

総合論文

生体内酸化ストレス指標としてのビタミンCに関する研究*

奈良女子大学生生活環境学部食物栄養学科**

小城 勝相

Vitamins (Japan), 83 (12), 643-650 (2009)

Vitamin C as a biomarker of oxidative stress

Shosuke Kojo

Department of Food Science and Nutrition, Nara Women's University, Nara 630-8506 Japan

Oxidative stress receives much attention in relation to ageing, cancer, atherosclerosis, diabetes, and so on. However a reliable biomarker to evaluate oxidative stress in the tissue is not available. Based on chemical analysis of radical reactions in the cell, lipid hydroperoxide (LOOH), a mediator of oxidative stress and antioxidants such as vitamins C (C) and E can be biomarkers of oxidative stress. We developed a specific and sensitive method to determine tissue concentration of LOOH and C. We compared the efficiency of these markers using a drug-induced hepatitis as a model system. The liver C concentration was decreased firstly by administration of drugs such as CCl₄, thioacetamide, and D-galactosamine, showing that C concentration was the most sensitive biomarker in animal tissues. Oxidation of low-density lipoprotein (LDL), which was assumed to be the initial reaction in atherogenesis, caused fragmentation and cross-link of apolipoprotein B-100 (apoB). Fragmented and conjugated apoB proteins were calibrated using Western blot analysis of human plasma samples and named as B-ox. B-ox significantly correlated positively with conventional clinical parameters of atherosclerosis such as LDL cholesterol, triglyceride, IMT (intima-media thickness of the carotid artery), and age. A significant negative relationship was also found between B-ox and plasma C concentration, suggesting that plasma C and B-ox are reliable biomarkers of oxidative stress in humans. When oxidative stress was enhanced in the liver by hepatitis or during atherogenesis, the level of plasma ceramide was increased. Further studies are necessary to elucidate the underlying mechanism between ceramide metabolism and oxidative stress.

Key words: vitamin C (C), atherosclerosis, ceramide, hepatitis, oxidative stress

(Received June 3, 2009)

1. はじめに

生体内における酸化ストレスは、老化をはじめ、がん、動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病の原因として大きな注目を集めている。しかし生体内の酸化ストレスを正確に評価するバイオマーカーについてはいまだに多くの研

究が行われている最中である。本稿ではこの問題に関する我々のこれまでのアプローチについて述べてみたい。酸化ストレス指標を検討するにあたり、まず細胞内のラジカル反応の概要を示したのが図1である。

細胞内ではミトコンドリアで酸素を還元してATPを合成しているが、その際スーパーオキシドが呼吸で消費す

*本論文は日本ビタミン学会第61回大会(2009.5.30～31 亀岡市)における学会賞受賞講演をまとめたものである。

**〒630-8506 奈良市北魚屋西町

る酸素の1%程度発生し、ヒドロキシルラジカルなどのラジカル種 $X\cdot$ の発生につながると考えられている。 $X\cdot$ は生体内の脂質、タンパク質、核酸などのすべての有機物と反応する。中でも膜の脂質からの水素引き抜きが起こると脂質ラジカルが生成し、ラジカル種である酸素と迅速に反応して脂質ヒドロペルオキシラジカル ($LOO\cdot$) に変換される。 $LOO\cdot$ は他の脂質から水素原子を引き抜いて脂質ヒドロペルオキシド ($LOOH$) を生成するとともに、ラジカル連鎖反応 (自動酸化反応) が引き起こされ多くのアルデヒド類が産生され、これがタンパク質や核酸と反応して細胞障害の原因になることもわかってきた。

$LOOH$ は一定の寿命をもつため細胞内を移動しタンパク質やDNAと反応するため酸化反応のメディエーターと考えられ、酸化ストレスマーカーとも考えられている。このような酸化ストレス促進物質に対し細胞は抗酸化系を備えている。 $LOO\cdot$ に水素原子を与えてラジカルでなくする α -トコフェロール [ビタミン E (E)] や水中に存在する抗酸化剤のL-アスコルビン酸 [AsA: ビタミン C (C)], 過酸化水素や $LOOH$ を分解するグルタチオンペルオキシ

ダーゼ (GSH PX) などの酵素も存在する。 $GSH PX$ は還元型 GSH を用いて $LOOH$ を分解して酸化型の $GSSG$ を生成する。 $GSSG$ は $GSSG$ レダクターゼにより $NADPH$ を用いて還元され、 $NADP^+$ を生成する。 $NADP^+$ はグルコースを酸化することによって元の $NADPH$ に戻る。この図から、細胞内の酸化系はグルコースの還元力を用いて消去され、細胞内を還元的状態に維持していることがわかる。

ここで $X\cdot$ が増加したとき、即ち酸化ストレスが亢進したとき何が変化するであろうか? 予想しやすいのは酸化反応メディエーターの $LOOH$ の増加と抗酸化系 C, E, GSH の減少であろう。そこで、まずこれらの動態を検討することにしたが、測定法のないものについては特異的測定法 (多種類の分子が含まれる生体サンプルの中で目的とする分子だけを測定する方法) を開発することから始めた。

