

血清 SOD 活性に関する基礎的研究

新潟大学医学部小児科学教室 (主任: 堺 薫教授)

平野 春伸

A preliminary study on serum superoxide dismutase activity

Harunobu HIRANO

Department of Pediatrics, Niigata University School of Medicine

(Director: Prof. Kaoru SAKAI)

Superoxid (O_2^-) plays vital role in an organism. Superoxide dismutase (SOD) is a specific enzyme in scavenging superoxide. SOD is noticed in medical science, but there are few reports on serum SOD activity. In measurement of serum SOD activity, there are various inhibitors in serum such as albumin, α_2 -macroglobulin and γ -globulin. To investigate the measuring method of serum SOD activity, the author analyzed serum by gel-chromatography and examined influence by addition of these inhibitors and relation between serum SOD activity and them. Serum SOD activity was measured by means of nitroblue tetrazolium-xanthine oxidase method and formic acid as suspending solution, after dialysis. As the result of these investigation, there seemed to be little influence by these inhibitors in this method. It was found that SOD activity of many sera could be measured at the same time and easily without influence of inhibitor in this method.

Key words: active oxygens, superoxide dismutase, scavenger

活性酸素, スーパーオキサイド ディスムターゼ, スカベンジャー

Superoxide (O_2^-) は、生体に様々な障害を与える一方、種々の生物活性や病的状態……特に、炎症¹⁾²⁾³⁾、免疫⁴⁾、発癌⁵⁾、制癌⁶⁾⁷⁾、動脈硬化⁸⁾などにおいて、重要な役割を果たしている。この Superoxide を特異的に消去する生体内酵素が Superoxide dismutase (SOD) である。SOD は、1969年、Fridovich らにより発見されてから⁹⁾、生体(生物)の各方面で検討されており、医学的には白血球細胞¹⁰⁾、癌組織¹¹⁾、rheumatoid arthritis (RA) の関節液¹⁾¹²⁾などでの SOD

活性の報告があり、また、臨床治療面でも、RA¹³⁾、respiratory distress syndrome (RDS)¹⁴⁾、mucocutaneous lymphnode syndrome (MCLS)¹⁵⁾などの疾患に応用されつつある。本論文においては、血清 SOD 活性測定法およびその基礎的研究について述べる。

1. SOD 測定法の原理

SOD は、Fig. 1 に示すような反応を触媒するため、 O_2^- が基質となる。SOD 測定は、概念的には、生成さ

Reprint request to: Harunabu Hirano,
Department of Pediatrics, Niigata
University School of Medicine,
Niigata City, 951 JAPAN

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町1番町
新潟大学医学部小児科学教室 平野 春伸

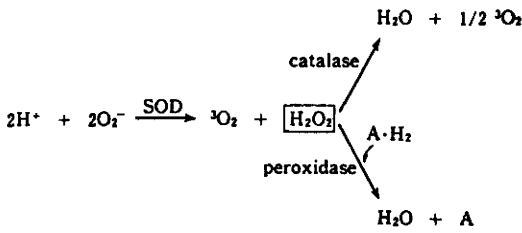


Fig. 1 Dismutation reaction of superoxide *in vivo*

れた H_2O_2 量または O_2^- 量を測定すればよいが、実際には、 O_2^- は $10\text{mol}/\text{min}$ という非常に速い速度で *dismutate* されるので、 H_2O_2 を測定するのは困難である。従って、測定に際して O_2^- を連続的に産生する反応系と、 O_2^- との反応性が非常に強い化学物質 (detector) とが必要である。このため、 O_2^- 産生系に、SOD を添加して起こる場合の阻害度を利用して、SOD 活性を求めることが一般的である。 O_2^- の産生系としては、酵素系、光化学系、化学系、電気化学系があり、中でも、酵素系としての xanthine oxidase が多く利用される。この際の detector としては、nitroblue tetrazolium (NBT), neotetrazolium (NT), cytochrome c などが用いられる。

2. 血清 SOD 活性測定法

著者は、superoxide 産生系として比較的扱い易い xanthine oxidase 系を用い、detector として NBT を用いた。

1) 試 薬

Superoxide 産生系には、
 xanthine oxidase (SIGMA Chemical Company)
 hypoxanthine (KOHJIN Co., Ltd)
 Triton X-100 (半井化学薬品)
 EDTA (半井化学薬品)
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬)

