

男子不妊症患者精漿中トコフェロール同族体濃度

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

桐山 竜夫・眞田 俊吾

野々村 光生・吉田 修

京都大学医学部附属病院薬剤部 (主任: 堀 良平教授)

安原 真人・岩崎 優子

堀 良平

VITAMIN E LEVELS OF PLASMA AND SEMINAL
PLASMA IN INFERTILE MEN

Tadao KIRIYAMA, Shungo SANADA, Mitsuo NONOMURA,

Osamu YOSHIDA, Masato YASUHARA*,

Yuko IWASAKI* and Ryohei HORI*

*From the Department of Urology (Chairman: Prof. O. Yoshida, M.D.)**and the Pharmacy* (Chairman: Prof. R. Hori, M.P.),**Faculty of Medicine, Kyoto University*

Vitamin E was discovered in 1922 as antisterility vitamin. Recently it has been known to have an effect of antioxidation as free radical scavenger that prevents from damage of cellular membrane subsequently to production of free radical. In order to know what part vitamin E takes in idiopathic male infertility, vitamin E levels of plasma and seminal plasma were measured in 33 patients by high-speed liquid chromatography.

There was no significant correlation between vitamin E concentrations in plasma and seminal plasma ($r=0.14$). One case was excluded from following analyses because of an extraordinarily high serum level of $33.8 \mu\text{g/ml}$. Alpha-tocopherol concentration was $8.77 \pm 2.93 \mu\text{g/ml}$ in plasma and $0.22 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ in seminal plasma. Plasma concentration of β - and γ -tocopherol was 0.08 ± 0.04 and $0.82 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$, respectively. These two types of tocopherol were undetectable in seminal plasma. Delta-tocopherol was not detected both in plasma and seminal plasma. When the 32 patients were classified into 3 groups of sperm concentration of more than $40 \times 10^6/\text{ml}$, from 39 to $20 \times 10^6/\text{ml}$ and less than $19 \times 10^6/\text{ml}$, and 2 groups of motility rate of more than 60% and from 59 to 30%, and when relationships between either of α -tocopherol level in plasma or seminal plasma and sperm concentration or motility rate were analyzed, none of significant difference was noted.

Plasma concentration of α -tocopherol after oral administration of tocopherol acetate of 150 to 300 mg a day for 14 to 42 days was about 2 times as high as concentration before the administration in each of 5 patients. Seminal plasma concentration of α -tocopherol after the administration was almost the same as concentration before the administration in 4 patients and about 2 times as high as in other 2 patients.

Key words: Mele infertility, Seminal plasma, Vitamin E, Tocopherol

緒 言

ビタミンEは、1922年 Evans and Bishop¹⁵⁾ によって雌性ラットにおける妊娠維持の食餌性因子として発見された。その後1936年 Evans et al.¹⁶⁾ によって麦芽油から分離された。1938年 Fernholz¹⁷⁾ によって構造式が決定され、同時に Karrer et al.²⁵⁾ によって合成された。

ビタミンE欠乏の重要な影響の1つに生殖器に与える障害がある。このためビタミンEは抗不妊ビタミン (antisterility vitamin) とも呼ばれていた。この生殖器に与える障害作用はラットでもっとも強くあらわれ、ビタミンE欠乏雌性ラットでは胎児は妊娠10日前後に死亡する。一方雄性ラットでは胚上皮の変性を起こし、これは非可逆性である。

しかし、ビタミンEのこの作用機序が全く解明されず、また明らかな治療成績が評価されることなしに男子不妊症の治療に用いられてきた。近年、細胞膜障害作用をもつ過酸化脂質などの過酸化物質に対する抗酸化剤 (antioxidant) として働くビタミンEのいわゆる scavenger 作用が注目されている。

その具体的な例として食餌中のビタミンEや不飽和脂肪酸の量がラットの生殖能に影響を及ぼし、抗酸化剤の投与はビタミンEの抗不妊作用と拮抗する⁹⁾ ことを挙げる。

男子不妊症の成因が不明で有力な治療方法がない現在、これらの見地から改めてビタミンEのもつ抗不妊効果を検討する必要があると考えて、まず男子不妊症患者の精漿中ビタミンE濃度を測定したのでその成績を発表する。

