

慢性関節リウマチにおける超酸化物 イオン生成系, 超酸化物イオン分解酵素 および過酸化脂質に関する研究

第 1 編

慢性関節リウマチにおける滑液中での超
酸化物イオン生成系, 超酸化物イオン分
解酵素および過酸化脂質についての検討

岡山大学医学部第3内科教室 (主任: 大藤 真教授)

塩 孜

Key words: 慢性関節リウマチ (RA), 滑液,
超酸化物イオン (O_2^-),
超酸化物イオン分解酵素 (SOD),
過酸化脂質

緒 言

殆どどの生物が生活する上には是非とも欠かせない酸素は、活性化されて非常に反応性が高い酸素として利用されている¹⁾。その活性化された酸素の中に、酸素分子 (O_2) へ一電子付加して生理条件下に形成される超酸化物イオン (superoxide free radical, 以下 O_2^- と略す) がある。活性化された酸素自身即ち O_2^- は、非常に不安定であり、この O_2^- より非酵素的反応により、一重項酸素 (1O_2) やハイドロキシルラジカル ($OH\cdot$) などが続々と生成される。これらの活性酸素種は、生体にとって有害ともいわれ、また、脂質の多価不飽和脂肪酸部分と容易に反応して過酸化脂質を形成する。この過酸化脂質も生体に悪影響を及ぼすことが近年明かにされている²⁾³⁾。ところで、生体には超酸化物イオン分解酵素 (superoxide dismutase 以下 SOD と略す) が存在する。その SOD は $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ の如く O_2^- を分解し、radical scavenger として働いている。

近年、 O_2^- , SOD, 過酸化脂質などが、老化現象、動脈硬化症、放射線障害、白内障、未熟児網膜症などの面とともに、炎症の面でも注目されてきた。著者は、慢性の進行性炎症性疾患である慢性関節リウマチ (以下 RA と略す) の主たる

炎症の場である関節腔内における O_2^- , SOD や過酸化脂質の役割を検討し、RA 関節炎の病態との関係を研究した。

調 査 対 象

対象は、アメリカリウマチ協会診断基準による definite 以上の31例の RA 患者から採取した滑液49検体である。31例の内訳は、男1例、女30例で年齢分布は36才より77才に至り、平均年齢は、56.9才である。31例の診断, stage, class は表1の通りである。

方法は、各症例の膝関節より得た滑液を用い、滑液中 SOD 活性および滑液白血球中 SOD 活性、さらに滑液中過酸化脂質をそれぞれ測定し、他の炎症の指標である滑液粘稠度、滑液白血球数、滑液中のライソゾーム酵素の一つである酸性フォスファターゼ活性、急性炎症蛋白である滑液中 CRP 量などを測定した。

対照として、10例の変形性膝関節症 (以下 OA と略す) 患者から採取した滑液11検体を用いた。

測 定 方 法

1. 検体の処理

滑液は、採取後直ちに白血球数を算定し、相対的粘稠度を測定した。スプラーゼ (持田製薬社製) 処理を加えた滑液10mlのみ別に採取し、

Table 1. object and laboratory data

RA

No.	name	age	sex	diagnosis	stage	class	leucocyte count (cmm)	relative viscosity (second)	CRP (mg/dl)	Ac-P-ase (K-A U)
1	F.S	66	F	c	2	1	3,500	60	0.15	6.2
2	M.S	48	F	c	4	2	2,900	120	3.00	3.0
3	M.F	47	F	c	4	3	13,900	150	3.70	5.6
4	M.F	47	F	c	4	3	23,500	105	4.05	5.5
5	M.O	55	M	c	2	1	39,600	60	8.50	4.0
6	S.T	61	F	c	4	2	45,700	50	2.80	3.0
7	H.K	69	F	c	4	3	38,000	45	4.05	12.8
8	I.E	72	F	c	3	3	10,500	80	1.25	4.8
9	F.O	60	F	d	2	2	4,500	40	0	2.4
10	M.O	55	M	c	2	1	27,900	55	6.70	4.8
11	K.K	54	F	c	2	2	29,400	60	2.00	6.8
12	K.K	54	F	c	2	2	20,700	60	1.80	3.0
13	F.S	66	F	c	2	1	5,400	60	0.55	4.6
14	F.K	63	F	c	4	3	6,400	30	1.35	4.8
15	F.K	63	F	c	4	3	14,300	35	1.50	5.2
16	M.K	61	F	c	4	3	31,800	40	3.15	7.4
17	C.O	36	F	c	2	1	30,500	60	0.30	5.2
18	M.O	55	M	c	2	1	44,000	45	6.05	6.4
19	H.K	65	F	c	4	3	6,600	1,300	0	6.0
20	Y.A	66	F	c	4	3	30,200	105	0.95	3.8
21	H.U	65	F	c	4	2	1,900	330	0.95	2.3
22	I.E	72	F	c	3	3	12,600	85	2.15	4.6
23	F.K	63	F	c	4	3	2,700	65	0.95	4.0
24	K.I	50	F	c	4	3	15,800	50	7.15	7.8
25	S.T	61	F	c	4	2	8,100	45	3.15	3.8
26	M.O	58	F	c	4	3	10,700	70	0.30	5.6
27	M.O	58	F	c	4	3	5,200	70	0.45	6.5
28	M.Y	67	F	c	3	2	7,600	110	0.95	4.0
29	Y.N	44	F	c	3	2	4,900	255	0.65	2.2
30	Y.A	66	F	c	4	3	12,800	175	0.95	5.8
31	F.S	66	F	c	2	1	1,500	100	0.55	3.2
32	F.K	63	F	c	4	3	14,600	35	1.50	3.9
33	F.K	63	F	c	4	3	5,200	45	1.50	3.0
34	Y.I	47	F	c	3	2	4,9000	35	1.10	4.8
35	Y.U	47	F	c	2	2	8,300	120	2.45	6.1
36	Y.U	47	F	c	2	2	15,000	155	1.80	4.8
37	I.E	72	F	c	3	3	18,900	90	4.60	4.4
38	T.G	52	F	c	4	4	43,000	40	6.70	10.6
39	T.M	62	F	c	2	2	22,300	45	3.15	3.6
40	K.H	52	F	c	3	1	4,500	340	0.55	3.0
41	M.M	52	F	c	2	2	26,800	30	3.70	3.6
42	H.S	56	F	c	4	2	10,700	45	1.45	6.6
43	F.S	57	F	c	2	2	20,300	30	1.60	5.0
44	K.H	52	F	c	3	1	9,500	60	1.45	3.2
45	K.H	52	F	c	3	1	12,000	60	1.45	3.3
46	K.G	77	F	c	3	2	4,500	85	1.85	4.6
47	T.Y	54	F	c	2	2	8,800	40	4.70	3.9
48	E.O	42	F	d	2	1	1,500	240	0.45	2.6
49	E.N	51	F	c	2	1	1,800	300	0.45	2.0
average		56.9					14,824.5	117.7	2.34	4.94

