

活性酸素，過酸化脂質，フリーラジカルの生成と消去機構 並びにそれらの生物学的作用

藤田 直

Formation and Removal of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxides and Free Radicals, and Their Biological Effects

Tadashi FUJITA

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara,
Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received November 22, 2001)

It is well known that biomembranes and subcellular organelles are susceptible to lipid peroxidation. There is a steadily increasing body of evidence indicating that lipid peroxidation is involved in basic deteriorative mechanisms, e.g., membrane damage, enzyme damage, and nucleic acid mutagenicity. The formation of lipid peroxides can be induced by enzymatic or nonenzymatic peroxidation in the presence of oxygen. The mechanisms of formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides, and free radicals in biological systems are briefly reviewed. In recent years, there has been renewed interest in the role played by lipid peroxidation in many disease states. Xanthine oxidase has been shown to generate reactive oxygen species, superoxide ($O_2^- \cdot$), and hydrogen peroxide (H_2O_2) that are involved in the peroxidative damage to cells that occurs in ischemia-reperfusion injury. During ischemia, this enzyme is induced from xanthine dehydrogenase. We have shown that peroxynitrite (a reactive nitrogen species) has the potential to convert xanthine dehydrogenase to oxidase. The following biological effects of lipid peroxidation were found: a) the lipid peroxidation induced by ascorbic acid and Fe^{2+} affects the membrane transport in the kidney cortex and the cyclooxygenase activity in the kidney medulla, and b) the hydroperoxy adducts of linoleic acid and eicosapentaenoic acid inhibit the cyclooxygenase activity in platelets. The balance between the formation and removal of lipid peroxides determines the peroxide level in cells. This balance can be disturbed if cellular defenses are decreased or if there is a significant increase in peroxidative reactions. Once lipid peroxidation is initiated, the reactive intermediate formed induces cell damage.

Key words—reactive oxygen species; lipid peroxide; lipid peroxidation; cell damage; ischemia-reperfusion

1. はじめに

活性酸素，フリーラジカル，過酸化脂質という言葉が，生体现象の中で，今日，盛んに用いられるようになってきた。それは活性酸素，過酸化脂質が，種々の疾病に関与していることが解明されつつある結果であろう。しかしながら，この分野における研究はほとんどが現象論に終始することが多く，分子レベルでの研究は困難を極めている。*In vitro* では活性酸素，脂質過酸化反応の実験系はいろいろな角度から検討しやすく，また結果も多く得られている。しかし，*in vivo* にその結果をすぐ適用して判

断することは非常に危険である。なぜなら，活性酸素，過酸化脂質生成時の環境が異なること，いずれもその評価は指標値であって，絶対量を論じていないためである。

本稿では活性酸素と過酸化脂質の生成と消去について，臓器，細胞レベルでの基礎的及び応用面から，また，これらの現象の生体に及ぼす影響について，当研究室で得られたこれまでの若干の成果を中心に概説したい。

2. 活性酸素の生体組織での生成と消去

酸素は周期律表では第 VI 族に属し，原子番号は 8 であり，8 個の電子をもっている。通常，電子は 2 つが対になって存在しているが，対にならず 1 つだけ離れて存在する場合がある。これがフリーラジカルで反応性が高い。電子は対になっているのが安

大阪薬科大学衛生化学教室 (〒569-1094 高槻市奈佐原 4-20-1)

*本総説は，平成 13 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

定であり、不対電子は一般に不安定で、対をなすために相手から電子を奪い、自らは対をつくり安定になろうとする性質が強い。酸素分子は不対電子が2個存在するのでビラジカル (biradical) と言える。酸素分子が体の中に入ると、次々に他の物質から電子を奪い、より反応性に富む不安定な化学種に変化していく。すなわち、酸素はラジカルを2つもって、そこに電子が1個入ってくるとラジカルの性質が片方だけ消され、そのかわりもう一方のラジカルの性質が強くなり、弱酸性で解離してアニオンになる。これがスーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) であり、単にスーパーオキシドと称している。

活性酸素にはラジカルとラジカルでないものがある。脂質関連物質を含む広義の意味における活性酸素のうち、前者としては、反応性の高いものからヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、アルコキシラジカル ($LO\cdot$)、ペルオキシラジカル ($LOO\cdot$)、ヒドロペルオキシラジカル ($HOO\cdot$)、一酸化窒素 ($NO\cdot$)、二酸化窒素 ($NO_2\cdot$)、 O_2^- などである。後者の非ラジカルグループには一重項酸素 (1O_2)、オゾン (O_3)、過酸化水素 (H_2O_2)、脂質ヒドロペルオキシド ($LOOH$) などがある。

脂質ヒドロペルオキシドは後述する過酸化脂質である。生体内での重要なフリーラジカルは、ほとんどが酸素を含むものであり、活性酸素のことを意味することが多く、時にはフリーラジカルと同一視している場合がある。しかし、薬物によっては生体で代謝を受け、ラジカルを生成して毒性を示すものがある。例えば、農薬のパラコートラジカルや四塩化炭素から生成されるトリクロルメタンラジカル ($\cdot CCl_3$) は、炭素部がラジカル化しているフリーラジカルであって活性酸素ではない。したがって活性酸素、フリーラジカルを論じる場合、両者をよく整理して考察しないとまぎらわしくなってくる。

さて、組織細胞レベルに影響を及ぼすとみられている活性酸素には、フリーラジカルとして O_2^- 、 $\cdot OH$ 、非ラジカルとして H_2O_2 がある。生体系での O_2^- の生成はキサンチン酸化酵素、アルデヒド酸化酵素、NAD(P)H酸化酵素などによる酵素的反応による場合と、パラコートをはじめとする薬物の酸化により生成するラジカルによって、酸素分子が一電子還元を受け、 O_2^- が生成される非酵素的

反応によって誘導されることが定説になっている。

生理的条件下では、 O_2^- を発生する機構は組織液、血液中や細胞内顆粒にて酵素系により行われる。白血球は好中球やマクロファージを含むが、いずれにおいても、ある刺激により NAD(P)H オキシダーゼの活性が高まり、 O_2^- が生成される。¹⁾ この O_2^- は殺菌作用を示す原動力であるが、過剰の生成は炎症を引き起こすことになる。ミトコンドリアでは、電子伝達系により ATP を合成する過程で O_2^- を生成する。これは、CoQ の1電子還元で生じた $CoQ\cdot^-$ により O_2 が1電子還元を受けて O_2^- が生じるものである。²⁾ ミクロソームでの O_2^- の生成は NADPH 依存性チトクローム P450 還元酵素と関係している。プロメラインのようなタンパク質分解酵素でミクロソームを処理した場合と界面活性剤で処理して得たチトクローム P450 還元酵素とでは NADPH 存在下における O_2^- の生成に差があると言われている。^{3,4)} 後者の場合、ミクロソームでの O_2^- の生成は NADPH 依存性チトクローム P450 還元酵素と P450 がリンクして、NADPH から放出された1電子が O_2 に渡され1電子還元を受けて O_2^- が生成される。

病態下における O_2^- の発生系として、近年、注目されているのが、虚血—再灌流時におけるキサンチンオキシダーゼの活性化である。Granger ら⁵⁾ は、虚血—再灌流時に発生する活性酸素は O_2^- であると言う。その機序は、虚血時に ATP の分解が促進されヒポキサンチンが生成し、一方で、キサンチンデヒドロゲナーゼからキサンチンオキシダーゼが誘導される。再血流時はヒポキサンチンを基質としてキサンチンオキシダーゼ及び再血流によって豊富に供給される酸素によって O_2^- が生成される (Fig. 1)。さらに、キサンチンを基質にして酸素とキサンチンオキシダーゼにより O_2^- と尿酸が生成される。キサンチンから尿酸が生成する過程にはキサンチンデヒドロゲナーゼも関与するが、この反応は分子状の酸素は必要とせず、 NAD^+ の存在下で進行し、 O_2^- は発生しない。現在のところ、虚血時のキサンチンデヒドロゲナーゼからオキシダーゼへの変換機構に関しては、不明な点が多い。

キサンチンオキシダーゼは動物種、臓器によりその活性に差があり、ヒト及びウサギの脳や心筋のキサンチンデヒドロゲナーゼは虚血時オキシダーゼに

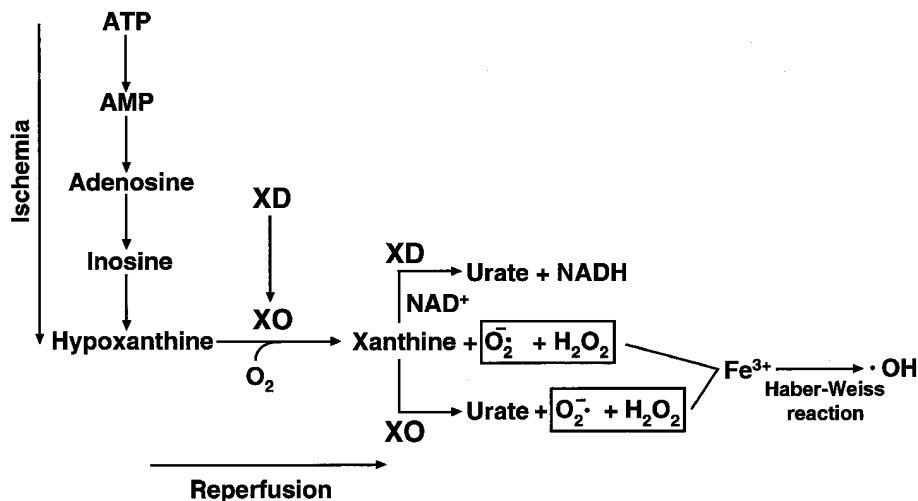


Fig. 1. The Proposed Mechanism for the Generation of Reactive Oxygen Species in Ischemia-Reperfusion
XD: xanthine dehydrogenase, XO: xanthine oxidase.