対 象 と 方 法

対象とした症例は、1980年8月から10月の3か月間に京都大学医学部附属病院泌尿器科不妊外来を受診した特発性の男子不妊症患者33名である。いずれも2年以上の不妊を主訴とし、その妻は産婦人科学的には正常である。精液の採取は4ないし7日の禁欲後、手法的に行なった。約30分ないし1時間室温に放置後精液検査を施行した。2500 rpm 15分で精漿を分離し、測定まで凍結保存した。血液の採取は精液の採取30分ないし1時間後に前腕皮静脈より行なった。

ビタミンE濃度の測定は高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いる阿部・勝井の方法⁵²⁾ に準拠して行なった。すなわち、血漿もしくは精漿 0.2 ml に内部標準物質として tocol を含む ethanol 0.5 ml を加えて混和した後、n-hexane 5 ml を加えて1分間振盪

する。遠心分離 (2500 rpm, 10分間) 後、有機層 4 ml とり、窒素ガス気流下に溶媒を留去する。残渣を 0.1 ml の n-hexane に溶解し、その 20 μ l をカラムに注入した (Fig. 1)。カラムは ZORBAX SIL (4.6 $\times$ 250 mm) を用い、移動相は n-hexane: isopropylalcohol (99.5:0.5)、流速 2.0 ml/min とした。島津高速液体クロマトグラフ LC-3A を用い、検出には蛍光分光光度計 (島津 RF-500LC, Ex. 298 nm, Em. 325 nm) を使用した。

Vitamin E assay

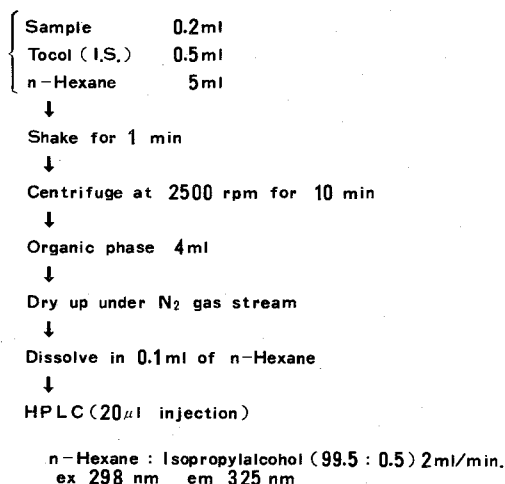


Fig. 1. Method of vitamin E assay

なお上記の条件での α -, β -, γ -, δ -トコフェロールおよびトコールの t_R はそれぞれ 4.0, 7.4, 8.2, 16.6 および 20.2 分であった (Fig. 2)。

成 績

血漿 α -トコフェロール値が 33.8 μ g/ml と異常に高値であった1例を除いた32例 (年齢: 26~38歳, 平均 31.13 $\pm$ 3.25 歳) の血漿および精漿ビタミンE濃度はTable 1に示すとおりである。血漿 α -トコフェロール値は 8.77 $\pm$ 2.93 μ g/ml, β -トコフェロール値は 0.08 $\pm$ 0.04 μ g/ml, γ -トコフェロール値は 0.82 $\pm$ 0.36 μ g/ml であった。精漿 α -トコフェロール値は 0.22 $\pm$ 0.09 μ g/ml で血漿値と比較すると 39.9 分の1であった。なお β -および γ -トコフェロールは精漿で、 δ -トコフェロールは血清および精漿の両方で検出不能であった。

