



# ヒト甲状腺腫瘍における Superoxide dismutase の含量および局在の変化

船 阪 有 彦

近畿大学医学部耳鼻咽喉科学教室

Change of superoxide dismutase content and  
its immunohistochemical localization  
in human thyroid tumors

Kunihiko Funasaka

Department of Otorhinolaryngology, Kinki University School of Medicine,  
Osaka, Japan

## ABSTRACT

The manganese- and copper and zinc-containing superoxide dismutase contents and their immunohistochemical localization in human thyroid tumors and some other thyroid diseases were examined and compared with those in the adjacent normal thyroid tissues. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used in this study for the measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD contents. The content of Mn-SOD tended to increase in diffuse hyperplasia and follicular adenoma. The content of Mn-SOD was significantly higher in papillary carcinoma than in the adjacent normal thyroid tissue. Follicular carcinoma also revealed a markedly high Mn-SOD content. The content of Cu, Zn-SOD tended to increase slightly in thyroid disease. The Mn-SOD and Cu, Zn-SOD activities were examined in thyroid diseases and also compared with those in the adjacent normal thyroid tissues. The SOD activity was measured by the xanthine/xanthine oxidase/nitrobluetetrazolium system in sodium carbonate buffer at pH 10.2. Mn-SOD and Cu, Zn-SOD activities were prone to increase slightly in thyroid diseases. However, no significant difference was found between the thyroid diseases and adjacent normal thyroid tissue in Mn-SOD or Cu, Zn-SOD activity. Follicular carcinoma and papillary carcinoma contained a significantly high Mn-SOD content compared with normal tissues. The Mn-SOD activity in these two carcinomas increased slightly. The discrepancy between the enzyme activity and immunoreactive content suggested that an immunoreactive but enzymatically inactive or low active Mn-SOD protein existed in thyroid carcinomas. In the immunohistochemical study, the adjacent normal thyroid tissue showed granular positive staining of Mn-SOD in the cytoplasm, and also showed positive staining of Cu, Zn-SOD in the nucleus and the cytoplasm. To determine the proliferative ability in thyroid diseases, the stainings of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and epidermal growth factor receptor (EGFR) were examined. PCNA staining was evaluated by % labeling index (%LI) of positive staining cell nuclei. Increases in Mn-SOD, Cu, Zn-SOD, EGFR and %LI of PCNA were observed in the papillary proliferative lesion of diffuse hyperplasia. A strong positive stain of Mn-SOD was observed in papillary and follicular carcinomas, whereas in anaplastic carcinoma staining was markedly less intense in spite of heavy strong staining of EGFR and high labeling in %LI of PCNA. These findings indicate that the Mn-SOD content varies

according to the degree of differentiation and generating ability of thyroid carcinoma. Therefore, the Mn-SOD content was studied in two variant lines of B16 melanoma; B16F1 with a low metastatic potential and B16BL6 with a high metastatic potential. Using ELISA, the Mn-SOD content in the hyper metastatic B16BL6 cell line was significantly lower ( $P < 0.01$ ) than that in the B16F1 cells. This suggested that in the highly proliferative tumor for example an anaplastic thyroid carcinoma and malignant tumor in other organs, a disordering mechanism of Mn-SOD content elevation existed. An anaplastic thyroid carcinoma had a natural potential of proliferative ability, and the well differentiated thyroid carcinoma corresponded to normal thyroid tissue. Induction of Mn-SOD mRNA was observed with  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  and  $\text{IL-6}$ . To investigate the elevation of Mn-SOD content in well differentiated thyroid carcinoma. The  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  and  $\text{IL-6}$  content were studied in various thyroid diseases and thyroid carcinoma. There was no significant correlation between the Mn-SOD content and each parameter ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  and  $\text{IL-6}$  content) in each thyroid disease.

**Key words:** thyroid cancer, manganese-containing superoxide dismutase, copper, zinc-containing superoxide dismutase, immunostaining.

### 緒 言

細胞レベルにおいて、酸素の一部は酸化剤として代謝エネルギーに利用されたあと自らは還元され、スーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ )、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、あるいはヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) などの状態を経て水 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) になる。この酸素が酸化剤として利用される際に生じるスーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) は生体内においてさまざまな生体反応に関わっている。たとえば、白血球やマクロファージの細菌貪食による殺菌作用を直接受け持つのがこのスーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) や過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) であるといわれている<sup>1</sup>。スーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) は生体内では必要不可欠な存在であるが、反面生体に有害な作用を及ぼす場合もある。たとえば、パラコート中毒症の際に肺に蓄積したパラコートは生体内での還元物質によって反応性の高いラジカルに変化し、このラジカルが酸素分子や過酸化水素と反応してスーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) やヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) を生ずる。生体内ではこのような反応が連続的に起こり、肺組織で過剰に生じたスーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) やヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) が肺組織を障害して肺水腫を引き起こすとされている<sup>2</sup>。このほかにも、スーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) は動脈硬化、糖尿病、慢性腎不全などの疾患に関与していることが報告されている<sup>3-5</sup>。

しかしながら生体はこのスーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ ) を消去する酵素すなわちスーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase; SOD) を保持している。SOD は、1969年 Fridovich と McCord らによってウシ赤血球から単離精製された。 $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$  の反応を触媒し<sup>6,7</sup>、生体内で、superoxide radical を消去することで有害な free radical から生体を防御する役割を担ってい

る。哺乳類においては3種類のSODが存在する<sup>8,9,10</sup>。すなわち、主としてcytosolに存在するCu, Zn-SOD、ミトコンドリア内に存在するMn-SOD、そして細胞外に存在するextracellular SODである。Cu, Zn-SODは分子量が約32,000あり、およそ150個のアミノ酸よりなる1量体(monomer)に銅および亜鉛原子をおのおの1個ずつ含んだサブユニット2個より構成されている<sup>11</sup>。このCu,Zn-SODの活性は、シアンや過酸化水素などにより、阻害を受ける。Mn-SODは分子量約8,000で同一のサブユニット4個から構成されシアンなどでは活性阻害を受けない<sup>12</sup>。extracellular SODに関してはMarklundらが報告し細胞外液中にあるといわれている<sup>10</sup>。これらのSODはアミノ酸組成、免疫化学的性質は互いに異なっている。上記した酸素ラジカルが各種疾患に関連していることからその消去酵素であるSODも老化、各種の炎症、先天性疾患などとの関連において注目されている。たとえば、Bartoszら<sup>13</sup>はショウジョウバエのうちの短命の変異種では成虫全体のSOD活性が野生型のものより20%低かったと報告している。Nathら<sup>14</sup>はチトクロームc法で糖尿病患者の末梢白血球のSOD活性が正常人より低下していることを報告した。Araiら<sup>15</sup>はglucoseによるSOD活性部位の糖化がSOD活性低下をもたらすことを報告した。また、寺本<sup>16</sup>はモルモットを用いた気管支喘息の誘発モデルにおいて、Cu, Zn-SODが喘息発作時に気道痙攣や気道過敏性を軽減する重要な役割をしていると報告している。そして、特に近年、癌とSODとの関連についても注目されるようになってきた。Dionisiら<sup>17</sup>は2つの実験癌をもちいてMn-SOD活性を測定し正常組織との比較で実験癌のMn-SOD活性が著しく低下していたことを報告した。Petkauら<sup>18</sup>はラット乳腺carcinomaの腫瘍部分と正常部分との比較において腫

瘍部分のSOD量が低下したことを報告した。またPeskinaら<sup>19</sup>もWalker 256 carcinomaやLewis肺癌をもちいて同様の報告をしている。

筆者は甲状腺細胞の立体培養を用い、甲状腺癌の転移能の違いによる細胞構築の違い<sup>20</sup>、あるいは増殖能とEGF-Rの変化<sup>21</sup>など甲状腺癌を含めた甲状腺疾患について研究を加えてきた。しかし、甲状腺癌でのSODの動態やその組織および細胞での局在について明らかにした報告はない。筆者はEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法によって甲状腺癌を含めた甲状腺疾患でのMn-SOD, Cu, Zn-SODの含量を測定し<sup>22</sup>、未分化癌では従来の報告と同じく腫瘍部分では正常部分に比べSOD量は低下するという結果が得られたが分化癌では逆の結果を得た。すなわち分化癌ではMn-SODが著しい高値をしめした。そこで甲状腺分化癌におけるMn-SOD含量、活性、免疫組織学的局在および他の腫瘍マーカーとの相関を考察して甲状腺癌の特性について検討し、あわせてMn-SODの腫瘍マーカーとしての可能性についても検討を試みた。

### 実験材料と方法

#### 1. 実験材料

実験材料として1989年～1992年に近畿大学医学部耳鼻咽喉科において外科的手術により摘出された甲状腺病変組織として、乳頭癌7例、濾胞癌2例、濾胞腺腫5例、diffuse hyperplasia 3例を用いた。対照としては、病変組織から十分に離れた非病変部甲

**Table 1** Surgical samples of primary thyroid disease for the measurement of the SOD activity and content

Histological diagnosis	No. of cases
Adjacent normal tissue	8
Diffuse hyperplasia	3
Follicular adenoma	5
Follicular carcinoma	2
Papillary carcinoma	7

**Table 2** Surgical samples of primary thyroid disease for the immunohistochemical study

Histological diagnosis	No. of cases
Adjacent normal tissue	12
Graves' disease	8
Follicular adenoma	11
Follicular carcinoma	7
Papillary carcinoma	5
Anaplastic carcinoma	3