を使用した。

Detector としては、

NBT (SIGMA Chemical Company)

を使用した。

標準物質として、

superoxide dismutase (SIGMA Chemical Company, purified from bovine blood)

を使用した。

2) 実験 法

NBT は、Triton X-100 の存在下で、 O_2^- によって、赤紫色の formazan に還元される。この生成された formazan を 530nm の吸光度で測定した。

Fig. 2 に示すように、添加 SOD 濃度により、吸光度が異なるので、ある反応時間での吸光度を測定し、無添加の場合との比較により阻害度を求め、SOD 活性を決定した。

また、著者は、oxygen free radical の scavenger である、formic acid を加えることにより、この反応系を完全に停止できることを見出した。この反応停止液

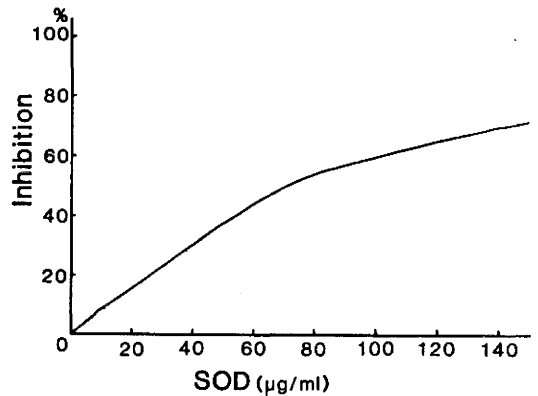


Fig. 2 Inhibition by superoxide dismutase

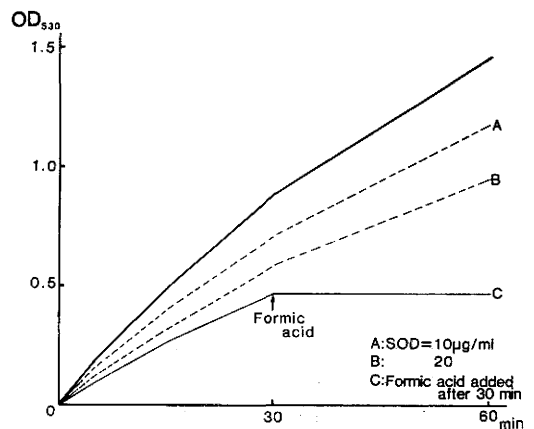


Fig. 3 Change of reduction of NBT by addition of SOD

Reduction of NBT (production of formazan) shows OD_{530} . The line C shows reduction of NBT by addition of SOD at the start and Formic acid after 30 min.

を使用することにより、多数検体の測定が可能になった (Fig. 3)。

また、この反応系において、反応条件を左右する NBT 量, xanthine oxidase 量, hypoxanthine 量, および反応停止液の formic acid 量について検討した。

結果は Table 1 に示す通りである。xanthine oxidase は、0.1ml より 0.2ml にした方が OD₅₃₀ は高くなるが、NBT および hypoxanthine は倍量にしても、ほとんど変化がないため、ともに 0.2ml とした。10% formic acid は 0.1ml で反応を完全に停止することができた。以上より、下記のような SOD 活性測定法を確立した。

Table 1 Change of production of formazan by varying amounts of NBT, xanthine oxidase and hypoxanthine.

NBT	Xanthine Oxidase	Hypoxanthine	OD ₅₃₀
0.2 ml	0.1 ml	0.2 ml	0.562
0.2	0.2	0.2	0.841
0.4	0.2	0.2	0.863
0.2	0.2	0.4	0.695

SOD 活性測定法

0.5M phosphate buffer (pH 7.5)	0.5ml
15% Triton X-100	0.1ml
1mM EDTA	0.1ml
2mM NBT	0.2ml
40μg/ml xanthine oxidase	0.2ml

に sample 0.2ml を加えて、全量 1.3ml とする。

2mM hypoxanthine	0.2ml
------------------	-------

を加えて反応を開始、37°C 30分 incubate した後、反応停止液として、

10% formic acid	0.1ml
-----------------	-------

を加えて、530nm における吸光度を求めらる。

精製 SOD (bovine blood) を sample (0.2ml) として用いて、SOD 量と阻害率との検量線を、あらかじめ求めておく。血清は、それ自体 OD₅₃₀ に影響するため、この反応系で、sample (血清) を最初に加えた場合の吸光度と反応停止後に加えた場合の吸光度を比較して、阻害率を求めらる。