2. $LOOH$ の特異的測定法の開発とその応用

$LOOH$ の測定法には色々な種類がある。山本¹⁾や宮澤²⁾らの HPLC- 発光検出器を用いてリン脂質の分子種ごとのヒドロペルオキシドを測定する方法は優れているが、我々

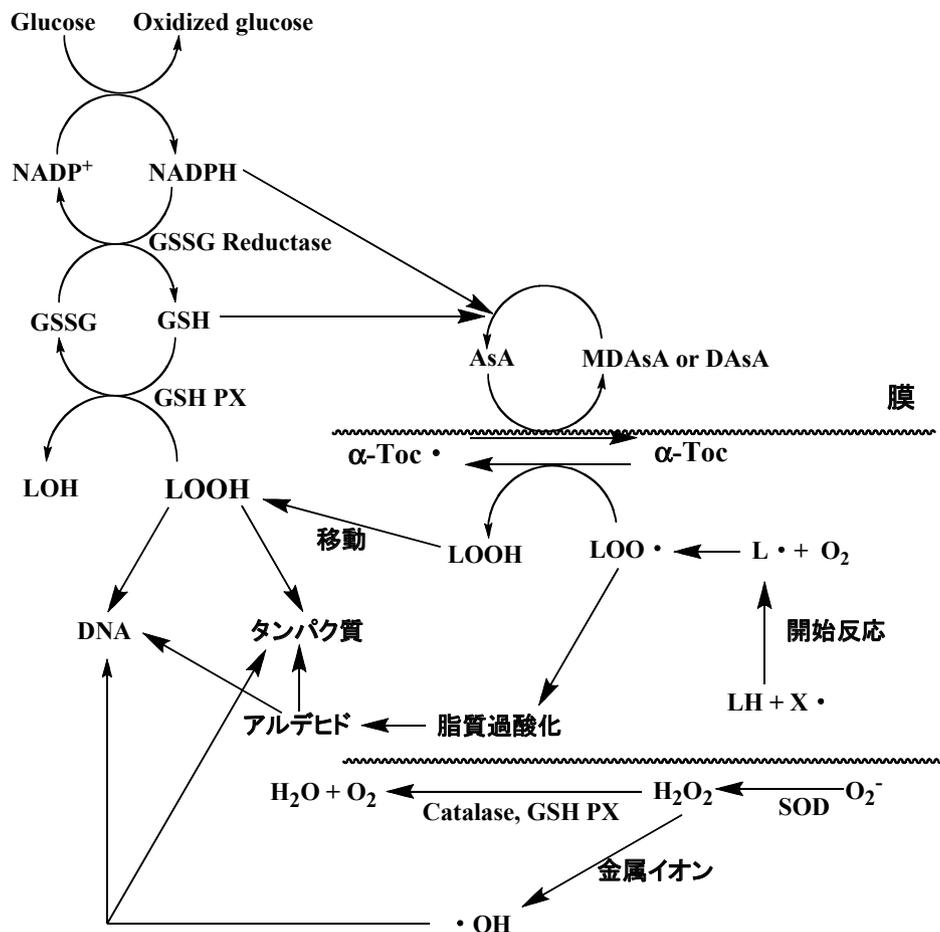


図1. 細胞内のラジカル反応 (文献⁴⁶⁾の図を改変)

は汎用型分光光度計を備えた HPLC を用いて総 LOOH レベルを測定する方法の開発を目指した。図 2 に示すように、芳香族ホスフィン類は LOOH と短時間で定量的に反応してホスフィンオキシドを生成する(リンは酸素との親和性が高くアルキルホスフィンが空気中で燃え上がるので反応性を低下させるためにわざわざ芳香族置換基を用いる)。

臓器から $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ で脂質を抽出しホスフィンと反応させれば特異的に組織中の総 LOOH レベルの測定ができるはずである。ここで芳香族として何を使うかであるが、芳香族縮合環系はベンゼン環が増えるほど熱や光で酸化されやすくなる。しかしフェニル基だけだと吸光係数が小さいので感度が低い。両方をお互い合わせるためナ