OA

No.	name	age	sex		leucocyte count (cmm)	relative viscosity (secound)	CRP (mg/dl)	Ac-P-ase (K-A U)
1	C.S	70	F		500	220	0	2.0
2	T.I	83	M		200	280	0	2.0
3	T.S	68	F		300	175	0	1.1
4	N.K	62	F		400	90	0.15	2.0
5	M.T	50	F		200	340	0	1.3
6	K.F	74	F		600	260	0	3.2
7	K.O	70	F		200	175	0	1.5
8	T.K	53	F		200	1,620	0	2.3
9	T.T	71	F		100	160	0	0.8
10	A.K	43	F		250	180	0	2.4
11	A.K	43	F		250	250	0	2.5
average		64.4			290.9	340.9	0.01	1.95

M: male F: female c: classical d: definite

3,000回転20分間遠沈後上清を分離した。その上清を滑液中 SOD 活性, 過酸化脂質, 酸性フォスファターゼ活性, CRP 量などの測定に用いた。沈渣である細胞成分を滑液白血球中 SOD 活性の測定に用いた。

2. 白血球数の算定

11の目盛りを有する白血球用メランジュールの1まで滑液を取り, 0.3%食塩水を11まで吸い, よく振盪して Bürker-Türk 型計算板に閉じ, 白血球数を算え, 1立方メートル中の数で算定した。

3. 相対的粘稠度の測定

室温で18ゲージの注射針を通して, プラスチックの注射器より重力で1mlの滑液が落下するのに要する時間を相対的粘稠度とし, 秒で表わした。

4. SOD 活性の測定

Fridovich⁴⁾らの開発した Xanthine-Xanthine Oxidase 法を用い, 生成された O_2^- による Nitroblue tetrazolium (N BT) の還元が, SOD により阻害される割合から測定する方法で, 今成ら⁵⁾によって改良された方法を用いた。すなわち, 0.05 M Na_2CO_3 緩衝液2.4ml (PH 10.2) をとり, さらに 3 mM Xanthine, 3 mM EDTA, bovine serum albumin 溶液, 0.75mM NBT を各0.1mlずつ加える。これに SOD を含む試料を加え, 25℃でincubateし, 20分後に 6 mM $CuCl_2$ 0.1mlを加えて反応を停止させ, 島津製分光光度計を使用し, 560nmで吸光度を測定し

た。試料の代わりに蒸留水を用いた対照の吸光度を0.20から0.23の範囲に入るように調整し, 対照の吸光度を50%阻害する割合を 500 単位とした。(表2)

Table 2. Assay Method of Superoxide Dismutase Activity

0.05M Na_2CO_3 Buffer Solution (pH 10.2) 2.4ml
 ↓
 3mM Xanthine 0.1ml
 ↓
 3mM EDTA 0.1ml
 ↓
 Bovine Serum Albumin Solution 0.1ml
 ↓
 0.75mM Nitroblue Tetrazolium 0.1ml
 ↓
 Sample (Synovial Fluid : 1.5ml) (Synovial Fluid Leucocyte : 0.1ml)
 ↓
 Incubation at 25°C
 ↓
 Xanthine Oxidase Solution 0.1ml
 ↓
 Incubation at 25°C for 20 min.
 ↓
 6mM $CuCl_2$ 0.1ml
 ↓
 Assay of Optical Density at 560nm

a. 滑液中 SOD 活性の場合

細胞外液中の SOD 活性は, 細胞内に比して低いので, 試料として滑液1.5mlを用い, 滑液の色調による修飾は, 滑液の色調を補正して行った。

b. 滑液白血球中 SOD 活性の場合

主として Patriaca ら⁶⁾の方法を用いた。赤血球中 SOD 活性は, 白血球のそれに比べて高活性を示すので, 赤血球の contamination をできるだけ防ぐために, 顕鏡により赤血球の混入がないことを確認した上で検査を行った。たとえ赤血球の混入がみられたものでも沈渣を $Tris-NH_4Cl$ 溶液で2回以上の溶血洗滌操作を加えた。

以後, 1mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) で2mlとし, sonicator (和研薬社製) を使い, 超音波処理し, 遠沈し, その上清0.1mlを測定に用いた. (表3)

Table 3. Assay Method of Synovial Fluid Leucocytes Superoxide Dismutase Activity

10ml Synovial Fluid
Centrifugation at 3,000rpm for 20min.
Subjection of Leucocytes Mass to Tris-NH₄Cl Solution more than twice
Leucocytes Mass in 2ml of 1mM Phosphate Buffer Solution (pH 7.8)
Homogenization by Sonicator
Centrifugation of the Homogenate at 4,000rpm for 20min.
Assay of 0.1ml Supernatant Fluid same as Table 2.

5. 過酸化脂質の測定

チオバルビタール酸反応を用い, n-ブタノールで抽出し, 535m μ の吸光度で測定する内藤法⁷⁾を利用し, Malonaldehyde (以下MDAと略す)の量として表わした. すなわち, 試料として滑液0.5mlを用い, 20%トリクロル酢酸水溶液2.5mlに滑液を加え, 混合し, 0.67%チオバルビタール酸1mlを加え混合する. この混合液を沸騰水溶液中で30分間加熱し, 流水中で急冷し, n-ブタノール4mlを加え混和し, 3,000回転10分間遠沈し, その上清の吸光度を測定し, 標準溶液と比較した. (表4)

Table 4. Assay Method of Synovial Fluid Lipoperoxide Level

25% Trichloroacetic Acid 2.5ml
Synovial Fluid 0.5ml
Blend (Mixer: about 30sec.)
0.67% Thiobarbituric Acid 1.0ml
Blend (Mixer: about 30sec.)
Heat in Boiling Water for 30min.
Rapidly Cooling
n-Butylalcohol 4.0ml
Blend well
Centrifugation at 3,000rpm for 10min.
Supernatant Fluid
Assay of Optical Density at 535nm

6. 酸性フォスファターゼ活性の測定

酸性フォスファターゼ (以下Ac-P-aseと略す)活性は, フェニルリン酸を基質とするヤトロン社製のKing-Armstrong法のキットを用いた.

7. CRP量の測定

ヘキスト社製のLC-Partigenによる定量を行

った.

