

総説：秋田大学医学部保健学科紀要13(2)：23-30, 2005

活性酸素に関する実験系の基礎的概念について —男性不妊の実験モデルを参考に—

兒 玉 英 也 渡 邊 竹 美 糠 塚 亜 紀 子

要 旨

活性酸素によりもたらされる酸化ストレスによる細胞障害は、近年の医学研究の大きな関心事である。本稿では、活性酸素に対する基礎的な知識を解説するとともに、活性酸素に関するいくつかの実験主義について、著者が経験した男性不妊の実験モデルを例に解説した。培養系で活性酸素の細胞への影響を調べる場合、活性酸素産生酵素がしばしば使用される。臓器や生体の活性酸素のレベルを知りたい場合、活性酸素により障害を受けた物質の量（過酸化脂質や8-ヒドロキシデオグアノシンなど）を測定し、間接的に活性酸素のレベルを評価する。ある生物現象に酸化ストレスが関与するかを検討したい場合の最も基本的なアプローチは、活性酸素消去酵素や活性酸素の産生の抑制剤によりその現象が影響を受けるかどうか検討することである。通常活性酸素は細胞にとって有害な分子であるが、様々な生物作用において生理的な作用も示すので、注意が必要である。

1. 緒 言

好気性生物にとって、酸素は呼吸によるエネルギー獲得に必須な分子であるが、酸素の代謝過程で中間産物として産生される活性酸素も生理的に重要な分子であり、病原菌の殺菌作用等、生命の維持に重要な働きを担っている。しかしこの活性酸素は反応性が極めて高いことから、無秩序に産生されると生体にとって極めて有害な分子となる。細胞には過剰な活性酸素の影響を除去する為の様々な防御機構が常に機能しており、通常の状態では活性酸素の細胞障害作用が顕性化することは無い。しかし、何らかの原因でこの防御ラインが崩れると、細胞は活性酸素の攻撃である酸化ストレスに脅かされる。近年、この酸化ストレスによる細胞障害は、加齢による細胞の退行性変化、発癌、突然変異、慢性疾患の発生機序等、細胞の様々な病理学的変化に広く関わっていることが明らかとなっている¹⁾。

本稿では、活性酸素に対する基礎的な知識を解説す

るとともに、活性酸素に関する実験手技の基本的な概念について、著者が経験した男性不妊の実験モデルを例に解説したい。

2. 活性酸素に関する基礎知識

1) 活性酸素とは

空気中の酸素分子は安定しているが、好気性生物が呼吸し新陳代謝をしているときに一部の酸素が電子の安定性を失った不安定な状態（付対電子）となり、これを活性酸素とよぶ。活性酸素は他から電子を引き抜いたり、水素原子を得たりして「他者を酸化して自らは安定化する」という性質を有する。この、活性酸素の酸化力は非常に強いので、過剰に産生されると正常な細胞にとっては大いなる脅威となる²⁾。

2) 活性酸素の種類

生体には様々な活性酸素種が存在するが、その中

で重要なものは、酸素が水分子に代謝される過程で産生されるスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) と過酸化水素 (H_2O_2)、およびこの代謝過程に金属イオンが存在すると産生されるヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) の三種類が主要なものである。これらの活性酸素は、それぞれ反応性、半減期が異なり、それぞれ特徴がある。活性酸素の主要な代謝経路を、図1に示す。

スーパーオキシドは、通常酸素分子に電子が1個取り込まれた還元体で、酸素が水に代謝される経路で一次的に産生される。反応性が弱く半減期も短いことから、スーパーオキシド自体は比較的毒性の低いものである。また、スーパーオキシドはイオンであるため、通常は細胞膜を通過することはできないと考えられている。

過酸化水素は、通常酸素分子に電子が2個取り込まれた還元体で、スーパーオキシドの代謝過程で生成される他に、生体内の酵素反応で広く産生されている。過酸化水素自体の毒性は弱いですが、半減期が長いこと一たび産生されると比較的長く留まる性格を有し、これから述べるヒドロキシラジカルへ転換すると細胞の損傷の原因となる。

