

〔原著〕 松本歯学 3 : 117~121, 1977

ウシ歯髓組織中の脂質の分析

深沢加与子, 原田 実

松本歯学 口腔生化学教室 (主任 原田 実 教授)

Analysis of Lipids in Bovine Dental Pulp

KAYOKO FUKASAWA, MINORU HARADA

Department of Oral Biochemistry, Matsumoto Dental College.

(Chief: Prof. M. Harada)

Summary

The composition of lipids in a bovine molar pulp was examined by comparison with serum lipids.

Total lipids were found to be 3.6 percent of the lyophilized molar pulp and 4.0 percent of the lyophilized serum.

The lipids in the pulp were composed of 51.3% compound lipids, 21.6% glycerides, 10.5% cholesterol, and 16.5% cholesterol esters.

The composition of phospholipids which may constitute membranes in the bovine pulp was 48.7% phosphatidylcholine (including lysophosphatidylcholine), 22.1% sphingomyelin, 12.5% phosphatidylethanolamine, 11.9% phosphatidylserine and 4.8% cardiolipin.

結 言

歯髓組織は、硬組織である象牙質の形成維持に重要な役割を果している。Hodge⁶⁾ (1936) は、ヒト歯髓中のリン脂質と、コレステロールを分画定量し、歯髓の脂質研究の端緒をひらいた。近年になって Shapiro と Wuthier¹⁰⁾ (1966), Manzoli と Gelli⁸⁾ (1968) はそれぞれウシを材料とし、Ellingson と Smith³⁾ (1975) は数種の動物を材料とし、歯髓中の脂質を分析し、象牙質の石灰化と

の関係、動物種によるリン脂質画分の比較などにつき検討した。

本稿では、ウシの萌出した臼歯部歯髓を材料とし、脂質の分画定量を行ない血清成分と比較し、さらに結合組織線維を除く目的で、コラゲナーゼ消化を行ない歯髓中の膜成分に由来する複合脂質の分析を試みた。

材 料

ウシ (生後2~3年) 臼歯部歯髓は、屠殺場より得た新鮮な下顎から臼歯を抜去後、破折して採取した。ウシ血清は同じく屠殺場より得た新鮮血

(1977年10月31日受理)

を、3,000 rpm, 10 分間遠心分離し実験に供した。

コラーゲナーゼ (*Clostridium histolyticum*) は Worthington 社製品 (250U/mg) を用いた。各種脂質標準試薬, Cholesterol, Cholesterol Palmitate, 1-Monopalmitate, 1,3-Dipalmitate, Tripalmitate, Palmitic acid, Cardiolipin (bovine), Phosphatidylcholine (bovine), Phosphatidylserine (bovine), Sphingomyelin (bovine) は、ガスクロ工業のガスクロ用特製試薬を用いた。

有機溶媒類は、半井化学薬品の特級品を蒸留して使用した。薄層クロマト用シリカゲルは、Wako gel B5 (和光純薬), カラムクロマト用シリカゲルは Silica Gel No III 200 mesh (半井化学薬品, クロマト用特製試薬) を用いた。薄層プレートは Silicagel $_{60}F_{245}$, 20×20 cm, 250 μ m, (Merck) を用いた。

実験方法

1. 試料の調製 歯髄 100 g を凍結乾燥 (ATOMOVAC Freeze dryer) し、細片とした物に、0.45 M NaCl 溶液 5,000 ml を加え 5 分間ホモゲナイズした。これを 5°C で 12 時間攪拌した後、50,000×g, 1 時間遠心分離し沈殿を集めた。この沈殿に対し、0.45 M NaCl 抽出を同様に 2 度繰り返して行なった。次に塩不溶性画分に 3% 酢酸を加え、5°C で 24 時間攪拌した後、50,000×g, 1 時間遠心分離し、沈殿を集めた。この沈殿に対して、酢酸抽出を同様に 2 度繰り返し得られた沈殿を十分水洗した後、凍結乾燥して不溶性画分とした。

コラーゲナーゼ消化は歯髄不溶性画分 3.5 g を 0.2 M 炭酸水素アンモニウム緩衝液 300 ml (pH 7.8, 1×10^{-3} M $CaCl_2$ を含む) に懸濁させ、コラーゲナーゼを 50 mg 加え、37°C, 24 時間振盪し消化した。この消化液を、20,000×g, 30 分間遠心分離し、沈殿を十分水洗した後、凍結乾燥しコラーゲナーゼ未消化画分とした。

