

●特集・酸素中毒をめぐる

活性酸素・フリーラジカルとスカベンジャー

湯佐 祚子*

フリーラジカルは不安定で反応性が強いいため発生部位近くで細胞構成要素と反応すると共に連鎖反応を起こす。好気性生物では生理的代謝過程でも発生するが、フリーラジカルを含む活性酸素が多く生体反応に関与している。酸素中毒の発生機序として酸素分圧上昇により細胞内活性酸素の発生が防御系の能力を越えて上昇することが主因とするフリーラジカル説がある。この説を裏付ける状況証拠につき、肺及び中枢神経系を中心に述べた。更にこの酸素中毒の発生機序を理解するために、活性酸素の生化学、反応性、細胞内での発生源と障害及びその消化系につき概説した。

キーワード：フリーラジカル、活性酸素、活性酸素の消去系、酸素中毒、活性酸素の生化学

Reactive oxygen species, free radicals and their scavengers in relation to oxygen toxicity

Toshiko Yusa*

*Department of Anesthesiology, University of the Ryukyus, Faculty of Medicine

The oxygen centered free radicals and related reactive oxygen species (ROS) are highly reactive, thus interact with intracellular elements and induce chain reactions. They are generated in vivo as byproducts of normal metabolism and participate in many biological processes. The damage caused by increased oxygen tension (oxygen toxicity) is hypothesized currently that ROS are generated at rates which exceed the ability of cellular defenses to detoxify these deleterious products. In this review, the circumstantial evidences for the free radical theory are reviewed mainly focused on the lung and the brain. To obtain a deeper understanding of the theory and the mechanisms of oxygen toxicity, the biochemistry, intra-or extra-cellular sources of ROS, targets at risk for ROS, and the defense system to ROS are also discussed.

Keywords : _____

free radicals

reactive oxygen species

scavenger of reactive oxygen

oxygen toxicity

biochemistry of reactive oxygen

はじめに

我々が生命活動を営む上で必要な高分子有機化合物を生合成するためには化学エネルギー(ATP)が必要である。我々生体にとって酸素が重要なことは、1分子のglucoseが細胞内で酸素により酸化されると38分子のATPが生成されるが、酸素が存在しない場合は2分子のATPしか生成されないことでも明かである。我々が呼吸により吸入する空気中にある21%(約150mmHg)の酸素は、細胞内での濃度は30-40 μ M¹⁾、ATP生成系の最終段階で電子伝達系より4個の電子を受けとって水(H₂O)となる。

好気性生物の地球上への発生過程でも解るように元来酸素は生物にとって毒作用を持っていた。好気性生物の酸素還元過程では大部分が酸素の還元分子種を遊離することなく、金属酸素錯体を中間体として4電子還元が進行するが、いくつかのオキシダーゼやオキシゲナーゼでは活性酸素(ROS: reactive oxygen species)であるO₂や

*琉球大学医学部麻酔科学講座

H_2O_2 を反応物として遊離するし、細胞成分の自動酸化やフリーラジカル (FR) との反応によって ROS が生成する。細胞外では活性化食細胞や食菌作用中に ROS が発生する。生体への放射線照射では水の放射線分解種として水和電子と共に一次的 FR (e_{aq}^- , $HO\cdot$, $H\cdot$) が発生し、酸素や細胞内成分と反応して二次的 FR が発生する。その他環境因子として可視光、紫外光、光化学空気汚染、タバコ煙による障害は FR 反応による。その他虚血一再還流も FR 反応に関与している。

通常の細胞内の生理的代謝過程での ROS の生成量は酸素の水への還元酸素量の 1-2%程度であるが、これが消去されないと生体内分子を酸化して障害をあたえる。一方、ROS は生理的に重要な代謝に関与したり病原菌に対する生体の防御、細胞分裂等の生体制御にも関与している。従って ROS の細胞内濃度は厳密に制御されている。

高気圧酸素療法では組織での酸素分圧が異常に高くなるため、酸素の毒性や X 線照射との増強作用、対象とする患者の炎症、虚血、使用薬などの関連で活性酸素の発生が問題になる。

テーマである活性酸素、フリーラジカルには以下に述べる様に多くのものがあり、またテーマに関連する多くの成書、総説や論文がすでにある。従ってこの総説では狭義の活性酸素の基礎と主に生体内での反応を中心にして、化学、生化学の知識の少ない臨床医に出来るだけ理解しやすいように概説することを目的とした。参考文献も基礎的な部分については最近の邦文の成書をあげた。酸素中毒との関連についてはすでに本誌及び他誌に報告^{2)~6)}しているので重複すると思うが、最近の報告を加えて述べる。

活性酸素とフリーラジカル

1. 酸素の物性、反応性とフリーラジカル、活性酸素の定義^{7)~9)}

基底状態の分子 (エネルギー準位の低い分子) は一般的に一重項状態であるが、大気中の酸素 (O_2) は三重項酸素 (3O_2) である。

酸素原子は原子番号が 8 で原子核の周りに 8 個の電子を持っている。酸素原子 2 個が結合して出来る酸素分子 (O_2) の電子配置は 2 個の電子がエネルギー準位の高い軌道 (反結合軌道) に 1 個ずつ入り、互いに電子運動の方向を同じくして配置

(3 重項状態) されておりため結合軌道の結合力が弱められ、三重結合ではなく原子間の結合は二重結合 ($O=O$) となっている。酸素は反結合軌道 (π_x^* 及び π_y^*) に結合していない電子が 1 個ずつ入っているためにラジカル分子 (遊離基: 不対電子を持つ分子) であり、2 個の不対電子を持っているためピラジカル分子である (図 1)。一般にラジカル (不対電子をもつ原子、原子団及び分子種) は不対電子を対をなした電子状態にするため、電子を与えやすい物質より電子を引き抜く性質 (酸化剤) をもっている。しかし 3O_2 の 1 電子還元はすでに電子の入っている反結合軌道に電子を入れなければならず進行しにくいいため、 3O_2 の 1 電子還元酸化還元電位は低い。従って、 3O_2 は電子供与性の高い (酸化電位の低い) 還元物質のみしか 1 電子還元できない。更に三重項であるため、逆方向スピンの電子対を持つ一重項の細胞成分とはスピン禁制のため反応できない。以上の理由で 3O_2 は高い酸化力を持つにもかかわらず、反応性は低い。しかし逆に三重項であるため FR とは反応性が高い。ROS の表示には表 1 のように系統表示と慣用表示があるが、以下慣用表示を使用して述べる。

3O_2 とその最も還元された分子種である H_2O との間には 3O_2 が 1 電子還元されたスーパーオキシド (O_2^-)、2 電子還元とプロトンが付加された過酸化水素 (H_2O_2)、 H_2O_2 が 1 電子還元されたヒドロキシラジカル ($HO\cdot$) が生成する。この他励起分子種である 1 重項酸素 (1O_2 : 電子スピンの方向が逆になった酸素で高エネルギー性酸素) は 3O_2 の低い反応性の要因がなくなるため反応性が高く、細胞成分を非特異的に酸化する。従ってこの 4 種が一般に活性酸素 (ROS) と呼ばれている。

これら狭義の ROS の他に、生体内で過酸化反応に関与する ROS 種として $HO_2\cdot$ (O_2 に H^+ が付加したもの)、ROS により生成する有機化合物の酸化物- H_2O_2 および $HO\cdot$ の H がアルキル基 (R) に置換された $RO\cdot$, $ROO\cdot$, $ROOH$: 例えば脂質過酸化反応で生成する脂質アルコキシラジカル ($LO\cdot$)、脂質ペルオキシラジカル ($LOO\cdot$)、脂質ヒドロペルオキシド ($LOOH$) 及び O_2^- を生成しやすい有機ラジカル ($R\cdot$)、 Cl^- のミエロペルオキシダーゼによる酸化で生成する ClO^- 、好中球でアミンミエロペルオキシダーゼと Cl^- との反応で生成する $RNHCl$ 、 Fe^{2+} と H_2O_2 との反応などで生成

