VX-2 癌上顎洞内移植家兎の組織における Superoxide dismutase アイソエンザイムの存在様式に関する研究

九州歯科大学大学院歯学研究科口腔外科学第2専攻(指導:梶山 稔教授)

九州歯科大学学生化学講座(指導:野口知雄教授)

岡 部 多加志

昭和56年1月26日受付

本研究の要旨は昭和56年1月21日九州歯科学会1月例会において発表した。

Studies on Distribution Profiles of Superoxide Dismutase Isoenzymes in Tissues of Rabbits Bearing VX-2 Carcinoma in the Maxillary Sinus

Takashi Okabe

Second Department of Oral Surgery (Director: Prof. Minoru Kajiyama)

Department of Biochemistry (Director: Prof. Tomoo Noguchi)

Distribution profiles of superoxide dismutase (SOD) isoenzymes in various tissues of domestic rabbits with VX-2 carcinoma in the maxillary sinus were compared with those of control rabbits.

1. Cu,Zn-SOD and Mn-SOD activities were highest in the liver and lowest in the submaxillary gland of tissues from control rabbits.

2. Cu,Zn-SOD activity in the liver of rabbits decreased significantly 3 weeks after the transplantation of VX-2 carcinoma in the maxillary sinus. Mn-SOD activity did not decrease significantly until 5 weeks after the transplantation.

3. In the VX-2 carcinoma Mn-SOD activity was not detected and Cu,Zn-SOD activity decreased remarkably compared with other tissues.

These results suggest that VX-2 carcinoma lost most of the ability to defend against oxygen toxicity and this ability weakened only in the liver among tissues of rabbits bearing VX-2 carcinoma in the maxillary sinus.

結 言

生物は酸素毒性(活性酸素による生体成分の非特異的酸化)に対して、防御機構を備えている。基底状態の酸素分子($^3\text{O}_2$)は電子配置から三重項状態であり、一般

に反応性は低く、細胞成分の非特異的酸化は $^3\text{O}_2$ の還元分子種(スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、ヒドロキシラジカル)によることが多い¹⁾。細胞内に産生したこれらの活性酸素は、Superoxide dismutase (Superoxide oxidoreductase, EC 1.15.1.1.), Cata-

lase (Hydrogen-peroxide : hydrogen-peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.6.), Peroxidase (Donor : hydrogen-peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7.) などにより反応性の低い $^3\text{O}_2$, H_2O に変化する²⁾. 活性酸素の1つであるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) は反応性が非常に高く, 酸素毒性の最も重要な分子種として注目されており, この O_2^- の不均化反応を触媒する Superoxide dismutase (以後 SOD と略す) は, 1969年, McCord and Fridovich³⁾ により赤血球中に発見された金属酵素である.

この反応で生成する H_2O_2 は Catalase により直ちに反応性の低い $^3\text{O}_2$ と H_2O に変化する.

SOD は生物界に広く分布しており, 哺乳動物の各組織には2種のアイソエンザイムが存在する. 1つは Cu および Zn を含む Cu,Zn-SOD であり, もう1つは Mn のみを含む Mn-SOD である. 前者は細胞礎質 (Cytosol) とミトコンドリアの Intermembrane space に分布しており, 後者はミトコンドリアの Matrix に局在する⁴⁾.

この SOD の活性分布およびアイソエンザイムパターンは多くの動物種の各組織を用いてかなり詳細に調べられているが⁵⁻⁷⁾, 口腔領域の各組織に関する報告はない.

他方, 1975年, Dionisi ら⁸⁾, 1978年, Oberley ら⁹⁾ によって, 肝癌, 腹水癌において, Cu,Zn-SOD が著しく低下していること, また, Mn-SOD が欠損あるいは著明に低下していることが報告されて以来, 悪性腫瘍細胞における SOD アイソエンザイムの存在様式が脚光をあびるに至った. その後, その他の悪性腫瘍細胞においても, 同様な SOD 活性の低下とアイソエンザイムパターンが報告されている¹⁰⁾. しかし, 口腔領域に多発する扁平上皮癌に関する報告はない. また, 上顎洞癌は臨床的には早期診断が困難であるため, 今後の病態生化学的研究に期待が持たれる.

以上のような背景から, 著者は扁平上皮癌と類似した組織像を示す VX-2 癌¹¹⁾ を家兎上顎洞内に移植し実験上顎洞癌を作成し, 主要臓器ならびに口腔領域組織における SOD の活性分布および存在様式について正常家兎のそれと比較検討した.

実験材料と方法

I 実験動物

体重 2.0—2.5 kg の日本白色種家兎を購入後, 恒温調

節下の動物舎で固型飼料 (ORIENTAL RC-5) と水を充分に与え, 環境に順応させた後, 実験に供した.

II 実験腫瘍

実験腫瘍には当教室で家兎大腿部に累代移植を行なっている VX-2 癌を用いた. 本腫瘍の細胞浮遊液を安藤 (1971)¹²⁾ の方法で調製し, 杉村ら (1973)¹³⁾ の方法に従い, 家兎上顎洞内に 0.5ml を注入移植した.