状腺組織8例を用いた (Table 1)。それぞれの組織は10%ホルマリン緩衝液で固定後、常法に従いパラフィン包埋し薄切切片を作製し、以下の実験に使用する前に病変部および非病変部甲状腺組織は病理組織学的に確認を行った。免疫組織学的検討に関して使用した組織標本は、上記手術標本以外に、近畿大学医学部病院病理部保存の甲状腺未分化癌3例、甲状腺乳頭癌5例、濾胞癌7例、濾胞腺腫11例、Graves病8例、非病変部甲状腺組織12例を用い、病理組織パラフィン包埋ブロックからパラフィン切片を作製して追加し組織学的検討に使用した (Table 2)。

#### 2. 組織試料の調整

-80°Cで保存していた手術時採取組織片を0.2～0.5g切り出し、50 mM phosphate buffer saline (pH 7.4) (以下PBSと略す) 2 mlを加えポリトロン (NIHONSEIKI, BM-1) およびポッター型ホモジナイザー (OMEGA ELECTRIC, SM-3) を用いてホモジネートを行い、周波数20 KHz、出力130 W (COSMO BIO, UCD-200) で超音波処理後2,000 rpm、10分間 (HITACHI, 05PR-22) 遠心し、上清をSOD測定用の試料とした。上記作製した試料の蛋白量は、PIERCE社製BCA protein assay reagentで測定した。

#### 3. 抗Mn-SOD抗体、抗Cu, Zn-SOD抗体

Kawaguchiら<sup>23</sup>によりヒト肝臓から抽出したMn-SODおよびCu, Zn-SODを結晶化し作製されたエピトープの明確なモノクローナル抗体の供与を大阪大学医学部生化学教室からうけた<sup>24</sup>。

#### 4. SOD含量の測定

Kawaguchiら<sup>24</sup>の方法に準じた。抗ヒトMn-SOD抗体 (300 μg/ml) をポリスチレン製の96穴のマイクロタイタープレートに50 μlずつ添加しシーリング後、4°Cで12時間静置、洗浄後1%のBSAを含む50 mMのPBS (pH 7.4) でブロッキングを行い、一次抗体固相化プレートを作製した。

上記のマイクロタイタープレートの各ウェルに50 mMのPBS (pH 7.4) で希釈調節した検量線作成用の標準液と試料を各々100 μlずつ添加しシーリングした。室温で2時間静置反応した後洗浄し50 mMのPBS (pH 7.4) で5,000倍に希釈したbiotin化酵素標識抗体希釈液を各ウェルに100 μlずつ添加し、再びシーリングして室温で2時間静置反応した。さらに洗浄を3回繰り返した後50 mMのPBS (pH 7.4) 5,000倍に希釈したhorse radish peroxidase avidin D (以下アビジン HRP と略す) (VECTOR) 希釈液を50 μlずつ添加し、10分間静置さらに3回洗浄後、O-phenylenediaminedihydrochloride (SIGMA) 1 tab.を0.1M citrate phosphate buffer (pH 5.4) 10

ml に溶解させ、 $H_2O_2$  (WAKO) 8.4  $\mu$ l 添加した発色溶液を各ウェルに50  $\mu$ l ずつ添加し発色、2N の  $H_2SO_4$  で発色停止後、比色計で吸光度(波長492 nm) 測定し、検量線から試料中の SOD 含量を求めた。

#### 5. SOD 活性の測定法

Mn-SOD, Cu, Zn-SOD の活性測定は、Kuthan らの方法に準じて行った<sup>25</sup>。すなわち、 $2.2 \times 10^{-9}$  M xanthine,  $2.5 \times 10^{-5}$  M nitro blue tetrazolium および  $1 \times 10^{-4}$  M EDTA をふくむ  $5 \times 10^{-2}$  M sodium carbonate buffer (pH 10.2, 25°C) に  $2.2 \times 10^{-9}$  M xanthine oxidase (Boehringer) 20  $\mu$ l を 1 mM EDTA 液を含む 2M ammonium sulfate 2 ml に加え、この際に生じるブルーフォルマザンの吸光度を吸光度計(日立330)を用いて560 nm で測定し、その後試料を添加し試料中の SOD によるブルーフォルマザンの生成阻害から活性値を算出した。Cu, Zn-SOD の活性は0.25M KCN を加えることにより阻害し<sup>26</sup>、総 SOD 活性と Cu, Zn-SOD 活性の差から、Mn-SOD, Cu, Zn-SOD 各々の活性値を求めた。

standard には superoxide dismutase (Cu, Zn 型) (和光), superoxide dismutase (Mn 型) (和光) を用いた。(pH 7.8 30°C でチトクローム C の還元反応速度を50%阻害する酵素量を 1 unit とする。)

#### 6. 免疫組織学的検討

それぞれの組織は10%ホルマリン緩衝液で固定後、常法に従いパラフィン包埋し薄切切片を作製し免疫染色(ABC法)に用いた<sup>27</sup>。各症例のパラフィン切片は脱パラフィン後、0.3%過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼを阻止した。次に、一次抗体として抗 Mn-SOD 抗体、抗 Cu, Zn-SOD 抗体、抗 PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 抗体 (COULTER CLONE) と抗 EGF-R (epidermal growth factor receptor) 抗体 (CAMBRIDGE RESERCH) を用い 4°C 16時間反応させた。その後ビオチン化二次抗体 (VECTOR) と室温で30分間反応させ、さらにアビジン (DAKO) とビオチン化ワサビペルオキシダーゼ (以下 HRP と略す DAKO) との混合液を室温で1時間反応させた。HRP の発色は0.03%  $H_2O_2$  入りジアミノベンチジン(和光)液で発色させ、ヘマトキシリンで対比核染色を施した。

#### 7. PCNA の陽性細胞率

PCNA に関しては細胞陽性率は、光学顕微鏡下 ( $\times 400$ ) に 4 視野で確認した細胞数の合計に対する陽性細胞の比率で算定した。

#### 8. マウスメラノーマ細胞株の培養

C57 BL/6 マウスから自然発生した B16 メラノーマ細胞株のうち、低転移型の F-1 と高転移型の BL-6 を用い、10% FBS と、100  $\mu$ g/ml のカナマイシン

200単位/ml のペニシリン G 10 mM の HEPES を含有する RPMI-1640 培地液を使用して、75  $cm^2$  培養ボトルで24時間培養したものを5ボトルずつ細胞を回収し、SOD 含量測定に必要な処理を加えて試料の用に供した。

#### 9. IL-1 $\beta$ の測定法

抗ヒト IL-1 $\beta$  抗体コーティングチューブに、ヒト血清アルブミン液で希釈調節した検量線作成用の標準液と試料を各々200  $\mu$ l ずつ添加し、さらに、<sup>125</sup>I 標識抗 IL-1 $\beta$  抗体液を50  $\mu$ l ずつ添加して混和し室温で18時間静置した。その後、各チューブの溶液を吸引除去し、 $\gamma$ -カウンター(LKB-1274)で各チューブの放射能を1分間測定し、そのカウント値から検量線を作成して検体の含量を求めた。

#### 10. TNF- $\alpha$ の測定法

抗ヒト TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体をポリスチレン製96穴のマイクロタイタープレートに50  $\mu$ l ずつ分注しシーリング後、4°Cで12時間静置したものを洗浄し、1%のBSAを含む50 mM の PBS (pH 7.4) にてブロッキングを行い一次抗体固相化プレートとして用いた。上記のプレートの各ウェルに50 mM の PBS (pH 7.4) で希釈した検量線作成用 recombinant ヒト TNF- $\alpha$  標準液を100  $\mu$ l ずつ分注し、室温でプレートシェーカーを用いて2時間、緩やかに振盪させた。これを洗浄後50 mM の PBS (pH 7.4) で5,000倍に希釈した biotin 化酵素標識抗体希釈液を各ウェルに100  $\mu$ l ずつ添加し再びシーリングし、さらに90分間室温で振盪させた後、洗浄してから各ウェルに50 mM の PBS (pH 7.4) で5,000倍に希釈したアビジン HRP (VECTOR) 希釈液を50  $\mu$ l ずつ添加し10分間室温で静置した。これを洗浄、OPD で発色させ、吸光度(波長492 nm) 測定し、検量線から試料中の TNF- $\alpha$  含量を求めた。

#### 11. IL-6 の測定法

抗ヒト IL-6 モノクローナル抗体を96穴のマイクロタイタープレートに分注し4°Cで12時間静置し1%のBSAを含む50 mM の PBS (pH 7.4) でブロッキングした。この一次抗体コーティングプレートの各ウェルに50 mM の PBS (pH 7.4) で希釈した検量線作成用 recombinant ヒト IL-6 標準液と検体を50  $\mu$ l ずつ添加しシーリングして、4°Cで18時間静置した。これを洗浄後、各ウェルに酵素標識抗体溶液を100  $\mu$ l ずつ添加し、さらに室温で1時間静置後、洗浄を3回行った。その後、基質液(2,2'-アジノビス1,3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)を100  $\mu$ l 各ウェルに添加し、室温で1時間静置、反応停止液100  $\mu$ l を添加し発色停止後、吸光度(波長405 nm) を測定し、検量線から試料中 IL-6 含量を求めた。