結 果

1. 白血球数

RA群は, $14,824.5 \pm 12,161.1$, OA群は, 290.9 ± 149.7 とRA群に有意に増加を認めた. ($P < 0.001$) (表1)

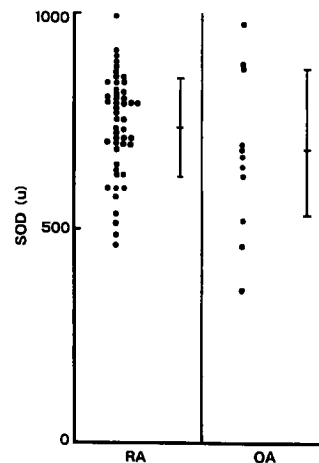
2. 相対的粘稠度

M $\pm$ SEで表わすと, RA群は, 117.7 ± 18.9 秒, OA群は, 340.9 ± 91.6 秒とOA群が有意に高く, 粘稠度はRA群が有意に減少していた. ($P < 0.005$) (表1)

3. SOD活性

滑液中SOD活性では, M $\pm$ SDで表わすとRA群は, $736.2 \pm 117.5u$, OA群は, 685.9 ± 185.9 とRA群に高い傾向がみられたが, 有意性はみられなかった. ($P < 0.03$) (図1)滑液白血

Figure 1. SOD Activity of Synovial Fluid in Rheumatic Diseases



球中SOD活性では, M $\pm$ SEで表わすと, RA群は, $531.3 \pm 16.2u$, OA群は, $60.5 \pm 17.0u$ とRA群に有意に高かった. ($P < 0.001$) (図2)

4. 過酸化脂質

RA群は, $9.71 \pm 2.88nM/ml$, OA群は, $5.32 \pm 1.21nM/ml$ とRA群に有意な高値を示した. ($P < 0.001$) (図3)

5. Ac-P-ase活性

RA群は, $4.94 \pm 2.07 K-AU$, OA群は, $1.95 \pm 0.67 K-AU$ とRA群に有意に高かった. ($P <$

Figure 2. SOD Activity of Synovial Fluid Leucocyte in Rheumatic Diseases

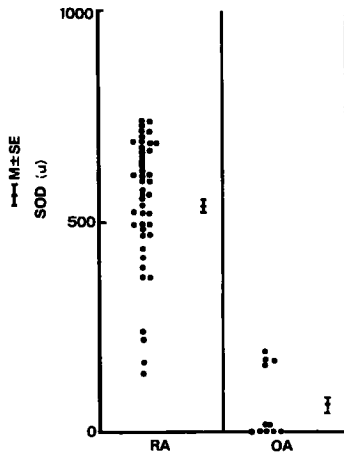
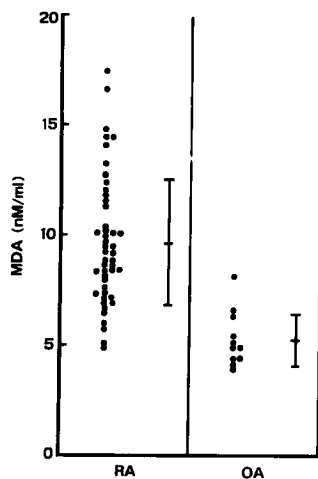


Figure 3. MDA of Synovial Fluid in Rheumatic Diseases



0.001) (表 1)

6. CRP 定量

RA 群は, $2.34 \pm 2.15 \text{ mg/dl}$, OA 群は, $0.01 \pm 0.04 \text{ mg/dl}$ と RA 群に有意な増加を示した. ($P < 0.001$) RA 群には 2 例に CRP 量の零がみられた. OA 群は唯 1 例 0.15 mg/dl を呈した以外はすべての例で零であった. (表 1)

7. SOD 活性と白血球数

滑液中 SOD 活性と白血球数との間には, 有意な相関がみられた. ($P < 0.05$) (図 4) 白血球中 SOD 活性と白血球数との間にも有意な相関がみられた. ($P < 0.01$) (図 5) すなわち, 滑液へ

Figure 4. Correlation between SOD Activity and Leucocyte Count in RA Synovial Fluid

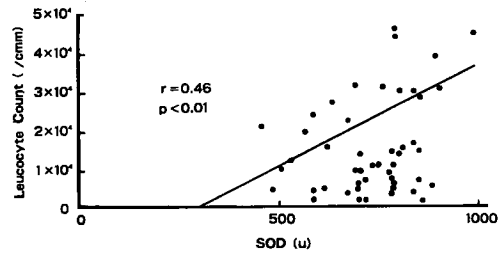
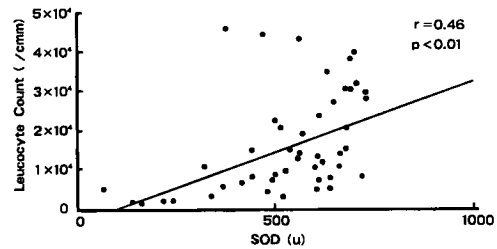


Figure 5. Correlation between SOD Activity of Leucocyte and Leucocyte Count in RA Synovial Fluid



の炎症細胞浸潤が強い程, SOD 活性が高かった.

8. SOD 活性と相対的粘稠度

滑液中 SOD 活性と相対的粘稠度との間には, 一定の相関関係を認めなかった. (図 6) しかし, 白血球中 SOD 活性の場合は, 白血球中 SOD 活性の上昇とともに粘稠度の低下する傾向がみられた. (図 7)

9. SOD 活性と過酸化脂質

滑液中 SOD 活性と過酸化脂質の間には, 有意な相関が認められた. ($P < 0.01$) (図 8) 白血球中 SOD 活性と過酸化脂質の間にも有意な相関が認められた. ($P < 0.01$) (図 9) すなわち, 脂質の過酸化反応が, SOD により抑えられていないように思われた.

10. SOD 活性とライソゾーム酵素活性

滑液中 SOD 活性と Ac-P-ase 活性との間には, 有意な相関がみられた. ($P < 0.05$) (図 10) 白血球中 SOD 活性と Ac-P-ase 活性の間にも有意な相関が認められた. ($P < 0.01$) (図 11) すなわち, SOD 活性は遊出されたライソゾーム酵素活性と相関したので, 炎症の程度に比例して高いことが認められた.

