薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
107 (4) 287-293 (1987)

Adjuvant 関節炎における過酸化脂質の消長

湯田康勝,* 平野文也, 田中淳子

明治製菓薬品研究所

Formation of Lipid Peroxides in Adjuvant Arthritis

YASUKATSU YUDA,* FUMIYA HIRANO, and JUNKO TANAKA

Pharmaceutical Research Laboratories Meiji Seika Kaisha, Ltd.,
Morooka-cho, Kohoku-ku, Yokohama, 222, Japan

(Received October 14, 1986)

The peroxidation of lipids in rat liver and the activities of the related enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), were studied by means of adjuvant induced arthritis.

The injection of adjuvant into rats was found to be associated with a transient increase of lipid peroxidation in the liver. However, the level of lipid peroxides rapidly diminished.

This diminution of lipid peroxidation was shown to be neither related with the GSH-Px nor with the SOD activity.

The level of lipid peroxides in the liver was found to be not correlated with that in the serum.

The decrease of lipid peroxidation in the liver seemed to have some relations to the inflammatory process on adjuvant arthritis.

Principal component analysis of these parameters was carried out. It was suggested that the inflammatory process of adjuvant arthritis can be divided into three stages. Namely, the first stage (day 4-14) which represents an acute phase; the second stage (day 14-56) which represents a subacute phase, or so-called secondary lesions; and the third stage (day 56-70) which represents the chronic, or stationary phase of the inflammatory process.

Keywords—lipid peroxidation; inflammation; liver; superoxide dismutase; glutathione peroxidase; adjuvant arthritis; principal component analysis

炎症や自己免疫疾患などと脂質過酸化反応の関連についてはアラキドン酸カスケード中の過酸化脂質である PGG₂, PGH₂ あるいは lipoxygenase 産生物を中心とした研究¹⁾が進んでいる。また、炎症局所に遊走する多形核白血球や単球は炎症性の刺激により活性酸素や種々のフリーラジカルを放出して生体内不飽和脂肪酸を酸化し、過酸化脂質の炎症局所への蓄積を起こすと考えられている。慢性関節リウマチ患者の関節滑液中には過酸化脂質が高濃度に存在し、好中球の活性酸素産生能も顕著に上昇しているとの報告²⁾もある。また、動物実験において、活性酸素の消去剤である superoxide dismutase (SOD)³⁾や ceruloplasmin⁴⁾が抗炎症作用を示すとの報告もある。

これらの報告は炎症反応における O₂⁻の関与と過酸化脂質の関与を示唆しているように思われる。我々は従来から炎症反応における過酸化脂質の意義について検討してきた。このたび adjuvant 関節炎ラットを用いて、肝臓中の過酸化脂質と肝臓中及び血清中の過酸化脂質の生成並びに分解に関連する数種の酵素活性について検討し、興味のある結果を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 実験動物 日本チャールズリバー社より購入した Wistar Lewis 系雌性ラットを一定期間予備飼育後、8 から 9 週齢で使用した。

2. 試薬 *Mycobacterium butyricum* (Dif co.), thiobarbituric acid (TBA) (BDH), リンタングステン酸

(Merck), glutathione reductase (ベーリンガー・マンハイム山之内), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (興人), xanthine (Sigma), xanthine oxidase 溶液 (ベーリンガー・マンハイム山之内), *p*-phenylenediamine (東京化成), nitroblue tetrazolium NBT (東京化成). ほかの試薬はすべて特級品を使用した.

3. **Adjuvant 関節炎** 体重 150—160 g のラットの足蹠皮内に, エーテル麻酔下で流動パラフィンに懸濁溶解した *Mycobacterium butyricum* を 0.6 mg/0.1 ml 注射して起炎した. 起炎後, 経日的に adjuvant 注射足及び非注射足の足容積を測定し, 頸動脈より採血し, ついで肝臓を摘出した.

4. **過酸化脂質の定量** 頸動脈より採血した血液は常法により遠心分離し血清とした. 血清中の過酸化脂質量は八木らの TBA 法⁵⁾ に従い蛍光分光光度計を用いて定量した.

