

ウシ網膜ホモジネートのラジカル惹起剤誘導脂質過酸化 反応に対する各種抗酸化剤の効果の比較

鈴木 克則¹⁾, 植田 俊彦¹⁾, 植田 孝子²⁾, 山本 順寛³⁾, 千田 実穂¹⁾, 松石 美応¹⁾
姜 和哲¹⁾, 比嘉 明¹⁾, Donald Armstrong¹⁾, 安原 一²⁾, 小出 良平¹⁾

¹⁾昭和大学医学部眼科学教室, ²⁾昭和大学医学部第2薬理学教室

³⁾東京大学先端科学技術研究センター生命大部門生命反応化学分野

要 約

目 的: ウシ網膜の脂質過酸化反応に対する抗酸化剤の阻害効果を比較検討する。

方 法: 脂溶性かつ水溶性のいずれでも反応する鉄イオン, 脂溶性 (AMVN), 水溶性 (AAPH) の3種類のラジカル惹起剤を用い, 抗酸化剤の効果を比較した。脂質過酸化物として phosphatidylcholine hydroperoxide (PC-OOH) を高性能液体クロマトグラフィ (HPLC) により測定した。

結果および結論: Troglitazone は, 鉄イオンまたは AMVN 惹起による網膜ホモジネートの脂質過酸化反応

を抑制する強い効果があったことから, 特に膜内で作用し, quercetin は AMVN または AAPH 惹起による脂質過酸化反応を同様に抑制することから, 膜内だけでなく, 膜の外側でのラジカルスカベンジ効果を持つことが推定された。本法は, 抗酸化剤の総合的な酸化ストレスからの防御効果の評価に有効, かつ簡便なスクリーニング法であると考えられる。(日眼会誌 104 : 466—470, 2000)

キーワード: 脂質過酸化物, 抗酸化剤, 網膜ホモジネート, Troglitazone, Quercetin

Effect of Antioxidants on Radical-initiated Peroxidation of Retinal Homogenate

Katsunori Suzuki¹⁾, Toshihiko Ueda¹⁾, Takako Ueda²⁾, Yorihiro Yamamoto³⁾, Miho Chida¹⁾
Miou Matsuishi¹⁾, Kazuaki Kan¹⁾, Akira Higa¹⁾, Donald Armstrong¹⁾
Hajime Yasuhara²⁾ and Ryohei Koide¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine

²⁾Department of Pharmacology, Showa University School of Medicine

³⁾Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo

Abstract

Purpose: To compare the effect of antioxidants on radical-initiated peroxidation of retinal homogenate.

Methods: Lipid peroxides in bovine retinal homogenate were induced by 5 mM FeNO₃ (Fe), 25 mM 2, 2'-azobis(2, 4'-dimethylvaleronitrile) (lipid-soluble, AMVN) or 50 mM 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (water-soluble, AAPH) and the preventive effects of antioxidants were measured. Phosphatidylcholine hydroperoxide (PC-OOH) was analyzed with high performance liquid chromatography (HPLC) as the endpoint biomarker.

Results and Conclusion: Troglitazone, an oral hypoglycemic agent, inhibited PC-OOH production

by Fe and AMVN. Therefore, it may be effective for protecting against oxidative stress on the inner surface plasma membranes and subcellular organelle. Quercetin has radical scavenging effects on both sides of the membrane, because it prevents PC-OOH production by AMVN or AAPH. These results demonstrate the usefulness of an *in vitro* screening test that can accurately and rapidly determine the capacity of an antioxidant against lipid peroxidation or oxidative stress. (J Jpn Ophthalmol Soc 104 : 466—470, 2000)

Key words: Lipid hydroperoxide, Antioxidant, Retinal homogenate, Troglitazone, Quercetin

別刷請求先: 142-8666 東京都品川区旗の台1-5-8 昭和大学医学部眼科学教室 鈴木 克則

(平成11年12月6日受付, 平成12年2月7日改訂受理)

Reprint requests to: Katsunori Suzuki, M.D. Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666, Japan

