

## 自然老化動物を用いた酸化ストレスの解析と抗老化研究

佐々木 徹

**Analysis of Aging-related Oxidative Stress Status in Normal Aging Animals and Development of Anti-aging Interventions**

Toru SASAKI

*Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology,  
35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan*

(Received August 5, 2009)

Since Harman proposed the “free-radical theory of aging”, oxidative stress is postulated to be a major causal factor of senescence. Accumulation of oxidative stress-induced oxidatively modified macromolecules including protein, DNA, and lipid, were found in tissues during the aging process. However, it is not necessarily clear which factor is more critical for an increase in endogenous reactive oxygen and/or decrease in antioxidative defense, to the age-related increase in oxidative damage. To clarify the production of reactive oxygen increasing with age, we examined reactive oxygen-dependent chemiluminescent (CL) signals in *ex-vivo* brain slices prepared from different aged animal brain during hypoxia-reoxygenation treatment using a novel photonic imaging method. CL signal was intensified during reoxygenation. The signals in SAMP10 (short life strain) and SAMR1 (control) brain slices increased with aging. The slope of increase of CL intensity with age in P10 was steeper than those in R1. Age-dependent increase of CL intensity was also observed in C57BL/6 mouse, Wistar rat, and pigeon. However, SOD activity in brain was not changed with age. These results suggest that reactive oxygen production itself increase with aging. The rate of age-related increase of CL intensity was inversely related to the maximum life span of the animals. We speculate that reactive oxygen may be a kind of signal for aging and its levels in tissue may determine the aging process and life span. To decelerate the age-related increases of reactive oxygen production is expected as a potent strategy for anti-aging interventions.

**Key words**—aging; oxidative stress; life span; brain slices; imaging

## 1. はじめに

これまで老化の分子メカニズムに関する様々な学説が示されてきた。「老化のフリーラジカル説」<sup>1)</sup>は、Harman によって 1956 年に提唱された学説である。事実、生体内分子（タンパク質、脂質、DNA）の酸化修飾物が加齢に伴って増加することが報告されており、この説は有力な学説の 1 つである。<sup>2-11)</sup>「酸化ストレス」とは生体内の酸化と還元バランスの偏った状態と定義され、その指標となる組織の酸化修飾物質濃度は、(1)活性酸素生成、(2)活性酸素消去系、(3)酸化修飾物質修復・分解系の三要因によって決定されると考えられる。しかし、いずれが加

齢に伴って亢進する酸化ストレスの主因であるかはかならずしも明らかではない。

本説では、はじめにわれわれが独自に開発した光-放射線イメージング法<sup>12)</sup>を概説する。その上で、活性酸素の組織レベルが加齢に伴ってどのように変化するのか、われわれの検討した結果をこれまでの報告とともに概説する。さらに、加齢に伴う活性酸素の生成亢進の意味を考察する。

## 2. 組織の活性酸素レベルを評価する新しいイメージング法の開発

生きて機能している組織の代謝や機能を、ポジトロン断層撮像法 (PET) で用いるトレーサで動的に画像化、解析するイメージング法「バイオラジオグラフィ」がサブフェムトモルバイオ認識プロジェクト国際共同研究 (1993-1997 年)<sup>13)</sup>で開発された。この方法は、(1)生組織の代謝や機能を動的に解析できる、(2)生組織の環境を容易に変化させ、その影響を

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所  
老化機構研究チーム (〒173-0015 東京都板橋区栄町  
35-2)

e-mail: tsasaki@center.tmig.or.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S10 で  
発表したものを中心に記述したものである。

解析することができる, (3)血流変化のような個体を対象とする方法論で問題になる事象の影響を受けないという特徴を持ち, インビボとインビトロの間に位置して, 両者の隔たりをつなぐ方法論として期待される. これを使って, 脳組織生切片を対象にした組織の糖代謝,<sup>13-18)</sup> 神経受容体の分布と機能,<sup>19-21)</sup> 神経伝達物質の合成と放出,<sup>13,22,23)</sup> 神経伝達物質の濃度,<sup>21)</sup> ミトコンドリア機能<sup>24,25)</sup>が調べられている.

しかし, バイオラジオグラフィ法で組織生切片上の放射能分布をダイナミックに収集するためには, ラジオルミノグラフィプレートを一定時間毎に交換しなければならない. 筆者らは, シート状固体シンチレータをラジオルミノグラフィプレートの代わりに用い, 放射線により発生した極微弱光を超高感度フォトンカウンティングカメラでリアルタイムに画像収集する方法論「リアルタイムバイオラジオグラフィ法」を考案し (Fig. 1), 東京都老人総合研究所, 大阪市立大学, 東京都産業技術研究所, アロカ㈱との共同研究プロジェクトを開始した. この過程で発見した「試料の光反射率の差異に起因した検出効率に対する影響」の問題は, シンチレータの片面を鏡面とすることで解決できた. 「鏡面シンチレータ」は放射線計測と近年発展のめざましい光技術 (バイオイメージング法) とを融合させた新しい計測法<sup>12)</sup>のヒントとなった (Fig. 1). この着想に基づき, 放射性同位元素と化学発光探索子の共存する標準試料の画像収集を行った. その結果, 鏡面シンチレータを用いることで, 両画像の弁別収集に成功した.

### 3. 活性酸素を評価する分子探索子

活性酸素・フリーラジカルのインビボでの画像化は, 電子スピン共鳴 (ESR) 法を応用した方法が試みられている.<sup>26,27)</sup> 実用的には, 蛍光, 化学発光計測による方法が一般的である. ヒドロエチジン (HEt), ジクロロフルオレセインジアセテート (DCFH) は生細胞, 組織の活性酸素生成の評価に用いられる.<sup>28-30)</sup> DCFHは有機, 無機性過酸化物の非特異的探索子である. パルオキシダーゼ存在の下, 過酸化水素によって酸化され蛍光性 DCF を生ずる. HEt はスーパーオキシドによって酸化され, 蛍光性エチジウムを生ずる.<sup>30,31)</sup> 化学発光探索子は化学構造から 3 系統に分類される (Fig. 2). ルミノール,<sup>32-34)</sup> L-0120,<sup>35)</sup> イソルミノール,<sup>35,36)</sup> ルシゲニン,<sup>37-39)</sup> ウミホタルルシフェリン,<sup>34)</sup> ルシフェリン類縁体 (CLA,<sup>34,40)</sup> MCLA,<sup>41)</sup> MPEC<sup>42)</sup> が一般的に用いられている. 活性酸素の化学発光計測による実験例の多くは, 酵素系や細胞系を対象としたもので, 個体レベルでの実験例 (皮膚, 肝臓, 脳) は限られる.<sup>12,28,39)</sup> 活性酸素と化学発光探索子の反応は酸化反応で, 基本的にはホタルの発光機序であるルシフェリン-ルシフェラーゼ反応と同様である (Fig. 3).<sup>43)</sup> ルシゲニンは酵素, 細胞系<sup>44,45)</sup> 及び脳組織<sup>12,39)</sup> のスーパーオキシドの検出に頻繁に用いられる (Fig. 4). スーパーオキシドの検出には他の化学発光探索子も用いられるが,<sup>32-35,40-42,46)</sup> ルシゲニンの選択性は他の探索子よりも優れている.<sup>44,45)</sup> ルミノールは過酸化水素,<sup>28)</sup> MCLA は一重項酸素とも反応する.<sup>28)</sup> L-0120, MPEC は, スーパーオキシドに対する選択性が改善されている.<sup>35,42)</sup> ルシゲニンは, 塩基性下では過酸化水素と

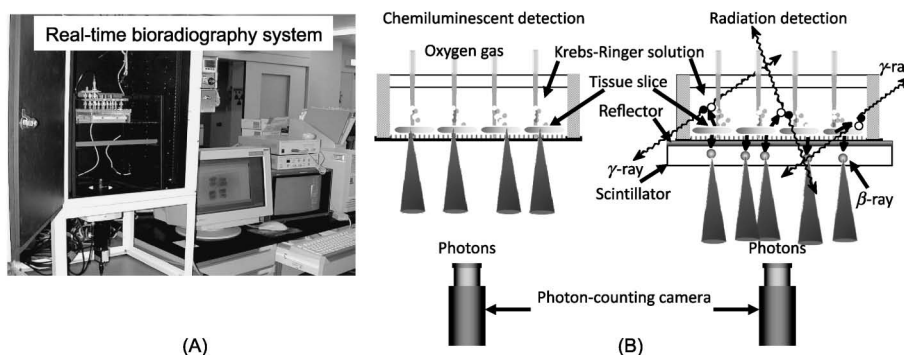


Fig. 1. Schematic of the System (A), and Diagrams Displaying the Combination of Chemiluminescence Detection without a Scintillator (Left) and Radiation Detection with a Reflexible Solid Scintillator (Right) (B)

