薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (3) 221-226 (1981)

四塩化炭素投与ラット肝における過酸化脂質とチオバルビツール酸
(TBA) 値についての一考察¹⁾

三原 翠,* 内山 充
国立衛生試験所

Evaluation of Thiobarbituric Acid (TBA) Value as an Index of Lipid
Peroxidation in CCl₄-Intoxicated Rat Liver

MIDORI MIHARA* and MITSURU UCHIYAMA
National Institute of Hygienic Sciences, 18-1, Kamiyoga
1-chome, Setagaya-ku, Tokyo

(Received September 16, 1980)

2-Thiobarbituric acid (TBA) values obtained by 1% H₃PO₄ method which is applicable to whole tissue homogenate (*Anal. Biochem.* 86, 271 (1978)) were further evaluated by using highly peroxidized CCl₄-intoxicated rat liver homogenate along with the control one.

Both homogenates were fractionated by three manners: Trichloroacetic acid treatment to yield supernatant and acid-insoluble precipitate; chloroform-methanol extraction to obtain lipid, water soluble and residual fractions; and 105000×g ultracentrifugation to make supernatant and pellet fractions.

Of all fractions were measured conjugated diene and peroxide values besides TBA values and a good similarity of indices was obtained. However, the sum of the TBA value of each fraction was far smaller than that of original whole homogenate in CCl₄-intoxicated rat, while the sum was rather bigger than original value in the case of normal rat, irrespective to the method of fractionation.

Since the color development of TBA reaction is strongly affected by various cell components, it is likely that 1% H₃PO₄ method applied to whole homogenate does not give only the existing amount of TBA-reactive substances, but can represent the combined status of tissue peroxidation including several antioxidative and prooxidative factors located in other compartments from extracted lipid.

Keywords—thiobarbiturate; TBA value; lipid peroxidn; lipoperoxide; conjugated diene; peroxide value; antioxidant; carbon tetrachloride liver peroxidn

緒 言

近年生体内における脂質過酸化物が多くの病因（血栓症,²⁾ 心臓病,³⁾ 未熟児網膜症等⁴⁾）や、老化⁵⁾ の原因になっていると考えられ注目を集めている。事実、動脈硬化を起した血管壁には脂質過酸化物が付着していることが報告され、⁶⁾ また未熟児に吸入させる酸素濃度が高くなると血液中の TBA 値が高くなることも知られている。⁴⁾ そして今後も臨床化学的に疾病と脂質過酸化との関連を求める研究が数多く行われることになるだろう。

ところで、不飽和脂肪酸の酸化反応は、フリーラジカル生成とそれに伴う共役ジエン化から始まって、酸素が付加してヒドロパーオキシド、エンドパーオキシドを生じ、さらにアルデヒド・ケトン類へと分解しあるいは重合して、種々の生成物を生じる反応の連続である。そのため脂質過酸化物の測定は各反応段階の生成物をそれぞれ別個に測定するいくつかの方法、たとえば過酸化物質価 (POV),⁷⁾ 共役ジエン量,⁸⁾ 短鎖アルカン,⁹⁾ リポフスチン色素,¹⁰⁾ TBA 値¹¹⁾ などを併用して用いているのが現状であり、¹²⁾ 決定的な最良の方法は見出されていない。また各反応段階の生成物は、それぞれ生成量や生成時期が互に同一ではないので、同じ試料についての各指標の変化は一致しないことが多い。

これまで過酸化脂質指標の中で、組織内脂質の過酸化を表わすのに臨床面で最も広く用いられているものは TBA 値である。¹³⁾ これは試料の前処理を含めて発色に至る操作が比較的簡便であることと、感度が高いことによる。

われわれはさきに生体組織中の過酸化脂質が TBA と反応する際生じる呈色度に強い pH 依存性のあることを見出し、pH 2 付近で最も良く反応することを報告した。^{11b)} そして従来用いられてきた呈色時の媒体、たとえばトリクロル酢酸 (TCA) などに代えて、1%リン酸を用いる方法を確立した。以下この方法を 1%リン酸法と呼ぶ。この 1%リン酸法によって、組織ホモジネート全体について得られる TBA 値は、脂質の過酸化を高めると古くからいわれていた種々の生体変化、たとえば四塩化炭素 (CCl_4) 中毒、老化、ビタミン E 欠乏症などによく平行して増加することが確認されている。¹⁴⁾