		外郭電子の配置		O—O 核間距離 (Å)
		π^*_x	π^*_y	
基底状態の酸素 ($^3\text{O}_2$)	$^1\Sigma_g^-$			1.2074
一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)	$^1\Delta_g$			1.2155
一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)	$^1\Sigma_g^+$			1.2268
スーパーオキシド (O_2^-)				1.289-1.35

図1 酸素分子の外郭電子配置と核間距離

する Fe イオン酸素錯体 (FeO^{2+}) などの金属酸素錯体も生物学的には ROS として作用して細胞成分を酸化するため、広義の ROS と考えられる。

狭義の ROS のうち O_2^- , $\text{HO}\cdot$ および $^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g^+$ 型) はラジカルであるが H_2O_2 , $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$ 型) はラジカルではない。

またフリーラジカル (FR) には酸素のラジカルの他に、一酸化窒素 (NO), 二酸化窒素 (NO_2) など窒素のラジカルや硫黄のラジカル (チールラジカル: $\text{RS}\cdot$) 等がある。

2. 酸素 ($^3\text{O}_2$) の生体内での活性化¹⁰⁾

$^3\text{O}_2$ が血中に入りヘモグロビン (Hb) と結合して HbO_2 になると酸素分子の核間距離が伸びて O_2 の核間距離と等しくなる。 $^3\text{O}_2$ は組織中に存在する酸化酵素により 1 電子, 又は 2 電子還元を受けて核間距離の延長した O_2^- と H_2O_2 を生成する。酸素分子間の核間距離が延長すると酸素原子間の結合が弱くなり, 容易に 1 電子還元を受けて最も反応性の強い ROS である $\text{HO}\cdot$ を生成する。

電子軌道 3d に不対電子を持つ遷移金属イオンはラジカルと同じ性質を持つため $^3\text{O}_2$ と反応し, $^3\text{O}_2$ の反応性が高くなる。このためオキシゲナーゼやオキシゲナーゼには反応中心に Fe, Cu, Mn, Co を持つ酵素が多い。従って遷移金属イオンが細胞内に存在すると $^3\text{O}_2$ による非特異的な細胞成分の酸化を促進する。

酸素添加酵素 (酸素分子又は酸素原子を基質に

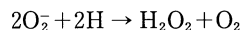
添加する酵素) に取り込まれた $^3\text{O}_2$ も核間距離が延長したり, エネルギー準位の高い $^1\text{O}_2$ と類似した性質となる。

3. 各々の活性酸素の反応⁷⁾⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾

1) スーパーオキシド (O_2^-)

O_2^- は酸素分子 (ピラジカル) の反結合軌道の π_x^* または π_y^* に 1 電子が入ったもので 1 個の不対電子も持つモノラジカルで, アニオンとしての性質を持つアニオンラジカルである。種々の酵素系 (xanthine-xanthine oxidase 系や NADPH-cytochrome P_{450} reductase - cytochrome P_{450} 系等) で生成する。

O_2^- の反応性は非プロトン性溶媒中ではアニオンとしての反応 (求核置換反応, 求核付加反応, 塩基触媒反応), ラジカルとしての反応 (水素引抜き反応, 1 電子還元, 1 電子酸化, 不均化反応) をする。しかし水中での O_2^- は不均化反応をして H_2O_2 と O_2 に分解される。



従って特に酸化され易い物質 (エピネフリン, SO_3) や還元され易い物質 (Fe^{3+}) とのみ反応するのみで, 反応性は比較的低い。しかし O_2^- は生体内に存在する微量の遷移金属を還元して活性化し, 強力な脂質過酸化反応の開始剤となる。更に H_2O_2 を経由して $\text{HO}\cdot$ 源となる。 O_2^- に H^+ が付加した $\text{HO}_2\cdot$ は O_2^- より酸化力がつよいが, pKa が 4.8 付近であるため生理的 pH ではほとんど O_2^- の

表1 活性酸素及び有機酸化物 (広義の活性酸素) の分子式, 慣用名

分子式 系統表示(慣用表示)	慣用名
O ₂	(di) oxygen, molecular oxygen 酸素(分子), 分子状酸素
·OO· (³O ₂)	(ground state) triplet oxygen (基底状態の) 3重項酸素分子
³Σ _g ⁻ O ₂	(triplet sigma g minus oxygen)* //
¹O ₂	(excited) singlet oxygen (励起状態の) 1重項酸素分子
¹Δ _g O ₂	(singlet delta g oxygen)* //
¹Σ _g ⁺ O ₂	(singlet sigma g plus oxygen)* //
O ₃	ozone オゾン
O ₂ ⁻ (O ₂ ⁻ , O ₂ ⁻ ·)	superoxide (anion radical) スーパーオキシド(ラジカル)
HO ₂ , HO ₂ [·]	hydrodioxyl ヒドロペルオキシ(ラジカル)
(HO ₂ [·] , HOO·)	hydroperoxyl (radical)
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide 過酸化水素
HO· (HO·, OH·)	hydroxyl (radical) ヒドロキシラジカル
RO· (RO·)	alkoxyl (radical) アルコキシラジカル
ROO· (ROO·)	(alkyl) peroxy (radical) (アルキル)ペルオキシラジカル
ROOH	(alkyl) hydroperoxide (アルキル)ヒドロペルオキシド
R·	(organic) radical 有機ラジカル
ClO ⁻	hypochloride 次亜塩素酸イオン
RNHCl	N-chloroamine N-クロロアミン

系統表示ではラジカル (不対電子) は分子式の右肩に点で示し, 電荷をその次に示す。

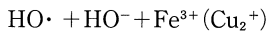
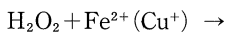
* : 系統名

型で存在する。

2) 過酸化水素 (H₂O₂)

H₂O₂は上述の O₂の不均化反応か, フラビン酵素 (オキシダーゼ) による酸素存在下での基質の酸化過程で生成する。

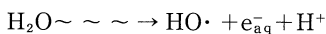
H₂O₂の酸素間の核間距離は O₂より長く, またラジカルではないため安定で, 水中では酸化, 還元には関与しない。生体では Fe²⁺や Cu⁺イオン等の遷移金属イオンの存在下で Fenton 反応により HO· を生成する。



また H₂O₂はペルオキシダーゼの基質となり complex I [(Fe=O)³⁺] や complex II [(Fe=O)²⁺] を生成して有機化合物を酸化する。

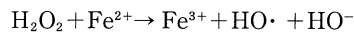
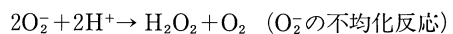
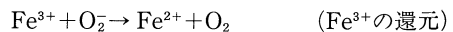
3) ヒドロキシラジカル (HO·)

HO· は上述した Fenton 反応や嫌気的条件下での水への X線照射で水和電子と共に生成する。

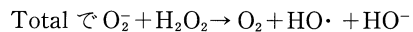


以前 O₂ と H₂O₂が直接反応して HO· が生成

(Haber-Weiss 反応) すると考えられたが, この反応は鉄などの金属イオン等の触媒なしにはほとんど進行しないことから, 現在は鉄などの金属イオンを介して進行する金属イオン触媒 Haber-Weiss 反応 (metalcatalyzed Haber-Weiss 反応) 又は Fenton 型 Haber-Weiss 反応) が受け入れられている。