11. SOD 活性と CRP 量

Figure 6. Correlation between SOD Activity and Relative Viscosity in RA Synovial Fluid

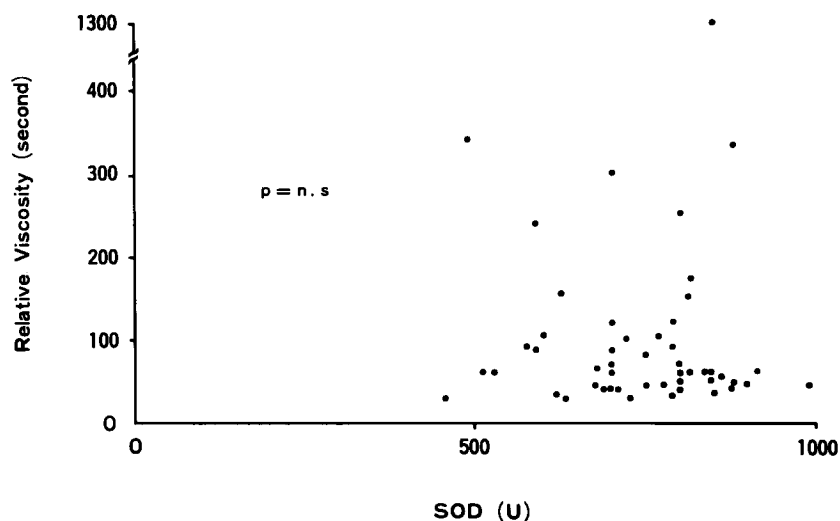


Figure 7. Correlation between SOD Activity of Leucocyte and Relative Viscosity in RA Synovial Fluid

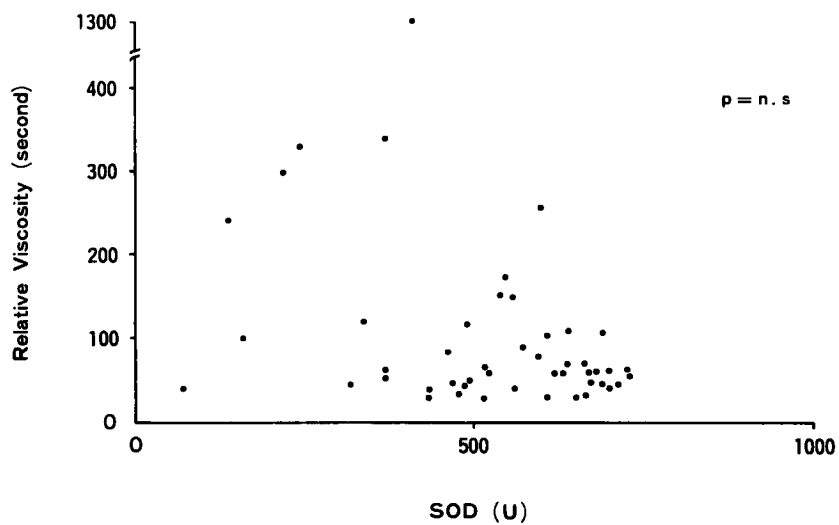


Figure 8. Correlation between SOD Activity and MDA in RA Synovial Fluid

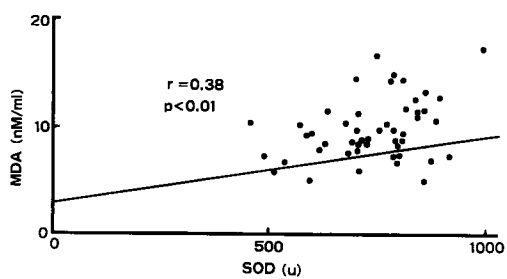


Figure 9. Correlation between SOD Activity of Leucocyte and MDA in RA Synovial Fluid

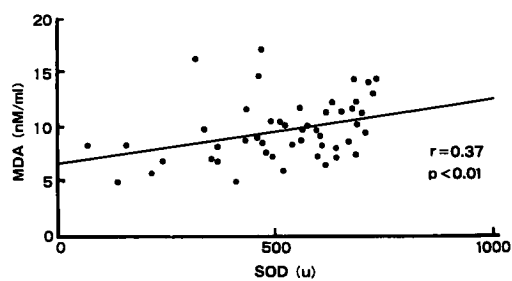


Figure 10. Correlation between SOD Activity and Acid Phosphatase Activity in RA Synovial Fluid

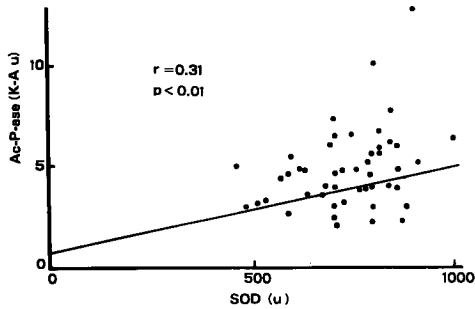


Figure 11. Correlation between SOD Activity of Leucocyte and Acid Phosphatase Activity in RA Synovial Fluid

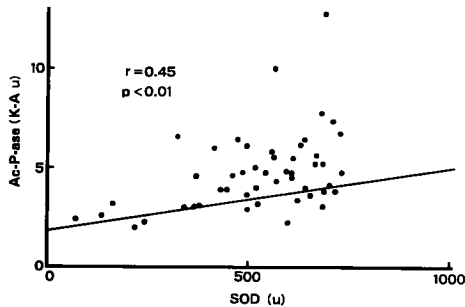
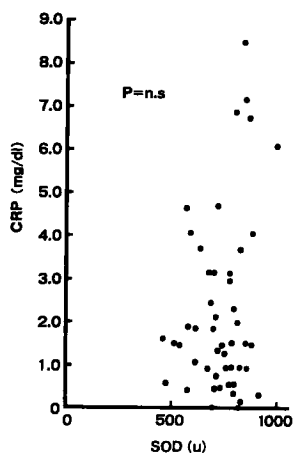


Figure 12. Correlation between SOD Activity and CRP Concentration in RA Synovial Fluid



滑液中 SOD 活性と CRP 量との間には有意な相関はみられなかった。しかし, SOD 活性の上昇とともに CRP 量が増加する傾向がみられた。

(図12) 白血球中 SOD 活性と CRP 量との間にも有意な相関が認められた。(0.01 < P < 0.05)
(図13) すなわち, 炎症の程度が強い程, SOD 活性が高いという関係がみられた。

12. 滑液中 SOD 活性と滑液白血球球中 SOD 活性

両者の間には一定の関係をみなかった。(図14)

Figure 13. Correlation between SOD Activity of Leucocyte and CRP Concentration in RA Synovial Fluid

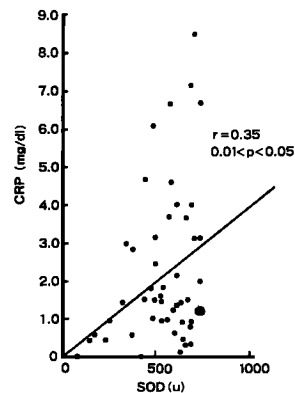


Figure 14. Correlation between SOD Activity of Synovial Fluid Leucocyte and SOD Activity of Synovial Fluid in RA

