犬声帯各部における superoxide dismutase (SOD) 活性の検討

——電子スピン共鳴スピントラッピング法による測定——

獨協医科大学越谷病院耳鼻咽喉科

藤岡 正, 伊藤 博喜, 都築 達, 田中 康夫

SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) ACTIVITY MEASURED BY ESR-SPIN
TRAPPING METHOD IN CANINE VOCAL CORDS

TADASHI FUJIOKA, M.D., HIROKI ITOH, M.D., TOHRU TSUZUKI, M.D.
and YASUO TANAKA, M.D.

Department of Otolaryngology, Dokkyo University School of Medicine Koshigaya Hospital

Recently, superoxide dismutase (SOD) has been regarded as a scavenger of superoxide radical which is a important factor of 'reperfusion injury' in ischemic heart or in brain disorder. Its low activity means cell susceptibility to the superoxide radical in tissues.

The SOD activity was examined in ten canine larynges after phonation by a electron spin resonance (ESR)-spin-trapping method. The values of mean SOD activity at the middle part of the membranous vocal cord, the vocal process of the arytenoid and the subglottal portion were 67.84 ± 11.06 U/ml/g, 121.94 ± 19.46 U/ml/g and 115.46 ± 19.18 U/ml/g, respectively. There was a significant difference between the value of the membranous vocal cord and those of the other two ($P < 0.01$).

The result suggests that the low SOD activity at the part of the membranous vocal cord might relate to a pathogenesis of the laryngeal polyp and vocal nodule. The reperfusion injury may participate in the cause of such vocal cord disorders which grow commonly at the middle part of the membranous vocal cord.

Key words: 声帯循環障害, 虚血—再灌流, SOD 活性
ESR スピントラッピング法, 声帯病変

A94-0712-61041

I 緒 言

声帯は高速振動体であり、前後軸においても特徴のある層構造を示している。すなわち、粘膜固有層の浅層は膜様部中央で最も厚く、前後で薄く、中間層はその逆となっており、深層は後ろほど厚いなど、声帯振動に際しての機械的損傷が起こりにくい構造となっている¹⁾。しかし、血管循環障害説²⁾が一つの成因として考えられている声帯ポリープを始めとした疾患は、最も可撓性に富んだ声帯膜様部中央に発生するものが多いが、なぜこの部分に発生するかの詳細は不明である。

最近、脳や心筋において、虚血—再灌流時に superoxide (O_2^-) 等のフリーラジカルが発生することが報告されている³⁾⁴⁾。発生したフリーラジカルは、最初の虚血段階より血流再開時に爆発的に急増しいわゆる再灌流障害 (reperfusion injury) といわれる重篤な壊死などの病変を引き起こす。このフリーラジカルの消去系の一つである superoxide dismutase (SOD) の活性濃度を電子スピン共鳴 (electron spin resonance, ESR) スピントラッピング法を用いて定量し、間接的にフリーラジカルの存在を証明する方法が近年開発さ

れてきた⁵⁾⁶⁾。

声帯各部では、虚血－再灌流の程度が異なるために、疾患発生部位に特異性があるのではないかと推測した。今回の研究では、ESR スピントラッピング法を用いて、振動直後の成犬声帯粘膜各部分の SOD 活性濃度を測定し、この結果から、血管循環障害と声帯病変の関係について考察した。

II. 研究方法

1. 研究対象

成犬10頭（体重 10～20kg）の発声直後の喉頭を摘出し、その声帯粘膜を以下の 3 群に分けて採取し、測定対象とした。

A 群：声帯膜様部中央部粘膜

B 群：声帯後部（声帯結節部付近）

C 群：声門下部

2. 試料の作製法

上記 A, B, C 群それぞれ10検体ずつ、粘膜を採取し、正確に秤量した後、試験管に分割した。さらに、pH7.4 の磷酸緩衝液（PBS 溶液）3cc を加え、1 分間各検体を破碎攪拌した後、攪拌溶液を遠心機（KOKUSAN, model H-103-RLH）で 1 時間、15000rpm 高速冷却遠心し、溶液の上清を試料とした（図 1）。

3. SOD 活性測定法

SOD 活性の測定は、平松、河野⁷⁾らの方法に準じて、2mM hypoxanthine (HYPO) 50 μ l, 5.5mM diethylene triamine penta-acetic acid (DETAPAC) 35 μ l, 5.5-dimethyl-1-pyrolin-n-oxide (DMPO) 10 μ l を試料に添加した。

これに 0.27U/ml の xanthine oxidase (XOD) を加え、直ちに攪拌し、反応液を高感度 ESR 水溶製扁平セル（日本電子）に移し、XOD 添加30～40秒後、ESR 分光計（日本電子、JES-RE-1X）にて DMPO-O₂⁻ スピンアダクトの ESR シグナルを測定した。この測定値を、0.8～100U/ml の標準 SOD 試薬の DMPO-O₂⁻ スピンアダクトの ESR シグナルに基づく検量線の上にのせて、各試料の SOD 活性濃度を試料 1mg あたりについて求めた。すなわち、既知量の O₂⁻ に試料を反応させた際の O₂⁻ 消費量より SOD 活性濃度を求めた。この方法によって A 群から C 群の計30検体につき、それぞれの SOD 濃度を測定した（図 1）。