33例で血清および精漿 α -トコフェロール濃度との間の相関関係を検定したが $r=0.14$ と相関は認められなかった (Fig. 3)。

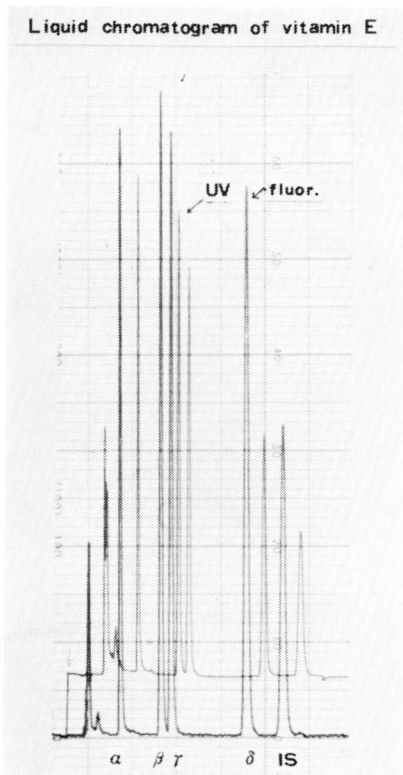


Fig. 2. Liquid chromatogram of vitamin E

Table 1. Vitamin E level of plasma and seminal plasma in male infertile patients

	Plasma	Seminal plasma
α -tocopherol	8.77 ± 2.93	0.22 ± 0.09
β -tocopherol	0.08 ± 0.04	0
γ -tocopherol	0.82 ± 0.36	0
δ -tocopherol	0	0
n	32	32

つぎに α -トコフェロールの精漿所見に及ぼす影響を検討する目的で32症例を精子濃度に基づいて3群に分けた。すなわち精子濃度 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上を第1群 ($n=11$, 30.9 ± 4.09 歳), 精子濃度 $39 \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$ を第2群 ($n=9$, 31.89 ± 3.18 歳), 精子濃度 $19 \times 10^6/\text{ml}$ 以下を第3群 ($n=12$, 30.75 ± 2.56 歳) とした (Table 2)。血清 α -トコフェロール濃度はそれぞれ $7.77 \pm 2.01 \mu\text{g}/\text{ml}$, $10.92 \pm 3.41 \mu\text{g}/\text{ml}$, $7.99 \pm 2.58 \mu\text{g}/\text{ml}$ で有意の差は認められなかった (Fig. 4)。精漿 α -トコフェロール濃度もそれぞれ $0.23 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{ml}$, $0.21 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{ml}$, $0.22 \mu\text{g} \pm 0.10 \mu\text{g}/\text{ml}$ とほぼ等値であった。すなわち精漿トコフェロール濃度は精子濃度の如何を問

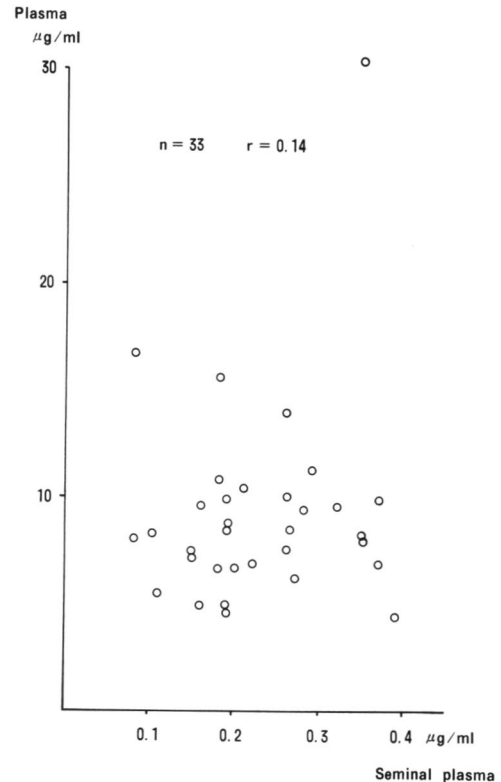
Fig. 3. Relationship between α -tocopherol concentrations in plasma and seminal plasma

Table 2. Age distributions of the patients studied

Age : 31.13 ± 3.25 (26 ~ 38) years of age, n = 32	
Grouping on sperm count	
Group 1 (more than $40 \times 10^6/\text{ml}$)	30.91 ± 4.09 , n = 11
2 (between $39 \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$)	31.89 ± 3.18 , n = 9
3 (less than $19 \times 10^6/\text{ml}$)	30.75 ± 2.56 , n = 12
Grouping on motility rate	
Group 1 (more than 60%)	31.05 ± 3.77 , n = 21
2 (more than 30%)	31.00 ± 1.87 , n = 5
3 (less than 29%)	n = 0