## 12. 甲状腺腫瘍疾患患者の術前術後の血中 Mn-SOD 含量の変化

甲状腺腫瘍疾患患者 9 名の腫瘍摘出術前、術後の血中 Mn-SOD 含量を ELISA 法で測定した。対照として健常成人 4 名の血中 Mn-SOD 含量を測定した。

## 13. 推計学的分析方法

測定値は平均値±標準誤差 (MEAN±SEM) で表示した。有意差検定は、Wilcoxon, Mann-Whitney U により、5%以下の危険率で有意の差があると表示した。相関係数はピアソンの相関係数と順位相関係数により検定し、ピアソンの相関係数を表示した。

## 結 果

### 1. SOD 含量の測定

#### 1.1. Mn-SOD 含量

ヒト甲状腺疾患組織の Mn-SOD 含量を ELISA 法で測定した結果、非病変部甲状腺組織では  $39.9 \pm 15.9$  ng/mg protein となった。過形成病変であるパセドウ病組織においては  $78.4 \pm 4.1$  ng/mg protein を示し、非病変部甲状腺組織に比べて有意に高値を示した。次に、腫瘍性病変においては良性腫瘍である濾胞腺腫で  $99.9 \pm 23.5$  ng/mg protein となり非病変部甲状腺組織との有意な差を認めた。悪性腫瘍病変である乳頭癌では  $171.5 \pm 108.5$  ng/mg protein、さらに濾胞癌では  $998.6 \pm 117.2$  ng/mg pro-

tein と有意に高値を示した。良性腫瘍と悪性腫瘍との間においても有意な差を認めた (Table 3)。

#### 1.2. Cu, Zn-SOD 含量

ヒト甲状腺病変組織の Cu, Zn-SOD 含量についても ELISA 法で測定した。その結果、非病変部甲状腺組織では  $187.1 \pm 34.4$  ng/mg protein であった。パセドウ病では  $213.8 \pm 6.9$  ng/mg protein と非病変部甲状腺組織より高値を示したが有意差は認められなかった。濾胞腺腫では  $234.8 \pm 78.6$  ng/mg protein、濾胞癌では  $352.4 \pm 55.2$  ng/mg protein といずれも非病変部甲状腺組織より高値を示したが、有意差は認められなかった。乳頭癌では  $286.8 \pm 82.5$  ng/mg protein と高値を示し、非病変部甲状腺組織に対して有意な差を認めた (Table 3)。

### 2. SOD 活性の測定

#### 2.1 Mn-SOD 活性

ヒト甲状腺疾患組織の SOD 活性を測定したところ、非病変部甲状腺組織では  $14.8 \pm 1.6$  U/mg protein であった。過形成病変においては  $16.7 \pm 2.9$  U/mg protein となり、非病変部甲状腺組織とは有意な差を認めなかった。濾胞腺腫においても  $22.0 \pm 4.1$  U/mg protein となり非病変部甲状腺組織との有意差を認めなかった。つぎに、濾胞癌、乳頭癌においても各々  $29.8 \pm 1.3$  U/mg protein、 $27.9 \pm 6.1$  U/mg protein で非病変部甲状腺組織との比較において有意な差を認めなかった (Table 4)。

**Table 3** Mn-SOD and Cu, Zn-SOD contents determined by ELISA

Histological diagnosis	No. of cases	Mn-SOD (ng/mg protein)	Cu, Zn-SOD (ng/mg protein)
Adjacent normal tissue	6	$39.9 \pm 15.9$	$187.1 \pm 34.4$
Diffuse hyperplasia	3	$78.4 \pm 4.1^{*a)}$	$213.8 \pm 6.9$
Follicular adenoma	5	$99.9 \pm 23.5^{*b)}$	$234.8 \pm 78.6$
Follicular carcinoma	2	$998.6 \pm 117.2$	$352.4 \pm 55.2$
Papillary carcinoma	7	$171.5 \pm 108.5^{*c)d)}$	$286.8 \pm 82.5^*$

each value represents the mean ± S.D.

\*a), \*b), \*c):  $P < 0.01$ , as compared with the adjacent normal thyroid tissue \*d):  $P < 0.01$ , significantly different from diffuse hyperplasia

**Table 4** Mn-SOD and Cu, Zn-SOD activity determined by NBT method

Histological diagnosis	No. of cases	Mn-SOD (n/mg protein)	Cu, Zn-SOD (n/mg protein)
Adjacent normal tissue	6	$14.8 \pm 1.6$	$115.5 \pm 5.9$
Diffuse hyperplasia	3	$16.7 \pm 2.9$	$126.6 \pm 20.6$
Follicular adenoma	5	$22.0 \pm 4.1$	$156.1 \pm 23.9$
Follicular carcinoma	2	$29.8 \pm 1.3$	$222.9 \pm 5.1$
Papillary carcinoma	7	$27.9 \pm 6.1$	$166.4 \pm 23.4$

each value is the mean ± S.D.

there was no significant difference

NBT; nitrobluetetrazolium

## 2.2 Cu, Zn-SOD の活性

ヒト甲状腺疾患組織で Cu, Zn-SOD の活性を測定した。非病変部甲状腺組織では  $115.5 \pm 5.9$  U/mg protein であった。パセドウ病では  $126.6 \pm 20.6$  U/mg protein で非病変部甲状腺組織との有意差は認めなかった。濾胞腺腫では  $156.1 \pm 23.9$  U/mg protein でこれも非病変部甲状腺組織との間での有意差は無かった。次に、濾胞癌、乳頭癌、ともに  $222.9 \pm 5.1$  U/mg protein,  $166.4 \pm 23.4$  U/mg protein と非病変部甲状腺組織にくらべ軽度増加したが有意差を認めなかった (Table 4)。

## 3. SOD 含量と活性値との相関について

SOD 含量測定では Mn-SOD で非病変部組織と病変部組織で有意差を認め、Cu, Zn-SOD においても乳頭癌と非病変部甲状腺組織との間で有意差を認めしたが、SOD 活性測定ではこれらに有意差を認めなかった。そこで、これらの疾患組織での SOD 含量と SOD 活性の関係を調べる目的で、この2つのパラメーターの相関について検討した。

### 3.1 Cu, Zn-SOD

活性と含量との間で推計学的に有意な ( $P < 0.05$ ) 相関係数 0.442 がえられた ( $y = 140.8 + 0.675x$ ,  $r_2 = 0.442$ ) (Fig. 1-a)。

### 3.2 Mn-SOD

非病変部甲状腺組織においては有意な ( $p < 0.05$ ) 相関係数 0.807 がえられた。 ( $y = -7.7117 + 3.3009x$

$x$ ,  $r_2 = 0.807$ ) (Fig. 1-b)。

しかしながら、悪性腫瘍においては相関を認めなかった (Fig. 1-c)。

## 4. 甲状腺組織免疫染色

ヒト各種甲状腺疾患組織における Mn-SOD, Cu, Zn-SOD の免疫染色を行った。腫瘍性病変の悪性度の指標として腫瘍マーカーの報告もある EGF-R

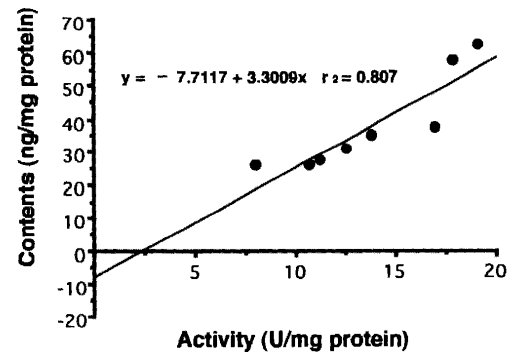


Fig. 1-b Relationship between the Mn-SOD content and its activity in normal thyroid tissues Six samples of normal thyroid tissues were assayed for Mn-SOD enzyme content by ELISA and for the Mn-SOD enzyme activity as described in "Materials and Methods". There a was significant correlation. ( $-7.7117 + 3.3009x$ ,  $r^2 = 0.807$ ,  $n = 8$ ).

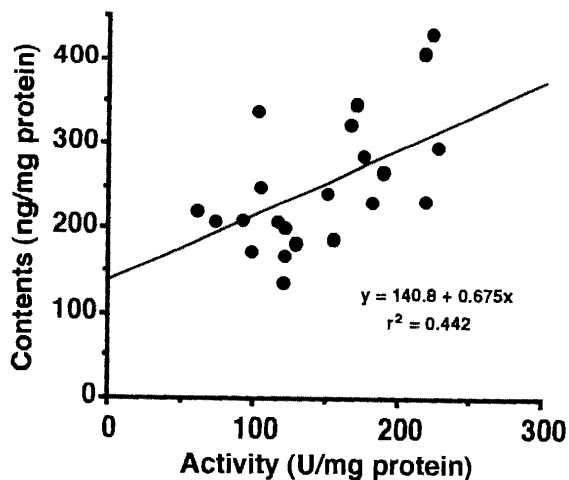


Fig. 1-a Relationship between the Cu, Zn-SOD content and its activity in the thyroid tissues

Twenty two samples of various thyroid tissues were assayed for Cu, Zn-SOD enzyme content by ELISA and for the Cu, Zn-SOD enzyme activity as described in "Materials and Methods". There was a significant correlation. ( $y = 140.8 + 0.675x$ ,  $r^2 = 0.442$ ,  $n = 22$ ).