(Fenton 反応)



HO· の有機化合物との反応は拡散律速に等しく, 生成した場所で水素引抜き, HO· 付加, 酸化等により直ちに反応する。しかし生体膜の脂質過酸化反応にはほとんど関与しない。後述するようにキノン系制癌剤や X線照射による制癌作用は, DNA 鎖近くで発生した HO· が鎖を切断することによって考えられている。

4) 一重項酸素 (¹O₂)

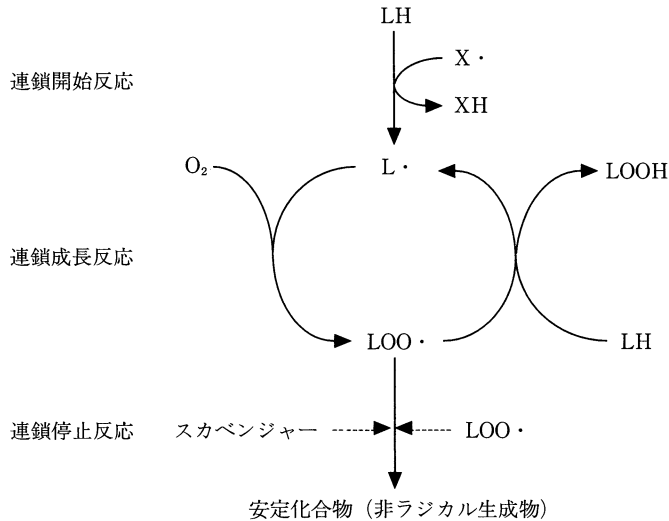


図2 脂質ラジカル連鎖反応による過酸化反応
(略語については本文参照)

一重項酸素には³O₂の π_x^* または π_y^* 軌道の一方にエネルギーをえた他方の電子が入った状態(¹ Δ_g)と π_x^* と π_y^* 軌道の電子配列は同じであるが電子スピンの方向が互いに逆である状態(¹ Σ_g^+)がある。電子配列図1から解るように¹ Σ_g^+ はラジカルであるが、¹ Δ_g はラジカルではない。

一重項酸素は基底状態の三重項酸素(³ Σ_g^-)より高いエネルギー状態であるため反応性が高く、エネルギーを他の分子にわたして基底状態に戻る。従って三重項酸素が一重項酸素になるにはエネルギーが必要で、光増感反応によりエネルギーが供与される。

例えばビリルビンは光よりエネルギーを吸収し、この吸収エネルギーが基底状態の三重項酸素に渡って一重項酸素となる。水中での寿命は¹ Δ_g が4 μ secで、¹ Σ_g^+ はさらに短く測定不能な程である。したがって水中での¹O₂と有機化合物の反応は¹ Δ_g との反応である。

生体内で¹O₂が生ずる可能性のあるのは前述のビリルビン、ヘム(ポルフィリン)、リポフラビン(ビタミンB₂)であるが、生体内では光増感剤がなければ¹O₂はほとんど生成されない。抗生物質、抗炎症剤、トランキライザーの服用で起こる皮膚障害は、これら薬剤が光増感剤であるため日光にあたると起こる。また生体膜の脂質過酸化反応や

好中球の食菌作用中での発生が示唆されているが量的に少なく、水中での寿命から考えて生体の有機化合物と反応して過酸化物を生成するとは考えられていない。

4. ラジカル反応⁷⁾⁸⁾¹¹⁾

ラジカルはラジカル反応をする。ラジカル反応には a) 生成反応, b) 成長反応, c) 停止反応がある。

- (1) $RH \rightarrow R \cdot$
- (2) $R \cdot + O_2 \rightarrow ROO \cdot$
- (3) $ROO \cdot + RH \rightarrow ROOH + R \cdot$
- (4) $R \cdot + R \cdot \rightarrow RR$
- (5) $ROO \cdot + R \cdot \rightarrow ROOR$
- (6) $ROO \cdot + ROO \cdot \rightarrow R'O + R'OH + O_2$

(1)が生成反応, (2)(3)が成長反応でO₂が存在すれば反応(2)(3)が繰り返される(連鎖反応)。(4)(5)(6)が停止反応である。

脂質の酸素分子による非酵素的なラジカル過酸化反応は図2に示したように、基質(LH)より何らかの引金(X·)により水素が引き抜かれ、脂質ラジカル(L·)が生成する連鎖開始反応が第一のステップである。

L·は酸素分子と反応してペルオキシラジカル(LOO·)となる。LOO·は他の脂質より水素を引き抜き新しい基質ラジカル(L·)を生成すると同

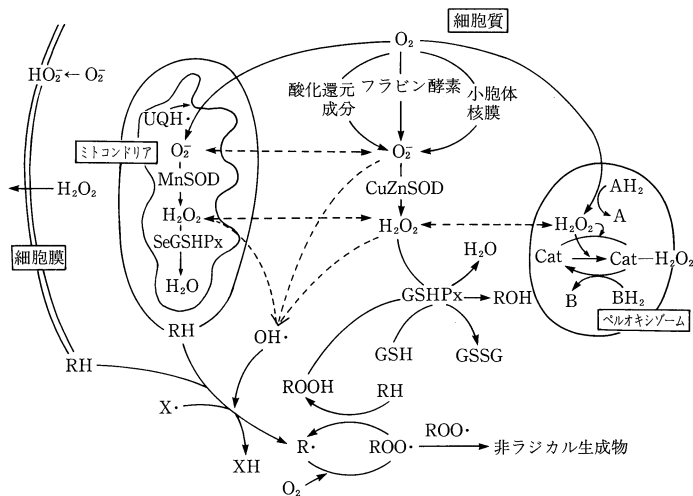


図3 細胞内での活性酸素・フリーラジカル発生と消去系の局在³⁾⁵⁾
 (Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605, 1979 の原図を改変, 略語については本文参照)

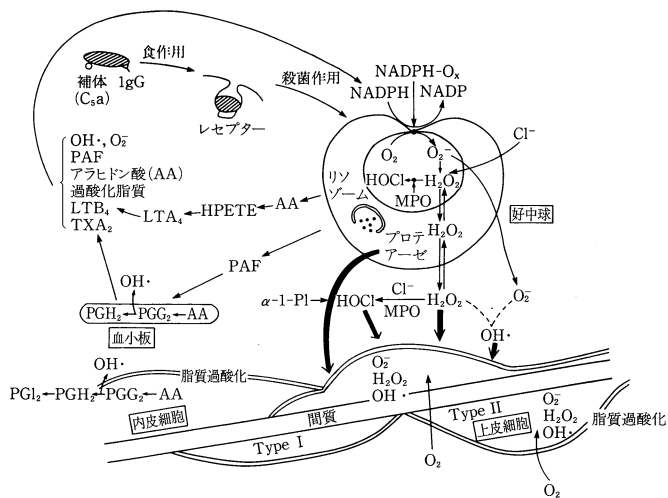


図4 食細胞による活性酸素・フリーラジカル発生³⁾
 (略語については本文参照)

時に、自身はヒドロペルオキシド (LOOH) となる。この新しい基質ラジカル (L·) はふたたび図の反応を繰り返し、この連鎖反応によるラジカル連鎖反応が自動酸化反応 (O₂が関与する非酵素的酸化反応) である。何度か連鎖成長反応を繰り返した後、2分子の LOO· が反応して非ラジカル生