本報告においては、1%リン酸法によって組織ホモジネート全体の示す TBA 値の変化の起源を解明するため、ホモジネートを蛋白沈殿剤によって沈殿と上清に、あるいは有機溶媒によって脂質部と水溶液部と残査に、それぞれ分画した場合の、各分画の示す TBA 値と他の過酸化脂質指標 (共役ジエン量, POV) との比較を行った。過酸化を高めた試料としては、 CCl_4 投与ラットの肝臓を用いた。

実 験 の 部

動物とその処理 ウィスター系雄性ラット 6 週令を用い、自由にエサと水を与え、測定開始の 24 時間前に CCl_4 を胃ゾンデで、体重 100 g 当り 0.4 ml を投与した。 CCl_4 は特級品を蒸留して用いた。ラットは断頭後すみやかに肝臓を取り出し、冷 1.15% KCl にて脱血後細切し、1.15% KCl にて 10% ホモジネートとした。

ホモジネートの分画 1) TCA 処理——10% ホモジネート 0.5 ml に 10% TCA 2 ml を加えかくはん後、3000 rpm 10 分間遠心分離を行う。分離後上層をデカンテーションあるいは必要に応じてろ過を行い TCA 上清とし、沈殿部は静かに水を加えて表面を洗った後、1%リン酸法による TBA 法を行う。

2) 溶媒分画——10% ホモジネート 0.5 ml に CHCl_3 -MeOH (2:1) 4 ml を加えて空気を窒素で置換した後よくかくはんし、その後時々かくはんしながら 10 分間放置する。その後水 2 ml を加えてさらにかくはん後、3000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、 CHCl_3 層を毛細管ピペットでとり、少量の芒硝を入れた乾燥ろ紙でろ過する。 CHCl_3 層は、窒素気流中 30° 以下で濃縮乾固し抽出脂質とする。残部は水層と固型蛋白性残査にわけける。

POV 測定用油脂は、10% ホモジネート 2 ml に CHCl_3 -MeOH (2:1) 7 ml を加え、10 分間放置しながら時々かくはんし、その後遠心分離を行い以下上記と同様に操作する。

3) 遠心分画——10% ホモジネートを 105000 g で 60 分間遠心分画を行い、上清はそのまま各測定に用い沈殿部は 1 回洗滌後元の容量となるように、1.15% KCl を加えて再懸濁させる。

各種の測定法 1) 共役ジエン量——10% ホモジネート 0.5 ml 相当の脂質抽出物を吸収スペクトル用 n -ヘプタン 3 ml に溶解し、233 nm の吸光度を測定する。

2) POV の測定——10% ホモジネート 2 ml 相当脂質抽出物について、Swoboda らの方法^{7b)} を 1 部改変して行った。すなわち CHCl_3 -酢酸 (2:3) 3 ml に脂質を溶解後、キャピラリーで窒素を十分導入し (約 30 秒間)、窒素気流中で飽和 KI 2 滴を加えてすばやく栓をし、よくかくはん後窒素下暗所に 30 分間以上放置する。その後 5% $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 5 ml をすばやく加えよくかくはん後遠心分離し、上層を 353 nm で吸光度を測定する。空試験を必ず行い測定値からさしひく。検量線は滴定法^{7a)} で POV を測定した *tert*-ブチルヒドロパーオキシドを用い、滴定に使用したときの濃度の 1000 倍に薄めたものを用いて作成する。

3) TBA 値の測定——ホモジネート全体および TCA 沈殿部、溶媒抽出後の蛋白性残査は、前報^{11b)} に準じて 1%リン酸法で測定する。TCA 上清部および CHCl_3 -MeOH 抽出後の水層部分は、そのまま 0.6% TBA 1 ml を加えて発色させ 4 ml 当りの吸光度を求めマロンアルデヒド (MA) 量として表わす。抽出脂質の TBA 値は八木らの方法¹⁵⁾ に準じ次のように行った。すなわちホモジネート 0.5 ml に相当する脂質に 20% 酢酸-NaOH (pH 3.5) 2.5 ml, 7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 0.5 ml, 0.6% TBA 1 ml を加え 95° で 45 分間加熱後、532—520 nm の 2 波長吸光度差を測定し MA 量として表わした。