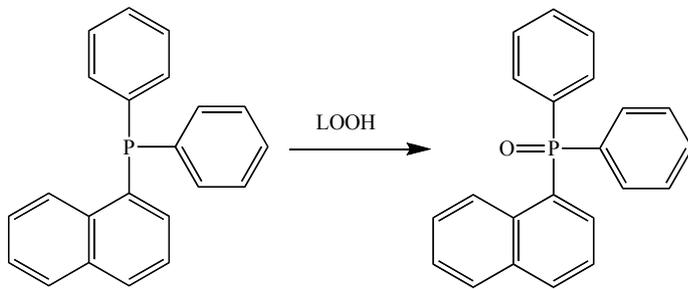


図 2. 脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) 測定法

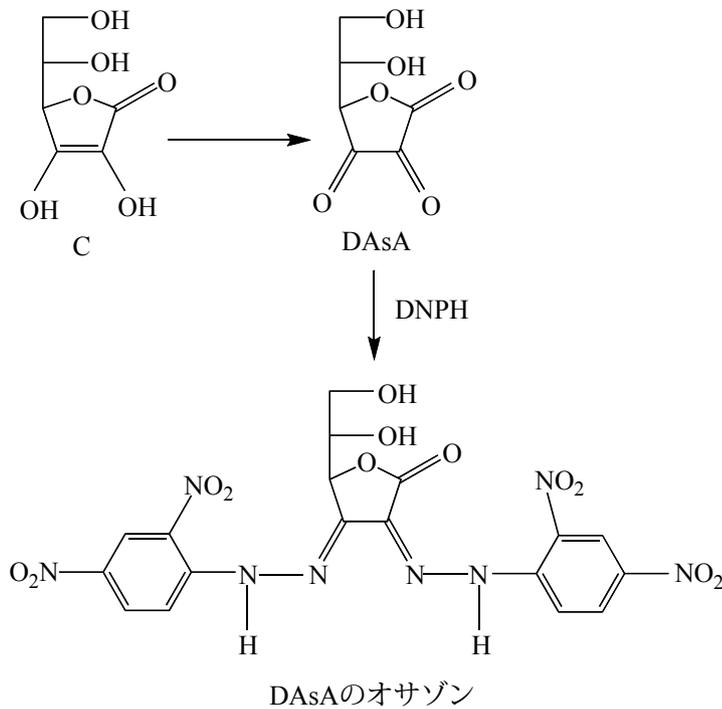


図 3. ビタミン C の測定法

フチルジフェニルホスフィンを合成して 1 pmol の LOOH を検出できる方法を確立した³⁾。

この方法が酸化ストレス評価に有効であることは、老化マウスの組織⁴⁾、E 欠乏ラット⁵⁾、鉄過剰症ラット⁶⁾などで臓器の LOOH が有意に上昇することで確認した。さらに認知症モデルとして知られる老化促進モデルマウス (SAM) P8 は、対照群の R1 と比較して 3, 6 ヶ月齢において脳、心臓、肝臓、肺の LOOH 濃度が有意に高いことが判明した⁷⁾。特に脳では 1 ヶ月齢においては P8 と R1 の間に差はないが、認知能力が低下するまさに 2 ヶ月齢において P8 の LOOH 濃度が有意に上昇し、酸化ストレスが認知能力低下の原因であることを示唆した⁸⁾。

3. ビタミン C の特異的測定法の開発とその応用

本研究を開始した 1990 年当時は C の特異的測定法はなく比色法が用いられていた。我々は図 3 に示すように、C を酸化して得られるデヒドロアスコルビン酸 (DAsA) は 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) と反応して定量的に DAsA のオサゾンを与えること、このオサゾンは 5 員環構造であることを二次元 NMR により確定した。このオサゾンは高い疎水性をもつので逆相カラムで完全な分離が可能のため HPLC を用いて 1 pmol の検出限界で測定することが可能となった⁹⁾。

C の特異的分析法の応用として、C を遺伝的に合成できない ODS ラットを離乳直後から C 欠乏食を与え組織中の C の減少を追跡した。開始時には C は血漿中で最も濃度が低く、副腎や脳で最も濃度が高かった。C 欠乏による C の減少様式は 4 種類に分類され、脳で最も減少速度が遅かった。C 欠乏 3 週間で脳以外の C は 0 になった¹⁰⁾。

図 1 に示すように、 α -トコフェリルラジカル (α -Toc \cdot) は C から水素原子もしくは電子をもらって E に再生できるとされており、*in vitro* では十分に確立した反応である。しかし生体内では、水相の C と膜脂質相の α -Toc \cdot が界面で有効に反応するかどうかは不明で、このような再生がどの程度起こるのかわかっていなかった。我々は、ODS ラットを 1) 対照群、2) C 欠乏群、3) E 欠乏群、4) C, E 同時欠乏群の 4 群に分け、3 週間飼育した。その結果、血漿、心臓、肝臓、肺、腎臓の E 濃度は、C 欠乏によって対照群より有意に低下することがわかった。もし C と E の間に相互作用がなければ C 欠乏によって E は変化しないはずなので、この結果はこれらの組織で C が E を再生することを示している¹¹⁾。

同時に、血漿、心臓、肝臓、筋肉、腎臓ではE欠乏によってC濃度が有意に低下した。この結果はEがCを救済できることを示している。しかしEがモノデヒドロアスコルビン酸(MDAAs)やDAsAを直接還元する反応は起こらないので、このEによるCの救済は、E欠乏による膜相の酸化ストレスが水相のCの低下をもたらすためと考えられる。この結果は*in vitro*の反応ではCはEを再生できるが、EはCを救済できないのに対し、動物組織(*in vivo*)ではCとEは相補的な作用を行うことを示している¹¹⁾。

この相互作用を利用して、ラットを1)E欠乏食、2)E欠乏食に1%プロポリス添加食を与えた2群を用いて組織のC濃度を測定した。その結果、8週間後、腎臓、胃、小腸、大腸のC濃度はプロポリス添加群で対照群より有意に高いことがわかり、プロポリスがE欠乏による酸化ストレスを軽減してCを救済すること、即ちプロポリスに抗酸化活性があることが動物実験で初めて明らかになった¹²⁾。