検量線での阻害率に相当する SOD 量を sample (血清) の SOD 活性とした。

3. 血清中の阻害 (干渉) 物質の検討

血清測定の際、superoxide 産生を促進するような干渉物質が存在する。また、血清中には、albumin, γ-globulin, α₂-macroglobulin などが SOD 様活性を有するとされている^{16) 17)}。これらが SOD 活性測定の際に影響することが問題になる。このため、次の方法で干渉物質の除去、阻害物質の影響を検討した。

1) 干渉物質の除去

血清を cellulose tube に入れ 0.05M リン酸緩衝液中で12時間透析後に測定した。Cellulose tube は分子量1万以下を透析により除去できる。Table 2 は、正常児5名の血清を前述の方法により、透析前後で測定したものである。透析前の血清を測定系に加えると、血清無添加の場合よりむしろ OD₅₃₀ は上昇するが、透析後では干渉物質を除去でき、SOD 活性が測定できることがわかった。尚、透析前後で血清の容積、濃度はほとんど変化しなかった。

Table 2 Effect of dialysis on the measurement of serum SOD activity

Case	ΔOD ₅₃₀		SOD (μg/ml)
	before dialysis	after dialysis	
A	+131.5%	-12.5%	20.0
B	+97.6	-6.9	11.0
C	+145.6	-8.2	13.1
D	+131.2	-10.6	17.0
E	+143.0	-9.3	14.9

2) 血清蛋白分画の SOD 活性の検討

ヒト血清を gel-chromatography により、分子量別の fraction に分け、各 fraction における SOD 活性を測定した。Fig. 4~6 は、前述の測定法で、血清 SOD 活性が高値を示した症例の血清 1ml を Sephadex G-200 を充填した column (直径 1cm, 長さ 62cm) で gel-chromatography を行った。

Case F と case G の gel-chromatography では、fraction No. にして、No. 50~58 に、分子量にして、30,000~50,000 の所にほぼ単一の peak を認めた。これは SOD に相当すると思われた。

精製 bovine blood SOD (Sigma) の gel-chromatography を Fig. 7 に示す。種属の違いはあるものの、

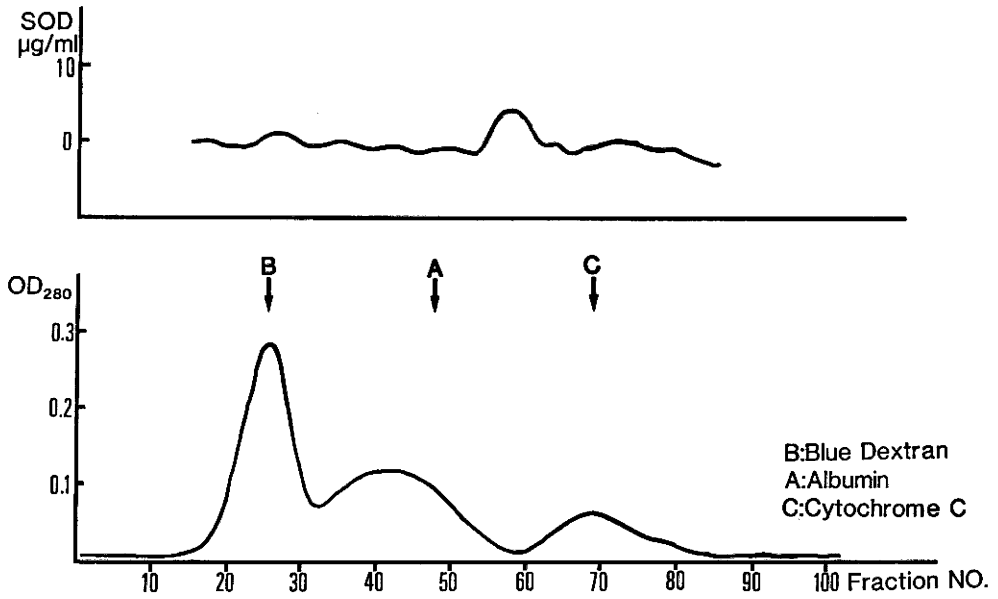


Fig. 4 Sephadex G-200 gel-chromatography (case F)