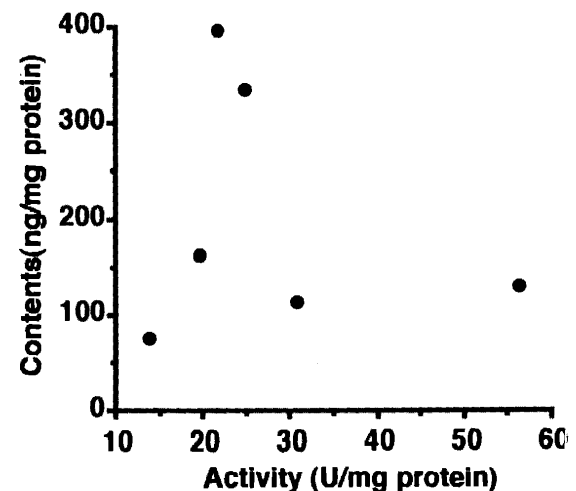
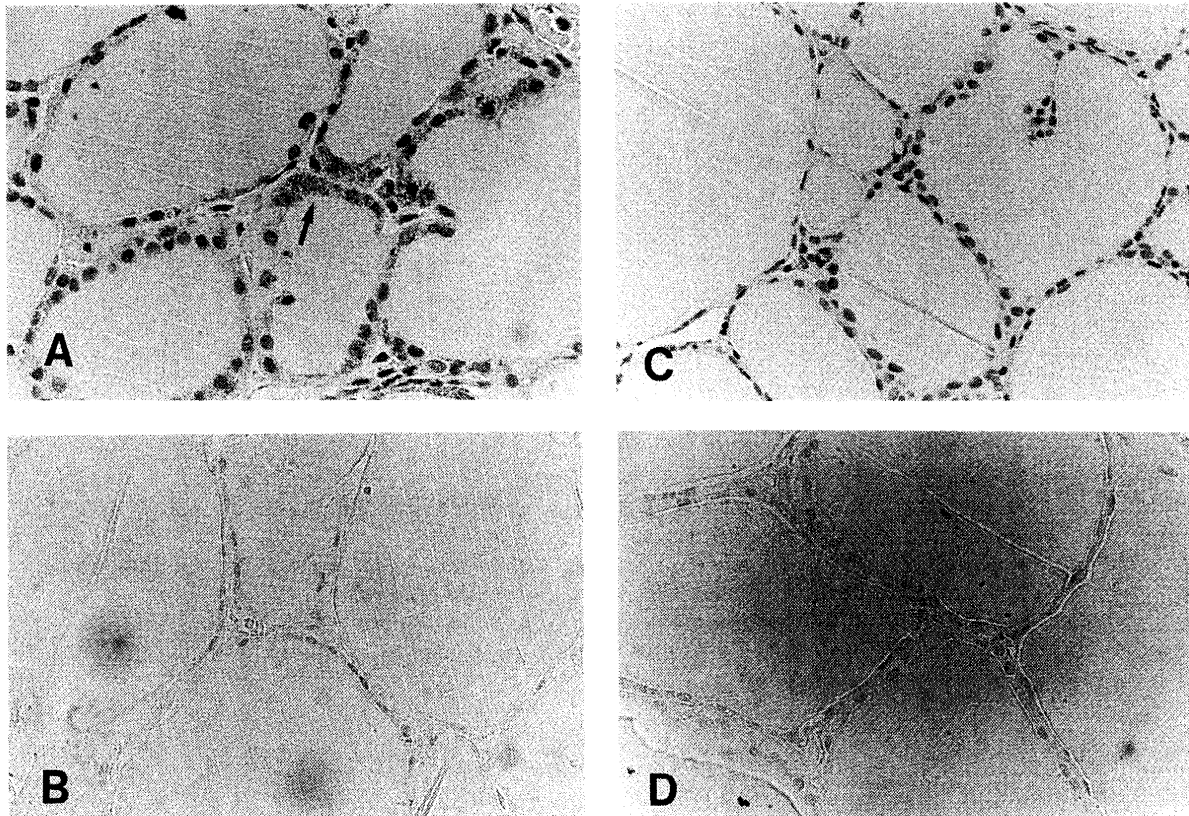


Fig. 1-c Relationship between the Mn-SOD content and its activity in papillary thyroid carcinoma Seven samples of normal thyroid tissues were assayed for Mn-SOD enzyme content by ELISA and for the Mn-SOD enzyme activity as described in "Materials and Methods". There was no significant correlation between its content and activity.

**Table 5** The intensity of Mn-SOD, Cu, Zn-SOD, EGFR and PCNA in thyroid disease

Histological diagnosis	Mn-SOD	Cu,Zn-SOD	EGFR	PCNA	% LI
Adjacent normal tissue	+	+ <sub>N=C</sub>	±	+	(2.4)
Graves' disease	++	++ <sub>N&gt;C</sub>	++	++	(8.4)
Follicular adenoma	+++	++ <sub>C&gt;N</sub>	+++	+++	(18.4)
Follicular carcinoma	++++	+++ <sub>C&gt;N</sub>	++++	+++	(28.1)
Papillary carcinoma	++++	+++ <sub>C&gt;N</sub>	++++	+++	(22.8)
Anaplastic carcinoma	±	± <sub>C</sub>	++++	++++	(67.5)

% LI; Labelling Index. C; cytoplasm. N; nucleus

**Fig. 2** Immunohistochemical examination of normal thyroid tissue

- A. Adjacent normal thyroid tissue showed granular positive staining of Mn-SOD in the cytoplasm (arrow). (×132)  
 B. Cytoplasm and the nucleus showed positive staining of Cu, Zn-SOD. (×100)  
 C. Adjacent normal thyroid tissue showed negative staining of EGFR. (×100)  
 D. Adjacent normal thyroid tissue showed little positive staining of PCNA (%LI=2.4%). (×132)

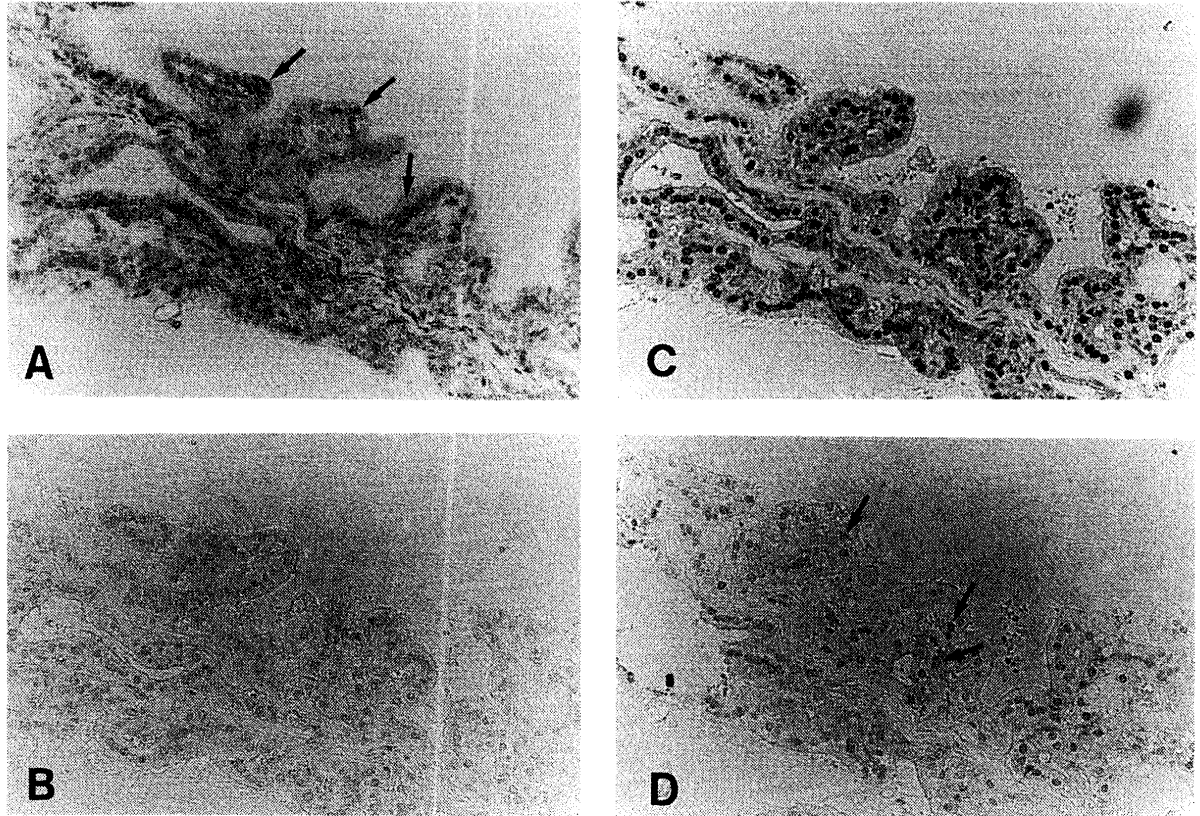
(epidermal growth factor receptor) と、非ヒストン核蛋白で増殖サイクルの主として G<sub>1</sub> 期から S 期にかけて細胞核内に蓄積し腫瘍増殖能の指標としての報告もある PCNA (proliferating cell nuclear antigen) についても免疫染色し併せて検討した。(Table 5) (% LI は PCNA における細胞陽性率で光学顕微鏡下 (×400) に 4 視野で確認した細胞数の合計に対する陽性細胞の割合を示している。)