わず同値であった (Fig. 5)。

つぎに32症例を精子運動率に基づいて2群, すなわち, 60%以上の第1群 ($n=21$, 31.05 ± 3.77 歳) とそれ以下の第2群 ($n=5$, 31.00 ± 1.87 歳) の2群に分けて (Table 2), α -トコフェロールの精子運動率に及ぼす影響を検討した。血漿 α -トコフェロール値は第1群で $8.77 \pm 3.18 \mu\text{g}/\text{ml}$, 第2群で $10.08 \pm 2.50 \mu\text{g}/\text{ml}$ となり, 両者間に有意の差はなかった (Fig. 6)。精漿 α -トコフェロール値も第1群は $0.24 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{ml}$, 第2群は $0.22 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{ml}$ でほぼ等値であった (Fig. 7)。

1日 150 mg または 300 mg の α -トコフェロール

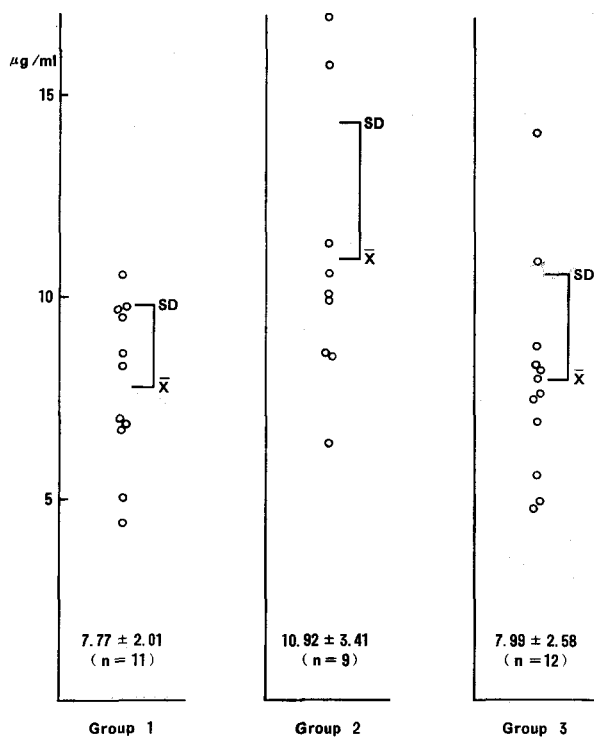


Fig. 4. Plasma concentrations of α -tocopherol in male infertile patients by grouping on sperm count

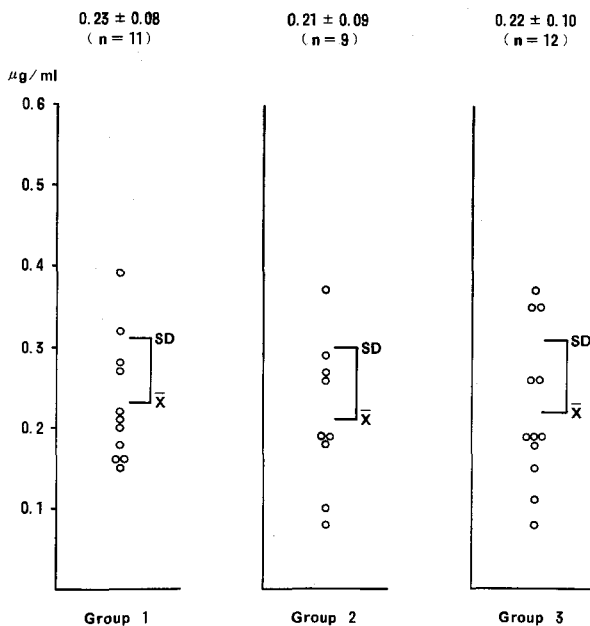


Fig. 5. Seminal plasma concentrations of α -tocopherol in male patients by grouping on sperm count