III 実験試薬

Xanthine, Nitro blue tetrazorium, および O-Dianisidine は半井化学製, Xanthine oxidase は Sigma 社製, Riboflavin は東京化成工業製を使用した. その他の試薬は市販の特級を用いた.

IV 試料調製

VX-2 癌移植後2週目から5週目までの各週ごとに家兎を屠殺, 脱血し, 直ちに各組織 (大脳, 肺臓, 心臓, 肝臓, 胃, 小腸, 腎臓, 脾臓, 上顎洞ならびに鼻腔粘膜, 歯肉ならびに口蓋粘膜, 舌, 顎下腺, 咬筋, VX-2 癌組織) を摘出した. 各組織は直ちに 0 °C の 5 mM リン酸カリ緩衝液 (pH 7.5) で充分に洗浄した後, ろ紙で軽くふきとり, 湿重量を測定した. ついで5倍量の 5 mM リン酸カリ緩衝液 (pH 7.5) を加え, ハサミで細片し, 氷冷下でワーリングブレンダーを用いてホモジナイズした. つづいてホモジネイトを 10 kHz で30秒, 超音波処理したのち, 4 °C, 12000 × g で50分間遠心し, その上清を酵素標品とした.

V SOD の活性測定法

A. 全SOD (Cu,Zn-SOD + Mn-SOD) 活性の測定法
Beauchamp and Fridovich (1971)¹⁴⁾ の方法に従い, Xanthine-xanthine oxidase 系で発生する O_2^- による NBT (Nitro blue tetrazorium) の還元阻害率から全SOD 活性を測定した. すなわち, 0.1 mM Xanthine, 0.025 mM NBT, 0.1 mM Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) および 0.05 M 炭酸ソーダー緩衝液 (pH 10.2) から成る反応液に, 25 °C で 560 nm での1分間あたり吸光度を 0.0165 だけ増加させる量の Xanthine oxidase を加えた. この O_2^- 産成系に酵素標品を添加し, 吸光度の増加を 50% 阻害する酵素量を 1 unit と定義した.

B. Cu,Zn-SOD および Mn-SOD の活性測定法

Cu,Zn-SOD 活性は酵素標品をクロロフォルム-エタノール処理後に測定した (Mn-SOD はクロロフォルム-エタノール処理により特異的に失活する⁴⁾). Mn-SOD 活性は 8 mM⁹⁾ の KCN の存在下で測定した (Cu,Zn-SOD は CN^- の存在下で特異的に失活す

る⁴⁾).

VI SOD アイソエンザイムのディスク電気泳動による分離

Davis (1964)¹⁵⁾の方法に従い、10% ポリアクリルアミドゲルを調製した。泳動はトリス-グリシン緩衝液 (pH 8.9) を用い、4°C で約2時間、1 カラムあたり 4 mA で行なった。泳動後、Misra and Fridovich (1978)¹⁶⁾の方法に従い SOD の活性染色を行なった。本法はリボフラビン-光照射系で発生する O_2^- による Dianisidine (橙色) の還元 (脱色) の SOD による阻害を原理とする。すなわち、ゲルを 2 mM O-Dianisidine, 0.1 mM Riboflavin, 50 mM リン酸カリ緩衝液 (pH 7.2) に約1時間、暗所で浸し、よく洗った後、15W の蛍光灯を約15分間照射した。Cu, Zn-SOD, Mn-SOD の鑑別は下記の方法で行なった。泳動緩衝液中に 2 mM KCN を入れ泳動させ、消失した活性バンドを Cu, Zn-SOD とした¹⁴⁾。また、クロロフォルム-エタノール処理した酵素標品を用いて泳動し、消失した活性バンドを Mn-SOD とした¹⁴⁾。

VII 蛋白量測定法

Lowry ら (1951)¹⁷⁾の方法に従った。標準蛋白として牛血清アルブミンを用いた。

VIII 予備実験

A. 組織学的観察

VX-2 癌移植後2週目には腫瘍細胞は鼻涙管上方の洞粘膜内にて増殖し、洞内側壁粘膜上皮下の軟組織中を浸潤していた。しかし、洞壁骨組織の破壊はみられず、洞外への腫瘍細胞の浸潤は認められなかった (Fig. 1)。

Fig. 1 Histopathological view of the frontal section of VX-2 bearing rabbit (14 days after VX-2 transplantation in the maxillary sinus).

VX-2 癌移植後3週目には、腫瘍はさらに増大し、上顎洞下半部をほぼ満し、同部の内側骨壁の破壊がみられ、洞外側骨壁の骨梁間骨髓を浸潤し、上顎洞外にて増殖が認められた (Fig. 2)。

Fig. 2 Histopathological view of the frontal section of VX-2 bearing rabbit (21 days after VX-2 transplantation).