成物となるか、消去剤により捕捉され反応が完了する (連鎖停止反応)。

生体膜での脂質過酸化反応は膜に存在する NADPH - cytochrome P₄₅₀ reductase - cytochrome P₄₅₀系で生成した O₂⁻による微量鉄イオンの還元、活性化された鉄による開始反応で始まる。

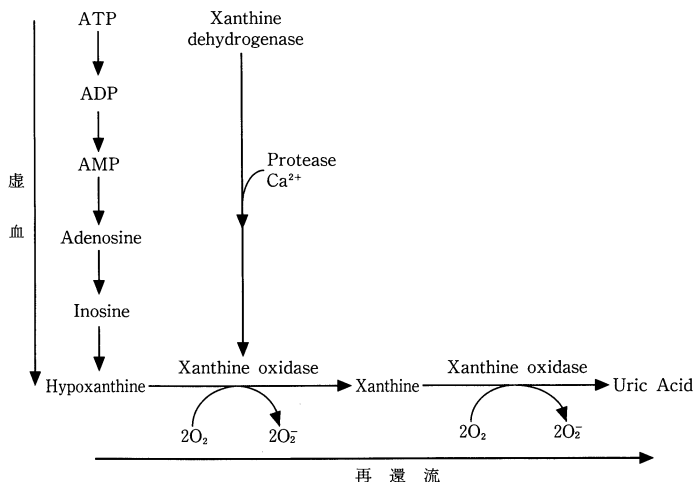


図5 虚血—再還流時における Xanthine-Xanthine oxidase 系からの superoxide (O_2^-) 発生機構

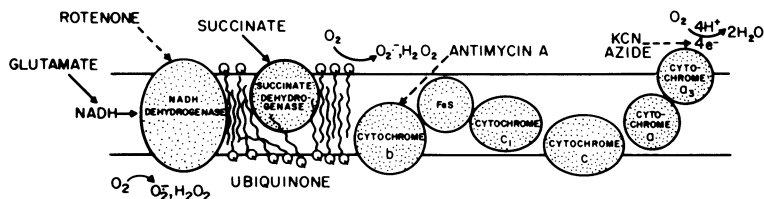


図6 ミトコンドリア電子伝達系での superoxide (O_2^-) 発生部位と阻害剤の作用部位¹⁴⁾
Superoxide (O_2^-) の発生は電子伝達阻害剤 (点線矢印で表示) を使用して測定されている。

脂質過酸化物のなかでリノール酸やアラキドン酸が酵素反応により O_2 付加された生成物のヒドロペルオキシドやエンドペルオキシドは単離同定が可能であり、化学名で呼ぶことが出来るが、生体膜中の不飽和脂肪酸のヒドロペルオキシドは混ざり物であるため、過酸化脂質と言われている¹²⁾。

生体内での活性酸素，フリーラジカルの発生

生体内での ROS と FR の発生は大別して細胞内と細胞外が考えられるため、生理的代謝過程での発生を含めた細胞内での発生 (図3) と細胞外としては活性化食細胞や食菌作用中に発生する ROS, FR (図4) について述べる。

1. 細胞内構成要素による活性酸素発生^{2)-6),10)11)13)14)}

1) 可溶性小分子

細胞内の可溶性要素である hydrokinone, catecholamine, thiol, flavin, tetrahydropterin は O_2 を還元して O_2^- を発生する。

キレート化 Fe^{3+} は ascorbate, thiol 等で還元された Fe^{2+} となり自動酸化して O_2^- を発生する。発生した O_2^- は不均化反応または superoxide dismutase により H_2O_2 となる。

2) 可溶性酵素と蛋白

Xanthine oxidase (XO) と類似の構造を持つ aldehyde oxidase は O_2 の 1 電子又は 2 電子還元を触媒し、 O_2^- , H_2O_2 が発生する。XO は in vivo

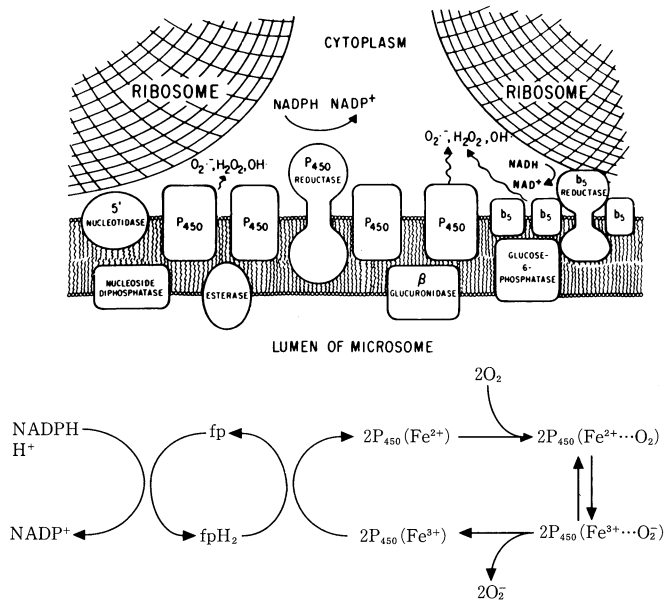


図7 ミクロゾームによる活性酸素発生と NADPH-cytochrome P₄₅₀ reductase-cytochrome P₄₅₀系からの superoxide (O₂⁻) 発生機構²⁾¹⁴⁾

fp=NADPH-cytochrome P₄₅₀ reductase

P₄₅₀(Fe³⁺)=cytochrome P₄₅₀

では NAD⁺依存性の dehydrogenase として働き活性酸素を発生しないが、虚血時 protease, Ca²⁺により oxidase 型に変化して O₂を発生する (図5)。

Dydydroorotate dehydrogenase, flavoprotein dehydrogenase, tryptophan dioxygenase も O₂⁻を発生する。赤血球内では hemoglobin の methemoglobin への酸化の際に O₂⁻が発生する。

3) ミトコンドリア (Mit)

好氣的代謝過程での酸化還元では酸素の90%以上は cytochrome oxidase により 4 電子還元されて ROS, FR は発生しないが, Mit は細胞内 O₂⁻, H₂O₂発生の主な構成要素である。電子伝達系の ubiquinone-cytochrome b 間で O₂⁻発生が一番多く, ubisemiquinone (CoQH[•]) の自動酸化による (図6)。O₂⁻は不均化反応により H₂O₂となり細胞質内に遊出する。OH[•]の発生も報告されており, この場合 O₂⁻と H₂O₂のほかに遷移金属イオン (Fe²⁺, Cu⁺)が必要である (上述した Fenton

反応)。Fe³⁺は ascorbete 等で還元されるため, peroxidase と遷移金属が存在すると H₂O₂より OH[•]が発生する。

4) 細胞内皮系と核膜

細胞内皮系と核膜は構成要素が類似しており, 膜に結合したヘム蛋白の cytochrome P₄₅₀, b₅とこれに電子を渡すフラビン酵素の NADPH-cytochrome P₄₅₀ reductase より成る mixed function oxidase 系がある。これらの酵素は自動酸化して ROS を発生する (図7)。多くの xenobiotics は NADPH-cytochrome P₄₅₀ reductase で 1 電子還元を受けセミキノン型となり O₂に電子を渡して O₂⁻を発生する。ミクロゾーム(形質膜, 粗面小胞体などを含む)での OH[•]発生も報告されており, H₂O₂を介する iron-catalyzed Haber-Weiss 反応によると考えられている。

