

ラット切歯歯髓における脂質分画の脂肪酸組成と コレステロールにおよぼす放射線照射の影響

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）

大 橋 茂

（昭和53年11月15日受稿）

Key words ラット切歯歯髓, 脂質分画, 脂肪酸分析
コレステロール, 放射線照射

緒 言

歯髓の主な機能は歯の形成ならびにその機能維持にある。歯髓の機能代謝についての脂質の役割は、エナメル芽細胞、象牙芽細胞におけると同様に余り解明されていない。歯の硬組織における脂質については主として組織化学的研究^{1~5)}において脂質の存在が報告されてきたが、最近、生化学的研究も定性的、定量的になされつつある。^{6~13)} 歯と脂質の関係について興味あることは、歯の形成の石灰化過程に、ある種の脂質が関与していることが示唆されていることである。Anderson¹⁴⁾は骨端軟骨の石灰化の研究において、石灰化開始部位の基質に基質小胞 (Matrix Vesicle) の存在を明らかにした。この基質小胞は細胞から分泌される単位膜で囲まれた小胞構造で、この小胞に最初の結晶構造が出現し、ついでそこから周囲への石灰化が進んで行くことから、この基質小胞が石灰化を惹きおこすメカニズムを担っていると考えられている。この基質小胞にリン脂質が高濃度に含まれていることが Peress et al¹⁵⁾により明らかにされ、脂質の骨の石灰化への関与が注目されてきている。この様な基質小胞体は、歯においてもエナメル質石灰化部位をのぞいて、硬組織石灰化部位に観察されることが Bernard,¹⁶⁾ Eisenmann・Glick¹⁷⁾, Sisca・Provenza,¹⁸⁾ Slavkin et al.¹⁹⁾により次々と報告されており、歯における石灰化にとっても重要な構造物であることは疑いないと思われる。

歯と脂質との関係は一連の組織化学的研究により注目されてきているが、^{1~3,20~22)} 基質小胞体との関係からも、歯の硬組織ならびに軟組織としての歯髓の脂質の生化学的分析は重要と考える。歯の硬組織

の脂質組成ならびに脂肪酸分析は、象牙質、エナメル質について多くの報告^{6~13)}がみられるが、歯髓の脂質については、若干の動物において組成分析の報告^{23~30)}がみられるにすぎない。脂肪酸分析についても未だ詳細な研究はみられていない。

細胞膜成分としての脂質、特にリン脂質は Singer・Nicolson³¹⁾により膜モデル (流動モザイク説) が提出され、生体膜として細胞内成分の生理的機能への分担に関連して研究が進められ、酵素反応、膜の透過性、細胞膜間の融合、免疫など様々の生理的機能で重要な動的役割を果たすことが示唆されている。^{32,33)}そして膜リン脂質の不飽和脂肪酸量の増減、脂肪酸炭素鎖は長短は膜の流動性に影響をおよぼす³⁴⁾。このことは膜の機能に密接した流動性がリン脂質の脂肪酸組成に依存していることを示している。³⁵⁾一方ステロールの膜における存在も重要視され、高等動物細胞は主として膜表面にステロールを豊富に有しており、至適な膜構造の維持に寄与していると考えられている。³⁶⁾これらのことから膜の流動性調節はリン脂質脂肪酸鎖とステロールとの相互作用による膜脂質の動的構造に規定されていると言っても過言でない。このことはまた膜ステロールの質的あるいは量的変化が生じた際には、膜構造保持安定剤としての作用が減弱ないしは喪失され、ひいては膜機能に障害をきたすことになろう。リン脂質の脂肪酸構成パターンは、臓器組織によって特異性がみられ、^{37,38)} 歯髓脂質分画の脂肪酸組成ならびにコレステロールについて明らかにすることは、膜の特異性を理解する意味で重要である。またコレステロールは骨端軟骨の基質小胞に含量が高いことが認められており、^{7,8)}リン脂質とともに骨、歯の石灰化に関与することが注目されている。

歯髓の脂質分画における脂肪酸の分析報告は少なく、Graziano³⁷⁾による牛歯髓における総脂肪酸の報告と、Ellingson・Gibson³⁸⁾によるラット、家兎、牛の歯髓におけるリン脂質の総脂肪酸の比較がなされている。教室の橋本³⁹⁾はラット切歯歯髓について脂質組成の解析を行い、総脂肪酸については、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、アラキドン酸が主成分であることを報告している。

一方、歯に対する放射線の影響は、Leist³⁹⁾がラット頭部に治療線量のX線を照射し象牙質欠損を観察して以来、多くの種類の実験動物での組織学的研究は、照射によって歯胚部の歯髓に浮腫がみられ、象牙芽細胞形成障害として“Dentin Nische”という特徴がみられることを示している。⁴⁰⁾ Franke・Pliess⁴¹⁾は25 Rという少線量照射でも歯胚部の歯髓に核崩壊、石灰化直前の段階にある一部の象牙芽細胞の変性を認めており、組織学的には歯髓はかなり放射線感受性の高いことが示されている。またFedorov⁴²⁾は齶蝕の発生が放射線照射動物においてその発生率が高いことを報告しており、齶蝕歯の構成脂肪酸に変動がみられるということ^{43)~47)}を合せ考えると、歯の成長維持にたずさわる歯髓脂質の放射線による変化を検討することは、正常歯髓の機能恒常性を理解する上に役立つものと考えたので、私はラット切歯歯髓脂質の各脂質分画について脂肪酸組成の解析を行うとともに、X線照射後の変動を究明し、コレステロールについての検討も合せ行った。

実験材料および方法

1) ウィスター系雄性ラット、体重100 g(産後4週目)のものを使用し、市販の固形飼料(オリエンタルMF)を与え飼育し、主として体重230 g前後のラットを実験に供した。

2) X線照射は東芝製KXC 19型深部治療用X線発生装置を用いて行った。管電圧200 KVp、管電流25 mA、濾過板0.5 mmCu + 0.5 mmAl、焦点皮膚間距離50 cmの条件で線量率76 R/minで1回全身照射した。radへの換算は係数(conversion factor)0.95を用いた。⁴⁸⁾脂肪酸分析におけるX線照射群は1000 rad、1回全身照射し、照射後3日目のものである。

