臨床用 SOD 活性測定キットの確立

大柳善・岸 信一・中迫智子*

Establishment of SOD activity kit for clinical use
Yoshihiko Ōyanagui・Shinichi Kishi・Tomoko Nakazako*

臨床材料のスーパーオキシドメディスムターゼ (SOD) を測定したいとの要求が高まっている。抗体を用いての EIA および RIA 法では活性のない SOD も検出するため、その意義の解釈に困難を生じる。われわれはあくまでも活性を簡便に測定できるキットを確立せんとした。SOD 活性測定法は多数あるが、代表的な 7 方法で SOD に対する感受性と障害をもたらす蛋白モデルとしてのウシ血清 (BSA) への感受性を比較したのが表 1 である。チトクローム c 法の SOD へ感度を 1 とすると化学発光法は 9.8 と一番感度はよかったが、BSA で促進が生じ (注 b)、血清などの SOD 測定はできない。LDH+NADH 法も感度はよく、BSA/SOD 感度比も大きく (蛋白障害率が低いことを示す) よい方法であるが、LDH が高価である。epinephrine, pyrogallol, NBT 法は感度の低いこと、さらに試薬が不安定な点よりもキット化には向かない。結局、Elstner らの Nitrite 法がよく条件を変えてチトクローム c 法より 8.5 倍 SOD への感度の高い改良亜硝酸法を見いだした。この方法では高感度の分光計は不要であり、蛋白障害は少ないので、臨床家が通常の分光計で SOD 活性を測定できるものとなった。図 1 は当キットでの操作法と原理を示す。キサンチンオキシダーゼ (XOD 系) で生ずる O_2^-

図 1 Fujisawa SOD activity assay-kit procedure

は SOD が存在すると H_2O_2 と O_2 になり、ヒドロキシルアミンと反応して NO_2^- となる O_2^- 量が低下する。なお、この反応時の蛋白の障害を小さくするためキットには安定化剤が加えてある。発色は 24 時間後でも SOD 値を変えるほどの変化は示さない。SOD 値は混定法の種類のみならず、同一方法によっても O_2^- 産生が多い条件下で測定すると低くなるなどの差を生じる。ここにキットの存在意義があろう。ヒトの血漿中の SOD 値の変化が肝炎などで報告されているが、蛋白の障害を無視しているので信用できないのではなからうか。われわれは血漿中の蛋白濃度に相当する BSA の SOD 様活性部分を差

表 1 sensitivities of SOD and BSA on various SOD assay methods

assay method	reaction				ID ₅₀		ratio BSA SOD	relative sensitivity to SOD
	pH	°C	min	nm	SOD μg/ml	BSA mg/ml		
cytochrome c	7.4	25	1/2	550	0.51	9	17,647	(1)
LDH+NADH	6.5	37	10	340	0.20	7	35,000	2.55
PMS+NBT	7.8	25	1/2	560	0.73	1	1,370	0.70
pyrogallol+NBT	8.2	37	5	540	0.55	0.6	1,091	0.93
epinephrine	10.2	27	3	480	0.22	1 ^a	4,545	2.32
chemiluminescence	7.8	25	1	—	0.05	— ^b	—	9.80
Nitrite (Elstner, et al.)	7.8	25	20	530	0.12	8.5	70,833	4.25
Nitrite (our kit) this report	8.2	37	30	550	0.06	11	183,333	8.50

* Research Laboratories of Fujisawa Pharmaceutical Co. 藤沢薬品(株)中央研究所

図2 correction of plasma effect on SOD assay

図3 correlation between inhibition (1/30 serum dilution) and SOD unit

し引くこととした。図2の正常人血漿の例では終濃度22倍としたとき、 O_2 産生が50%阻害となり、22NU (Nitrite unit)/ml の総 SOD を含んでいることとなる。1 mM KCN を加えて Cu, Zn-SOD 活性を抑えると、阻害率はこの濃度で22%となり、計算より 9.7NU/ml Mn-SOD と 12.3NU/ml Cu, Zn-SOD よりなっているとわかる。赤血球はクロロホルムエタノール処理をしてヘモグロビン除去しなければならないが、活性は高いので測定は容易である。5人のDown病患者赤血球ではすべて正常人の場合より約50%活性が高かった。従来、当疾患の診断はリンパ球などの顕微鏡写真で注意深く21番の染色体異常を調べて行われていたが、SOD 活性キットによると約2時間で判定が可能となる。当キットのい

図4 correlation between inhibition (1/3,000 erythrocyte lysate dilution) and SOD unit

ま1つの特徴は、ヒト血漿で特濃度1/30、赤血球では終濃度1/3,000の1希釈点のみの O_2 阻害率を知れば、図3と4で求めた実験式で直接 SOD 活性単位が NU でも CU (チトクローム c 法単位) が得られる点である。この式にはすでに蛋白障害の補正が加味されている。SOD の1単位は O_2 産生を50%阻害する量と規定されているので、必ず2点以上の希釈点での阻害率を知り、グラフ上よりの読み取りが必要であったことを考えると当キットは臨床検査には優れたものとなっている。

再現性は CV 値で2.2%以下とよく、添加回収実験ではつねに95%以上であった。血液試料は血漿と赤血球を分離して $0\sim 4^{\circ}C$ に保有すれば最低8日間は大丈夫である。血液必要量は約1.5 ml、赤血球のみ対象なら 0.1 ml 以下でよい。カタラーゼの ID_{50} は $50\mu g/ml$ 、アスコルビン酸で $10^{-4}M$ 、尿酸で $10^{-4}M$ 、還元型グルタチオンで $2\times 10^{-3}M$ 、D-glucose で $5\times 10^{-3}M$ と、いずれも SOD 活性測定を左右することはない。尿中ビリルビンは阻害を示すが、SOD 含量の低いこともあり、目下尿中 SOD の定量はできない。しかし、ラット肝ミトコンドリアと上澄みでは Cu, Zn-SOD と Mn-SOD の分別測定が可能であったので、動物実験にも本キットは適用可能である。

文献などについては、大柳善彦：炎症 4(1)：63-73, 1984, をみられたい。