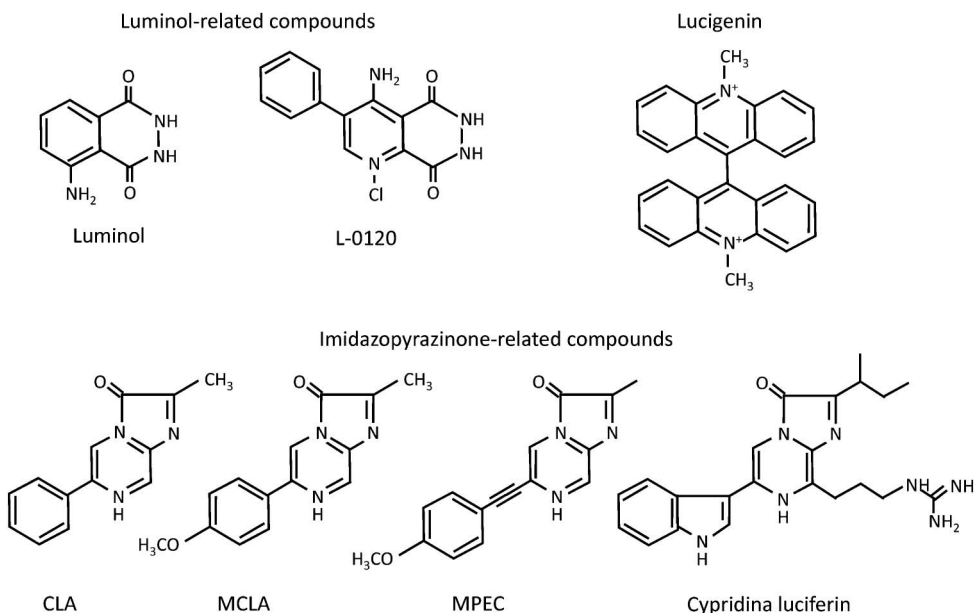


Fig. 2. Chemiluminescent Probes to Determine the Reactive Oxygen

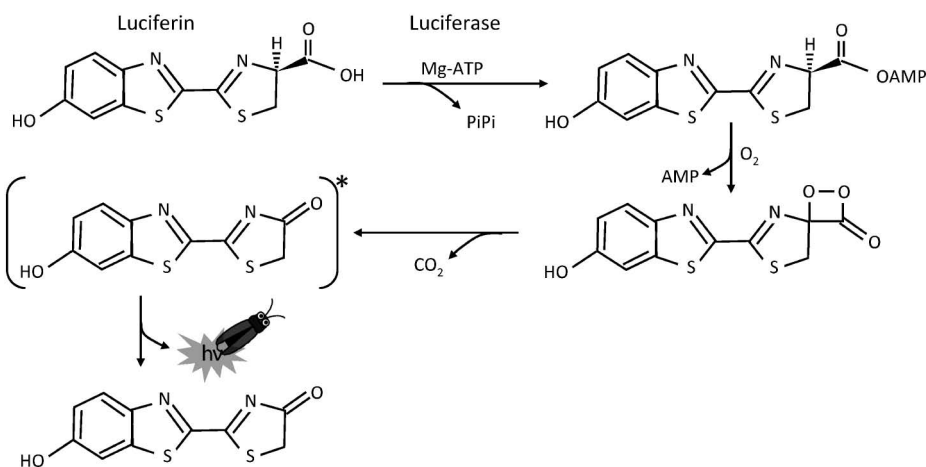


Fig. 3. Chemiluminescent Emission in Firefly Luciferin-luciferase Reaction

も反応する。しかし、生理的 pH 環境ではスーパーオキシドと選択的に反応する。<sup>47,48)</sup> カチオンであるルシゲニンは膜電位蛍光探索子であるローダミン 123 と同様にミトコンドリアに滞留する。<sup>49)</sup> このことから、ルシゲニンがミトコンドリアのスーパーオキシド生成の指標となる。ルシゲニンは生体内のレドックスサイクリングによって酸素からスーパーオキシドを生ずる。これがバックグラウンドレベルの上昇の原因になるとの指摘もある。<sup>45,50)</sup>

#### 4. 脳虚血-再灌流の酸化ストレス分子機序の解明

虚血-再灌流の分子機序解明は、脳、腎、心虚血

の治療法や臓器移植医療の開発に重要である。活性酸素は虚血-再灌流、低酸素-再酸素の細胞傷害機序に重要な役割を果たすと考えられている。<sup>51-53)</sup> 活性酸素の生成機序として、キサンチンオキシダーゼ、<sup>54-57)</sup> ミトコンドリア電子伝達系、<sup>58-60)</sup> シクロオキシゲナーゼ、NADPH オキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ<sup>51,53)</sup> が候補に挙げられる。脳は酸化ストレスに特に脆弱である。体重の 2% の臓器にもかかわらず、吸入した酸素の 20% を消費する。<sup>61)</sup> 活性酸素の標的になる多価不飽和脂肪酸を多く含むが、脳の抗酸化物質、酵素レベルは他の臓器に比べ低い。<sup>62)</sup>

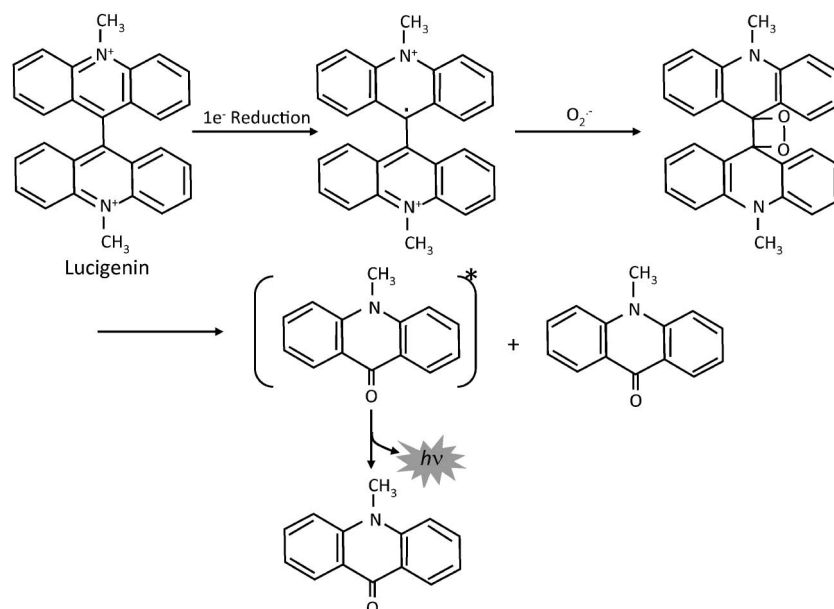


Fig. 4. Determination of Superoxide by Lucigenin-enhanced Chemiluminescence

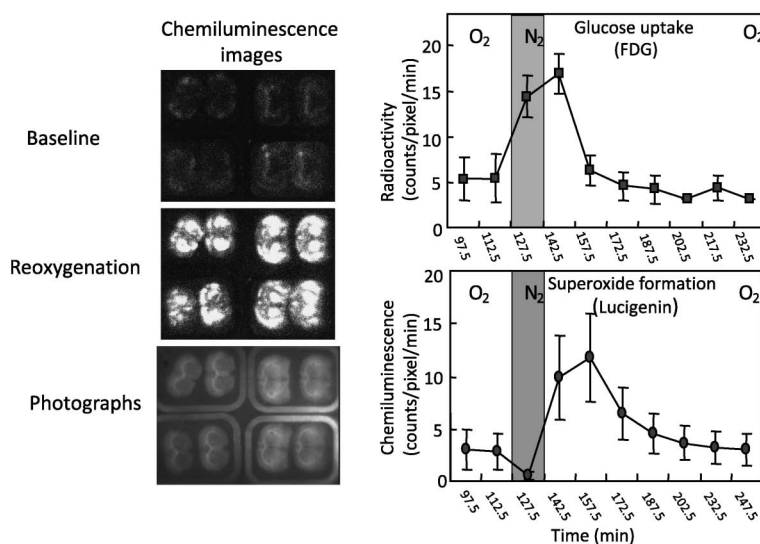


Fig. 5. Changes of Radioactivity and Chemiluminescence Counts in Brain Slices at the Acquisition Time Points after the Start of Incubation with FDG and Lucigenin