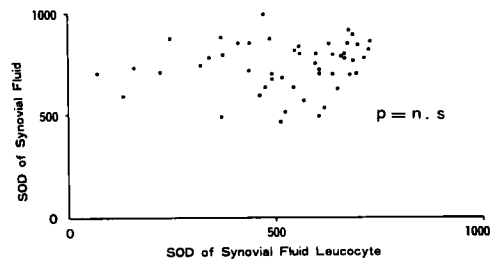


Figure 15. Correlation between MDA and Leucocyte Count in RA Synovial Fluid

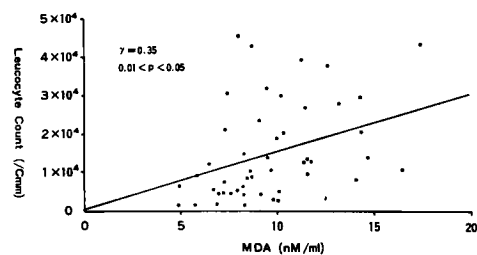
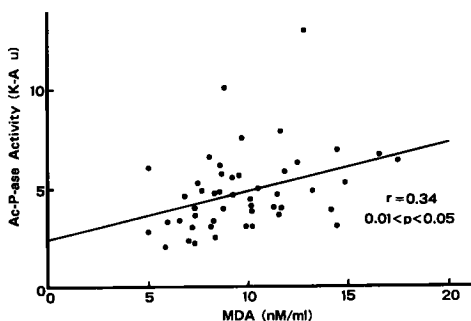


Figure 16. Correlation between MDA and Acid Phosphatase Activity in RA Synovial Fluid



13. 過酸化脂質と白血球数

過酸化脂質と白血球数との間には、有意な相関がみられた。(0.01 < P < 0.05) (図15) すなわち、滑液への炎症細胞浸潤が強い程、脂質の過酸化反応は盛んであると思われた。

14. 過酸化脂質とライソゾーム酵素活性

過酸化脂質と Ac-P-ase 活性との間には、有意な相関がみられた。(0.01 < P < 0.05) (図16) すなわち、脂質の過酸化反応が、ライソゾーム酵素の遊出を促しているように思われた。

考 按

RA の病因に関しては、古くから感染説、代謝異常説、内分泌異常説などが考えられてきた。しかし、近年では自己免疫異常を中心とした立場からの原因の究明が行われている。関節とその関連組織を主病変とした系統的かつ慢性進行性疾患である RA の炎症関節腔内では、現在のところ次のような免疫機序が考えられている。すなわち、T-cell の機能が減弱し、B-cell が増加し、形質細胞からリウマチ因子等の自己抗体が産生され、このリウマチ因子が変性 IgG や補体と結合して免疫複合物を形成し、この免疫複合物を好中球が貪食し、やがて好中球は崩壊し、好中球中細胞質に含まれていた一層の膜を有するライソゾーム顆粒が破壊されてライソゾーム酵素が遊出し、そのライソゾーム酵素の起炎作用によって滑膜炎を惹起するとされている。近年、この RA 関節腔内での炎症の機序のうち、好中球による免疫複合物の貪食過程およびライソゾーム膜破壊等に、 O_2^- 等の活性酸素種、SOD、過酸化脂質が何らかの役割を果たしているとし

て注目され始めた。

まず、生体内での O_2^- の発生は、白血球が貪食作用を行う時⁸⁾、Xanthine Oxidase 等の各種フラビン酵素反応時⁹⁾、ヘモグロビンの自動酸化時等¹⁰⁾といわれている。RA に於いても炎症を起こしている関節腔内では、好中球等の白血球が浸潤し、免疫複合物を貪食し、 O_2^- を生成していると考えられる。Babier⁸⁾ によれば、白血球の中でも大部分は、顆粒球が O_2^- を生成しているが、リンパ球も O_2^- の生成に関与しているという。 O_2^- を産生しない chronic granulomatous disease は、顆粒球による殺菌作用が障害されている疾患であるという事実や Lavelle¹²⁾ による大腸菌に関する実験等により O_2^- には殺菌作用という生体にとり有益な作用が認められる。しかし、反面好中球等が貪食に際して O_2^- と H_2O_2 とを生成し、これらが反応して $OH\cdot$ を生成し、この $OH\cdot$ が滑液の粘稠度を保つヒアルロン酸を脱重合したり¹³⁾、白血球そのものを障害し成熟前壊死をもたらす¹⁴⁾、さらに、この細胞壊死により水解酵素の遊出、続いて chemotactic factor の放出が起こり炎症サイクルの永続性にも大きな役割を果たしているかもしれない¹⁴⁾。また、 O_2^- は、プロスタグランディンの生合成¹⁵⁾、マクロファージの遊走¹⁵⁾、血小板凝集や放出にも関与している¹⁶⁾、コラーゲンのゲル化を抑制して軟骨や近位関節の構造にも作用したり¹⁷⁾、軟膏のプロテオグリカンの崩壊作用¹⁸⁾もある等生体にとり不利益な面も多々みられる。臨床薬理学の面でも、 O_2^- 産生の抑制度が非ステロイド性消炎剤のスクリーニングとして評価され、非ステロイド性消炎剤の薬理効果の 1 つに O_2^- の生成抑制が考えられている¹⁹⁾。このように O_2^- は、殺菌作用という生体にとり有益な作用がみられるが、炎症という面では催炎症的に働き、生体にとり不利益なものと両面が考えられる。

一方、SOD は、カタラーゼ等と同様に radical scavenger の 1 つで、 O_2^- を dismutate する酵素である。SOD は、あらゆる好気細胞中にその活性が見出され、細胞質およびミトコンドリアにそれぞれ isozyme が存在している。Beckman ら²⁰⁾ により赤血球中には銅と亜鉛を含んだ形で細胞質のみに存在し、白血球中にはマンガ

ンを含んだ形でミトコンドリア中に存在しているといわれた。しかし, Marvin ら²¹⁾は, 白血球にもミトコンドリアだけでなく細胞質にも SOD 活性が存在すると指摘した。SOD 活性の分布は, 細胞外液には細胞内に比して非常に活性が低く, 100分の1から1,000分の1位であり, 牛滑液の SOD 濃度は $1\mu\text{g}/\text{ml}$ という報告もある¹³⁾。