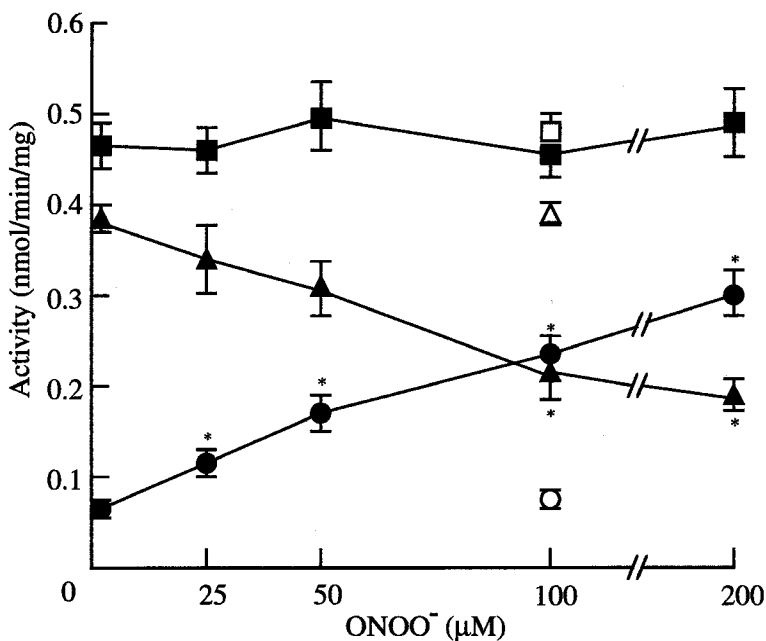


Fig. 2. Effects of ONOO^- on the Activities of XO and XD in Rabbit Liver

The cytosolic fraction (0.5 mg of protein) was preincubated at 30°C for 1 min in 1 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.1) with or without the indicated concentrations of ONOO^- (●, ▲, ■) or decomposed ONOO^- (100 μM) (ONOO^- alone was preincubated in the Tris-HCl buffer at 30°C for 1 min before use) (○, △, □). Xanthine (60 μM) and NAD^+ (0.1 mM) were subsequently added to the preincubation mixture, and the mixture was incubated at 30°C for 30 min. Each point represents the mean of 4 experiments; vertical lines show S.E.M. * $p < 0.01$; compared with the corresponding value in the absence of ONOO^- . ●, ○, XO activity; ▲, △, XD activity; ■, □, total (XO plus XD) activity. ONOO^- : peroxynitrite.

変換されないが、肝のそれは変換されると言う。⁶⁾ 著者らは、ウサギ肝キサンチンデヒドロゲナーゼからオキシダーゼへの変換に対する金属イオンの影響を比較し、銅イオンが最も強力な変換促進作用を有していることを報告した。⁷⁾ さらに、活性窒素の1つであるパーオキシナイトライト ONOO^- がキサンチンデヒドロゲナーゼからオキシダーゼへの変換

を促進することを見出した (Fig. 2).⁸⁾ 内皮細胞で生成した $\text{O}_2^{\cdot-}$ は速やかに NO と反応し、 ONOO^- を生成する。この反応は $\text{O}_2^{\cdot-}$ がスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) と反応するよりも速い。生成した ONOO^- は酸化力が強く、特にチオール化合物と反応しやすいことから、キサンチンデヒドロゲナーゼのチオール基が ONOO^- により

酸化され、キサンチンオキシダーゼに変換されたものと思われる。このことは、SH 剤であるジチオスレイトール (DTT) を添加した時、キサンチンオキシダーゼがデヒドロゲナーゼに再変換されたことから明らかである (Table 1)。以上の成果より、 ONOO^- の細胞毒性のメカニズムの 1 つとして、 ONOO^- がキサンチンデヒドロゲナーゼからオキシダーゼへの変換を惹起することによって、活性酸素の生成を増大させることを明らかにした。

Nordström ら⁹⁾ は虚血—再灌流時の障害に対して、キサンチンオキシダーゼの阻害剤であるアロプリノールを投与するとその障害が抑制されることから、虚血—再灌流障害にヒポキサンチン—キサンチンオキシダーゼの系が関与していることを認めた。

Table 1. Reversal of ONOO^- -Induced Conversion of XD to XO in Rabbit Liver

Treatment	XO activity	XD activity	Total activity
	(pmol/min/mg)		
Control	29.3 ± 9.6	160.7 ± 31.1	190.1 ± 37.5
DTT (1 mM)	30.8 ± 1.5	220.1 ± 5.8	251.0 ± 7.3
ONOO^- (100 μM)	114.7 ± 10.5	97.1 ± 14.3	211.8 ± 6.8
+ DTT (1 mM)	70.0 ± 6.6*	167.2 ± 14.3*	237.2 ± 9.5

ONOO^- (100 μM) was preincubated with the cytosolic fraction (0.5 mg of protein) at 30°C for 1 min in 1 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.1). DTT (1 mM) was subsequently added to the preincubation mixture with xanthine (60 μM) and NAD^+ (0.1 mM), and the mixture was incubated at 30°C for 30 min. Values are the means ± S.E.M. ($n=3$).

* $p < 0.05$; compared with ONOO^- (100 μM) alone. DTT: dithiothreitol.

さらに、SOD、カタラーゼを併用することにより O_2^- 及び H_2O_2 を消去して、反応性の高い $\cdot\text{OH}$ の産生を阻止することによって、組織細胞障害をより効果的に防御できることが報告された。¹⁰⁾ 最近、著者らは、アルキル化剤である N-エチルマレイミド (NEM) が、アロプリノールとは異なって、キサンチンデヒドロゲナーゼには作用せず、キサンチンオキシダーゼに対しての選択的な阻害剤であることを見出した (Fig. 3).¹¹⁾

酸化的ストレスにおける細胞障害の直接的な原因として、反応性の低い O_2^- や H_2O_2 より、反応性の高い $\cdot\text{OH}$ の関与を示唆している報告が多くある。すなわち、虚血時にみられるアシドーシスの状態ではトランスフェリン、フェリチンなどの鉄結合タンパク質から、 O_2^- により Fe^{3+} が還元されて Fe^{2+} として遊離され、 H_2O_2 と反応して $\cdot\text{OH}$ を生じ、この $\cdot\text{OH}$ が DNA、タンパク質などを直接攻撃する。一方で、 $\cdot\text{OH}$ は脂質と反応して脂質ラジカルを経て、脂質ヒドロペルオキシドの生成に発展する。¹²⁾ また、Arroyo ら¹³⁾ は心筋の虚血—再灌流時に $\cdot\text{OH}$ が産生されること、Das ら¹⁴⁾ は心筋ミトコンドリアでの $\cdot\text{OH}$ の生成を認めている。さらに、ラジカルスカベンジャーであるジメチルスルホキシド (DMSO) やジメチルチオ尿素の処置により心臓の虚血—再灌流障害が抑制されたという報告もあり、^{15,16)} O_2^- 及び H_2O_2 からの $\cdot\text{OH}$ の生成、そして障害に至る経路は否定できないものと思

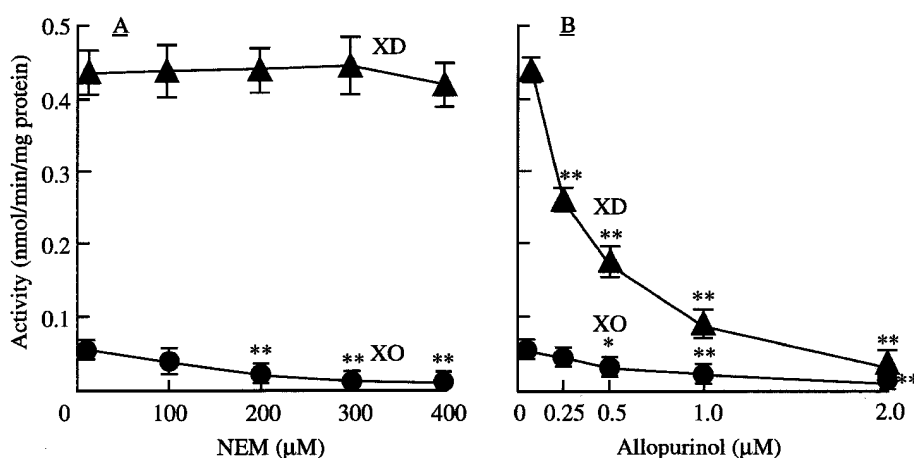


Fig. 3. Effects of NEM (A) and Allopurinol (B) on the Activities of XO and XD in Rabbit Liver

The cytosolic fraction (0.5 mg of protein) was incubated with various concentrations of NEM or allopurinol in 1 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.1) containing pyruvate (1 mM), xanthine (60 μM) and NAD^+ (0.1 mM) for 30 min at 30°C. Each point represents the mean of 4 experiments; vertical lines show S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; compared with the corresponding value in the absence of NEM or allopurinol. NEM: N-ethylmaleimide.