筆者らは、虚血-再灌流のモデル実験として、ラット脳生切片を対象に無酸素-再酸素過程におけるスーパーオキシド生成と糖代謝の経時変化を検討した。ラット脳生切片（厚さ  $300\mu\text{m}$ ）をルシゲニン ( $2\text{mM}$ ) あるいは  $[^{18}\text{F}]2\text{-フルオロ}2\text{-デオキシグルコース}$  (FDG) ( $37\text{MBq}$ ) を含むクレブス-リンゲル液中で酸素供給 ( $95\% \text{O}_2/5\% \text{CO}_2$ ) 下、暗箱内 ( $34^\circ\text{C}$ ) で  $165$  分間インキュベートした。  $15$  分間の無酸素 ( $95\% \text{N}_2/5\% \text{CO}_2$ ) 処理ののち、再度酸素供給下で  $120$  分間インキュベートした。この間、切片

から放出される微弱光を化学発光計測の場合は直接、放射線計測の場合は鏡面化シンチレータを用い、リアルタイムバイオラジオグラフィ装置で画像化、解析した。<sup>12)</sup> その結果、スーパーオキシド依存性の化学発光は再酸素処理時に著しく増強し、その部位に局在性が認められた (Fig. 5)。次に、低酸素-再酸素の過程でスーパーオキシドの生成の場はどこか、スーパーオキシドの特異的分解酵素であるスーパーオキシドデスマターゼ (SOD) の効果から解析した。その結果、ルシゲニンの化学発光は細

膜透過性を有する SOD ミミック<sup>63,64</sup>である EUK-8 の添加で著減したが, Cu, Zn-SOD 添加では変化せず, 計測された化学発光は細胞内のスーパーオキシドレベルを反映すると結論された (Fig. 6). 現段階では, 細胞内におけるスーパーオキシドの生成機序は明らかではない. 予備的検討結果であるが, われわれはルシゲニンの化学発光が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で変化しないことを確認した. 一方, その化学発光はミ

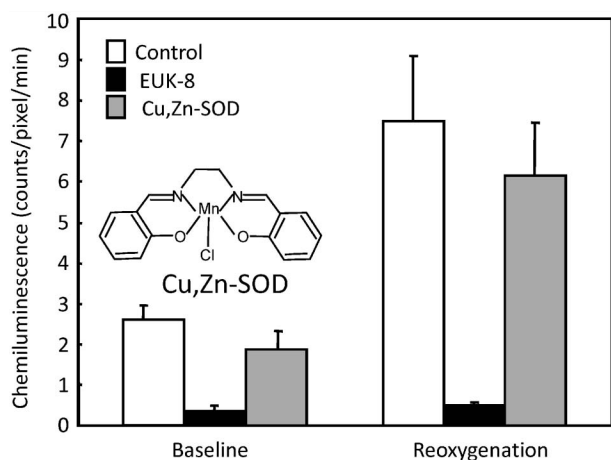


Fig. 6. Effect of EUK-8 and Cu,Zn-SOD on Chemiluminescent Intensity in Wistar Rat (3-month-old) Brain Slices

A set of eight rats was used for the control and of five rats for EUK-8 and Cu,Zn-SOD experiments.

トコンドリア電子伝達系の阻害剤のシアン, ロテノン, アンチマイシン A の処理によって一過性に亢進した (Fig. 7). ミトコンドリア電子伝達系の活性酸素の主要な生成場所として, 複合体 I と III が示唆されている.<sup>65-69</sup> ミトコンドリア電子伝達系の阻害において, 活性酸素の放出亢進は阻害部位の上流に位置する酸化還元反応中心から起こる一方で, 下流の放出は低下すると考えられている (Fig. 8).<sup>65-69</sup> 複合体 I の阻害剤であるロテノン, 複合体 III の阻害剤であるアンチマイシン A, 複合体 IV の阻害剤であるシアンの処理によって, 複合体 I と III からの活性酸素の放出が亢進することが単離ミトコンドリアと亜ミトコンドリア粒子において示されている.<sup>66-71</sup> しかし, 複合体 II の阻害剤である 3-ニトロプロピオン酸処理では化学発光の亢進を認めなかった (Fig. 7). これは複合体 I と II の酸化還元反応中心は複合体 II の阻害部位の上流には存在しないからであると考えられる.<sup>67,71</sup>

FDG の集積で評価した糖代謝は, 無酸素時に亢進した (Fig. 5). 好氣的環境下では, ミトコンドリアの酸化的リン酸化によって効率的に ATP を合成することができる. 解糖と酸化的リン酸化により, 1 分子のブドウ糖から 38 分子の ATP が得られる. 一方, 嫌氣的環境下の解糖では, ATP の生成は 2

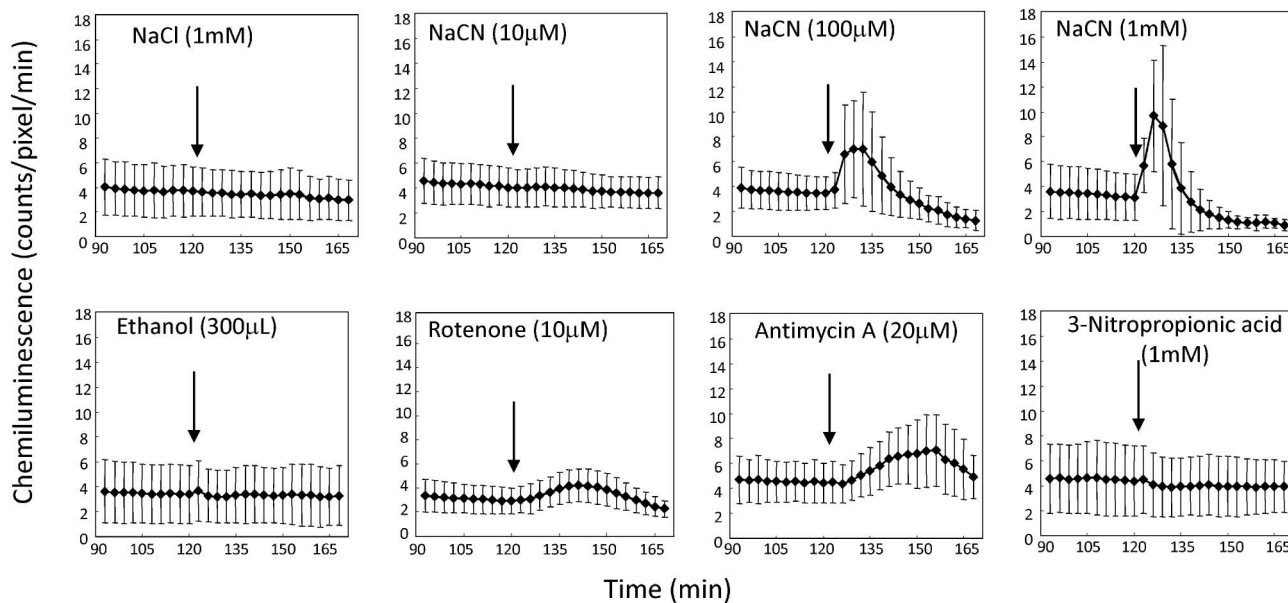


Fig. 7. Effect of Mitochondrial Electron Inhibitors on Chemiluminescence Intensity in Wistar Rat (3-month-old) Brain Slices

Images of four brain slices prepared from a rat were acquired every 3 minutes under the oxygenated condition for up to 165 min (twenty-five frames). The NaCl and NaCN solutions (30 µl), and ethanol, rotenone, antimycin A, and 3-nitropropionic acid solutions (300 µl), were added at the point indicated by arrow.

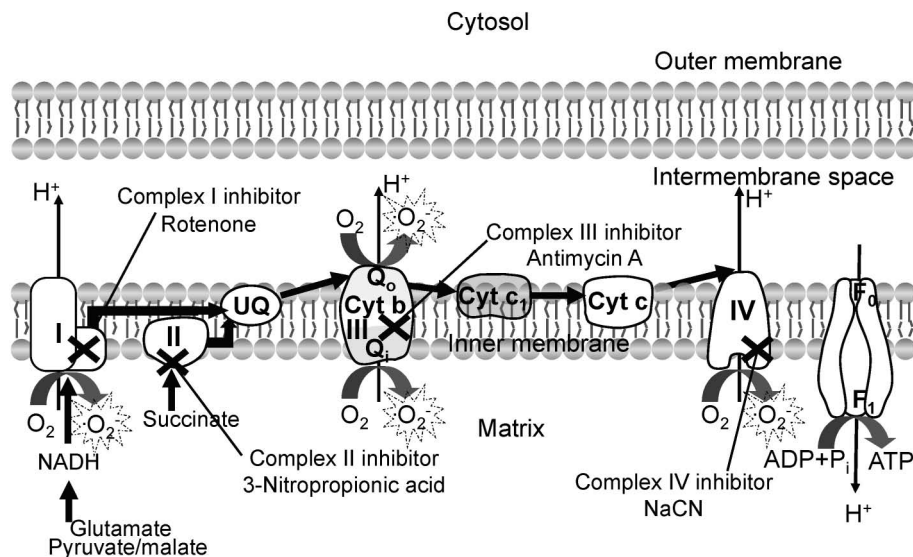


Fig. 8. Sites of the Mitochondrial Electron Transport Chain Inhibitors and Superoxide Generation