5) ペルオキシゾーム

ペルオキシゾームは直接 H₂O₂を発生する酵素 D-aimno acid oxidase, urate oxidase, L-α-

hydroxyacid oxidase, fatty acyl-Co A oxidase を持っている。

発生した H_2O_2 は通常 catalase により代謝されるが、細胞質内にも遊出する。

6) 細胞質膜

細胞膜は ROS, FR の反応の場として重要である。細胞外で発生した ROS, FR はまず細胞質膜で反応する。膜には不飽和脂肪酸や酸化されやすいアミノ酸が多く、ROS, FR により障害をうける。 H_2O_2 は膜を通過するが、 O_2^- は膜でプロトン化されやすく、 O_2^- より強い oxidant である hydroperoxyl radical ($HO_2\cdot$) となる。更に細胞膜に存在する phospholipase A_2 の活性化により、遊離したアラヒドン酸 (AA) の cyclooxygenase (cyclo-ox) と lipoxygenase (lipo-ox) によるプロスタノイド生成中にラジカルが発生する。AA の cyclo-ox による methylene hydrogen の引抜きにより脂肪酸ラジカルや PGG₂ の hydroperoxide より hemoprotein radical や $OH\cdot$ が発生する。これらのラジカルは cyclo-ox を不活性化するため、feedback の調節作用が働いている。Prostaglandin endoperoxide (PGH₂) より thromboxane (TxA) が生成するときにもラジカル反応が関与している。

2. 食細胞による活性酸素の発生¹⁰⁾¹⁵⁾

食細胞による食菌作用は多核白血球 (好中球; PMN) が侵入物に向かう走行時、PMN 内に取り込む食作用と ROS による殺菌作用による (図 4)。細菌、捕体、抗体などでオプソニン化されると、PMN 内に取り込まれ食胞を形成しつつ、活性化された膜結合性 NADPH-oxidase (NADPH-ox) により O_2^- を発生し respiratory burst として知られている酸素消費の上昇が起こる。PMN は O_2^- と同時に H^+ を放出するため HO_2^- となり易く、 O_2^- の不均化反応で H_2O_2 が発生する。PMN は多くのリソゾーム酵素や myeloperoxidase (MPO) を持っており食胞中や細胞外に放出する。発生した H_2O_2 は MPO の作用で halide (Cl^- , Br^- , I^-) を酸化してそれぞれ対応する hypohalous acid とするが、生体内では HOCl が主である。

殺菌は HOCl とリソゾーム酵素による作用とされている。 $OH\cdot$ の関与については FR スカベンジャー (消去剤) により殺菌が抑制されることから考えられ、遷移金属として蛋白結合性の fer-

ritin, lactoferrin, transferrin が考えられる。

H_2O_2 発生により解糖、5 炭糖リン酸回路の促進、glutathione 代謝の亢進が起こる。更に phospholipase A_2 が活性化され、リン脂質より AA や血小板活性化因子 (PAF) が遊離される。AA の cyclo-ox, lipo-ox による代謝過程で生成される leukotriene (LTB), TxA や PAF は PMN による O_2^- 生成を誘導する。これらの変化は食菌時のみでなく、細胞膜受容体を介して作用する抗原抗体複合体、IgG, C_{5a} , 走化性 peptide や protein kinase C を直接活性化する phorbol myristate acetate (PMA) などの刺激で O_2^- , H_2O_2 生成が起こる。

3. 細胞内で O_2^- 発生源となる化学物質¹³⁾

1) 抗癌剤

キノン系制癌剤は水溶性であるため、核の DNA 鎖に付加する。作用機構はまずキノン系制癌剤が前述した核膜に存在する NADPH-cytochrome P_{450} reductase で 1 電子還元され、次いでその電子を O_2 に渡して O_2^- を発生し、不均化反応で発生する H_2O_2 が鉄イオンにより $HO\cdot$ を発生して DNA 鎖を切断することである。更に細胞内に入ったキノン系制癌剤は粗面小胞体、形質膜の膜酵素により還元され O_2^- を多量に発生する。キノン系制癌剤である adriamycin は Fe^{3+} とキレートし、分子内電子移動によって鉄を還元して非酵素的に活性型 adriamycin 鉄錯体となって不飽和脂肪酸より水素を引き抜いて過酸化連鎖反応を開始させる。

キノン構造を持っていない bleomycin は Fe^{2+} 及び O_2 が存在すると DNA を切断する。 Fe^{2+} のかわりに Fe^{3+} を ascorate 等の還元剤と共存させた場合にも DNA を切断する。

2) パラコート及びニトロフラン

細胞内に取り込まれたパラコートやトリパノソーム感染症や尿路感染症の治療に使用されるニトロフランは生体膜の前述した NADPH-cytochrome P_{450} reductase が関与する還元酸化サイクルにより O_2^- を発生する。

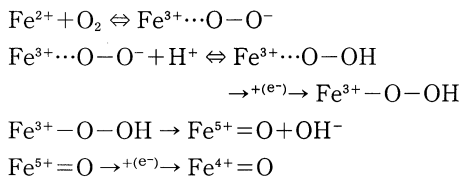
3) 鉄イオン

生体内の貯蔵鉄は ferritin の型で貯蔵されている。鉄は ferritin を完全に飽和しているのではなく、 O_2^- , ascorbate, reductase などの作用で Fe^{2+} の型で遊離している。 Fe^{3+} は 3d 軌道に不対電子

表2 活性酸素・フリーラジカルによる細胞障害と標的物質³⁾⁶⁾¹⁴⁾

標的物質	細胞障害
不飽和または thiol 含有アミノ酸	蛋白の変性と cross-link, 酵素の不活性化
核酸塩基	細胞周期の変化, 突然変異
炭水化物	細胞レセプターの変化
不飽和脂質	コレステロールと脂肪酸の変化, 脂質の cross-link
補因子	ニコチンアミドやフラビン含有補酵素の活性低下
神経伝達物質	セロトニン, エピネフリンなどの活性低下
抗酸化剤	α -tocopherol, β -carotene などの活性低下
蛋白	ペプチド鎖の切断, 変性
DNA	鎖の切断, 塩基の修飾
ヒアルロン酸	滑液粘度の変化

をもつため FR と同様の性質をもつが, Fe^{2+} は不対電子をもたない。 Fe^{2+} は好氣的条件下では不安定で, 酸素と結合して O_2 付加物を生成し, 活性化される。



$\text{Fe}^{3+} \cdots \text{O} - \text{O}^-$ (ペルフェリール型物質) はラジカルであるが酸化力は弱い。しかし 1 電子還元された $\text{Fe}^{3+} - \text{O} - \text{OH}$ は $\text{Fe}^{5+} = \text{O}$ に変化して強力な酸化剤となる。従って Fe^{2+} による脂質過酸化反応は $\text{Fe}^{5+} = \text{O}$ による不飽和脂肪酸よりの電子の引抜きにより開始される可能性がある。

活性酸素とフリーラジカルによる障害

活性酸素とラジカルはそれ自身または活性酸素により派生する酸化種により生体内の有機化合物を酸化・分解し, 障害を起こすが (表 2), 主な標的は sulfhydryl 含有蛋白 (酵素), DNA と脂質である^{2)~6), 10)14)}。

1. 蛋白質との反応

Tryptophan, tyrosine, cysteine, phenylalanine, methionine などのアミノ酸は H_2O_2 , $\text{HO}\cdot$, HOCl で速やかに酸化される。Glutathione も O_2 , H_2O_2 で酸化される。細胞機能を維持する上で重要なことは, Ca^{2+} -ATPase は thiol を, calmodulin (Ca^{2+} 結合蛋白) は meth-

ionine を含有していることである。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ も活性化に必要な thiol を含有している。これら酵素の障害は膜機能, 電解質輸送に影響をあたえる。酵素は不活性化されるのみではなく guanylate cyclase (cyclic GMP 生成に関与) は活性化される。また cyclo-ox の活性は peroxide により調節されている。