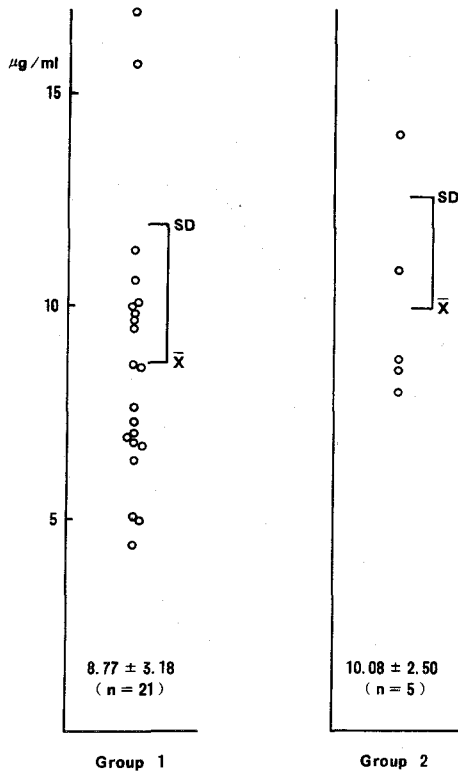


Fig. 6. Plasma concentrations of α -tocopherol in male infertile patients by grouping on motility rate

アセテートを14ないし42日間服用後の血漿および精漿 α -トコフェロール濃度を測定した。血漿濃度を測定した5例では全例で α -トコフェロール値が上昇し、投与前平均 $9.56 \mu\text{g/ml}$ が投与後 $18.90 \mu\text{g/ml}$ になった。増加率は1.3から3.1で平均2.2であった。投与前の値の低いものの方が投与後の値の増加が大きい傾向にあった (Fig. 8)。最終薬剤服用後5ないし6時間で採取した精液で、精漿の α -トコフェロール濃度を測定した6例では、2例で明らかな上昇をみたが他の4例では投与前とほぼ同値であった (Fig. 9)。すなわち、上昇をみた2例では、投与前値 $0.37 \mu\text{g/ml}$, $0.18 \mu\text{g/ml}$ は投与後それぞれ $0.64 \mu\text{g/ml}$, $0.38 \mu\text{g/ml}$ となり、増加率は2.1と1.7で平均1.9となり、血清 α -トコフェロール値の上昇と平行して増加するのが認められた。一方増加をみなかった4例での増加率の平均は1.1であった。 α -トコフェロール・アセテートの服用後血漿 α -トコフェロール値の増加と平行して精漿へ移行するものと、精漿へ全く α -トコフェロールが移行しないものとの2群が存在するような傾向を示したが、これは今後症例を増加させて結論づけたい。

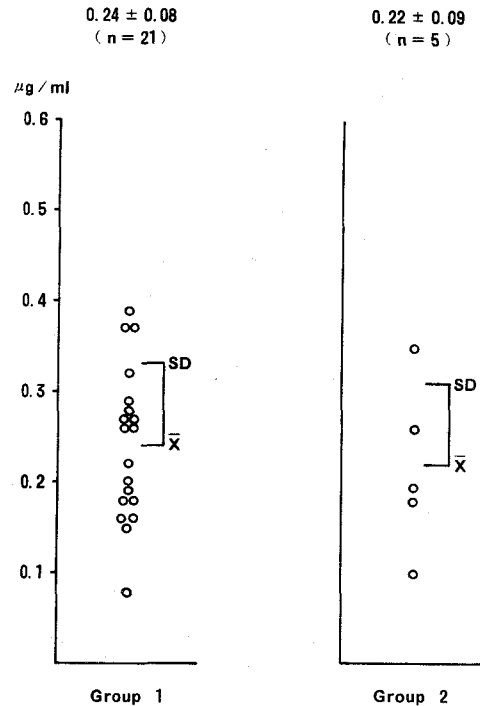


Fig. 7. Seminal plasma concentrations of α -tocopherol in male infertile patients by grouping on motility rate