分子である。このような嫌気的環境下では、代償的に解糖と乳酸生成が活性化すると考えられる。<sup>46,72,73</sup> 筆者らは、低酸素処理による酸素代謝の低下とブドウ糖代謝の亢進を脳スライスで示した。<sup>17</sup> 低酸素下での糖代謝の亢進は、無酸素下で低下したミトコンドリアの効率的な ATP 産生を解糖のみで代償するための応答であると考えられる。取り込まれたブドウ糖から生ずる還元当量は NADH に転移される。実際に、ミトコンドリアの NADH/NAD<sup>+</sup> 比を指標としたレドックスは無酸素、低酸素処理で還元側にシフトする。<sup>74-76</sup> 脳の虚血-再灌流における活性酸素の生成に、低酸素下での還元的状態から再酸素による酸化状態へ移行する際のレドックスバランスの変化が係わることが示唆された。

### 5. 脳の活性酸素レベルの加齢変化と寿命との関係の解析

筆者らは、加齢促進モデルマウス (SAM), C57/BL6S マウス, Wistar ラット, ハト脳組織生切片を対象に、定常状態と低酸素-再酸素過程におけるスーパーオキシド依存性化学発光の加齢変化を検討した。<sup>77</sup>

SAM は京都大学において米国 Jackson 研究所由来の AKR/J マウスの同系交配選別で発見、開発された老化モデル動物である。<sup>78</sup> 老化の指標、病態解析、寿命上の違いから、老化促進 (P) と正常老化 (R) 系に分類される。<sup>79,80</sup> P 系は R 系に比べて 26% ほど短命で、<sup>78</sup> P 系の SAMP10 は脳萎縮を呈し

て、<sup>81</sup> より早期に条件回避学習の低下傾向が表れる。<sup>79</sup> 一方、R1 の脳萎縮は大脳皮質のある領域に限定される。<sup>78-80</sup> 酸化ストレス関連の解析が SAM において進められた結果、<sup>82-85</sup> 以下の知見が得られている。

SAMP8 の脳のタンパクカルボニル化は SAMR に比べて増加し、その酸化ストレスの亢進はフリーラジカルスカベンジャーである PBN とビタミン E によって抑制された。<sup>83</sup> SAMP8 の脳の過酸化脂質レベルは、SAMR1 に比べて加齢のより早期に増加した。SAMP8 各臓器の過酸化脂質の増加は、Mn-SOD などの抗酸化防御機構の低下によると解釈されている。同様に、SAMP1 肝臓の過酸化脂質の増加は、Mn-SOD、チトクロム C オキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼの低下で説明されている。<sup>82</sup> 一方、SAMP10 の線維芽様細胞における検討から、酸化ストレスの亢進に対するミトコンドリアの形態的及び機能的変化の関与が示唆されている。<sup>86</sup> 筆者らは、SAMP10 脳組織生切片のスーパーオキシド依存性の化学発光が定常状態と再酸素時のいずれにおいても、R1 に比べて若齢時から亢進していることを発見した (Fig. 9)。最近、SAMP10 の大脳皮質の DNA とタンパク質の酸化修飾物が加齢に伴って増加し、それらのレベルは SAMR1 よりも高値であることが報告された。<sup>84,87,88</sup> 同様に、大脳皮質のカルボニル化タンパク質の濃度も加齢に伴って増加することが報告された。<sup>84</sup> 一方で、抗酸

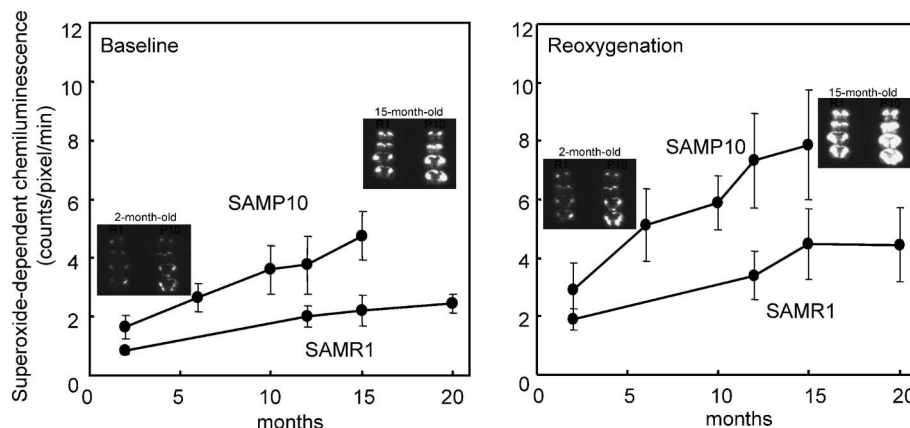


Fig. 9. Analysis of Age-related Changes of Superoxide Levels in Senescence Accelerated Mouse (SAM) Brain Slices

Superoxide-dependent chemiluminescent intensity expressed as “counts/pixel/min” was represented as the mean  $\pm$  S.D. for 2, 6, 10, 12, and 15-month-old SAMP10, and for 2, 12, 15, and 20-month-old SAMR1.

化酵素である Cu, Zn-SOD は 6 ヶ月齢の SAMP10 の脳で上昇するものの, Mn-SOD は加齢に伴って変化しないらしい。<sup>84)</sup> 興味深いことに, SAMP10 の脳の酸化ストレス, 形態的及び機能的変化が, ラジカルスカベンジャー作用を有する抗酸化物質であるカテキンによって部分的に改善することが報告された。<sup>84,87,88)</sup> 以上の解析結果は, SAM が酸化ストレスの亢進したモデル動物であることを示唆する。筆者らは, SAMP10 の脳のスーパーオキシド依存性化学発光の加齢変化は, SAMR1 よりも急峻であるという興味深い結果を得た (Fig. 9)。SAMP の平均寿命は当初 SAMR よりも 26% 短いと報告された。<sup>78)</sup> 最近の報告では SAMP の平均寿命は 9.7 ヶ月で, SAMR の 16.3 ヶ月よりも 40% 短い。<sup>79)</sup> 長寿の SAMR1 脳のスーパーオキシドレベルはより長い時間をかけて短命の SAMP10 のレベルに到達した (Fig. 9)。活性酸素の組織レベルが寿命を規定しているかのようなのである。東京都健康長寿医療センター研究所では, 従来から C57BL/6S マウス, Wistar ラット, Fischer ラットの育成を行っており, それらの自然老化動物の供給体制が整っている。筆者らは, SAM と同様の現象が自然老化動物でも観察されるかを調べた。その結果, C57BL/6S マウス, Wistar ラット, ハトでも加齢に伴う化学発光の増加が認められた (Fig. 10)。筆者らはさらに, 難治性てんかん患者の外科的療法の際に摘出された脳組織の供与を受け, 同様の検討を試みた。その結果, ヒト脳においても加齢に伴う化学発光の増加を認めた (未発表)。一方, SAM と同様に老化

動物モデルとしてクロトー遺伝子欠失マウスが知られている。この動物は早期老化の多彩な症状を呈し, その原因遺伝子としてクロトーが同定されている。クロトー遺伝子欠失マウスの平均寿命 (60 日) は対照の野生に比べて著しく短い。<sup>89)</sup> しかし, スーパーオキシド依存性の化学発光は両者の間で変わらなかった (Fig. 11)。この理由として, (1)クロトー遺伝子の発現は腎臓では高いが脳では低いこと,<sup>90)</sup> (2)クロトー遺伝子欠失に伴う老化の表現形は自然老化のものとは異なる機序による, が考えられた。

## 6. 活性酸素の増加か? 酸化ストレス防御系の低下か?

酸化ストレスの指標である組織の酸化修飾物質濃度は, 第一義的には活性酸素生成と活性酸素消去系のバランスによって決まると考えられる。しかし, いずれが加齢に伴う酸化ストレス亢進の決定因子であるかは, かならずしも明らかではない。加齢に伴う酸化ストレス亢進の要因として, 活性酸素の生成亢進あるいは濃度の増加が細胞, 細胞内小器官レベルで報告されている。多核白血球, マクロファージでの活性酸素生成は加齢に伴い増加することが, ルシゲニン, ルミノールによる解析から報告された。<sup>91-95)</sup> しかし, 食作用の活性化に伴う活性酸素の生成亢進は老齢の多核白血球の方が若齢よりも顕著であった。<sup>91,95)</sup> 食作用は生体防護のための機能である。一般に加齢に伴う機能の衰退と定義される老化とはこの現象は逆であり, この解釈は複雑である。血液細胞以外では, 老齢ラットの精巣より単離されたライディッヒ細胞で, ルシゲニンで評価した活性