次に, SOD 活性の測定法には, Fridovich ら⁴⁾の開発した Xanthine-Xanthine Oxidase 法を改良した今成ら⁵⁾の方法を使用した。Scudder ら²²⁾が指摘した通り, Cytochrome より NBT の方がより敏感であり, NBT は Cytochrome-C と異って他の還元物質による影響を受けない等の点で, Xanthine Oxidase-NBT の系を用いた。しかし, SOD による NBT 還元抑制効果は非特異的ともいわれている²²⁾。滑液白血球中 SOD 活性の測定は, できるだけ血液混入のないものを使用した。Patriaca⁶⁾らは contaminate した赤血球中 SOD 活性を除くために 0.2% 食塩水で洗滌処理している。著者は, 白血球の viability を維持するために Tris- NH_4Cl 溶液で赤血球を溶血させて洗滌処理した。滑液中 SOD 活性の場合は, やはりできるだけ血液混入のない滑液を使用し, 前述の如く細胞外液中 SOD 活性は極めて低く, 測定が困難であったが, 自記分光光度計による分析で滑液の色調による修飾は色調を補正して行えば測定可能であったので, 試料としては滑液白血球中 SOD 活性測定の場合の15倍量すなわち 1.5ml を用いた。また, 銅と亜鉛を含む SOD は, PH10 の強アルカリでは PH7.8 の弱アルカリの時と比べて17倍の感受性があるといわれており, マンガンを含む SOD はそれ程でもないといわれている²⁴⁾。滑液白血球中 SOD 活性の測定は, 緩衝液として PH 10.2 の $0.05\text{M Na}_2\text{CO}_3$ 液を用いているため, 主として銅と亜鉛を含む SOD を測定しているのかもしれない。

ところで, 1968年 Huber ら²⁵⁾によってプレドニゾロンやフェニルブタゾンと同等かそれ以上の抗炎症効果を示す牛肝臓由来の抗炎症蛋白 Ontosein が初めて指摘された。1969 Carson らによって, 以前に分離されていた cupper-containing erythrocyte protein (human) が SOD であ

ることが判明した²⁶⁾。1971年には Ontosein と SOD とが同一であることも判り, この抗炎症蛋白は "Orgotein" と命名された。Orgotein は, metalloprotein 属に対する包括的名称である。その Orgotein は, 赤血球, 肝臓, 他組織より分離された水溶性蛋白で, 純品として注射薬の形で取り出され²⁷⁾, OA の治療に関節腔内注入を行い, 好成績であったという報告²⁸⁾もある。

さて, 炎症性疾患である RA 群の滑液が, 非炎症性疾患とされる OA 群の滑液と比較して, 白血球数は有意に増加し, 粘稠度は有意に低下し, Ac-P-ase 活性は有意に高く, CRP 量も有意に増加していたのは従来の報告と同様である。滑液中 SOD 活性は, RA 群は OA 群に比して高い傾向がみられ, また滑液白血球中 SOD 活性は, RA 群が有意に高値を示した。SOD は, 前述の如く白血球ではミトコンドリアや細胞質に由来するといわれ²⁴⁾, ライソゾーム顆粒由来の酵素ではないが, 炎症疾患群においてより活性が高値を示した。この理由としては, RA 炎症関節腔内で好中球が免疫複合物等を貪食する際に多量の O_2^- を生成する結果, O_2^- を分解するために radical scavenger として働き SOD 活性が高くなると考えられる。したがって, 滑液白血球中 SOD 活性は, 白血球数, Ac-P-ase 活性, 活性 CRP 量とも相関し, 粘稠度の低下とともに高まる傾向がみられたものと思われる。この粘稠度に関して, McCord¹³⁾は, invitro の実験で, O_2^- によってもアルロン酸の脱重合が起こり, その O_2^- による脱重合を SOD が阻止し, しかも, O_2^- と H_2O_2 とにより, $\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$ の反応で 2 次的に生成された $\text{OH}\cdot$ が O_2^- 以上にヒアルロン酸の脱重合をひき起こすことを指摘した。著者の成績では, 滑液中 SOD 活性と粘稠度との間には一定の関係を認めず, 滑液白血球中 SOD 活性の上昇とともに粘稠度が低下する傾向, すなわち, ヒアルロン酸の脱重合が進んでいる傾向がみられた。McCord の見解の如く, O_2^- , SOD, $\text{OH}\cdot$ 等が複雑にヒアルロン酸の脱重合に関与し, さらにヒアルロニダーゼ等の他の要因も加わっているため, SOD 活性と粘稠度との間にはクリアカットな関係が認められなかったものと思われる。

一方、滑液中 SOD 活性は、滑液白血球中 SOD 活性と相関しなかったので、滑液中の SOD の由来が判然としなくなる。ところが、Fridovich²⁶⁾ は、 O_2^- はミトコンドリアでも生成されるとしているが、Salin ら²⁴⁾ は、細胞膜の外表面で生成されると指摘している。もし O_2^- が細胞膜の外表面で生成されるならば、細胞質で生成された SOD は、 O_2^- を scavenge するため放出拡散され滑液中へ移行するかもしれない。このことは、滑液中 SOD 活性が、白血球数や Ac-P-ase 活性との間に相関を示し、滑液中 SOD 活性上昇とともに CRP 量が増加した傾向があったことを理解し易くする。また、滑液中には、内因性の SOD も存在する¹³⁾ ので、この内因性 SOD も加わって測定されたものと考えられる。

ところで、Rister ら³⁰⁾ は、若年性関節リウマチに於ける末梢血好中球中 SOD 活性は、健康人と比較して有意に低値を示したと報告している。著者の成績と Rister らの成績との相違については、著者が、白血球数を一定量にしていないのに対して、Rister らは、一定量的好中球に対する SOD 活性で表わしたことで、著者は白血球全体をとりあげたのに対して、Rister らは好中球のみを対象としたこと、さらには著者が滑液中の主として炎症白血球を扱い、Rister らは末梢血好中球を扱っている等が関与しているかもしれない。果たして 1 個の白血球が有する SOD 活性は、一定しているのかそれとも活性化の度合いにより違うものなのか大きな問題となるが、著者は後者と考えている。

次に、脂質過酸化反応は生体内では主として不飽和脂肪酸の酸化反応であり、その最終産物として過酸化脂質が形成される。この脂質過酸化反応はラジカル反応によることが明らかにされているが、生体内ではラジカル反応の中でも O_2^- , $OH^\cdot$, 1O_2 等がその主要な原因と考えられる³¹⁾。よって、前述した如く顆粒球の貪食時に O_2^- , $OH^\cdot$, 1O_2 等を生成するので、好中球による免疫複合物等の貪食がみられる RA 関節腔内では盛んに脂質過酸化が行われるので、滑液中過酸化脂質が RA 群で OA 群に比して有意に高く、滑液白血球数と相関したものである。また、脂質過酸化反応は、SOD により特異的に阻害さ