さらにODSラットにおいては経口投与したDAsAの生理活性がCに比べて非常に低いことも示した¹³⁾。

4. 典型的病態における酸化ストレスマーカーの変化

C, E, LOOHの3つの酸化ストレスマーカーの有効性を比較するため、典型的な病態として化学物質による肝炎について検討した。四塩化炭素(CCl₄)、チオアセトアミド、D-ガラクトサミンは肝臓に短期間で壊死を引き起こすことで知られている。

例えば、ラットに1g/kg体重のD-ガラクトサミンを腹腔内投与すると、6時間後には血漿ALT(alanine aminotransferase)、AST(aspartate aminotransferase)が有意に上昇し肝臓で壊死が開始されたことがわかる。12時間後はさらに上昇し、24時間ではそれぞれが2,000ユニットを超えるまで上昇し大規模な壊死が起こっていることを示した。マーカーの中では肝臓のC濃度が投与3時間後に有意に減少した。肝臓のEは18時間後有意に増加(Eは酸化ストレスが亢進した組織に集まることもある)し、LOOHは24時間後に有意に増加した。これらの結果、Cが最も酸化ストレスを鋭敏に反映したことがわかった¹⁴⁾。

同様の実験により、CCl₄¹⁵⁾、チオアセトアミド¹⁶⁾の投与やストレプトゾトシンによる糖尿病¹⁷⁾でも最初に変化するのにはCであったことから、Cはこれらの酸化ストレス指標のなかでも最も鋭敏であることがわかった。細胞内の抗酸化剤の中でもCの還元力は非常に強力なので、組織内におけるCの鋭敏な変化は化学的観点からは当然かもしれない。さらにこれら薬剤による肝炎では典型的な壊死が起こるとされてきたが、カスパーゼ-3依存性のアポトーシスが起きることも明らかになった¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。

5. 酸化ストレスが細胞死を起こす機構

酸化ストレスによってなぜ細胞死が起こるのかは未だに明らかではない。細胞内に酸化ストレスを感知して増殖・生存と細胞死両方のシグナルネットワークが惹起されることはよく知られている。最近注目されているのがマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK: mitogen activated protein kinase)である。MAPKが酸化ストレスによって活性化(リン酸化)されることは培養細胞を用いて研究されてきたが、動物組織で酸化ストレスとMAPK活性化の関係を時間的に調べた例すらなかった。

ラットにCCl₄¹⁸⁾、チオアセトアミド¹⁹⁾、D-ガラクトサミン²⁰⁾を投与するとCの減少と同時に、より早期にMAPKの活性化が起こった。この結果は酸化ストレスに最も鋭敏に反応したのはMAPKであることを示す。培養ラット肝細胞を用いて100μMの過酸化水素でERK(extracellular signal-related kinase)の活性化が起こることがわかっている²¹⁾。肝細胞には約2000μMのCが存在するため、100μMのCの変化を検知することは無理である。MAPKの反応性が高いのはインスリン受容体を介するシグナルネットワークの場合のような高感受性のタンパク質²²⁾が関与するものと考えられ、酸化ストレスに応答する生理的シグナルネットワークの存在を示している。それではMAPKが活性化すれば細胞死は必ず起こるのであるか?この点を明らかにするために抗酸化剤であるEがMAPKと細胞死に与える影響を検討した。

ラットを、1)12時間絶食した後、CCl₄{0.5 mL/kg(ミネラルオイルとの1:1混合物を1 mL/kg)}を経口投与した群、2)CCl₄投与12時間前にE{0.5 mL/kg(ミネラルオイルとの1:1混合物を1 mL/kg)}を経口投与した群、3)Eのみを投与した群、4)CCl₄の代わりにミネラルオイルのみを投与した正常群を用意し、これら4群間の比較を行った。

血漿ALTはCCl₄投与12時間以降、ASTは24時間以降有意に上昇した。この結果はCCl₄投与12時間以降に壊死が激しく起こっていることを意味する。しかしE投与によりその上昇は有意に抑制された。この結果はEが肝臓の壊死を有意に阻害したことを意味する。肝臓のCはCCl₄投与6時間以降に減少したが、Eの投与でその減少はCCl₄投与12時間以降に有意に抑制された。CCl₄投与によるCの減少が抑制されたことから、Eは抗酸化作用により肝細胞の壊死を抑制したと考えられる²³⁾。

MAPKに関しては、CCl₄投与でCが減少する投与6時間後よりはるか以前である1.5-3時間後、即ちサイトゾルにまで広汎な酸化ストレスが及ぶ前にリン酸化JNK(c-Jun NH₂-terminal kinase)、ERKが一時的に増加した。Eの投与は肝壊死を有意に抑制するがMAPKの活性化に対しては全く影響を与えなかった²³⁾。

以上の結果より、たとえ少量のラジカル種でMAPKが

活性化されても、Cの減少が起こる程度に酸化ストレスが細胞内で亢進しなければ必ずしも壊死には至らない、即ちMAPKの活性化は細胞死にとって必要条件ではあっても充分条件ではないことがわかった。その点を考慮するとCは酸化ストレスの生理的影響を予測するよい指標であることが再確認された。