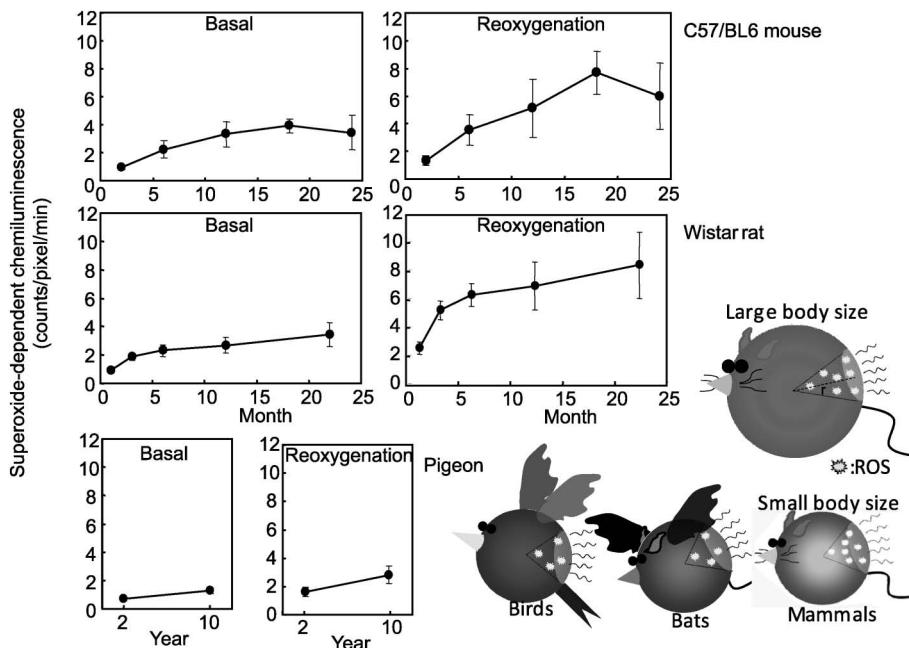


Fig. 10. Age-related Changes of Superoxide Levels in C57/BL6 Mouse, Wistar Rat, and Pigeon Brain Slices  
 Superoxide-dependent chemiluminescent intensity expressed as ‘counts/pixel/min’ was represented as the mean ± S.D. for 3, 6, 12, 18, and 24-month-old C57/BL6 mice, 1, 3, 6, 12, and 22-month-old Wistar rats, and 2 and 10-year-old pigeons.

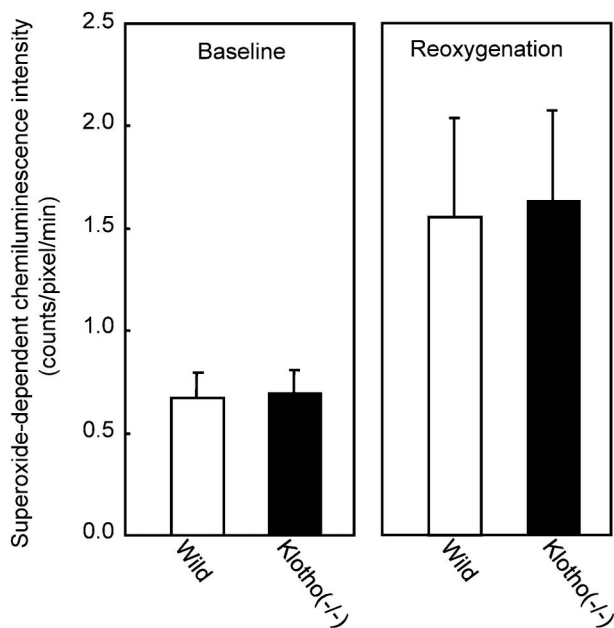


Fig. 11. Comparison of Superoxide Dependent Chemiluminescence Intensity Levels in Brain Slices between Wild and Klotho (-/-) Mouse (4-Week)

酸素の生成が若齢より高いことが報告されている。<sup>96)</sup> この報告では、加齢に伴うミトコンドリア体積の減少で活性酸素の生成亢進を説明している。加齢あるいは一過性運動で、骨格筋の活性酸素の増加することが、蛍光探索子である DCFH による解析

から報告されている。<sup>97)</sup> 同様に、老齢ラットより単離した肝細胞の DCFH で評価した活性酸素量と、蛍光探索子である HET で評価された老齢ラット陰莖のスーパーオキシドが、対照の若齢よりも高いことが報告されている。<sup>98,99)</sup> 一方、DCFH で評価した心臓の活性酸素に、若齢と老齢で差異がないとの報告もある。<sup>100)</sup> ミトコンドリアは細胞内のスーパーオキシドと過酸化水素の主たる発生場所である。ミトコンドリアのスーパーオキシドと過酸化水素の生成は加齢に伴って増加することが哺乳類と昆虫で報告されている。<sup>101-104)</sup> しかし、ミトコンドリアのスーパーオキシドと過酸化水素の生成が中年期にピークに達するとの報告もある。<sup>105,106)</sup> 両者の報告の違いは、前者が無傷のミトコンドリアを、後者が重ミトコンドリア粒子を対象としているからかもしれない。Sohal らは、呼吸鎖の構造上の変化が加齢に伴うミトコンドリアからの過酸化水素の漏出増加の原因であることを示唆している。<sup>103)</sup>

加齢に伴う酸化ストレスの亢進のもう一つの解釈は、酸化ストレス防御系の変化である。加齢に伴って、カタラーゼ、グルタチオンペーパーオキシダーゼの活性がヒトサテライト細胞で減少する。<sup>107)</sup> ラットの肝、肺、水晶体でアスコルビン酸が、水晶体でグルタチオンが、加齢とともに減少することが知られ



ている。<sup>108)</sup> ショウジョウバエでカタラーゼ、グルタチオンレダクターゼ活性、還元型グルタチオン濃度が加齢後期で減少する。一方、SODは増加傾向を示した。<sup>109)</sup> SOD活性の加齢変化には多くの報告がある。その多くは、SOD活性が変化しない、あるいは若干増加傾向を示す。<sup>110-114)</sup> 少数だが、Fischer F344ラットでSOD活性が加齢に伴って低下することが報告されている。<sup>115)</sup> 筆者らはスーパーオキシド依存性化学発光が加齢に伴いほぼ直線的に増加する一方で、SOD活性は変化しないことをマウス、ラット、ハト脳で示した (Fig. 12)。スーパーオキシド依存性化学発光は、スーパーオキシドの生成と消去酵素であるSOD活性の影響を受ける。SOD活性に変化が認められなかったことから、活性酸素そのものの生成が加齢に伴って増加していると結論された。しかし、生体内分子 (タンパ

ク質、脂質、DNA) の酸化修飾物質の加齢に伴う増加は、二相性であることが報告されている (Fig. 13)。このパターンはスーパーオキシドの生成とは異なる。この理由としては、以下の可能性が考えられる。(1) 生体の抗酸化ストレス防御系は、活性酸素の生成に対して十分量が存在していて、活性酸素の発生量が防護を超える老齢後期になって初めて酸化修飾物質の著しい増加をみる。(2) 酸化修飾物質の生成、分解、修復が老齢後期に低下する。(3) 活性酸素消去系が老齢後期に低下する。(4) 老齢後期に好発する老年病に付随した炎症反応に伴い活性酸素生成が亢進する。

## 7. 活性酸素と寿命

ミトコンドリアで生成される活性酸素と寿命との関係が様々な動物種で調べられている。ミトコンドリアで生成された過酸化水素は寿命に逆相関を示す

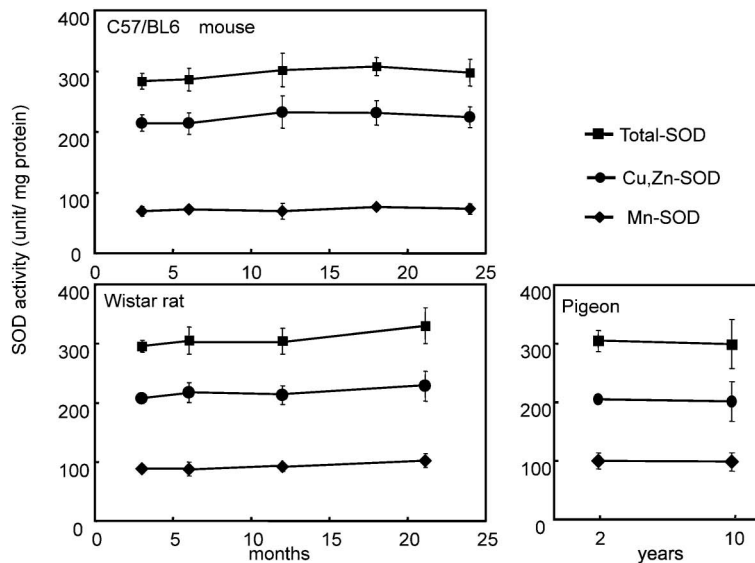


Fig. 12. Analysis of Age-related Changes of Superoxide Dismutase (SOD) Activity in Brain Tissues

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. for C57/BL6 mice: 3, 6, 12, 18, and 24-month-old, for Wistar rats: 3, 6, 12, and 20-month-old, and for pigeons: 2 and 10-year-old.