#### 4.1 正常甲状腺 (Adjacent normal tissue)

Mn-SOD 染色では細胞質内に顆粒状陽性像 (+) を呈した。これに対して Cu, Zn-SOD では細胞質内と核に染色性を示した (+)。EGF-R 染色は殆ど染色性を示さなかった (±)。PCNA 染色による陽性細胞も散在性で (+)、% LI は 2.4% であった (Fig. 2)。

#### 4.2 バセドウ病 (Graves' disease)

Mn-SOD, Cu, Zn-SOD とともに乳頭状増殖部の濾



**Fig. 3** Immunohistochemical examination of Graves' disease

- A. Graves' disease showed increase of granular positive Mn-SOD staining in the cytoplasm in the papillary proliferative lesion (arrows). ( $\times 66$ )  
 B. Positive Cu, Zn-SOD staining in the cytoplasm and the nucleus increased in the papillary proliferative lesion, the nuclear staining being markedly increased. ( $\times 66$ )  
 C. Graves' disease showed positive staining of EGFR in the cytoplasm. ( $\times 66$ )  
 D. PCNA was positively stained in Graves' disease. % labeling index of positive staining cell nuclei increased (arrows) (%LI=8.4%). ( $\times 66$ )

胞細胞でのみ染色性が増加したが、それ以外の部位での染色性は認められなかった。各々の局在性に関しては Mn-SOD で細胞質内顆粒陽性像(++)を呈し、Cu, Zn-SOD では細胞質内でも染色性を示したが、核における染色性の増加が特徴的であった(++)。EGF-R 染色では細胞質に染色性の増加を認めた(++)。PCNA 陽性細胞もやや増加し(++)、% LI は8.4%であった (Fig. 3)。

#### 4.3 濾胞腺腫 (Follicular adenoma)

良性腫瘍である濾胞腺腫では、Mn-SOD 染色、Cu, Zn-SOD 染色とも非腫瘍性病変に比べ強い染色性を示した。すなわち、Mn-SOD で細胞質内に顆粒状陽性像の増強を認めた(+++)。Cu, Zn-SOD では核と細胞質に陽性所見を認めたが、細胞質における陽性所見の増強が著名であった(++)。EGF-R 染色においても非腫瘍性病変とは明らかに異なる強い染色性をもった陽性像を示した(+++)。また PCNA 染色の% LI においても18.4%と陽性細胞数

の占める割合が増加した (Fig. 4)。

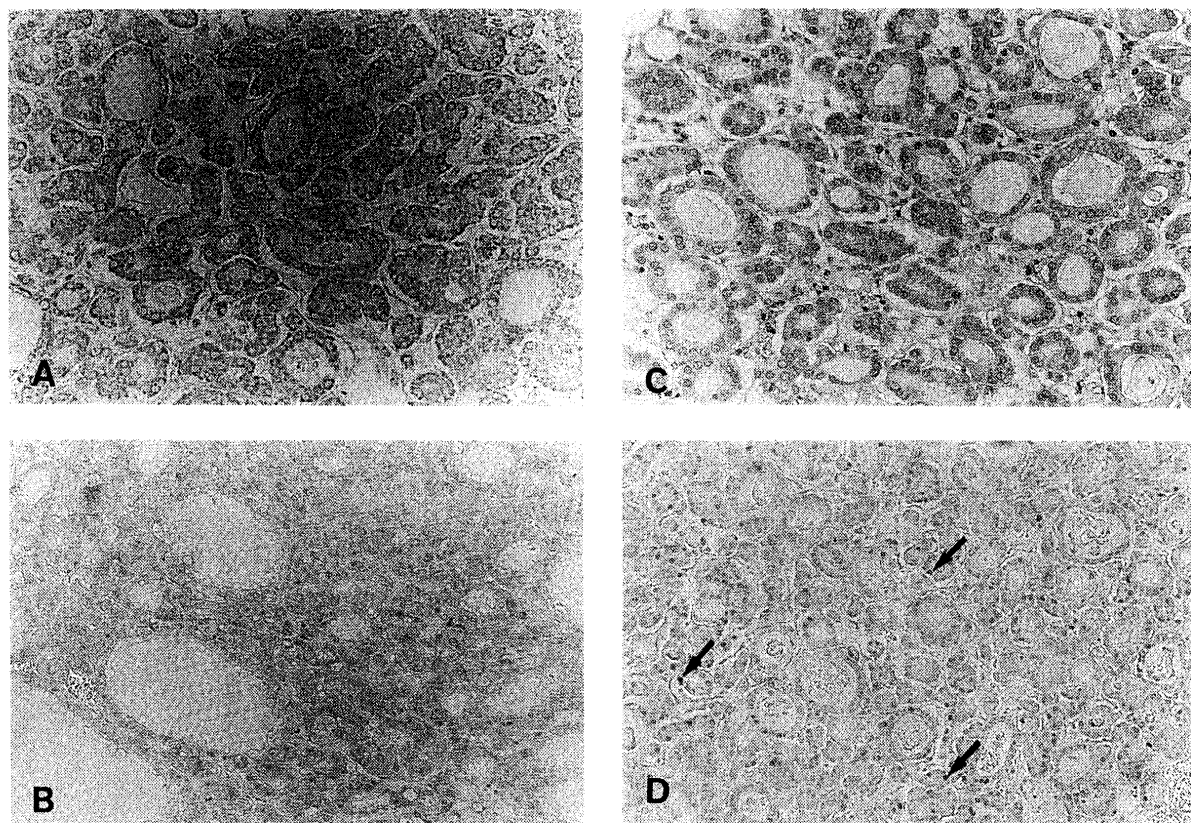
#### 4.4 濾胞癌 (Follicular carcinoma)

悪性腫瘍である濾胞癌においては良性腫瘍よりもさらに強い染色性で示した。すなわち、Mn-SOD 染色において細胞質陽性像は顆粒状というよりむしろ瀰漫性に著しい強陽性を示した(++++)。Cu, Zn-SOD 染色においては細胞質は強陽性に染色し、また核も陽性像増加していた(+++)。EGF-R 染色で細胞質での陽性所見が増強し PCNA 染色でも陽性細胞が著しく増加し% LI は28.1%となった (Fig. 5)。

#### 4.5 乳頭癌 (Papillary carcinoma)

Mn-SOD 染色で濾胞細胞の細胞質に著しい強陽性像をみとめた(++++)。Cu, Zn-SOD 染色では濾胞細胞の細胞質に強い陽性像をしめし、核においても強陽性の染色性を示した(++++)。EGF-R 染色も陽性像の増加を認めた(++++)。PCNA 染色も% LI も増加し22.8%となった (Fig. 6)。





**Fig. 4** Immunohistochemical examination of Follicular adenoma

- A. Follicular adenoma showed increase of granular positive Mn-SOD staining of cytoplasm higher than nontumorous disease. ( $\times 66$ )  
 B. The positive Cu, Zn-SOD staining was more prominent in the cytoplasm and the nucleus than in the non-tumorous disease. ( $\times 66$ )  
 C. The staining intensity of EGFR was significantly greater than that in the non-tumorous disease. ( $\times 66$ )  
 D. %labeling index increased to 18.4% (arrows). ( $\times 40$ )

#### 4.6 未分化癌 (Anaplastic carcinoma)

未分化癌での免疫染色の結果は、Mn-SOD, Cu, Zn-SODとも正常に比べ明らかな染色性の低下を認めた(±)。しかしながら、EGF-Rは細胞質で極めて強い陽性像を認め(++++), PCNAの%LIも67.5%と著しく高値を示した(Fig. 7)。

#### 5. マウスメラノーマ細胞株の培養

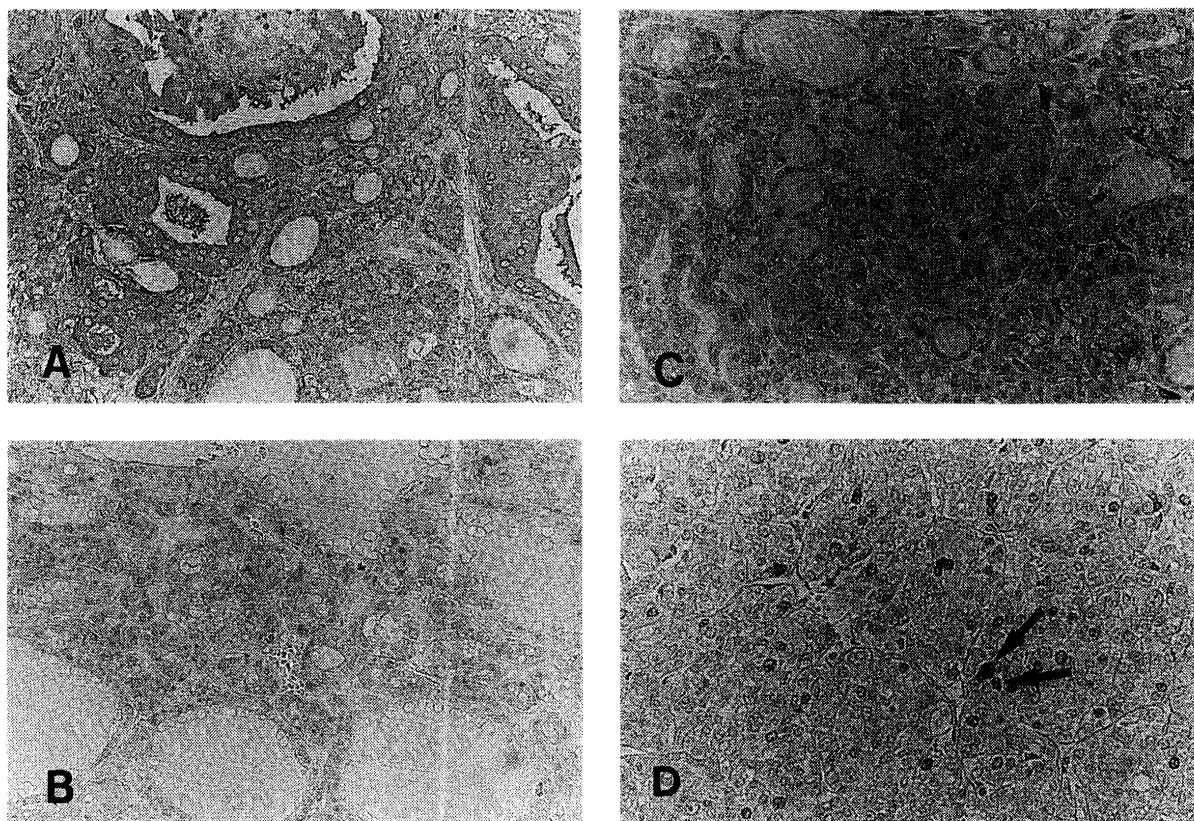
Mn-SOD含量は、転移性の低いF1株で278.275 ng/mg protein, 転移性の高いBL-6株で101.58 ng/mg proteinを示した(Fig. 8)。