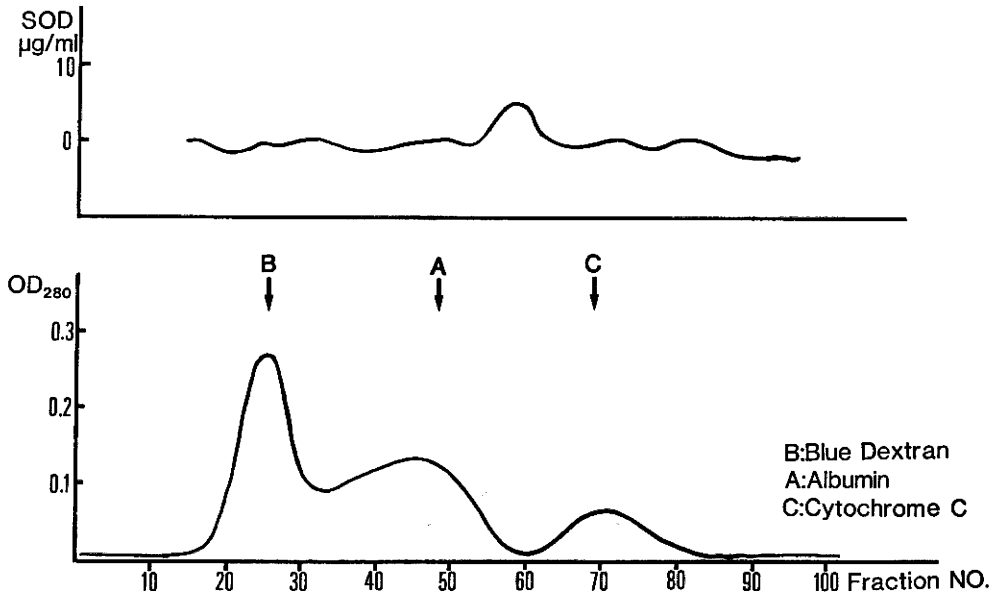


Fig. 5 Sephadex G-200 gel-chromatography (case G)

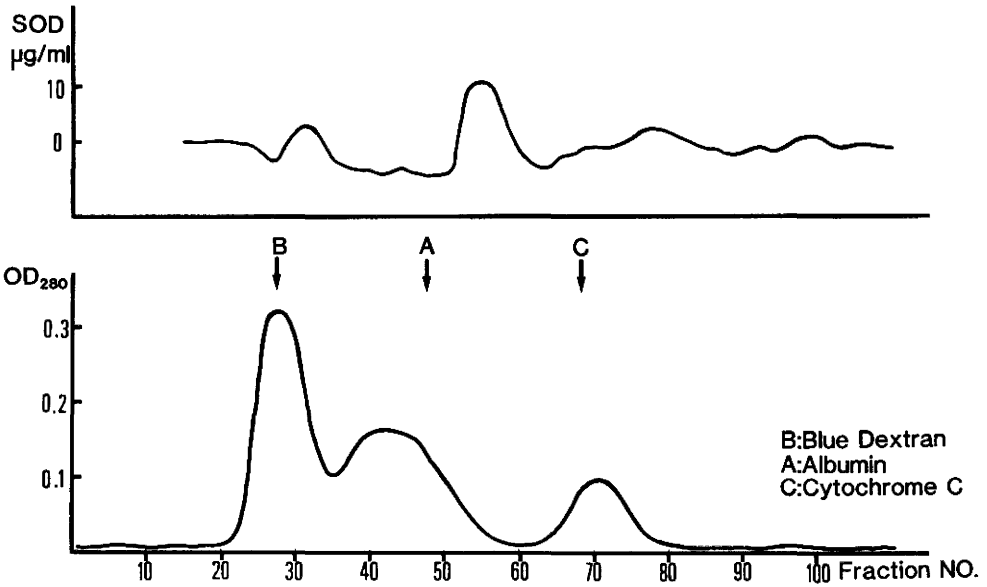


Fig. 6 Sephadex G-200 gel-chromatography (case H)