3) 切歯歯髓の分離:ラットを断頭、放血後、頭部を水中にて冷却し、上下顎より切歯を抜去した。切歯を縦割し歯髓を摘出し、冷却した0.9%塩化ナトリウム液にて洗浄、濾紙にて吸いとり、この操作をくり返し肉眼的に赤血球の血色の無くなるまで脱血、

洗浄した。

4) 脂質の抽出:1実験当り5匹のラットの上下切歯より歯髓を集め、Folch et al.⁴⁹⁾の方法に準じて脂質を抽出した。歯髓をクロロホルム:メタノール、2:1の比の中でホモゲナイズして浮遊せしめ、1日以上暗所に放置、濾紙にて濾過、その濾液に対し0.2倍容量の0.73%塩化ナトリウム液を重層、静置、1日後に水層(上層)を吸引除去、脱水のため無水硫酸ソーダを加え振とうし、濾紙にて濾過、濾液をN₂ガス下で加温し蒸発、残渣を総脂質として分離した。

5) 脂質分画:薄層クロマトグラフィーで行った。シリカゲルG(merk)薄層を調製し、活性化後、総脂質を塗布、単純脂質分画展開溶媒として、n-ヘキサン:エチルエーテル:酢酸(53:7:0.66 V/V/V)、リン脂質分画展開溶媒として、クロロホルム:メタノール:水(65:25:4)を使用。乾燥後、沃度ガスにて発色、各分画部分を各々集めクロロホルム:メタノール(4:1)で抽出、分画した。

6) 脂肪酸の分析:分離した各脂質分画をStoffel・Ahrens⁵⁰⁾の方法に準じて5%塩酸メタノールを用いてメチルエステル化した後、その脂肪酸エステルを常法に従ってn-ヘキサンで抽出濃縮しガスクロマトグラフィーを行った。ガスクロマトグラフィーは島津製ガスクロマトグラフ(GC-4B)に積分計(ITG-2A, IDC-2A)を接続したのを用い、20%DEGS-1% H₃PO₄カラムで行ない、計測された主ピークについて脂肪酸構成比を算出した。これら一連の脂質分画、脂肪酸分析は3回、計15匹のラットについて行なった。X線照射群も同様である。

7) 歯の硬組織よりの脂質の抽出:歯根部に近い硬組織を、0.9%塩化ナトリウム中で表面をけずりとり洗滌、角質を15% EDTA液で37℃、1夜加温、脱灰操作⁵¹⁾した後ガラスホモゲナイザーで粉碎、クロロホルム、メタノール(2:1)液を20倍量加え、以後歯髓同様の操作で脂質の抽出を行ない、脂肪酸分析を試みた。

8) コレステロール、コレステロールエステルの定量:前述のごときラットを飼育し、体重130 g、230 g、500 gの時期にコレステロールの定量をKilianian反応によるZak et al.⁵²⁾抽出法に準じて行なった。また体重200 g時における正常ラット、およびX線照射(全身1回、600 rad)後1、3、7日目のラット歯髓における定量を行ない、照射による変動を検討した。各群いずれも5匹を1群とし、平

TABLE 1. FATTY ACID COMPOSITION OF LIPID FRACTIONS FROM INCISOR DENTAL PULPS OF NORMAL AND X-RAY IRRADIATED RATS.

Fatty acids	Relative percentages							
	Total lipids		Phospholipid		Triglyceride		Cholesterol ester	
	Normal	X-ray	Normal	X-ray	Normal	X-ray	Normal	X-ray
14:0	2.5	3.4	3.4	5.4	8.9	14.0	7.2	20.9
16:0	35.8	38.0	38.9	36.7	59.4	57.7	60.1	57.0
16:1	1.7	1.4	1.8	1.5	8.2	4.0	5.8	3.2
18:0	18.9	18.6	25.7	21.7	13.5	13.3	15.6	10.6
18:1	22.7	17.6	15.2	13.9	8.6	8.5	7.0	4.9
18:2	7.8	7.9	3.0	4.7	1.5	2.5	4.3	2.6
20:4	10.6	13.1	12.0	16.2	—	—	—	—

均値±S・Dを求めた。

すなわち、1匹上下4切歯より分離した歯髓(30~50mg)を秤量後、目盛付試験管にとり、アセトン:エタノール(1:1, v/v)を10mlまで加え、温浴中で加熱、冷却後、再び全量を10mlとし、遠心上清液を4mlづつ2本の試験管にとった。一方を蒸発乾固、酢酸(超特級)を3ml、呈色試薬⁵¹⁾2mlを加え激しく混和、30分後560mμの吸光度を測定し、総コレステロールを求めた。他方の試験管は抽出上清が1mlになるまで蒸発減量し、ジギトニン液(1% w/v)を加え混和、4時間放置後遠沈(3000rpm, 10分)、上清を除去、沈澱をアセトンで洗滌、再度遠沈、沈澱物に酢酸、呈色試薬を加え呈色測定を行ない遊離コレステロールを算出した。コレステロールエステルは総コレステロールより遊離コレステロールを差し引いて算出した。

結 果

歯髓総脂質の脂肪酸は、パルミチン酸(C_{16:0})、ステアリン酸(C_{18:0})、オレイン酸(C_{18:1})、リノール酸(C_{18:2})、アラキドン酸(C_{20:4})が主成分であったが、ミスチン酸(C_{14:0})、パルミトオレイン酸(C_{16:1})を含めて組成比を求めた。勿論他に多くの微小ピークをガスクロマトグラム上に認めたがこれらは除外した。

表1に示すごとく、総脂肪酸の組成はC_{16:0}>C_{18:1}>C_{18:0}>C_{20:4}<C_{18:2}の順に構成比が高かった。X線照射群では、不飽和脂肪酸含量の中で最も高いC_{18:1}の減少、C_{20:4}の増加がみられ、不飽和脂肪酸へのX線照射の影響が著明であった。