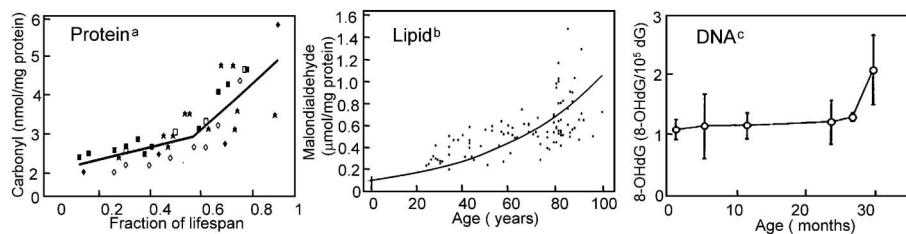


Fig. 13. Increase of Oxidative End-product Concentration during Aging Process

Age-related changes in <sup>a</sup>carbonyl concentration of protein from different tissues,<sup>8)</sup> <sup>b</sup>malondialdehyde concentration of erythrocyte,<sup>3)</sup> and <sup>c</sup>8-OHdG concentration of nuclear DNA from brain,<sup>5)</sup> were analyzed as markers for protein, lipid, and DNA oxidation, respectively.

が、SOD、カタラーゼ、グルタチオンには相関はない。<sup>102,116</sup> 家ネズミに比べて倍の寿命を持つ白足マウスのミトコンドリアからのスーパーオキシドと過酸化水素の生成は、家ネズミに比べて低い。<sup>117</sup> 筆者らはSAMの短命のP10系統の脳のスーパーオキシドレベルが正常系統R1に比べて高いことを発見した (Fig. 9)。身体サイズの小さい動物の単位体積当たりの体表面積は大きい。このような動物は体重当たりのエネルギー代謝率は大きくなり、生活代謝率/酸化傷害学説によれば、単位体積当たりの活性酸素生成率は高くなる (Fig. 10)。しかし、鳥類は同サイズの哺乳類に比べてエネルギー代謝率は高いが長寿である。実際に、ハトの最大寿命は35年で、同程度の身体サイズのラットの4年より長い。この理由は、鳥類のミトコンドリア活性酸素の漏出が小さいことで説明されている。心臓、脳のミトコンドリア電子伝達系からの活性酸素の漏出は複合体IとIIIが主である。<sup>71,118</sup> 鳥類の心臓、脳のミトコンドリアからの活性酸素の漏出が低いことは、ミトコンドリア及び核DNAの酸化マーカーが低値であることから明らかである。<sup>65</sup> われわれの研究でも、ハト脳組織生切片のスーパーオキシド依存性化学発光はラット、マウスに比べて低値で、このことを表していると考えられる (Fig. 10)。興味深いことに、哺乳類であるが同じ飛翔動物であるコウモリも長寿である。<sup>119</sup> 飛翔動物は常に酸素分圧の変化に晒されており、これに適応する形で堅固な酸化ストレス防護系を発達させてきたのかもしれない。一方、酸素濃度の低い深海に生息する魚類の酸化ストレス防護系は脆弱である。魚の生息深度とSOD、グルタチオンペルオキシダーゼ活性には負の相関がある。<sup>120</sup>

酸化ストレス防護系と寿命の関係が報告されている。哺乳類では最大寿命と血清中尿素濃度、<sup>121</sup> 組織SOD活性、カロテノイド、 $\alpha$ トコフェロール、尿酸濃度<sup>122</sup>に正の相関があるとの報告がある。しかし、酸化ストレス防護系と寿命には明確な相関はないようである。哺乳類ではSOD活性と最大寿命の間に正の相関があるが、グルタチオンペルオキシダーゼとの間にはない。<sup>123</sup> 筆者らは加齢に伴うスーパーオキシド依存性化学発光の増加率と最大寿命の間に負の相関があることを示した (Fig. 14)。組織の活性酸素レベルが老化、寿命を規定している

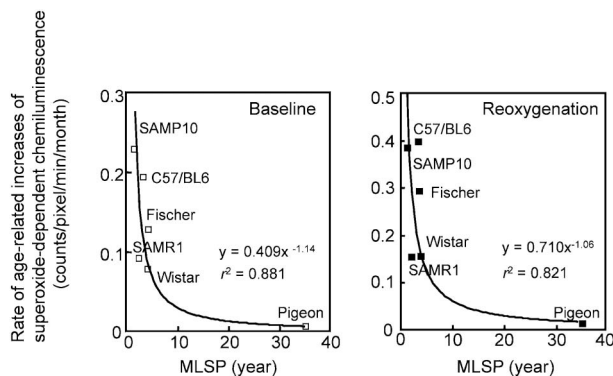


Fig. 14. Relationship between Rate of Age-related Increases of Superoxide-dependent Chemiluminescence and Maximum Life Span Potential (MLSP)

Rate of age-related increases of superoxide-dependent chemiluminescence expressed as "counts/pixel/min/month" was obtained from the data (2, 6, 10, 12, and 15-month-old SAMP10 mice; 2, 12, 15, and 20-month-old SAMR1 mice; 3, 6, 12, and 18-month-old C57/BL6 mice; 3, 6, 12, and 22-month-old Wistar rats; 3, 10, 22, and 28-month-old Fischer rats; 2 and 10-year-old pigeons). MLSP was calculated from the data in published report,<sup>78</sup> or was taken from published reports.<sup>118,121</sup>

かのような結果である。

これまで、活性酸素・フリーラジカルは生物に不都合な面だけが強調されてきた。しかし、好中球やマクロファージは細菌などの異物処理のために活性酸素を産生する。また、血管拡張に関与する一酸化窒素も活性酸素・フリーラジカルである。近年、活性酸素・フリーラジカルは、レドックスシグナル情報伝達物質として細胞増殖の制御などに関与する、生体維持に必須の分子であると考えられるようになってきた。<sup>124-127</sup> この脈絡で老化を考えれば、生体内の活性酸素・フリーラジカルに至適量が存在していて、遺伝子によるのであろう老化の制御も、活性酸素・フリーラジカルを介して行われることが予想される。このことは、活性酸素・フリーラジカルの制御で老化の進行速度を変え得ることを意味するのかもしれない。活性酸素・フリーラジカル制御法の開発は老化の介入戦略として期待される。

**謝辞** 本研究は財団法人高齢者研究・福祉振興財団東京都老人総合研究所（現地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所）で行われた。活性酸素を評価する新しいイメージング法の開発は、理化学研究所・分子イメージング研究プログラム渡辺恭良プログラムディレクター、地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・加沢エトリ主任研究員、アロカ株式会社・岩本明憲氏、坪井寿氏、加

藤徹氏との共同研究で行われた。

酸化ストレスの解析と老化、寿命に関する研究は、東京都老人総合研究所・金子孝夫研究副部長、田原正一研究助手、静岡県大葉・海野けい子准教授、愛知県心身障害コロニー・発達障害研究所・島田厚良室長、東京理科大学薬学部・小島周二教授、東京都老人総合研究所・萬谷博研究員、遠藤玉夫研究部長との共同研究で行われた。関係の先生方に深謝する。また、東京都老人総合研究所・清水孝彦研究員、石神昭人主任研究員（現東邦大学薬学部准教授）、近藤嘉高研究員、後藤佐多良協力研究員（順天堂大学客員教授）、丸山直記副所長との共同研究も進行中である。諸先生の日ごろの研究協力と有益な助言、激励に感謝する。