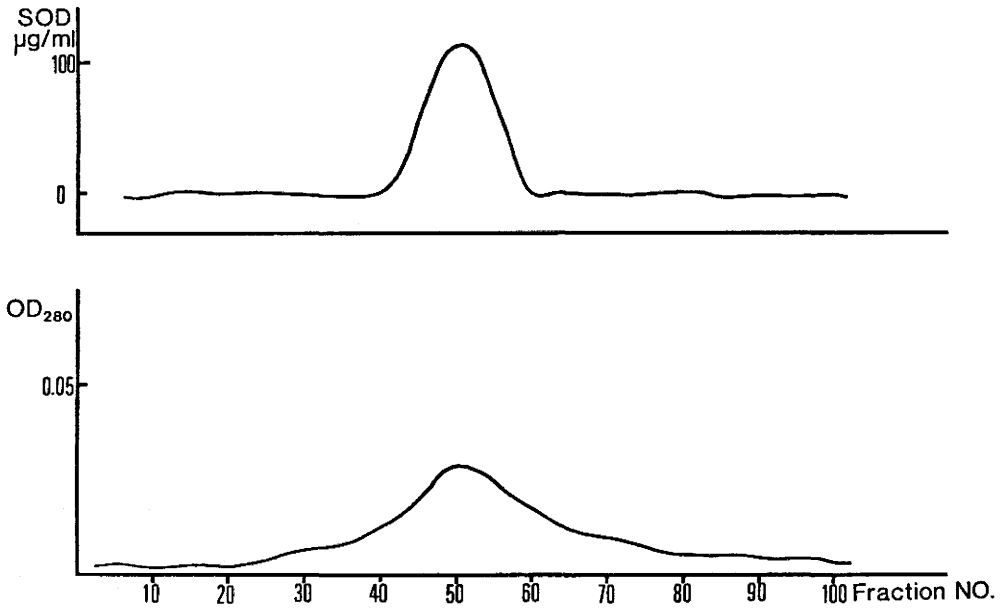


Fig. 7 Sephadex G-200 gel-chromatography (bovine SOD)

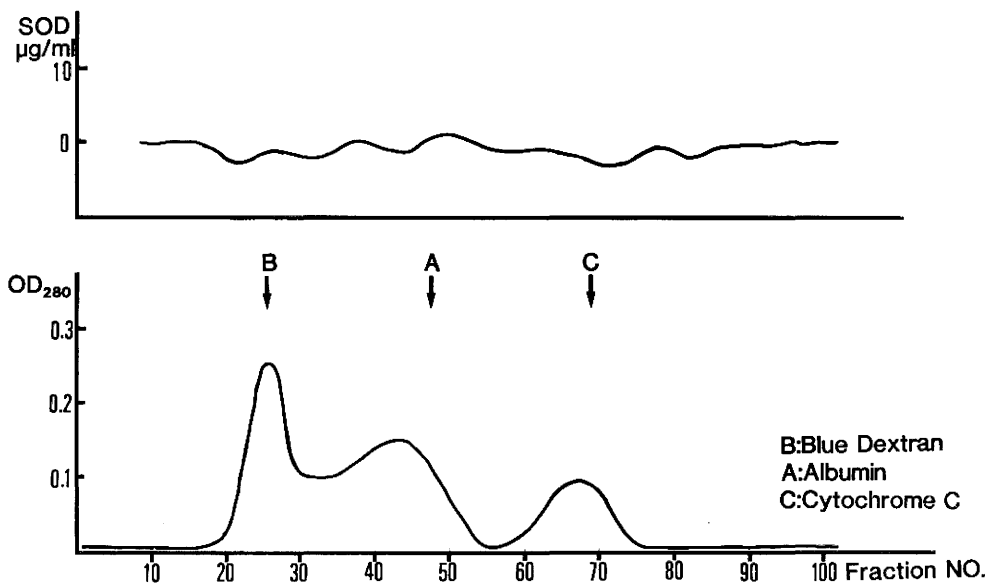


Fig. 8 Sephadex G-200 gel-chromatography (case J)

ほぼ同じ位置に peak が認められた。

Fig. 6 は、2つの peak を有した特殊な例を示すが、fraction No. にして No. 28~32 と No. 51~57 に、分子量にして 200,000 以上と 30,000~50,000 の所に、2つの peak が認められた。第1の peak は、高分子域にあり、void volume と一致し、通常ここにみられる aggregated IgG や α_2 -macroglobulin と思われ、SOD 様活性を有するものの、純粋な SOD とは、考えられない。一方、第2の peak は、Fig. 4, 5 および Fig. 7 の peak と一致し、蛋白濃度が低下しているにもかかわらず、高活性を有し、比活性 (活性/蛋白量) から考えた場合、SOD に相当すると思われる。また、SOD 活性低値の血清を同様の方法で検討したが、Fig. 8 のようにほとんど peak は認めなかった。