(Received December 6, 1999 and accepted in revised form February 7, 2000)

I 緒 言

脂溶性抗酸化物質である vitamin E (VE) は、細胞膜および細胞内小胞器膜中で発生するラジカルを捕獲して膜の障害を防いでいる。ラジカルを捕獲した VE は VE ラジカルとなり、再び、細胞外液中の水溶性抗酸化物質である vitamin C と ubiquinol によって還元され、自らは元の VE に戻る¹⁾。このように抗酸化物質は、生体内の脂溶性または水溶性環境により、それぞれ作用が異なる。一方、網膜は、特に視細胞外節で docosahexaenoic acid などの多くの高度不飽和脂肪酸を含み²⁾、フリーラジカルが存在すれば容易に過酸化を受ける³⁾。さらに、網膜は光の曝露や、多くの酸素の供給によりフリーラジカルが発生しやすい環境にある。したがって、フリーラジカル反応を抑制することが種々の網膜疾患の治療効果をもたらすと考えられる。この20年余りの間に、加齢黄斑変性症⁴⁾、糖尿病網膜症^{5)~7)}、未熟児網膜症^{8)~11)}、網膜色素変性症¹²⁾の治療に抗酸化剤の投与が試みられている。

これまでに種々の抗酸化剤が網膜脂質過酸化反応に対し、どの程度の抗酸化効果を持つのかを推測するための *in vitro* assay 法が報告^{13)~15)}されている。今回は、さらに①脂質過酸化の指標として、細胞膜や細胞内小胞器膜に最も多く含まれる phosphatidylcholine (ヒトでは全脂質量のうち 32.1 mol%)²⁾の過酸化物質 [phosphatidylcholine hydroperoxide (PC-OOH)] を測定し、②ラジカル惹起薬として水溶性、かつ脂溶性部分で反応する鉄イオン¹⁶⁾、脂溶性ラジカル惹起剤¹⁷⁾、水溶性ラジカル惹起剤¹⁸⁾を使用し、③不飽和脂肪酸の多い網膜ホモジネートを用いて脂質過酸化反応阻害効果を調べ、抗酸化剤の脂溶性、水溶性における作用を推測する簡便スクリーニング法を開発したので紹介する。

II 実験方法

ウシ眼球を用いて網膜ホモジネートを作製した。屠殺場からウシ眼を得て、水で低温を保ちつつ、早急に研究室に運び速やかに Ueda ら¹⁴⁾の方法に従って網膜を摘出した。始めにウシ眼球から anterior segment を切除した。残った eye cup 中の網膜を鑷子で剝離し視神経乳頭部で切除、摘出した。摘出した網膜は重量を測定し、網膜サンプルとして -80°C の冷凍庫で保管した。実験に際し、網膜サンプルを解冻し、網膜重量の5倍量の精製水を加え、氷浴中で 40 W 10 s の超音波 (Branson Sonifier cell Disruptor 200) を用いて細胞を破壊し、網膜ホモジネート (10 mg protein/ml) として実験に使用した。

1. 過酸化惹起反応および抗酸化剤添加実験条件

10 ml ガラス試験管に網膜ホモジネート 50 μ l とラジカル惹起剤 10 μ l を加え、総量が 200 μ l になるように精製水 (140 μ l) を加え、37°C 水浴で 0, 15, 30, 60, 90 分、または 120 分間加温した。ラジカル惹起剤として、5 mM

FeNO₃ と 80 mM ADP の混和液 (鉄イオン)¹⁹⁾、25 mM 2,2'-azobis(2,4 dimethylvaleronitrile) (AMVN)、または 50 mM 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) の3剤を使用した。また、抗酸化剤添加実験では 10 ml ガラス試験管に網膜ホモジネート 50 μ l とラジカル惹起剤 10 μ l、または各抗酸化薬 10 μ l をそれぞれ添加し、総量 200 μ l になるように精製水 (130 μ l) を加え、37°C 水浴で 60 分間加温し、50% inhibition concentration (IC₅₀) 測定用試料とした。また、経時的な観察実験では 0, 15, 30, 60, 90 分、または 120 分間の加温を行い、PC-OOH 生成に及ぼす阻害の割合および経時的变化の測定用試料とした。