総脂質の単純脂質クロマトグラフィーによる解析は、リン脂質(PL)、コレステロール(Chol)、コレ

ステロールエステル(Chol-E)、トリグリセリド(TG)が主成分であることが示された。これら成分の脂肪酸組成を表1に示す。総PL分画の脂肪酸組成比においては、C_{16:0}>C_{18:0}>C_{18:1}>C_{20:4}の順位が示され、総脂質と比べてC_{18:1}とC_{18:0}の含有順位の逆転がみられた。X線照射群では総脂肪酸でみられたC_{18:1}の減少、C_{20:4}の増加傾向がPL分画でも認められ、またC_{18:0}の相対的減少がみられた。

他方単純脂質の他の主成分であるTGとChol-Eの脂肪酸ではC_{20:4}は測定誤差範囲内しか検出されず、大部分はC_{16:0}が占め他の分画に比してC_{14:0}が多かった。TGは飽和脂肪酸が82%、Chol-Eでは83%とほぼ同率比でみられ、脂肪酸組成はほとんど同じ構成比が得られた。X線照射群ではTGの脂肪酸組成比でC_{18:1}の変化がみられ、Chol-Eでは総PL同様C_{18:1}とC_{18:0}の減少がうかがわれた。またTG、Chol-EではC_{14:0}組成比の著しい増加が示された(表1)。

薄層クロマトグラフィーで得られたPL分画、すなわちホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、リゾホスファチジルコリン(LPC)、スフィンゴミエリン(SM)、ホスファチジルグリセロール(PG)の各分画の脂肪酸組成を表2に示した。

PLの主成分はPC、PE、PSの3者が90%以上を占め、およそ3:2:1の比が示された。これら3者の脂肪酸組成比に各々差異が認められ、それぞれC_{16:0}>C_{18:1}>C_{18:0}>C_{20:4}、C_{18:0}>C_{18:1}>C_{16:0}>C_{20:4}、C_{16:0}>C_{18:1}>C_{18:0}を示した。PC、PEではC_{16:0}とC_{18:0}が逆の構成比率を示したものの、不飽和酸含量はほぼ等しく、C_{20:4}含量比もともに10%以上みられたが、PSではC_{20:4}の含量が少なかった。

TABLE 2. FATTY ACID COMPOSITIONS OF PHOSPHOLIPID FRACTIONS FROM INCISOR DENTAL PULPS OF NORMAL AND X-RAY IRRADIATED RATS.

Fatty acids	Relative percentages											
	Phosphatidylcholine		Phosphatidylethanolamine		Phosphatidylserine		Lysophosphatidylcholine		Sphingomyelin		Phosphatidylglycerol	
	Normal	X-ray	Normal	X-ray	Normal	X-ray	Normal	X-ray	Normal	X-ray	Normal	X-ray
14:0	1.3	0.9	1.1	3.0	2.2	3.1	4.2	1.0	2.6	6.1	1.3	4.2
16:0	39.9	48.8	18.9	23.4	60.9	36.3	56.0	42.0	45.6	34.4	41.2	55.6
16:1	2.5	1.4	2.2	2.2	3.0	0.6	2.3	3.2	0.9	4.4	5.3	2.6
18:0	16.7	18.5	37.9	38.5	12.5	20.7	20.5	26.3	27.9	31.2	26.4	22.6
18:1	22.3	15.9	27.4	16.9	17.5	23.4	13.7	20.3	16.2	13.2	17.0	9.3
18:2	4.7	1.3	1.8	1.2	2.5	2.5	0.3	0.2	0.1	0.8	5.1	1.0
20:4	12.6	13.2	10.7	14.8	1.4	3.4	3.1	7.0	6.7	9.9	3.7	4.8

TABLE 3. FATTY ACID COMPOSITIONS OF RAT TEETH, SUBCUTANEOUS FAT AND THE USED DIET.

Fatty acids	Relative percentages		
	Teeth	Fat	Diet
14:0	3.0	1.8	1.3
16:0	39.2	24.4	17.4
16:1	4.5	4.2	1.8
18:0	15.8	3.5	2.0
18:1	19.8	25.6	21.7
18:2	5.6	36.7	48.7
20:0	—	3.8	7.2
20:4	12.2	—	—

TABLE 4. CHOLESTEROL CONCENTRATIONS OF THE DENTAL PULPS OF RATS IN VARIOUS BODY-WEIGHT.

Body weight (g)	Cholesterol contents (mg/g tissue)			Ratio of ester (%)
	Total	Free	Ester	
130	1.94±0.05	1.51±0.03	0.43±0.04	22.2
230	2.33±0.03	1.76±0.02	0.57±0.04	24.5
500	2.46±0.05	1.69±0.03	0.77±0.02	31.3

TABLE 5. EFFECT OF X-IRRADIATION (WHOLE-BODY, SINGLE DOSE OF 600 rad) ON CHOLESTEROL CONCENTRATIONS OF THE DENTAL PULPS OF RATS.

Day after exposure	Cholesterol contents (mg/g tissue)			Ratio of ester (%)
	Total	Free	Ester	
Control	1.83±0.12	1.63±0.12	0.21±0.03	11.4
Day 1	1.94±0.08	1.69±0.06	0.26±0.04	13.4
Day 3	2.21±0.23	1.77±0.19	0.44±0.11	19.9
Day 7	1.99±0.08	1.72±0.10	0.27±0.08	13.6

3者の中ではPC脂肪酸構成比が総脂肪酸のそれに近い値が得られた。X線照射群において $C_{16:0}$ はその含量の多いPSでは減少、PC、PEでは増加がみられた。 $C_{18:0}$ は3者において増加傾向がみられ、PSでは著しかった。 $C_{18:1}$ はPC、PEでは著しい減少が認められ、PSでは逆に増加がみられた。これらのことから、PC、PEは組成比の異なり（飽和酸 $C_{16:0}$ と $C_{18:0}$ が逆の含量）を示したものの、X線照射による脂肪酸構成比の変動は同傾向を示し、PSでは上記2者とは組成比においてかなり異なりをみせ、また照射にともなう変動も傾向を異にすることが明らかであった。