3) 阻害物質添加による影響

albumin, α_2 -macroglobulin (α_2 -MG), γ -globulin (γ -glob) を下記の濃度に調整し、正常血清に 1/10 量および 1/5 量を加えてその SOD 活性の変化を検討した。

- albumin 25g/dl (normal serum albumin (human)-alpha ミドリ十字)
- α_2 -MG 1000mg/dl (α_2 -macroglobulin (human) Behring Inst.)
- γ -glob 2.5g/dl (Venoglobulin-I ミドリ十字)

Table 3 に示すように、1/10量の添加では、ほとんど

Table 3 Change of SOD activity by addition of inhibitory materials

Added materials		Change of SOD-like activity
Albumin	+1/10 (+2.5g/dl)	+4.4±5.7%
	+1/5 (+5.0g/dl)	+24.6±8.9%
α_2 -Macroglobulin	+1/10(+100mg/dl)	+0.2±4.4%
	+1/5 (+200mg/dl)	-0.5±4.5%
γ -Globulin	+1/10(+250mg/dl)	-0.7±3.4%
	+1/5 (+500mg/dl)	+0.4±5.7%

変化はみられなかったが、albumin 1/5 量添加 (+5.0 g/dl) によっては、SOD 活性は、大きく変化した。しかし、albumin 5.0g/dl の変化は臨床的には、ほとんど存在し得ないことであり、一般的な臨床では、ほとんど無視できるものと判断した。

4) 血清各種蛋白成分と SOD の関係

Albumin, α_2 -globulin, γ -globulin との関係を知るため、血清 albumin, α_2 -globulin, γ -globulin 値と血清 SOD 活性との相関について検討した。尚、低分子阻害物質に関しては、透析処理をして除去した。対象は、無作為に選んだ5才~15才の患児104名である。

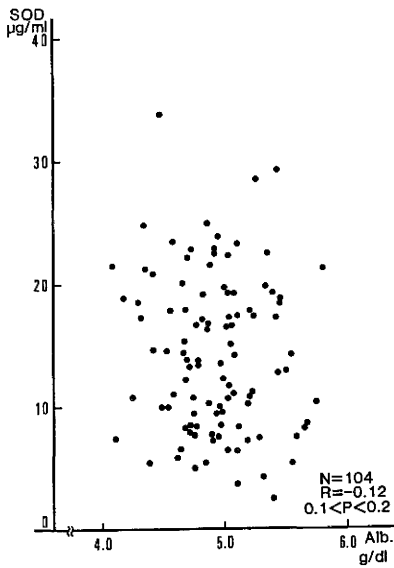
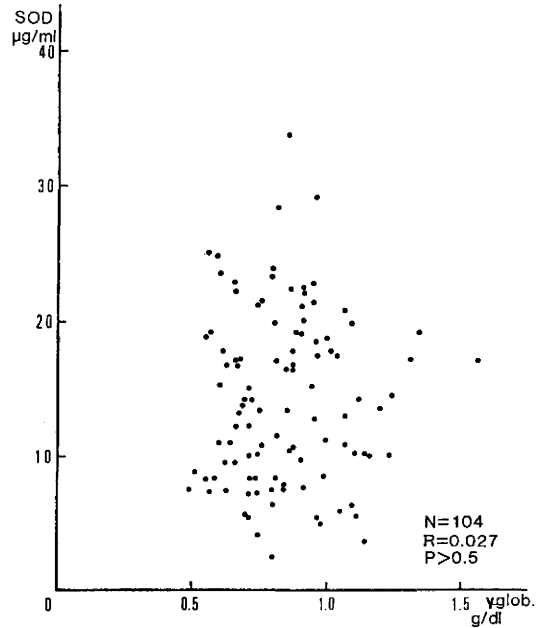
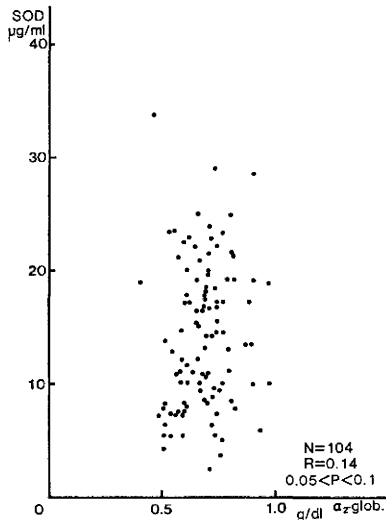