2. 抗酸化剤

脂溶性化合物として vitamin E は palm oil から抽出したもの (palm oil は tocopherol-tocotrienol 比 1:1.7, PO-RIM Selanger, マレーシア)、catechin (Aldrich Chem. Co. WN, 米国)、(±)-5-[4-(6-hydroxy 2,5,7,8, tetramethylchroman-2-ylmethoxy) benzyl]-2,4 thazolidinedione (troglidazone, 三共製薬) を用い、溶媒には 99.5% ethanol を用いた。水溶性化合物として白樺の木皮を原料とする flavonoid の一種である pycnogenol (Kaire Int'l, CO, 米国)、uric acid (Sigma Chem. Co, MO, 米国)、quercetin (Sigma Chem. Co, MO, 米国) を用い、精製水を用いて試料を溶解した。各抗酸化剤は最終濃度が 10⁻³—10⁻⁹ M となるように調整し実験に用いた。

3. PC-OOH 測定

網膜ホモジネート中の PC-OOH は、高性能液体クロマトグラフィ (HPLC) を使い、山本ら¹¹⁾の方法で分析した。過酸化惹起反応および抗酸化剤添加実験終了後に試料 200 μ l を 1.5 ml マクロチューブに分取し、2 倍量の chloroform/methanol [1/2(v/v), 400 μ l] 溶液を加え、1 分間激しく混和し、12,000 rpm で 2 分間の遠心分離操作の後、chloroform 層に分取した。分取した chloroform 層 10 μ l を HPLC system (JASCO) で分離、定量した。使用したカラムは silica column (5 μ m, 4.6×250 mm, Superco)、移動相には methanol/40 mM monobasic sodium phosphate (9:1, by volume) を用い、吸光度 234 nm で測定を行った。その網膜ホモジネート中の PC-OOH 量は、pmol/mg protein で表した。

4. 蛋白定量

網膜ホモジネート中蛋白量は DC Protein Assay Kit (BIO-RAD Co, 米国) を用いて測定した。

5. 統計学的解析法

統計学的解析は、Student's t-test を用いた。

III 結 果

1. ラジカル惹起剤の違いによる PC-OOH 生成反応の経時的变化 (図 1)

網膜ホモジネート中 PC-OOH 量は鉄イオン添加によ

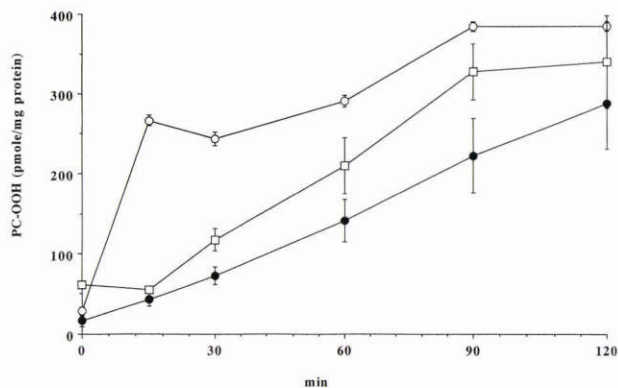


図1 ラジカル惹起剤の違いによるPC-OOH生成反応の経時的变化。

縦軸には網膜ホモジネート中PC-OOH量を、横軸にはインキュベーション時間を示した。図にはラジカル惹起剤として5 mM FeNO₃と80 mM ADP(○), 25 mM AMVN(●), 50 mM AAPH(□)を用いた場合のPC-OOH量を示した。5回の実験結果から求めた各値は平均値±標準誤差で表した。

PC-OOH: phosphatidylcholineの過酸化物質, AMVN: azobis(2,4 dimethylvaleronitrile), AAPH: azobis(2-amidinoprpane) dihydrochloride