われる。

前述したように、虚血後、酸素が供給されるとヒポキサンチン、キサンチンオキシダーゼ、酸素の三者が共存することにより、まず最初に O_2^- が生じることになる。 O_2^- は生体において、その他種々の反応系により生成されるが、その生成部位は生体膜のような疎水環境より細胞質のような親水環境で生成しやすい。 O_2^- は水溶液中での寿命は短い、脂溶性の状態では消滅する時間は遅いことから、hydrophilic と hydrophobic の環境下では活性酸素の作用強度が異なることは十分考えられる。 O_2^- は弱酸性あるいは中性の pH 下ではアニオンの型で存在するが、その生体膜の透過性はほとんどないと言われている。¹⁷⁾したがって、 O_2^- は生成した場所で他の活性酸素に変換されて作用することが考えられる。この考えは反応速度定数からみると、 O_2^- 自身にはそれほど強い反応性がなく、¹⁸⁾酸素障害や過酸化脂質の生成における O_2^- の役割はほとんどなく、それから二次的に派生した活性酸素種によって反応が促進されると言われていること^{19,20)}からも推測できる。そこで考えられるのが O_2^- の H_2O_2 への変換である。

Figure 4 は膜の内側と外側における O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ の生成の関連性を示したものである。活性酸素の中で最も反応性の高い $\cdot OH$ を直接に生成する反応は生体組織細胞には存在しない。細胞外液では、

O_2^- は不均化反応 (dismutation) により H_2O_2 を生成する。この H_2O_2 は Fe^{3+} の存在下、 O_2^- との反応 (ハーバーワイス反応) により $\cdot OH$ を生じる。²¹⁾一方、細胞内では H_2O_2 が Fe^{2+} あるいは Cu^+ により1電子還元を受け、 $\cdot OH$ は容易に生成される。 O_2^- は、酸化還元の一作用を有し、特に金属イオンを速やかに還元する。これに関して、 O_2^- が鉄の細胞内貯蔵型であるフェリチン分子中の Fe^{3+} を還元して、 Fe^{2+} を遊離させることがBiemondら^{22,23)}により報告された。このように、 Fe^{2+} が H_2O_2 (膜の透過性は容易である) との反応 (フェントン反応) を経て $\cdot OH$ を生じ、脂質過酸化反応が開始されるのが一般的な現象のようである (実線はメインルート、破線はマイナールート)。^{17,24)}

生体内の鉄イオンや銅イオンは、フェリチンやセルロプラスミンなどのタンパク質に結合した状態で保持され、容易に H_2O_2 や脂質ヒドロペルオキシドを分解しないようになっていることから、細胞内での酸素障害は鉄や銅イオンの細胞内での状態に依存していると言えるかも知れない。こうして、細胞内での活性酸素の生成機構を考える時、 O_2^- それ自身は反応性は低い、他の活性酸素の前駆物質の役割を果たしている可能性が大きいように思われる。

さて、生体組織細胞で発生した活性酸素、フリーラジカルの消去系はどのような機構で行われるであろうか。活性酸素やフリーラジカルの消去は細胞レ

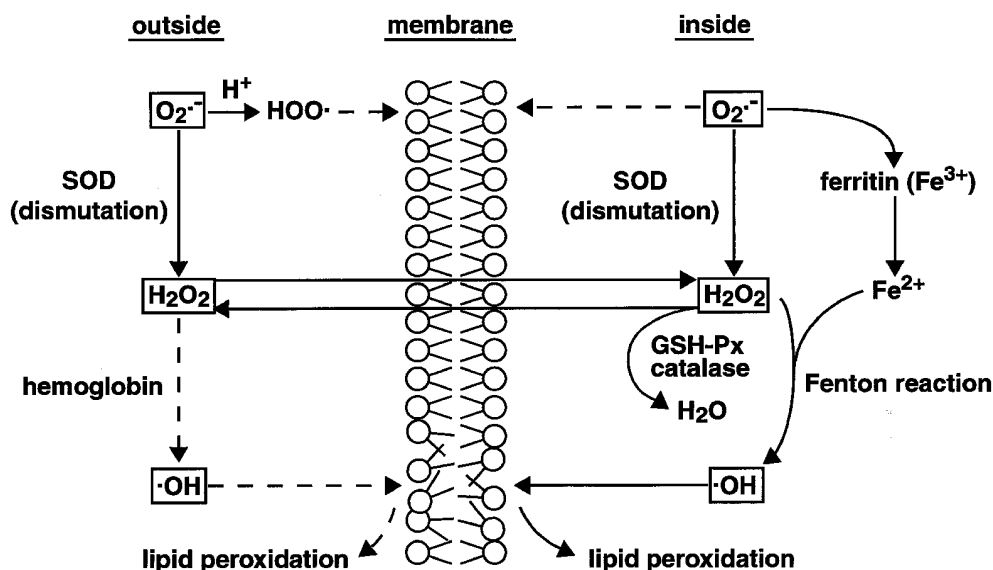


Fig. 4. Reactive Oxygen Species and Lipid Peroxidation
SOD: superoxide dismutase, GSH-Px: glutathione peroxidase.

ベルでは、酵素系に依存している場合が多いように思われる。O₂⁻やH₂O₂を消去する酵素系がよくリンクしているところは、活性酸素の効果は最小限にとどめることができる。酵素としてはSODがあり、この酵素は細胞質に存在するCu-Zn SODとミトコンドリアに存在するMn-SODの2種が主なものである。作用は両者ともO₂⁻を消去してH₂O₂にし、いわゆるラジカルの捕捉、消去を目的とする。グルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)(細胞質やミトコンドリアに存在)、カタラーゼ(ペルオキシソームに存在)はH₂O₂を分解し、ラジカル(・OH)の発生を抑制する。したがって、これらの酵素は抗酸化酵素とも言われている。

ミトコンドリア内で発生したO₂⁻は、Mn-SOD(内膜に存在)によりH₂O₂に変換される。このH₂O₂はGSH-PxによりH₂Oに分解される。H₂O₂は容易に膜を通過するので、ミトコンドリア外に放出されたH₂O₂はペルオキシソームに存在するカタラーゼにより、また細胞質に存在するGSH-Pxにより消去される。ただ、この場合、低濃度のH₂O₂に対してはGSH-Pxが作用し、高濃度のH₂O₂はカタラーゼによって消去されると言われている。²⁵⁾ ミクロソームには、ミトコンドリアと異なり、O₂⁻やH₂O₂を消去する酵素系が存在しないためミクロソームで発生したO₂⁻やH₂O₂は膜外に放出される。そこで、O₂⁻はCu-Zn SODによりH₂O₂となり、次にH₂O₂はGSH-Pxにより消去される。

SOD, GSH-Px, カタラーゼの活性酸素消去に関する作用は、その環境に応じて役割を分担しているように思われる。例えば、高圧酸素下、ビタミンE欠乏動物の肝や肺で生成した活性酸素種はほとんどGSH-Pxによって分解され、カタラーゼは効果がないこと、²⁶⁾ また、キサンチン—キサンチンオキシダーゼ系でO₂⁻を発生させたラット肺にSODを注入すると、急性肺障害や浮腫は抑制されるが、カタラーゼでは効果が認められないことなどが報告されている。²⁷⁾ このことは、これらの酵素が、ある場合には相補的に作用し、また一方では、それぞれの活性酸素種の発生源に対して、その機能を分担していることを示唆しているものと考えられるが、その機序はまだ明らかにされていない。

近年、SODの誘導体が開発されている。SODは血中に投与してもすぐに消失してしまい効果が持続

しない。この欠点を克服するために、化学修飾したスチルマレイン酸エステル誘導体(SMA-SOD)が組織内pH低下部位(虚血時、炎症部など)に集まり、SODよりも血中の活性寿命が長いことから酸化的ストレスに有効であると言われている。²⁸⁾ このSMA-SODは、細胞外空間におけるO₂⁻の消去を目的として開発されたものと考えられるが、一方、細胞内における活性酸素の細胞毒性を消去するには、外因性のSODはエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれる必要がある。²⁹⁾ このことより、SODを含む活性酸素消去系に関する外因性の酵素が*in vivo*で有効に作用する機構解明、及びいろいろな角度からの酵素誘導体の開発が待たれる。

抗酸化作用を有する化合物(抗酸化剤)としては脂溶性化合物と水溶性化合物があり、前者にはビタミンE, ユビキノン, カロチノイドなどがある。後者はアスコルビン酸(AsA)(鉄イオンと共存する場合はラジカル生成に働く)、グルタチオン、尿酸などである。これらの化合物はほとんどがラジカル捕捉、消去作用を有し、ラジカルの発生段階では抑制しない。抗酸化剤を使用する時は、脂溶性(膜レベルで作用)か、水溶性(細胞質、細胞外液中で作用)かをよく見極めて実験に使用しないと、ただその結果のみを容易に判断することは危険である。発生するラジカルが膜レベルか、細胞質、血中レベルかで活性酸素の捕捉あるいは消去の効果に差が生じることが予想される。その他、生体内の抗酸化物質を修飾した抗酸化性薬物、及び天然物などが開発されているが、ここでは省略し、優れた他の文献を参照していただきたい。³⁰⁾

3. 過酸化脂質の生体組織での生成と消去並びに生物学的作用

生体内で生成される過酸化脂質LOOHの基質は主として、膜リン脂質の二重結合を2個以上有する脂肪酸(多価不飽和脂肪酸)である。この膜リン脂質は生体膜構成成分の複合脂質である。脂肪(トリアシルグリセロール)と異なる点は、グリセロール骨格の末端の水酸基1個が脂肪酸のエステル結合ではなく、リン酸と結合していることである。

一般に、膜リン脂質が少々アルカリや酸に対して抵抗力を示すのは構造的にみて、脂肪酸エステル部で疎水性を示し、ホスホリルコリンあるいはエタノールアミン部で親水性を示す、いわゆる両親媒性