ヒドロキシラジカルは極めて反応性の高い分子で、酸素分子に電子が3個取り込まれた還元体である。生体内では過酸化水素とスーパーオキシドの相互反応に基づくハーバーワイス反応や、過酸化水素から金属イオンを触媒とするフェントン反応によって産生されると考えられている。一般に、生体の構造物の酸化ストレスによる様々な損傷は、この分子の生成によりもたらされると考えられている。ヒドロキシラジカルは極めて高い反応性を有する一方で半減期は極めて短かく、その影響は極めて局所的、限定的となる。

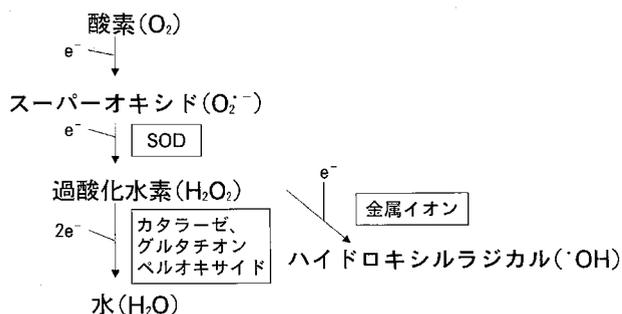


図1 活性酸素の主要な代謝経路

生体内で酸素が水分子に代謝される過程で産生される主要な活性酸素は、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、およびこの代謝過程に金属イオンが存在すると産生されるヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) の三種類である。

3) 活性酸素の細胞障害について

活性酸素は極めて反応性に富む分子で、一旦放出されると最初に出会った細胞の構造物と速やかに反応する。この場合、たんぱく質、脂質、核酸、糖のすべての構成要素が、ターゲットとなりうる²⁾。

細胞膜はその性質上活性酸素のターゲットとなり易く、中でも膜脂質中の不飽和脂肪酸は最も酸化的損傷を受けやすい。脂肪酸は酸化されると過酸化脂質となり、さらに過酸化を受けた脂肪酸アシル基が隣接する脂肪酸の過酸化を引き起こすラジカルを産生する。このため、膜脂質の過酸化は周囲の膜脂質の脂肪酸へと連鎖する格好で広がっていくことになる。

核DNAの4種類の塩基はヒドロキシラジカルにより酸化的損傷を受けやすい部位である。損傷を受けた塩基のあるものは、8-ヒドロキシデオグアノシンのように、DNA複製時に異常な塩基対を形成する変異原となりうる。また、チミングリコールのような損傷は、DNAの複製を停止させる。このように、核DNAは酸化的損傷により、正常な複製機能を失ってしまい、このような過程は発癌や先天異常の発生などのメカニズムに深く関わっていると考えられている。

たんぱく質中のアミノ酸残基では、トリプトファン、チロシン、ヒスチジン、システインなどが特に酸化され易い。スーパーオキシドが一酸化窒素と結合したときに産生されるペルオキシナイトライトによるチロシン水酸基の硝酸化反応によっても、細胞膜のたんぱく質は損傷を受けやすい。

4) 活性酸素に対する防御機構

細胞は過剰な活性酸素の影響を除去する為の様々な防御機構を有している。その中でも最前線に位置するのが、グルタチオン、ビタミンC、SH基などの小分子と活性酸素消去酵素と呼ばれる酵素群である。これらは産生された活性酸素を、種々の細胞障害を及ぼす以前の段階で消去してしまう。活性酸素消去酵素として重要なのが、細胞質およびミトコンドリアに局在するSOD(スーパーオキシドジスムターゼ)で、これはスーパーオキシドを過酸化水素に変換する酵素である。パーオキシゾームに存在するカタラーゼと赤血球のミトコンドリアに局在するグルタチオンペルオキシダーゼは過酸化水素を消去する酵素である。グルタチオンペルオキシダーゼの作用により過酸化水素が消去される酵素反応では、グルタチオンが基質として利用されるが、このときグルタチオンは酸化されて酸化型のグルタチオンに

転換する。転換された酸化型グルタチオンはNADP依存性酵素であるグルタチオンリダクターゼの作用により還元され再利用される。細胞内の過酸化物はグルタチオン・S・トランスフェラーゼと呼ばれる酵素によっても消去される。

活性酸素の攻撃に対する第二の防御ラインに位置するのが α -トコフェノール（ビタミンE）や β -カロチンなどのビタミン類、並びにフォスホリピッド・ヒドロペルオキシド・グルタチオンペルオキシダーゼなどの酵素である。これらは活性酸素の損傷が周囲に広がらないように、働いている。例えば α -トコフェノールは、細胞膜に存在し、膜脂質の不飽和脂肪酸での過酸化物ペルオキシドの攻撃による連鎖反応を断ち切る役割を有している。 β -カロチンは、生体内でビタミンAへと生合成され、抗酸化作用を發揮する。