XV-2 癌移植後5週目には、腫瘍細胞は上顎洞を充滿し、洞外側骨壁はほとんど破壊され、上顎洞外で広範囲に増殖してみられた (Fig. 3)。

Fig. 3 Histopathological view of the frontal section of VX-2 bearing rabbit 35 days after VX-2 transplantation).

B. VX-2 癌移植家兎の血漿蛋白成分

VX-2 癌移植後1週、2週、3週、4週、および5週目の家兎血漿の蛋白電気泳動を浅川ら (1977)¹⁸⁾の方法により行なった。同時にα-グロブリン分画に属す

Table 1 Changes of rabbit plasma protein after VX-2 carcinoma transplantation

	0	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks
Total protein (g/dl)	5.1±0.9	5.6±0.7	5.1±1.2	5.3±0.8	5.3±0.6	5.6±0.8
Albumin (%)	67.5±6.2	65.9±7.2	59.4±7.1	49.2±8.8	44.8±8.2	42.2±7.5
α-globulin (%)	6.4±1.8	6.4±1.3	8.5±2.8	11.8±3.9	13.0±3.8	13.0±2.7
β-globulin (%)	11.5±2.4	11.2±2.2	15.2±2.7	17.5±3.7	20.6±4.6	21.7±4.2
Fibrinogen (%)	8.9±2.6	10.2±3.8	13.2±4.4	16.5±5.3	16.1±5.2	16.7±5.0
γ-globulin (%)	4.0±1.3	4.0±1.7	4.9±2.3	4.9±1.8	5.3±3.1	5.0±3.3
Haptoglobin (mg/dl)	23.7±10.8	24.9±12.3	59.0±27.5	72.9±24.2	76.9±35.4	62.8±27.3
Ceruloplasmin (U/l)	44.7±21.1	66.1±33.2	158.7±92.3	219.0±94.7	230.5±97.6	275.5±110.2

Values shown are Mean ± SD of 20 rabbits.

る Acute phase reactants のうち, Elson (1974)¹⁹⁾ の方法によりハプトグロビンを, Schosinsky (1974)²⁰⁾ の方法によりセルロプラスミンを測定した (Table 1). その結果, アルブミン分画が減少し, α-グロブリン分画, β-グロブリン分画, およびフィブリノーゲン分画が増加した. また, 血漿中のハプトグロビンおよびセルロプラスミンは著しく増加した. 以上は実験腫瘍を有する動物にみられる典型的な血漿蛋白像である^{21), 22)}.

IX 測定値の有意性の検定

正常家兎と担癌家兎の測定値の検討に際しては, F-検定で分散を吟味し, t-検定を行ない, 有意水準 5% で差の有意性を検討した. なお図表中, *印は P=0.05 の有意水準を示す.

実 験 成 績

I 正常および VX-2 担癌家兎の SOD 活性

正常および VX-2 癌移植後 5 週目の家兎の各組織の抽出液を用いて, 全 SOD (Cu,Zn-SOD+Mn-SOD), Cu,Zn-SOD および Mn-SOD 活性を測定した.

A. 全 SOD (Cu,Zn-SOD+Mn-SOD) 活性

正常家兎の各組織のうち, 肝臓が最も高い活性を示した. 口腔領域組織 (咬筋, 舌, 顎下腺, 歯肉ならびに口蓋粘膜, 上顎洞ならびに鼻腔粘膜) のうち顎下腺が特に低い全 SOD 活性を示し, 他の口腔領域組織はいずれも類似した活性を示した. 担癌家兎の肝臓では, 全 SOD 活性が著しく低下していた. しかし, 他の組織では正常および担癌家兎の各組織間に有意差はなかった.

VX-2 癌は全組織中, 最も低い全 SOD 活性を示した (Table 2) (Fig. 4).

B. Cu,Zn-SOD 活性

Cu,Zn-SOD 活性の場合も正常家兎の全組織中, 肝

Table 2 Organ distribution of Total-SOD in control and VX-2 bearing rabbits.

Tissue	Total-SOD (units/mg protein)	
	Control	VX-2 bearing
Liver	927.2±155.8	511.2±131.7*
Kidney	476.2±75.0	512.6±73.2
Heart	277.2±82.1	353.8±129.8
Spleen	172.8±41.0	168.9±46.2
Lung	165.6±35.6	168.9±46.2
Stomach	153.3±50.8	147.6±42.2
Small intestine	196.4±32.5	218.1±22.2
Masseter	192.1±34.0	201.1±41.3
Submaxillary gland	66.8±15.8	48.9±13.1
Tongue	254.6±72.0	205.4±26.0
Gingiva	147.2±37.5	164.3±68.1
Sinus & nasal mucous membrane	202.5±48.2	
Brain	165.8±27.4	191.0±36.2
VX-2 carcinoma		20.8±4.8

Values shown are Mean±SD of 7 rabbits.

臓が最も高い値を示した. 口腔領域組織のうち, 顎下腺が最も低い活性を示し, 他の口腔領域組織はいずれもほぼ同様な活性を示した. 担癌家兎の肝臓では, Cu,Zn-SOD活性が著しく低下していたが, 他の組織では正常および担癌家兎の間に差は認められなかった.