の化合物であり、外部からのアルカリに対してはコリンやエタノールアミン部の $-N^+$ が、酸に対してはリン酸部の $-O^-$ が受けてその作用を弱めている。

不飽和脂質は空气中に放置すると酸素を吸収して着色し、ついには黒色のタール様物質に変わり不快臭を発する。この過程が、一般に脂質の自動酸化と呼ばれる現象であるが、その機構は極めて複雑である。生体で起こる脂質の過酸化反応には、いろいろなファクターが要求される。

過酸化脂質の形成機構は大別すると2つある。1つはフリーラジカルの開始剤によって促進される非酵素的な過酸化反応であり、他は主としてミクロソームで行われる NADPH 依存性の酵素による過酸化反応で両者とも分子状の酸素を必要とする。生体組織での脂質過酸化は主としてこの2つの系で行われるが、その基質は膜リン脂質であり、過酸化現象が最も起こりやすいのは、この脂質に富んでいるミトコンドリアやミクロソームなど膜レベルでの反応が主たる場所である。^{31,32)}

Figure 5 は、AsA (1.0 mM) 及び Fe^{2+} (0.4 mM) によってラットの腎皮質切片の脂質過酸化反応を行った後、パラアミノ馬尿酸 (PAH) の組織内への取り込みと、チオバルビツール酸 (TBA) 値との関係を示している。³³⁾ ラット腎皮質切片への PAH の取り込みは、AsA 及び Fe^{2+} の存在下、有意に減少した。この時、同時に、細胞水の増加が観察された (Table 2)。これらの結果より、ラジカル反応によって促進された膜の脂質過酸化反応が、腎皮質の尿細管細胞に障害を与え、膜の透過性に影響を及ぼしているものと思われる。

それでは、膜レベルにおける脂質過酸化反応を促進する因子は何であろうか。結論的にみると、生体

組織では、 $O_2 \cdot^-$ 、 H_2O_2 、 Fe^{2+} の3つの相互作用により $\cdot OH$ が生成され、その後、脂質過酸化反応が促進されるものと推定できる。前項で述べたように、活性酸素種の中でも $\cdot OH$ が過酸化現象のキャスティングボードを握っているように思われる。しかしながら、Fig. 6 に示されるように、膜リン脂質から脂質ラジカルに至るまでの機構が複雑である。

脂質過酸化反応は、膜リン脂質の2位の多価不飽和脂肪酸からの水素の引き抜きに始まる。すなわち、二重結合に挟まれたメチレン基の水素が最も引き抜かれ易い。その後、リン脂質ヒドロペルオキシ

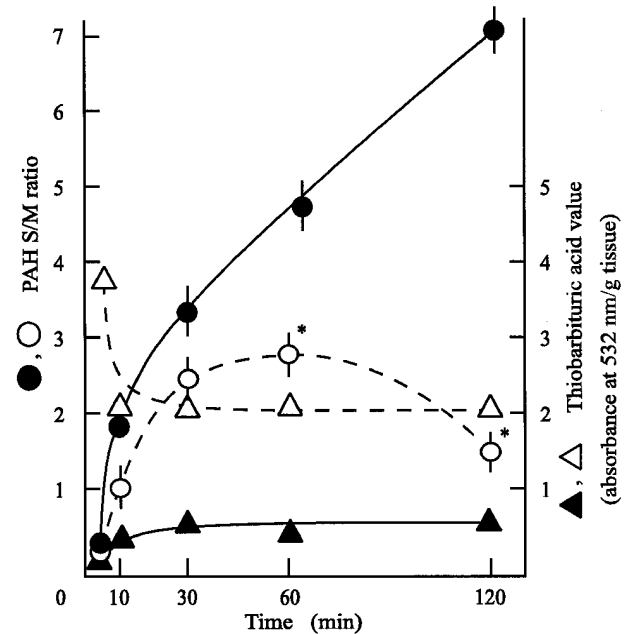


Fig. 5. PAH Accumulation in Rat Kidney Cortical Slices previously Incubated with and without AsA plus Fe^{2+}

Slices were incubated at 25°C in Cross & Taggart buffer after preincubation for 10 min at 37°C in 0.15 M KCl/0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) in the absence (continuous line) and presence (dashed line) of AsA (1.0 mM) and Fe^{2+} (0.4 mM). (●, ○) PAH S/M ratio; (▲, △) Thiobarbituric acid value. Each point represents the mean of 8 experiments; vertical lines show S.E.M. * $p < 0.01$; significantly different from control. PAH: *p*-aminohippurate, AsA: ascorbic acid, S/M: Slice/Medium.

Table 2. Effect of AsA plus Fe^{2+} on Tissue Water

	Tissue H ₂ O (% wet wt.)	ECW (μ l/100 mg dry wt.)	ICW (μ l/100 mg dry wt.)
Control	74.25 \pm 0.65	127.18 \pm 4.59	163.69 \pm 7.70
AsA + Fe^{2+}	80.83 \pm 0.34*	194.39 \pm 9.11*	228.07 \pm 4.82*

Slices were preincubated for 10 min at 37°C in 0.15 M KCl/0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) with and without AsA (1.0 mM) + Fe^{2+} (0.4 mM), and then further incubated for 60 min at 25°C in Cross & Taggart buffer. Values are the means \pm S.E.M. ($n = 4$).

* $p < 0.01$; significantly different from control. ECW: extracellular water, ICW: intracellular water.

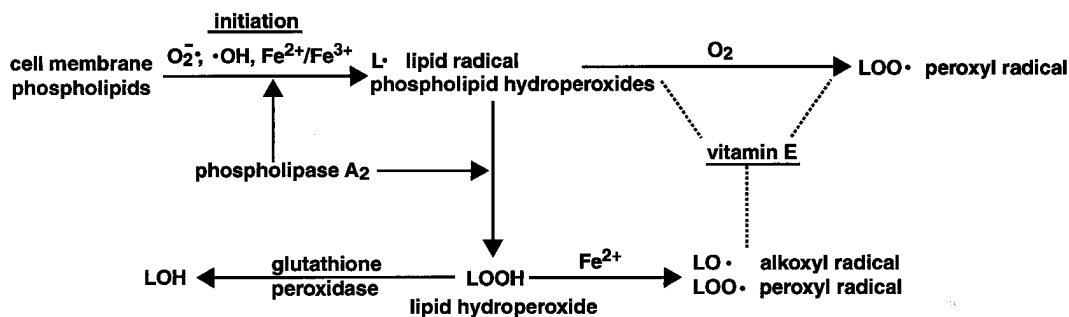
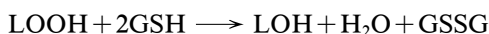


Fig. 6. The Relationship between Lipid Radical and Phospholipase A₂

ド (PL-OOH) を形成する。次に、活性化されたホスホリパーゼ A₂ の作用により脂肪酸ヒドロペルオキシド (L-OOH) が遊離される。³⁴⁻³⁶ もう 1 つの考えられる過程は、過酸化反応の最初の段階でホスホリパーゼ A₂ が活性化され脂肪酸が遊離されることである。その脂肪酸に開始剤が働き、脂質ラジカルが生成される経路である。いずれにしても脂質ラジカルは形成されるが、そこに至るまでのホスホリパーゼ A₂ の挙動が問題である。

膜リン脂質の多価不飽和脂肪酸鎖が過酸化を受けると、極性の-OOH 基が生成され脂肪酸鎖の疎水的結合は弱くなり膜のコンホメーションが変化し、その流動性が増す。その結果、ホスホリパーゼ A₂ が基質である膜リン脂質に接近しやすくなり、LOOH を切り離す。遊離された LOOH は、次のようにグルタチオンと GSH-Px により脂質アルコール (LOH) に分解される。³⁷



一方、LOOH は鉄や銅などの遷移金属イオンが存在すると、次のように LO· や LOO· を生成し、新たな脂質過酸化反応の開始剤になり連鎖反応が進行する。



次に、体内で生成された過酸化脂質を消去する機構としては、前述した GSH-Px 又は膜レベルではビタミン E やユビキノンがある。酵素の場合はラジカルの発生を抑制するが、ビタミン E のような脂溶性化合物は膜脂質で生じた LOO·, LO· を捕捉し、ラジカルの連鎖反応を止める作用がある。Maiorino ら³⁸ は新しい Se 依存性の GSH-Px を見つけた。この酵素はビタミン E の共存下、基質と

してリン脂質の多価不飽和脂肪酸の過酸化脂質に直接作用して脂質アルコールを生じるもので、ホスホリパーゼ A₂ によって切り離される前に、あるいは Fe²⁺ が作用して LO· を形成する前に、過酸化脂質はこの酵素によりリン脂質から消去されることを報告している。この GSH-Px とビタミン E³⁹ にホスホリパーゼ A₂ がどのように関与して過酸化リン脂質を消去していくか、その機序解明が待たれる。

4. アラキドン酸カスケードと活性酸素、過酸化脂質

膜リン脂質からホスホリパーゼ A₂ の作用により放出された脂肪酸 (アラキドン酸) は酵素的に酸化される場合がある。Figure 7 に示したように、場所的違いは別として、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ系を経て生成される過酸化脂質であるプロスタグランジン G₂ (PGG₂) 及びモノヒドロペルオキシ酸 (HPETE) はアラキドン酸カスケードの中間体として存在する。

