

原 著

エンドトキシン投与時の生化学的研究

——過酸化脂質の産生機序とこれに及ぼす
抗酸化剤の効果を中心として——

京都大学結核胸部疾患研究所 臨床肺生理学部門

関 川 利 幸

(昭和58年6月1日受付)

緒 言

近年、高濃度酸素、オゾンや二酸化窒素等のオキシダント、さらにパラコート中毒による肺組織障害発生の原因因子として活性酸素や過酸化脂質等のフリー・ラジカルが指摘されている^{1,2,3)}。これらのフリー・ラジカルの細胞障害作用は、Tappel⁴⁾ Demopoulos⁵⁾ らにより報告されており、細胞膜の構造上の、そして機能上の破壊がその本体であるとされている。表-1はHyers⁶⁾ らが掲げる透過型肺水腫形成の原因としての肺毛細血管内皮細胞障害因子であるが、このなかには活性酸素の一種であるスーパーオキシド・アニオン (O_2^-) が含まれている。

一方、グラム陰性菌感染にひきつづきショッ

クとなり呼吸不全に陥った場合に致死率が高いことは、呼吸及び循環管理の技術が進歩した現在でもなお大きな臨床上的問題である^{7,8)}。

実験的にもエンドトキシン・ショックに陥った動物で肝組織中の過酸化脂質が増加するとの報告がみられるが^{9,10)}、このことから、エンドトキシン・ショックにおいてもフリー・ラジカルの関与が考えられる。しかし、現在迄のところ、エンドトキシン・ショック時における肺水腫発生とフリー・ラジカル、特に過酸化脂質との関係を論じた報告はみられないようである。そこで、著者はエンドトキシン投与時においてフリー・ラジカルである過酸化脂質の産生と組織障害発生との関係を調べ、さらに過酸化脂質に及ぼす抗酸化剤の効果を実験的に検討した。

表-1 肺微小血管障害をひきおこす因子⁶⁾

PUTATIVE MEDIATORS OF PULMONARY MICROVASCULAR INJURY
C5 ^a
SUPEROXIDE ANIONS
LEUKOCYTE NEUTRAL PROTEASES (ELASTASE)
HISTAMINE
ENDOTOXINS
FIBRIN (OGEN) DEGRADATION PRODUCTS
KININS

I. エンドトキシン投与時にみられるラット組織過酸化脂質の産生とそれに対する生体側防御機構の経時的变化。

I) 実験方法

実験動物として体重 150~200 g の雄 HLA-Wister 系ラットを使用し、エンドトキシンは E. Coli 011: B4 lipopolysaccharide (Difco 社) を用いた。実験はショック状態を作製するための大量 1 回投与群及び循環動態にさほど変化を

もたらさない量のエンドトキシンの持続作用を観察するための少量反復連続10日間投与群とに大別した。

1. エンドトキシン大量1回投与群 (A群)

体重 kg 当り 7.5 mg のエンドトキシンをラットの腹腔内に注入し、その後 6, 12, 24, 48 時間目と経時的にラボナル麻酔下にて腹部大動脈より脱血し屠殺した。

2. エンドトキシン少量反復投与群 (B群)

体重 kg 当り 1 mg のエンドトキシンを1日1回10日間連続して腹腔内に注入し、その間3日, 7日, 10日目にA群と同様の処置で屠殺した。

両群とも肺, 肝組織は *in situ* でそれぞれ肺動脈, 門脈より 4°C の生理的食塩水で灌流し, 可能な限り血液を除去した後摘出した。肺の大きな血管, 気管及び肝の血管を除去した後重量を測定し, 10倍量の生理的食塩水を加え日本精器製ホモジェナイザーで3分間ホモジェナイズした。このホモジェネートの一部は過酸化脂質測定用の試料とし, 又図-1にあるような操作を加えてスーパーオキシド・ディスムターゼ (superoxide dismutase 以下 SOD と略), グルタチオン・パーオキシダーゼ (glutathione peroxidase 以下 GSH-px と略) 活性測定のための試料とした。過酸化脂質は thiobarbitunic acid と反応させ, 515 nm の励起波長に

より 553 nm に蛍光スペクトルの極大を有するチオバルビツール酸反応物質 (thiobarbituric reactive substance 以下 TBARS と略) を形成し測定する八木の方法¹¹⁾によった。SOD (EC 1.15.11 superoxide : superoxide oxidoreductase) 活性の測定は Beauchamp-Fridovich らの方法に準じた^{12,13)}。GSH-px (EC 1.11.1.9 glutathione: H₂O₂ oxido-reductase) 活性の測定は Paglia-Valentine の方法に準じた^{14,15)}。各試料中の蛋白濃度, ヘモグロビン濃度の測定はそれぞれ Lowry 法, Cyanmethemoglobin 法によった。分光光度計は UNIONGIKEN SM 401 と ZEISS PMQ 3 を, 分光蛍光光度計は, SHIMAZU UV 250 を使用した。

統計処理は student の t 検定にておこない P < 0.05 をもって有意差があるものとした。

II) 実験結果

図-2 はエンドトキシン 7.5 mg/kg 1回, 及び 1 mg/kg 1回投与時のラット体動脈圧の変化である。7.5 mg/kg 投与では二相性の血圧低下が認められショックに陥る典型的なパターンを示すのに対し, 1 mg/kg の投与では血圧の変化は認められない。この結果よりA群ではショック状態における各測定値の変化を観察しているのに対し, B群では血圧の変動を介さない, エンドトキシンのより直接的な作用を観察しているものと考えられる。

表-2, 3及び4に, A群とB群の肺, 肝組織, 及び血液の TBARS 値, SOD 活性, GSH-px 活性の実測値を, 図-3 及び 4 に両群における TBARS 値, SOD 活性, GSH-px 活性の変化率を対照を100%としてそれぞれ示してある。

1. TBARS 値の変化: A群では, 肺, 肝組織ともにエンドトキシン投与後6時間目から有意な上昇が認められ, 24時間目で最高となり対照値に対し, 肺組織では約2倍, 肝組織では約9倍となった。48時間後ではすでに減少傾向をとるが両組織ともに対照と比較すると有意に高値となっている。血漿中の TBARS 値も全経過を通じて有意な上昇が認められ, 12時間目に最高になり対照の約3.7倍となった。B群でも

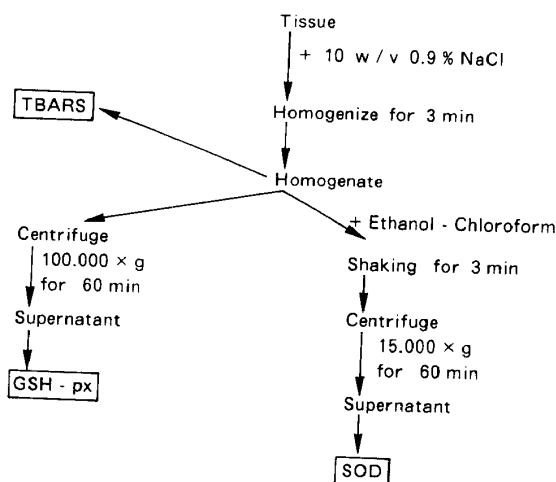


図-1 組織 TBARS, 及び SOD GSH-px 活性測定用試料の作製過程

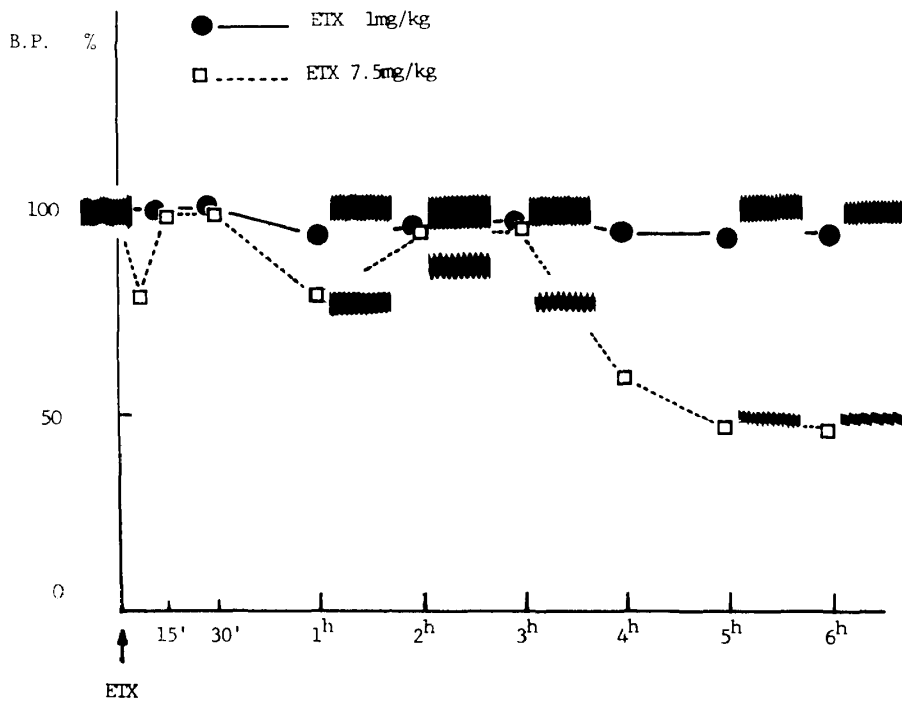


図-2 ETX 7.5mg/kg 及び 1mg/kg の腹腔内投与時のラット体動脈圧の変化

肺・肝両組織中の TBARS 値の上昇は認められ、エンドトキシン投与後 3～7 日目に対照値に比して肺組織では約 2 倍、肝組織では約 4 倍程度となり、10 日目では減少傾向を示した。血漿中 TBARS 値も上昇傾向は示したが有意な変化ではなかった。

2. SOD, GSH-px 活性の変化：A 群にお

いては、肺・肝両組織ともに SOD 活性の有意な低下が認められた。GSH-px 活性の低下は肝組織で初期にのみ認められたが時間の経過とともに対照値に復した。血液中の両酵素活性には変化は認められなかった。B 群においては、肺組織で SOD 活性の有意な低下が認められた以外には著明な変化はなかった。