肝臓中の過酸化脂質量は, 摘出した肝臓を直ちに 1.15% KCl で灌流し血液を除去したのち, 10% ホモジネートを調製し, sodium dodecyl sulfate (SDS) を加えたのち Ohkawa らの方法⁶⁾ に準じて測定した.

5. **Ceruloplasmin の定量** Ceruloplasmin は Sunderman らの方法⁷⁾ に従い, *p*-phenylenediamine oxidase 活性を指標にして測定した.

6. **SOD 活性の測定** SOD 活性は Fridovich⁸⁾ らの開発した xanthine oxidase-NBT の系を利用した今成らの改良法⁹⁾ に従い, NBT の還元を指標にして測定した.

7. **Glutathione Peroxidase (GSH-Px) 活性の測定** GSH-Px の活性は H_2O_2 を基質とし, Lawrence らの方法¹⁰⁾ に準じて測定した.

8. **蛋白質量の定量** Lowry 法によって測定した.

結

果

1. Adjuvant 注射 4 日後より 21 日目までの変化

Adjuvant 注射 4 日目から 21 日目までの肝臓重量, 肝臓中の過酸化脂質量, 血清中の過酸化脂質量及び adjuvant 注射足並びに非注射足の足容積の変化についての相関係数を Table I に要約した.

肝臓中の過酸化脂質量の変化と血清中の過酸化脂質量との変化には若干の相関が認められたが, adjuvant 注射足及び非注射足の足容積の変化と過酸化脂質量の変化との間では相関が極めて低く, 関節炎の発症に対する肝臓及び血清中の過酸化脂質の関与は明瞭でなく, この間での過酸化脂質の炎症反応における関与は少ないように思われた. しかしながら, Table I の相関係数 (R) より炎症反応に対する寄与率 (R^2) を算出したところ肝臓中の過酸化脂質は 8.16% で血清中の過酸化脂質の 3.18% に比べて高い寄与率を示した. したがって以後の実験では肝臓中の過酸化脂質を主とし, adjuvant 注射 4 日目より 70 日目までの adjuvant 関節炎発症過程と過酸化脂質の生成及び分解に関する各種パラメータの変動について検討することとした.

2. Adjuvant 注射 4 日後より 70 日目までの変化

Adjuvant 注射 4 日目より 70 日目までの各パラメータの平均値及び標準偏差を Table II に, また, これらの相関関係を Table III に示した.

パラメータ間で比較的高い相関 (相関係数 0.7 以上) を示したのは肝臓中の SOD と GSH-Px で 0.762, adjuvant 注射足の足容積の変化と非注射足の足容積の変化で 0.883 及び非注射足の足容積の変化と血清中 GSH-Px で 0.779 と正の相関を示した. また, 肝臓中の SOD と血清中の ceruloplasmin は -0.815 , 肝臓中の過酸化脂質と血清中の GSH-Px は -0.750 及び肝臓中の過酸化脂質と非注射足の足容積の変化は -0.765 で負の相関を示した.

TABLE I. Correlation Coefficients between Several Parameters in Adjuvant Arthritis

	Liver weight	Liver LPO	Serum LPO	Treated foot	Non-treated foot
Liver weight	1				
Liver LPO	-0.283	1			
Serum LPO	0.176	0.473	1		
Treated Foot	0.745	-0.382	-0.003	1	
Non-treated Foot	0.814	-0.132	0.252	0.838	1

Calculated between acute phase (day 4) and subacute phase (day 21). The level of lipid peroxides in liver was found to be not correlated with that of serum. LPO, lipid peroxide.