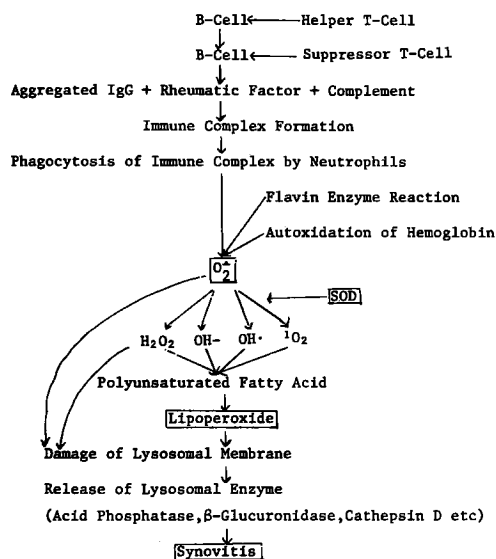
れ、過酸化脂質の蓄積が抑えられるといわれる³²⁾。しかしながら、滑液中 SOD 活性及び滑液白血球中 SOD 活性と過酸化脂質との間にそれぞれ有意な正の相関がみられた。この理由としては、 O_2^- を SOD が分解して H_2O_2 を形成し、2 次的に O_2^- と H_2O_2 とが反応して $OH^\cdot$ や 1O_2 を生成し、この $OH^\cdot$ や 1O_2 が O_2^- よりもより以上に脂質過酸化反応に関与しているためかもしれない。

さらに、生体膜中のリン脂質は、構成成分中に多価不飽和脂肪酸を含んでいるので、脂質過酸化現象は、細胞中の膜構造部や膜構造を主成分とする顆粒で最も起こり易いといわれる²⁾。一層の膜を有するライソゾーム膜顆粒でも、 $OH^\cdot$ そのものによってもライソゾーム顆粒融解が起きるともいわれるが、この脂質過酸化反応が起こり、過酸化脂質がライソゾーム膜を不安定化させ、ライソゾーム酵素の遊出を促し易くしたため過酸化脂質と Ac-P-ase 活性とが相関したと考えられる。吉川ら³³⁾ も同様のことを指摘している。よって過酸化脂質も炎症という点で催炎症的に働くものと思われる。

最後に、今迄 SOD は抗炎症蛋白とみなされてきたが、果して抗炎症蛋白としてよいか否か問題と思われる。著者の結果では、検体の扱い方によっても変わってくるかもしれないが、滑液中 SOD 活性は、炎症性疾患である RA 群が非炎症疾患とされる OA 群に比して高い傾向がみられ、滑液白血球中 SOD 活性は、RA 群が OA 群に比して有意な高値を示した。さらに、SOD 活性は、滑液白血球中のみならず、滑液中ともに、炎症の指標である白血球数、ライソゾーム酵素活性、CRP 量ともほぼ正の相関を示した。もし SOD が抗炎症蛋白であり、かつ、抗炎症蛋白活性が低下しているが故に炎症が亢進しているという考え方をするならば、SOD 活性は RA 群が OA 群に比して低くなくても良く、かつ SOD 活性は、白血球数、ライソゾーム酵素活性、CRP 量との間に負の相関を示しても良かったと思われる。SOD は、催炎症作用をもつと思われる O_2^- を分解して、2 次的に $OH^\cdot$ や 1O_2 を生成する。これら生成された活性酸素種より、生体膜不安定化作用によって催炎症的に働くと思われる過

酸化脂質が形成される。著者の成績でも, SOD 活性は過酸化反応が SOD により抑制されていないような結果がみられた。以上より SOD は, 従来のように抗炎症作用というだけでなく, 他面では 2 次的に催炎症作用のある物質への媒介としての働きにも留意しなければならないと思われる。Fig. 17 に著者の O_2^- , SOD 及び過酸化脂質等が関与する RA 関節炎病態に関する仮説を図示した。

Figure 17. Proposed Etiology of Rheumatoid Arthritis concerning Superoxide (O_2^-) Generating System, Superoxide Dismutase (SOD) and Lipoperoxide.



結 語

RA の病態を研究する目的で, RA の主たる炎症の場である関節腔内における O_2^- , SOD, 過酸化脂質等の役割を検討すべく, OA を対照として, 滑液中 SOD 活性, 滑液白血球中 SOD 活性, 滑液中過酸化脂質をそれぞれ測定し, 他の炎症の指標である滑液中白血球数, 滑液粘稠度, 滑液中ライソゾーム酵素活性, CRP 量との関係

を調べ, 以下の結果を得た。

- (1) 滑液中 SOD 活性は, OA 群に比し RA 群に高い傾向がみられ, 滑液白血球中 SOD 活性は, OA 群に比し RA 群が有意な高値を示した。
- (2) 過酸化脂質は, OA 群に比し RA 群が有意な高値を示した。
- (3) 滑液中 SOD 活性と白血球数, 過酸化脂質, ライソゾーム酵素活性との間には有意な正の相関がみられた。
- (4) 滑液白血球中 SOD 活性と白血球数, 過酸化脂質, ライソゾーム酵素活性, CRP 量との間には有意な正の相関がみられた。
- (5) 過酸化脂質と白血球数, ライソゾーム酵素活性との間には有意な正の相関がみられた。
- (6) 以上の結果より, 炎症という観点からみて O_2^- や過酸化脂質は催炎症因子とみなしてもよいと思われる。そして, SOD を従来通りに全面的に抗炎症蛋白とみなすことに対して考慮の余地があるように思われた。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御懇意な御指導と御校閲を賜った恩師大藤 真教授に深甚なる謝意を捧げるとともに, 御指導御鞭撻をいただいた倉敷広済病院院長江沢英光先生, 高知医科大学生物化学教室内海耕穂教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は, 第11回結合組織学会総会で発表した。

