanagui, Y.: Participation of superoxide anion at the prostaglandin phase of carrageenan foot-oedema. *Biochem. Pharmacol.* **25**: 1465-1472, 1976.
- 7) Azuma, Y., Hashizume, I. and Takagi, N.: Participation of free radicals in immediate hypersensitivity. *Proc. Eighth Int. Cong. Pharmacol. Tokyo* p. 427, 1981.
- 8) 東 幸雄, 橋爪伊勢夫, 高木順彦: SOD の抗炎症作用機序についての検討—白血球遊走における O_2^- の役割— *炎症* **3**: 355-356, 1983.
- 9) Petrone, W. F., English, D. K., Wong, K. and McCord, J. M.: Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**: 1159-1163, 1980.
- 10) Roos, D. and Loos, J. A.: Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes. I. Stimulation by phytohaemagglutinin. *Biochim. Biophys. Acta.* **222**: 565-582, 1970.
- 11) Schiffmann, E., Corcoran, B. A. and Wahl, S. M.: N-formyl-methionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**: 1059-1062, 1975.
- 12) Wahl, S. M.: Corticosteroid inhibition of chemotactic lymphokine production by T and B lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **256**: 375-385, 1975.
- 13) Falk, W., Goodwin Jr., R. H. and Leonard, E. J.: 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J. Immunol. Methods* **33**: 239-247, 1980.
- 14) Harvath, L., Falk, W. and Leonard, E. J.: Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: Use of polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. *J. Immunol. Methods* **37**: 39-45, 1980.
- 15) Yoshimoto, A., Ito, H. and Tomita, K.: Cofactor requirement of the enzyme synthesizing prostaglandin in bovine seminal vesicles. *J. Biochem.* **68**: 487-499, 1970.
- 16) Kuehl Jr., F. A., Humes, J. L., Beveridge, G. C., Van Arman, C. G. and Egan, R. W.: Biologically active derivatives of fatty acids. *Inflammation* **2**: 285-294, 1977.
- 17) Leber, T.: Über die Entstehung der Entzündung und die Wirkung der Entzündungserregenden Schädlichkeiten. *Fortschr. Med.* **6**: 460-464, 1888.
- 18) McCutcheon, M., Wartman, W. B. and Dixon, H. M.: Chemotropism of leukocytes *in vitro*. *Arch. Pathol.* **17**: 607-614, 1934.
- 19) Harris, H.: Chemotaxis of granulocytes. *J. Pathol. Bact.* **66**: 135-146, 1934.
- 20) Ketchel, M. M. and Favour, C. B.: Acceleration and inhibition of migration of human leukocytes *in vitro* by plasma protein fraction. *J. Exp. Med.* **101**: 647-663, 1955.
- 21) Cutler, J. E.: A simple *in vitro* method for studies on chemotaxis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **147**: 471-474, 1974.
- 22) Nelson, R. D., Quie, P. G. and Simmons, R. L.: Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Immunol.* **115**: 1650-1656, 1975.
- 23) Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* **115**: 453-466, 1962.
- 24) Borel, J. F.: Effect of some drugs on the chemotaxis of rabbit neutrophils *in vitro*. *Experientia* **29**: 676-678, 1973.
- 25) Rivkin, I., Foschi, G. V. and Rosen, C. H.: Inhibition of *in vitro* neutrophil chemotaxis and spontaneous motility by anti-inflammatory agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **153**: 236-240, 1976.
- 26) Kuehl Jr., F. A., Humes, J. L., Egan, R. W., Ham, E. A., Beveridge, G. C. and Van Arman, C. G.: Role of prostaglandin endoperoxide PGG_2 in inflammatory processes. *Nature* **265**: 170-172, 1977.
- 27) Pryor, W. A. and Stanley, J. P.: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acid, nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J. Org. Chem.* **40**: 3615-3617, 1975.
- 28) O'Brien, P. J. and Rahimtula, A.: The possible involvement of peroxidase in prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **70**: 832-838, 1976.
- 29) Egan, R. W., Humes, J. L. and Kuehl Jr.,

- F. A. : Differential effects of prostaglandin synthetase stimulators on inhibition of cyclo-oxygenase. *Biochemistry* 17 : 2230-2234, 1978.
- 30) Egan, R. W., Gale, P. H., Beveridge, G. C., Marnett, L. J. and Kuehl Jr., F. A. : Direct and indirect involvement of radical scavengers during prostaglandin biosynthesis. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 6 : 153-155, 1980.
- 31) 阿部哲士, 川向康生, 磯村八州男, 立川四郎, 前野弘夫 : 新しい imidazoline 誘導体 YM 13162の抗炎症作用 炎症 3 : 507-508, 1983.
- 32) 愛下秀毅, 森村武士, 酒井芳紀, 坂口博昭, 坪島正巳 : 新しい type の抗炎症剤 2-aminomethyl-4-tert-butyl-6-propionylphenol (ONO-3144) の 2, 3 の性質について 炎症 2 : 465-466, 1982.
- 33) 東 幸雄, 横山智則, 小笹憲雄, 小川 保, 高木順彦 : 新しいタイプの塩基性抗炎症薬 2-amino-methyl 1-4-tert-butyl 1-6-propionionylphenol (ONO-3144) の抗炎症作用について 歯基礎誌 26 : 1072-1077, 1984.
- 34) Vane, J. R. : Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature : New Biol.* 231 : 232-235, 1971.
- 35) Smith, J. B. and Willis, A. L. : Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature : New Biol.* 231 : 235-237, 1971.
- 36) Ferreira, S. H., Moncada, S. and Vane, J. R. : Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nature : New Biol.* 231 : 237-239, 1971.