Fig. 9 Relation between SOD and albumin

Fig. 11 Relation between SOD and γ -globulinFig. 10 Relation between SOD and α_2 -globulin

a) albumin 値と SOD 活性との関係 (Fig. 9)

$N=104$, $R=-0.12$, $0.1 < P < 0.2$ であり, 相関は認められなかった. albumin 値の高い症例は, SOD 活性がむしろ低値の方に多くみられた.

b) α_2 -globulin 値と SOD 活性との関係 (Fig. 10)

$N=104$, $R=0.14$, $0.05 < P < 0.1$ であり, 有意な相関はみられなかった.

c) γ -globulin 値と SOD 活性との関係 (Fig. 11)

$N=104$, $R=0.027$, $P > 0.5$ であり, 相関はみられなかった.

以上の検討より, 血清 SOD 活性測定の際の albumin, α_2 -macroglobulin, γ -globulin などの阻害物質の影響は, ほとんど無視できるものであり, 透析処理をすれば, これらのことを考慮せずに, 前述の方法で血清 SOD 活性が測定できるものと判断した.

4. 考 案

生体に障害を与える superoxide (O_2^-) は, 反応性が強く, 非常に速い速度で何らかの物質と反応してしまうため, その実体をとらえることが難しい. 1969年に McCord と Fridovich が初めて O_2^- を dismutate する酵素である SOD を発見してから⁹⁾, その特性が明らかになった. 細胞内生化学的反應や生物学的現象にこの SOD の概念を導入することにより, O_2^- あるいはそれから派生する活性酸素が関与していることがわかってきた. 活性酸素は, 物理化学, 生化学, 放射線学, 微生物学, 植物学, 医学など広い範囲の重要な現象に関与しており, 医学においては白血球の殺菌作用や酵素反応, 脂質の酸化, 放射線障害, 発癌, 制癌, 免疫, 炎症, 未熟

児網膜症，白内障，動脈硬化などに深い関係がある。炎症については，McCord, Babior, Oyanagi らが報告したように¹⁾²⁾³⁾，組織を直接障害したり，血管透過性を亢進したりするなど種々の面で深い関係がみられている。

一方 SOD は，この O_2^- を不活化するため，生体内では重要な役割を演じており，各臓器内や血液中での SOD の増加あるいは減少は，いろいろな疾患と関係し，例えば，RA 患者で関節液中の SOD 活性の低下¹⁾²⁾，染色体異常，特に 21 trisomy での白血球・赤血球中の SOD 活性の上昇¹⁸⁾，腫瘍組織内での SOD 活性の低下¹¹⁾，肝疾患における血清 SOD 活性の上昇¹⁹⁾，腎不全患者での血清 SOD 活性の上昇²⁰⁾などが報告されている。また，治療面でも以前より使用されている Orgotein 投与による RA への効果¹⁸⁾，未熟児の RDS での bovine SOD 投与による bronchopulmonary dysplasia の発生子防¹⁴⁾，MCLS 患児に liposomal-SOD 投与による coronary aneurysma の予防効果¹⁵⁾などで注目されている。

SOD 測定法は，McCord⁹⁾，Beauchamp²¹⁾，篠原²²⁾らが報告している。McCord の方法では，xanthine oxidase—cytochrome c 系を用いており，1分間当の還元型 cytochrome c を測定しているため，多数の検体測定には困難である。Beauchamp の方法では，著者と同様 xanthine oxidase-NBT 系を用い，測定感度も ng/ml まで測定可能と述べているが，反応停止液については触れていないので，多数検体の測定には用いにくい。篠原の方法では，xanthine oxidase-NT 系を用いており，かなり微量まで SOD 活性の測定ができ，血清 SOD 活性測定には有用であるが，NT が水溶性に乏しいこと，および反応停止液については詳しく触れていないことで少し用いにくい。

また，血清中には SOD 様物質があること，および血清 SOD は組織内 SOD と比べて微量であることなどで，今まで血清 SOD 活性に関する報告は少なかった。

著者は，今回の研究で，血清 SOD 活性測定の際には，SOD 様物質の影響は，ほとんどなく，これを考慮することなしに測定することができること，血清を透析処理後に使用すること，および，反応停止液の使用により，簡便にかつ多くの検体を同時に測定できることなど，血清 SOD 活性測定法の改良を行うことができた。