り最初の37℃水浴で15分間加温で急激に増加し、90分まで穏やかに増加した。AMVNまたはAAPH添加により、網膜ホモジネート中PC-OOH量はそれぞれ120分後または90分後まで経時的に増加した。したがって、PC-OOH生成抑制反応実験は60分間のインキュベーション後に検討した。

2. ラジカル惹起剤による網膜ホモジネート中PC-OOH増加に及ぼす抗酸化剤の効果

惹起剤の違いによる抗酸化剤の効果を比較するため、網膜ホモジネート中PC-OOH生成量を50%阻害する濃度(IC₅₀)を表1に示した。水溶性かつ脂溶性下で反応する鉄イオンにより網膜ホモジネート中PC-OOH量は37℃で水浴中60分間の加温により34.3±2.2(平均値±標準誤差) pmol/mg proteinから346.2±5.1 pmol/mg proteinと約10倍に増加し、脂溶性ラジカル惹起剤であるAMVNでは166.4±2.9 pmol/mg protein, 水溶性ラジカル惹起剤であるAAPHでは198.3±3.4 pmol/mg proteinとそれぞれ有意に増加した(p<0.01)。そこで、鉄イオンを惹起剤として用いた場合にはtroglitazoneが最も高い効果を示した。IC₅₀は0.3±0.15(平均値±標準誤差)μMとなった。最も阻害効果が低かったのはuric acidでIC₅₀は1 mM以上となった。AMVNによるPC-OOH生成に対してもtroglitazoneが最も効果が高く、IC₅₀は0.34±0.27 μMで、鉄イオンを惹起剤とした場合に比べフラボノイドであるquercetinを用いた場合、IC₅₀は5.10±4.9 μMとなった。一方、AAPHを惹起剤として用いた場合にはtroglitazoneは阻害しなかったが、他の抗酸化剤は阻害した。

表1 ラジカル惹起の違いによる網膜中PC-OOHに及ぼす抗酸化剤の効果(IC₅₀)

Experimental condition	鉄イオン (5 mM)	AAPH (50 mM)	AMVN (25 mM)
Troglitazone	0.3 ± 0.15	>100	0.3 ± 0.3
Quercetin	44.0 ± 15.0	7.1 ± 4.8	5.1 ± 4.9
Vitamin E	3.0 ± 0.5	13.0 ± 6.0	1.4 ± 1.0
Pycnogenol	10.0 ± 2.0	9.8 ± 3.2	2.3 ± 0.3
Catechin	56.0 ± 12.0	14.0 ± 8.0	68.0 ± 5.0
Uric acid	>100	17.0 ± 5.0	>100

鉄イオン: 5 mM FeNO₃と80 mM ADPの混和液, AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinoprpane) dihydrochloride, AMVN: 2,2'-azobis(2,4 dimethylvaleronitrile), PC-OOH: phosphatidylcholine hydroperoxide.

IC₅₀(50% Inhibition concentration, μM) 数値はそれぞれ独立した5回の実験結果から求め、平均±標準誤差で示した。網膜ホモジネート中PC-OOH(pmol/mg protein)を下記に示した。

Without radical initiator	34.3 ± 2.2	22.2 ± 2.1	49.8 ± 2.2
With radical initiator	346.2 ± 5.1	198.3 ± 3.4	166.4 ± 2.9

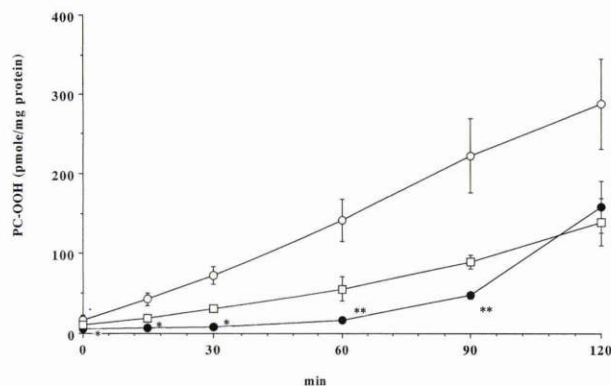


図2 AMVN誘導脂質過酸化反応に及ぼすquercetinまたはtroglitazoneの効果。

縦軸には網膜ホモジネート中PC-OOH量を、横軸にはインキュベーション時間を示した。図には25 mM AMVN単独(○), 25 mM AMVN+10⁻⁵ M quercetin(□), 25 mM AMVN+10⁻⁵ M troglitazone(●)を加えた場合のPC-OOH量を示した。5回の実験結果から求めた各値は平均値±標準誤差で表した。

