正常歯髄および実験的炎症歯髄の アラキドン酸代謝

cell-free system による検討

興地隆史・小林千尋・砂田今男^{*1)}、森田育男・
室田誠逸^{*2)}

rapid communication

Change of arachidonic acid metabolism in inflamed rat dental pulp The profile of arachidonic acid metabolism in rat dental pulp was studied with a cell-free system. Conversion of exogenously added radioactive arachidonic acid was measured by using thin-layer chromatography. Normal dental pulp could mainly produce 6-keto-PGF_{1α} and 12- or 15-HETE like lipoxygenase product. When rat dental pulp was experimentally inflamed by applying bacterial lipopolysaccharide, increase of arachidonic acid metabolizing activity was observed. Especially PGE₂ producing activity was elevated 9.3-fold compared with that of the normal. It was suggested that arachidonic acid metabolites were involved in the development of pulpal inflammation.

Takashi Okiji・Chihiro Kobayashi・Imao Sunada^{*1)},
Ikuko Morita・Sei-itsu Murota^{*2)}

key words: arachidonic acid metabolism,
inflammation, dental pulp

歯髄の生理機能の調節,あるいは病態の成立過程におけるアラキドン酸代謝物の関与については,これまで詳細な検討はほとんどなされていない. 現在までのところ,ラジオイムノアッセイ法を用いてヒト¹⁾,ラット²⁾,あるいはイヌ歯髄³⁾において,アラキドン酸代謝物が存在することを示した報告があるにすぎない.したがって, cell-free 系を用いて,歯髄におけるリポキシゲナーゼ経路を含む,アラキドン酸代謝活性の全貌を明らかにすることは,意義のあることと思われる.

今回,筆者らは,ラット歯髄ホモジネートにおける外因性アラキドン酸の変換を指標として,ラット正常歯髄のアラキドン酸代謝活性の特徴,および歯髄炎の成立過程におけるアラキドン酸代謝物の関与の実態について,若干の興味ある知見を得たので報告する.

材料と方法

実験には,体重 250 g 前後の SD 系雄性ラットを用い

表 1 synthesized arachidonic acid metabolites from rat normal and inflamed dental pulp

	normal (dpm/mg protein)	inflamed (dpm/mg protein)
6-keto-PGF _{1α}	1500.0 ± 253.4	5682.5 ± 1187.1
TXB ₂	370.1 ± 50.0	1900.9 ± 320.3
PGE ₂	216.6 ± 30.4	2017.9 ± 572.0
HETE	3196.0 ± 489.2	6479.4 ± 1324.8

mean ± SE of 5 experiments

図 1 radiochromatogram showing the profile of arachidonic acid metabolism in rat normal pulp

The extracted sample was spotted on a thin-layer plate and developed with an organic phase of the solvent system of ethyl acetate/2, 2, 4-trimethyl pentane/acetic acid/water, 110 : 50 : 20 : 100, v/v. The dotted line shows the lower sensitivity of radiochromatoscanner by 0.3-fold.

た. 上顎切歯より歯髄を摘出後, 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 8.2) 中にて超音波破碎したものを酵素源とした. この酵素液に ¹⁴C-アラキドン酸を加え, 2 mM の Ca²⁺ 存在下で 37°C 30分間インキュベートした. 生成した ¹⁴C-標識アラキドン酸代謝物を薄層クロマトグラフィーにより分離した. 生成量の定量は, 薄層プレート上の代謝物に相当する部分をかきとった後, そこに含まれる放射能の量を液体シンチレーション法で測定することにより行った.

実験的炎症歯髄は, 以下の方法により作製した. すなわち, ネブタール麻酔下で上顎切歯の歯冠を歯肉縁付近で切断後, ハンドリーマーで切断面より約 7 mm, 45 号まで歯髄腔を拡大して貼薬のためのスペースを設け, ここに長さ 5 mm に切断した Fiber Point にて LPS (*E. coli* 055 : B5, 20 mg/ml)を貼付し, Caviton で仮封した. 24時間後, ラットを屠殺し, 上述の方法により, アラキドン酸代謝活性を測定するとともに, 病理組織学

^{*1)} Department of Endodontics & ^{*2)} Institute of Stomatognathic Science, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University ^{*1)} 東京医科歯科大学歯学部第三歯科保存学教室, ^{*2)} 同顎口腔総合研究施設機能部門