III. 結 果

喉頭各部粘膜採取、秤量

pH 7.4 PBS 溶液 3ml 添加後、破碎・攪拌（1 分間）

15000rpm 高速冷却遠心（1 時間）

上清を試料とし、2 mM HYPO 50 μ l, 5.5mM DETAPAC 50 μ l, DMPO 10 μ l, 及び 0.27 U/ml XOD を添加、攪拌

反応液を日本電子社製高感度 ESR 水溶性扁平セルに移す

XOD 添加後、30～40秒より日本電子社製 JES-RE-1X ESR 分光計にて、DMPO-O₂⁻ スピンアダクトの ESR シグナルを測定

標準 SOD 添加 DMPO-O₂⁻ スピンアダクトの ESR シグナルに基づく検量線にて、SOD 活性を求める

図 1 試料作製およびSOD活性測定法

表 1 声帯各部粘膜の SOD 活性濃度

No.	部位 声帯膜様部 中 央 部	声帯後部	声門下部
1	63.4	121.4	148.1
2	54.7	93.9	121.6
3	62.9	105.2	131.1
4	68.8	124.7	123.6
5	71.4	152.3	108.8
6	90.4	125.7	136.5
7	60.1	124.1	84.5
8	64.9	139.9	91.4
9	82.6	138.5	105.2
10	59.2	93.7	103.8
平 均	67.84	121.94	115.46
標準偏差	11.06	19.46	19.18

単位：U /ml /g

SOD 活性濃度（平均値±標準偏差）は、表 1 に示すように、声帯膜様部中央では 67.84±11.06U/ml/g, 声帯後部では 121.94±19.46U/ml/g, 声門下部では 115.46±19.18U/ml/g であった。

3 群の相互の平均値の差の検定を行ったところ、有意水準 1% で、声帯膜様部中央と声帯後部及び、声帯膜様部中央と声門下部の間には有意差を認めたが、声帯後部と声門下部の間には有意差を認めなかった。

IV. 考 察

1. SOD 活性の測定法

SOD 活性の測定法としては、従来よりチトクローム C 法、NBT 法、EIA 法、RIA 法などの方法が用いられてきた。今回、測定に用いた ESR スピントラッピング法は、1945年、Zavoisky により提唱された磁気分光

法を基礎とし、活性酸素-フリーラジカルの磁場中における不対電子のスピンの遷移に伴うマイクロ波の吸収を、共鳴現象として観察するものである。しかしながら、活性酸素種の示す反応は非常に早く、ESR分光計を用いても、活性酸素種を、室温・溶液中で直接測定することは困難であった。しかし、1971年 Janzen により、不安定なラジカルを安定化して測定するスピントラッピング法が開発された¹⁴⁾。今回、我々が用いたこの方法では、 O_2^- の定量が可能であり、さらにSODの直接定量もできる。分光法とは違い、マイクロ波を使用していることもあり、雑蛋白による測定誤差がなく、また試料の形状を問わなくてもよいという特徴がある。ESRスピントラッピング法によるSOD活性測定は、基質として O_2^- 量が正確に捕捉されていること、操作法が簡単であり、少量の試料(約30mg)で短時間(約3分)にて測定可能という利点がある⁶⁾¹⁵⁾。

2. 声帯振動と虚血一再灌流

声帯ポリープ、声帯結節を始め、声門癌に至るまで声帯各種疾患は、最も可撓性に富んだ声帯膜様部中央部に発生するものが多い。

高速振動体である声帯の解剖学的特徴として、前述のような機械的損傷が起こりにくい構造を示している¹⁾。他に、血行動態についても、犬喉頭¹¹⁾¹⁹⁾や人喉頭¹⁰⁾¹¹⁾における報告がなされている。平野¹⁾によると、犬喉頭での観察のまとめとして、発声において最も重要な声帯遊離縁のいわゆる cover では、血管は直下のいわゆる body から直接入るのではなく、前後から声帯遊離縁に平行して入り、この部分の血管はほかの部分と比べて疎である。そしてこの部分には太い血管はみられないが、細動静脈の直接吻合が多く、振動のための血流量の減少による組織の呼吸及び代謝障害を防止するような形態的所見の特徴があると述べられている。しかし、この声帯膜様部中央になぜ各種疾患が多発するかは、いまだ十分に実証されていない。

福田¹¹⁾は、声帯遊離縁の運動は、前後軸においては「一種のなわとび様運動」を行っているとして述べているが、このことから、声帯膜様部中央部は振幅が大きいため、声帯振動中には最も強く虚血が起こり、また振動停止時には再灌流の程度も最も大きいであろうと推測できる。すなわち、声帯膜様部中央部では、前述の脳や心筋と同様に、虚血一再灌流時にフリーラジカルが大量に発生し、各種声帯疾患が起こりやすい原因となっている可能性が考えられる。