表-2 ETX 大量 1 回及び少量反復投与における肺組織 TBARS 値及び SOD, GSH-px 活性値

ETX 7.5mg/kg						
	TBARS ^a		SOD ^b		GSH-px ^c	
C	31.33 ± 4.03	%	2100.0 ± 104.9	%	10.99 ± 0.54	%
6h	61.39 ± 8.61	196	1458.7 ± 114.9	69	11.06 ± 1.10	101
12h	55.72 ± 11.71	178	1500.8 ± 106.8	71	10.70 ± 1.27	97
24h	67.75 ± 8.43	216	1218.6 ± 41.1	58	10.93 ± 0.55	99
48h	52.20 ± 7.30	167	1500.8 ± 119.7	71	10.86 ± 0.61	99
ETX 1mg/kg × 10						
	TBARS ^a		SOD ^b		GSH-px ^c	
C	30.05 ± 3.52	%	2214.9 ± 149.6	%	11.18 ± 0.60	%
3d	47.60 ± 5.08	175	1857.0 ± 299.7	84	11.75 ± 0.67	105
7d	57.82 ± 8.89	192	1829.5 ± 255.3	83	11.52 ± 1.12	103
10d	40.03 ± 8.35	134	1772.8 ± 213.5	80	10.90 ± 0.79	97

a: nmols/g wet tissue

b: U/Lung

c: μmols NADPH/min·Lung

表-3 ETX 大量1回及び少量反復投与における肝組織 TBARS 値及び SOD, GSH-px 活性値

ETX 7.5 mg/kg						
	TBARS ^a		SOD ^b		GSH-px ^c	
C	39.20±5.26	%	45157.3±3580.6	%	256.4±25.7	%
6h	209.30±45.47	534	37827.2±1469.2	84	206.3±7.2	80
12h	257.80±15.76	658	33740.6±3395.0	75	217.8±36.9	85
24h	353.30±20.70	901	34222.5±1324.0	76	240.0±46.3	94
48h	187.60±22.60	479	36403.8±1280.1	81	254.9±26.0	99
ETX 1mg/kg×10						
	TBARS ^a		SOD ^b		GSH-px ^c	
C	40.60±11.79	%	40555.8±3172.9	%	279.9±43.0	%
3d	185.71±38.37	457	40453.5±6291.9	100	296.7±46.2	106
7d	150.68±51.03	371	40296.2±4380.5	99	307.9±44.1	110
10d	64.40±6.60	159	41958.7±4616.4	103	307.9±23.0	110

a: nmols/g wet tissue b: U/Liver c: μmols NADPH/min·Liver

表-4 ETX 大量1回及び少量反復投与における血液 TBARS 値及び SOD, GSH-px 活性値

ETX 7.5 mg/kg						
	TBARS ^a		SOD ^b		GSH-px ^c	
C	3.15±0.46	%	118.1±4.5	%	3.11±0.02	%
6h	8.13±2.51	258	116.9±6.8	99	2.88±0.30	93
12h	11.73±4.73	372	114.9±7.1	97	3.12±0.02	100
24h	5.53±0.99	176	116.9±6.8	99	3.08±0.01	99
48h	3.88±0.32	123	121.3±8.3	103	3.05±0.07	98
ETX 1mg/kg×10						
	TBARS ^a		SOD ^b		GSH-px ^c	
C	2.90±0.21	%	129.9±9.2	%	3.08±0.16	%
3d	3.37±1.22	116	123.3±12.4	94	3.18±0.33	103
7d	3.81±1.24	131	129.2±8.9	99	3.44±0.18	117
10d	3.19±0.61	110	124.9±5.3	96	3.22±0.18	105

a: nmols/ml b: U/mg pr. c: μmols NADPH/min. μmols Hb.

III) 本項考察

産生された過酸化脂質が生体にとって有害であり、組織障害拡大作用を有することは、in vivo¹⁶⁾ in vitro¹⁷⁾ において報告されている。その反面、過酸化脂質の産生が常に生体に障害作用のみをもたらすのではないことは、近年次々と知見が得られている Prostaglandin の合成過程において¹⁸⁾、また白血球の貪食・殺菌作用に

においても¹⁹⁾これが利用されている例で認められている。このようにある面では生体にとって必要である過酸化脂質が有害作用を現わすのは、それが無秩序に、そして大量に産生され、同時に前後して、又は併行して細胞構造の破壊をもたらす他の原因が存在する場合においてであると考えられる。例えば、ショック状態では低酸素そのものによる過酸化脂質の産生の亢進があ

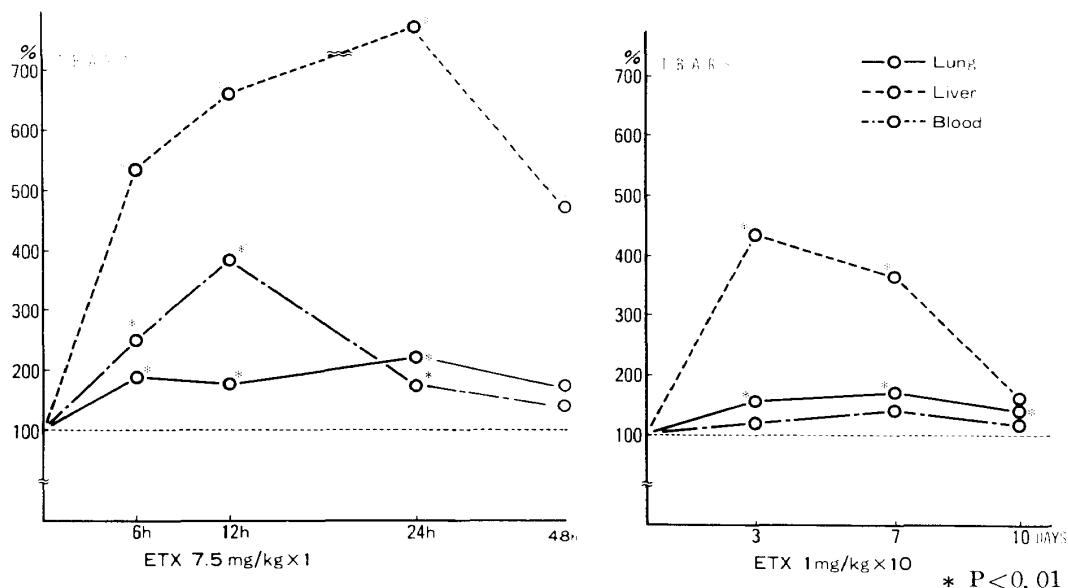


図-3 ETX 大量1回及び少量反復投与における肺, 肝組織及び血液中の TBARS 値の経時的変化率

ると同時に、末梢循環からのライソゾーム酵素の放出によって細胞構造の破壊が進行することが互に原因と結果となり障害をもたらし、また拡大してゆくと考えられる。

一方、生体は過酸化脂質の産生を抑制するための機構を有し過度の蓄積による障害作用の発現を阻止している。反応性の高いフリー・ラジカルの除去機構として、活性酸素である superoxide anion (O₂⁻) に対する SOD²⁰⁾ や、hydrogen peroxide (H₂O₂) に対する catalase, GSH-px²¹⁾ 等の酵素が代表的なものである。フリー・ラジカルとしての過酸化脂質の消去には α-tocopherol (Vitamine-E)²²⁾ の作用や、GSH-px²¹⁾ による分解が知られている。さらに前述のように、何らかの機序で、酸素や不飽和脂肪酸のフリーラジカルが細胞内可溶性分画中に生じたとしてもこれが直ちに組織過酸化脂質の蓄積へと進行するものではなく、同時に細胞内構造が破壊されるような障害が加えられ、細胞膜の断裂が生じ、フリーラジカルによって細胞膜構成不飽和脂肪酸が攻撃され易い状態となる必要があると考えられる。つまり正常の細胞は脂質の過酸化に対し、その構造が細胞内顆粒というコンパートメント化されていることによって保護されていると言えるであろう。

今回のラットへのエンドトキシン投与実験で

は、大量1回投与でも、また少量反復投与でも組織過酸化脂質濃度が上昇し、同時に組織 SOD 活性が著明に低下した結果となった。この組織過酸化脂質の蓄積の原因としては、第一にその産生が増加した場合、第二に生成された過酸化脂質に対する除去機構の能力が低下した場合を考慮する必要があると思われる。

まず、組織過酸化脂質の産生増加についてであるが、エンドトキシン・ショックにみられる組織過酸化脂質の増加はマウスに LD₅₀ のサルモネラ・エンドトキシンを投与した場合、肝臓過酸化脂質が増加したとする Sakaguchi⁹⁾ らの報告や、ラットに E. Coli エンドトキシンを投与し同様の結果を得た守田¹⁰⁾ らの報告がある。ショックに陥った場合の過酸化脂質の産生増加は、組織低酸素によると考えられている。その機序を説明するものとして、低酸素状態では、電子伝達係より逸脱した電子が不飽和脂肪酸を直接還元するとした Demopoulos らの Alkyl radical 産生説²³⁾ と、低酸素状態解除後に供給された酸素分子が不完全還元によって活性酸素が生成されるためとした Kogure らの説²⁴⁾ がある。過酸化脂質の産生は組織低酸素状態中においてか、あるいは低酸素状態の解除後においてなのか、さらに、それには活性酸素が必要か否かが両学説の対立点であるがいまだ結論はで