VX-2 癌は全組織中, 最も低い Cu,Zn-SOD 活性を示した (Table 3) (Fig. 5).

C. Mn-SOD 活性

Mn-SOD は正常家兎では肝臓が最も高い活性を示し

Fig. 4 Organ distribution of Total-SOD in control and VX-2 bearing rabbits.
 1. Liver, 2. Kidney, 3. Heart, 4. Spleen, 5. Lung, 6. Stomach, 7. Small intestine,
 8. Masseter, 9. Submaxillary gland, 10. Tongue, 11. Gingiva and palatal mucous
 membrane, 12. Sinus and nasal mucous membrane, 13. Brain, 14. VX-2 carcinoma.

Fig. 5 Organ distribution of Cu,Zn-SOD in control and VX-2 bearing rabbits. Legends same as Fig.4.

た。口腔領域組織のうち、Mn-SOD 活性も顎下腺が特に低い値を示し、他の口腔領域組織ではよく似た値を示した。担瘤家兎では腎臓が最も高い活性を示した。VX-2 癌組織には Mn-SOD 活性は検出されなかった

(Table 4) (Fig. 6)。

D. Cu,Zn-SOD と Mn-SOD の割合

全 SOD 活性に対する Cu,Zn-SOD 活性の割合では、VX-2 癌が約100%と最も高く、次に担瘤家兎の肺

Table 3 Organ distribution of Cu,Zn-SOD in control and VX-2 bearing rabbits.

Tissue	Cu,Zn-SOD (units/mg protein)	
	Control	VX-2 bearing
Liver	657.5±81.9	383.6±103.4*
Kidney	313.0±49.9	272.4±114.4
Heart	180.5±85.5	219.4±78.4
Spleen	141.4±36.0	126.6±25.5
Lung	131.4±33.2	140.9±36.8
Stomach	104.9±39.4	99.2±22.9
Small intestine	137.9±19.9	141.8±21.0
Masseter	121.6±18.6	137.8±41.7
Submaxillary gland	40.8±15.6	32.5±5.9
Tongue	153.6±47.7	134.8±17.9
Gingiva	119.9±39.8	125.9±53.3
Sinus & nasal mucous membrane	137.0±43.0	
Brain	107.7±25.8	134.0±23.8
VX-2 carcinoma		20.5±4.3

Values shown are Mean±SD of 7 rabbits.

Table 4 Organ distribution of Mn-SOD in control and VX-2 bearing rabbits.

Tissue	Mn-SOD (units/mg protein)	
	Control	VX-2 bearing
Liver	185.0±86.7	103.4±60.1
Kidney	162.6±42.6	187.1±45.1
Heart	83.6±39.9	134.7±48.6
Spleen	20.5±6.7	15.1±4.4
Lung	26.1±1.7	22.6±4.9
Stomach	56.7±31.3	51.0±28.3
Small intestine	53.4±12.6	75.9±12.6
Masseter	81.0±20.2	69.2±16.9
Submaxillary gland	22.3±6.7	18.1±4.5
Tongue	108.1±29.2	79.3±17.1
Gingiva	43.7±18.3	43.2±12.8
Sinus & nasal mucous membrane	61.7±13.8	
Brain	53.8±11.8	55.1±24.5
VX-2 carcinoma		0

Values shown are Mean±SD of 7 rabbits.

Fig. 6 Organ distribution of Mn-SOD in control and VX-2 bearing rabbits. Legends same as Fig. 4.

臓が約85%, 担癌家兎の脾臓が約84%と高い値を示した (Table 5) (Fig. 7).

全 SOD 活性に対する Mn-SOD 活性の割合では,

VX-2 癌が 0%であり, 担癌家兎と正常家兎の脾臓がそれぞれ約10%, 約12%と低い値を示した (Table 6) (Fig. 8).

Table 5 The activity ratio of Cu,Zn-SOD to Total-SOD in tissues from control and VX-2 bearing rabbits.

Tissue	Ratio of Cu,Zn-SOD to Total-SOD	
	Control %	VX-2 bearing %
Liver	71.3±5.1	75.8±10.0
Kidney	66.0±6.5	59.0±9.3
Heart	70.8±7.3	62.7±7.6
Spleen	81.7±6.7	83.3±8.5
Lung	78.5±5.0	84.6±3.3
Stomach	67.4±7.3	69.4±10.8
Small intestine	70.2±3.2	65.0±7.6
Masseter	65.8±8.8	67.4±12.5
Submaxillary gland	59.0±10.2	68.9±15.3
Tongue	60.0±6.2	64.3±8.4
Gingiva	74.0±12.1	75.8±6.6
Sinus & nasal mucous membrane	66.4±5.8	
Brain	69.0±12.5	71.6±13.1
VX-2 carcinoma		99.5±11.8

Values shown are Mean±SD of 7 rabbits.

Fig. 7 The activity ratio of Cu,Zn-SOD to Total-SOD in tissues from control and VX-2 bearing rabbits.