最終的な防御ラインに位置するのが種々の修復酵素である。脂質に関してはフォスフリパーゼA₂、GSH-ペルオキシダーゼなど、たんぱく質に関してはプロテアーゼやGSSH-リダクターゼなど、核酸に関してはエクソヌクレアーゼやエンドヌクレアーゼなどが該当する。これらは活性酸素で攻撃を受けた構造物を元通りの姿に修復する役割を担っている。

5) 医療における活性酸素の意義

酸化的ストレスによる組織損傷は、心臓血管病、癌、神経変性疾患、膠原病など、様々な慢性疾患の病態に関与するといわれているが、因果関係は必ずしも明瞭ではない。多くの場合、酸化的ストレスの増加は、何らかの疾患の原因というよりも、他の原因から引き起こされた結果と考えるべきである。しかし、生体の酸化的ストレスのレベルを減少させることが様々な慢性疾患の予防に働く可能性は、多くの研究で指摘されている。新鮮な野菜や果物が健康を維持し、慢性疾患の予防に働くのも、これらの食物が抗酸化物を多く含むことが主な要因であろう²⁾。

疫学的には、日常生活において酸化的ストレスを増加するといわれている環境要因がしばしば問題となり、喫煙、食品添加、ストレス、紫外線など、様々な要因が唱えられている。しかし、それが実際に疫学的に意味のあることなのかは、議論のあるところである。例えば、過度の運動は生体の活性酸素の産生を増加させるが、それが健康に悪影響を及ぼすとは必ずしも言えないであろう。疫学的な検討に酸化的ストレスを組み込む場合、その酸化的ストレスを増加させる要因も含めて検討する必要がある。

3. 活性酸素の実験系 — 男性不妊の実験から —

従来より、男性不妊の成立過程に関して、酸化的ストレスの関与が検討されてきている。ここでは、著者らが行った男性不妊に関する実験をモデルとして、活性酸素の実験の基本となる考え方を概説したい。

1) 活性酸素の添加実験

活性酸素の様々な細胞への影響を調べる場合、活性酸素を直接培養系に添加してその影響を観察する方法が考えられる。この場合、どのような活性酸素種を添加するかで、用いる試薬は異なる。スーパーオキシドを添加したい場合は、スーパーオキシドの生成系である酵素反応を利用するが、よく用いられるのはキサンチンオキシダーゼ活性酸素産生系である。過酸化水素は、比較的安定で試薬として入手できるので、そのまま添加可能である。ヒドロキシルラジカルを直接添加したい場合は、硫酸第二鉄とアスコルビン酸の反応を用いるのが簡便な方法である³⁾。

キサンチンオキシダーゼ活性酸素産生系による、スーパーオキシドの生成反応を図2に示した。キサンチンがキサンチンオキシダーゼの作用により尿酸に転換される過程で、スーパーオキシドと過酸化水素が産生される。スーパーオキシドだけを添加したい場合は、過酸化水素の消去酵素であるカタラーゼと同時に投与すればよい。培養系への添加実験の場合、スーパーオキシドはイオンである性質上、細胞膜を通過せず、過酸化水素は容易に細胞膜を通過すると考えられており、この点も実験結果を分析する上で考慮しなければならない。また、この系では、金属イオンの存在によって、過酸化水素からヒドロキシルラジカルも発生する場合がある。ヒドロキシルラジカルを消去したい場合は、マンニトール

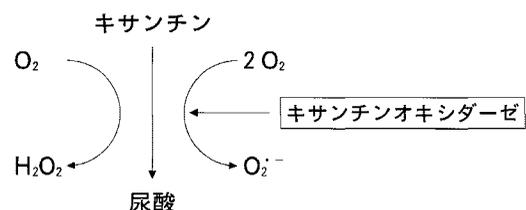
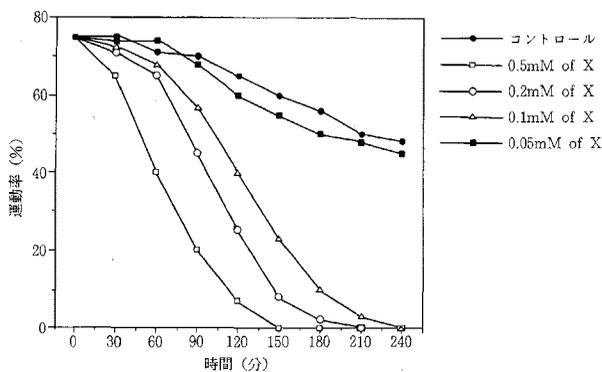