他の少成分であるLPC、SM、PGにおいては $C_{16:0}$ > $C_{18:0}$ で飽和酸含量が高く、また照射群でも組成比の変動がみられ、3者共通の変動は $C_{20:4}$ の上昇がみられた事である。これら3者のPLに占める含量は少なく、なお詳細なる追求が必要である。

組織臓器細胞の脂肪酸構成は飼料によって変動がみられる。^{52,53}歯の硬組織においても同様の効果が認められてきている。⁵⁴⁻⁵⁶ 使用した飼料の脂肪酸構成の分析の結果、表3に示すごとく、 $C_{18:2}$ 、 $C_{18:1}$ の不飽和酸主体の構成になっていた。また照射に伴う体重の減少は、主として脂肪組織の貯蔵脂肪(TG)の栄養源としての放出減少に由来するが、⁵⁷ラット腹腔脂肪細胞の脂肪酸分析を行った結果は表3に示すごとく、飼料の脂肪酸構成比と著しく類似していた。

歯の硬組織の脂肪酸分析を試みたが、その脂肪酸構成は、若干の差こそあれ、歯髓の脂肪酸構成に準じていると言っても差つかえないと思われる(表3)。

教室の橋本²⁸は歯髓脂質分画のX線照射によるCholおよびChol-Eの相対比の変動が著しいことを報告している。この場合、抽出脂質の薄層クロマト分画面上での発色定量を行って測定している。そこで臨床的方法で直接的にChol量を測定することにより、歯髓重量当りの定量を試みた。ラット体重差によるChol量の定量結果を表4に示す。体重の増加につれて総Cholの増加がみられ、この場合、エステル型の増加が著しかった。

歯髓Chol含量のX線照射にともなう経日的変化を表5に示す。明らかに照射により経日的な一過性の増加が認められた。亜致死線量照射後3日目は健康状態の最悪が予想される時期で、多くの検査において変化巾の大きい時期に当る。⁵⁸ 照射後3日目にみられる総Cholは対照に比して1.2倍の増量がみられたが、これは遊離Cholの極く僅かの増加と、

Chol-Eの倍増によることが示された。照射後7日目では再び減少し正常値に近い値が得られた。

考 按

歯髓の脂質に関する生化学的研究は、Hodge²³、Graziano²⁷、Shapiro・Wuthier²⁴、Manzoli・Gelli²⁵、谷本、²⁶ Ellingson・Smith³⁰、橋本²⁸によって、各種動物につき構成脂質、脂肪酸の解析がなされ報告されてきているが、余り解明されていない。

歯髓の総脂肪酸分析は、Graziano²⁷により牛歯髓では、ラウリル酸($C_{12:0}$)、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ が多かったと報告され、教室の橋本²⁸はラット歯髓の総脂肪酸は $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{20:4}$ の4者が多く、 $C_{18:2}$ は少なかったと報告し、長鎖不飽和脂肪酸含量について両報告者間に差がみられている。本実験においては、ラット切歯歯髓の総脂肪酸は $C_{16:0}$ (36%)、 $C_{18:0}$ (19%)、 $C_{18:1}$ (23%)、 $C_{18:2}$ (9%)、 $C_{20:4}$ (11%)を認め、橋本²⁸の報告と同率の結果が得られた。

最近Ellingson・Gibson²⁹は家兎の切歯、臼歯、ラットの切歯の各歯髓PLの総脂肪酸について報告しており、3者とも構成比が若干異なるものの、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{20:4}$ が主成分で、かなりの長鎖不飽和脂肪酸の存在を認め、ラット切歯歯髓のPL脂肪酸構成比は $C_{16:0}$ (17%)、 $C_{18:0}$ (14%)、 $C_{18:1}$ (17%)、 $C_{20:4}$ (19%)を示し、家兎に比して $C_{16:0}$ が少なかったとしている。本実験で得られた総PLの脂肪酸については、総脂肪酸に比して $C_{18:0}$ (26%)、 $C_{18:1}$ (15%)と構成比に逆転がみられ、 $C_{20:4}$ (12%)の含有比は増加がみられたものの、彼等の報告とはかなりの構成比に差がみられた。

他方歯の硬組織については脂肪酸分析が多くなされてきており、Das・Harris⁶による16種の動物の臼歯の総脂肪酸分析をみると、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ が70~90%を占め、長鎖不飽和脂肪酸は $C_{18:1}$ が主体で、 $C_{20:4}$ は微量成分として分析されていない。またOduyga・Prout⁹によるラット切歯、臼歯の脂肪酸組成分析においても $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ が主成分で、 $C_{16:1}$ 、 $C_{18:2}$ がある種のPLに存在することを報告してはいるが、炭素数20以上の脂肪酸は少なかったとしている。歯の軟組織と硬組織における長鎖脂肪酸の有無は、石灰化過程における脂肪の関与など両者の密接な関係において注目される。本実験においては、歯の総脂肪酸分析ではその組成が歯髓のそれと類似していたことを示し、硬組織においても $C_{20:4}$

が高濃度に存在することを認めた。このことは他の論文との比較において、歯の硬組織、歯髓の比較検討がなされていることは注意をひくとともに、脂肪酸構成の相異は報告者の実験条件、特に飼料の違いが1原因になっていることを示唆している。食餌による脂肪酸構成の変化が報告されてきているが、Alam et al.⁴⁷⁾は大豆油食(その脂肪酸構成は本実験で用いた飼料のそれに近い)のラット切歯においてC_{20:4}が存在したと報告している。