1. Liver, 2. Kidney, 3. Heart, 4. Spleen, 5. Lung, 6. Stomach, 7. Small intestine, 8. Masseter, 9. Submaxillary gland, 10. Tongue, 11. Gingiva and palatal mucous membrane, 12. Sinus and nasal mucous membrane, 13. Brain, 14. VX-2 carcinoma.

Table 6 The activity ratio of Mn-SOD to Total-SOD in tissues from control and VX-2 bearing rabbits.

Tissue	Ratio of Mn-SOD to Total-SOD	
	Control %	VX-2 bearing %
Liver	19.3±7.6	17.3±7.0
Kidney	34.7±9.4	36.3±7.2
Heart	31.0±14.3	39.8±9.9
Spleen	12.0±4.5	9.7±2.4
Lung	15.9±2.8	13.9±4.5
Stomach	34.5±11.0	32.6±12.7
Small intestine	26.7±3.5	33.6±5.4
Masseter	41.9±5.6	35.3±11.0
Submaxillary gland	33.2±8.7	37.1±7.7
Tongue	43.1±7.9	38.3±5.8
Gingiva	31.6±15.2	30.3±14.0
Sinus & nasal mucous membrane	32.4±11.2	
Brain	32.8±8.3	27.4±9.2
VX-2 carcinoma		0

Values shown are Mean±SD of 7 rabbits.

Fig. 8 The activity ratio of Mn-SOD to Total-SOD in tissues from control and VX-2 bearing rabbits. Legends same as Fig. 7.

II VX-2 担癌家兔肝臓の SOD 活性の変動

VX-2 癌移植後, 2 週, 3 週, 4 週, および 5 週目の家兔の肝臓 SOD 活性の変動を調べた. 全 SOD (Cu, Zn-SOD+Mn-SOD) 活性は, VX-2 癌移植後 2 週目までは変わらず, 3 週目には有意に低下した. 4 週目にはさらに著明に低下した.

Cu,Zn-SOD は全 SOD と類似した活性変動を示し

た. これに対し, Mn-SOD 活性は癌移植後 5 週目までは有意に変化しなかった (Table 7) (Fig. 9).

Ⅲ ディスク電気泳動による SOD アイソエンザイムの分離

VX-2 担癌家兔において VX-2 癌以外の組織では, いずれも 3 種の活性バンドが検出された (Fig. 10). このうち易動度の最も低いバンドは, 組織抽出液をクロロフォルム-エタノール処理することにより消失した (Fig. 11). また, 易動度の高い 2 種のバンドは泳動緩衝液中に 2 mM KCN を加えることにより消失した

(Fig. 12). このことから, VX-2 癌以外の組織には Cu,Zn-SOD が 2 種と, Mn-SOD が 1 種の合計 3 種のアイソエンザイムが存在することが明らかになった. また, VX-2 癌組織では易動度が Cu,Zn-SOD に相当する 2 種の活性バンドが検出され, Mn-SOD に相当する活性バンドは検出されなかった. 両活性バンドはクロロフォルム-エタノール処理により消失せず, KCN 処理により完全に消失した.

以上の結果は VX-2 癌組織には Mn-SOD が欠損しており, Cu,Zn-SOD のみが存在していることを示し

Table 7 Changes in hepatic SOD activity after VX-2 carcinoma transplantation.

	Control	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks
Total-SOD	927.2±155.8 (7)	850.1±150.0 (3)	620.8±115.0* (3)	400.3±115.1 (3)	400.2±100.0 (3)
Cu,Zn-SOD	657.5± 81.9 (7)	516.2± 81.6 (3)	405.1± 44.5* (3)	320.2± 56.3 (3)	269.8± 31.0 (3)
Mn-SOD	185.0± 86.7 (7)	143.3± 17.8 (3)	149.8± 11.0 (3)	98.2± 20.5 (3)	78.5± 20.2 (3)

Values shown are Mean±SD.

Numbers of parenthesis indicate numbers of rabbits.

Fig. 9 Changes in hepatic SOD activity after VX-2 carcinoma transplantation.

Fig. 10 Polyacrylamide gel disc electrophoresis of crude extracts from various tissues of VX-2 bearing rabbits.

1. Liver, 2. Kidney, 3. Heart, 4. Masseter, 5. Tongue, 6. VX-2 carcinoma, 7. Gingiva and palatal mucous membrane, 8. Submaxillary gland, 9. Sinus and nasal mucous membrane, 10. Brain.

All tissues extracts except VX-2 carcinoma contain two forms of Cu,Zn-SOD and one form of Mn-SOD; VX-2 carcinoma contains two forms of Cu,Zn-SOD but not Mn-SOD.

ている。

Fig.11 Polyacrylamide gel disc electrophoresis of ethanol-chloroform treated crude extracts from various tissues of VX-2 bearing rabbit. All crude extracts were treated by ethanol-chloroform mixture before the electrophoresis. The slower migrated SOD (Mn-SOD) disappeared. Legends same as Fig. 10.