アラキドン酸カスケードで活性酸素が生成する部位は、シクロオキシゲナーゼ系とリポキシゲナーゼ系のヒドロペルオキシダーゼが作用する部位である (Fig. 8)。シクロオキシゲナーゼ系の PGG₂ から PGH₂ への変換過程で生じた ·OH は、シクロオキシゲナーゼを阻害し、PG の合成を抑制することが報告されている。⁴⁰ すなわち、反応過程にラジカルスクベンジャーであるフェノールやメチオナールなどを添加しておく、シクロオキシゲナーゼ反応の停止はかなり防止できるという Kuel らの説である。リポキシゲナーゼ系による活性酸素の生成場所は、酵素の種類、局在部位などから一定していない。すなわち、リポキシゲナーゼ系ではアラキドン酸を基質として、細胞種によってアラキドン酸の炭

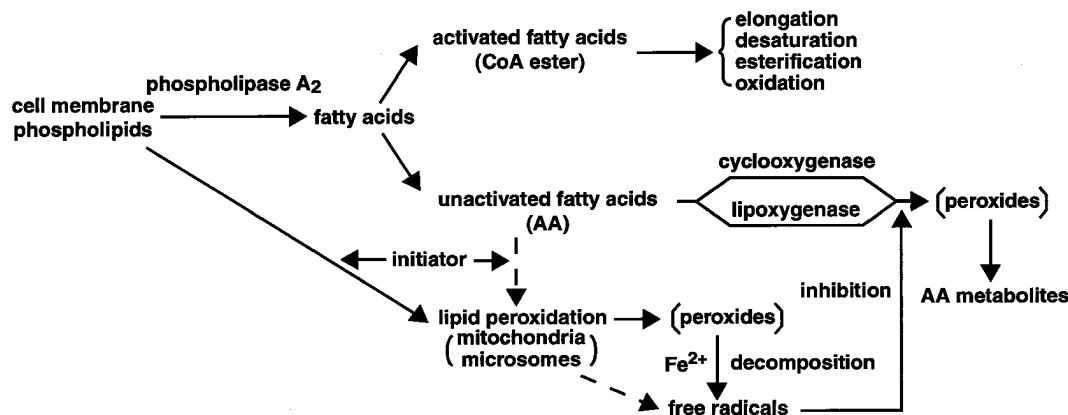


Fig. 7. Lipid Peroxides and Free Radicals from Membrane Phospholipids
AA: arachidonic acid.

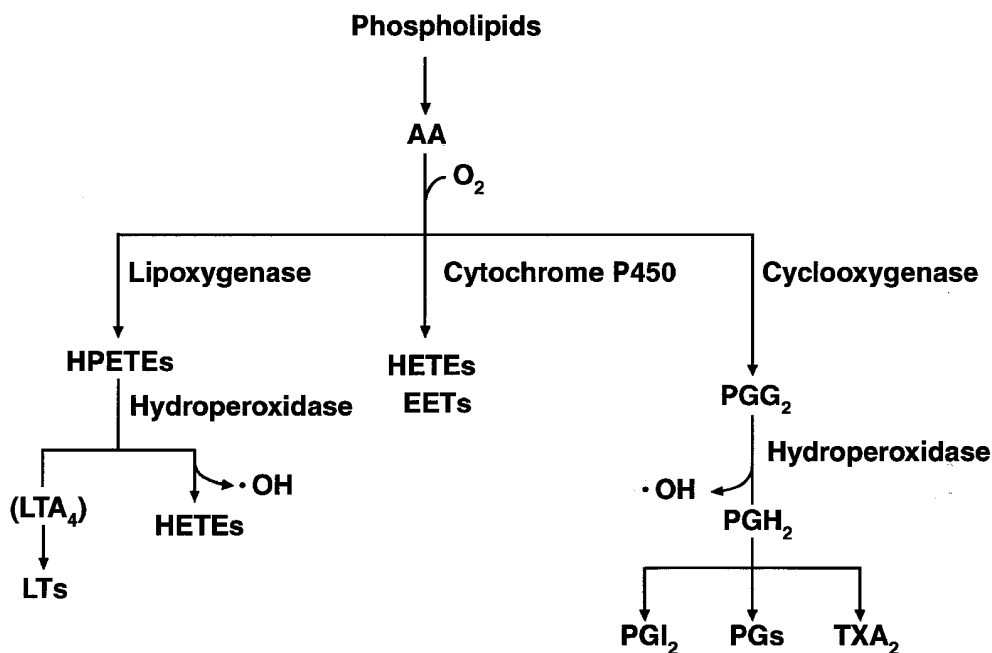


Fig. 8. AA Metabolism and the Generation of Reactive Oxygen Species

HPETE: hydroperoxyeicosatetraenoic acid, HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid, EET: epoxyeicosatrienoic acid, LT: leukotriene, PG: prostaglandin, TX: thromboxane.

素数 5, 12, 15 位のいずれかに酸素分子を添加して, HPETE, モノヒドロキシ酸 (HETE), ロイコトリエン (LT) が生成される. 我々は, 最近, リポキシゲナーゼ系の代謝産物である 12-HETE が, アンジオテンシン II による血管収縮を増強することを認めた (Fig. 9).⁴¹⁾ Figure 8 に示したように, HPETE から HETE に変換する際, $\cdot\text{OH}$ が生成される. リポキシゲナーゼ系で生成した 12-HPETE, 15-HPETE は PGI_2 合成酵素を著明に抑制するが,

12-HETE や 15-HETE にはそのような作用はないと言う.⁴²⁾ しかも, HPETE の PGI_2 合成酵素阻害効果は, $\cdot\text{OH}$ スキャベンジャーである MK-447 によって解除される. これらのことは, HPETE から HETE への変換時に発生する $\cdot\text{OH}$ によって, PGI_2 合成酵素が抑制されることを示している.

一方, Lands ら^{43,44)} はアラキドン酸をシクロオキシゲナーゼと反応する際, GSH-Px を添加すると PG 合成が抑制されることを観察した. このこと

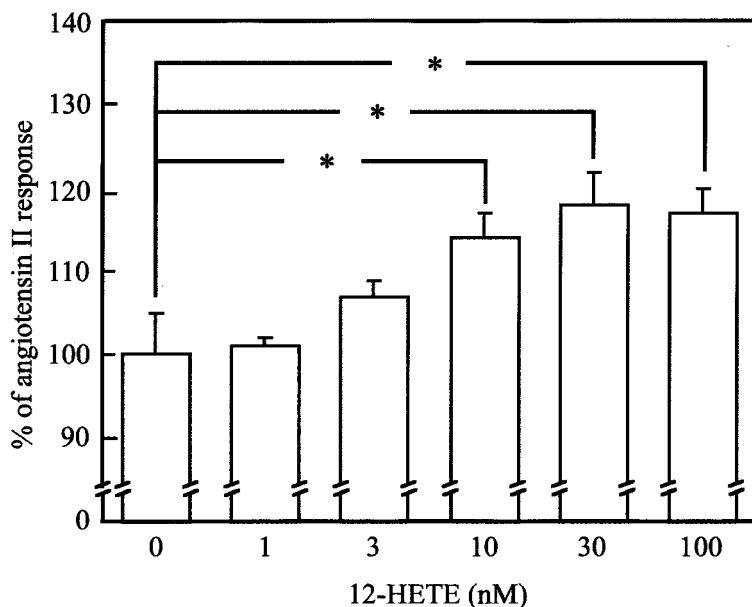


Fig. 9. Effects of 12-HETE on the Angiotensin II-Induced Contractile Response in Isolated Hamster Vessels

The artery strip (10 mm × 1.0 mm) was preincubated with the indicated concentrations of 12-HETE at 37°C for 5 min in Tyrode's solution. After preincubation, the angiotensin II (10 nM) response was observed. Vertical bars represent the means ± S.E.M. ($n=6$). * $p<0.01$; significantly different from each control angiotensin II response.

は、シクロオキシゲナーゼの反応を続行するためにはヒドロペルオキシド (PGG_2) の存在が必要であることを示している。さらに、 PGH_2 にはシクロオキシゲナーゼ活性に対する促進あるいは抑制作用がないことを Lands ら⁴⁵⁾ は認めている。また、12-HPETE が血小板の 12-リポキシゲナーゼ⁴⁶⁾ や白血球の 5-リポキシゲナーゼ⁴⁷⁾ を活性化するという報告もある。Gaudet ら⁴⁸⁾ は、脳虚血後に血流を再開すると、脳内 PG 類 (E_2 , $F_{2\alpha}$, D_2 , I_2) が著明に増加することを認めた。また、ロイコトリエンも、血流再開後に急増することが報告されている。⁴⁹⁾ このことは、虚血中に蓄積されたアラキドン酸の一部が、シクロオキシゲナーゼやリポキシゲナーゼにより、血流再開後に供給される酸素と反応して過酸化物となり、さらに、その後の代謝経路が賦活されることを示唆しているものと思われる。