考 察

前述のごとく、ビタミンEは抗不妊ビタミン (anti-sterility vitamin) として発見された。すなわち、ビタミンE欠乏食で飼育すると雌性ラットでは胎児は妊娠10日前後で死亡し、死亡した胎児は子宮内で吸収される。一方、雄性ラットでは胚上皮の著明な変性が起こり、これは不可逆的である。この生殖器に与える障害作用はラットでもっとも強くあらわれ、このため現在でもラット胎仔吸収試験としてビタミンEの生物学的活性測定法として利用されている。しかしビタミンE欠乏症には種属特異性³⁸⁾があり、ヒトにおける欠乏症が明確でなかったことやビタミンEの生理作用がむしろ非特異的であることもあって、ビタミンEの研究が遅れていた。

近年、ビタミンEの生理作用が解明されるにつれて、発見の動機となった抗不妊作用から全く離れ、生体抗酸化機能^{46~48)}や生体膜安定化作用^{13,32,33)}が生理作用の中心をなすものとして重視されるようになってきた。ここで、男子不妊症におけるビタミンEの役割を、吸収・分布・代謝・排泄などの薬力学的な動態や上記の生体抗酸化作用・生体膜安定化作用などの作用

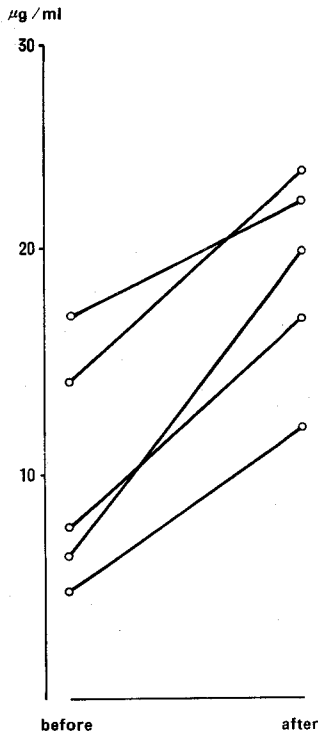


Fig. 8. Plasma concentration of α -tocopherol after oral administration of tocopherol acetate (150~300 mg/day for 14~42 days)

機序から改めて検討していく必要があると考えた。

生体内における不飽和脂肪酸の過酸化反応は自動酸化 (autoxidation) と呼ばれ, free radical による一連の連鎖反応によって進行する。ビタミンE欠乏動物ではこれらの脂質の過酸化反応が亢進している^{8,20)} ことや多価不飽和脂肪酸の投与はビタミンE欠乏症状の発現を促進する^{7,10,12,21)}。生体内における脂質の過酸化反応には正常な生理的なものと有害な病原的なものがあることが知られている。前者には prostaglandin endoperoxide synthetase によるアラキドン酸からプロスタグランジン PGH_2 の合成反応^{22,45)} と血小板における lipoxygenase によるアラキドン酸の反応⁴⁶⁾ がある。

有害な反応としては, ミクロソームで行なわれる NADPH 依存性のものと酸素に依存しないものがある²⁴⁾。薬物代謝に関連する cytochrome P-450 の反応は NADPH, O_2 , NADPH-cytochrome P-450 reductase, $ADP-Fe^{3+}$ を必要とし¹⁸⁾、したがって薬物代謝と脂質過酸化反応の関連性が指摘されている。フェノバルビタールなどで誘導すると脂質の過酸化反応が亢進し, 生成された過酸化物によって薬物代謝酵素

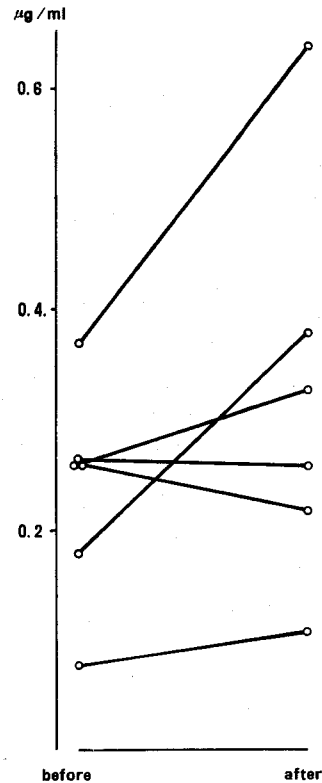


Fig. 9. Seminal plasma concentration of α -tocopherol after oral administration of tocopherol acetate (150~300 mg/day for 14~42 days)