チオアセトアミドの肝障害は酸化ストレスにより引き起こされるが、抗酸化作用を持つDMSOの経口投与で完全に抑制され、同時にMAPKの活性化も完全に阻害された¹⁹⁾。一方、チオアセトアミドによる肝障害はEでは阻害できない。もう1つの肝臓毒、D-ガラクトサミンによる肝障害も酸化ストレスによるものであり、DMSOでは部分的に阻害できる²⁴⁾がEの投与によっては全く効果がなかった。CCl₄、チオアセトアミド、D-ガラクトサミンは共に肝臓に酸化ストレスを亢進し、MAPKを活性化し、肝臓にアポトーシスと壊死を引き起こすが、発生するラジカル種、ラジカルの細胞内局在などに違いがあり、抗酸化剤への反応も異なるものと考えられ今後の研究が必要である。

6. 酸化ストレスが亢進した肝臓が他の組織に与える影響

劇症肝不全においては腎臓や脳等に多臓器不全が起こることはよく知られている。これは肝不全時にはサイトカイン類やエンドトキシンのような高分子からアンモニア、ビリルビン、芳香族アミノ酸等の低分子に至るまで種々の細胞毒性をもつ物質が血液中に増加するためと考えられており、これらを除去するためにブタの肝細胞を含め多くの補助肝臓が考案されている²⁵⁾。毒物の中に活性炭に吸着する脂質成分があることも知られていた。その本体はわかっていなかったが、我々はその本体が種々の細胞にアポトーシスを引き起こすことが知られているセラミド(図4)ではないかという仮説をたてた。セラミドは生理活性が強いことで注目されているスフィンゴ脂質の一種であり、酸化ストレスとの関連も注目されている²⁶⁾。

まずセラミドをLC/MS/MSを用いて特異的・高感度に定量する方法を確立した²⁷⁾。この研究は、種々の抗がん

剤が白血病細胞(HL-60)にアポトーシスを起こす機構を調べたものである。抗がん剤処理により、まず過酸化水素が発生し、その後セラミドの増加が起こること、抗酸化剤存在下ではセラミド量も減少しアポトーシスも阻害されることがわかった。即ち、培養細胞では酸化ストレスの下流にセラミド合成があることがわかった²⁷⁾。

ラットにCCl₄²⁸⁾やD-ガラクトサミン²⁹⁾を投与すると血液中でセラミドが増加することを見いだした。即ち、肝臓で酸化ストレスが亢進すると血液中に細胞死を引き起こす能力を持つセラミドが増加することがわかった。四塩化炭素の場合、セラミドを合成する中性スフィンゴミエリナーゼ活性が肝臓で早期に上昇し、腎臓や脳でもセラミドが増加することがわかった³⁰⁾。劇症肝不全以外にも後で述べるように、動脈硬化においてセラミドと酸化ストレスの関係が明らかになってきた。

7. 動脈硬化における酸化ストレスとビタミンC

これまで述べてきたのは大量に肝細胞が壊死を起こす薬物性肝炎、即ち激的なモデル病態における酸化ストレスの評価法であった。しかしそのような強い酸化ストレスが通常起こることは少ないと考えられ、老化の原因になるような日常的に起こる弱い酸化ストレスの評価法が必要であるが、弱いものを測定するというのは非常に困難である。

粥状動脈硬化症は低密度リポタンパク質(LDL)の酸化が重要な役割を果たすと考えられ、古くから酸化ストレスとの関連が指摘されている病気である。そこでLDLの酸化反応を取り上げた。LDLはアポリポタンパク質B-100(アポB)という分子量が500 kDaを超えるタンパク質³¹⁾に糖が結合し、その糖タンパク質にコレステロール等の脂質がとりこまれた粒子である。

生体成分の中で脂質はラジカル反応性が高いと考えられていることからLDLの酸化反応においても脂質部分の酸化に関しては多くの研究があり、脂質過酸化の結果生じるアルデヒドによってアポBが修飾されることも報告されている³²⁾。酸化されたLDLをマクロファージが認識することから、最初我々はアポBの糖鎖の先端にあるシアル酸がラジカル反応で分解することを見だし³³⁾、この変化がマクロファージの認識に関係すると考えた。確かにシアル酸のラジカル反応性は糖類の中では最も高い³⁴⁾が、シアル酸よりも以下に述べるアポBのタンパク質部分の反応性の方がはるかに高いことが判明した³⁵⁾。

単離したLDLを銅イオンで酸化する反応はよく研究されており、アポBの断片化や会合(化学結合しているので単純な会合ではなく架橋というべきかもしれない)が起こることが知られていた³⁶⁾。我々は抗アポB抗体を用いるWestern blotを用いて酸化反応によるアポBの分解を解析した。分解はラジカル補足剤で阻害され、ラジカル開始剤で促進することからラジカル反応によることも証