的検索も合せて行った。

結果と考察

図1は、ラット正常歯髄における¹⁴C-アラキドン酸の代謝を示すラジオクロマトグラムである。もっとも強い放射能は、薄層プレート上で12-HETEおよび15-HETEと一致する部位に認められた。本代謝物の産生は、indomethacin (10⁻⁵M)では抑制されないが、BW-755C (10⁻⁴M)添加により著明に抑制された。したがって、この代謝物は、リポキシゲナーゼによって産生されたものであり、歯髄におけるHETE生合成活性の存在が明らかとなった。歯髄中のHETEの存在に関しては、現在までまったく報告されておらず、その産生細胞、あるいは生理的意義については、今後の検討が必要であろう。現在、筆者らは、HPLCおよびGC/MSを用いてこのリポキシゲナーゼ代謝物を同定中である。

一方、シクロオキシゲナーゼ産物に関しては、6-keto-PGF_{1α}がもっとも多量に生成された。PGD₂, E₂, E_{2α}, TXB₂, およびHHTも産生されたが、その量はわずかであった。

Hirafuji ら²⁾は、ラジオイムノアッセイ法により、ラット切歯歯髄においてはPGI₂生合成活性が著明であることを報告しており、これは筆者らの結果と一致するものである。

歯髄におけるPGI₂の産生源は、現在不明であるが、歯髄中に豊富に分布する血管系の細胞が、その産生源の一つと考えられ、歯髄内の血管系の恒常性維持に対するPGI₂の関与が推察される。

つぎに、LPS貼付によって実験的に炎症を惹起させたラット切歯歯髄を用い、歯髄における炎症反応の進展におけるアラキドン酸代謝物の関与について検索した。この炎症モデルにおいては、病理組織学的には血管の拡張、充血、および好中球を主体とする炎症性細胞の浸潤などが観察された。好中球浸潤はLPS貼付部直下にいちじるしく、下層にむかいびまん性に認められたが、根尖部付近ではごくわずかに観察されるのみであった。

表1に、このような炎症歯髄組織におけるアラキドン酸代謝活性を、正常歯髄と比較して示す。炎症歯髄においては各代謝物とも生成量の増加が認められたが、特にPGE₂生合成活性は9.3倍、TXB₂生合成活性は5.2倍

に上昇した。6-keto-PGF_{1α}およびHETEの生成量の増加は、それぞれ3.8倍、2.0倍であった。また、12-HETEおよび15-HETEよりわずかに極性の高い、未同定の代謝物の産生も認められた。

歯髄炎は、臨床的にはときに激しい痛みを伴うことが知られているが、本質的には一般の結合組織における炎症と類似した非特異的炎症であると考えられている。歯痛に対し、非ステロイド性抗炎症薬が有効であることから、歯髄炎の発症過程、あるいは歯痛の発現に対するアラキドン酸代謝物の関与が示唆されるが、現在までこの方面の知見はきわめて少ない^{1,3)}。

今回観察された、炎症歯髄組織におけるアラキドン酸代謝活性の上昇は、LPSによる起炎刺激により、歯髄を構成する細胞群自体のアラキドン酸代謝活性が亢進したこと、および、歯髄内に浸潤した炎症性細胞が著明なアラキドン酸代謝活性を有することの両者を反映したものと考えられる。急性炎症巣におけるアラキドン酸代謝物の関与については、現在まで多くの研究がなされており、PGE₂, I₂は、細静脈の血流増加作用を介して血管透過性亢進現象に⁴⁾、またTXB₂⁵⁾およびHETE⁶⁾は白血球遊走現象にそれぞれ関与することが報告されている。

したがって、これらのアラキドン酸代謝物が、今回病理組織学的に観察された、歯髄における炎症性変化の成立過程に対し、密接な関連を有するものと推測される。今後、歯髄における炎症のどの時期にどの種類のアラキドン酸代謝物がどの程度の役割を演じているかについて、さらに検討を進める予定である。

文 献

- 1) Cohen, J.S. et al.: J. Endod. 11: 330-335, 1985.
- 2) Hirafuji, M., Ogura, Y.: Biochem. Pharmacol. 32: 2983-2985, 1983.
- 3) Lessard, G.M. et al.: J. Endod. 12: 146-149, 1986.
- 4) William, T.J.: Br. J. Pharmacol. 65: 517-524, 1979.
- 5) Kitchen, E.A. et al.: Prostaglandins 16: 239-244, 1978.
- 6) Palmer, R.M.J. et al.: Prostaglandins 20: 411-418, 1980.