活性の低下をきたす⁵¹⁾。これらの脂質の過酸化反応は singlet oxygen (1O_2) の quencher (消去剤) で阻害される²⁷⁾ことから, これらの反応の initiator として 1O_2 が作用していることが判明している^{27,39)}。

ミトコンドリアの存在下にアスコルビン酸やグルタチンなどを添加すると脂質の過酸化反応が亢進する。このような非酵素的な脂質過酸化反応でも superoxide anion ($-O_2^-$) が生成され⁴²⁾、これは superoxide dismutase の付加で阻害される²⁷⁾。これらのことから酵素的および非酵素的脂質過酸化反応の initiation には 1O_2 の生成という同一な機構が想定されている。

ビタミンEの細胞内分布は, 核³⁾、ミトコンドリア^{29,36)}、クロマチン²³⁾、および, ミクロソーム³⁶⁾などの細胞小器官の生体膜に存在し, ビタミンE欠乏時には膜透過性, 膜結合酵素の活性や微細構造の変化^{5,19,30,37)}が認められる。このためビタミンE欠乏症は membrane pathology から理解するべきものとの考え³⁷⁾もある。1) シアルル酸や過酸化水素による赤血球の酸化溶血はビタミンEで予防できる。2) 前

述のミクロソームにおける酵素の過酸化反応もミクロソーム膜に存在する非ヘム鉄タンパクの三次構造の異常による²⁰⁾もので、ビタミンEがこれの安定化に関与している^{6,13)}。3) ミトコンドリアにおいても同様な機構が考えられ³⁷⁾、ビタミンEの欠乏時には膜透過性³⁷⁾や内膜の微細構造の変化³⁰⁾が観察されている。

4) リソソームには protease や nuclease などの酸性加水分解酵素が存在する。リソソーム膜が障害されると、これらの酵素が細胞質中に放出されて細胞障害の原因となる。ビタミンE欠乏時にみられる筋細胞の萎縮や脳軟化症はリソソーム膜の脆弱化に起因する。

5) 副腎にはビタミンEが多く含まれ⁴⁴⁾、ビタミンEが欠乏すると副腎皮質のステロイド合成が低下する²⁸⁾。これは細胞膜結合酵素である adenyl cyclase の活性低下によるもので、ビタミンEは活性発現にリン酸を必要とする adenyl cyclase を膜リン脂質と関連しながら安定化しているものと想像されている。これら各種の生体膜の機能は膜の流動性と関連し、流動性は膜の構造の機能的表現でもある。ビタミンEは膜リン脂質の不飽和脂肪酸、とくにアラキドン酸残基と特異的に作用して膜流動性を抑制する^{14,32)}。これがビタミンEの膜安定化の機構と考えられている。

このビタミンEの膜安定化作用も従来の抗酸化作用で説明されている。 $\cdot\text{O}_2$ が細胞膜のリン脂質の二重結合を侵襲すると、この二重結合はみずから共役結合に変形すると同時に、隣接の多価不飽和脂肪酸の二重結合を連鎖反応的に分解し、hyperperoxide を形成していく、このため細胞膜自体と細胞膜結合の酵素タンパクが変性する。

生体側の抗酸化防禦機構として superoxide anion に対しては superoxide dismutase、 H_2O_2 に対しては catalase、active oxygen や free radical に対しては free radical scavenger、hydroperoxide に対しては glutathion peroxidase、過酸化脂質に対しては分子交換、すなわち、

- 1) O_2^- : superoxide dismutase
- 2) H_2O_2 : catalase
- 3) active O_2 } : free radical scavenger
free radical }
- 4) LOOH: glutathion peroxidase
- 5) PL-LOOH: molecular exchange with PL

の5つの機構が用意されている。

精子は特異的に高度に分化した細胞であり、精漿中に存在する自由細胞でもある。赤血球が active oxygen や free radical の増加や antioxidant の減少で溶血するように、精漿中においても同様な細胞膜障害作用