歯髓の単純脂質分画、PL分画の脂肪酸分析については、教室の橋本²⁹⁾によるラット歯髓の総脂肪酸ならびにPLにみられるC_{20:4}がTGにはみられなかったとの報告があるのみで、詳細な検討はなされていない。また橋本²⁹⁾はX線照射によって総脂肪酸でC_{18:1}の減少、C_{20:4}の増加と、不飽和脂肪酸の構成比の変動が認められたことを報告している。本実験でも総脂肪酸に照射にともなう同様の構成比の変動がみられた。PLの脂肪酸でも先に述べたごとく、総脂肪酸に比してC_{18:1}の含有比が少なかったが、X線照射によりC_{18:1}の減少、C_{20:4}の増加が認められた。Das・Harris⁹⁾はラットの歯において食餌制限によりC_{18:1}が増えたことを報告しており、C_{18:1}は特に生理的変動をきたし易い脂肪酸かも知れない。一方、TG、Chol-Eの脂肪酸では両者はかなり似た構成比を示し、C_{20:4}は微量でC_{18:0}が50%以上を占め、飽和脂肪酸がそれぞれ82%、83%と総脂肪酸とはかなり異った構成比がみられた。X線照射群ではTG、Chol-Eの脂肪酸とも、C_{14:0}の上昇が著しく、両分画では照射による脂肪酸の短鎖化が考えられた。これらの結果より、総脂肪酸でみられた照射にともなう不飽和脂肪酸の変化は、含有比率の高いPLにおける変動に起因することが示唆された。

ラット切歯歯髓におけるPLはPC>PE>PSの順に多く、この3者で総PLの83%が占められていることが報告されている。²⁹⁾PCの脂肪酸構成比の順序はC_{16:0}>C_{18:1}>C_{18:0}>C_{20:4}であり総脂肪酸構成比に近く、PEのそれはC_{14:0}>C_{18:1}>C_{16:1}>C_{20:4}でC_{16:0}が少なく、C_{18:0}が多かった。この両者の傾向は歯においても観察されている。⁹⁾これに対してPSではC_{16:0}>C_{18:1}>C_{18:0}>C_{20:4}とPCと同順位で構成されるが、C_{16:0}が61%を占め、C_{18:0}が少なく、C_{20:4}は極めて少なかった。この様にこれら3者の脂肪酸構成は、その構成脂肪酸が同じでもその構成率が大きく異っており、特異性が予想される。またX線照射にともなう構成比の変動もPC、PEでは

C_{18:1}の減少、C_{20:4}の増加と総脂肪酸の変化と同傾向がみられたが、PSではC_{18:1}の増加がみられ構成各脂肪酸の変動が著しかった。PL構成比においてX線照射によるPS含有量の減少が観察されており、²⁹⁾歯髓のPLの役割は生理学的な解析において、さらに詳細な研究が望まれる。歯髓のPLでは他の軟組織に比してPSが特に多く含まれていることが注目されているが、^{24,28,30)}歯においても同様含有量が高いと報告⁷⁾されている。PSの生理的役割は明らかでないが、酸性リン脂質として膜の或種の機能に関与することが示唆されており、⁵⁰⁾歯においても石灰化との関係で注目され、^{60,61)}石灰化組織中の金属イオンとの結合が示されている。⁶²⁾

LPC、SM、PGは歯髓においては含有量が少なく、脂肪酸構成では3者とも飽和脂肪酸が多く認められ、またこれらはX線照射によりその構成比に変動がみられた。これらの事からも、総脂肪酸に認められるX線照射による変動は、いずれの脂質分画にも認められており、末梢組織としての歯髓においても、エネルギー源、または膜構成成分としての脂質に全身照射の影響がみられ、脂質代謝の変動が著しいことが示唆される。

教室の橋本²⁹⁾は抽出された脂質の薄層クロマト分析において、Chol、Chol-Eの構成比がX線全身照射によって著しく変化したと報告している。Cholは歯の軟、硬組織脂肪酸の30%におよび、PLに次ぐ構成成分であり、その変動は重要である。X線照射にともなう、生体内最大のChol合成場所である肝において、照射後¹⁴C-酢酸、¹⁴C-前駆体を用いてのin vitroでの解析では、その促進がみられているが、組織含有量からの分析では増加、減少の種々の傾向がみられており、不明の点が多い。⁶³⁾Rabinowitz・Beideman⁶⁴⁾は頭部へのガンマ線照射により、口腔組織のChol含量が増加したと報告している。

歯髓より直接的に定量された総Cholの含有量は体重の増加とともに、若干ではあるが明らかに上昇が認められたが、これは主としてChol-Eの増加によるものと考えられた。Manzoli・Gelli²⁵⁾は牛胎児の成長(3~9ヶ月)にともなう歯髓の総脂質に対する総Cholの割合は、殆んど一定であったとしている。

X線照射後、歯髓の総Cholは増量がみられ、3日後には1.2倍が得られたが、7日目には再び減少した。この一過性の変化において、Cholでは有意差の

変化が得られず, Chol-E の変動が原因と考えられた。橋本²⁰⁾が示した Chol と Chol-E の相対比と同傾向がみられたが, 変動巾の違いは測定法, 条件の違いが原因と考えられる。

歯髄における Chol は細胞膜構成成分と考えられているが,²⁵⁾末梢組織の Chol 代謝は, 組織にその代謝に必要な酵素が存在するにもかかわらず, 肝における Chol 代謝によるフィードバック, さらに肝より血液中に放出されるリポタンパクによって調節されており, 細胞側の受容体も関係があることが明らかにされつつある。⁶⁵⁻⁶⁷⁾細胞中の Chol は ACAT (Fattyacyl-CoA:Cholesteryl acyl transferase) によって Chol-E になる。X線照射による Chol-E の増加は, この酵素活性の上昇を意味するのかも知れない。

いずれにせよ歯髄における X線照射による脂肪酸, Chol の変動がみられることは, 歯髄における脂質代謝への放射線の影響が明らかにみられることを示すが, それらの変動効果は, 代謝に関する酵素系の放射線による直接的, 間接的な化学変化に起因するというよりも, 照射による変動が経日的にみられることから, 未知の機構による酵素蛋白調節機構の変化がおり, また膜の変化により細胞内での低分子基質や代謝阻害剤の異常な分布がおり, 物質代謝に対する調節機構への効果となって現われてくると考えられる。本実験に用いた歯髄は種々の細胞群を含んでおり, それぞれの生理的機能の解明がなされなければならない。