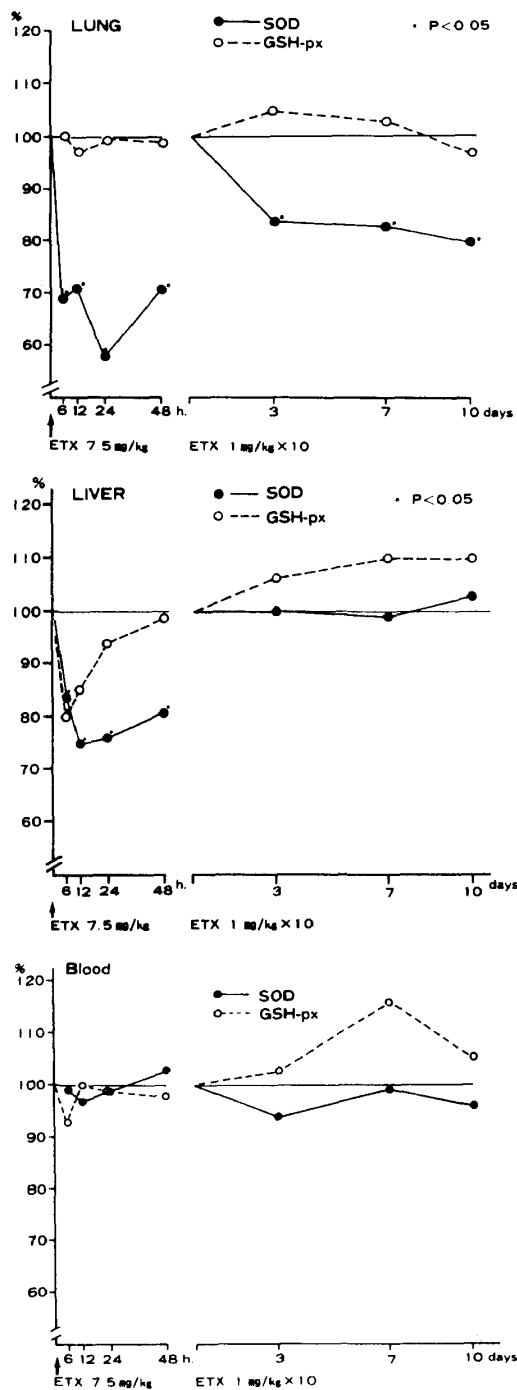


図-4 ETX 大量1回及び少量反復投与における肺, 肝組織及び血液中の SOD, GSH-px 活性の経時的变化率

ていない。いずれの説においても、エンドトキシン・ショックにおける組織過酸化脂質の産生増加を説明はできるものと思われる。

ショックに陥るような大量のエンドトキシン投与での過酸化脂質の産生機序は上述の機序で説明は可能であるが、循環動態にさほど影響

しないと思われる少量反復投与でも組織過酸化脂質が増加するのは如何なる理由によるものか。この点に関しては、次項で述べるように抗酸化酵素である SOD 活性の低下もその一因であると考えられるが、エンドトキシンの生体に対する作用からもう一つの過酸化脂質の産生増加機序が推測される。

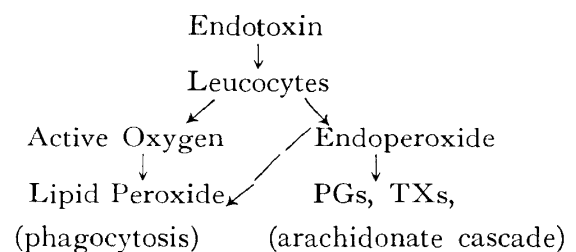
エンドトキシンの生体に対する作用は発熱作用から、ショック惹起, 致死作用迄種々の程度のもがみられるが、その大部分は白血球, その他の血液成分を介するものである^{25,26,27}。また, エンドトキシンを投与した場合に認められる著明な病理組織学的変化は、多核白血球の血管内凝集である。Balis ら²⁸ は、猿にエンドトキシンを投与し、肺毛細血管内や肝洞静脈及び中心静脈に多形核白血球が沈着し、それが脱顆粒現象をひきおこし自己破壊へと進行し、ライゾーム酵素を放出し、同時に周囲組織の障害が生ずることを認め、この過程においてこれらの多形核白血球は活発な貪食作用を有し、細胞内に多数の貪食泡を形成しその内容物はエンドトキシンであったと報告している。Coalson ら²⁹ もエンドトキシンを投与された猿の肺の電子顕微鏡学的観察において、投与後15分で多形核白血球の血管内皮細胞への沈着が既に認められると述べ、さらに毛細血管内皮細胞障害はこの多形核白血球が沈着した部位にのみ存在することを報告した。これらの結果は、エンドトキシン投与時にみられる肺水腫の原因として多形核白血球の肺毛細血管内皮細胞障害を示唆したものと考えられる。エンドトキシンによる多形核白血球の血管内皮細胞への沈着は補体の活性化 (C_{5a}) を介するものであることが O'Fraherty³⁰, Hohn ら³¹ によって述べられ、彼らもグラム陰性菌敗血症や、エンドトキシン血症時の肺組織障害はこの補体を介した多形核白血球の血管内皮細胞への沈着が原因であると推測している。臨床上、グラム陰性菌感染の患者で補体の活性化が認められることは Fearon ら³² によって報告されているところから、ヒトのエンドトキシン・ショックにおいても白血球による血管内皮細胞障害が存在すると考えられる。異物貪

食能の亢進した多形核白血球が活性酸素 (O_2^- , H_2O_2) を放出することは Yost ら³³⁾, Root³⁴⁾ らにより報告されているし, その respiratory burst 及び殺菌作用との関係が Babior³⁵⁾ によって総説されている。また補体の存在下にエンドトキシンと接触するだけでも白血球から活性酸素が放出されるとの報告も Goldstein³⁶⁾, Sacks ら³⁷⁾ によってなされている。このようにして肺毛細血管に沈着した多形核白血球から放出された活性酸素 (O_2^- , H_2O_2) が, より反応性の高い hydroxy radical (OH) や singlet oxygen (1O_2) へと変化し, 同時に放出されているであろうライソゾーム酵素の作用で破壊された細胞膜の多価不飽和脂肪酸に働いて過酸化脂質を産生すると推測される。事実, Stossel ら³⁸⁾ は, polystyrene beads や熱処理された菌体で活性化された多形核白血球と不飽和脂肪酸の linolenic acid とを反応させることにより過酸化脂質が産生されることを TBA 法で証明している。

さらに, エンドトキシン投与時にみられる過酸化脂質の産生増加には, 上記の機序に加えて Prostaglandin (PGs) や Thromboxane (TXs) との関係を検討せねばならない。各種生理活性を有する PGs や TXs もアラキドン酸から酵素的に生成される過酸化脂質の一種であることは周知の事実であり, エンドトキシンのショックをはじめとする生体作用の発現にとって重要であることもまた数多く報告されている。Gonde ら³⁹⁾ はエンドトキシン・ショックに陥ったラットの肝ミトコンドリアからアラキドン酸が遊離されることを報告した。Cook ら⁴⁰⁾ は必須脂肪酸欠乏ラットは, エンドトキシン・ショックに対し抵抗性があり, それは組織内のアラキドン酸やリノール酸が減少し PGs や TXs の合成が減少するためであろうと推測している。また, より直接的に Feuerstein ら⁴¹⁾ はエンドトキシンを投与されたラットの肺組織は PGs や TXs を大量に産生したと報告し, Smith ら⁴²⁾ は, 羊をもちいた病理学的考察を加味した実験から, エンドトキシン投与初期に認められる肺高血圧とひき続く肺組織障害には白血球の肺毛細血管への沈着及び肺局所の Thromboxane A_2 (TX

A_2) 産生亢進が関係していると述べ, この TX A_2 は沈着した白血球か, 肺毛細血管内皮細胞由来であろうと推測している。このようにして局所濃度の上昇した PGs が, それ自身過酸化脂質として細胞膜中の他の不飽和脂肪酸に作用して過酸化反応をひきおこす可能性は生ずるものと思われる。Kuehl ら⁴³⁾ は, 大きな組織障害作用を有するのは生成された PGs (E, Ftype) ではなく, むしろ endoperoxide である PG G_2 それ自身か, その際同時に産生される PG 作用の無いフリー・ラジカルであると述べ, PG 産生と過酸化脂質産生との間に密接な関係があることを示唆している。著者も⁴⁴⁾, エンドトキシン投与にみられる組織過酸化脂質の増加をインドメサシンの前処置で抑制し得たとの結果を得ている。

白血球系を介する過酸化脂質産生の亢進は下記のような貪食作用と PGs 産生との二つの過程に関係するものと推測される。



以上, エンドトキシン投与時にみられる過酸化脂質産生増加の機序には, ショック状態による組織低酸素のためのフリー・ラジカルの増加による場合と, エンドトキシンによって活性化され組織毛細血管に沈着した白血球を介する場合があると考えられる。しかし, 各々の関与する割合は不明であり今後解明されねばならない問題である。

次に, 過酸化脂質の除去機構とその変化についてであるが, エンドトキシン・ショックに陥った動物の肝組織 SOD 活性の低下は守田ら¹⁰⁾, Sakaguchi ら⁹⁾ によって報告され, その原因はショック状態のための組織破壊であろうと推測している。そのような組織低酸素による細胞障害のための二次的な酵素活性の低下ならば, SOD, GSH-px 活性の抑制率が経時的に同程

度認められるはずである。しかし、本実験において、GSH-px 活性抑制の程度は、SOD 活性のそれに比して軽度で、回復も速い。特に肺組織では SOD 活性の著明な低下が認められたが GSH-px 活性の変化は認められない結果となった。この傾向は組織低酸素が生じていないと思われるエンドトキシン少量反復投与群(B群)でもみられた。図-5は組織 TBARS 値と、組織 SOD 及び GSH-px 活性との関係を肺、肝両組織で図示したものである。SOD 活性と TBARS 値との間には負の相関が認められる

が、GSH-px 活性は TBARS 値にかかわらずほぼ一定となった。このことは SOD, GSH-px 活性の変化には、組織破壊による二次的な活性低下以外の因子が存在している可能性を考える必要があることを示唆するものである。

Frank ら⁴⁵⁾は、微量のエンドトキシン (B群の1/2~1/10量)を投与されたラットは高濃度の酸素に対して耐性を獲得することを認め、それは肺組織中の SOD, GSH-px, catalase 等の酵素活性が増加するためであることを報告したが、その際 SOD と GSH-px 活性の増加率を比較