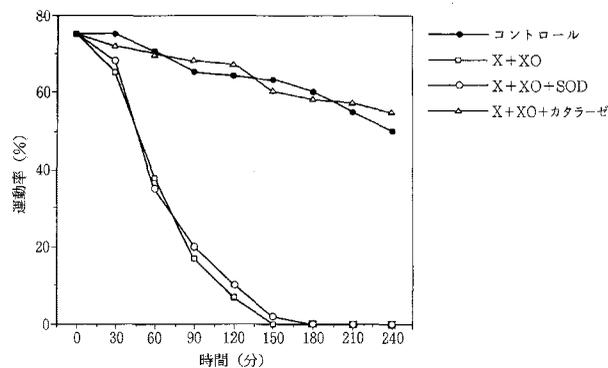
図2 キサンチンオキシダーゼ活性酸素産生系

キサンチンを基質として、キサンチンオキシダーゼの作用により尿酸に転換される過程で、スーパーオキシドと過酸化水素が同時に産生される。通常、発生したスーパーオキシドは、速やかに過酸化水素へと転換される。



(a)

a: マウスの精巣上体から精子を採取し、精子懸濁液を作成した。そこに、キサンチンオキシダーゼ (XO) の濃度を一定 (20mU/ml) とし、異なった濃度のキサンチン (X) を添加し、経時的に精子の運動率を観察した。0.1mM 以上の濃度のキサンチンを添加した場合に精子運動性は急速に減少した (データは 6 回の実験の平均値)。



(b)

b: キサンチンオキシダーゼ 20mU/ml とキサンチン 0.1mM のキサンチンを加えると、精子の運動率は急速に減少する。この系に SOD を同時に加えても精子運動率の減少率に影響は認めなかったが、カタラーゼを同時に添加すると精子の運動率の減少はコントロールレベルまで改善した (データは 6 回の実験の平均値)。

図 3 キサンチンオキシダーゼ活性酸素産生系のマウス精子運動能に対する影響

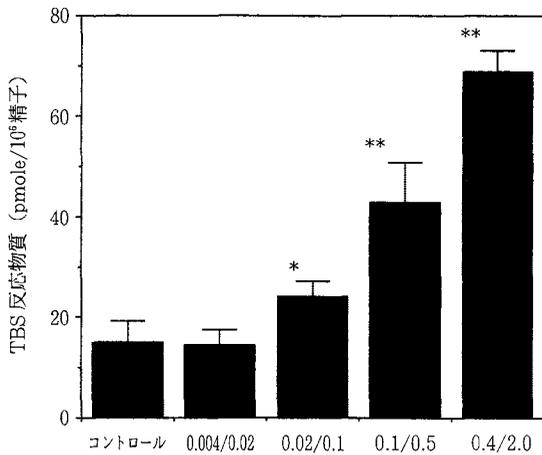
などのヒドロキシルラジカル消去剤と同時に投与することが考えられるが、ヒドロキシルラジカルの反応が極めて早いため、その評価は難しい³⁾。

図 3 は、キサンチンオキシダーゼ活性酸素産生系のマウス精子運動能に対する影響を検討した成績である⁴⁾。キサンチンオキシダーゼの濃度を一定とし、異なった濃度のキサンチンを精子懸濁液に添加し、経時的に精子の運動率を観察した (図 3 a)。0.1 mM 以上の濃度のキサンチンを添加した場合に精子運動性は急速に減少した。この実験系で重要なことは、異なった濃度で活性酸素を添加したい場合に、キサンチンオキシダーゼの量を一定として、基質であるキサンチンの量を増減することである。この逆をやると、キサンチンオキシダーゼの増加により反応速度は上昇するが、最終的な活性酸素の産生量には変化がない場合があるので、注意が必要である。図 3 b は、この系における活性酸素消去酵素の影響を検討した成績である。0.1mM のキサンチンと SOD を同時に加えても精子運動率の減少率に影響は認めなかったが、カタラーゼをキサンチンと同時に添加するとその運動率の減少はコントロールレベルまで改善した。従って、キサンチンオキシダーゼ活性酸素産生系においてマウス精子の障害作用を担う活性酸素種はスーパーオキシドではなく、過酸化水素であると考えられた。