6. 各種甲状腺疾患でのIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6  
 各種甲状腺疾患においてIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6を各々測定した(Table 6)。非病変部甲状腺組織では、TNF- $\alpha$ は $1.0 \pm 0.2$  (pg/ $\mu$ g protein $\times 1/1,000$ , 以下単位を略す。)IL-1 $\beta$ では $2.1 \pm 0.4$ , IL-6が $0.8 \pm 0.2$ であった。バセドウ病ではTNF- $\alpha$ が $2.2 \pm 0.1$ , IL-1 $\beta$ では $4.9 \pm 0.2$ , IL-6では $0.5 \pm 0.1$ で非病変部

甲状腺組織に比べTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ で有意な増加を認めた。濾胞腺腫ではTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 各々 $4.4 \pm 1.6$ ,  $11.8 \pm 3.9$ で非病変部甲状腺組織に比べ有意に増加を示した。乳頭癌, 濾胞癌ともTNF- $\alpha$ で $5.3 \pm 0.3$ ,  $6.2 \pm 1.3$ と増加, IL-1 $\beta$ で $10.4 \pm 0.8$ ,  $1.9 \pm 0.5$ とこれも増加しいずれも非病変部甲状腺組織との間で有意差があった。IL-6は乳頭癌, 濾胞癌でのみ,  $1.9 \pm 0.5$ ,  $3.2 \pm 1.2$ と非病変部甲状腺組織に比べ有意に増加を示した。各種甲状腺疾患組織でのIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6について測定し, Mn-SODと比較してその相関について検討したが, Mn-SODとIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6の3者のいずれとの間にも相関を認めなかった。

#### 7. 術前術後における甲状腺疾患患者の血中 Mn-SOD 含量

術前値 $52.4 \pm 3.8$  ng/ml, 術後値 $69.0 \pm 12.1$  ng/ml, 対照値 $50.2 \pm 6.7$  ng/mlでいずれも有意差を認



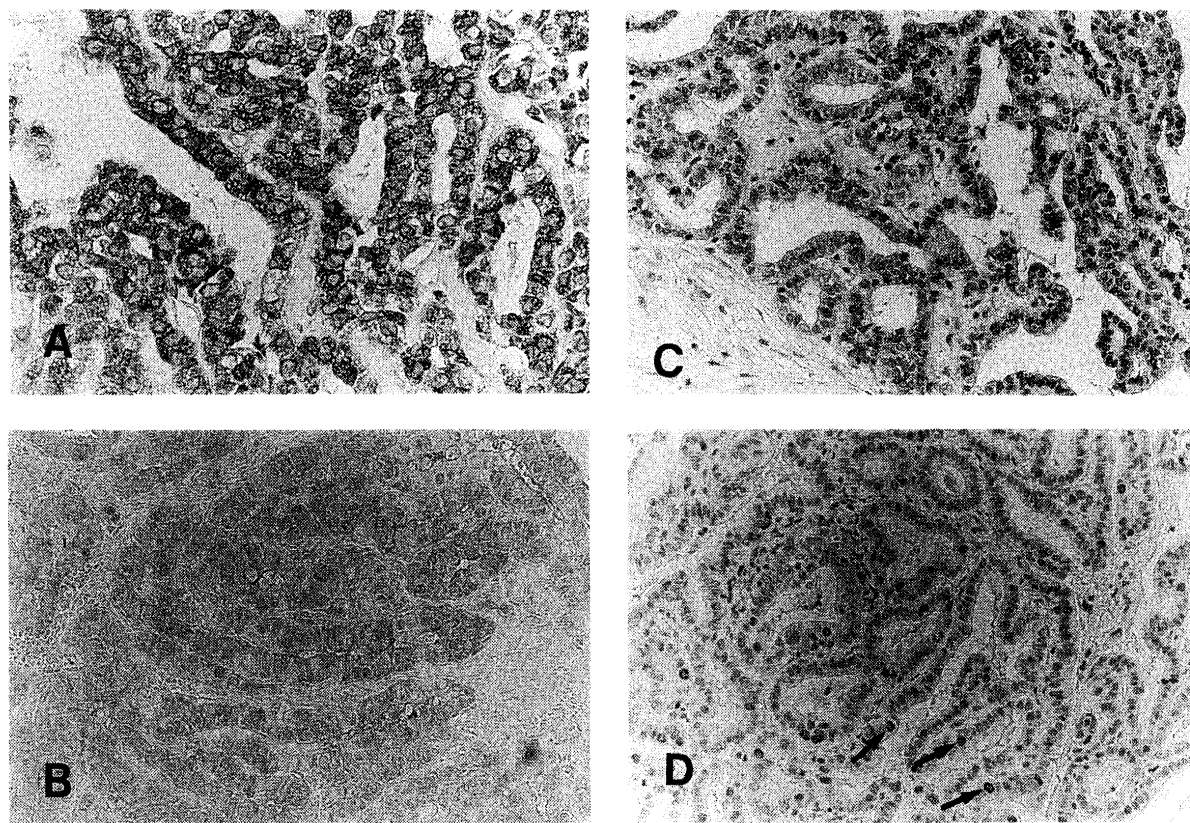
**Fig. 5** Immunohistochemical examination of follicular carcinoma  
 A. Strong positive staining of Mn-SOD was diffusely observed in the cytoplasm. ( $\times 66$ )  
 B. Strong positive staining of Cu, Zn-SOD was observed in the cytoplasm and nucleus. ( $\times 66$ )  
 C. The staining intensity of EGFR was significantly greater higher than that in follicular adenoma. ( $\times 66$ )  
 D. % labeling index increased to 28.1% (arrows). ( $\times 66$ )

めなかった (Fig. 9).

### 考 察

近年における SOD と癌との関わりについての多くの報告から<sup>17-19</sup>, 癌において Mn-SOD の活性は著しい低下を示したり, あるいはほとんど活性を認めないというのが, 定説となっている. Bozzi ら<sup>28</sup> の各種のラット腹水肝癌細胞での増殖性の強さと SOD 低下傾向の相関に関する報告, Bize ら<sup>29</sup> の Morris 肝細胞癌 3 亜型を用いた成長速度と SOD 活性低下傾向に関する報告など用例にはことかかない. しかし, 筆者の ELISA 法による Mn-SOD 含量測定においては, Table 3 に示すように甲状腺濾胞癌, 乳頭癌において著明な高値を示した. 非腫瘍性で増殖性病変であるバセドウ病や濾胞腺腫においても非病変部甲状腺組織との比較で有意な増加を認めた. そこで SOD 含量測定に用いたものと同じ試料で実際の活性値について測定を行ったが, SOD 活性測定においても同様に高い値を示した. (Table 4)

結果で記載したように, 正常値  $14.8 \pm 1.6$  に比べ濾胞癌で  $29.8 \pm 1.3$ , 乳頭癌で  $27.9 \pm 6.1$  と有意ではないが, やや高い値を示し, Cu, Zn-SOD でも同様正常値  $115.5 \pm 5.9$  に比べ濾胞癌  $222.9 \pm 5.1$ , 乳頭癌  $166.4 \pm 23.4$  と増加を示した. 今回示した結果において Mn-SOD 含量は癌では, 4.3~25.0 倍の上昇を示したのに対し活性値の上昇は 1.8~2.0 倍程度であった. この矛盾を検討するために, 各試料の含量と活性値の相関を算出した. Fig. 1-a, -b のように Cu, Zn-SOD と Mn-SOD の非腫瘍性病変では含量と活性の間に相関をみとめた. しかし, 癌では Mn-SOD の含量と活性との相関が認められず (Fig. 1-c), このことより, 癌での Mn-SOD は活性がない inactive な SOD, または活性の低い SOD である可能性, あるいは活性を不活化する物質の存在する可能性が示唆された. Bozzi ら<sup>28</sup> は増殖性の強さと SOD 低下傾向が相関すると述べているが, 甲状腺分化癌は臨床的には他の癌に比べ緩慢な発育をするが, Mn-SOD の結果がこの分化癌の臨床経過になんらかの影響を