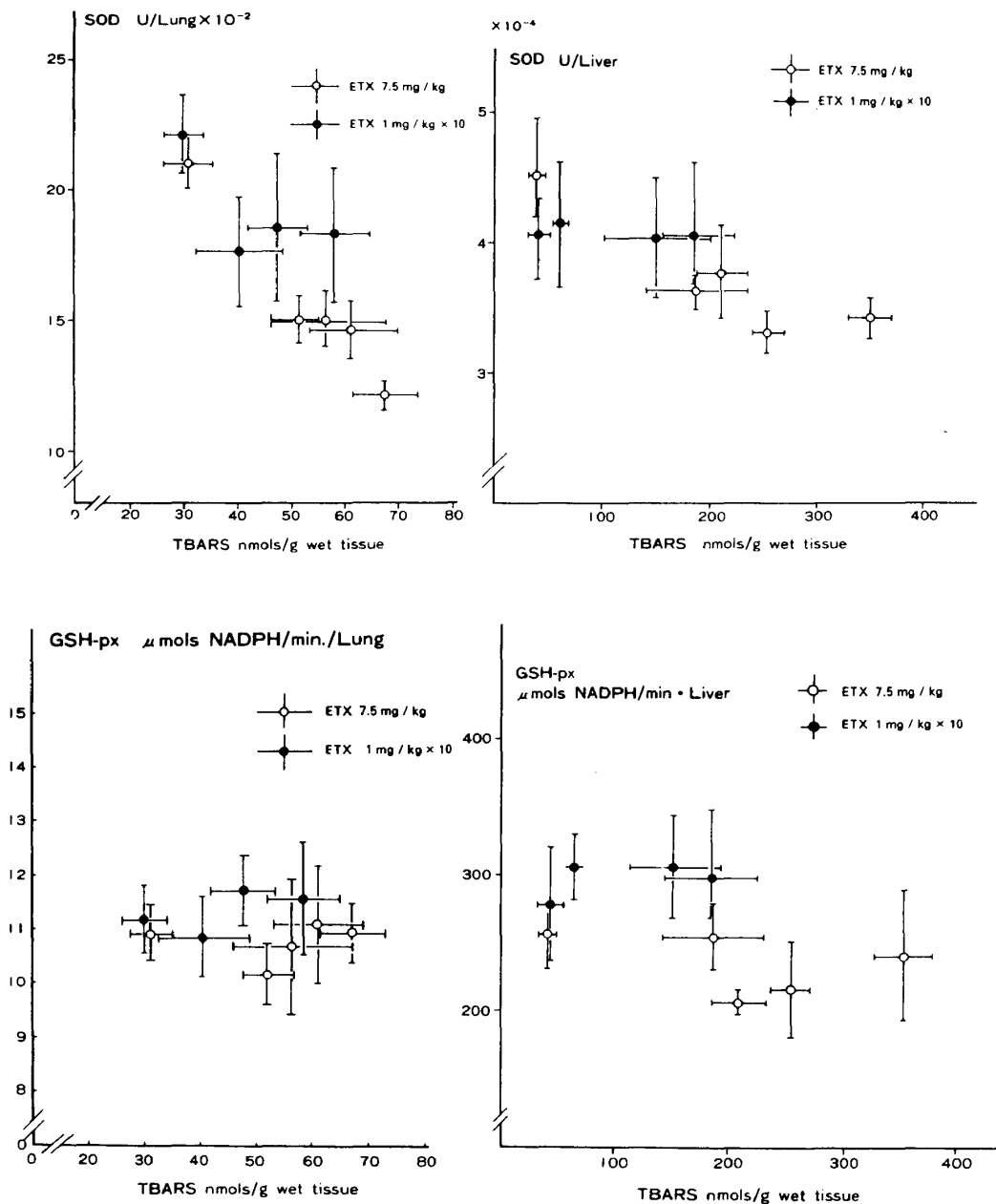


図-5 肺、肝組織における TBARS 値と SOD, GSH-px 活性との関係

すると GSH-px 活性の増加率が高い結果を示している。Chow ら⁴⁶⁾は、オゾンに暴露されたラットで肺過酸化脂質の濃度と肺 GSH-px 活性との間に正の相関があることを報告している。また、Nohl ら⁴⁷⁾は、ラット心筋細胞のミトコンドリア内の SOD 活性及び GSH-px 活性の加齢における変化を調べ、GSH-px 活性は加齢とともに増加し、これは、基質とする H₂O₂ や過酸化脂質の濃度の増加によって酵素誘導されたためであるとした。これに対し、SOD 活性の増加はみられなかった。これらの報告は、GSH-px はその基質である過酸化脂質により酵素誘導を受け易い酵素であることを示している。

一方、本実験で測定した SOD 活性は細胞可溶性分画中の銅と亜鉛を含有する酵素 (Cu-Zn SOD) であるが、ラットに85%酸素を投与し、肺組織中の SOD 活性が増加したとする Crapo ら⁴⁸⁾の結果では、この SOD 活性の増加はミトコンドリア分画中のマンガンを含む酵素 (Mn-SOD) によるものであり、Cu-Zn SOD 活性の増加は少ないと報告されている。さらに、組織低酸素によっても SOD 活性は増加するが、それもミトコンドリア内の Mn-SOD に特異的であることが Sjostrom ら⁴⁹⁾により述べられている。これらのことから、本実験で測定した SOD (Cu-Zn SOD) 活性は、エンドトキシン投与による組織破壊をそのまま反映している

のに対し、GSH-px は増加した過酸化脂質や、H₂O₂ によって酵素誘導を受けることにより活性の低下が抑制されたり、逆に活性の上昇がみられるのではないかと推測される。

Erhardt ら⁵⁰⁾は、兎の後肢に自己血液で血腫を形成させると、肺コンプライアンスは低下し組織学的に無気肺や間質性肺水腫が生じ、ヒトの外傷後の ARDS に類似した所見を得た。この時、肺組織 SOD 活性も低下し過酸化脂質産生の防御機構に障害が生ずることを認めている。この結果は、非感染性の外傷後の呼吸不全をはじめ、広範囲の疾患に対して過酸化脂質による組織障害が関与していることを推測させるものであると考えられる。しかし、彼らの結果からも、また今回の著者の結果からも SOD 活性の低下が組織過酸化脂質濃度上昇の直接的原因になっているのか否かは判らない。

以上、エンドトキシンをラットに投与した場合の組織過酸化脂質の蓄積は、一方では産生の増加があり、また同時に抗酸化酵素—特にSOD—活性の抑制が存在するためでもあると考えられ、図-6にその概要を示した。

次に、肺、肝組織中の過酸化脂質の相関について述べてみたい。図-7にみられるようにショックの有無にかかわらず肺組織 TBARS 値と肝組織 TBARS 値との間に正の相関があることは臨床上の敗血症ショック後の肺障害や、実

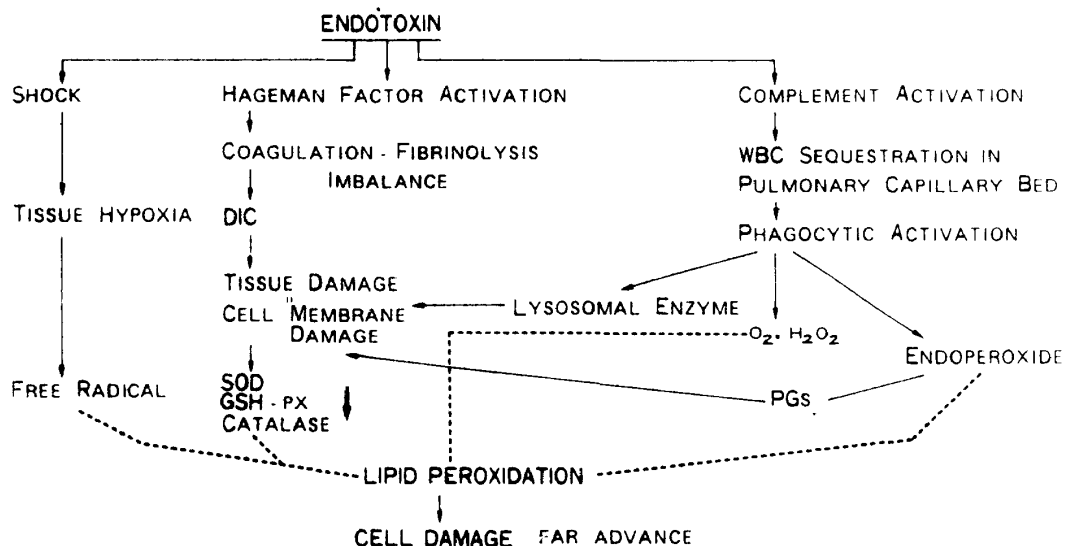


図-6 ETX 投与時の過酸化脂質形成の機序

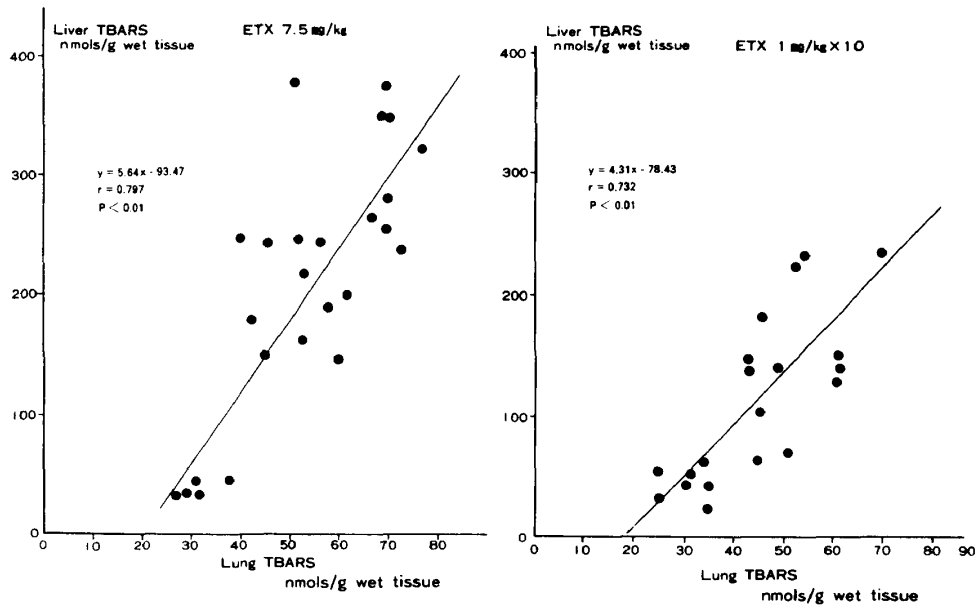


図-7 ETX 大量1回及び少量反復投与における、肺組織 TBARS 値と肝組織 TBARS 値との関係

験的エンドトキセミアにおいての肺障害が多臓器障害の一症状であり、その原因として過酸化脂質が広く関与していることを示すと考えられる。実験的に腹腔内に投与されたエンドトキシンは門脈から肝臓に運ばれ、肝 kupffer 細胞で処理されるが、その際処理能力以上のエンドトキシンが肺をはじめ各臓器に障害をもたらすと考えられる。この意味から、エンドトキセミア