5. 結 語

血清 SOD 活性測定法およびその問題点について検討した。

血清 SOD 活性は，血清を透析処理した後，NBT-xanthine oxidase 系を用い，反応停止液として formic acid を使用することで，比較的簡便かつ多数検体を同時に測定することができた。また，血清中の阻害物質については，透析処理によりほとんど測定系への影響はないと思われた。尚，今後この方法により，小児各種疾患特に腎疾患や未熟児・新生児の疾患における，血清 SOD 活性を検討したことを稿を改めて報告したい。

稿を終るにあたり，御指導と御校閲をいただいた新潟大学医学部小児科学教室 堀 薫教授に深謝いたします。また，直接の御指導をいただいた同浅見 直助教授，並びに種々の御助言や御協力をいただいた同医局員の皆様に厚くお礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) McCord, J.M., et al.: Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *185*: 529~531, 1974.
- 2) Babior, B.M. et al.: Biological defense mechanism. The production by leukocyte of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.*, **52**: 741~744, 1973.
- 3) Oyanagi, Y.: Participation of superoxide anions at the prostaglandin phase of carrageenan foot-oedema. *Pharmacol.*, **25**: 1465~1472, 1976.
- 4) 神宮政男, 延永 正: 免疫反応と活性酸素. *最新医学*, **33**: 1342~1357, 1984.
- 5) 永田親義: 発癌におけるフリーラジカル機構, I, II, *科学*, **53**: 307, 372, 1983.
- 6) 山中直樹, 太田和雄: 癌と Free Radicals. *最新医学*, **33**: 730~734, 1978.
- 7) Favaudon, V.: On the mechanism of reductive activation in the mode of action of some anti-cancer drugs. *Biochimie* **64**: 457~475, 1982.
- 8) 五島雄一郎: 過酸化脂質と動脈硬化. *最新医学*, **33**: 691~695, 1978.
- 9) McCord, J.M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **244**: 6049~6055, 1969.

- 10) **Yoshimitsu, K., Kobayashi, Y. and Usui, T.:** Superoxide dismutase activity in leukemic blasts of children with acute leukemia. *Acta Paediat. Scand.* **73:** 92~96, 1984.
- 11) **Oberly, L.W.:** Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.*, **105:** 456~464, 1984.
- 12) **Black, D.R., et al.:** Protection against superoxide and hydrogen peroxide in synovial fluid from rheumatoid arthritis. *Clin. Sci.*, **61:** 483~486, 1981.
- 13) **Walravens, M. et al.:** Comparison of gold and orgotein treatment in rheumatoid arthritis. *Current Therap. Res.*, **20:** 62~69, 1976.
- 14) **Rosenfeld, W. et al.:** Prevention of bronchopulmonary dysplasia by administration of bovine superoxide dismutase in preterm infants with respiratory distress syndrome. *J. Pediatr.*, **105:** 781~785, 1984.
- 15) **下田康介, 他:** 川崎病の治療薬としての L-SOD の有効性について. *日児誌*, **89:** 967, 1985.
- 16) **Amano, D. et al.:** Inhibitory effect of superoxide dismutase and various other proteins on the nitroblue tetrazolium reduction by phagocytizing guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, **66:** 272~279, 1975.
- 17) **Hoffman, M. et al.:** α_2 -Macroglobulin "fast" forms inhibit superoxide production by activated macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, **760:** 421~432, 1983.
- 18) **Frants, R.R. et al.:** Superoxide dismutase in Down's syndrome. *Lancet*, **2:** 42, 1975.
- 19) **沢木倭二, 他:** 種々の肝疾患における血清 superoxide dismutase の生物学的活性値と免疫学的活性値. *医学のあゆみ*. **122:** 1136~1137, 1982.
- 20) **沢木倭二, 他:** 腎不全時における尿中並びに血清 Cu-Zn-Superoxide Dismutase levels in renal failure. *愛知医科大学医学会雑誌*, **10:** 16~20, 1982.
- 21) **Beauchamp, C. et al.:** Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44:** 276~287, 1971.
- 22) **篠田力雄, 他:** Superoxide Dismutase の臨床化学への応用. *臨床病理*. **24:** 926~930, 1976.

(昭和61年2月24日受付)