ウシ血清中の脂質の分析は、100 ml を凍結乾燥して用いた。

2. 脂質の抽出 全歯髄、コラーゲナーゼ未消化画分、血清からの抽出は、Folk の方法⁵⁾に従い、各凍結乾燥粉末に、クロロホルム：メタノール (2 : 1) 混液を 100 倍容加え、30 分間還流抽出した。抽出液に 1/5 容の水を加えよく振盪水洗し、クロロホルム層を脂質画分とした。

3. 脂質のカラムクロマトグラフィーによる分離 脂質の分画は、Renkonen 等の方法⁹⁾に従い、シリカゲルカラム (1.8×12 cm) に抽出した脂質を吸着させ、クロロホルム 500 ml 溶出画分 (中性脂質), アセトン 500 ml 溶出画分 (糖脂質), クロロホルム：メタノール (1 : 1) 500 ml ならびにメタノール 500 ml 溶出画分 (リン脂質) をそれぞれ分取した。

4. 薄層クロマトグラフィーによる脂質の分離

A. 全脂質の分離は、Wakogel B5 で 250 μ m の厚さにガラスプレート (20×20 cm) を作成し、110°C, 30 分間加熱し、活性化したもので行なった。展開溶媒は [I] クロロホルム (0.1% エタノール含有) : n-ヘキサン (75 : 25), [II] クロロホルム (0.1% エタノール含有) : メタノール (95 : 5) を用いた。[I] の溶媒で 12 cm 展開し、風乾した後、[II] の溶媒で同方向に 5 cm 展開した。発色は、1% ヨードメタノール溶液で行なった。各分画の定量は、Amenta の方法¹⁾に従い、スポット部分をかき取り、そのまま重クロム酸酸化法²⁾で定量した。

B. リン脂質の分離は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画したリン脂質画分を薄層クロマトグラフィーで分離定量した。Silicagel $_{60}F_{254}$ ガラスプレート (20×20 cm, 250 μ m) を用いた。展開溶媒は、[I] クロロホルム：メタノール：7 N-アンモニア (60 : 35 : 5), [II] クロロホルム：メタノール：酢酸：水 (65 : 25 : 8 : 4) を用いた。各種リン脂質の発色は、1% ヨードメタノール溶液 (不飽和結合), 0.25% ニンヒドリン-アセトン溶液 (アミノ基), ドラゲンドルフ試薬 (第三級アミン) を用いた。

展開と各スポットの同定は次のように行なった。溶媒 [I] にて展開後、ヨード発色試薬で発色させ、スポット部分をそれぞれかき取った。このシリカゲルにクロロホルム：メタノール (4 : 1) を加え 45°C にて抽出を 3 回繰り返し抽出液を集めた。この抽出液の一部を用いて、溶媒 [II] にて再クロマトを行ない、ヨード発色、ニンヒドリン発色、ドラゲンドルフ試薬発色を行なった。また、標準試薬との混合展開を行ないそれぞれを同定した。

5. リンの定量 薄層クロマトグラム抽出液の一定量をマイクロキエルダールフラスコに取り有機

溶媒を減圧下で除去した後、過塩素酸を加え湿式灰化後、無機リン酸を Fiske-Subbarow 法⁴⁾で定量した。

6. 脂質の定量 有機溶媒を乾固し、重クロム酸酸化法²⁾で定量した。標準物質としてパルミチ

ン酸を用いた。

結 果

ウシ歯髓組織中の総脂質量は、乾燥重量当り 3.6%であった。歯髓コラゲナーゼ未消化画分中の

Table 1. The content of lipids in bovine molar pulp and serum

	Dry weight of tissues		Total lipids	
	(g)	(mg)	(%)	
Pulp	10.0	358	3.6	
Collagenase resistant ^a fraction	0.8	270	32.4	
Serum ^b	7.2	290	4.0	

a. 10.0g(dry weight) of pulp was treated.
b. 100 ml of bovine serum was lyophilized.