の程度、及び各臓器障害の程度は肝臓の細網内皮系の異物処理能力に依存していると言っても過言ではない。本実験にみられるような肝組織過酸化脂質の増加は肝臓の構造上または機能上の障害を示すものであり、当然肝細網内皮系の機能低下も存在すると考えられる。敗血症、外傷等では肝細網内皮系の機能低下がおこり^{51,52)}、

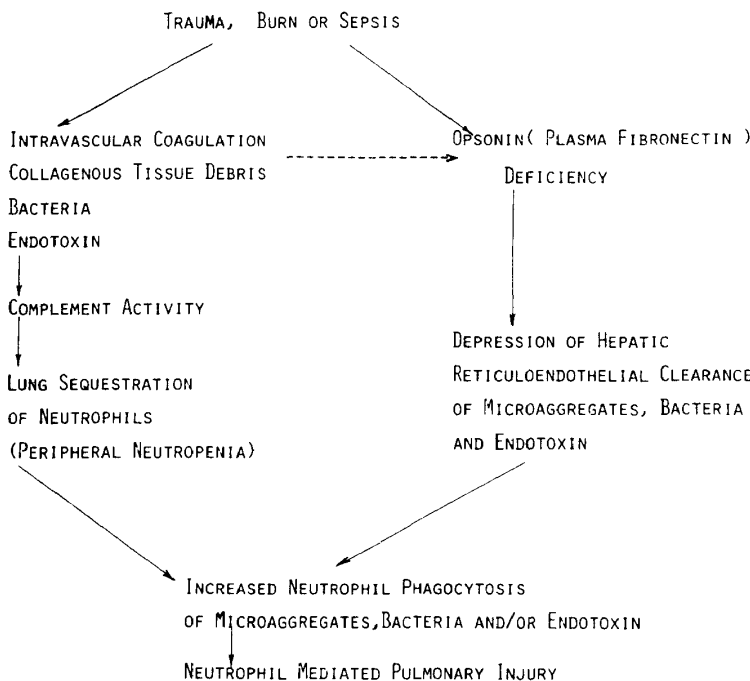


図-8 白血球、補体、細網内皮系が関与する肺組織障害の機序⁵³⁾

白血球により肺毛細血管内皮細胞障害が増強されることが Lancer ら⁵³⁾によって報告されている。この白血球を介する肺組織障害が表-1に掲げた Hyers らの主張する ARDS の原因因子と関係するものであり、本考察にて推測したような過酸化脂質の産生亢進をひきおこす機序の一つになり得ると考える。

このように過酸化脂質の面からも ARDS が多臓器障害の一つの症状であり、その発生や治療、予後の決定には肝臓の機能を考慮に入れる必要があるという従来の説の重要性が示されるものと考えられる。

II. ラット, エンドトキシン・ショックにみられる組織過酸化脂質の産生と肺水腫形成及び致死率に対する各種抗酸化剤の影響について。

I) 実験方法

実験動物は, 体重200グラム程度の雄の HLA-Wister 系のラットを用い, エンドトキシンは E. Coli oll: B4 Lipopolysaccharide (Difco 社) を使用した。全体を5群に分け, 体重 kg 当り 7.5 mg のエンドトキシンの投与60分前に体重 kg 当り 1 g の glutathione (GSH), 250 mg の α -tocopherol, 30,000 U の SOD を単独もしくは併用で投与した。第6群としてプレドニゾン 10 mg/kg の前処置群も作製した。

- G-I : GSH →ETX 7.5 mg/kg
- G-II : α -toco →ETX
- G-III : SOD →ETX
- G-IV : GSH + α -toco →ETX
- G-V : GSH + α -toco + SOD →ETX
- G-VI : predonisolon 10 mg/kg →ETX

そしてエンドトキシン投与後24時間目において各群の死亡率, 肺水腫の指標として湿肺重量の体重比 (L/B), 組織 TBARS 値, 及び S-GOT, S-GPT を測定した。組織 TBARS 値は実験(I)と同様の方法について行った。

II) 実験結果

表-5に各群の死亡率, L/B 比, 組織及び血漿中の TBARS 値が, 表-6に S-GOT, S-GPT の値が示してある。図-9に死亡率, 図-10に L/B 比の変化, 図-11に肺, 肝両組織中の TBARS 値の変化が図示してある。また, 図-12に各群の前処置の有無における S-GOT, S-GPT の変化を図示してある。

まず, 死亡率は GSH 単独 (I), もしくは併用 (IV) (V) で著明な低下が認められた。それに対し α -tocopherol 単独 (II), SOD 単独 (III) では改善はみられなかった。

次に, 肺水腫形成の指標としての L/B 比は前処置各群ともに抑制が認められた。各群間に有意差は認められないが, 特に GSH 単独 (I), プレドニゾン (VI), においてその効果が大きであった。

表-5 ETX 7.5 mg/kg 投与24時間目の各群の死亡率, L/B 比及び TBARS 値

	mortality		L/B (%)				TBARS									
	(%)	N	%		N	blood ^a			Liver ^b			Lung ^c		N		
I GSH	-	30	10	0.70±0.12	100	10										
	+	6.7	15	0.53±0.05	75	15	4.18±0.44	105	9	86.0±10.0	168	9	53.1±5.5	130	9	
II α -toco.	-	30	10	0.65±0.12	100	10										
	+	30	10	0.53±0.05	82	10	3.58±0.34	90	8	91.9±6.6	179	8	62.1±5.7	151	8	
III SOD	-	40	10	0.71±0.03	100	10										
	+	30	10	0.60±0.04	85	10	4.70±0.43	118	5	150.7±23.9	294	5	70.9±7.6	173	5	
IV GSH + α -toco.	-	30	10	0.82±0.12	100	10										
	+	10	10	0.67±0.05	82	10	4.53±0.59	113	6	69.5±1.9	136	6	50.5±4.0	123	6	
V GSH + α -toco. + SOD	-	40	10	0.62±0.05	100	10										
	+	0	10	0.49±0.05	79	10	4.21±0.21	105	7	62.2±7.7	121	7	44.5±2.3	109	7	
VI predonisolon	-	40	10	0.66±0.11	100	10										
	+	0	10	0.46±0.04	70	10	4.65±0.57	116	5	96.0±17.0	188	5	46.1±13.2	113	5	
ETX only normal				0.71±0.12	100	10	5.90±0.27	148	9	222.7±50.6	434	9	86.1±11.0	111	9	
				0.52±0.05	73	10	4.00±0.42	100	5	51.2±6.3	100	5	40.9±4.00	100	5	

a: nmols/ml b: nmols/g wet tissue

表-6 各前処置群の S-GOT, S-GPT の値

	S-GOT		N	S-GPT		N
	-	+		-	+	
I GSH	1049.4 ± 550.1	6	372.3 ± 180.9	6		
	166.9 ± 43.3	9	36.7 ± 14.6	9		
II α-toco.	771.0 ± 72.2	7	232.5 ± 142.7	8		
	547.9 ± 179.3	7	126.2 ± 28.7	8		
III SOD	1771.3 ± 591.7	5	478.5 ± 208.0	5		
	1701.0 ± 401.6	5	458.7 ± 133.5	5		
IV GSH α-toco.	1342.6 ± 535.7	5	336.0 ± 111.3	5		
	280.5 ± 214.2	6	74.3 ± 92.0	6		
V GSH α-toco. SOD	1220.0 ± 237.9	5	304.0 ± 85.3	5		
	379.8 ± 215.8	7	76.8 ± 54.7	7		
VI predon- isolon	1476.0 ± 1305.6	5	451.6 ± 403.3	5		
	130.8 ± 41.5	5	40.8 ± 13.2	5		

さらに、肺、肝における TBARS 値は、いずれの群においてもエンドトキシンによる増加に対して抑制効果があるが、SOD (III) では効果が最少で、三剤併用 (V)、GSH と α-tocopherol 二剤併用群 (IV) で効果が大きであった。

また、S-GOT, S-GPT はエンドトキシン投与後24時間目で著明な上昇が認められたが、α-tocopherol 単独 (II), SOD 単独 (III) 前処置ではこの上昇を抑制し得なかった。