2) 酸化的ストレスの測定

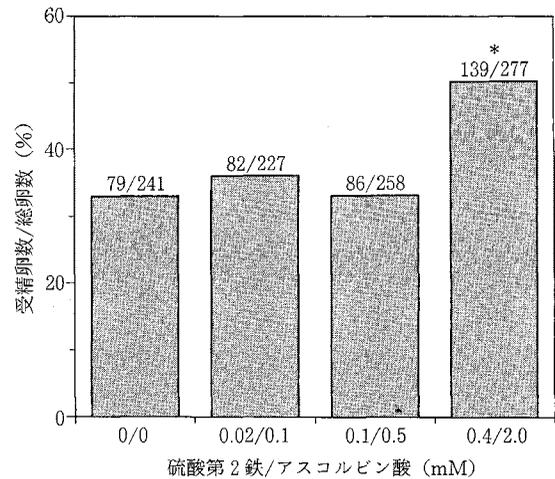
一般に我々が行う臨床研究で細胞や組織、さらに生体がどれだけ酸化ストレスにさらされているかを評価する目的で、その目標となっているサンプルの活性酸素レベルを測定したい場合がある。その場合、活性酸素自体がきわめて半減期が短く組織に留まることがないことから、活性酸素の濃度を直接測定することは不可能である。そこで、それに変わる方法として、活性酸素により障害を受けた物質の量を測定し、間接的に活性酸素のレベルを評価することが行われる。どのような物質を測定するかは、その実験の目的により選択することになる³⁾。

一般に、酸化ストレスの指標としてよく利用されているのが過酸化脂質で、血中や組織での測定が可能である。特に、細胞膜の酸化的損傷を評価する場合、細胞膜の不飽和脂肪酸が主要なターゲットとなるので好都合である。図 4 a に、硫酸第二鉄とアスコルビン酸 (ヒドロキシルラジカル産生反応) をマウス精子に添加し、過酸化脂質の量を TBA 法により測定した成績を示す⁵⁾。硫酸第二鉄/アスコルビン酸濃度を 0.02/0.1mM 以上で添加すると、精子の過酸化脂質の量が増加する。一方で図には示していないが硫酸第二鉄/アスコルビン酸の添加による精子の運動率への影響を観察すると、運動率の減少が起こるのは硫酸第二鉄/アスコルビン酸の濃度は 2.0/1.0mM 以上であった。したがって、マウス精子に硫酸第二鉄/アスコルビン酸の濃度を 0.02/0.1



(a)

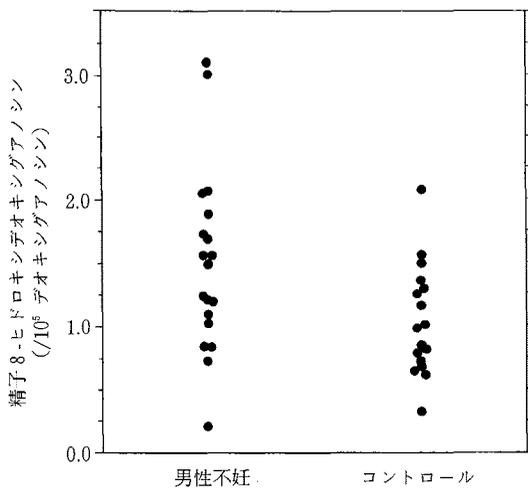
a : マウスの精巣上体から精子を採取し、濃度の異なった硫酸第二鉄とアスコルビン酸を添加して一時間培養した後に回収し、過酸化脂質の量を TBA 法により測定した。硫酸第二鉄/アスコルビン酸濃度を 0.02/0.1mM 以上で添加した場合、精子の過酸化脂質の量は有意に増加した (* <0.05 , ** <0.01 , 平均値+SE, n=5)。



(b)