生体細胞内のミトコンドリアにおいては、酸素の98

%は還元されて水になるが、残りの2%の酸素は O_2^- 等の活性酸素(フリーラジカル)を生成し、細胞を障害すると考えられている。生体細胞内にはこれに対する防御系としてSODが、また細胞外にはcatalase, glutathione peroxide等のフリーラジカル消去系(free radical scavenging system)が存在し、障害の発生と進行を防いでいる。しかし、一旦組織内でフリーラジカル産生量が消去系の処理能力を上回るとフリーラジカルが急増し、重大な細胞障害を引き起こすものといわれている³⁾。現在のところ、フリーラジカルは、生体内脂質から水素を引き抜いて脂質過酸化反応を起こしたり、蛋白を攻撃して分解による低分子化、または、橋かけ反応による高分子化を起こしたり、核酸塩基を攻撃する¹²⁾と考えられている。

この機序により、フリーラジカルは、虚血性心疾患や脳梗塞他における再灌流障害、急性呼吸促迫症候群(ARDS)やブレオマイシン肺臓炎等の肺疾患、老化や発癌へまで影響を及ぼすと考えられている。

今回の測定結果から、喉頭においても声帯振動時の虚血一再灌流時のSOD活性の低下が声帯ポリープや声帯結節の発生の一因である可能性が示唆された。喉頭における発癌にもフリーラジカルが関与することが予想されるが、それらの関係については今後の研究課題としたい。

VI. 結 語

ESRスピントラッピング法を用いて、発声直後の犬喉頭各部粘膜のSOD活性濃度を測定し、その差について検討した。

① 声帯膜様部中央部粘膜は、声帯後部、声門下部に比較し、SOD活性濃度が低く、有意差を認めた。

② 声帯後部及び声門下部のSOD活性濃度には、有意差を認めなかった。

以上により、フリーラジカルを発生する過程である虚血一再灌流が、犬声帯膜様部中央部の粘膜では、他の部分よりも高度に生じていると推測され、これらの成績から声帯各種病変が声帯膜様部中央部に発生しやすいことの一因であると示唆された。

参 考 文 献

- 1) 平野 実：音声外科の基礎と臨床、耳鼻21(補1)：239-440, 1975.
- 2) 広戸幾一郎、進 武幹、小池祐一、広瀬幸夫：声帯ポリープの成因、日耳鼻 74：866-873, 1971.

- 3) 山崎 昇：冠再灌流障害，現代医療 21：111-117，1989.
 - 4) McCord JM：Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. New Engl J Med 312：159-162, 1985.
 - 5) Janzen EG：Spin trapping. Account Chem Res 4：31-40, 1971.
 - 6) 河野雅弘：活性酸素種とSODの定性・定量—ESR—スピントラッピング法による，組織培養 14：132-136, 1988.
 - 7) 平松 緑，河野雅弘：ESRによるSuperoxide dismutase 活性測定法の開発，日本電子ニュース 26：106-109, 1986.
 - 8) 広戸幾一郎：声帯の病理，日耳鼻 80：931-937, 1977.
 - 9) 三橋重信，栗田茂二郎，永田正人，江崎修一，清川兼輔他：声帯血管の分布様式とその血行動態，日耳鼻 87：1371-1372, 1984.
 - 10) 山口幹夫，山下利幸，兼竹博之，小池靖夫：耳鼻咽喉科領域における粘膜血液量—文献的考察—耳鼻臨床 82：1531-1540, 1989.
 - 11) 福田宏之：声帯粘膜の可撓性を考慮した手術的アプローチ，平野 実 編：音声外科における最新の進歩，医学教育出版社，東京 1984，29-62頁.
 - 12) 八木国夫，中野 稔監修，二木鋭雄，島崎弘幸編集：活性酸素，医歯薬出版，1987.
 - 13) 嵯峨井勝：環境因子とフリーラジカル—生体内でラジカル反応を誘起する様々な環境因子，Mebio 5 (9)：69-74, 1988.
 - 14) Janzen EG：Spin trapping. Account Chem Res 4：31-40, 1971.
 - 15) 山岸玲子：乾癬ならびにアトピー性皮膚炎患者における皮膚superoxide dismutase 活性の検討—Electron spin resonanceスピントラッピング法による測定—，慈恵医大誌 104：1989，197-207.
-
- 稿を終えるに臨み，数々のご助言を頂いた日本電子株式会社 ESR 応用研究室長河野雅弘博士，実験測定にご協力頂いた黄海文昌，大島いずみ両氏に深甚の謝意を表します。なお，当論文の要旨は，第2回日本喉頭科学会，第91回日本耳鼻咽喉科学会において発表した。
-
- (1991年1月12日受稿 1991年3月27日受理 急載)
別刷請求先 〒343 埼玉県越谷市南越谷2-1-50
獨協医科大学越谷病院耳鼻咽喉科 藤岡 正