TABLE II. Lipid Peroxides and Enzyme Activities in Adjuvant Arthritis

		Day										
		4	10	14	17	21	26	32	38	44	56	70
Swelling %	TF	151.8 ±20.6	146.6 ±29.6	316.6 ±20.3	329.3 ±26.5	376.9 ±27.0	355.9 ±63.8	351.6 ±48.6	321.5 ±34.8	303.4 ±36.5	251.6 ±57.7	222.9 ±60.4
	NTF	13.2 ±4.4	20.6 ±11.0	162.5 ±48.7	165.2 ±35.9	211.7 ±54.1	229.9 ±45.0	237.1 ±66.1	205.8 ±61.2	214.1 ±59.9	195.8 ±79.4	166.4 ±64.3
Serum												
GSH-Px (U/ml)		1.02 ±0.15	1.20 ±0.16	1.53 ±0.22	1.79 ±0.38	1.78 ±0.40	1.90 ±0.36	2.24 ±0.62	2.81 ±0.53	2.37 ±0.62	2.34 ±0.24	1.32 ±0.17
SOD (U/ml)		2.22 ±0.44	2.71 ±0.43	2.75 ±0.37	2.97 ±0.37	3.19 ±1.05	3.06 ±0.45	3.11 ±0.43	2.48 ±0.51	2.96 ±0.73	3.83 ±0.54	1.96 ±1.01
Ceruloplasmin (ug/ml)		16.6 ±0.96	14.4 ±1.72	16.1 ±1.47	13.9 ±1.35	14.5 ±1.10	15.8 ±1.70	14.7 ±2.97	12.8 ±2.24	13.6 ±1.79	13.3 ±2.50	12.7 ±1.30
Protein (mg/ml)		65.3 ±1.59	56.6 ±10.13	57.2 ±7.21	62.4 ±3.40	59.5 ±8.04	65.4 ±7.12	70.2 ±5.67	63.8 ±4.73	69.7 ±3.40	65.9 ±1.75	61.5 ±2.89
Liver												
LPO (nmol/gT.)		674.4 ±137.1	452.6 ±60.9	460.9 ±93.5	352.6 ±72.0	449.6 ±49.0	361.9 ±65.1	349.5 ±47.2	310.9 ±26.0	340.0 ±57.4	303.5 ±46.3	381.4 ±37.1
GSH-Px (U/ml)		6.22 ±0.50	5.61 ±0.60	2.58 ±0.89	2.51 ±0.59	1.27 ±0.39	2.71 ±1.81	4.76 ±2.47	2.61 ±0.89	6.20 ±2.90	9.32 ±1.00	7.52 ±0.44
SOD (U/ml)		896.3 ±142.0	815.6 ±244.6	696.1 ±155.9	639.5 ±144.5	805.7 ±103.0	826.2 ±200.3	896.3 ±293.4	1015.3 ±304.4	1036.4 ±285.5	1182.5 ±347.4	1179.4 ±146.2
Weight (g)		6.83 ±0.36	6.75 ±0.34	7.02 ±0.29	7.43 ±0.82	7.91 ±0.65	7.53 ±0.49	7.05 ±0.79	6.82 ±0.44	7.85 ±0.65	7.59 ±0.62	7.03 ±0.25

Values represent mean ± S.D. Control values were obtained from 8 weeks rat. TF: Treated foot. NTF: Non-treated foot.

TABLE III. Correlation Coefficients between Several Parameters in Adjuvant Arthritis

	Liver				Serum				Foot	
	Weight	LPO	SOD	GSH-Px	Protein	Cerulo- plasmin	GSH-Px	SOD	Treated	Non- treated
Liver										
Weight	1									
LPO	-0.216	1								
SOD	-0.036	-0.309	1							
GSH-Px	-0.168	-0.022	0.762	1						
Serum										
Protein	-0.084	-0.295	0.417	0.319	1					
Ceruloplasmin	-0.153	0.505	-0.815	-0.675	-0.141	1				
GSH-Px	0.078	-0.750	0.293	-0.064	0.688	-0.133	1			
SOD	0.609	-0.427	-0.055	0.020	0.141	-0.047	0.399	1		
Foot										
Treated	0.426	-0.536	-0.278	-0.651	0.236	0.168	0.623	0.390	1	
Non-treated	0.393	-0.765	0.173	-0.258	0.442	-0.250	0.779	0.402	0.883	1

Calculated between acute phase (day 4) and chronic or stationary phase (day 70).