結 論

ラット切歯歯髄より抽出分離分画した脂質の脂肪酸組成と, X線全身照射後の変動を解析した。

歯髄の脂肪酸はパルミチン酸 ($C_{16:0}$), ステアリン酸 ($C_{18:0}$), オレイン酸 ($C_{18:1}$), アラキドン酸 ($C_{20:4}$) がそれぞれ10%を超える主成分であったが, ミリスチン酸 ($C_{14:0}$), パルミトオレイン酸 ($C_{16:1}$), リノール酸 ($C_{18:2}$) についてもその構成比を求めた。

1) 切歯歯髄の総脂肪酸構成は, 切歯硬組織の総脂肪酸構成に類似していた。

2) 総脂質の脂肪酸は $C_{16:0} > C_{18:1} > C_{18:0} > C_{20:4}$ の順に多く, これらで全体の88%を占めた。照射群では $C_{18:1}$ の減少, $C_{20:4}$ の増加がみられた。

3) 総リン脂質の脂肪酸構成では $C_{16:0} > C_{18:0} > C_{18:1} > C_{20:4}$ の順を示し, 照射群では $C_{18:1}$ の減少, $C_{20:4}$ の増加がみられた。

4) トリグリセリド, コレステロールエステルの脂肪酸構成は $C_{16:0} > C_{18:0} > C_{14:0} > C_{18:1} > C_{16:1}$ の順で, $C_{16:0}$ の含有比が60%を占め, また $C_{14:0}$, $C_{16:1}$ が他の分画より多かったが, $C_{20:4}$ は含まれず, 飽和脂肪酸が80%以上を占め, 両者で類似した構成がみられた。しかし X線照射群では, トリグリセリド脂肪酸の変化は $C_{16:1}$ の減少と $C_{14:0}$ の増加としてみられ, コレステロールエステルでは $C_{18:0}$, $C_{18:1}$ の減少, $C_{14:0}$ の増加がみられ, 両者間で照射による変動は異なった。

5) リン脂質の大部分を構成するホスファチジルコリン(PC), ホスファチジルエタノールアミン(PE), ホスファチジルセリン(PS)の脂肪酸構成は, それぞれ $C_{16:0} > C_{18:1} > C_{18:0} > C_{20:4}$, $C_{18:0} > C_{18:1} > C_{16:0} > C_{20:4}$, $C_{16:0} > C_{18:1} > C_{18:0}$ の構成を示し, 三者間に著しい構成比率の相違がみられ, PC, PE では $C_{20:4}$ の含有比が高く, PS では少かった。また X線照射後の構成変動では, PC, PE において $C_{18:1}$ の減少, $C_{16:0}$, $C_{20:4}$ の増加がみられたが, PS では $C_{18:0}$, $C_{18:1}$ の増加, $C_{16:0}$ の減少と, PS では PL, PE と異なった挙動がみられた。

6) 歯髄重量当りのコレステロール, コレステロールエステルを定量した。成長にともなって総コレステロール含量の若干の増加がみられたが, その増加はエステル型に依存していた。

7) X線照射後, 総コレステロールは一過性に増加し, その後減少した。この量的変動もエステル型の変化が原因とみられた。

謝 辞

本実験は岡山大学医学部放射線医学教室で行ったものである。

稿を終るにあたり, 本研究遂行に際し, 終始御懇篤なる御指導, 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, および恩師西嶋克己教授に深甚なる謝意を捧げるとともに, 格別な御指導, 御助力下さった山本剛禧博士に深く感謝致します。

文 献

1. Irving, J. T. : The sudanophil material at site of calcification. *Archs. Oral Biol.* **8**, 735-745, 1965.
2. Irving, J. T. : The pattern of sudanophilia in developing rat molar enamel. *Archs. Oral Biol.* **18**, 137-140, 1973.
3. Irving, J. T. and Wuthier, R.E. : Histochemistry and biochemistry of calcification with special reference to the role of lipids. *Clin. Orthop.* **56**, 237-260, 1968.
4. Stewart, J.M., Claiborne, P. A. and Luikart, G. A. : A histologic and histochemical study of lipids in human odontoblasts. *J. Dent. Res.* **44**, 608-613, 1965.
5. Alfred, H. : Histochemical observations on the lipids of carious human dentine. *Nature* **210**, 748, 1966.
6. Das, S. K. and Harris R.S. : Fatty acids in the tooth lipids on 16 animal species. *J. Dent. Res.* **49**, 119-125, 1970.
7. Prout, R.E.S., Oduyuga, A.A. and Tring, F.C. : Lipid analysis of rat enamel and dentine. *Archs. Oral Biol.* **18**, 373-380, 1973.
8. Prout, R.E.S. and Shutt, E.R. : Analysis of fatty acid in rat enamel and dentine. *Archs. Oral Biol.* **15**, 1105, 1970.
9. Oduyuga, A.A. and Prout, R.E.S. : Fatty acid composition of neutral lipid and phospholipid of enamel and dentine from rat incisors and molars. *Archs. Oral Biol.* **18**, 689-697, 1973.
10. Dirksen, T.R. and Ikels, K.G. : Quantitative determination of some constituent lipids in human dentine. *J. Dent. Res.* **43**, 246-251, 1964.
11. Dirksen, T.R. : Lipid components of sound and caries dentine. *J. Dent. Res.* **42**, 128-132, 1963.
12. Rabinowitz, J.L., Luddy, F.E., Barford, R.A., Herb, S.F., Orlean, S.L. and Cohen, D.W. : Lipid determination in powdered human dentin by thin-layer and gas-liquid chromatography. *J. Dent. Res.* **46**, 1086-1089, 1967.
13. Prout, R.E.S. and Shutt, E.R. : Analysis of fatty acids in human root dentine and enamel. *Archs. Oral Biol.* **15**, 281-286, 1970.
14. Anderson, H.C. : Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.* **41**, 59-72, 1969.
15. Peress, N.S., Anderson, H.C. and Sajdera, S.W. : The lipids of matrix vesicles from bovine epiphyseal cartilage. *Calc. Tissue Res.* **14**, 275-281, 1974.
16. Bernard, G.R. : Ultrastructural observations of initial calcification in dentine and enamel. *J. Ultrastruct. Res.* **41**, 1-17, 1972.
17. Eisenmann, D.R. and Glick, P.L. : Ultrastructure of initial crystal formation in dentine. *J. Ultrastruct. Res.* **41**, 18-28, 1972.
18. Sisca, R.F. and Provenza, D.V. : Initial dentine formation in human deciduous teeth. An electron microscope study. *Calc. Tissue Res.* **9**, 1-16, 1972.
19. Slavkin, C. H., Bringas, P.Jr., Croissant, R. and Bavetts, L.A. : Epithelial mesenchymal interactions during odontogenesis II. Intercellular matrix vesicles. *Mech. AgeDev.* **1**, 1-23, 1972.
20. Irving, J.T. and Wuthier, R.E. : Further observations on the sudan black stain for calcification. *Archs. Oral Biol.* **5**, 323-324, 1961.
21. Irving, J.T. : Histochemical changes in the early stages of calcification. *Clin. Orthop.* **17**,