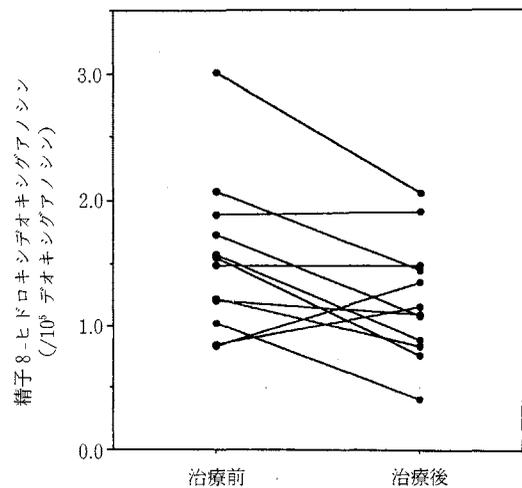
b : マウスの精巣上体から採取された精子を 0.02/0.1 から 0.4/2.0mM の間の濃度の硫酸第二鉄/アスコルビン酸で 1 時間処理し、薬剤を取り除いた後、マウス卵子への体外受精を行い、受精率を検討した。実験結果は 7 回の実験での受精卵数/総媒精卵数の合計の割合を示す。その結果、0.4/2.0mM の濃度で処理した精子は、通常の精子よりも高い受精率を示した (* <0.01)。

図4 マウス精子膜の過酸化障害の体外受精率への影響



(a)

a : WHO の判定基準を満たす男性不妊患者 19 例と健常男性 20 例の精子の 8-ヒドロキシデオグアノシン量を、高速液体クロマトグラフィーに接続した電気化学検出器により検出した。男性不妊患者の精子の 8-ヒドロキシデオグアノシン量は健常男性のそれと比較して有意に高値であった ($p<0.05$)。



(b)

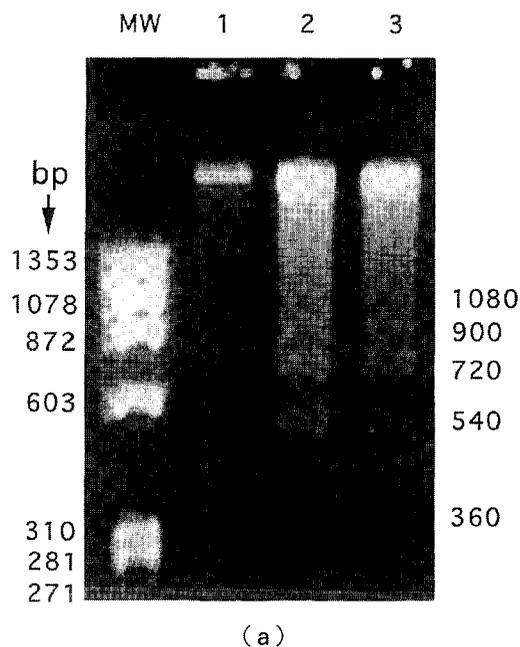
b : 12 例の男性不妊患者に抗酸化作用を有する薬剤 (ビタミン E 200mg/day, ビタミン C 200mg/day およびグルタチオン 400mg/day) を 2 カ月間内服させ、治療の前後で精子の 8-ヒドロキシデオグアノシン量を測定した。治療により、精子の 8-ヒドロキシデオグアノシン量は有意に減少が認められた。

図5 男性不妊患者の精子の酸化 DNA 量の定量

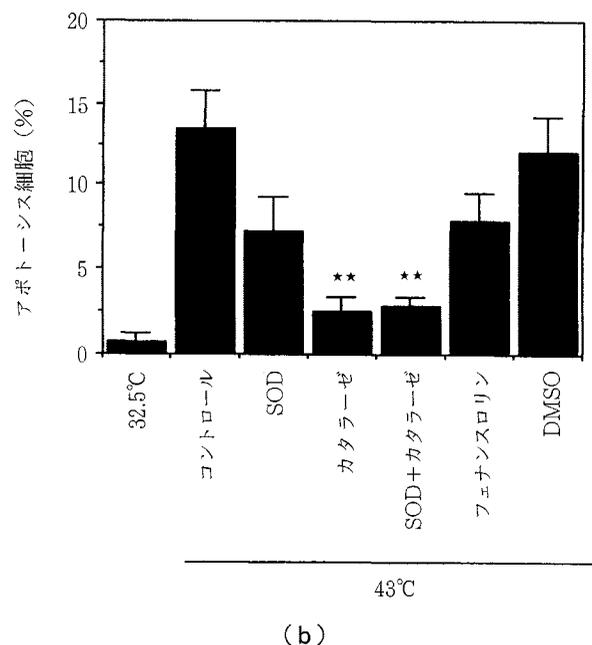
から0.4/2.0mMの間の濃度で添加すると、膜の過酸化脂質量は増加するが運動率は減少しないことになる。このような方法で膜の過酸化障害を付加した精子を体外受精の方法で受精させ、受精率を検討した成績を図4 bに示す。その結果、0.4/2.0mMの濃度で処理して膜の過酸化損傷を付加した精子は、通常の精子よりも高い受精率を示した。この実験結果は、少ない量の活性酸素のストレスにより精子の受精能力が促進される可能性を示しており、活性酸素の生理的な意義を示唆するものとして興味深い。このように、活性酸素は様々な生物作用において、生理作用の一翼を担っている可能性が指摘されている。