** : p<0.01, * : p<0.05(vs. AMVN単独)

3. Quercetinとtroglitazoneの抗酸化能の比較

AMVN誘導脂質過酸化反応に対するquercetin, またはtroglitazoneの効果について経時的に検討した。90分後までtroglitazoneは有意なPC-OOH生成抑制効果(p<0.01)を示し、quercetinに比べ阻害効果は著明であった(図2)。

脂質過酸化惹起剤として、AAPHを用いた場合には90分後にquercetinでPC-OOH生成は18%(p<0.05), troglitazoneでは53%となった(図3)。

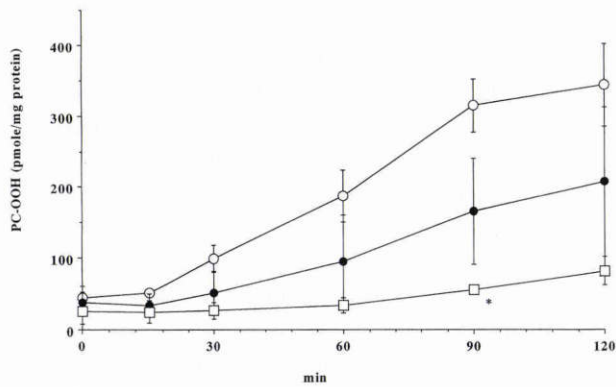


図3 AAPH誘導脂質過酸化反応に及ぼす quercetin または troglitazon の効果.

縦軸には網膜ホモジネート中 PC-OOH 量を、横軸にはインキュベーション時間を示した。図には 50 mM 単独 (○), 50 mM AAPH + 10⁻⁵ M quercetin (□), 50 mM AAPH + 10⁻⁵ M troglitazon (●) を加えた場合の PC-OOH 量を示した。5 回の実験結果から求めた各値は平均値 ± 標準誤差で表した。

** : p < 0.01, * : p < 0.05 (vs. AMVN 単独)

IV 考 按

生体の過酸化反応を抑制するためには、水溶性環境部分でのラジカル反応、例えば細胞質内の活性酸素が細胞膜に到達する前に捕獲する方法と、脂溶性環境部分でのラジカル反応、例えば細胞膜の中で発生した過酸化連鎖反応を停止させる方法の 2 種類がある。当然、脂溶性薬物は細胞膜内に溶解しやすいが、細胞膜内にどれくらい到達するかが問題で、生体に投与する前に、本実験のように細胞膜やミトコンドリアなどの細胞内小器官官膜を含むホモジネートを用いた *in vitro* の実験は重要である。

これまでの鉄イオンでラジカル反応を調べてきた報告は多い。出血などにより組織内に存在する鉄イオンは¹⁶⁾、水溶性でも脂溶性のいずれの環境でもすべて強い過酸化反応を起こすので、その意味ではすべての過酸化反応といえる。しかし、生体内では通常膜成分が過酸化されるので、脂溶性環境で抗酸化作用を示す物質がより有効である。ラジカル惹起剤として鉄イオンを用いた場合は troglitazone > VE > pycnogenol > quercetin > catechin > uric acid (UA), となり、一方 AMVN で反応させた脂溶性部分においても同様に、troglitazone > VE > pycnogenol > quercetin > catechin > UA で、両者は同じ傾向となった。このことから、多くの過酸化反応は脂溶性の反応を抑制することが重要であり、この点では troglitazone が最も有効であると考えられる。Troglitazone は α -tocopherol と構造が類似しているので、フェノール環の水酸基が oxygen radical に結合することで抗酸化効果を示し、その効果は α -tocopherol よりもやや強いと報告²¹⁾されている。今回の結果は、これに一致するものであり、ウシ網膜内 PC-OOH 生成に対する抗酸化作用は VE よりやや