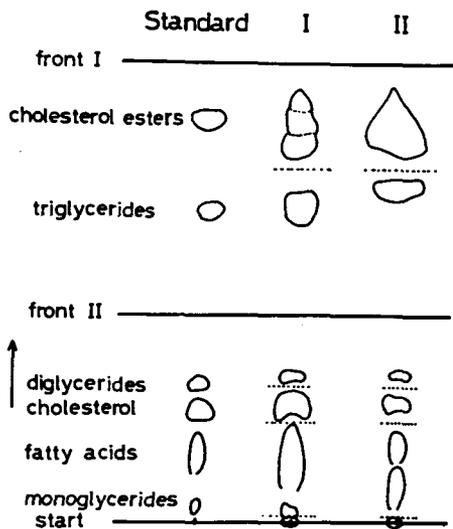


Fig. I. Thin layer chromatogram of the lipids in the bovine molar pulp and serum.

Material : I. Lipids fraction extracted from bovine molar pulp.

II. Lipids fraction extracted from bovine serum.

Plate : Wakogel B-5, 250 μ m.

Solvent : I. n-hexane-chloroform (cont. 0.1 % ethanol) (25 : 27, v/v)

II. chloroform (cont. 0.1 % ethanol)-methanol (95 : 5, v/v)

Identification : 1 % iodine.

総脂質量は乾燥重量当り 32.4%であった(表1)。またこの総脂質量を歯髓乾燥重量当りに換算すると 2.7%となり、前処理によって歯髓組織中の脂質の約 25%が可溶性画分に移行していた。全歯髓、コラゲナーゼ未消化画分および血清中の脂質を薄層クロマトグラフィーにより分離すると 6~7 個のスポットに別れ、原点より順に複合脂質、モノグリセリドならびに脂肪酸、コレステロール、ジグリセリド、トリグリセリド、コレステロールエステルと同定した(図1)。歯髓組織中の脂質と血清脂質を比較すると歯髓組織中には複合脂質の含有量が非常に高く、コレステロールエステルの含有量が低い。特にコラゲナーゼ未消化画分に対してこの特徴は顕著であった(表2)。

歯髓コラゲナーゼ未消化画分の高い含有率を占める複合脂質を分離するためにシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行なった。その結果、中性脂質 41.3%、糖脂質 4.8%、リン脂質 53.9%であった。このカラムクロマトグラフィーの結果は、薄層クロマトグラフィーの結果とよく一致した。また、リン脂質が複合脂質の大部分を占めていた。カラムクロマトグラフィーで分離したリン脂質を薄層クロマトグラフィーで分離定量した結果、ホスファチジルコリンが最も高く、リゾ体を含め 48.7%、スフィンゴミエリン 22.1%、ホスファチジルエタノールアミン 12.5%、ホスファチジルセリン 11.9%、カルジオリピン 4.8%であった。ホ

Table 2. Composition of the lipids in bovine molar pulp and serum (percent of total lipids)

	Pulp	Collagenase resistant fraction	Serum
Compound lipids	51.3	57.6	18.9
Monoglycerides and fatty acids	12.9	8.0	6.5
Diglycerides	3.0	3.5	6.2
Triglycerides	5.7	3.3	8.7
Cholesterol	10.5	17.2	6.2
Cholesterol esters	16.5	10.4	53.5

Values are mean of three different determinations on the same material.

Table 3. Composition of the phospholipids in collagenase resistant fraction of bovine molar pulp

Phospholipids	Percent of total lipids phosphorus
Sphingomyelin	22.1
Phosphatidylcholine	44.1
Lysophosphatidylcholine	4.5
Phosphatidylethanolamine	12.5
Phosphatidylserine	11.9
Phosphatidylinositol	—
Phosphatidic acid	—
Cardiolipin	4.8

The recovery of total phosphorus applied to chromatograms being 94.4%.

Values are mean of three different determinations on the same material.

— : indicates not detected.