4) 脂質および蛋白質量——総脂質は重量法で、蛋白質は Lowry 法¹⁶⁾ の方法で測定した。

実 験 結 果

TCA 分画、溶媒分画による検討

Table I は CCl_4 投与によっておこる肝の脂質過酸化の変化を、ホモジネート全体および種々の方法で分画し

TABLE I. Comparison of Lipid Peroxide Indices in CCl_4 -Intoxicated Rat Liver Homogenate^{a)} and Its Fraction

		T B A Value nmol/0.05 g wet weight					POV nmol/ 0.05 g	Conj. Diene nmol/0.05 g
Whole		TCA Fractionation ^{b)}		Solvent Fractionation ^{c)}				
		Super.	Precip.	Lipid	Protein	Water Sol.		
Control	2.6 ^{d)} ± 0.3	0.1 ± 0	3.3 ± 0.3	5.2 ± 0.8	0.3 ± 0	0.3 ± 0.3	2.1 ± 0.2	18.3 ± 1.7
CCl ₄	39.7 ± 0.8	0.2 ± 0.1	9.3 ± 2.3	6.5 ± 0.1	0.3 ± 0	0.5 ± 0	4.5 ± 0.1	41.1 ± 4.1
Increment Ratio %	1527	200	282	125	100	167	202	225

a) 6-to7-week-old rats were used. CCl_4 was given orally at a dose of 0.4 ml per 100 g. The rats were killed 24 hr after administration. Liver were homogenized with 1.15% KCl solution to make a 10% homogenate.

b) The TCA fractions were prepared from 0.5 ml of 10% liver homogenate by adding 2 ml of 10% TCA solution and centrifuging for 10 min at 3000 rpm. The precipitate was washed with water and put into 1% H_3PO_4 -TBA method.^{11b)} The supernatant was served directly to the TBA reaction with 1 ml of 0.6% TBA.

c) The solvent fractions were performed by extracting homogenate with CHCl_3 -MeOH (2:1) and centrifuge for 10 min at 3000 rpm. Lipid fraction was offered as specimen for POV and conjugated diene measurement.

d) All values are expressed as mean values ± s.d. obtained from 3 individual animals.

た画分について TBA 法で測定したものである。単位は肝湿重量 50 mg 当りの過酸化物のモル数、すなわち MA 量で表わしてある。

表から明らかなように各 TBA 値は CCl_4 投与によって値が増加する点は一致しているが、その増加率はそれぞれ異なっている。1%リン酸法によるホモジネート全体の TBA 値が最も顕著な増加を示しており、次に TCA 沈殿部の TBA 値であり、抽出した脂質では増加率は低くなっている。次に TCA あるいは溶媒分画した各画分の示す TBA 値とその総和さらに全ホモジネートの示す TBA 値とを比較してみると、コントロールにおいては全ホモジネートの値は、TCA 沈殿部、抽出脂質部よりもむしろ小さな値を示し、 CCl_4 投与後の肝では反対にホモジネートのまま測定した方がはるかに大きな値となっている。これは正常状態においては細胞の脂質以外の部分に TBA 反応抑制因子が存在しているため、全ホモジネートのまま測定すると脂質の示す TBA 値よりも小さくなり、 CCl_4 投与後の肝ではこの抑制因子の減少と共に促進因子の増加が起ったため、脂質を分離して測定した場合の TBA 値よりもホモジネート全体として測定した際の TBA 値は増加したのではないかと考えられ、今後検討を要する。

すなわちこれらの結果よりホモジネート全体を用いて得られる TBA 値は、実際に *in vivo* の状態で生成している過酸化脂質量をそのまま測定しているのではなく、細胞内の調節因子を含めた全体としての脂質過酸化の傾向を測定していると思われる。これを確かめるために抽出脂質について POV と共役ジエン量を測定したところ、抽出脂質の TBA 値あるいは蛋白沈殿物中の TBA 値よりも、モル数換算ではやや高い値が得られた。TBA 値が他の指標に比べ低い値を与えることは既に報告¹⁵⁾ もあり、脂質過酸化物のすべてが TBA 反応物質になるのではないといわれているところから、このような結果は理解できる。したがって CCl_4 投与による増加率が 1%リン酸法によるホモジネート全体の TBA 値で測定すると極めて大きいことの理由として、上記過酸化抑制因子、促進因子の存在を推定せざるをえない。

105000 × g 分画による過酸化脂質の変化

Table II はホモジネートを 105000 × g で遠心分離し分離した上清と沈殿部についてそれぞれ TBA 値、POV、共役ジエンを測定し過酸化脂質の生成部位と各種因子の存在を調べたものである。