- 92-102, 1960.
22. Irving, J.T. : A histologic staining method for sites of calcification in teeth and bone. *Archs. Oral Biol.* **1**, 89-96, 1959.
 23. Hodge, H.C. : Lipid in the tooth pulp. *Proc. Sov. Exp. Biol. Med.* **35**, 53-56, 1936.
 24. Shapiro, I.M. and Wuthier, R.E. : A study of the phospholipids of bovine dentine tissue : II. Developing bovine fetal dental pulp. *Oral Biol.* **11**, 513-519, 1966.
 25. Manzoli, F.A. and Gelli, M. : Quantative determination of lipids in the dental pulp of *Bos taurus* during development. *Archs. Oral Biol.* **13**, 705-708, 1968.
 26. 谷本 門 : カイウサギの歯髄中の脂質に関する研究. 日大歯誌, **42**, 746-752, 1968.
 27. Graziano, V. : Determinazione gas chromatografica degli acidi grassi nella polpa di denti di bue. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **38**, 1304-1306, 1962.
 28. 橋本郷之助 : 歯髄の脂質に関する研究. I. ラット切歯歯髄の脂質ならびに脂肪酸組成の解析と放射線全照射による変動. 岡山医学会誌, **89**, 851-857, 1977.
 29. Ellingson, J.S. and Gibson, B.J. : Fatty acid compositions of phospholipid in rat, rabbit and bovine dental pulp. *Archs. Oral Biol.* **20**, 735-738, 1975.
 30. Ellingson, J.S. and Smith, M. : Phospholipid compositions of rat, rabbit and bovine dental pulp. *Archs. Oral Biol.* **20**, 731-745, 1975.
 31. Singer, S.J. and Nicolson, G.L. : The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720, 1972.
 32. Singer, S.J. : The molecular organization of membranes. *Ann. Rev. Biochem.* **43**, 805-833, 1974.
 33. Sibert, D.F. : Genetic modification of membrane lipid. *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 315-339, 1975.
 34. Machtiger, N.A. and Fox, C.F. : Biochemistry of bacterial membranes. *Ann. Rev. Biochem.* **42**, 575-600, 1973.
 35. 鬼頭 誠 : 大腸菌膜を構成しているリン脂質分子を決定している機構. 生化学, **49**, 1301-1315, 1977.
 36. 野沢義則 : ポリエン抗生物質と膜一膜ステロールの意義に関連して一. 蛋白質核酸酵素, **22**, 115-130, 1977.
 37. Shrennerholm, L. : Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J. Lipid Res.* **9**, 570-579, 1968.
 38. Miyamoto, K., Stephanides, L.M. and Bernson, J. : Fatty acid of glycerophosphatides in developing chick embryonic brain and liver. *J. Lipid Res.* **7**, 664, 1966.
 39. Leist, M. : Über die Einwirkung der Röntgenstrahlen and des Radiums auf Zähne und Kiefer. *Strahlentherapie*, **24**, 268-281, 1927.
 40. Kimeldorf, D.J., Jones, D.C. and Castanera, T.J. : Reviews of general subjects. The radiobiology of teeth. *Radiat. Res.* **20**, 518-540, 1963.
 41. Franke H. and Pliess, G. : Beitrag zur Testung biologische morphologischer Strahlenwirkungen. *Strahlentherapie* **116**, 85-96, 1961.
 42. Fedorov, Y.A. : Increased damage to the teeth by dental caries induced by ionizing radiation (In Russian). *Dokl. Acad. Nauk. SSSR* **14**, 1195-1198, 1961.
 43. Burton, H.S. and Mc Weeney, D.J. : Role of nonenzymatic browning. *Nature* **196**, 995, 1962.
 44. Armstrong, W.G. : Modifications of the properties and composition of the dentinal matrix caused by dental caries. *Adv. Oral Biol.* **1**, 309-331, 1964.
 45. Odutuga, A.A. and Prout, R.E.S. : Fatty acid composition of carious molar enamel and dentine from rats deficient in essential fatty acids. *Archs. Oral Biol.* **20**, 49-51, 1975.
 46. Alam, S.Q., Alvarez, C.T. and Harris, R.S. : Effects of nutrition on the composition of tooth