2. 脂質との反応

脂質過酸化は前述したように酸化剤が脂質より水素 (特に allylic hydrogen) を引き抜くことにより連鎖反応が開始されるが, 水素を引き抜くラジカルについてはまだ不明な点が多く確定していない。細胞膜 (Mit, ミクロゾーム膜) は炭水素残基を多く持つ不飽和脂肪酸が多く過酸化を受けやすい。脂質過酸化による障害は膜構造や機能障害のみではなく, 過酸化脂質 (LOOH) の蓄積はアミノ酸残基の酸化や連鎖重合反応により酵素を不活性化する。更に 3 つ以上の二重結合をもつ脂肪酸の過酸化で生成される malonaldehyde は蛋白, 酵素, RNA, DNA, やリン脂質と cross-link 反応をする。

脂質過酸化は細胞膜の脂質のみでなく血漿中の lipoprotein が酸化され, アルブミン結合脂肪酸と反応して PMN に対する走行性物質が生成される。

3. 核酸と DNA

$\text{HO}\cdot$ は DNA 塩基と反応して染色体異常を発生させ, ribose-phosphate と反応して DNA 鎖を切断する。

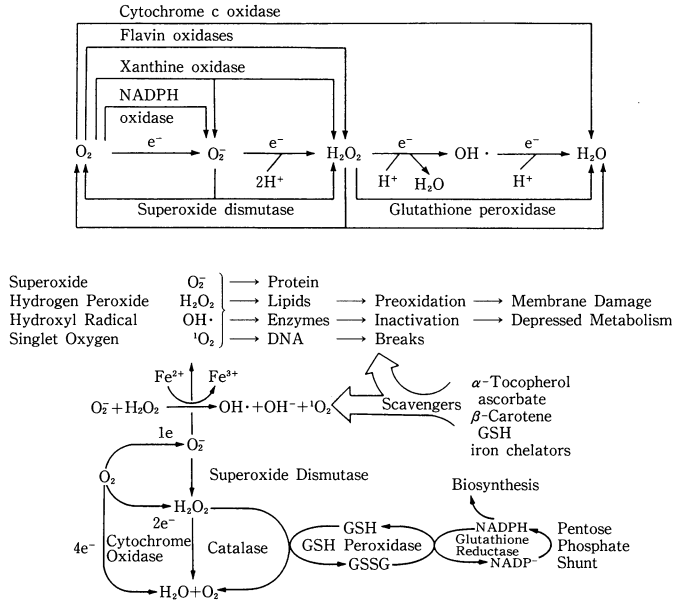


図8 酸素の酸化還元反応に関与する主な酵素及び活性酸素の防御系⁵⁾

(Ernster L: Biochemistry of reoxygenation injury. Crit Care Med 16: 947-953, 1988 及び Crapo JD: Physical, chemical and aspiration in injury. Cecil Textbook of Medicine, 16th ed. Edited by Wyngaarden JB, Smith LHJr. Philadelphia, W.B. Sanders, 1982, p405 より引用)

活性酸素とラジカルに対する防御機構 (スカベンジャー)

活性酸素による障害に対し生体は防御機構を持っている(図8)。生体組織中には ROS, FR を直接的, 又は間接的に消去する化学物質や酵素が存在する^{2)~6),14)16)}。

ROS, FR 等の活性物質を不活性化する物質について scavenger (消去剤), trap (捕捉剤) 及び quencher (消光剤) の用語が使用されているが, 消去剤とはラジカルに対しては捕捉剤, H_2O_2 に対しては抗酸化酵素 (ROS を消去する酵素) であり, 1O_2 に対しては捕捉剤または消光剤をいう。従って消去剤は ROS, FR 等の活性物質を不活性化物質すべてを指し, 捕捉剤は活性物質と結合または反応して不活性化物質である。消光剤は吸収光や発光を消す物質を指す¹²⁾。

1. 抗酸化酵素

活性酸素を消去する酵素として, 活性酸素の内 1O_2 ($^1\Delta_g$) は水溶液中で直ちに消失し, また $HO \cdot$ は発生した場所で直ちに非特異的に反応して消失するので, これらを消去する酵素はない。

1) O_2^- に対する抗酸化酵素

O_2^- の H_2O_2 への不均化反応を触媒するのが superoxide dismutase (SOD) で, すべて金属酵素 (活性中心に $Cu^{2+}-Zu^{2+}$ 又は Fe^{3+}, Mn^{3+} を持つ) である。SOD には細胞質内に存在する $Cu^{2+}-Zu^{2+}$ SOD (CuZnSOD) と Mit の matrix に存在する Mn^{3+} SOD (MnSOD) があるが, 活性は同一である。活性中心にある金属の還元-酸化サイクルにより O_2^- を不均化する。血漿中にも弱い SOD 活性があるが, 四量体酵素の CuZnSOD である。関節液, 血漿及び組織液には ceruloplasmin (Cu 蛋白質) が存在して O_2^- を消去するが, 反応は化学量

論的で、1分子の ceruloplasmin に対して1モルの O_2 を非酵素的反応で消去する。しかし脂質過酸化反応の開始剤として作用する Fe^{2+} を Fe^{3+} に変換するフェロオキシダーゼ活性を持つため、脂質過酸化反応の阻害作用がある。

2) H_2O_2 に対する抗酸化酵素

H_2O_2 は catalase (Cat) と glutathione peroxidase (GSH-Px) で還元される。Cat は細胞質内でペルオキシゾーム内に存在し、触媒反応の他に酸化型 (compound I) は強力な酸化剤で H_2O_2 以外の小分子と反応する peroxidase (Px) として作用する。Cat が無機の過酸化化物とのみ反応するのに対し、GSH-Px は有機の過酸化化物にも作用し、細胞質内に広く分布する。しかし適量の還元 glutathione (GSH) の存在が必要で、GSH は酸化 glutathione (GSSG) より glutathione reductase (GSH-red) により再生するが、この反応には NADPH が必要で、NADPH は pentose phosphate shunt (5炭糖リン酸回路) より供給される。 H_2O_2 に対する反応定数より考え、通常の細胞での H_2O_2 の消去には GSH-Px が重要である。しかし H_2O_2 の発生が増加した場合は Cat が重要となる。細胞外には H_2O_2 に対する酵素系はないが、 H_2O_2 は赤血球膜を通過して赤血球内の Cat と GSH-Px により代謝されるため、赤血球が防御系となる。

前述したように、生体内には $HO\cdot$ を直接生成する細胞反応や $HO\cdot$ を消去する酵素や特定の物質もない。しかし Fe^{2+} や lactoferrin, transferrin, ferritin のような iron complex が O_2 と H_2O_2 の metal catalyzed Haber-Weiss 反応を触媒するため、 O_2 と H_2O_2 の完全な消去は $HO\cdot$ 発生を抑制する。

3. その他の消去剤

過酸化脂質 (LOOH) 生成過程での FR 捕捉剤として脂溶性ビタミン E (α , β , γ , δ -tocopherol; VE) がある。 $LOO\cdot$ と反応して生成する VE ラジカルはビタミン C (VC) と反応して VE に戻るため VE と VC は抗酸化作用に対し相乗作用がある。しかし生体内では VE は脂溶性で、細胞膜内に存在するのに対し VC は水溶性であり、相乗作用は複雑である。VC は O_2 と反応して H_2O_2 を生成するが、 $HO\cdot$ 生成にも関与する。他の脂溶性の抗酸化剤として β -carotene があるが、 PO_2 が