相関係数 0.6 以上を示したパラメータの組み合わせは肝臓重量と血清中 SOD, 肝臓重量と血清中 ceruloplasmin, 血清中蛋白質量と血清中 GSH-Px 及び血清中 GSH-Px と注射足の足容積であった。

3. 肝臓中過酸化脂質と SOD 活性

Fig. 1 に肝臓中過酸化脂質と肝臓中及び血清中 SOD 活性の経日的変化を示した。肝臓中の過酸化脂質量は adjuvant 注射 4 日目で最高値を示し、以後、減少して 38 日目頃には無処置対照群のレベルまで低下した。一方、肝臓中の SOD 活性は adjuvant 注射 4 日目から 17 日目までは減少し、以後、70 日目まで上昇をつづけた。しかし、肝臓中過酸化脂質量との間には明瞭な関連はみられなかった。

また、血清中の SOD 活性は 4 日目より 21 日目まで上昇し、以後、多少の変動がみられたものの肝臓中過酸化脂質量の変動との間での相関は低く、その関連も明確でなかった。

4. 肝臓中過酸化脂質と GSH-Px 活性

Fig. 2 に示したように肝臓中の GSH-Px 活性は adjuvant 注射 4 日目より 21 日目まで急激に減少し、21 日目以降では多少の増減は見られるものの総体的には上昇に転じていた。また、肝臓中 GSH-Px 活性は肝臓中過酸化脂質の変動とは併行せず、相関も認められなかった。一方、血清中の GSH-Px 活性は adjuvant 注射 4 日目

Fig. 1. Comparison between LPO (Liver) and SOD (Liver/Serum)

Time course of LPO (bar) and SOD (line) in adjuvant arthritis: Correlation coefficients between liver LPO and liver SOD or serum SOD are -0.309 or -0.427.

Fig. 2. Comparison between LPO (Liver) and GSH-Px (Liver/Serum)

Time course of LPO (bar) and GSH-Px (line) in adjuvant arthritis: Correlation coefficients between liver LPO and liver GSH-Px or serum GSH-Px are -0.022 or -0.750.

Fig. 3. Comparison between LPO (Liver) and Swelling (Foot)

Time course of LPO (bar) and swelling (line) in adjuvant arthritis: Correlation coefficients between liver LPO and swelling (treated foot) or swelling (non-treated foot) are -0.536 or -0.765 .

Fig. 4. Comparison between GSH-Px (Liver) and SOD (Liver/Serum)

Time course of GSH-Px (bar) and SOD (line) in adjuvant arthritis: Correlation coefficients between liver GSH-Px and liver SOD or serum SOD are 0.762 or 0.020 .

が最も低く、以後 44 日目頃まで上昇し、肝臓中の過酸化脂質量の変動とは相反する変化を示した。

5. 肝臓中過酸化脂質の変動と炎症反応

Fig. 3 に adjuvant 注射 4 日後より 70 日後までの足容積の経日的変化と肝臓中の過酸化脂質量との関係を示した。Adjuvant 注射足の足容積は注射 4 日目から 10 日目までの一次炎症の持続に続き 14 日目では関節炎の発症により顕著に増加したが、肝臓中過酸化脂質との間には高い相関を示さなかった。一方、非注射足の足容積は 10 日目頃から急激に増加、二次炎症の進展とともに更に増加して、21 日目以降では慢性化の傾向を示した。これらの変化を肝臓中過酸化脂質との関係でみると非注射足の足容積の変化は過酸化脂質の変動とは相反する動きを示し、両者の間では明らかな負の相関関係を認めた。

6. 肝臓中の GSH-Px と SOD 活性

Fig. 4 に肝臓中の GSH-Px 活性と SOD 活性の関係を示した。肝臓中の両酵素活性はともに類似した経日的変化を示し、よく相関した変動を示した。一方、血清中 SOD 活性と肝臓中 GSH-Px 活性のあいだにはほとんど関連がみられなかった。

7. 主成分分析

Adjuvant 関節炎の進展過程を解析する目的で各パラメータの測定値を用い主成分分析を行った。結果を Fig. 5—8 に掲げる。Fig. 5 及び 6 は第 1 主成分と第 2 主成分について、Fig. 7 及び 8 は第 2 主成分と第 3 主成分についての分析である。なお、第 1 主成分から第 2 主成分までの累積寄与率は 68.96% 、第 1 主成分から第 3 主成分までの累積寄与率は 82.85% であった。