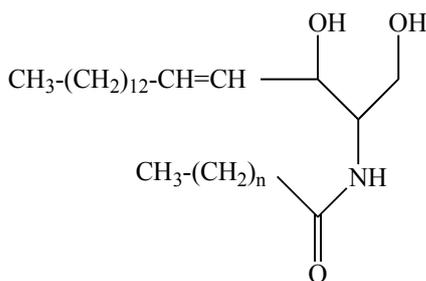


図4. セラミド

明した³⁷⁾。さらに、アポ B は短時間で断片化しアポ B は消失してスマアールを与える³⁷⁾が、LDL 粒子は粒子径が小さくなる (small dense LDL?) だけで粒子の形態を保持していることもわかった³⁸⁾。Western blot を用いることで血清を酸化しても同様の分解が起こることを確認できた³⁷⁾。

アルブミンやトランスフェリンなどの血漿タンパク質も銅イオンと過酸化水素を用いるラジカル反応で分解し、その反応は Western blot で追跡できる³⁹⁾。一方、血漿を銅イオンで酸化するとアポ B は E と同程度の速度で迅速に分解するのに対し、アルブミンやトランスフェリンは全く分解しない。この結果はアポ B のラジカル反応性がタンパク質の中でも異常に高いことを示している⁴⁰⁾。極端にいうと血液中で酸化ストレスが亢進するとアポ B だけが分解・会合する。血液中には多くのタンパク質が存在するにもかかわらず、LDL の酸化が重要なのはこの高い反応性のためであることがわかった。

それほどアポ B の反応性が高いのであれば正常なヒト血漿中にもラジカル反応の生成物である会合・分解アポ B が存在するはずである。約 200 人の血漿サンプルを Western blot し、会合・分解アポ B をデンストメーターで定量し数値化して B-ox と名付けた。B-ox は従来の動脈硬化指標である LDL コレステロール、総コレステロール、IMT (頸動脈内中膜複合体肥厚度)、トリグリセリド、年齢と有意な正の相関を示し、HDL コレステロールと有意な負の相関を示した⁴¹⁾。即ち、動脈硬化指標としての意味があることが示された。特記すべきは、血液中の C と B-ox が有意な負の相関を示したことである⁴¹⁾。

ヒトに応用できるバイオマーカーは血液中の分子が望ましい。血液中の C はヒトの場合でもウイルス性肝炎、糖尿病、心筋梗塞、急性リンパ芽球性白血病などで低下することが知られている⁴²⁾が、短期間の食事の影響も無視できないので 1 回の測定ではその価値は評価しにくいかもしれない。しかし B-ox はもう少し長期間における酸化ストレスを評価する biomarker として意味があるかもしれない。

8. 動脈硬化とセラミド

先に肝臓における酸化ストレス亢進でセラミドが血中に増加することを述べたが、動脈硬化においてはどうか？ 従来動脈硬化の危険因子としてコレステロールがよく知られているがコレステロールは細胞膜脂質の主要構成因子の 1 つであり、毒性等の生理活性がそれほど強いとは考えにくい。動脈硬化発症においては内皮細胞やマクロファージのアポトーシスや増殖等の複雑なプロセスが関わっている。これらの点を考慮すると、もしコレステロールと似た挙動をする生理活性物質が存在すれば、その物質が真の動脈硬化の危険因子である可能性がある。

上記の条件を満たす危険因子として、先に述べた肝炎

で血中に増加するセラミドに注目した。100 人程度の血液を分析した結果、血漿中の総セラミドは総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質、遊離脂肪酸、収縮期血圧と有意な正の相関を示した。中でもコレステロールとの相関が最も高かった。しかも総セラミドは B-ox と有意な正の相関を示したことから、コレステロール-セラミド-酸化ストレスの間に相関があることがわかった⁴³⁾。

この相関をさらに明らかにするため、動脈硬化モデル動物であるアポ E 欠損マウスに高コレステロール食を負荷すると、血漿中のコレステロールといくつかのセラミド分子種が有意に増加した⁴⁴⁾。さらに、B-ox も増加したので、コレステロール負荷がセラミドと酸化ストレスの増加を引き起こすことがわかった⁴⁴⁾。血中の C はコレステロール負荷で増加したが、これは酸化ストレス亢進に対するマウス (C を生合成できる) の代償的反応であると考えられる。ラットでもコレステロール負荷により血漿と腸間膜白色脂肪組織におけるセラミドの増加を確認した⁴⁵⁾。コレステロール代謝とセラミド合成の間にどのような関係があるのかについては今後の研究に期待したい。

謝 辞

本研究は多くの研究者 (兵庫医大: 井口 弘教授, 京都工繊大: 竹谷 茂教授, 兵庫教大: 増澤康男教授, 岸田恵津教授, 慶応大: 都島基夫教授, 金沢大: 松郷誠一教授, 国立循環器病センター: 斯波真理子博士, 京谷晋吾博士, 埼玉社会保険病院: 丸山太郎博士, 国立栃木病院: 中野里美医師, 富山大: 佐々木和男教授, エーザイ: 阿部皓一博士, 上越教育大: 得丸定子教授, 鳥取大: 松浦達也教授, 奈良女子大: 中田理恵子講師, 他, 順不同) との共同研究を含んでおり、これらの皆様に深く感謝いたします。最後に本研究を共に行った兵庫教育大学と奈良女子大学の卒業生、大学院生、この 5 年近く共に研究に励んだ本研究室助教の市 育代博士に心から感謝いたします。

(平成 21.6.3 受付)