Fig.12 Polyacrylamide gel disc electrophoresis of crude extracts from various tissues of VX-2 bearing rabbit in the presence of KCN. Developing reactants included 2 mM KCN; two faster migrated SOD (Cu,Zn-SOD) disappeared. VX-2 carcinoma (No.6) does not contain Mn-SOD. Legends same as Fig. 10.

考 察

我々は効率のよいチトクローム系による酸素呼吸を行なうことによって、活性酸素を遊離することなく、酸素($^3\text{O}_2$)を反応性の低い H_2O にまで還元している¹⁾。ところが細胞内のある種の酸化酵素、可視光線、紫外

線、放射線、細胞成分の自動酸化等により細胞内に活性酸素が生じ、これが生体成分を無差別に酸化し、酸素毒性を示す²⁾。しかし、我々はこの酸素毒性に対する防御機能を備えている。1969年、McCord and Fridovich³⁾により、牛の赤血球中の O_2^- の不均化反応を触媒する SOD が発見されて以来、この酵素は酸素毒性から生体を保護するための重要な因子の1つとして広く注目され、今日まで多くの動物種を用いて SOD アイソエンザイムの組織および細胞内分布がかなり詳細に報告されている⁴⁻⁷⁾。

高等動物では一般に2種類の SOD が存在している。1つは Cu,Zn-SOD であり、細胞液質 (Cytosol) とミトコンドリアの Intermembrane space に分布する。もう1つは Mn-SOD であり、ミトコンドリアの Matrix に局在している¹⁰⁾。

SOD 活性はヒトの組織では脳、肝臓、腎臓、心筋において高く²³⁾、ラットでは肝臓、腎臓、赤血球、精巢、心臓、脳、肺臓、筋肉の順に高活性を示す²⁴⁾ ことが報告されている。

Yoshioka ら (1977)²⁵⁾ はラットの肝臓の SOD 活性が胎生児期、新生児期、成熟期につれて上昇することを出生後の生体の耐酸素毒性機能の獲得という立場から報告している。

Bougle ら (1980)²⁶⁾ は猫を用いて Retina と Retrorenal fibroplasia の SOD 活性を比較し、未熟児の高濃度酸素療法による網膜症が SOD 活性が低いために生じる酸素毒性が原因であろうと示唆している。

著者は家兎各組織の SOD 活性を測定し、Cu,Zn-SOD では肝臓、腎臓、心臓、舌、脾臓、上顎洞ならびに鼻腔粘膜の順に高活性を示し、Mn-SOD では肝臓、腎臓、舌、心臓、咬筋、上顎洞ならびに鼻腔粘膜の順に高活性を示すことを認めた。また、全 SOD では肝臓、腎臓、心臓、舌、上顎洞ならびに鼻腔粘膜、小腸、咬筋の順に高活性を示した。すなわち、上記の分布は口腔領域組織以外では Paynter ら (1979)²⁴⁾ によって報告されたラットの臓器分布と類似していたが、口腔領域組織における SOD 活性分布に関してはこれまで全く報告されていなかった。著者は家兎の咬筋、舌、顎下腺、歯肉ならびに口蓋粘膜、上顎洞ならびに鼻腔粘膜の SOD 活性を測定した結果、全 SOD, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD とともに口腔領域組織では顎下腺が最も低い活性を示した。次に、正常と VX-2 担癌家兎の各組織を比較すると、担癌家兎の肝臓において全 SOD および Cu,Zn-SOD 活性が著しく低下していた。動物肝臓の SOD

活性が加齢⁵⁾, SOD の含有する金属の欠乏食投与^{24), 27)}等により, 著しく変動することが多数報告されているのに対し, 担癌動物の肝臓 SOD 活性の変動については Dinescu-Romalo and Mihai (1979)²⁸⁾ の Guerin T. 腹水癌ラットの肝臓に関する報告のみである。彼等は担癌と正常ラット肝臓の SOD 活性の変動を認めていない。従って, 担癌家兎における肝 SOD (全 SOD と Cu,Zn-SOD) 活性の低下は著者によって初めて明らかにされたものである。

細胞内に生じた O_2^- は先に述べた様に, SOD の触媒により過酸化水素に変化し, 過酸化水素は直ちに Catalase により H_2O と反応性の低い 3O_2 にまで分解される^{1), 2)}。すなわち, 好気性生物では SOD と Catalase による二重の酸素毒性に対する防御機構が成立している。担癌動物の Catalase に関しては, すでに Kampschmidt (1965)²⁹⁾, Nakahara ら (1966)³⁰⁾, Kaplan and Grovers (1972)³¹⁾ によって報告されたように, いずれも担癌生体の肝臓では Catalase 活性が著しく低下している。著者は VX-2 担癌家兎の肝臓において, SOD 活性のみならず Catalase 活性も著明に低下することを認めている (未発表)。このことから, VX-2 担癌家兎肝臓では上記の SOD と Catalase による二重の酸素毒性に対する防御機能が低下しているものと考えられる。