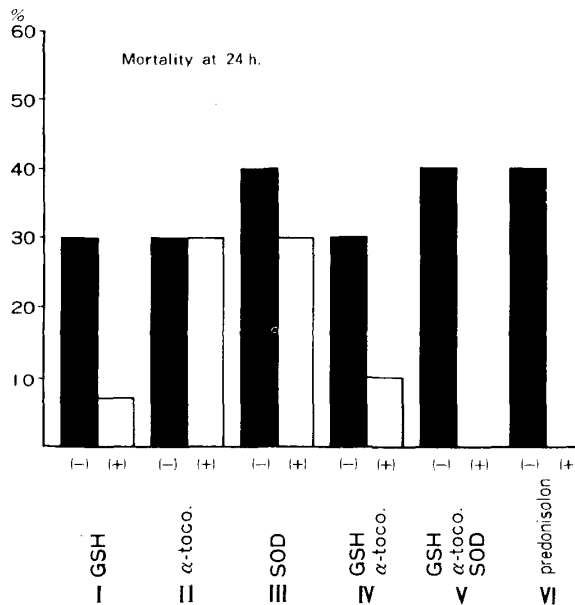


図-9 ETX 7.5 mg/kg 投与24時間目の死亡率

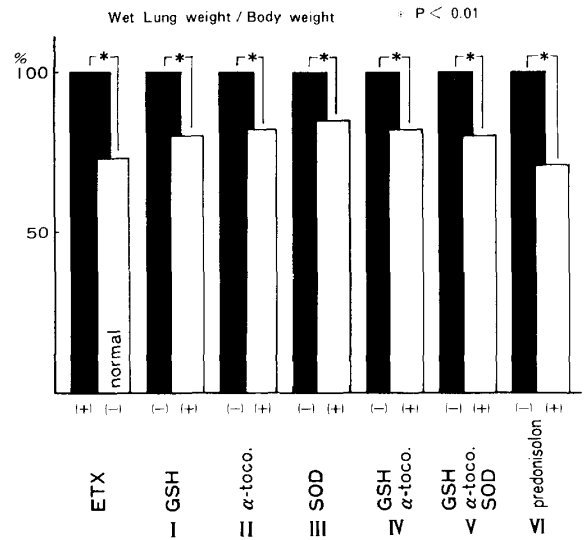


図-10 各群の無前処置を対照とした時の前処置による L/B 比の低下率

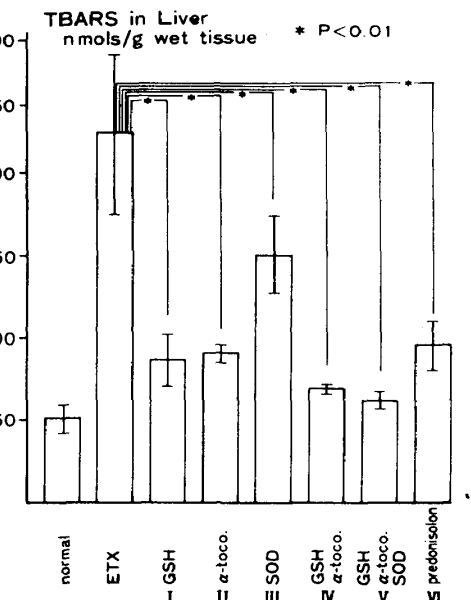
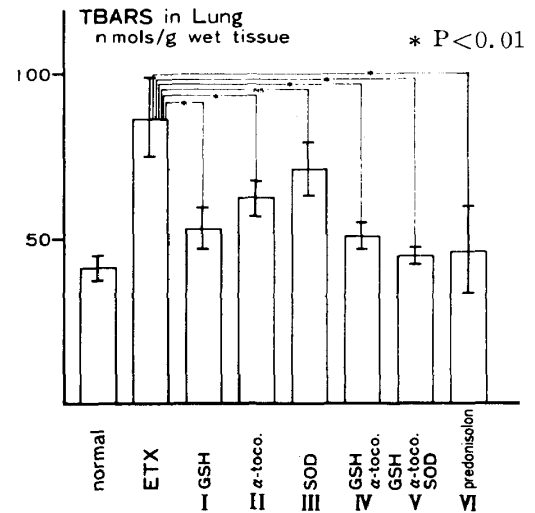


図-11 各前処置群の組織 TBARS 値

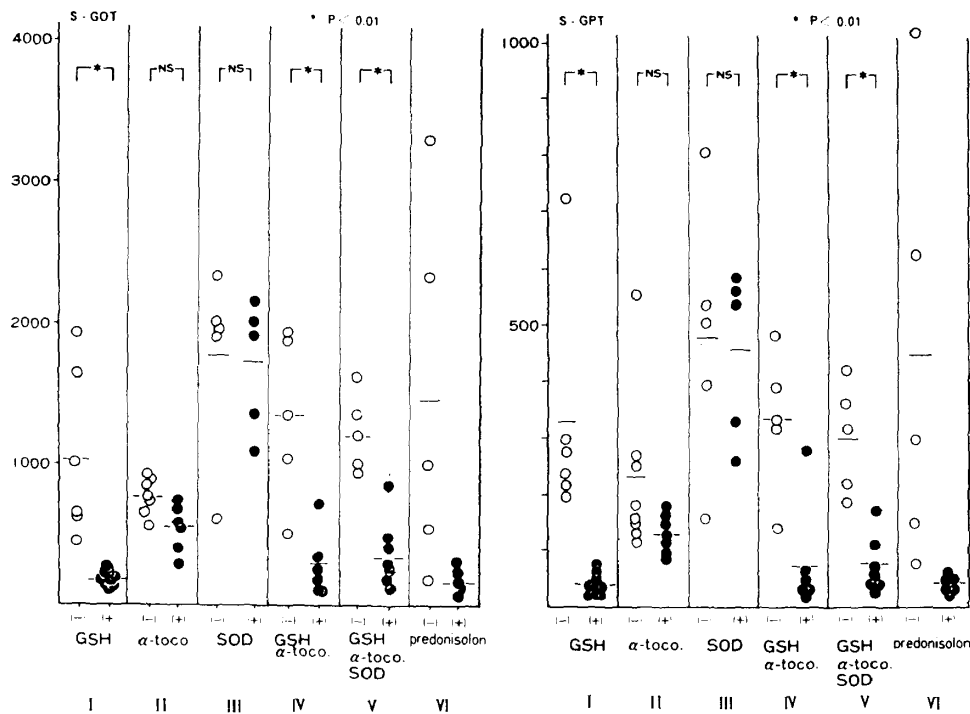


図-12 各前処置の有無における S-GOT, S-GPT の変化

III) 本項考察

各種酵素, 及び α -tocopherol (Vitamine-E) による過酸化脂質の生成抑制, 分解の概要を図-13に示した⁵⁴⁾. SOD はスーパーオキサイド・アニオン (O_2^-) の濃度を低下することによって他の反応性の高い $\cdot OH$, 1O_2 等の活性酸素の産生を抑制し, glutathione (GSH) は GSH-px の基質として H_2O_2 や過酸化脂質の分解を亢進すると考えられる。また, α -tocopherol は第1に細胞膜中の多価不飽和脂肪酸が過酸化を受けて生じた Alkyl radical そのものを消去する作用

があること, 第2に活性酸素の中でも反応性の高い一重項酸素 (1O_2) の不活化作用によって, 第三に細胞膜を構成する多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸と特異的に結合し膜を安定化する作用等によって脂質の過酸化を防止すると考えられている。

エンドトキシン・ショックにおいて認められる組織過酸化脂質濃度の増加に対する各種抗酸化剤の効果に関する報告は少なく, 特に肺組織についての報告は現在までのところみあたらないようである。

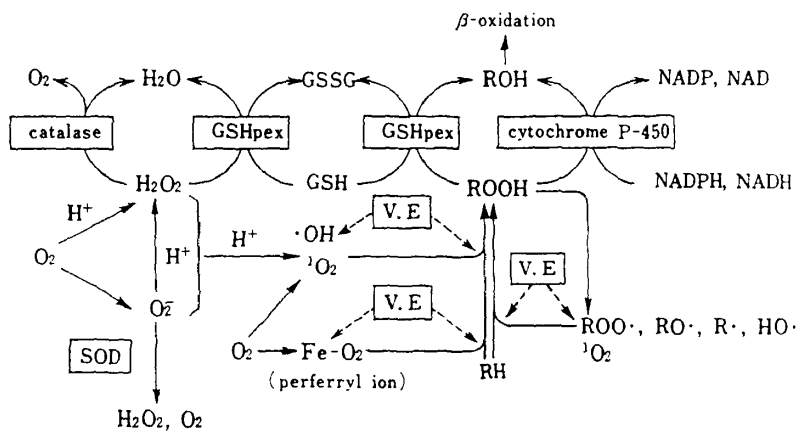


図-13 酵素およびビタミンEによる過酸化脂質の生成抑制, ならびに分解の概要⁵⁴⁾

エンドトキシン・ショック時の GSH による肝組織過酸化脂質濃度の増加抑制は Sakaguchi⁹⁾ ら, 守田ら¹⁰⁾ によって報告されており, 本実験でも肝組織に対する GSH の有効性が示された。さらに, GSH 前処理で肺組織の過酸化脂質の増加抑制と肺水腫発生の抑制が認められることは, 従来から言われている GSH の抗ショック作用, 致死率減少作用の発現の一因として GSH による肺組織障害, 即ち呼吸障害発生の抑制が重要であることを示唆するものと考えられる。

SOD が有効であった報告としては, ラットにパラコートを投与した際認められる肺組織学的変化の軽減や, 同時に死亡率が低下するとの Autor ら⁵⁵⁾ の実験がある。彼らは, SOD の効果があったことからパラコートによる無気肺や肺水腫の形成は, O_2^- による肺組織の膜リン脂質の過酸化が原因と推定している。また, McCormic ら⁵⁶⁾ は, 補体及び白血球が関与する免疫複合体による肺組織障害—肺血管透過性の亢進, 肺内出血, 白血球の肺内流入—が, SOD の投与で抑制されたとし, このことから免疫複合体による炎症性変化においても活性化された白血球からの O_2^- 放出が組織障害発生に重要であることを推測している。本実験では SOD 前処置の効果は期待される程ではなかった。考えられる理由として, 第1にショック状態における過酸化脂質産生亢進が主として Demopoulos らの言う Alkyl radical の産生を介する機序によるためであるかもしれない。第2に Autor らも述べているが SOD の投与方法にも問題があり, より大量の SOD を持続的に投与すれば有効であったかもしれない。第3に活性酸素 (O_2^-) による障害惹起作用はショック初期のみかもしれない。SOD が有効であったとする McCormic ら⁵⁶⁾ の結果でも, 効果のあったのは初期病変に対してであり, 4時間以後では血管透過性, 肺組織学的病変に対し無効であったと述べている。白血球から放出された O_2^- が初期には直接に血管内皮細胞の膜に作用し脂質過酸化をひきおこすが, そのようにして産生された過酸化脂質が, ある濃度以上になると自

動酸化をひきおこし障害を増幅することは知られている。自動酸化がおこる時期では SOD は最早無効であると考えられる。このような理由から, エンドトキシン・ショックの初期に大量の, 且つ持続的な SOD の投与が必要であろうと推測される。

α -tocopherol 前処置では組織過酸化脂質の増加抑制と肺水腫発生活防にはある程度有効であったが死亡率の改善は認められなかった。Sakaguchi ら⁵⁷⁾ はマウスのエンドトキシン・ショックにおいて, 肝組織中の α -tocopherol の減少と過酸化脂質の増加が認められるが, あらかじめ α -tocopherol 補充食で飼育したマウスでは両者の変化が著明に抑制されたと述べ, α -tocopherol の有効性を指摘した。しかし, ラットを96~98%の高濃度酸素に68時間暴露した Yam ら⁵⁸⁾ は, α -tocopherol を体重 kg 当り 50 mg を12時間毎に投与しても死亡率, 及び湿肺重量の体重比に対し効果の無いことを報告し, 組織正常濃度以上の α -tocopherol の肺障害予防効果を疑問視している。

プレドニゾロン 10 mg/kg の前処置では, L/B 比, 肺組織 TBARS 値の増加抑制があり, エンドトキシン・ショックにおける肺水腫発生活防効果が確認された。これは, 従来から言われているライソゾーム膜の安定化作用⁵⁹⁾ と, 循環系に対する α 遮断効果⁶⁰⁾ によるショック状態の軽減からの二次的な効果との説明は可能である。Suzuki ら⁶¹⁾ らは, 脳寒冷傷害実験によりステロイドが過酸化脂質の濃度を減少したと報告しているが, その機序は不明である。