最後に、シンポジウムでの発表と本稿の執筆の機会を頂きました、東邦大学薬学部・石神昭人准教授並びに東京都健康長寿医療センター研究所・萬谷博研究員に深謝いたします。

#### REFERENCES

- 1) Harman D., *J. Gerontol.*, **11**, 298–300 (1956).
- 2) Adelman R., Saul R. L., Ames B. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2706–2708 (1988).
- 3) Gil P., Farinas F., Casado A., Lopez-Fernandez E., *Gerontology*, **48**, 209–214 (2002).
- 4) Haripriya D., Sangeetha P., Kanchana A., Balu M., Panneerselvam C., *Exp. Gerontol.*, **40**, 129–135 (2005).
- 5) Kaneko T., Tahara S., Matsuo M., *Mutat. Res.*, **316**, 277–285 (1996).
- 6) Kaneko T., Tahara S., Matsuo M., *Free Radic. Biol. Med.*, **23**, 76–81 (1997).
- 7) Leon T. I., Lim B. O., Yu B. P., Lim Y., Jeon E. J., Park D. K., *Lipids*, **36**, 589–593 (2001).
- 8) Levine R. L., *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 790–796 (2002).
- 9) Nakae D., Akai H., Kishida H., Kusuoka O., Tsutsumi M., Konishi Y., *Lab. Invest.*, **80**, 249–261 (2000).
- 10) Stadtman E. R., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **928**, 22–38 (2001).
- 11) Sohal R. S., Agarwal S., Candas M., Forster M. J., Lal H., *Mech. Ageing Dev.*, **76**, 215–224 (1994).
- 12) Sasaki T., Iwamoto A., Tsuboi H., Watanabe Y., *Brain Res.*, **1077**, 161–169 (2006).
- 13) Matsumura K., Bergstrom M., Onoe H., Takechi H., Westerberg G., Antoni G., Bjurling P., Jacobson G. B., Langstrom B., Watanabe Y., *Neurosci. Res.*, **22**, 219–229 (1995).
- 14) Yoshida S., Murata T., Omata N., Waki A., Fujibayashi Y., Isaki K., Oka H., Yonekura Y., *Neurosci. Res.*, **30**, 271–278 (1998).
- 15) Murata T., Omata N., Fujibayashi Y., Waki A., Sadato N., Yoshida S., Yano R., Yoshimoto M., Yonekura Y., *J. Neural. Transm.*, **106**, 1075–1087 (1999).
- 16) Omata N., Murata T., Fujibayashi Y., Waki A., Sadato N., Yoshimoto M., Wada Y., Yonekura Y., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **20**, 350–358 (2000).
- 17) Sasaki T., Yamaguchi M., Kojima S., *Synapse*, **55**, 252–261 (2005).
- 18) Sasaki T., Nariai T., Maehara T., Sato K., Oda K., Ishii K., *Brain Res.*, **1142**, 19–27 (2007).
- 19) Murata T., Matsumura K., Sihver S., Onoe H., Bergstrom M., Sihver W., Yonekura Y., Langstrom B., Watanabe Y., *J. Neural. Transm.*, **105**, 1117–1127 (1998).
- 20) Murata T., Matsumura K., Onoe H., Bergstrom M., Takechi H., Sihver S., Sihver W., Neu H., Andersson Y., Ogren M., Fasth K. J., Langstrom B., Watanabe Y., *Neurosci. Res.*, **25**, 145–154 (1996).
- 21) Sasaki T., Ishiwata K., Murata T., Senda M., *Synapse*, **44**, 42–50 (2002).
- 22) Sasaki T., Kawamura K., Tanaka Y., Ando S., Senda M., *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, **10**, 1–11 (2002).
- 23) Sasaki T., Funaki Y., Shozushima M., Terasaki K., *Radioisotopes*, **52**, 677–685 (2003).
- 24) Sasaki T., Soga S., Ishii S., Kobayashi T., Nagai H., Senda M., *Brain Res.*, **831**, 263–272 (1999).
- 25) Sasaki T., Senda M., Ohno T., Kojima S., Kubodera A., *Brain Res.*, **28**, 25–31 (2001).
- 26) Ishida S., Matsumoto S., Yokoyama H., Mori N., Kumashiro H., Tsuchihashi N., Ogata T., Yamada M., Ono M., Kitajima T., *Magn. Reson. Imaging*, **10**, 109–114 (1992).
- 27) Berliner L. J., Khramtsov V., Fujii H., Clanton T. L., *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 489–499 (2001).

- 28) Tsuchiya M., Suematsu M., Suzuki H., *Methods Enzymol.*, **233**, 128–140 (1994).
- 29) Frank J., Biesalski H. K., Dominici S., Pompella A., *Histol. Histopathol.*, **15**, 173–184 (2000).
- 30) Buxser S. E., Sawada G., Raub T. J., *Methods Enzymol.*, **300**, 256–275 (1999).
- 31) Bindokas V. P., Jordan J., Lee C. C., Miller R. J., *J. Neurosci.*, **16**, 1324–1336 (1996).
- 32) Archer S. L., Nelson D. P., Weir E. K., *J. Appl. Physiol.*, **67**, 1912–1921 (1989).
- 33) Lucas M., Solano F., *Anal. Biochem.*, **206**, 273–277 (1992).
- 34) Pettit A. I., Wong R. K., Lee V., Jennings S., Quinn P. A., Ng L. L., *J. Hypertens*, **20**, 677–683 (2002).
- 35) Daiber A., August M., Baldus S., Wendt M., Oelze M., Sydow K., Kleschyov A. L., Munzel T., *Free Radic. Biol. Med.*, **36**, 101–111 (2004).
- 36) Hirayama O., Takagi M., Hukumoto K., Katoh S., *Anal. Biochem.*, **247**, 237–241 (1997).
- 37) Dirnagl U., Lindauer U., Them A., Schreiber S., Pfister H. W., Koedel U., Reszka R., Freyer D., Villringer A., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **15**, 929–940 (1995).
- 38) Faulkner K., Fridovich I., *Free Radic. Biol. Med.*, **15**, 447–451 (1993).
- 39) Schreiber S. J., Megow D., Raupach A., Victorov I. V., Dirnagl U., *Brain Res.*, **703**, 227–230 (1995).
- 40) Nakano M., *Cell. Mol. Neurobiol.*, **18**, 565–579 (1998).
- 41) Wada K., Saniabadi A. R., Umemura K., Nakano M., Ito T., Nakashima M., *Free Radic. Biol. Med.*, **18**, 923–927 (1995).
- 42) Shimomura O., Wu C., Murai A., Nakamura H., *Anal. Biochem.*, **258**, 230–235 (1998).
- 43) Shimomura O., Goto T., Johnson F. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2799–2802 (1977).
- 44) Murphy M. E., Sies H., *Methods Enzymol.*, **186**, 595–610 (1990).
- 45) Laurindo F. R., de Souza H. P., Pedro Mde A., Janiszewski M., *Methods Enzymol.*, **352**, 432–454 (2002).
- 46) Sasaki T., *Curr. Med. Chem.*, **4**, 61–69 (2004).
- 47) Vanfleteren J. R., De Vreese A., *J. Exp. Zool.*, **274**, 93–100 (1996).
- 48) Li Y., Zhu H., Kuppusamy P., Roubaud V., Zweier J. L., Trush M. A., *J. Biol. Chem.*, **273**, 2015–2023 (1998).
- 49) Rembish S. J., Trush M. A., *Free Radic. Biol. Med.*, **17**, 117–126 (1994).
- 50) Schepetkin I. A., *Biochemistry (Mosc.)*, **64**, 25–32 (1999).
- 51) Li C., Jackson R. M., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **282**, C227–C241 (2002).
- 52) Dhar-Masareño M., Cárcamo J. M., Golde D. W., *Free Radic. Biol. Med.*, **38**, 1311–1322 (2005).
- 53) Margail I., Plotkine M., Lerouet D., *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 429–443 (2005).
- 54) Korthuis R. J., Granger D. N., Townsley M. I., Taylor A. E., *Circ. Res.*, **57**, 599–609 (1985).
- 55) Taylor M. D., Mellert T. K., Parmentier J. L., Eddy L. J., *Brain Res.*, **347**, 268–273 (1985).
- 56) Inauen W., Payne D. K., Kviety P. R., Granger D. N., *Free Radic. Biol. Med.*, **9**, 219–223 (1990).
- 57) Phillis J. W., Sen S., Cao X., *Neurosci. Lett.*, **169**, 188–190 (1994).
- 58) Asimakis G. K., Lick S., Patterson C., *Circulation*, **105**, 981–986 (2002).
- 59) Kim G. W., Kondo T., Noshita N., Chan P. H., *Stroke*, **33**, 809–815 (2002).
- 60) Sims N. R. Anderson M. F., *Neurochem. Int.*, **40**, 511–526 (2002).
- 61) Ames B. N., *Science*, **221**, 1256–1264 (1983).
- 62) Rice-Evans C., Burdon R., *Prog. Lipid Res.*, **32**, 71–110 (1993).
- 63) Musleh W., Bruce A., Malfroy B., Baudry M., *Neuropharmacology*, **33**, 929–934 (1994).
- 64) Bruce A. J., Malfroy B., Baudry M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2312–2316 (1996).
- 65) Herrero A., Barja G., *Aging (Milano)*, **11**, 294–300 (1999).
- 66) Sun J., Trumpower B. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **419**, 198–206 (2003).
- 67) Chen Q., Vazquez E. J., Moghaddas S., Hopfel C. L., Lesnefsky E. J., *J. Biol. Chem.*, **278**, 36027–36031 (2003).
- 68) Kudin A. P., Bimpong-Buta N. Y., Vielhaber S., Elger C. E., Kunz W. S., *J. Biol. Chem.*, **279**, 4127–4135 (2004).