**Fig. 6** Immunohistochemical examination of papillary carcinoma

- A. Strong positive staining of Mn-SOD was observed in the cytoplasm. ( $\times 132$ )  
 B. Strong positive staining of Cu, Zn-SOD was observed in the cytoplasm and nucleus. ( $\times 80$ )  
 C. The staining intensity of EGFR significantly increased as in follicular carcinoma. ( $\times 66$ )  
 D. The % labeling index increased to 22.8% (arrows). ( $\times 132$ )

及ぼしているものと考えられる。

周知のごとく甲状腺癌には緩慢な経過を示す分化癌だけでなく、臨床的には急速な発育を示し、甲状腺周囲組織への浸潤および遠隔転移を高頻度に伴うため極めて不良な予後経過を示す未分化癌も存在しその悪性度は多様である。筆者は Mn-SOD の免疫組織学的な局在と甲状腺の病理学的腫瘍マーカーの 1 つである EGFR および細胞増殖期の核に蓄積し腫瘍増殖度の指標となる PCNA の染色との比較により分化癌だけでなく、未分化癌をふくめた甲状腺癌全体の悪性度について免疫組織学的検討を試みた。腫瘍性病変のうち、濾胞腺腫、乳頭癌、濾胞癌の 3 者において、免疫染色における細胞質および核の染色性の増加は、Mn-SOD 含量の増加を反映しているものと考えられる。また、この 3 者においては、非病変部甲状腺組織より濾胞腺腫、さらに乳頭癌、濾胞癌と Mn-SOD の染色性の増加傾向と EGFR、PCNA を含めた病理組織学的な腫瘍増殖性の増加傾向が一致しているものと考えられた。未分化癌に

おいては、EGFR 染色は著しい強陽性を示し、また、PCNA の%LI は 67.5% と、ともに細胞増殖性の著しい強さを示し、臨床的には急速な発育、強い周囲への浸潤を示す未分化癌の性質を有為に反映しているものと考えられた。しかし、Mn-SOD、Cu、Zn-SOD 染色では共に非病変部甲状腺組織よりも低い染色性を示した。すなわち、Mn-SOD 含量変化は癌の分化度あるいは Mn-SOD の産生能によって異なっていることが考えられた。Oberley らは実験動物の悪性腫瘍例において、Mn-SOD 活性の低下を認め、その際に癌細胞の増殖自体が、著しい酸素ラジカルの増加と Mn-SOD の低下を引き起こすのではないかという提言をしている<sup>30</sup>。筆者らはこの提言に基づき実験モデルとして C57B/L マウスの悪性黒色種細胞株 B16 の一亜型で低転移株の B16F1 と、同じく一亜型で著明に肺転移を起こす高転移株 B16BL6 を培養し、これらの上清を用いた ELISA 法による Mn-SOD 含量測定において高転移株 BL6 で F1 に比べ有意に低い Mn-SOD の発現を認めた。

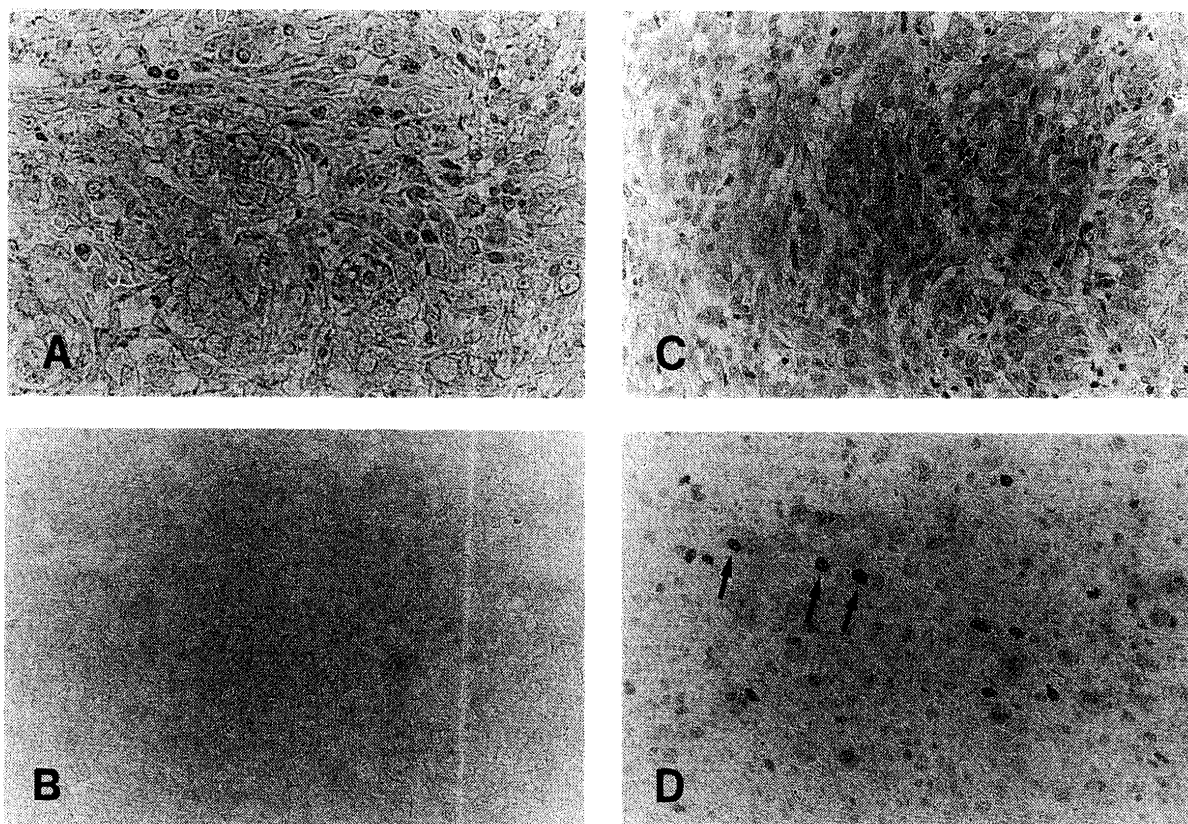


Fig. 7 Immunohistochemical examination of anaplastic carcinoma

- A. The staining intensity of Mn-SOD was significantly decreased being weaker than that in the adjacent normal thyroid tissue. ( $\times 132$ )
- B. The staining intensity of Cu, Zn-SOD was significantly decreased being weaker than that in the adjacent normal thyroid tissue. ( $\times 66$ )
- C. Strong positive staining of EGFR was observed in the cytoplasm. ( $\times 66$ )
- D. The %LI increased markedly to 67.5% (arrows). ( $\times 66$ )

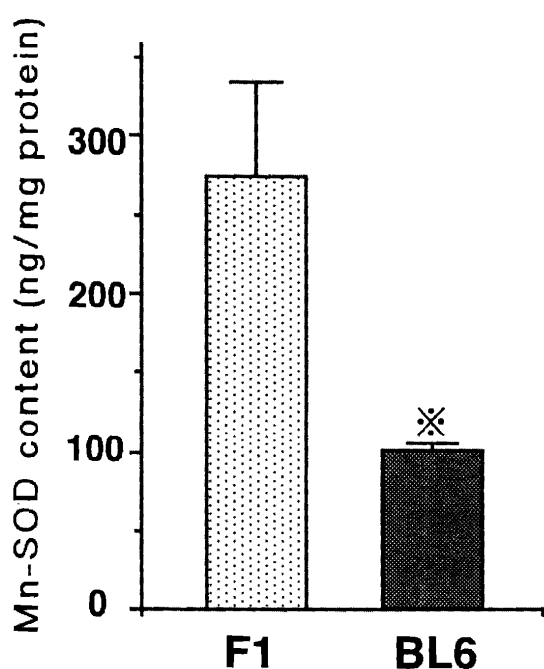


Fig. 8 The Mn-SOD content in B16 melanoma BL6 and F1

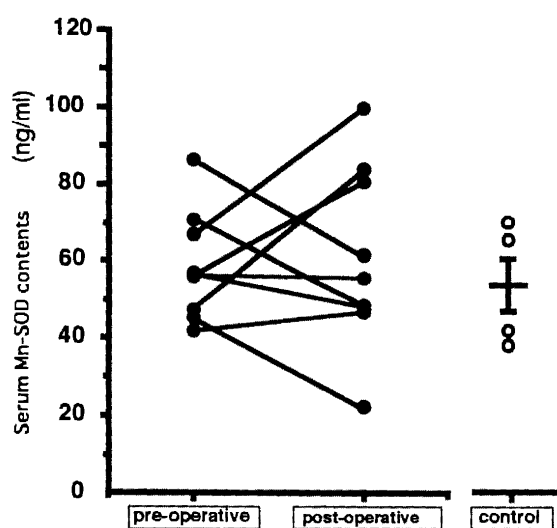
In comparison to BL6 (hypermetastatic type) with F1 (low metastatic type), the Mn-SOD content in BL6 was significantly lower than that in F1. (\*;  $P < 0.05$ )

この結果から転移能が高い甲状腺未分化癌においても他臓器の癌と同様に、なんらかの機序により SOD の発現が阻害されていることが示唆された。Mn-SOD は本来、発癌プロセスの各段階に関与していると考えられているスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) を消去するもので、正常細胞におけるその増加は緒言に述べたように、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) 増加に対応した生体側の防御反応と考えられる。すなわち、甲状腺分化癌における Mn-SOD 含量の増加は分化癌という癌細胞が、まだ正常細胞に近い機能を有して

**Table 6** measurement of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in thyroid disease

Histological diagnosis	No. of cases	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6
Adjacent normal tissue	7	1.0 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.2
Graves' disease	4	2.2 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1
Adenomatous goiter	4	7.2 $\pm$ 1.2	11.5 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.3
Follicular adenoma	5	4.4 $\pm$ 1.6	11.8 $\pm$ 3.9	1.1 $\pm$ 0.1
Papillary carcinoma	7	5.3 $\pm$ 0.3	10.4 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.5
Follicular carcinoma	7	6.2 $\pm$ 1.3	14.2 $\pm$ 2.1	3.2 $\pm$ 1.2

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.