- lipids and fatty acids in rats : III. Effects of feeding different oils and fats caries and on fatty acid composition of teeth. *J. Dent. Res.* **52**, 236-241, 1973.
47. Alam, S.Q., Alvarez, C.T. and Harris, R.S. : Effects of nutrition on the composition of tooth lipid and fatty acids in rats : II. Effects of restriction of a cariogenic diet on caries and lipid composition of molars and incisors. *J. Dent. Res.* **52**, 229-235, 1973.
48. Recommendation of the international commission on Radiological Units and measurements : *Physical Aspects of Irradiation.* (ICRU- Report 10-b), 1962.
49. Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509, 1957.
50. Stoffel, E.C. and Ahrens, E.M. : Analysis of long chain fatty acids by gas-liquid chromatography. Micromethod for preparation of methyl esters. *Anal. Chem.* **31**, 307-308, 1959.
51. Zak, B., Dickenman, R.C., White, E.G., Burnett, H. and Cherney, P.J. : Rapid estimation of free and total cholesterol. *Am. J. Clin. Pathol.* **24**, 1307-1315, 1954.
52. Abdel-Hay, A.A., Kramer, M., Szotyori, K. and Tarjan, R. : Dietary fats and lipid metabolism. II. The effect of various dietary fats on the fatty acid composition of some organs of the rat. *Nahrung* **12**, 213-218, 1968.
53. Van Golde, L.M.G. and Deenen, L.L.M. : The effect of dietary fat on the molecular species of lecithin from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **125**, 496-506, 1966.
54. Oduyuga, A.A. and Prout, R.E.S. : Effect of essential fatty acid deficiency on the fatty acid composition of individual lipids from enamel and dentine of the rat. *Archs. Oral Biol.* **19**, 911-920, 1974.
55. Das, S.K. and Harris, R.S. : Effects of dietary restriction on the composition of lipids in rat teeth. *Archs. Oral Biol.* **20**, 121-135, 1975.
56. Prout, R.E.S. and Atkin, E.R. : Effect of diet deficient in essential fatty acid on fatty acid composition of enamel and dentine of the rat. *Archs. Oral Biol.* **18**, 583-589, 1973.
57. Agostini, C., Sessa, A., Fenaroli, A. and Ciccarone, P.A. : Production of "fatty livers" by x-irradiation. *Radiat. Res.* **23**, 350-356, 1964.
58. 若林 弘 : X線全身照射のラット肝ミトコンドリアにおける脂質過酸化反応に関する研究. 第一編 X線全身照射にともなうラット肝ミトコンドリアの Fe^{++} 誘導脂質過酸化反応の変動について. 岡山医学会誌, **88**, 185-196, 1976.
59. Pohl, S.L., Kraus, H.M.J., Kozyreff, V., Birnbaumer, L. and Rodbell, M. : The glucogen-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. VI. Evidence for a role of membrane lipids. *J. Biol. Chem.* **246**, 4447-4454, 1971.
60. Oduyuga, A.A. and Prout, R.E.S. : Calcium hydroxyapatite nucleation by lipids extracted from hard and soft animal tissues. *J. Dent. Res.* **52**, 926, 1973.
61. Takazoe, I., Vogel, J. and Ennever, J. : Calcium hydroxyapatite nucleation by lipid extract of *Bacterionema matruchotii*. *J. Dent. Res.* **49**, 395-398, 1970.
62. Shapio, I.M., Wuthier, R.E. and Irving, J.T. : Enamel matrix and dentine. *Archs. Oral Biol.* **11**, 501-512, 1966.
63. Streffer, C. : 放射線生化学 (山田武, 大山ハルミ共訳), 図書出版社, 東京, 1969.
64. Rabinowitz, J.L. and Beideman, R.W. : 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity and chemical composition of rat palatal tissue after gamma irradiation. *Archs. Oral Biol.* **21**, 401-404, 1976.
65. 内藤国幸 : リポ蛋白による脂質代謝調節. 代謝, **13**, 775-784, 1976.
66. 武内 望 : コレステロールと胆汁酸の代謝調節. 代謝, **13**, 785-794, 1976.

67. Brown, M.S. and Goldstein, J.L. : Receptermediated control of cholesterol metabolism. *Science* **191**, 150-154, 1976.

**Fatty acid composition of lipids and cholesterol content
of normal and irradiated rat incisor pulps**

Shigeru OHASHI

Department of Oral Surgery, Okayama University Medical School,

Okayama, Japan (Prof. K.Nishijima)

(Director : Prof. M.Yamamoto)

Department of Medical Radiology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

Fatty acid composition of various lipids isolated and fractionated from rat incisor pulps were analyzed by means of thin layer and gas chromatography. The changes of the compositions after whole body X-irradiation were also investigated.

The results are as follows.

- 1) The fatty acid composition of total lipid from rat incisor pulps was similar to that of total lipids from rat incisor (hard tissue).
- 2) Palmitic, oleic, stearic and arachidonic acids, in that order, accounted for most of the fatty acids (>88%) in total lipid. In the irradiated group (at 3 days after whole body irradiation), oleic acid had decreased and arachidonic acid had increased.
- 3) The fatty acids of phospholipid were found in the order, palmitic, stearic, oleic and arachidonic acids. After irradiation, the percentage of oleic acid decreased and that of arachidonic acid increased.
- 4) Similarly, the fatty acids of triglyceride and cholesterol ester were in the order, palmitic, stearic, myristic, oleic and palmitoleic acid, and palmitic acid accounted for 60%. Saturated fatty acids accounted for over 80% of both lipid fractions and arachidonic acid was a trace component. After irradiation, the changes of fatty acid composition of both lipid fractions were different. A decrease in palmitoleic acid and an increase in myristic acid in the compositions of triglyceride were observed. On the other hand, a decrease in stearic and palmitoleic acids and an increase in myristic acid were observed in cholesterol ester.
- 5) The fatty acids of phosphatidyl-choline (a), ethanolamine (b) and serine (c) were in the orders; (a) palmitic, oleic, stearic and arachidonic acid; (b) stearic, oleic, palmitic and arachidonic acid; and (c) palmitic, oleic and stearic acid.
Arachidonic acid in phosphatidyl choline and ethanolamine accounted for a high percentage of the composition, but was low in phosphatidyl serine. After irradiation, a decrease in oleic acid and an increase in palmitic and arachidonic acid in the compositions of phosphatidyl-choline and -ethanolamine were observed, whereas an increase in stearic and oleic acids and a decrease in palmitic acid was observed in the composition of phosphatidyl serine.
- 6) The contents of free and ester type cholesterol in the incisor pulps were determined. Total cholesterol content increased in parallel with increase in body weight, this increase could be accounted for by an increase in ester type.
- 7) After whole body X-irradiation, the content of total cholesterol increased temporarily and reached maximum 3 days after irradiation. This change of the content was due mainly to the change in the amount of ester type.