マウスの線維芽細胞を用いた Hong ら⁶²⁾ は, ステロイドがフォスホリパーゼ活性を低下しアラキドン酸の遊離を減少せしめ, PGs の産生を抑制すると報告した。Brigham ら⁶³⁾ も大量のメチルプレドニゾロンの前処置でエンドトキシン・ショックの羊の肺血管透過性亢進が阻止されることを観察し, ステロイドによる PGs, TXs の産生阻害作用をその機序の一つとして掲げている。アラキドン酸の endoperoxide が TBA 反応物質となり, 組織過酸化脂質反応の引き金となり得ることは前述したが, ステロイ

ドによる PGs とその中間代謝産物の産生を抑制し、結果的に組織 TBARS 値の増加を抑制することは一部にはあり得ると考える。

さらに、Brigham ら⁶³⁾ はステロイドには白血球凝集抑制作用もあると述べているが、Hamman Schmidt ら⁶⁴⁾ もラットを用いて、補体の活性化による白血球凝集がステロイドによって抑制されたと報告している。白血球血管内凝集が抑制されれば、ライソゾーム酵素や活性酸素の放出も減少して、組織障害の軽減と過酸化脂質産生低下が推測される。この点から彼らは ARDS に対するステロイドの大量療法の有効性を述べている。しかし、パラコート中毒に対しては、大量のステロイドが有効でなかったと Fairshter⁶⁵⁾ は、報告しているが、活性酸素や過酸化脂質の疾患による産生機序の違いを示唆するものかもしれない。

α -tocopherol や SOD の単独前処置では、肝臓過酸化脂質抑制が少なかったことは、この二群において図-12に示す S-GOT, S-GPT の上昇抑制効果が認められない結果と一致する。このことは、肝臓過酸化脂質濃度が肝臓の細胞破壊の程度を示す一つの指標となり得ることを示すものであると考える。

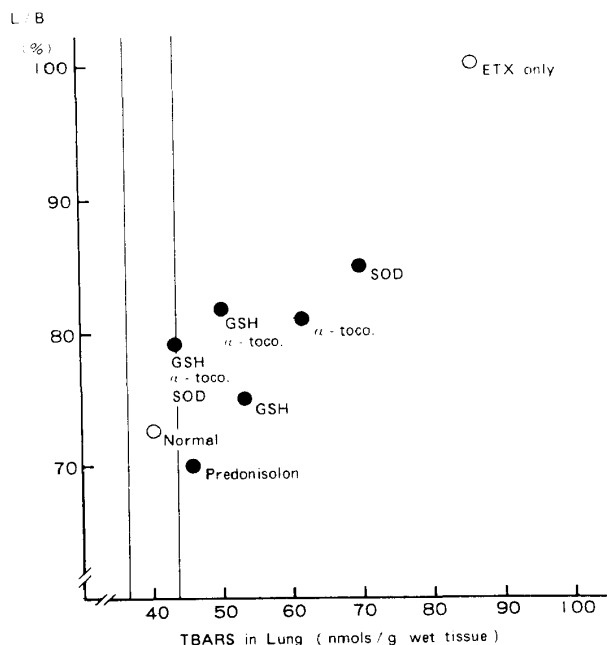


図-14 各前処置群における肺組織 TBARS 値と L/B 比との関係

さらに、図-14にエンドトキシンのみの投与の L/B 比を100%としての各前処理群における変化率と、肺組織 TBARS 値との関係を示した。両者には正の相関が認められ、エンドトキシンによる肺血管透過性亢進と組織過酸化脂質の産生が密接に関係していることを示している。

以上、エンドトキシン・ショック時の過酸化脂質産生の抑制、肺水腫発生の軽減効果という面から、GSH, glucocorticoid の初期投与が最も有効であるとの結果を得た。SOD, α -tocopherol の有効性は今回の実験からは明確でなかったが、その投与方法、投与時間、投与量についてはさらに検討が必要であると考ええる。

結 語

過酸化脂質の産生機序とこれに及ぼす抗酸化剤の効果を見るため、ラットにエンドトキシンを投与し下記の結果を得た。

1. ショックに陥る程度のエンドトキシンの大量の投与でも、また循環動態に影響しない少量反復投与でも組織過酸化脂質は増加した。
2. 過酸化脂質に対する生体防御機構の一つである SOD 活性は過酸化脂質の増加と逆相関にあった。それに対し GSH-px 活性は大きな変化はなかった。
3. 各種抗酸化剤の組織過酸化脂質蓄積に対する抑制効果と肺水腫形成抑制効果とは相関する傾向があった。なかでも GSH の効果が大きかった。
4. グルココルチコイドもエンドトキシンによる過酸化脂質の増加及び肺水腫形成に予防効果があった。
5. 以上の結果から、エンドトキシン・ショックに生ずる肺水腫には組織過酸化脂質の蓄積が一因となると考えられ、またその予防には GSH, Steroid が有効であると結論した。

本論文の要旨は第22回、第23回日本胸部疾患学会総会、及び第17回日本胸部疾患学会近畿地方会にて発表した。

文 献

- 1) Fisher, A. B., Bassett, D. J. P. & Forman, H. J.: Oxygen toxicity of the lung: Biochemical aspects. *Pulmonary Edema.*, pp. 207-216, 1979. ed. by Fishman, A. P. & Renkin, E. M.
- 2) Roehm, J. N., Hadley, J. G. & Manzel, D. B.: Antioxidant vs lung disease. *Arch. Intern. Med.*, 128: 88-93, 1971.
- 3) Bus, J. S., Aust, S. D. & Gibson, J. E.: Superoxide and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity. *Biochem. Biophys. Comm.*, 58: 749-755, 1974.
- 4) Tappel, A. L.: Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proceed.*, 32 (8): 1870-1874, 1973.
- 5) Demopoulos, H. B.: the basis of free radical pathology. *Fed. Proceed.*, 32 (8): 1859-1861, 1973.
- 6) Hyers, T. M.: Pathogenesis of adult respiratory distress syndrome: Current concepts. *Semin. Respir. Med.*, 2: 104-108, 1981.
- 7) Kaplan, R. L., Sahn, S. A. & Petty, T. L.: The incidence of the adult respiratory distress syndrome in gram negative sepsis. *Arch. Intern. Med.*, 139: 867-869, 1979.
- 8) 佐川弥之助: 肺水腫 日本胸部疾患学会雑誌 21 (1): 1-2, 1983.
- 9) Sakaguchi, S., Kanda, N., Hsu, C. C. & Sakaguchi, O.: Lipid peroxide formation and membrane damage in endotoxin-poisoned mice. *Microbiol. Immunol.*, 25 (3): 229-244, 1981.
- 10) 守田敏洋, 国元文生, 小川龍: ショック時の臓器過酸化脂質の変化とその意義 —2. エンドトキシンショック時の肝臓過酸化脂質と SOD 活性—麻酔, XXX: 281-284, 昭56
- 11) 八木国夫: Thiobarbituric acid 螢光法による血漿又は血清中の過酸化脂質の微量定量法 *Vitamine (Japan)*, 49 (9, 10): 403-405, 1975.
- 12) Beauchamp, C. & Fridovich, I., Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acryl amide gels. *Analy. Biochem.*, 44: 276-287, 1971.
- 13) 今成登志男, 広田元子, 他: Superoxide Dismutase 活性測定法の改良, *医学のあゆみ* 101 (6) 469-470 昭52
- 14) Paglia, D. E. & Valentine, W. N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70 (1): 158-169, 1967.
- 15) 宮内裕光: ヒト赤血球の glutathione peroxidase について: *日医大誌* 43 (1): 14-20, 1976
- 16) Naito, H., Johnson, B. & Johnson, B. C.: Some effects of methyl linoleate hydroperoxide on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Proc. Soc. Exp. Med.*, 122: 545-548, 1966.
- 17) 白台 鴻, 星野忠彦, 金田尚志: 自動酸化油投与マウスの病理組織学的研究(急性毒性), *栄養と食糧* 29(2): 85-94, 1976.
- 18) Carpenter, M. P.: Antioxidant effects on the prostaglandin endoperoxide synthetase product profile. *Fed. Proceed.*, 40: 189-194, 1981.
- 19) Shohet, S. B., Pitt, J., Baehner, R. L. & Poplack, D. G.: Lipid peroxidation in the killing of phagocytized pneumococci. *Infect. Immunity*, 10 (6): 1321-1328, 1974.
- 20) Fridovich, I.: The biology of superoxide and of superoxide dismutase - in brief. The function of red blood cells: Erythrocyte pathology, pp. 153-172, 1981.
- 21) Sunde, R. A. & Hoekstra, W. G.: Structure, synthesis and function of glutathione peroxidase. *Nutr. Review.* 38 (8): 265-273, 1983.
- 22) Tappel, A. L.: Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitamin. Hormon.* 20: 493-510, 1962.
- 23) Flamm, E. S., Demopoulos, H. B., Seligman, M. L., Poser, R. G. & Ransohoff, J.: Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke.* 9: 445-447, 1978.
- 24) 小暮久也: 脳虚血と活性酸素. 佐野圭司, 半田肇監修, 脳虚血と細胞障害. にゅーろん社. 17~30, 1981
- 25) Cline, M. J., Melmon, K. L., Davis, W. C. & Williams, H. E.: Mechanism of endotoxin interaction with human leucocytes. *Brit. J. Haemat.* 15: 539-547, 1968.
- 26) Nies, A. S., Greinder, D. K., Cline, M. J. & Melmon, K. L.: The divergent effects of endotoxin fraction on human plasma and Leucocytes. *Biochem. Pharmacol.* 20: 39-46, 1971.