文 献

- 1) Yamamoto Y, Brodsky MH, Baker JC, Ames BN (1987) Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **160**, 7-13
- 2) Miyazawa T, Yasuda K, Fujimoto K, Kaneda T (1988) Presence of phosphatidylcholine hydroperoxide in human plasma. *J Biochem (Tokyo)* **103**, 744-746
- 3) Tokumaru S, Tsukamoto I, Iguchi H, Kojo S (1995) Specific and sensitive determination of lipid hydroperoxides with chemical derivatization into 1-naphthylidiphenylphosphine oxide and high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* **307**, 97-102
- 4) Tokumaru S, Iguchi H, Kojo S (1996) Change of the lipid hydroperoxide level in mouse organs on ageing. *Mech Ageing Dev* **86**, 67-74
- 5) Tokumaru S, Ogino R, Shiromoto A, Iguchi H, Kojo S (1997) Increase of lipid hydroperoxides in tissues of vitamin E-deficient rats. *Free Radic Res* **26**, 169-174

- 6) Ikeda K, Sun F, Tanaka K, Tokumaru S, Kojo S (1998) Increase of lipid hydroperoxides in the rat liver and kidney after ferric nitrilotriacetate administration. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 1438-1439
- 7) Matsugo S, Kitagawa T, Minami S, Esashi Y, Oomura Y, Sasaki K, Tokumaru S, Kojo S, Matsushima K (2000) Age-dependent changes in lipid peroxide levels in various organs in senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* **278**, 105-108
- 8) Yasui F, Ishibashi M, Matsugo S, Kojo S, Oomura Y, Sasaki K (2003) Brain lipid hydroperoxide level increases in senescence-accelerated mice at an early age. *Neurosci Lett* **350**, 66-68
- 9) Kishida E, Nishimoto Y, Kojo S (1992) Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* **64**, 1505-1507
- 10) Tokumaru S, Takeshita S, Nakata R, Tsukamoto I, Kojo S (1996) Change in the level of vitamin C and lipid peroxidation in tissues of the inherently scorbutic rat during ascorbate deficiency. *J Agric Food Chem* **44**, 2748-2753
- 11) Tanaka K, Hashimoto T, Tokumaru S, Iguchi H, Kojo S (1997) Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *J Nutr* **127**, 2060-2064
- 12) Sun F, Hayami S, Haruna S, Ogiri Y, Tanaka K, Yamada Y, Ikeda K, Yamada H, Sugimoto H, Kawai N, Kojo S (2000) *In vivo* antioxidant activity of propolis evaluated by the interaction with vitamin C and E, and the level of lipid hydroperoxides in rats. *J Agric Food Chem* **48**, 1462-1465
- 13) Ogiri Y, Sun F, Hayami S, Fujimura A, Yamamoto K, Yaita M, Kojo S (2002) Very low vitamin C activity of orally administered L-dehydroascorbic acid. *J Agric Food Chem* **50**, 227-229c
- 14) Sun F, Hamagawa E, Tsutsui C, Sakaguchi N, Kakuta Y, Tokumaru S, Kojo S (2003) Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by D-galactosamine in rat liver. *Biochem Pharmacol* **65**, 101-107
- 15) Sun F, Tsutsui C, Hamagawa E, Ono Y, Ogiri Y, Kojo S (2001) Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1535**, 186-191
- 16) Sun F, Hayami S, Ogiri Y, Haruna S, Tanaka K, Yamada Y, Tokumaru S, Kojo S (2000) Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1500**, 181-185
- 17) Sun F, Iwaguchi K, Shudo R, Nagaki Y, Tanaka K, Ikeda K, Tokumaru S, Kojo S (1999) Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci* **96**, 185-190
- 18) Iida C, Fujii K, Kishioka T, Nagae R, Onishi Y, Ichi I, Kojo S (2007) Activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) during carbon tetrachloride intoxication in the rat liver. *Arch Toxicol* **81**, 489-493
- 19) Kishioka T, Iida C, Fujii K, Nagae R, Onishi Y, Ichi I, Kojo S (2007) Effect of dimethyl sulphoxide on oxidative stress, activation of mitogen activated protein kinase and necrosis caused by thioacetamide in the rat liver. *Eur J Pharmacol* **564**, 190-195
- 20) Nishioka H, Kishioka T, Iida C, Fujii K, Ichi I, Kojo S (2006) Activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) during D-galactosamine intoxication in the rat liver. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 3019-3022
- 21) Rosseland CM, Wierod L, Oksvold MP, Werner H, Ostvold AC, Thoresen GH, Paulsen RE, Huitfeldt HS, Skarpen, E (2005) Cytoplasmic retention of peroxide-activated ERK provides survival in primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatology* **42**, 200-207
- 22) 小城 勝相 (2005) バイオファクター(シグナル伝達物質)としての過酸化水素. *ビタミン* **79**, 334-337
- 23) Iida C, Fujii K, Koga E, Washino Y, Kitamura Y, Ichi I, Abe K, Matsura T, Kojo S (2009) Effect of α -tocopherol on carbon tetrachloride intoxication in the rat liver. *Arch Toxicol* **83**, 477-483
- 24) Iida C, Fujii K, Koga E, Washino Y, Ichi I, Kojo S (2007) Inhibitory effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on necrosis and oxidative stress caused by D-galactosamine in the rat liver. *J Nutr Sci Vitaminol* **53**, 160-165
- 25) Rozga J (2006) Liver support technology-an update. *Xenotransplantation* **13**, 380-389
- 26) Won JS, Singh I (2006) Sphingolipid signaling and redox regulation. *Free Radic Biol Med* **40**, 1875-1888
- 27) Yamada Y, Kajiwara K, Yano M, Kishida E, Masuzawa Y, Kojo S (2001) Increase of ceramides and its inhibition by catalase during chemically induced apoptosis of HL-60 cells determined by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* **1532**, 115-120
- 28) Ichi I, Nakahara K, Fujii K, Iida C, Miyashita Y, Kojo S (2007) Increase of ceramide in the liver and plasma after carbon tetrachloride intoxication in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol* **53**, 53-56
- 29) Yamaguchi M, Miyashita M, Kumagai Y, Kojo S (2004) Change in liver and plasma ceramides during D-galactosamine-induced acute hepatic injury by LC-MS/MS. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 4061-4064
- 30) Ichi I, Kamikawa C, Nakagawa T, Kobayashi K, Kataoka R, Nagata E, Kitamura Y, Nakazaki C, Matsura T, Kojo S (2009) Neutral sphingomyelinase-induced ceramide accumulation by oxidative stress during carbon tetrachloride intoxication. *Toxicology* **261**, 33-40
- 31) Chen S, Yang C, Chen P, Setzer D, Tanimura M, Li W, Gotto Jr AM, Chan L (1986) The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100. *J Biol Chem* **261**, 12918-12921
- 32) Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL (1989) Low density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 1372-1376
- 33) Tanaka K, Tokumaru S, Kojo S (1997) Possible involvement of radical reactions in desialylation of LDL. *FEBS Lett* **413**, 202-204
- 34) Tanaka K, Yamada Y, Narita S, Hashimoto R, Kojo S (1999) Comparison of reactivity among carbohydrate moieties of transferrin to a radical reaction. *Res Commun Biochem Cell Mol Biol* **3**, 63-68
- 35) Matsukawa N, Nariyama Y, Hashimoto R, Kojo S (2003) Higher reactivity of apolipoprotein B-100 and α -tocopherol compared to sialic acid moiety of low density lipoprotein (LDL) in radical reaction. *Bioorg Med Chem* **11**, 4009-4013
- 36) Fong LG, Parthasarathy S, Witztum JL, Steinberg D (1987) Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100. *J Lipid Res* **28**, 1466-1477
- 37) Tanaka K, Iguchi H, Taketani S, Nakata R, Tokumaru S, Sugimoto T, Kojo S (1999) Facile degradation of apolipoprotein B by radical reactions and the presence of cleaved proteins in serum. *J Biochem (Tokyo)*