正常家兎の各組織での全 SOD 活性に対する Mn-SOD 活性の割合を調べたところ, 脾臓と肺臓とでは約 10% が Mn-SOD であり, 全組織中, 最も小さい。また, 肝臓では Mn-SOD が約 20% であり, 脾臓および肺臓以外の組織とくらべて, 比較的, Mn-SOD の占める割合が小さい。Derosa (1979)³²⁾ はラットの肺臓では著しく Mn-SOD が少ないことを報告し, その原因として血液混在を挙げている。

悪性腫瘍組織における SOD 活性とアイソエンザイムパターンに関する報告は多い^{8-10, 28, 33-37)}。これらの報告によると, 一般に悪性腫瘍細胞において, Cu, Zn-SOD 活性が著しく低下しており, Mn-SOD 活性は欠損あるいは著しく低下している。これまで, 口腔領域に多く出現する扁平上皮癌の SOD に関する報告はない。著者は扁平上皮癌によく類似した組織像を示す VX-2 癌¹¹⁾ を用い, これを家兎の上顎洞内に移植し実験上顎洞癌を作成し, 各組織における SOD 活性分布とアイソエンザイムパターンについて, 正常家兎と比較

した。その結果, 正常, 担癌家兎のいずれにおいても VX-2 癌以外の組織にはすべて Cu,Zn-SOD と Mn-SOD の両者が存在するのにに対し, VX-2 癌組織中には Cu,Zn-SOD のみが存在し, Mn-SOD は全く検出されなかった。また, VX-2 癌組織の Cu,Zn-SOD は他の諸組織と比較して著しい低活性を示した。これらの結果から, VX-2 癌は Mn-SOD を含まず, わずかに Cu,Zn-SOD を含み, O_2^- 消去機能 (酸素毒性に対する防御機能) をほとんど失った移植性固形癌であると推察される。

結 論

VX-2 癌を家兎の上顎洞内に移植し, 実験上顎洞癌を作成し, 各組織における Superoxide dismutase の活性分布および存在様式を正常家兎と比較し, 以下の知見を得た。

1. Cu,Zn-SOD および Mn-SOD 活性は正常家兎の組織のうち, 肝臓が最も高い値を示した。また, 両アイソエンザイムは口腔領域組織の中で, 顎下腺が最も低い活性を示した。
2. 全 SOD および Cu,Zn-SOD 活性は VX-2 癌移植後 3 週目の家兎の組織のうち, 肝臓のみで有意に低下していたが, Mn-SOD 活性は VX-2 癌移植後 5 週目まで有意に低下しなかった。
3. VX-2 癌組織では, Mn-SOD は欠損していた。また, Cu,Zn-SOD 活性は各組織の中で, 最も低い値を示した。

以上の結果から, VX-2 癌は酸素毒性に対する防御機能をほとんど失っていること, また VX-2 癌の上顎洞内移植家兎の組織の中で, 肝臓のみがこの防御機能をかなり失っていることが示唆された。

稿を終るに臨み, 本研究に終始御懇切なる御指導, 御校閲を賜った恩師, 梶山 稔教授, 本学生化学講座, 野口知雄教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また, 日夜をいとわず種々御懇篤なる御教示と御鞭撻を戴きました高田義一助手に満腔の謝意を表します。