強いことが確認された。

IC₅₀ の値から生体内での有効作用を推測すると、10⁻⁷ M から 10⁻⁵ M くらいと概算される。今回の結果では、水溶性環境での troglitazone の IC₅₀ は 100 μ M (10⁻⁴ M) 以上なので生体内では有効性がないと推測される。したがって、troglitazone は膜にラジカルが到達する前にラジカルを捕獲することはできず、troglitazone を投与する場合は水溶性の環境で作用を示す quercetin などの水溶性抗酸化剤と併用する方が有用であると考えられる。単剤で投与する場合には、水溶性でも脂溶性でも μ M オーダーで作用を示す quercetin や pycnogenol などの flavonoid が有効であろう。

さらに、今回の結果は PC-OOH の測定にも特徴がある。これまで、thiobarbituric acid (TBA) 法で調べられていたが、TBA 法は反応生成物である malondialdehyde (MDA) 量に換算して表示されているので、aldehyde + sucrose, biliverdine glycoxal などの比較的近い吸収波長を持つ物質も同時に測定して²²⁾、誤差が生じる可能性がある。これに対し、PC-OOH の測定は HPLC を用いて細胞膜に最も多く含まれる脂質である PC-OOH を試料中から分離し、共役ジエンの量を直接的に測定したものである。ラジカル惹起剤により網膜ホモジネート中不飽和脂肪酸の二重結合に挟まれた水素が引き抜かれ、脂質過酸化連鎖反応が開始される。この水素が引き抜かれた後の共鳴構造を共役ジエンといい、230~235 nm の紫外部に吸収を持ち、脂質が過酸化を受ける際の初期の変化を測定するのに有効とされている。過酸化脂質 (lipid hydroperoxide) とその類似物質を測定するよりは、共役ジエンを測定した方がより正確に細胞膜脂質過酸化量を示すことが可能となる。

体内の各組織の細胞は、常にミトコンドリアやミクロゾームなどで産生されるフリーラジカルによる影響を受け、細胞内各器官膜の脂溶性部分、水溶性部分で、過酸化による障害を受ける可能性がある。通常、フリーラジカルは生体内抗酸化物質 (例えば glutathion, albumin) や抗酸化酵素 (例えば superoxide dismutase, glutathion peroxidase, catalase) により速やかに消去されている。しかし、虚血後再灌流による superoxide の大量発生²³⁾、高血糖が原因と考えられる抗酸化酵素の糖化などによる酵素活性の減少²⁴⁾などが起こり、その産生消去のバランスがくずれることにより障害が増大する可能性はある。したがって、酸化反応を抑制することによる治療効果が期待される。しかし、フリーラジカルによる細胞障害の機構は脂溶性部分、水溶性部分で異なると考えられ、それぞれの場における、より効率の良い抗酸化剤による防御システムが必要になってくると考えられる。