第 1 主成分及び第 2 主成分について各パラメータの因子負荷量を図示したものが Fig. 5 であり、第 2 主成分及び第 3 主成分について各パラメータの因子負荷量を図示したものが Fig. 7 である。第 1 主成分は非注射足の足容

Fig. 5. Factor Loading (1)

Fig. 6. Principal Component Analysis (I)

Fig. 7. Factor Loading (II)

Fig. 8. Principal Component Analysis (II)

積の変動及び肝臓中過酸化脂質の変動と高い相関を示し、また、注射足の足容積の変化とも比較的高い相関を示す主成分であった (Fig. 5).

第2主成分は肝臓中の GSH-Px 活性及び肝臓中の SOD 活性との相関が高く、血清中 ceruloplasmin 活性とも比較的高い相関を示す主成分であった (Fig. 5 及び 7).

また、第3主成分は肝臓重量及び血清中蛋白質量に相関の高い主成分であった (Fig. 7).

Fig. 6 は第1主成分及び第2主成分についての二次元表示である。Adjuvant 注射4日目より二次炎症の発症に至る14日目までに急激な変化がみられ、14日目以降では二次炎症の進展との関係を推察させるものであった。

Fig. 8 に第2主成分と第3主成分についての二次元のグラフを揚げた。これによると、炎症の進展に従って全体的に原点を中心にしてあまり大きくはないものの、複雑な変化を示すことが分かった。

考 察

過酸化脂質が種々の疾患と密接に関連しているとの多くの報告^{1,2)}があるが、炎症や自己免疫疾患についても例外ではない。¹⁾ 過酸化脂質と炎症との関連性を明確にするためには、炎症時に生体内で産生される過酸化脂質の消長及び消去系の関与を総体的に考えねばならない。

今回、adjuvant 関節炎モデルを用い、過酸化脂質量の変動と、この生成、分解に関係する数種の酵素活性の変動について検討したところ、起炎後一過性に肝臓中の過酸化脂質が上昇し、以後、二次炎症の発症及び炎症反応の進展とともに低下するとの結果を得た。これは Robak の得た結果¹¹⁾と類似しているように見えるが、かれの報告では無処置群の肝臓中過酸化脂質量が adjuvant 注射後のラット肝臓中過酸化脂質量より高値であり、起炎による一過性の上昇が認められていない点でここに得た結果とは相違する。炎症時の肝臓中過酸化脂質の上昇はカラゲニン足浮腫炎症においても報告^{11,12)}されているが、adjuvant 関節炎でも同様に起炎剤の投与による一次炎症の発症に対応して肝臓中の過酸化脂質の上昇が生じたものと考えられる。

肝臓中過酸化脂質の低下に伴って血中での過酸化脂質の上昇が考えられている¹³⁾が、adjuvant 注射4日目より21日目までに測定した血清中の過酸化脂質量は著明な変動を示さず、肝臓中の過酸化脂質量とのあいだにも明瞭な相関関係はなかった。この結果は Yoshikawa らが Wistar 系ラットを用いた adjuvant 関節炎で報告している結果とは異なっている。この相違が使用動物の過齢や系統差によるものかは明確ではないが、血清中での脂質の過酸化反応を抑制するとの報告のある ceruloplasmin が、起炎後4日目より高値を示すことより考えて、この酵素が血清中の過酸化脂質の上昇を抑制している可能性もある。

いずれにしても adjuvant 関節炎の発症には血清中の過酸化脂質及び肝臓中の過酸化脂質はほとんど関与しているとは思われない。

一方、adjuvant 関節炎発症直後から一過性に上昇していた肝臓中過酸化脂質は低値を示しており、それに対応して脂質の過酸化を抑制する肝臓中の SOD 活性は上昇に転じている。この結果よりみて、肝臓中での過酸化脂質の低下は肝臓中の SOD による O_2^- の消去によるものと考えられる。更に、過酸化脂質の分解酵素として知られる GSH-Px の活性は起炎後4日目より関節炎発症までは減少して低値を示しており本酵素による肝