スファチジン酸とホスファチジルイノシトールは同定されなかった(表3)。

考 察

ウシ臼歯部歯髓ならびに血清の総脂質含量は、それぞれ3.6%、4.0%であった。この分析値は凍結乾燥材料についての値であるが、歯髓、血清ともほぼ同様に脂質を含有するといえる。一方、コラゲナーゼ未消化画分には歯髓中で可溶性の状態、あるいはコラゲナーゼ消化処理により遊離する脂質は存在せず、歯髓中の細胞膜あるいは構造成分として存在する脂質が回収されていると考えられる。この画分では脂質含量は増加し、32.4%を占め、歯髓全脂質の約75%がこの画分に回収された。

Manzoli と Gelli⁸⁾ は、ウシ胎児の切歯と臼歯の総脂質含量を3、6、9ヶ月と経時的に測定しているが、この値と比較し、本報告の値は低かった。この相違は材料、方法の相違に起因するものと考えられる。

各種脂質成分の分画測定値を総脂質の百分率で比較すると、歯髓と血清で著明な差が見られた。すなわち血清では血清リポタンパク質に由来する組成を示し、歯髓では複合脂質が50%以上を占め、膜、構造成分の組成を示した。また、Manzoli と Gelli⁸⁾ のウシ胎児のコレステロールエステルとコレステロールの存在比率が0.157であるのに対し、本報告では1.57で、エステル型の存在比が高かった。一方、コラゲナーゼ未消化画分の脂質組成は複合脂質の割合の増大に対し、コレステロールエステルの割合が低下し、血清成分が除かれたことを示唆する。

次にコラゲナーゼ未消化画分の複合脂質の構成について、Manzoli と Gelli⁸⁾ のウシ胎児の結果と比較すると、ホスファチジルコリンの割合が最も高い点は一致しているが、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトールが、本結果では検出されなかった。これは、試料の処理の違いに原因すると考えられる。Windrum ら¹¹⁾ は、硬組織中では10~20%の脂質がコラーゲンと強固に会合し

ているため、溶媒抽出での分離が困難であることを指摘し、脂質はコラーゲン構造に必須であると述べている。本報告のリン脂質の値は、歯髄組織中の細胞外成分であるコラーゲンを除いた細胞膜や構成成分のリン脂質をより直接に定量できたものとする。

要 約

ウシ臼歯の歯髄を材料とし、脂質の分画定量を行ない、血清の脂質と比較した。さらに歯髄の不溶性画分をコラゲナーゼで消化し、結合組織線維を除いた膜成分に由来すると考える複合脂質の分析を行なった。

歯髄の総脂質含量は乾燥重量当り3.6%で、血清の4.0%と近い値であった。しかし、歯髄組織の脂質組成は、複合脂質51.3%、グリセリッド類21.6%、コレステロール10.5%、コレステロールエステル16.5%で血清脂質の組成比率とは異なる値を示した。

膜成分に由来すると考えるリン脂質の割合はホスファチジルコリン(リゾ体を含む)48.7%、スフィンゴミエリン22.1%、ホスファチジルエタノールアミン12.5%、ホスファチジルセリン11.9%、カルジオリピン4.8%であった。

文 献

- 1) Amenta, J. S. (1964) A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography. *J. Lipid Res.* 5: 270-272.
- 2) Bloor, W. R. (1928) The determination of small amounts of lipid in blood plasma. *J. Biol. Chem.* 77: 53-73.
- 3) Ellingson, J. S. and Smith, M. (1975) Phospholipid compositions of rat, rabbit and bovine dental pulp. *Archs oral Biol.* 20: 731-734.
- 4) Fiske, C. H. and Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.
- 5) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- 6) Hodge, H. C. (1936) Lipids of the tooth pulp. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 35: 53.
- 7) Irving, J. T. (1958) Sudanophil inclusions in ameloblasts, odontoblasts and cells of the oral epithelium. *Nature*, 181: 569-570.
- 8) Manzoli, F. A. and Gelli, M. (1968) Quantitative determination of lipids in the dental pulp of *Bos taurus* during development. *Archs oral Biol.* 13: 705-708.
- 9) Renkonen, O., Gahmberg, C. G., Simons K. and Kääriäinen L. (1972) The lipids of the plasma membranes and endoplasmic reticulum from cultured baby hamster kidney cell (BHK 21). *Biochem. Biophys. Acta.* 255: 66-78.
- 10) Shapiro, I. M. and Wuthier, R. E. (1966) A study of phospholipids of bovine dental tissues-II Developing bovine foetal dental pulp. *Archs oral Biol.* 11: 513-519.
- 11) Windrum, G. M., Kent, P. W. and Eastoe, J. E. (1955) The constitution of human renal reticulin. *Brit. J. Exp. Pathol.* 36: 49-59.