したがって、今回我々の試みた網膜組織内の過酸化脂質量を測定する方法は、眼内組織において抗酸化剤の総合的な酸化ストレスからの防御効果の評価に有効な方法

であると考えられる。

文 献

- 1) **Sato K, Niki E, Shimasaki H** : Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Arch Biochem Biophys* 279 : 402—405, 1990.
- 2) **Anderson RE, Andrews LD** : Biochemistry of retinal photoreceptor membranes in vertebrates and invertebrates. In : Weastfall JA (Ed) : *Visual Cells in Evolution*. Raven Press, New York, 1—22, 1980.
- 3) **De La Paz MA, Anderson RE** : Lipid peroxidation in rod outer segments, role of hydroxyl radical and lipid hydroperoxides. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33 : 2091—2096, 1992.
- 4) **Christen WG** : Antioxidant vitamins and age-related eye disease. *Proc Assoc Am Physicians* 3 : 16—21, 1999.
- 5) **Ceriello A, Quatraro A, Gugliano D** : New insights on non-enzymatic glycosylation may lead to therapeutic approaches for the prevention of diabetic complications. *Diabet Med* 9 : 297—299, 1992.
- 6) **Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS** : Effect of vitamin C on glycosylation of protein. *Diabetes* 41 : 167—173, 1992.
- 7) **Scharrer A, Ober M** : Anthocyanosides in the treatment of retinopathies. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 178 : 386—389, 1981.
- 8) **Hittner HM, Rudolph AJ, Kretzer FL** : Suppression of severe retinopathy of prematurity with vitamin E supplementation. Ultrastructural mechanism of clinical efficacy. *Ophthalmology* 91 : 1512—1523, 1984.
- 9) **Finer NN, Peters KL, Schindler RF, Grant GD** : Vitamin E and retrolental fibroplasia : Prevention of serious ocular sequelae. *Ciba Found Symp* 101 : 147—164, 1983.
- 10) **Hittner HM, Kretzer FL** : Vitamin E and retrolental fibroplasia : Ultrastructural mechanism of clinical efficacy. *Ciba Found Symp* 101 : 165—185, 1983.
- 11) **Raju TN, Langenberg P, Bhutani V, Quinn GE** : Vitamin E prophylaxis to reduce retinopathy of prematurity : A reappraisal of published trials. *J Pediatr* 13 : 844—850, 1997.
- 12) **Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Hayes KC, Nicholson BW, Weigel-DiFranco C, et al** : A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 111 : 761—772, 1993.
- 13) **Hiramitsu T, Armstrong D** : Preventive effect of antioxidants on lipid peroxidation in retina. *Ophthalmic Res* 23 : 196—203, 1991.
- 14) **Ueda T, Ueda T, Armstrong D** : Preventive effect of natural antioxidants on lipid peroxidation in mammalian eye. *Ophthalmic Res* 28 : 184—192, 1996.
- 15) **Chida M, Suzuki K, Nakanishi-Ueda T, Ueda T, Yasuhara H, Koide R, et al** : *In vitro* testing of antioxidants and biochemical end-points in bovine retinal tissue. *Ophthalmic Res* 31 : 407—415, 1999.
- 16) **Ito T, Nakano M, Yamamoto Y, Hiramitsu T, Mizuno Y** : Hemoglobin-induced lipid peroxidation in the retina : A possible mechanism for macular degeneration. *Arch Biochem Biophys* 316 : 864—872, 1995.
- 17) **Kagan VE, Serbinova EA, Safadi A, Catudic JD, Packer L** : NADPH-dependent inhibition of lipid peroxidation rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 186 : 74—80, 1992.
- 18) **Terao K, Niki E** : Damage to biological tissues induced by radical initiator 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2 : 193—201, 1986.
- 19) **Sugio K, Nakano M** : Mechanism of phospholipid peroxidation induced by ferric ion-ADP-adriamycin-coordination complex. *Biochem Biophys Acta* 713 : 333—343, 1982.
- 20) **Yamamoto Y, Brodsky MH, Baker JC, Ames BN** : Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 160 : 7—13, 1987.
- 21) **Nagasaka Y, Kaku K, Nakamura K, Kaneko T** : The new oral hypoglycemic agent, CS-405, inhibits the lipid peroxidation of human plasma low density lipoprotein *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 50 : 1109—1111, 1995.
- 22) **Gutteridge JM, Quinlan GJ** : Malondialdehyde formation from lipid peroxides in the thiobarbituric acid test : The role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators. *J Appl Biochem* 5 : 293—239, 1983.
- 23) **Inoue M, Ebashi I, Watanabe N, Morino Y** : Synthesis of superoxide dismutase that circulates bound to albumin and accumulates in tissues whose pH is decreased. *Biochemistry* 28 : 6619—6624, 1989.
- 24) **Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N** : Glycation and inactivation of human Cu, Zn-superoxide dismutase. Identification of the *in vitro* glycated sites. *J Biol Chem* 262 : 16969—16972, 1987.