臓での過酸化脂質の分解によって肝臓中過酸化脂質が低下したとは考え難く、更に、一過性に上昇した肝臓中過酸化脂質の低下に GSH-Px が関与したとも思われない。

肝臓中の過酸化脂質は加齢により上昇するとの報告¹⁴⁾があるが、本実験の範囲内では加齢の影響は明らかでなく、adjuvant 注射によって生ずる一過性の過酸化脂質の上昇や関節炎発症後の過酸化脂質の変動に加齢による影響が関係しているとも考えられない。

以上、発症からある程度の慢性化の過程まで、主として肝臓中の過酸化脂質の変動を解析したところ、炎症の進展に伴って非注射足の足容積の変化と肝臓中過酸化脂質量との間で相関関係が強くなり相反する変動パターンを示すようになった。これらの関連したパラメータの炎症過程での関与を総合的に検討する目的で主成分分析を行った。

第1主成分はその因子負荷量の値より主として二次炎症の進展を示すものと考えられ、第2主成分は肝臓における過酸化脂質の生成及び分解に関するパラメータと相関が高く、生体の炎症反応抑制機構に関与しているものと考えられた。更に、第3主成分は肝臓重量や血清中蛋白質との相関が高いことから成長あるいは栄養状態にからんだ体の恒常性維持機構に関与しているものと考えた。

このような主成分に対する解釈をもとに Fig. 6 を見ると adjuvant 関節炎における炎症反応過程は3種の特徴的な相を持っていると考えることができる。すなわち、起炎後4日目より14日目までの一次炎症を主とする急性炎症期を第1段階、14日目の関節炎発症から56日目頃までの二次炎症の完成にむかう第2段階、そして56日目より70日目までの炎症像の固定化、慢性化の状態に進む第3段階である。

このような対比は Fig. 3 にみられる肝臓中の過酸化脂質と各足容積の変動との相反関係にも各相で明らかな差があり、過酸化脂質の増減が一樣でないことから推察される。

また、第2主成分及び第3主成分について見た炎症の過程は原点を中心とした複雑な変化となっている。これは、炎症の進展に伴って生体が恒常性を維持するために各種の対応を為していることの反映と考えられる。

以上に述べたように、肝臓中の過酸化脂質及び過酸化脂質の生成分解に関与する酵素系について検討することは、慢性化した炎症の様相を推測したり、その変化をとらえるために重要な指針を与えるものと考えられる。

引用文献

- 1) a) 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井 勝(編)“過酸化脂質と生体,” 学会出版センター, 東京, 1985, p. 229; b) 八木國夫, 五島雄一郎(編)“過酸化脂質と疾患,” 医学書院, 東京, 1981, p. 73.
- 2) T. Yoshikawa, N. Yokoe, S. Takemura, H. Kato, K. Hosokawa, M. Kondo, *Jpn. J. Med.*, **18**, 199 (1979).
- 3) a) Y. Oyanagui, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1465 (1976); b) T. Yoshikawa, H. Tanaka, M. Kondo, *Biochem. Med.*, **33**, 320 (1985).
- 4) C. W. Denko, *Agents Actions.*, **9**, 333 (1979).
- 5) a) K. Yagi, *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976); b) 金田尚志, 植田伸夫(編)“過酸化脂質実験法,” 医歯薬出版, 1983, p. 80.
- 6) H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, *Anal. Biochem.*, **95**, 351 (1979).
- 7) F. W. Sunderman, S. Nomoto, *Clin. Chem.*, **16**, 903 (1970).
- 8) J. M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969).
- 9) 今成登志男, 広田元子, 宮崎元一, 早川和一, 田村善蔵, 医学のあゆみ, **101**, 496 (1977).
- 10) R. A. Lawrence, R. F. Burk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952 (1976).
- 11) J. Robak, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 531 (1978).
- 12) S. C. Sharma, H. Mukhtar, S. K. Sharma, C. R. Krishna Murt, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 1210 (1972).
- 13) 大柳善彦, “スーパーオキシドと医学,” 共立出版, 東京, 1981, p. 107.
- 14) O. P. Sharma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 469 (1977).