遠心分画をすると分画前の全ホモジネートで得られた TBA 値に比べ、上清と沈殿の示す TBA 値を合わせても TBA 値は低くなり、先に示した TCA 分画に見られた現象と似た様相となっている。POV、共役ジエン量では遠心分画をしない場合のホモジネートについて得られた値と同様の傾向であった。また 105000 × g 上清中の過酸化脂質量が CCl_4 投与によって増加しているようにみえるため、Table II の湿重量当りを脂質量当りに表わしてみたところ、Table III のようになった。

表より 105000 × g 上清中の増加はいずれも脂質総量の増加に由来しており、脂質量当りの過酸化脂質の増加

TABLE II. Comparison of Lipid Peroxide Indices in Control and CCl₄-Intoxicated Rat Liver Centrifugal Fractions^{a)}

	TBA Value nmol/0.05 g						POV nmol/0.05 g		Conj. Diene nmol/0.05 g	
	105000 g Supernatant			105000 g Precipitate			105000 g Sup.	Precip.	105000 g Sup.	Precip.
	Whole	Lipid	Protein	Whole	Lipid	Protein				
Control	0.4 ^{b)} ±0.4	0.1 ±0.1	0.1 ±0	2.1 ±0.4	1.7 ±0.2	0.3 ±0.1	1.5 ±0.2	1.8 ±0.1	6.8 ±0.5	14.2 ±0.7
CCl ₄	3.0 ±1.0	0.3 ±0.1	0	6.0 ±0.3	1.8 ±0.2	0.2 ±0	1.5 ±0.1	3.5 ±0.3	14.9 ±1.9	15.8 ±0.7

a) Fractionations were performed by centrifuging for 60 min at 105000 g.

b) Values are expressed as means values ± s.d. obtained from 3 independent determinations.

TABLE III. Comparison of Lipid Peroxide Indices per Lipid in Control and CCl₄-Intoxicated Rat

	TBA Value nmol/mg			POV nmol/mg		Conj. Diene nmol/mg	
	Whole	105000 g Sup.	Precip.	105000 g Sup.	Precip.	105000 g Sup.	Precip.
Control	2.1	3.5	1.9	13.0	1.7	60.0	13.2
CCl ₄	23.5	2.0	2.9	1.0	3.7	10.2	16.8
Increment Ratio %	1107	58	151	8	218	17	127

TABLE IV. Effect of Various Agents added the Heating Step of TBA Reaction

Agent	Conc. (mm)	Tissue % ^{a)}	Lipid % ^{b)}	MA % ^{c)}
Ascorbate	1	56	69	98
	0.1	87	108	—
GSH	1	90	121	101
	0.1	105	122	—
Tocopherol	1	56	17	99
	0.1	53	22	—
	0.01	75	95	—
BHT	0.1	62	18	99
	0.01	101	99	—
FeCl ₂	0.1	220	160	101
	0.01	121	143	—
FeCl ₃	0.1	284	151	101
	0.01	112	132	—

a) The reaction mixture consists of 0.5 ml of 10% tissue homogenate, 3 ml of 1% H₃PO₄, 1 ml of 0.6% TBA and 0.5 ml of various agents.

b) The reaction mixture consists of 0.2 ml of extracted lipid, 2.8 ml of 20% CH₃COOH-NaOH (pH 3.5), 0.5 ml of 7% SDS, 0.6% TBA 1 ml and 0.5 ml of agents.

c) The reaction mixture consists of 8.5 nmol of malonaldehyde, 2 ml of 10% TCA, 1 ml of 0.6% TBA and 0.5 ml of agents.

は膜構造部分 (105000×g 沈殿部) にのみ見られることがわかった。以上の結果よりホモジネート全体で測定した時の TBA 値の急激な増加は、膜構造部の過酸化脂質の生成に加え上清中に急増した脂質を原料として、起った現象と考えられる。

TBA 反応時の生体成分の効果

次に抽出脂質画分以外の部分の TBA 反応に影響する因子を知るため、過酸化抑制・促進作用が知られている生体成分を取りあげ、組織ホモジネート、組織から抽出した脂質および MA の3者それぞれの TBA 反応時に