DNAの酸化的損傷を評価したい場合には、核8-ヒドロキシデオグアノシンの測定がよく用いられ、生体では尿中の評価がしばしば行われている。以前は、高速液体クロマトグラフィーに接続した電気化学検出器により検出していたが、最近では簡便なキットも市販されている。男性不妊の精子核8-ヒドロキ

シデオグアノシン量を測定した成績を、図5 aに示す^{6, 7)}。WHOの判定基準を満たす男性不妊患者19例の精子核の8-ヒドロキシデオグアノシン量は健康男性20例のそれと比較して有意に高く、男性不妊の精子には酸化的ストレスによるDNA損傷が高頻度で起きていると考えられた。体外受精などの不妊治療において異常なDNAを有する精子を顕微授精などの技術で受精させた場合、胚の発生障害、着床障害、流産および先天性異常の原因となることが危惧される。そこで、男性不妊の症例に対して抗酸化作用を有する薬剤（ビタミンE、ビタミンCおよびグルタチオン）を2カ月間内服させたところ、精子の精子核8-ヒドロキシデオグアノシン量に減少が認められた（図5 b）。抗酸化剤の内服により男性不妊の酸化的DNA損傷を減少させることが、胚の正常な発育をもたらす可能性のあることを示した実験結果と考えられる。



a: 生後40日齢のラットから精細胞を分離して熱ストレスを加えて培養し、4時間後にDNAを抽出してアガロース電気泳動をによりアポトーシスによるDNAの断片化を検討した。精子にとっての常温である32.5°Cで培養すると、精細胞にアポトーシスはほとんど起こらない（レーン1）しかし、37.0°Cで培養したもの（レーン2）、43.0°Cで1時間だけ熱ストレスを付加したもの（レーン3）では、アポトーシスに特有なDNAの断片化が検出された。



b: 43.0°Cで1時間培養した後、32.5°Cで培養して24時間後にフローサイトメトリーによりアポトーシス細胞を定量すると、約15%のアポトーシス細胞が検出される。この系に、も各種の活性酸素消去酵素ないしは抗酸化物質を添加して、熱ストレスによる精細胞のアポトーシス誘導に活性酸素が関与しているかどうかを検討した。その結果、カタラーゼの添加によりアポトーシスは有意に抑制され、熱ストレスによる精細胞のアポトーシス誘導に、過酸化水素の発生が関与していることが示された。

図6 精細胞の熱ストレス誘発アポトーシスにおける活性酸素の意義

3) 酸化ストレスの関与をみる実験系

—精細胞のアポトーシスに関する実験から—

ある生物現象に酸化ストレスが関与するかを検討したい場合の最も基本的なアプローチは、活性酸素の消去によりその現象が影響を受けるかを検討することである。活性酸素を消去するには、簡便な方法として、活性酸素消去酵素や活性酸素の産生を抑える薬剤の投与が考えられる。ここでは著者らが行った、精細胞のアポトーシスに関する実験系で、その概要を解説したい。

ヒトを含む多くの哺乳類では、造精過程が営まれる精巣および精巣上体は腹腔外に存在し、腹腔内よりも低温・低酸素分圧環境にある。精巣の温度が上昇すると、精細胞は「細胞自らのプログラムによる能動的な細胞死」と定義されるアポトーシスの機序に基づいて消失する。一般に活性酸素は多くの例でアポトーシスの誘導因子として位置づけられていることから、我々はこの熱ストレスによる精細胞のアポトーシス誘導に活性酸素が関与しているか否かを検討した⁸⁻¹⁰⁾。