あわせて, 種々の御協力を戴きました第 2 口腔外科学講座ならびに生化学講座の諸先生方に感謝します。

なお, 本研究の一部は昭和 54 年度福岡県対がん協会助成金によった。

引用文献

- 1) 浅田浩二：活性酸素 生成の抑制と消去，蛋白質核酸酵素 23：200—213，1978.
- 2) 山倉文幸・鈴木皓司：スーパーオキシドディスムターゼの構造と機能 鉄酵素およびマンガン酵素を中心に，蛋白質核酸酵素 23：221—231，1978.
- 3) McCord, J.M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase ; an enzymic function for erythro-cuprein (hemocuprein), J. Biol. Chem. 244 : 6049—6055, 1969.
- 4) Weisiger, R. A. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase ; organelle specificity, J. Biol. Chem. 248 : 3582—3592, 1973.
- 5) Reiss, U. and Gershon, D. : Rat-liver superoxide dismutase ; purification and age-related modifications, Eur. J. Biochem. 63 : 617—623, 1976.
- 6) Mazeaud, F., Maral, J., *et al.* : Distribution of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the carp : erythrocyte manganese SOD, Biochem. Biophys. Res. Commun. 86 : 1161—1168, 1979.
- 7) Kobayashi, Y., Ishigame, K., *et al.* : Superoxide dismutase activity of human granulocytes and lymphocytes, Lancet 16 : 865—866, 1977.
- 8) Dionisi, O., Galeotti, T., *et al.* : Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues, Biochim. Biophys. Acta 403 : 292—300, 1975.
- 9) Oberley, L.W., Bize, I.B., *et al.* : Superoxide dismutase activity of normal murine liver, regenerating liver and H6 hepatoma, J. Natl. Cancer Inst. 61 : 375—379, 1978.
- 10) Oberley, L.W. and Buettner, G.R. : Role of superoxide dismutase in cancer, Cancer Res. 39 : 1141—1149, 1979.
- 11) Ito, Y., Kimura, I., *et al.* : Comparative studies on pathogenesis of two strains of transplantable carcinoma of rabbits, Vx2 and Vx7, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127 : 1106—1111, 1967.
- 12) 安藤龍男：上顎癌の増殖態度に関する実験的研究，九州歯会誌 25：183—203，1971.
- 13) 杉村正仁・椿本雅有・他：家兎 VX-2 Carcinoma 移植による上顎洞癌モデルについて，口科誌 22：380—393，1973.
- 14) Beauchamp, C. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase ; improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, Anal. Biochem. 44 : 276—287, 1971.
- 15) Davis, B. J. : Disc electrophoresis-II ; method and application to human serum proteins, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 : 404—427, 1964.
- 16) Misra, H.P. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase and peroxidase ; a positive activity stain applicable to polyacrylamide gel electrophorograms, Arch. Biochem. Biophys. 183 : 511—515, 1977.
- 17) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., *et al.* : Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193 : 265—275, 1951.
- 18) 浅川英男・佐野紀代子：臨床検査講座 別巻 電気泳動法，医歯薬出版，東京，1977，32—57.
- 19) Elson, E.C. : Quantitative determination of serum haptoglobin ; a simple and rapid method, Am. J. Clin. Pathol. 62 : 655—663, 1974.
- 20) Schosinsky, K. H., Lehmann, H. P., *et al.* : Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride, Clin. Chem. 20 : 1556—1563, 1974.

- 21) Voelkel, E.F., Levine, L. *et al.* : Acute phase reactants ceruloplasmin and haptoglobin and their relationship to plasma prostaglandins in rabbits bearing the VX₂ carcinoma, J. Exp. Med. 147 : 1078—1088, 1978.
- 22) Ungar-Waron, H., Gluckman, A., *et al.* : Ceruloplasmin as a marker of neoplastic activity in rabbits bearing the VX-2 carcinoma, Cancer Res. 38 : 1296—1299, 1978.
- 23) Sykes, J.A., McCormack, Jr., F.X., *et al.* : A preliminary study of the superoxide dismutase content of some human tumors, Cancer Res. 38 : 2759—2762, 1978.
- 24) Paynter, D.I., Moir, R.J., *et al.* : Changes in activity of the Cu-Zn superoxide dismutase enzyme in tissues of the rat with changes in dietary copper, J. Nutr. 109 : 1570—1576, 1979.
- 25) Yoshioka, T., Utsumi, K., *et al.* : Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation of the rat liver during development, Biol. Neonate. 32 : 147—153, 1977.
- 26) Bougle, D., Vert, P., *et al.* : Retrolental fibroplasia and retinal superoxide dismutase in kittens, Lancet 2 : 268, 1980.
- 27) Williams, D.M., Lynch, R.E., *et al.* : Superoxide dismutase activity in copper-deficient swine, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149 : 534—536, 1975.
- 28) Dinescu-Romalo, G. and Mihai, C. : Superoxide anion production and superoxide dismutase activity in several tissues from normal and Guerin T₈ ascites tumor-bearing rats, Cell. Mol. Biol. 25 : 101—106, 1979.
- 29) Kampschmidt, R.F. : Mechanism of liver catalase depression in tumor-bearing animals, Cancer Res. 25 : 34—44, 1965.
- 30) Nakahara, W., Hozumi, M., *et al.* : Isolation of toxohormone from tissues of germfree mice, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123 : 124—125, 1966.
- 31) Kaplan, J.H. and Groves, J.N. : Liver and blood cell catalase activity of tumor-bearing mice, Cancer Res. 32 : 1190—1194, 1972.
- 32) DeRosa, G., Duncan, D.S., *et al.* : Evaluation of negative staining technique for determination of CN⁻-insensitive superoxide dismutase activity, Biochim. Biophys. Acta 566 : 32—39, 1979.
- 33) Sahu, S.K., Oberley, L.W., *et al.* : Superoxide dismutase activity of Ehrlich ascites tumor cells, J. Natl. Cancer Inst. 58 : 1125—1127, 1977.
- 34) Peskin, A.V., Koen, Ya.M., *et al.* : Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumors, FEBS lett. 78 : 41—45, 1977.
- 35) Petkau, A., Monasterski, L.G., *et al.* : Modification of superoxide dismutase in rat mammary carcinoma, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 17 : 125—132, 1977.
- 36) Bize, I.B., Oberley, L.W., *et al.* : Superoxide dismutase and superoxide radical in Morris hepatomas, Cancer Res. 40 : 3686—3693, 1980.
- 37) Loven, D.P., Oberley, L.W., *et al.* : Superoxide dismutase activity in 1,2-Dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma, J. Natl. Cancer Inst. 65 : 377—381, 1980.