及ぼす影響について検討した。

Table IV から明らかなように、各化合物は一樣に脂質に作用しているのではなく、MA 自身と TBA との反応には、ほとんどの化合物も影響を与えていないのに、脂質と TBA との反応には種々の影響を与えている。しかもホモジネートの状態すなわち蛋白結合物中の脂質と抽出脂質そのものとも傾向が異なる。例えばトコフェロールでは脂質単独では濃度に強く依存した抑制作用を示すのに、組織中の脂質に対しては濃度に依存せず、少量でもかなり抑制する代りに多量に存在していてもそれ程強い抑制力を示さない。これは生体中におけるトコフェロールの効果発現の実態を反映しているようでもあり興味深い。一方鉄の促進作用は反対に組織中では濃度に強く依存し、脂質単独ではあまり濃度に依存しないで促進作用を示している。BHT は生体成分ではないが抗酸化作用の一分野でトコフェロールを代替できる場合¹⁷⁾があるため検討したところ、脂質単独ではトコフェロールと同等の抑制作用を示したが、組織中の脂質に対してはトコフェロールより弱い抑制作用であった。

考 察

生体組織中の脂質過酸化物の測定法として TBA 法は繁用されているにもかかわらず、測定条件が統一されていないため報告者によってまちまちの結果がえられており、CCl₄ 投与についても、MA の生成が認められる¹⁸⁾というものと認められない¹⁹⁾というものの両報告がある。ところが我々がさきに報告したように、1%リン酸法による TBA 法では顕著に CCl₄ 投与肝の TBA 値が高まるばかりでなく、加齢による増加、ビタミン E 欠乏症による増加等、従来過酸化脂質が原因とされている病態とよく一致した結果¹⁴⁾となる。

しかし TBA 法は加熱することで反応が進むため、生成した TBA 反応陽性物質が必ずしも内因性の脂質過酸化物ではないのではないかという疑問が常に付随している。それ故今回は他の過酸化脂質測定法と併用したり、あるいは種々に分別した組織ホモジネートの TBA 値を測定し比較検討した。その結果ホモジネート全体を用いた場合の TBA 値は生体中の酸化抑制因子、促進因子をすべて含めた脂質の状態を表わすことが判った。すでに CCl₄ 投与ラットにグルタチオンやアスコルビン酸を投与すると毒性発現が軽減されることは報告されており、²⁰⁾モルモットではあるが CCl₄ 投与肝中に非ヘム鉄が増加するという報告²¹⁾もある。これらの事実は Table IV の傾向を裏づけるものと考ええる。また TBA 値の増加には脂質量の増加も関与している可能性が考えられるが、単に脂質量の増加のみが TBA 値の増加をもたらすものではないことは、105000×g 上清のみの値をみることで明らかである。すなわち 105000×g 沈殿物中にあると思われる過酸化脂質や過酸化促進因子と脂質の共存が、より大きい TBA 値をもたらすと思われる。

次にいくつかの異なった指標によって示される過酸化脂質のモル数を相互に比較すると、ホモジネート全体の TBA 値を除外すれば共役ジエンとして表わされたものが最も高く、次に POV, TBA 値となる傾向にある。共役ジエンが最も高くなる理由としては、過酸化の初期の反応であることと、測定法が 233 nm の吸光度測定であるため、共役ジエン以外の吸収の影響を受けやすいことが考えられる。

また共役ジエン、POV が比較的高いことはヒドロパーオキシド生成までは、生体機能上起りやすい機構であることを示しているのかもしれない。すなわち生成したヒドロパーオキシドは通常直ちにグルタチオンパーオキシダーゼ等で分解されるので、さらに進んだ段階の過酸化脂質を生成しにくくなっていることも考えられる。

一方 Table V で示すように CCl₄ 投与後の肝の共役ジエンの増加は投与 24 時間後ではすでに 1.5 時間後より減少する傾向にあり、共役ジエンは過酸化の初期に増大することがわかる。

TBA 値は反対に 24 時間後の方が大きく、共役ジエンとは異なった脂質過酸化の段階を表わしているのは明らかである。

また生体中に遊離で存在する MA は TCA 上清あるいは CHCl₃-MeOH 抽出後の水層の TBA 値として表わされるが、Table I のように組織中にはほとんど存在していない。したがって TBA と反応して呈色する物質は MA にまで分解する以前の過酸化脂質であり、MA 前駆物質とも呼ぶべきものと思われる。MA 前駆物質がヒドロパーオキシドそのものかあるいはさらに酸化されたものなのかは諸説^{14), 22)}あり、今後の検討が必要である。