**Fig. 9** The serum Mn-SOD contents in the pre- and post-operative patients in thyroid tumors. Nine serum samples taken from patients with various thyroid tumors were assayed for Mn-SOD enzyme content by ELISA. There were no particular tendencies in the serum Mn-SOD contents in patients post operatively.

おり、それ故に腫瘍の増殖に伴って増加するスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) に対応して、不完全な形ではあるが、Mn-SOD の発現を行うため癌としては特異的な甲状腺分化癌の性格をたもちえているのではないかと考えられる。そして、Mn-SOD の発現が完全に阻害されてしまった甲状腺未分化癌のほうが他臓器の癌と同程度の悪性度を有しているものと考えられた。

前述の腫瘍本来の増殖に伴って増加するスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) に対応して起こる Mn-SOD の発現とは別に、近年になって Mn-SOD の出現を促す物質についてはいくつか報告がなされている。TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) は1975年 Carswell らにより報告された lipopolysaccharide によって血中に誘導されるサイトカインの一種であり<sup>31</sup>、ま

た IL-1 $\beta$  は1972年に Gray らによってマウス胸腺細胞のマイトゲン反応性を増強させる因子として報告されたサイトカインの一種である<sup>32</sup>、また IL-6 は B細胞の抗体産生細胞への最終分化を誘導する T細胞由来のリンホカインとして Hirano らによって精製されたサイトカインの一種で、甲状腺自体が IL-6 というサイトカインを生み出し TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  を誘導しているともいわれている<sup>33</sup>。Grace らはその TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  働きのひとつに Mn-SOD の誘導があることを報告し<sup>34</sup>、その Mn-SOD 誘導の機序は TNF- $\alpha$  の細胞侵襲性に対する生体細胞側の防御反応であるとも言われている<sup>35</sup>。そこで、今回の SOD 含量測定で濾胞癌や乳頭癌において認められた Mn-SOD 含量の増加に関してこれら TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 などのサイトカインが影響しているか否かについての検討を行った。筆者らは免疫染色に用いた症例を含む34例の甲状腺疾患症例を TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 について測定し Mn-SOD との相関について検討したが、各因子の測定値と Mn-SOD 含量には相関を認めなかった。すなわち、SOD 含量測定で濾胞癌や乳頭癌において認められた Mn-SOD 含量の増加は TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 などのサイトカインによる誘導ではなく腫瘍自体の増殖性の結果起こってきたものと考えられる<sup>36</sup>。

次に、Mn-SOD の腫瘍マーカーとしての可能性をふくめ臨床応用について検討した。文献的には卵巣癌において血中 Mn-SOD 含量測定が診断的意義があるという報告があり<sup>37</sup>、甲状腺腫瘍患者における血中 Mn-SOD 含量の有用性を検討したが、術前術後および対照群との比較において、有意な変化を示さなかった。甲状腺腫瘍の場合、細胞質内から Mn-SOD の細胞外への分泌が行われることがないものとする。今後、症例を追加してさらに検討したい。現在、甲状腺穿刺吸引細胞診に際して微量の細胞の判定における補助診断として有用かどうかを検討中である。biopsy や手術時に濾胞癌と濾胞腺腫の鑑別がその被膜外浸潤の有無により確認できない例がある。このような例において Mn-SOD の免疫染色

は診断的意義を持つものと考え、

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、本論文の御指導と御校閲を賜りました恩師村田清高教授（近畿大学医学部耳鼻咽喉科学教室主任教授）、戸村隆訓教授（同第1生化学教室主任教授）、西田升三講師（同第1生化学教室講師）ならびに、楠 威志助手（同耳鼻咽喉科学教室助手）に深甚なる謝意を捧げます。また本研究を遂行するにあたり様々な形で協力いただきました耳鼻咽喉科学教室の諸先生方に心から感謝申し上げます。

### 文 献

- Babior BM, Kipnes RS, Curmutte JT. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent: biological defense mechanism. *J Clin Invest* 1973; 52: 741-744.
- Smith LL. The response of the lung to foreign compounds that produce free radicals. *Ann Rev Physiol* 1986; 48: 681-681.
- Kaneko T, Kaji K, Matsuo M. Cytotoxicities of alinoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chem-Biol Interact* 1988; 67: 295-304.
- 朝山光太郎. 糖尿病とフリーラジカル. *最新医学* 1990; 45: 1736-1742.
- 佐中 孜, 樋口千恵子, 小俣正子. 慢性腎不全進行因子としての活性酸素. *腎不全* 1991; 3: 73-77.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
- Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201: 875-880.
- Weisinger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase, Organelle specificity. *J Biol Chem* 1973; 249: 3582-3592.
- Weisinger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intra mitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973; 248: 4793-4798.
- Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7634-7638.
- Barra D, Martini F, Bossa F, et al. Primary structure of human Cu, Zn-superoxide dismutase. Cysteine- and tryptophan-containing peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 28: 1195-1200.
- Barra D, Schinina M, Simmaco M, et al. The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1984; 259: 12595-12601.
- Bartosz G, Leyko W, Fried R. Superoxide dismutase and life span of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 1979; 35: 1193-1193.
- Nath N, Chari SN, Rathi AB. Superoxide dismutase in diabetic polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes* 1984; 33: 586-589.
- Arai K, Iizuka S, Tada Y, et al. Increase in the glucosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glucosylation with the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 292-296.
- 寺本和弘. 実験気管支喘息モデルにおける気道過敏性亢進発症機序に関する検討:  $\beta$ -adrenergic receptor と oxygen radical に関する実験的観察. *近畿大医誌* 1993; 18: 213-232.
- Dionisi O, Gareotti T, Terranova T, et al. Superoxide radicals and hydrogen peroxidase formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues. *Biochim Biophys Acta* 1975; 403: 292-300.
- Petkau A, Monasterski LG, Kelly K, et al. Modification of superoxide dismutase in rat mammary carcinoma. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1977; 17: 125-132.
- Peskin AV, Koen YM, Zbarsky IB. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumors. *FEBS Letts* 1977; 78: 41-45.
- 楠 威志, 中野貴之, 船阪有彦ら. ヒト甲状腺腫瘍細胞のコラーゲン・ゲル培養内培養(第7報). *日耳鼻* 1993; 96: 1812.
- 楠 威志, 中野貴之, 船阪有彦ら. ヒト甲状腺病変細胞の増殖細胞核抗原. *日耳鼻* 1993; 96: 651-658.
- Iizuka S, Taniguchi N, Makita A. Enzyme-linked immunosorbent assay for human manganese-containing superoxide dismutase and its content in lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 1043-1049.
- Kawaguchi T, Noji S, Uda T, et al. A monoclonal antibody against COOH-terminal peptide of human liver manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1989; 264: 5762-5768.
- Kawaguchi T, Suzuki K, Mastuda Y, et al. Serum-manganese superoxide dismutase: normal values and increased levels in patients with acute myocardial infarction and several malignant diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody. *J Immunol Methods* 1990; 127: 249-254.
- Kuthan H, Haussmann H, Werringer J. A spectrophotometric assay for superoxide dismutase activities in crude tissue fractions. *Biochem J* 1986; 237: 175-180.
- Weisinger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase organelle specificity. *J Biol Chem* 1973; 248: 3582-3592.
- Hus SM, Raine L, Fargeer H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) and in immunoperoxidase techniques. *J Histochem* 1981; 29: 577-580.
- Bozzi A, Mavelli I, Agro AF, et al. Enzyme defence against reactive oxygen derivatives. *Mol Cell Biochem* 1976; 10: 11-16.
- Bize IB, Oberley LW, Morris HP. Superoxide dismutase and superoxide radical in Morris hepatomas. *Cancer Res* 1980; 40: 3686-3693.
- Oberley LW, Buettner GR. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res* 1979; 39: 1111

- 1149.
31. Carswell EA, Old LJ, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3666-3670.
  32. Grey I, Gershon RK, Waksman BH. Potentiation of cultured mouse thymocyte responses by factors released by peripheral leucocytes. *J Immunol* 1971; 107: 1778-1780.
  33. Weetman P, Bright T, Freeman M. Regulation of interleukin-6 release by human thyrocytes. *J Endocrinol (England)* 1990; 127: 357-361.
  34. Wong GHW, Goeddel DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 1988; 242: 941-945.
  35. Wong GHW, Elwell JH, Oberley LW, et al. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 1989; 58: 923-931.
  36. Funasaka K, Nishida S, Kimoto S, et al. Change of superoxide dismutase in human thyroid tumors and its induction factors. *Proc Jpn Cancer Assoc* 1994; 53: 578-578.