150mmHg 以下の時のみ $LOO\cdot$ と反応するのに対し、VE は酸素分圧が高い時に膜の保護作用があるとの報告もある。

VE と β -carotene は 1O_2 の消去剤としても作用する。細胞膜の LOOH は生理的レベルでは VE と β -carotene と反応せず、完全に過酸化障害を防御しない。少なくとも3つの GSH 系が細胞膜の過酸化反応を抑制する: a) GSH-Px, b) GSH-S-transferase, c) nonseleno, nontransferase GSH-dependent factor であるが、a), b) の細胞膜過酸化の抑制には限界がある。第3のc) は phosphatidylcholine hydroperoxide を対応する alcohol にする。これらの GSH 系は LOOH の生成を抑制することにより過酸化障害を抑制すると考えられている。

細胞内のアミノ酸の酸化も非可逆的変化ではなく、thiol の disulfide への酸化や methionine の sulfoxide への酸化は GSH transhydrogenase により thiol, methionine にもどる。

GSH や SH compound の methionine, cysteine, n-acetylcysteine などは Px, transferase, transhydrogenase の抗酸化作用に必要であるが、GSSG の細胞内濃度が高いと酵素を不活性化するため、細胞内の GSH/GSSG 比の適性を保持が重要である。

以上の他 FR と反応する糖質、不飽和脂肪酸、不飽和アミノ酸、urate は消去剤となる。合成物としては dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl thiourea (DMTU) などがある。Mannitol, formate, DMSO, VE, VC, β -carotene, urate, thiol は一種以上の FR と反応する。

活性酸素と酸素中毒の関係

酸素中毒として臨床的に問題となるのは大気圧下での高分圧酸素吸入による肺組織障害と高気圧酸素下での中枢神経系 (CNS) 障害である。酸素中毒の発生機序については、放射線障害と同一機序によると考えた Gershan (1954) に始まるフリーラジカル説がある。酸素分圧上昇による ROS の発生が防御系の能力を越えて増加することが主因と考える説である。これを裏づける事実が証明されるようになったのは McCord と Fridovich による SOD の発見 (1969) 以後のことである¹⁷⁾¹⁸⁾。

1. 高分圧酸素下での活性酸素発生増加²⁾

ラットの肺組織で電子伝達系の自動酸化による O_2 と H_2O_2 の発生をみると O_2 濃度と相関して増加する。肺細胞内構成要素であるミトコンドリア、ミクロゾーム、核膜¹⁹⁾でも同様に O_2 濃度に比例して活性酸素の発生増加がみられる。前述した可溶性小分子や酵素による O_2 発生も O_2 濃度と相関する。肺の還流実験によると高気圧酸素下で GSSG の流出と過酸化脂質が相関している²⁰⁾。大気圧下で 100% O_2 に 48 時間暴露すると肺障害が起こる前に過酸化脂質が 2 倍になるとの報告もある。

高気圧酸素 (4-5ATA) に暴露したラットやマウスの脳組織で過酸化脂質の増加が測定されている。脳細胞膜の過酸化脂質の増加により浸透圧が上昇し、細胞内より K^+ が細胞外に漏出し、 K^+ の蓄積により痙攣が起ると推察されているが、痙攣発作の機序についてはまだ定説がない。高気圧酸素による CNS の生化学的変化については、細胞内酵素の不活性化、過酸化脂質の増加、 γ -aminobutyric acid (GABA) の減少、ミトコンドリア呼吸の低下などが報告されている¹⁸⁾。多くの報告で高気圧酸素による痙攣は脳組織での過酸化脂質と関連している。

脳皮質片での過酸化脂質は O_2 分圧依存性で、 $Na^+-K^+-ATPase$ の抑制とも関連している²¹⁾²²⁾。更に Fe^{2+} が存在すると過酸化脂質の増加が促進される。アミノトリアゾール存在下では H_2O_2 により内因性 Cat が抑制されることから、Cat 活性の低下より H_2O_2 発生がわかる。これを利用して高気圧酸素下 (3ATA 迄) in vivo での H_2O_2 発生を測定すると O_2 分圧に対し直線的に増加する²³⁾。

ここで in vitro と in vivo の実験結果を比較する場合には組織の O_2 分圧を考慮する必要がある。肺胞と脳組織の PO_2 (mmHg) を比較すると空気吸入時には各々 100 と 30、100% O_2 吸入時には 670 と 80 以下、4-5ATA の高気圧酸素下では約 3,000 と 600 以下と報告されており、in vivo では肺組織は他の組織よりも高い O_2 分圧に暴露されている。

更に脳は抗酸化酵素の Cat, GSH-Px の活性と VE/不飽和脂肪酸比が低いとされている。従って組織の O_2 分圧で組織障害を比較すると脳は酸素に対し感受性が高いといえる。

2. 防御系と酸素中毒の関係^{2)~6)}

活性酸素発生増加の重要性を示す状況証拠として抗酸化剤の増量又は枯渇、耐性の発生により高気圧酸素の障害が軽減又は増強されることである。

致死量以下の O_2 (85%) にラットを 7 日間暴露すると 100% O_2 に対して耐性ができるが、この耐性は肺組織内の CuZnSOD, MnSOD の活性増加と一致している。空気吸入により耐性が消失すると SOD 活性も減少する。SOD 活性の上昇が見られないマウス、モルモット、ハムスターでは 100% O_2 に対して耐性ができない²⁴⁾²⁵⁾。肺細胞レベルでも酸素耐性ラットの肺胞上皮細胞で CuZnSOD, MnSOD が増加するが、酵素活性の高い type II 細胞が増加して耐性ができると考えられる。ラットで致死量以下のエトドトキシン前処置をすると抗酸化酵素の活性が上昇し、肺酸素中毒の発生が抑制されている²⁶⁾。この抗酸化酵素の誘導にサイトカイン (tumor necrosis factor, interleukin I) の関与が示唆されている²⁷⁾。これらの結果より抗酸化酵素を投与すると酸素中毒が抑制されることが考えられるが、抗酸化酵素は生体内では循環中の半減期が短く、又高分子のため活性酸素発生場所である細胞内に達せず、予防効果はない。

細胞内の抗酸化酵素の活性を上昇させる方法としては、生体膜モデルである liposome に trap するか polyethylene glycol に結合して投与する方法がある。SOD と Cat を trap した liposome をラットに投与すると 100% 酸素による肺障害が抑制できる²⁸⁾。

更に気管内に直接 SOD 又は Cat liposome や polyethylene glycol に結合させた SOD を注入しても効果がある²⁹⁾³⁰⁾。抗酸化酵素含有 liposome の代わりに赤血球でも効果がある³¹⁾。赤血球内には SOD, Cat, GSH があるからである。GSH や VE の欠乏で酸素中毒が増強されることはよく知られている。しかし正常の場合は投与しても予防効果はない。肺組織の SOD, Cat, GSH-Px 活性の低下をきたす dexamethasone や GSH 低下をきたす diethyl-malate の前処置により肺酸素中毒は増強されている。GSH-Px の機能に必要である selenium や GSH の減少を伴う cysteine の欠乏も肺障害を増強させる。

CNS の酸素中毒に関しては、SOD と Cat を

trapした liposome をラットに静注すると 6ATA 酸素下の痙攣発作に対して抑制効果がある³²⁾。又 diethyl-malate で組織の GSH を低下させると CNS の酸素中毒が増強される³³⁾。これらの結果は H₂O₂ の関与を示唆するが、更に monoamine oxidase (MAO) inhibitor (pargyline) により CNS の酸素中毒が抑制されることから、カテコールアミンの酸化による細胞内 H₂O₂ 発生が重要との報告もされている³⁴⁾。