文 献

1. 沢田幸治, 山崎勇夫: 生物と酵素. 蛋白質核酸酵素, **19**, 527-536, 1974.
2. Tappel, A.L.: Lipid peroxidation damage to cell component. *Feb. Proc.* **32**, 1870-1881, 1973.
3. Di Luzio, N.R.: Antioxidants, lipid peroxidation and chemical-induced liver injury. *Fed. Proc.* **32**, 1875-1881, 1973.
4. Fridovich, I. and Mc Cord, J.M.: Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055, 1969.
5. 今成登志男, 広田元子, 宮崎元一, 早川和一, 田村善蔵: Superoxide dismutase 活性測定の改良. 医学のあゆみ, **101**, 496-497, 1977.
6. Patriaca, P., Dri, P. and Rossi, F.: Superoxide dismutase in leucocytes. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* **43**, 247-250, 1974.
7. 内藤周幸, 菅原令子: 血漿過酸化脂質測定法の検討ならびに血漿過酸化脂質におよぼすビタミン E 摂取の影響. 臨床病理, **13**, 545-549, 1975.
8. Babior, B.M., Kipnes, R.S. and Curnutte, J.T.: Biological defense mechanism. *J. Clin. Invest.* **52**, 741-744, 1973.
9. Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S.G., Howell, L.G., Engel, P.C., Matthews, R.G., Schuman, M. and Sullivan, P.A.: The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 891-897, 1969.
10. Misra, H.P. and Fridovich, I.: The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **247**, 6960-6962, 1972.
11. Curnette, J.T., Whitten, D.M. and Babior, B.M.: Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.* **290**, 593-597, 1974.
12. Lavelle, F., Michelson, A.M. and Dimitrijevic, L.: Biological protection by superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 350-357, 1973.
13. Mc Cord, J.M.: Free radical and inflammation. protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* **18**, 529-531, 1974.
14. Salin, M.L. and Mc Cord, J.M.: Free radical and inflammation. protection of phagocytosing leucocytes by superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* **56**, 1319-1323, 1975.
15. Oyanagi, Y.: Participation of superoxide anions at the prostaglandin phase of carrageenan foot-oedema. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 1465-1472, 1976.
16. Hardin, I., Karabin, R. and Boxer, G.J.: Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J. Clin. Invest.* **59**, 959-965, 1977.
17. Greenwald, R.A. and Moy, W.W.: Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radicals. *Arthritis Rheum.* **22**, 251-259, 1979.
18. Greenwald, R.A., Moy, W.W. and Lazarus, D.: Degradation of cartilage proteoglycans and collagen by superoxide radical. *Arthritis Rheum.* **19**, 799, 1976.
19. Simchowitz, L., Mehta, J. and Spilberg, I.: Chemotactic factor-induced generation of superoxide radicals by human neutrophils. effect of metabolic inhibitors and antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* **22**, 755, 1979.
20. Beckman, G., Lundgren, E. and Tarnvik, A.: Superoxide dismutase isozymes in different human tissues. Their genetic control and intracellular localization. *Hum. Hered.* **23**, 338-345, 1973.
21. Marvin, L.S., and Mc Cord, J.M.: Superoxide dismutase in polymorphonuclear leucocytes. *J. Clin. Invest.* **54**, 1005-1009, 1974.

22. Scudder, P., Stocks, J. and Dormandy, T.L.: The relationship between erythrocyte superoxide dismutase activity and erythrocyte copper levels in normal subjects and in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta* **69**, 397-403, 1976.
23. Amano, D., Kagosaki, Y., Usui, T., Yamamoto, S. and Hayashi, O.: Inhibitory effects of superoxide dismutase and various other proteins on the nitroblue tetrazolium reduction by phagocytizing guinea pig polymorphonuclear leucocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 272-279, 1975.
24. Salin, M.L. and Mc Cord, J.M.: Superoxide dismutase in polymorphonuclear leucocytes. *J. Clin. Invest.* **54**, 1005-1009, 1974.
25. Huber, W., Schulte, T.L., Carson, S., Goldhamer, R.E. and Vogin, E.E.: Some chemical and pharmacological properties of a novel antiinflammatory protein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **12**, 308, 1968.
26. Mc Cord, J.M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase. an enzymic function for erythrocuprein (Hemocuprein). *J. Biolo. Chem.* **224**, 6049-6055, 1969.
27. Carson, S., Vogin, E.E., Huber, W. and Schulte, T.L.: Safety tests of orgotein, an antiinflammatory protein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **26**, 184-202, 1973.
28. Olesen, K.L. and Menander, K.B.: Orgotein: A new anti-inflammatory metalloprotein drug: Preliminary evaluation of clinical efficacy and safety in degenerative joint disease. *Curr. Ther. Res.* **16**, 706-717, 1974.
29. Fridovich, I.: The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880, 1978.
30. Rister, M., Bauermeister, K., Gravert, U. and Gladtko, E.: Superoxide dismutase deficiency in rheumatoid arthritis. (Letter) *Lancet* **1**, 1094, 1978.
31. 山中直樹, 吉岡 保, 内海耕慥: 老化と過酸化反応. 医学のあゆみ, **91**, 573-580, 1976.
32. 藤田 直, 安田正秀: 過酸化脂質と生体膜. 日薬理誌, **72**, 279-286, 1976.
33. 吉川敏一, 近藤元治, 横江信義, 山下文治, 須津富鶴, 織田静信: 慢性関節リウマチの病因的考察. 臨床免疫, **10**, 899-904, 1978.

**Studies on the superoxide generating system,
superoxide dismutase and lipoperoxide in rheumatoid arthritis**

Part I

**Studies on superoxide generating system, superoxide dismutase
and lipoperoxide of synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis**

Tutomu SHIO

The Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. T. Ofuji)

Superoxide dismutase (SOD) activity and the lipoperoxide level of synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis (RA) were investigated. SOD activity was checked with xanthine and xanthine oxidase reaction according to Fridovich. Lipoperoxide level was checked with thiobarbituric acid reaction according to Naito. Synovial fluid SOD activity, synovial fluid leucocyte SOD activity and synovial fluid lipoperoxide level were checked in comparison with those of osteoarthritis (OA). The correlation between SOD activity and inflammatory sings such as leucocyte count, relative viscosity, lysosomal enzyme activity (acid phosphatase activity) and C-reactive protein (CRP) concentration was checked in synovial fluid from patients with RA. The correlation between lipoperoxide level and inflammatory sings was checked similarly.

The results are summarized as follows:

- 1) Synovial fluid SOD activity in RA was higher than in OA. Synovial fluid leucocyte SOD activity was significantly higher than that of OA.
- 2) The synovial fluid lipoperoxide level of RA was significantly higher than that of OA.
- 3) A significant correlation was present between synovial fluid SOD activity and leucocyte count, lipoperoxide level, acid phosphatase activity.
- 4) A significant correlation was present between synovial fluid leucocyte activity and leucocyte count, lipoperoxide level, acid phosphatase activity, CRP concentration.
- 5) A significant correlation was present between synovial fluid lipoperoxide level and leucocyte count, acid phosphatase activity.
- 6) Superoxide and lipoperoxide may be an inducer of inflammation in view of RA inflammation. It is premature to pass judgement on the generally accepted idea that SOD is an anti-inflammatory protein.