著者らは、生理的な状態において、活性酸素あるいは過酸化脂質が PG 合成の調節にどのように関わっているかを明らかにするために、各種抗酸化剤あるいはヒドロペルオキシドのレベルに影響を及ぼすと思われる薬物の PG 合成に対する効果を検討した。腎髄質の PGE_2 生成は、 $\cdot OH$ のスクャベンジャーである 1,2-dimethoxyethane (DME)、一重項酸素 (1O_2) のスクャベンジャーである 2,5-di-

methylfuran (DMF) によっては促進されたが、sodium diethyldithiocarbamate, 2,6-di-tert-butylphenol, N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine のような強力な抗酸化剤によっては、著明に抑制されることを認めた (Table 3).⁵⁰⁾ このことより、シクロオキシゲナーゼ反応の進行には、少量の過酸化脂質の存在を必要とするが、PG 合成の間に生成される $\cdot OH$ や 1O_2 のような活性酸素は、シクロオキシゲナーゼを阻害するものと思われる。さらに、ヒドロペルオキシドのレベルを変動させるとされる薬物 (アジド, セレン) の腎髄質の PG 合成に対する影響を比較した (Fig. 10).⁵¹⁾ アジドはカタラーゼ活性を抑制するので、アジドの存在により細胞内の H_2O_2 の濃度が上昇することが予想される。セレンは GSH-Px の構成成分として抗酸化作用を発揮するので、セレンにより LOOH の分解消失が期待される。アジドは PG 合成を促進し、セレンは PG 合成を抑制した。これらのことは、少量の H_2O_2 あるいは過酸化脂質 (LOOH) が、シクロオキシゲナーゼの活性化に必要であることを示唆している。以上のように、シクロオキシゲナーゼ系やリポキシゲナーゼ系の代謝の進行に伴って必然的に生じてくる $\cdot OH$ やヒドロペルオキシドが、その代謝に関与している酵素活性を調節していることは、自己調節

Table 3. Effect of Various Antioxidants on the Biosynthesis of PGE in Rabbit Kidney Medulla Slices

Compound	Concentration (M)	PGE ($\mu\text{g/g}$ wet wt. of tissue)
No addition		2.66 \pm 0.19
1,2-Dimethoxyethane	10^{-5}	2.71 \pm 0.18
	10^{-4}	3.25 \pm 0.23
	10^{-3}	3.09 \pm 0.14
2,5-Dimethylfuran	10^{-5}	3.48 \pm 0.44
	10^{-4}	3.53 \pm 0.47
	10^{-3}	3.56 \pm 0.33
Sodium diethyl-dithiocarbamate	10^{-3}	0.86 \pm 0.23**
	10^{-2}	0.56 \pm 0.14**
2,6-Di-tert-butylphenol	10^{-4}	1.98 \pm 0.24
	10^{-3}	1.53 \pm 0.28*
<i>N,N'</i> -Diphenyl-p-phenylenediamine	10^{-6}	1.06 \pm 0.19**
	10^{-5}	0.53 \pm 0.18**

Slices were incubated for 30 min at 37°C in 0.15 M KCl/0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) in the presence or absence of drugs. Values are the means \pm S.E.M. ($n=5$).

* $p < 0.02$, ** $p < 0.01$: significantly different from control (No addition).

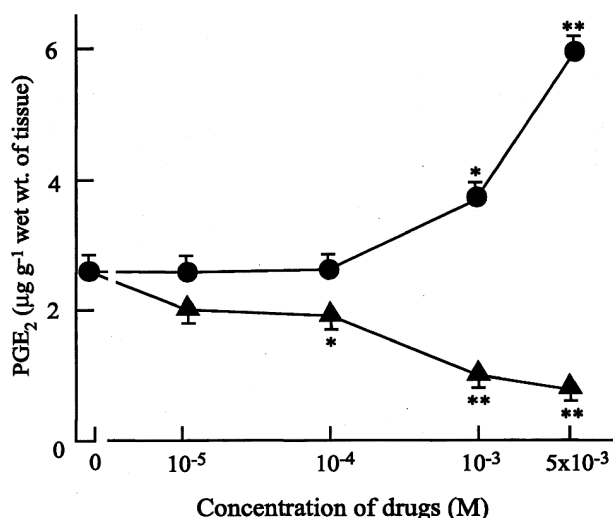


Fig. 10. Effects of Sodium Azide and Sodium Selenite on PGE₂ Synthesis of Rabbit Kidney Medulla Slices

Slices were incubated for 30 min at 37°C in 0.15 M KCl/0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) in the presence or absence of different concentrations of sodium azide (●) or sodium selenite (▲). Each point represents the mean of 5 experiments; vertical lines show S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; compared with the corresponding value in the absence of sodium azide and sodium selenite.

機構という観点からも興味深いものである。

次に、病的な場合を想定して、PG合成に対する脂質過酸化の影響を検討した。著者ら⁵²⁾はウサギ腎髄質切片を用い、AsAとFe²⁺で脂質過酸化を開始すると、時間の経過とともにPGE₂の合成は抑制されることを見出した (Fig. 11)。膜に結合してい

るホスホリパーゼ A₂ は脂質過酸化反応が促進している状態では活性化され、³⁴⁾ 膜リン脂質からの不飽和脂肪酸の遊離は促進されていた (Table 4)。⁵²⁾ このように AsA と Fe²⁺ で脂質過酸化が進行している時、PGの基質であるアラキドン酸はホスホリパーゼ A₂ によって供給されているにもかかわらず、PGの合成が抑制されていることは、脂質過酸化の過程でフリーラジカルや過酸化脂質が生成され、それによってシクロオキシゲナーゼが抑制されていることを示唆するものである。Tappelら⁵³⁾は、*in vivo* でデキストラン鉄を過剰に投与し脂質過酸化を促進すると、尿中へのPGE₂の排泄が抑制され、*in vivo*でのPG合成が脂質過酸化によって抑制されることを報告している。

さらに、ウサギ血小板でのアラキドン酸代謝に対するリノール酸の過酸化体 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid (13-HPODE) と、エイコサペンタエン酸 (EPA) の過酸化体 15-hydroperoxyeicosapentaenoic acid (15-HPEPE) の影響を検討した (Figs. 12,13)。^{54,55)} 13-HPODEは濃度依存的にシクロオキシゲナーゼを抑制し、リポキシゲナーゼにはほとんど影響を示さないこと、13-HPODEから生成するアルコール体である 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE)は、いずれの代謝系にも全く影響を及ぼさないこと、また、 $\cdot\text{OH}$ スキャベンジャーであるマンニトールあるいは

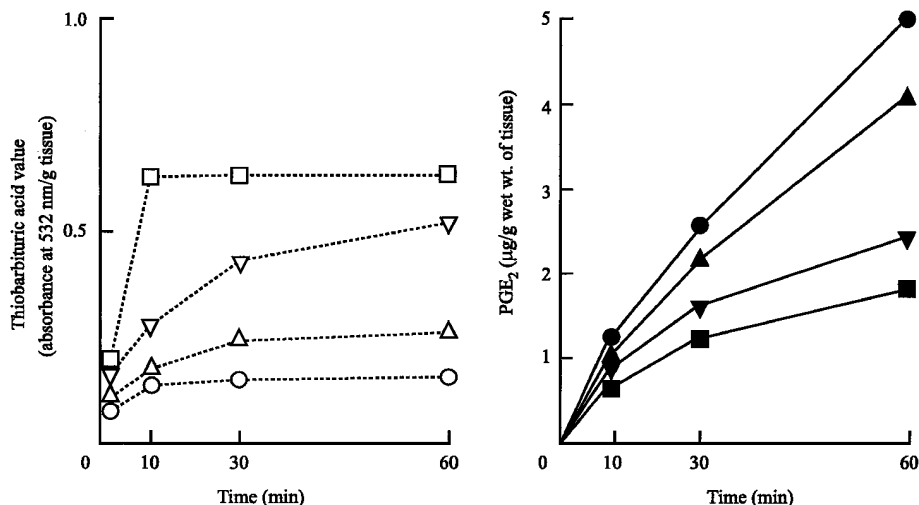


Fig. 11. Effects of AsA and Fe^{2+} on the Lipid Peroxidation and the Biosynthesis of PGE_2 of Rabbit Kidney Medulla Slices

Slices were incubated for 60 min at 37°C in $0.15\text{ M KCl}/0.02\text{ M Tris-HCl}$ buffer (pH 7.4) in the presence or absence of AsA and Fe^{2+} . Each point represents the mean of 3 experiments. \circ , \bullet ; Control; \triangle , \blacktriangle ; AsA (1 mM); ∇ , \blacktriangledown ; Fe^{2+} (0.4 mM); \square , \blacksquare ; AsA (1 mM) + Fe^{2+} (0.4 mM).

Table 4. Release of Fatty Acids from Rabbit Kidney Medulla Slices by AsA and Fe^{2+}

	Fatty acids released (percentage of fatty acids)				
	$\text{C}_{16:0}$	$\text{C}_{18:0}$	$\text{C}_{18:1}$	$\text{C}_{18:2}$	$\text{C}_{20:4}$
Control	70.7	29.3	+	+	+
AsA (1 mM) plus Fe^{2+} (0.4 mM)	38.6	22.6	17.9	12.1	8.8

Slices were incubated for 10 min at 37°C in $0.15\text{ M KCl}/0.02\text{ M Tris-HCl}$ buffer (pH 7.4) with and without AsA + Fe^{2+} . Plus signs indicate trace.

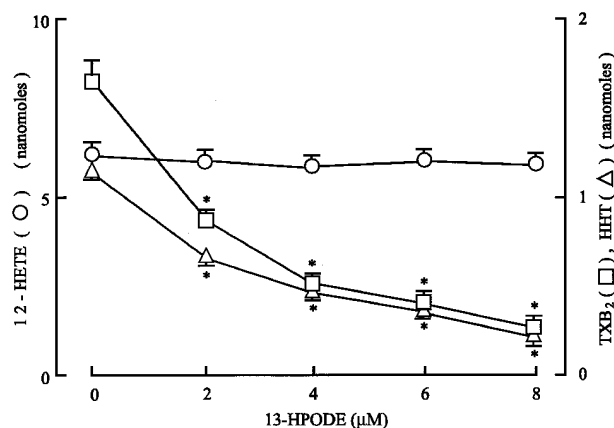


Fig. 12. Effects of 13-HPODE on the Formation of 12-HETE, TXB_2 and HHT in Washed Platelets

Platelets ($3 \times 10^8/\text{ml}$) were preincubated with various concentrations of 13-HPODE for 5 min at 37°C prior to the incubation with AA ($25\text{ }\mu\text{M}$) for 5 min. Each point represents the mean of 3 experiments; vertical lines show S.E.M. * $p < 0.01$; compared with the corresponding value in the absence of 13-HPODE. 13-HPODE: 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid, HHT: 12-hydroxyheptadecatrienoic acid.