- 69) Adam-Vizi V., *Antioxid. Redox Signal*, **7**, 1140–1149 (2005).
- 70) Turrens J. F., Boveris A., *Biochem. J.*, **191**, 421–427 (1980).
- 71) Barja G., Herrero A., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **30**, 235–243 (1998).
- 72) Harik S. I., Lust W. D., Jones S. C., Lauro K. L., Pundik S., LaManna J. C., *J. Appl. Physiol.*, **79**, 136–140 (1995).
- 73) Schurr A., West C. A., Rigor B. M., *Science*, **240**, 1326–1328 (1988).
- 74) Merrill D. K., Guynn R. W., *Brain Res.*, **221**, 307–318 (1981).
- 75) Perez-Pinzon M. A., Mumford P. L., Carranza V., Sick T. J., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **18**, 215–221 (1998).
- 76) Perez-Pinzon M. A., Mumford P. L., Rosenthal M., Sick T. J., *Brain Res.*, **754**, 163–170 (1997).
- 77) Sasaki T., Unno K., Tahara S., Shimada A., Chiba Y., Hoshino M., Kaneko T., *Aging Cell*, **7**, 459–469 (2008).
- 78) Takeda T., Hosokawa M., Takeshita S., Irino M., Higuchi K., Matsushita T., Tomita Y., Yasuhira K., Hamamoto H., Shimizu K., Ishii M., Yamamuro T., *Mech. Ageing Dev.*, **17**, 183–194 (1981).
- 79) Takeda T., *Neurobiol. Aging*, **20**, 105–110 (1999).
- 80) Takeda T., Hosokawa M., Higuchi K., *Exp. Gerontol.*, **32**, 105–109 (1997).
- 81) Shimada A., Hosokawa M., Ohta A., Akiguchi I., Takeda T., *Neuroscience*, **59**, 859–869 (1994).
- 82) Boldyrev A., Fedorova T., Stvolinsky S., Borras C., Sastre J., Vina J., “The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): An Animal Model of Senescence,” eds. by Nomura Y., Takeda T., Okuma Y., Elsevier, Amsterdam, 2004, pp. 109–115.
- 83) Butterfield D. A., Koppal T., Howard B., Subramaniam R., Hall N., Hensley K., Yatin S., Allen K., Aksenov M., Aksenova M., Carney J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **854**, 448–462 (1998).
- 84) Kishido T., Unno K., Yoshida H., Choba D., Fukutomi R., Asahina S., Iguchi K., Oku N., Hoshino M., *Biogerontology*, **8**, 423–430 (2007).
- 85) Yasui F., Ishibashi M., Matsugo S., Kojo S., Oomura Y., Sasaki K., *Neurosci. Lett.*, **350**, 66–68 (2003).
- 86) Chiba Y., Yamashita Y., Ueno M., Fujisawa H., Hirayoshi K., Hohmura K., Tomimoto H., Akiguchi I., Satoh M., Shimada A., Hosokawa M., *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **60**, 1087–1098 (2005).
- 87) Unno K., Takabayashi F., Kishido T., Oku N., *Exp. Gerontol.*, **39**, 1027–1034 (2004).
- 88) Unno K., Takabayashi F., Yoshida H., Choba D., Fukutomi R., Kikunaga N., Kishido T., Oku N., Hoshino M., *Biogerontology*, **8**, 89–95 (2007).
- 89) Kuro-o M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T., Ohyama Y., Kurabayashi M., Kaname T., Kume E., Iwasaki H., Iida A., Shiraki-Iida T., Nishikawa S., Nagai R., Nabeshima Y., *Nature*, **390**, 45–51 (1997).
- 90) Aizawa H., Saito Y., Nakamura T., Inoue M., Imanari T., Ohyama Y., Matsumura Y., Masuda H., Oba S., Mise N., Kimura K., Hasegawa A., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 865–871 (1998).
- 91) Braga P. C., Sala M. T., Dal Sasso M., Pecile A., Annoni G., Vergani C., *Exp. Gerontol.*, **33**, 477–484 (1998).
- 92) Chan S. S., Monteiro H. P., Deucher G. P., Abud R. L., Abuchalla D., Junqueira V. B., *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 1411–1418 (1998).
- 93) Kukovetz E. M., Bratschitsch G., Hofer H. P., Egger G., Schaur R. J., *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 433–438 (1997).
- 94) Martins Chaves M., Rocha-Vieira E., Pereira dos Reis A., de Lima e Silva R., Gerzstein N.C., Nogueira-Machado J. A., *Mech. Ageing Dev.*, **119**, 1–8 (2000).
- 95) Teramoto S., Suzuki M., Matsuse T., Ohga E., Ishii T., Ouchi Y., *Aging (Milano)*, **12**, 22–28 (2000).
- 96) Chen H., Cangello D., Benson S., Folmer J., Zhu H., Trush M. A., Zirkkin B. R., *Exp. Gerontol.*, **36**, 1361–1373 (2001).
- 97) Bejma J., Ji L. L., *J. Appl. Physiol.*, **87**, 465–470 (1999).
- 98) Hagen T. M., Wehr C. M., Ames B. N., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **854**, 214–223 (1998).

- 99) Bivalacqua T. J., Armstrong J. S., Biggerstaff J., Abdel-Mageed A. B., Kadowitz P. J., Hellstrom W. J., Champion H. C., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H1408–H1421 (2003).
- 100) Fu Y., Ji L. L., *J. Nutr.*, **133**, 3603–3609 (2003).
- 101) Sohal R. S., Brunk U. T., *Mutat. Res.*, **275**, 295–304 (1992).
- 102) Sohal R. S., Orr W. C., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **663**, 74–84 (1992).
- 103) Sohal R. S., Sohal B. H., *Mech. Ageing Dev.*, **57**, 187–202 (1991).
- 104) Judge S., Jang Y. M., Smith A., Hagen T., Leeuwenburgh C., *FASEB J.*, **19**, 419–421 (2005).
- 105) Guarnieri C., Muscari C., Caldarera C. M., *EXS*, **62**, 73–77 (1992).
- 106) Muscari C., Frascaro M., Guarnieri C., Caldarera C. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1015**, 200–204 (1990).
- 107) Fulle S., Di Donna S., Puglielli C., Pietrangelo T., Beccafico S., Bellomo R., Protasi F., Fano G., *Exp. Gerontol.*, **40**, 189–197 (2005).
- 108) Rikans L. E., Moore D. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **966**, 269–275 (1988).
- 109) Sohal R. S., Arnold L., Orr W. C., *Mech. Ageing Dev.*, **56**, 223–235 (1990).
- 110) Barja de Quiroga G., Pérez-Campo R., López Torres M., *Biochem. J.*, **272**, 247–250 (1990).
- 111) Carrillo M. C., Kanai S., Sato Y., Kitani K., *Mech. Ageing Dev.*, **65**, 187–198 (1992).
- 112) Danh H. C., Benedetti M. S., Dostert P., *J. Neurochem.*, **40**, 1003–1007 (1983).
- 113) Liu J., Mori A., *Mech. Ageing Dev.*, **71**, 23–30 (1993).
- 114) Tsay H. J., Wang P., Wang S. L., Ku H. H., *J. Biomed. Sci.*, **7**, 466–474 (2000).
- 115) Rao G., Xia E., Richardson A., *Mech. Ageing Dev.*, **5**, 49–60 (1990).
- 116) Sohal R. S., Svensson I., Brunk U. T., *Mech. Ageing Dev.*, **53**, 209–215 (1990).
- 117) Sohal R. S., Ku H. H., Agarwal S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 7–11 (1993).
- 118) Barja G., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **854**, 224–238 (1998).
- 119) Brunet-Rossinni A. K., *Mech. Ageing Dev.*, **125**, 11–20 (2004).
- 120) Janssens B. J., Childress J. J., Baguet F., Rees J. F., *J. Exp. Biol.*, **203**, 3717–3725 (2000).
- 121) Cutler R. G., *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **3**, 321–348 (1984).
- 122) Cutler R. G., *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**, 373S–379S (1991).
- 123) Sohal R. S., Sohal B. H., Brunk U. T., *Mech. Ageing Dev.*, **53**, 217–227 (1990).
- 124) Duranteau J., Chandel N. S., Kulisz A., Shao Z., Schumacker P. T., *J. Biol. Chem.*, **273**, 11619–11624 (1998).
- 125) Mittler R., Berkowitz G., *Redox Rep.*, **6**, 69–72 (2001).
- 126) Reth M., *Nat. Immunol.*, **3**, 1129–1134 (2002).
- 127) Forman H. J., Fukuto J. M., Torres M., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **287**, C246–C256 (2004).