以上を総括すると生体中の過酸化脂質測定は 2 種類の方法に大別されよう。1 つは脂質を抽出して POV, 共役

TABLE V. The Effect of CCl_4 Administration on TBA Values for Liver Homogenate Determined by the 1% H_3PO_4 Method and Conjugated Diene Method

	TBA Value nmol/0.05 g	Conjugated Diene $\Delta E_{1\text{cm}}^{0.1\%}$	
		9000 g pellet	105000 g pellet
Control	4.6 ± 1.5^a	—	—
CCl_4 1.5 hr.	15.4 ± 3.8	0.116 ± 0.064	0.170 ± 0.032
24 hr.	44.0 ± 8.3	0.039 ± 0.008	0.118 ± 0.021

a) Values represent the average of 3-5 independent determinations. Standard deviation are indicated.

ジエン量, TBA 値を測定する古典的な方法であり, もう一つは脂質を抽出せず組織ホモジネートのままで測定する方法である. 脂質を抽出する方法はある程度抽出過程中的酸化を防ぎきれないが, 過酸化脂質量を比較的よく反映していると考えられる. 一方 1%リン酸法に代表される全ホモジネートを用いる方法は, 脂質と共存する酸化抑制あるいは促進因子の影響をうけ, その場に存在する過酸化脂質だけでなく, 今後起りうる生体の変化を予測する形で TBA 値を表わす. したがってこれは過酸化脂質というよりも生体の過酸化傾向を表わす方法といえる. 従来両者の違いを無視して種々の過酸化脂質の測定が行われ議論されてきたが, 今後はこのような視点に立つことによって過酸化脂質をめぐる諸問題も解決に一步近づくものと思う.

謝辞 本研究は文部省環境科学特別研究補助金(課題番号 503077)によって行われたものであり深謝致します.

引用文献および注

- 1) 第3回日本過酸化脂質研究会で発表, 大阪, 1979年10月.
- 2) 大熊 稔, 最新医学, **33**, 696 (1978).
- 3) 五島雄一郎, 最新医学, **33**, 691 (1978).
- 4) 八木国夫, 最新医学, **33**, 726 (1978).
- 5) 原 一郎, 島崎弘幸, 化学と工業, **32**, 37 (1979); A.S. Csilany, K.L. Ayaz, Le-ChuSu, *J. Nutr.*, **107**, 1792 (1977).
- 6) S. Aoyama, M. Iwakami, *Jap. Heart J.*, **6**, 128 (1965).
- 7) 衛生試験法, 日本薬学会編, 金原, 東京, 1980, p. 187; P.A.T. Swoboda, C.H. Lea, *Chem. Ind.*, **16**, 1090 (1958).
- 8) R.O. Recknagel, A.K. Ghoshal, *Lab. Invest.*, **15**, 132 (1966).
- 9) 嵯峨井 勝, 生化学, **50**, 1290 (1978).
- 10) B.L. Fletcher, C.C. Dillard, A.L. Tappel, *Anal. Biochem.*, **52**, 1, (1973); A.S. Csilany, K.L. Ayaz, *Lipids*, **11**, 412 (1976).
- 11) a) A. Ottolenghi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **79**, 355 (1959); b) M. Uchiyama, M. Mihara, *Anal. Biochem.*, **86**, 271 (1978).
- 12) 三原 翠, 内山 充, ビタミン, **53**, 365 (1979).
- 13) K. Yagi, *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976).
- 14) M. Mihara, M. Uchiyama, K. Fukuzawa, *Biochem. Med.*, **23**, 302 (1980).
- 15) H. Ohkawa, N. Ohisi, K. Yagi, *J. Lipid Res.*, **19**, 1053 (1978).
- 16) O.H. Lowry, N.J. Rosebough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 17) D. Harman, *Agents and Actions*, **1**, 3 (1969).
- 18) P.J. Jose, T.F. Slater, *Biochem. J.*, **128**, p. 141 (1972).
- 19) R.O. Recknagel, A.K. Ghoshal, *Lab. Invest.*, **15**, 132 (1966).
- 20) N.R. DiLuzio, *Fed. Proc.*, **32**, 1875 (1973).
- 21) 田中英彦, 木本英治, 森重福美, 河野雅弘, 第17回ESR討論会, 岐阜, 1978年10月.
- 22) 天野立爾, 食衛誌, **13**, 293 (1972).