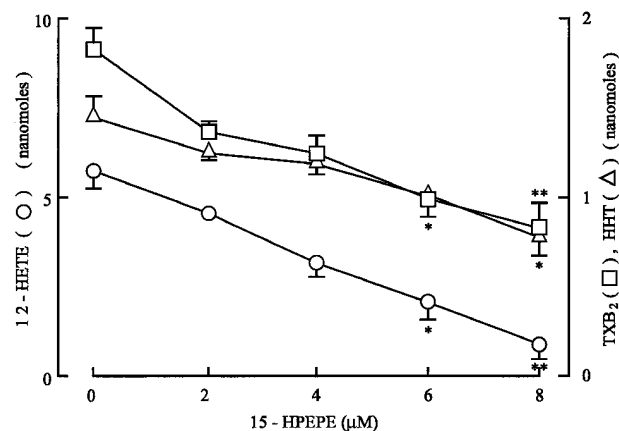


Fig. 13. Effects of 15-HPEPE on the Formation of 12-HETE, TXB_2 and HHT in Washed Platelets

Platelets ($3 \times 10^8/\text{ml}$) were preincubated with various concentrations of 13-HPODE for 5 min at 37°C prior to the incubation with AA ($40\text{ }\mu\text{M}$) for 5 min. Each point represents the mean of 4 experiments; vertical lines show S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; compared with the corresponding value in the absence of 15-HPEPE. 15-HPEPE: 15-hydroperoxyeicosapentaenoic acid.

DMSO を添加しても 13-HPODE のシクロオキシゲナーゼに対する抑制作用は変化しないことを見出した。このことは、13-HPODE によるシクロオキシゲナーゼの抑制には、hydroperoxy 基が必要であることを示している。健康食品として注目を集めている EPA の過酸化体である 15-HPEPE は濃度依存的に両酵素を抑制した。⁵⁵⁾ EPA 自体は 15-HPEPE の 10 倍以上の濃度ではじめて抑制を示した。15-HPEPE のアルコール体である 15-hydroxyeicosapentaenoic acid (15-HEPE) 及び $\cdot\text{OH}$ スキャ

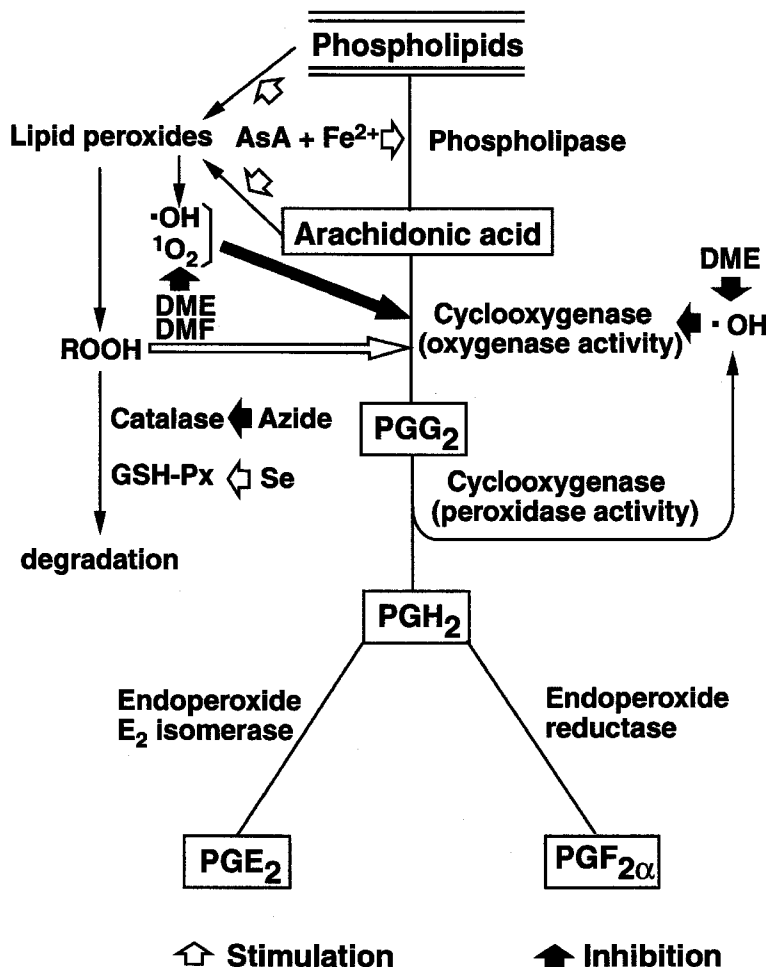


Fig. 14. Regulatory Mechanism of PG Biosynthesis by Factors which Regulate the Peroxide Tone
DME: 1,2-dimethoxyethane, DMF: 2,5-dimethylfuran.

ベンジャーの影響はほとんどみられず、13-HPODEと同様、hydroperoxy基が両酵素を抑制するのに必要であることが明らかとなった。以上のことより、過酸化脂質は、多量の場合、そのタイプと環境に応じてシクロオキシゲナーゼあるいはリポキシゲナーゼ活性を抑制すると思われる。

シクロオキシゲナーゼ系、リポキシゲナーゼ系あるいは一般的な過酸化反応で生成したヒドロペルオキシドや $\cdot\text{OH}$ が、その近辺で作用することは大体推定できるとしても、これまでの成績はすべて *in vitro* における実験に基づいていることであって、実験の組み立てによって、いろいろな角度からの証明は可能だとしても、はたして *in vivo* でもこのような反応が進行するかは大変疑問に思うところである。なぜなら、ヒドロペルオキシドによるシクロオキシゲナーゼ活性化効果は非常に低濃度でその効果が発揮され、^{56,57)} 例え *in vivo* でヒドロペルオキシ

ドが生じても、カタラーゼ、GSH-Pxのような酵素がその作用を無力化してしまう機構があるからである。また、 $\cdot\text{OH}$ は発生した部位でその周囲の脂質、タンパク、糖など生体成分のあらゆるものに攻撃をかけ、 $\cdot\text{OH}$ それ自身は消滅の運命となる。すなわち、生成した場所の近くに存在する化合物と速やかに反応し、特定の物質と選択的に反応することはない。あらゆる化合物が、 $\cdot\text{OH}$ の捕捉剤として作用していることになる。このように、生理的条件下で発生するヒドロペルオキシドや $\cdot\text{OH}$ の作用は、さほど酵素系に影響を及ぼさないかもしれない (Fig. 14)。

しかし、病的な場合、例えば虚血状態、組織が損傷を受け炎症を起こした場合、白血球の食作用時、あるいは薬物アドリアマイシン、パラコート服用した時に生成する $\text{O}_2\cdot$ が H_2O_2 に変換され、さらに、活性の強い $\cdot\text{OH}$ へと多量に変換して生体膜の

損傷、酵素活性の抑制へとその作用が発展していく可能性がより現実的ではなからうか。アラキドン酸カスケードにおける過酸化脂質の影響は、*in vitro* に比し、⁵²⁾ *in vivo* での実験系はいろいろな因子が関与するので、その機構の証明は難しい。現在のところでは、膜レベルにおいて、また、ミトコンドリアやマイクロソームの脂質過酸化反応から誘導されるフリーラジカルあるいは過酸化脂質によって膜障害、代謝機能の低下などが引き起こされると考えるのが一般的であろう。

いずれにしても、これまでの成績が *in vitro* での現象にすぎないのか、*in vivo* で活性酸素や過酸化脂質がどの程度の濃度でその作用を発揮するのか、今後の難しい問題が残されているような気がする。

5. おわりに

活性酸素—過酸化脂質の生体組織における生成と消去機構、及び若干の生理活性について概略を述べた。1985 年以来、活性酸素の生体における挙動、影響について数多くの報告があり、また、臨床面からも大きな関心が寄せられているが、その結果については、ほとんどが現象面からの解釈で本質的なものは未解明である。それは、この方面の研究では、*in vitro* の成績がそのまま *in vivo* の実験に適用できないからであろう。また、脂質過酸化反応を最初に引き起こす活性種が何であるかについてはさまざまな説がある。

Bast と Steeghs⁵⁸⁾ はラット肝マイクロソームの NADPH 依存性の脂質過酸化反応において・OH の生成を認めつつも、それは開始剤にはならないと言う。つまり、反応系にカタラーゼ、あるいは捕捉剤である DMSO を添加しても脂質過酸化は抑制されず、過酸化の開始剤には他の活性種の存在を示唆している。これに関連して、肝マイクロソームにおける脂質過酸化は、鉄—酸素錯体であるペルフェリルイオン ($\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2$) により開始されることが報告されている。⁵⁹⁾ このペルフェリルイオンは、 ADP-Fe^{3+} が肝マイクロソームの NADPH チトクローム P450 還元酵素の作用により、NADPH から電子を受けて ADP-Fe^{2+} となり、分子状酸素と結合してペルフェリルイオンが形成されると言う。このように、脂質過酸化を引き起こす活性種は特定できず、反応の場や状況に応じて変化すると思われる。それぞれの活性種がどこで生成されるのか、その場が極めて