- 125, 173-176
- 38) Hidaka A, Inoue K, Kutsukake S, Adachi M, Kakuta Y, Kojo S (2005) Decrease in the particle size of low-density lipoprotein (LDL) by oxidation. *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 2781-2785
- 39) Yamada Y, Okamoto E, Tanaka K, Kojo S (1998) Degradation of transferrin and albumin by radical reactions in human plasma evaluated by immunoblot. *Biochem Mol Biol Int* **46**, 733-738
- 40) Hashimoto R, Narita S, Yamada Y, Tanaka K, Kojo S (2000) Unusually high reactivity of apolipoprotein B-100 among proteins to radical reactions induced in human plasma. *Biochim Biophys Acta* **1483**, 236-240
- 41) Hashimoto R, Matsukawa N, Nariyama Y, Ogiri Y, Hamagawa E, Tanaka K, Usui Y, Nakano S, Maruyama T, Kyotani S, Tsushima M, Kojo S (2002) Evaluation of apolipoprotein B-100 fragmentation and cross-link in the serum as an index of atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* **1584**, 123-128
- 42) Ichi I, Kojo S (2010) "Antioxidants as biomarkers of oxidative stress" in 'Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications' ed by Aldini G, Yeum K-J, Niki E, Russell RM, in press, Wiley-Blackwell, Iowa (USA)
- 43) Ichi I, K. Nakahara K, Miyashita Y, Hidaka A, Kutsukake S, Inoue K, Maruyama T, Miwa Y, Harada-Shiba M, Tsushima M, Kojo S (2006) Association of ceramides in human plasma with risk factors of atherosclerosis. *Lipids* **41**, 859-863
- 44) Ichi I, Takashima Y, Adachi N, Nakahara K, Kamikawa C, Harada-Shiba M, Kojo S (2007) Effects of dietary cholesterol on tissue ceramides and oxidation products of apolipoprotein B-100 in apoE deficient mice. *Lipids* **42**, 893-900
- 45) Ichi I, Nakahara K, Kiso K, Kojo S (2007) The effect of dietary cholesterol and high fat on ceramide concentration in rat tissues. *Nutrition* **23**, 570-574
- 46) Kojo S (2004) Vitamin C, basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* **11**, 1041-1064