これらの狭義の ROS のみでなく他の ROS として nitric oxide (NO) の重要性が最近報告されている³⁵⁾。脳の細胞外 SOD を増加させた transgenic マウスを使用した実験で、6ATA の高分圧酸素下で死亡率が高く、細胞外 SOD と CuZnSOD を抑制する diethyldithiocarbamate で耐性が出来ることから、O₂ が CNS の酸素中毒を抑制する結果を得ている。さらに NO inhibitor (N-nitro-L-arginine) が抑制効果があることから、細胞外 SOD は“O₂ による NO の不活性化を抑制”することにより CNS の酸素中毒を増強させたと考えられる。我々の最近の実験結果も H₂O₂ と NO の関与が考えられたが、消去系を使用する実験は色々の因子の関与を考慮する必要がある。直接生体内での ROS, FR の測定が困難なことが問題である。

おわりに

以上活性酸素とフリー・ラジカルの発生、反応、消去系について述べたが、生体内反応を考える場合は活性酸素とフリーラジカルが消去系自体にも影響を与えることや、活性酸素とフリーラジカルの発生部位と消去系の局在などを考慮することが重要である。

【参 考 文 献】

- 1) 田村守, 植木修: 細胞内酸素濃度とその制御—酸素勾配—. 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦編; 活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構—, 共立出版, 東京, 1988, p203-209
- 2) 湯佐祚子, Freeman BA, Crapo JD: 高酸素症による細胞内活性酸素の発生増加と抗酸化酵素による抑制. 麻酔 33:1300-1309, 1984
- 3) 湯佐祚子: Free radical の生成と防御系—肺障害との関連—. 呼吸 7:644-651, 1988
- 4) 湯佐祚子: Free Radical Scavenger と肺炎患. 太田保世, 諏訪邦夫, 堀江孝至, 吉村博邦編; Annual Review 呼吸器1988, 中外医学社, 東京, 1988, p79-87
- 5) 湯佐祚子: 酸素中毒の発生機序—活性酸素の発生増加—. 臨床麻酔 14:61-67, 1990
- 6) 湯佐祚子: 酸素中毒. 日高圧医誌 26:191-199, 1991
- 7) 斎藤烈, 松郷誠一: 活性酸素の化学. 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦編; 活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構—, 共立出版, 東京, 1988, p13-25
- 8) 二木鋭雄: 活性酸素とは何か. 二木鋭雄, 島崎弘幸編; 活性酸素—医学・生物学・医学—, 医歯薬出版, 東京, 1987, p1-32
- 9) 浅田浩二: 活性酸素. 浅田浩二, 中野稔, 柿沼カツ子編; 活性酸素測定マニュアル, 講談社, 東京, 1992, p1-7
- 10) 中野稔, 松浦輝男, 二木鋭雄, 吉川敏一編: スーパーオキシド, 医歯薬出版, 東京, 1990
- 11) 浅田浩二: 活性酸素の生成. 二木鋭雄, 島崎弘幸編; 活性酸素—医学・生物学・医学—, 医歯薬出版, 東京, 1987, p33-63
- 12) 中野稔: フリーラジカルをめぐる用語の概念と定義. 日本臨牀 46:2117-2124, 1988
- 13) 中野稔: 活性酸素の生成と測定法の概要. 浅田浩二, 中野稔, 柿沼カツ子編; 活性酸素測定マニュアル, 講談社, 東京, 1992, p8-31
- 14) Freeman BA, Crapo JD: Biology of Disease: Free radical and tissue injury. Lab Invest 47:412-416, 1982
- 15) 竹重公一郎, 水上茂樹: 殺菌. 二木鋭雄, 島崎弘幸編; 活性酸素—医学・生物学・医学—, 医歯薬出版, 東京, 1987, p302-317
- 16) 中野稔: 活性酸素の消去. 二木鋭雄, 島崎弘幸編; 活性酸素—医学・生物学・医学—, 医歯薬出版, 東京, 1987, p64-85
- 17) Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO: Biology of Disease; Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. Lab Invest 73:3-19, 1995
- 18) Jamieson D: Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. Free Radical Biol Med 7:87-108, 1989
- 19) Yusa T, Crapo JD, Freeman BA: Hyperoxia enhances lung and liver nuclear superoxide generation. Biochim Biophys Acta 798:167-174, 1984
- 20) Nishiki K, Jamieson DD, Oshino N, Chance B: Oxygen toxicity in the perfused rat liver and lung under hyperbaric conditions. Biochem J 160:343-355, 1976
- 21) Dirks CD, Faiman MD: Free radical formation and lipid peroxidation in rat and mouse cerebral cortex slices exposed to high oxygen

- pressure. *Brain Res* 248:355-360, 1982
- 22) Kovachich GB, Mishra OP: partial inactivation of Na^+ , K^+ -ATPase in cortical brain slices incubated in normal Krebs Ringer phosphate medium at 1 and 10 atm oxygen pressures. *J Neurochem* 36:333-335, 1981
 - 23) Yusa T, Beckman JS, Crapo JD, Freeman BA: Hyperoxia increases H_2O_2 production by brain in vivo. *J Appl Physiol* 63:353-358, 1987
 - 24) Crapo JD, Tierney DF: Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 226:1401-1407, 1974
 - 25) Crapo JD, McCord JM: Oxygen-induced changes in pulmonary superoxide dismutase assayed by antibody titration. *Am J Physiol* 231:1196-1203, 1976
 - 26) Frank L, Summervill J, Massaro D: Protection from oxygen toxicity with endotoxin. Role of the endogenous antioxidant enzymes of the lung. *J Clin Invest* 65:1104-1110, 1980
 - 27) Berg JT, Allison RC, Prasad VR, Taylor AE: Endotoxin protection of rats from pulmonary oxygen toxicity; possible cytokine involvement. *J Appl Physiol* 68:549-553, 1990
 - 28) Freeman BA, Turrens JF, Mirza Z, Crapo JD, Young ST: Modulation of oxidant lung injury by using liposome-entrapped superoxide dismutase and catalase. *Fed Proc* 44:2591-2595, 1985
 - 29) Padmanabhan RV, Gudapaty R, Liener IE, Schwartz BA, Hoidal JR: Protection against pulmonary oxygen toxicity in rats by the intratracheal administration of liposome-encapsulated superoxide dismutase or catalase. *Am Rev Respir Dis* 132:164-167, 1985
 - 30) Tang G, White J, Gordon RJ, Lumb PD, Tsan MF: Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase protects rats against oxygen toxicity. *J Appl Physiol* 74:1425-1431, 1993
 - 31) VanAsbeck S, Hoidal J, Vercellotte GM, Schwartz B, Moldow C, Jacob H: Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes. Role of red cell glutathione. *Science* 227:756-759, 1985
 - 32) Yusa T, Crapo JD, Freeman BA: Liposome-mediated augmentation of brain SOD and catalase inhibits CNS O_2 toxicity. *J Appl Physiol* 57:1674-1681, 1984
 - 33) Weber CA, Duncan CA, Lyons MJ, Jenkinson SG: Depletion of tissue glutathione with diethyl maleate enhances hyperbaric oxygen toxicity. *Am J Physiol* 258:L308-L312, 1990
 - 34) Zhang J, Piantadosi CA: Prevention of H_2O_2 generation by monoamine oxidase protects against CNS O_2 toxicity. *J Appl Physiol* 71:1057-1061, 1991
 - 35) Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, Crapo JD: Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O_2 toxicity. *Proc Natl Acad Sci* 89:9715-9719, 1992