- 27) Bradley, S. G.: Cellular and molecular mechanism of bacterial endotoxins. *Am. Rev. Microbiol.* 33: 67-94, 1979.
- 28) Balis, J. U., Rappaport, E. S., Gerber, L., Fareed, J., Buddingh, F. & Messmore, H. L.: A primate model for prolonged endotoxin shock. Blood-vascular reactions and effects of glucocorticoid treatment. *Lab. Invest.* 38 (4): 511-523, 1978.
- 29) Coalson, J. J., Hinsaw, L. B. & Guenter, C. A.: The pulmonaly ultrastructure in septic shock. *Exp. Mlo. Pathol.* 12: 84-103, 1970.
- 30) O'Flaherty, J. T., Craddock, P. R. & Jacob, H. S.: Effect of intravascular complement activation on granulocyte adhesiveness and distribution. *Blood.* 51 (4): 731-739, 1978.
- 31) Hohn, D. C., Meyers, A. J., Gehrini, S. T., Beckmann, A. B., Markison, R. E. & Cheng, A. M.: Production of acute pulmonary injury by Leucocytes and activated complement. *Surgery.* 88 (1): 48-58, 1980.
- 32) Fearon, D. T., Ruddy, S., Schur, P. H. & McCabe, W. R.: Activation of the properdin pathway of complement in patients with Gram-Negative bacteremia. *N.E.J.M.* 292 (18): 937-940, 1975.
- 33) Yost, F. J. & Fridovich, I.: Superoxide radicals and phagocytosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 161: 395-401, 1974.
- 34) Root, R. K., Metcalf, J., Oshino, N. & Chance, B.: H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. 1. Documentation, quantitation, and some regulating factors. *J. Clin. Invest.* 55: 945-955, 1975.
- 35) Babior, B. M.: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N.E.J.M.* 298 (12): 659-668, 1978.
- 36) Goldstein, I. M., Roos, D., Kaplan, H. B. & Weissmann, G.: Complement and immunoglobulins stimulate superoxide productin by human leucocytes independently of phagocytoiss. *J. Clin. Invest.* 56: 1155-1163, 1975.
- 37) Sacks, T., Meldow, C. F., Craddock, P. R., Bowers, T. K. & Jacob, H. S.: Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. an in vitro model of immune vascular damage. *J. Clin. Invest.* 61: 1161-1167, 1978.
- 38) Stossel, T. P., Mason, R. J. & Smith, A. L.: Lipid perodition by human blood phagocytes. *J. Clin. Invest.* 54: 638-645, 1974.
- 39) Gonde, G., Carcia-Barreno, P. & Suarez, A.: Arachidonate release from rat liver mitochondria in endotoxin shock. *FEBS. Letters.* 112 (1): 89-91, 1980.
- 40) Cook, J. A., Wise, W. C. & Callihan, C. S.: Resistance of essential fatty acid-deficient rats to endotoxic shock. *Circulatory shock.* 6: 333-342, 1979.
- 41) Feuerstein, N. & Ramwell, P. W.: In vitro and in vivo effect of endotoxin on prostaglandin release from rat lung. *Br. J. Pharmac.* 73: 511-516, 1981.
- 42) Smith, E. M. Gunther, R., Gee, M., Flynn, J. & Demling, R. H.: Leucocytes, platelets and thromboxane A₂ in endotoxin-induced lung injury. *Surgery.* 90 (1): 102-107, 1981.
- 43) Kuehl, F. A., Humes, J. L., Egan, R. W., Ham, E. A., Beveridge, G. C. & Van Armen, C. G.: Role of prostaglandin endoperoxide PG G₂ in inflammatory prosscuss. *Nature.* 265: 170-173, 1977.
- 44) 関川利幸, 佐藤公彦, 佐川弥之助: エンドトキシン投与時の過酸化脂質の変動について, 日胸疾患誌 (抄) 19 (12): 1027. 1981.
- 45) Frank, L. & Roberts, J. R.: Endotoxin protection against oxygen induced acute and chronic lung injury. *J. Appl. Physiol.* 47 (3): 577-581, 1979.
- 46) Chow, C. K. & Tappel, A. L.: An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats. *Lipid.* 7 (8): 518-254, 1972.
- 47) Nohl, H. & Hegner, D.: Responses of mitochondrial superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities to aging. *Mechanisms of aging and development.* 11: 145-151, 1979.
- 48) Crapo, J. D., Barry, B. E., Foscue, H. A. & Shelburne, J.: Structural and biological changes in rat lungs occuring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am. Rev. Resp.*

- Dis. 122: 123-143, 1980.
- 49) Sjostrom, K. & Crapo, J. D.: Adaptation to oxygen by preexposure to hypoxia: Enhanced activity of Mangani superoxide dismutase. *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, 17 (suppl.): 111-116, 1981.
 - 50) Erhardt, W. D., Zaenker, K. S., Toelle, W., Wriedt-Luebee, I., Birk, M., Bluemel, G. & Probst, J.: The mechanical, enzymatic and morphological changes in acute pulmonary insufficiency following the production of a haematoma in rabbits. *J. Pathol.* 127 (2): 157-166, 1978.
 - 51) Niehaus, G. D., Schumacker, P. R. & Saba, T. M.: Reticuloendothelial clearance of blood-borne particulates. *Ann. Surg.* 191 (4): 479-487, 1979.
 - 52) Pearlstein, E., Gold, LI. & Garcia-Pardo, A.: Fibronectin; a review of its structure and biological activities. *Molecular & Cellular Biochemistry.* 29 (2): 103-128, 1980.
 - 53) Lancer, M. E. & Saba, T. M.: Neutrophil-mediated lung localization of bacteria; A mechanism for pulmonary injury. *Surgery.* 90 (3): 473-481, 1981.
 - 54) 福沢健治: 過酸化脂質の生成防止 過酸化脂質と疾患. 八木国夫, 五島雄一郎編 PP 121-129 医学書院 1981
 - 55) Autor, A. P.: Reduction of paraquat toxicity by superoxide dismutase. *Life Science.* 14: 1309-1319, 1974.
 - 56) McCormic, J. R., Harkin, M. M., Jonson, K. J. & Ward, P. A.: Suppression by superoxide dismutase of immune-complex induced pulmonary alveolitis and dermal inflammation. *Am. J. Pathol.* 102; 55-61, 1981.
 - 57) Sakaguchi, O., Kanda, N., Sakaguchi S., Hsu, C. C. & Abe, H.: Effect of α -tocopherol on endotoxocosis. *Microbiol. Immunol.* 25 (8): 787-799, 1981.
 - 58) Yam, J. & Robert, J. R.: Pharmacological alteration of oxygen induced lung toxicity. *Toxicology and Appl. Pharmacology* 47: 367-375, 1979.
 - 59) Weissmann, G. & Thomas, L.: Studies on lysosomes 1. The effects of endotoxin, endotoxin tolerance and cortisone on the release of acid hydrolases from a granula fraction of rabbit liver. *J. Exp. Med.* 116: 433-450, 1962.
 - 60) Lillehei, R. C., Longerbeam, J. K.; Block, J. H. & Manax, W. G.: The modern treatment of shock based on physiologic principle. *Clin. Pharmacol. Therap.* 5 (1): 63-101, 1964.
 - 61) Suzuki, O. & Yagi, K.: Formation of lipoperoxide in brain edema induced by cold injury. *Experimentia* 30 (3): 248, 1973.
 - 62) Hong, S. L. & Levine, L.: Inhibition of arachidonic acid release from cells as the biological action of anti-inflammatory corticosteroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (5): 1730-1734, 1976.
 - 63) Brigham, K. L., Bowers, R. E. & Mckeen, C. R.: Methylpredonisolon prevention of increased lung vascular permeability following endotoxemia in sheep. *J. Clin. Invest.* 67: 1103-1110, 1981.
 - 64) Hammerschmidt, D. E., White, J. G., Craddock, R. R. & Jacob, H. S.: Corticosteroid inhibits complement-induced granulocyte aggregation. *J. Clin. Invest.* 63: 798-803, 1979.
 - 65) Fairshter, R. D. & Wilson, A. F.: Praquat poisoning. Manifestation and therapy. *Am. J. Med.* 59 (6): 751-753, 1975.

BIOCHEMICAL ASPECTS OF ENDOTOXICOSIS IN RAT:

—Lipid peroxide formation and the effect of Free radical scavengers—

Toshiyuki Sekigawa*Department of Clinical Pulmonary Physiology Chest Disease Research Institute,
Kyoto University, Kyoto 606, Japan*

In recent years, lipid peroxide formation in various diseases or abnormal states and its notorious effects to many tissues are well known. We examined the lipid peroxide formation and changes of activities of free radical scavengers — SOD, GSH-px — in rat tissue following administration of *E. coli* endotoxin (ETX). And the effects of pre-treatment of free radical scavengers — GSH, α -tocopherol, SOD, -and glucocorticoid on lipid peroxide level in tissues, mortality and lung weight/body weight ratio (L/B) in endotoxin shock rats were tested.

The results were as follows.

- 1) The tissue (lung & liver) levels of lipid peroxide (TBARS value) showed a remarkable increase within 24 hours after administration of ETX. The repeated administration of small dose of ETX, which did not deteriorate hemodynamic state in rat, also gave rise to an increase of tissue level of TBARS.
- 2) The increase of tissue level of TBARS correlated inversely with decrease of SOD activity not in liver tissue but in pulmonary tissue.
- 3) Inhibitory effect of pre-treated free radical scavengers on increase of TBARS in tissues and of L/B ratio following endotoxemia were detected. In these effects of extrinsic free radical scavengers, the effect of GSH was most prominent and followed by that of α -toco. and SOD.
- 4) L/B ratio, as an index of pulmonary edema, was well correlated with the increase of lung TBARS.
- 5) Glucocorticoid pre-treatment protected rats from tissue damage induced by ETX shock.

These results suggested that in endotoxemia, shock state or not, tissue damage was augmented by lipid peroxide formation. In shock state, one of the causes of increase of tissue TBARS was an increase in production of lipid peroxide due to tissue hypoxia. And the decrease of degradation of formed lipid peroxide due to lowering of tissue SOD activity as showed in lung tissue was another cause.

However, from the findings that one of the pathological changes of endotoxemia is neutrophil sequestration in pulmonary capillary beds and these sequestered neutrophils release active oxygen to outer medium, we speculated that, not only in shock state but also in small dose administration of ETX, the tissue increase of TBARS may be in some degree mediated by these active oxygen from these sequestered neutrophils. The effectiveness of glucocorticoid pre-treatment in results may be partly due to inhibition of this neutrophil sequestration in capillary beds.

As conclusion, we thought that free radical scavengers — especially GSH — and large dose of glucocorticoid administration are effective against ETX-induced tissue damage by decrease of tissue lipid peroxide formation.