精細胞の熱ストレス誘発アポトーシスにおける活性酸素の意義を検討した実験結果の一部を図6に示す⁹⁾。生後40日齢のラットから精細胞を分離して熱ストレスを加えて培養すると、アガロース電気泳動によりアポトーシス細胞に特有のDNAの断片化が観察される。アポトーシス細胞の増加は、43.0°Cで1時間培養した後で、32.5°Cで培養した場合に、24時間後に約15%に達する。この系に各種の活性酸素消去酵素ないしは抗酸化物質を添加して、熱ストレス誘発アポトーシスに活性酸素が関与しているか検討した。その結果、カタラーゼの添加がアポトーシスを有意に抑制し、熱ストレスによる精細胞のアポトーシス誘導に、過酸化水素の発生が関与していることが示された。

停留精巣や精巣静脈瘤は、精巣の温度上昇による男性不妊の原因の一つでもあるが、その精子消失のメカニズムは明らかでない。著者らは、活性酸素の産生を抑制する薬剤であるアロプリノール（キサントキシンダーゼ抑制剤）を用いた停留精巣の実験系で、活性酸素の関与を明らかにした¹⁰⁾。興味ある方は、そちらも参照されたい。

4. 結 び に

活性酸素の実験系を考える場合、まず活性酸素の性質を十分理解した上で、実験を構築する必要がある。臨床研究では、様々な状況で酸化ストレスの関与が

考えられる場面に遭遇すると思われるが、酸化ストレスの評価には様々なアプローチがあり、実験の目的にあった手法を選択する必要がある。また、酸化ストレスは有害であるという一元的な発想は必ずしも正解ではなく、生体が活性酸素による酸化ストレスを生理的なものとして役立てている場合も少なくないことを、頭の片隅に入れておく必要がある。本稿が、臨床研究の導入に当たって、活性酸素の正しい理解と、酸化ストレスに関する実験系の基礎的な理解に役立つことを期待する。

文 献

- 1) 活性酸素, 八木國夫, 中野稔 (監), : 二木鋭雄, 島崎弘幸 (編), 医歯薬出版株式会社, 東京, 1991年
- 2) マシューズ, 他: カラー生化学, 清水孝夫, 他 (監), 西村書店, 新潟, 2003年, pp425-428
- 3) 活性酸素実験プロトコル, 谷口直之 (監), 秀潤社, 東京, 1994年
- 4) Kodama H, Fukuda J, et al.: Investigation of cytotoxic effect of reactive oxygen species on mouse spermatozoa. *Jpn J Fertil Steril* 40: 66-72, 1995
- 5) Kodama H, Gagnon C, et al.: Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl.* 17: 151-157, 1996
- 6) Kodama H, Yamaguchi R, et al.: Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 68, (1997) 519-524
- 7) 兒玉英也, 福田淳, 他: 男性不妊に対する薬物療法—抗酸化療法の効果をめぐって— *産婦の世界* 48: 167-171, 1996年
- 8) Ikeda M, Kodama H, et al.: Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod* 61: 393-399, 1999
- 9) 熊谷仁, 兒玉英也, 他: 酸化ストレスと造精機能. *産と婦* 65: 889-895, 1998
- 10) Kumagai A, Kodama H, et al.: Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* 8: 118-123, 2002

Basic Concept of Radical Oxygen Species Studies with Reference to Studies on Male Infertility

Hideya KODAMA Takemi WATANABE Akiko NUKAZUKA

Course of Nursing, School of Health Sciences, Akita University

Recently a number of medical studies have focused on cell damage induced by radical oxygen species (ROS) attack, so-called oxidative stress. This review describes basic knowledge on ROS and the concept of some experimental methods relating to ROS, making reference to our studies on male infertility. The ROS generating enzymes are sometimes used to investigate the effect of ROS on various cells in a culture system. The levels of ROS in tissues or bodies can be measured indirectly by detection of products of ROS-mediated reactions, such as fatty acid peroxide or 8-hydrox-2'-deoxyguanosine. Whether ROS is involved in a certain biological process can be investigated by experiment using inhibitors of ROS generations or ROS scavengers. Although the effects of ROS are usually deleterious to cells, we should be cautious as they are sometimes useful for various biological processes.