重要である。膜の脂質過酸化の促進により、いろいろな障害、例えば、酵素活性の低下や生理活性物質の減少などさまざまな現象が考えられ、種々の疾病の誘因になる可能性は十分考えられる。しかし、活性酸素により、特異的に障害をきたす臓器特異性は、異物を投与しない限り生理的には考えられない。生体で脂質過酸化が行われる場合、どの細胞顆粒画分が特に障害を受けるか、また、その反応を部位ごとに検知する方法は、現在のところまだ確立されていない。当然、防御も部位ごとに行うことは望めない。総合的な抗酸化剤を適用することが現実的であろう。活性酸素誘導による膜障害が、その発生と消去のバランスの崩れから出現することが一般的に認められている。この関係を如実に示しているのが、近年、特に話題となっている虚血—再灌流の研究であろう。この実験系は基礎と臨床の接点を示しているように思われるが、SOD という酵素を用いて体内の活性酸素の挙動を判断することには無理がある。なぜなら、SOD やカタラーゼが高分子タンパクのため膜の透過性はなく、どのような機序で細胞内の活性酸素を消去するかということに関しては、未だ解明されていない。

一方、虚血—再灌流時の膜障害におけるホスホリパーゼ A₂ の働きも無視できない。再灌流に伴っての Ca^{2+} の流入がホスホリパーゼ A₂ の活性を高め、膜リン脂質の分解を促すからである。活性酸素—過酸化脂質の一連の反応系にかかわる酵素、発生するラジカルを直接証明する手段、定量的⁶⁰⁾な議論を進め、生体における活性酸素—過酸化脂質の役割を解明することが今後の課題と思われる。

謝辞 本研究の遂行にあたり積極的に貢献していただいた大阪薬科大学衛生化学教室 藤本陽子助教授、佐久間覚助手、在籍した助手、薬学研究科大学院生、並びに薬学部学生の皆さんに厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Wakeyama H., Takeshige K., Takayanagi R., Minakami S., *Biochem. J.*, **205**, 593–601 (1982).
- 2) Turrens J. F., Alexandre A., Lehninger A. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**, 408–414

- (1985).
- 3) Ingelman-Sundberg M., Johansson I., *J. Biol. Chem.*, **259**, 6447–6458 (1984).
 - 4) Minakami H., Arai H., Nakano M., Sugioka K., Suzuki S., Sotomatsu A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 973–978 (1988).
 - 5) Granger D. N., Rutili G., McCord T. M., *Gastroenterology*, **81**, 22–29 (1981).
 - 6) Wajner M., Harkness R. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **991**, 79–84 (1989).
 - 7) Sakuma S., Fujimoto Y., Iwai M., Fujimoto K., Yasuda M., Nishida H., Fujita T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 487–490 (1994).
 - 8) Sakuma S., Fujimoto Y., Sakamoto Y., Uchiyama T., Yoshioka K., Nishida H., Fujita T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **230**, 476–479 (1997).
 - 9) Nordström G., Seeman T., Hasselgren P. O., *Surgery*, **97**, 679–684 (1985).
 - 10) Yoshikawa T., Ueda S., Naito Y., Takahashi S., Oyamada H., Morita Y., Yoneta T., Kondo M., *Free Radic. Res. Commun.*, **17**, 285–291 (1989).
 - 11) Fujimoto Y., Sakuma S., Tagami T., Ichikawa R., Fujita T., *Life Sci.*, **68**, 517–524 (2000).
 - 12) Halliwell B., *FASEB J.*, **1**, 358–364 (1987).
 - 13) Arroyo C. M., Kamer J. H., Dickeus B. F., Weglicki W. B., *FEBS Lett.*, **22**, 101–104 (1987).
 - 14) Das D. K., George A., Liu X., Rao P. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 1004–1009 (1989).
 - 15) Ganote C. E., Sims M., Safavi S., *Am. J. Pathol.*, **109**, 270–276 (1982).
 - 16) Bolli R., Zhv W. X., Hartley C. J., Michael R. C., Roberts R., *Circulation*, **76**, 458–468 (1987).
 - 17) Takahashi M., Asada K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **226**, 558–566 (1983).
 - 18) Niki E., “Kasseisanso,” ed. by Niki E., Shimasaki H., Ishiyaku-shuppan, Tokyo, 1987, pp. 1–32.
 - 19) Thomas M. J., Mehl K. S., Pryor W. A., *J. Biol. Chem.*, **257**, 8343–8347 (1982).
 - 20) B’elski B. H., Arudi R. L., Sutherland H. W., *J. Biol. Chem.*, **258**, 4759–4761 (1982).
 - 21) Granger D.N., *Am. J. Physiol.*, **255**, H1269–H1275 (1988).
 - 22) Biemond P., Van Eijk H. G., Swaak A. J. G., Koster J. F., *J. Clin. Invest.*, **73**, 1576–1579 (1984).
 - 23) Biemond P., Swaak A. J. G., Van Eijk H. G., Koster J. F., *Free Radic. Biol. Med.*, **4**, 185–198 (1988).
 - 24) Lynch E., Fridovich I., *J. Biol. Chem.*, **253**, 1838–1845 (1978).
 - 25) Flohé L., Brand I., *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 541–549 (1969).
 - 26) Nishiki K., Jamieson D., Oshino N., Chance B., *Biochem. J.*, **160**, 343–355 (1976).
 - 27) Halliwell B., Gutteridge J. M. C., *Biochem. J.*, **219**, 1–14 (1984).
 - 28) Inoue M., Watanabe N., *Modern Medicine*, **17**, 84–87 (1988).
 - 29) Kyle M. E., Nakae D., Sakaida I., Miccadei S., Farber J. L., *J. Biol. Chem.*, **263**, 3784–3789 (1988).
 - 30) Fukuzawa K., Takaishi Y., *J. Act. Oxyg. Free Rad.*, **1**, 55–70 (1990).
 - 31) Fujita T., “Lipid Peroxides and Allied Diseases,” ed. by Yagi K., Goshima Y., Igaku-shoin, Tokyo, 1981, pp. 65–72.
 - 32) Fujita T., “Vitamin E–Kiso to Rinsho-,” ed. by Igarashi O., Ishiyaku-shuppan, Tokyo, 1985, pp. 116–122.
 - 33) Fujimoto Y., Fujita T., *Br. J. Pharmacol.*, **76**, 373–379 (1982).
 - 34) Yasuda M., Fujita T., *Japan. J. Pharmacol.*, **27**, 429–435 (1977).
 - 35) Sevanian A., Stein R. A., Mead J. F., *Lipids*, **16**, 781–789 (1981).
 - 36) Sevanian A., Kim E., *J. Free Radic. Biol. Med.*, **1**, 263–271 (1985).
 - 37) Sevanian A., Mvakkassah-Kelly S.F., Montestruque S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 441–452 (1983).
 - 38) Maiorino M., Coassin M., Roveri A., Ursini F., *Lipids*, **24**, 721–726 (1989).
 - 39) Douglas C. E., Chan A. C., Choy P. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **876**, 639–645 (1986).
 - 40) Egan R. W., Paxton J., Kuehl F. A. Jr., *J. Biol. Chem.*, **251**, 7329–7335 (1976).
 - 41) Takai S., Jin D., Hara K., Takami H., Fujita T., Miyazaki M., *Eur. J. Pharmacol.*, **358**, 161–164 (1998).
 - 42) Ham E. A., Egan R. W., Soderman D. D.,

- Gale P. H., Kuhl F. A. Jr., *J. Biol. Chem.*, **254**, 2191–2194 (1979).
- 43) Smith W. L., Lands W. E. M., *Biochemistry*, **11**, 3276–3285 (1972).
- 44) Lands W. E. M., Lee R., Smith W. L., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **180**, 107–122 (1971).
- 45) Hemler M. E., Graff G., Lands W. E. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1325–1331 (1978).
- 46) Siegel M. I., McConnell R. T., Abrahams S. L., Porter N. A., Cuatrecasas P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1273–1280 (1979).
- 47) Maclouf J., deLaclos B. F., Borgeat P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 6042–6046 (1982).
- 48) Gaudet R. J., Alam I., Levine L., *J. Neurochem.*, **35**, 653–658 (1980).
- 49) Moskowitz M. A., Kiwak K. J., Hekimian K., Levine L., *Science*, **224**, 886–889 (1984).
- 50) Fujita T., Fujimoto Y., Tanioka H., *Experientia*, **38**, 1472 (1982).
- 51) Fujimoto Y., Yamamoto T., Niwase N., Fujita T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 129–130 (1985).
- 52) Fujimoto Y., Fujita T., *Biochim. Biophys. Acta*, **710**, 82–86 (1982).
- 53) Gavino V. C., Dillard C. J., Tappel A. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**, 322–327 (1985).
- 54) Fujimoto Y., Sumiya T., Tsunomori M., Nishida H., Sakuma S., Fujita T., *Int. J. Biochem.*, **26**, 127–131 (1994).
- 55) Tsunomori M., Fujimoto Y., Muta E., Nishida H., Sakuma S., Fujita T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1300**, 171–176 (1996).
- 56) Bordet J. C., Guichardant M., Lagarde M., *Biochim. Biophys. Acta*, **958**, 460–468 (1988).
- 57) Pendleton R. B., Lands W. E. M., *Free Radic. Biol. Med.*, **3**, 337–339 (1987).
- 58) Bast A., Steeghs M. H. M., *Experientia*, **42**, 555–556 (1986).
- 59) Minotti G., Aust S. D., *J. Biol. Chem.*, **262**, 1098–1104 (1987).
- 60) Gutteridge J. M., Halliwell B., *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 129–135 (1990).