を受ける可能性は大である。ビタミンEが本来持つ antisterility effect の作用機構を解明することはもちろん、精子に対する scavenger としての役割を解明することも多くの男子不妊症の成因が不明な現在、泌尿器科学にとってきわめて重大な課題の1つである。

現在、ヒトにおけるビタミンEと造精機能にかんする基礎的な研究やビタミンEの血中濃度と組織内濃度、とくに睾丸組織内濃度や精漿内移行との関連性についての研究は皆無に等しい。一方ヒトの血中ビタミンE濃度については主として栄養学の立場から広く研究され、性差は認められないが年齢差が存在する^{11,31)}ことが知られている。新生児にでは低値であるが、1歳を過ぎると成人(18~34歳)と同じになる⁵⁰⁾。一般にこの正常値に達する時期は母乳で育った乳児ではさらに早い。老人(68~93歳)になると有意に低くなる。マレーシアでの成績によると人種差はない⁴⁰⁾が食事の習慣によって差が生じる。収入レベルが低く社会経済の未発達な地方ではビタミンE摂取が少なく、したがって血中濃度も低い¹¹⁾。

α -トコフェロールの吸収・分布・代謝・排泄などの薬力学的動態は供試動物、試験法、投与量、投与形態などの影響を著しく受ける。健康人での α -トコフェロールの吸収率は55ないし79%³⁴⁾、51ないし86%²⁶⁾で、血中へは遊離型として移行し、投与後5ないし9時間で最高値に達し、半減期は53時間である³⁴⁾。

ビタミンEの経腸管的吸収は、主としてキロミクロンの形成と腸管内の胆汁酸濃度に依存する。吸収された α -トコフェロールはリンパ系のキロミクロンに分布し⁴¹⁾、血中ではリポタンパク質の各画分、すなわち Sf 3~9 画分、HDL 画分、Sf 10~400 画分、キロミクロンの順に多く分散する³⁵⁾。髄液中の α -トコフェロール濃度は血中濃度のほぼ100分の1である⁴⁹⁾。精漿中の α -トコフェロール濃度は血漿濃度と相関せず、血中濃度の約40分の1である。また α -トコフェロールアセテートの投与では全例血漿濃度の上昇がみられた。これに対し、精漿濃度の上昇がみられたのは一部の症例で、多くの症例では精漿濃度に変化がみられなかった。精漿におけるリポタンパク濃度や画分は血液のそれらや各個人によって相違があるのか興味のあるところである。また精漿中のビタミンが精子細胞の膜安定化や抗酸化作用を有しているのどうか全く不明である。ビタミンEと造精機能との関連については、ビタミンEがヘム蛋白の合成に関与し^{38,43)}、かつステロイド代謝に与る hydroxylase がヘム蛋白であることから、この面からの造精機能への影響が考えられ、事

実、ビタミンE欠乏動物でのステロイド合成の低下が指摘されている^{1,2)}。

いずれにせよ、抗不妊ビタミンとして発見されたビタミンEが、その作用機序が全く解明されることなく、またその薬効も適確に評価されることもなく男子不妊症の治療薬として使用されている。これらの点を明確にすることは男子不妊症を対象とする泌尿器科医の使命であろうと考える。

結 語

男子不妊症における抗不妊ビタミン—ビタミンEの役割を知る目的で、2年以上の不妊を主訴とする特発性男子不妊症32例（年齢：26～38歳、平均31.13±3.25歳）—血清 α -トコフェロール値の異常高値を示した1例を除く—の精漿ビタミン濃度をHPLCで測定した。血漿 α -、 β -および γ -トコフェロール濃度はそれぞれ $8.77 \pm 2.93 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.08 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.82 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ であった。精漿 α -トコフェロール濃度は血漿濃度の約40分の1に相当する $0.22 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ であった。 β -および γ -トコフェロールは精漿では検出されなかった。 δ -トコフェロールは血漿および精漿のいずれにおいても検出不能であった。血漿 α -トコフェロール濃度と精漿 α -トコフェロール濃度の間には有意の相関($r=0.14$)はみられなかった。血漿および精漿 α -トコフェロール値と精液所見（精子濃度および精子運動率）との間にも有意の関連はなかった。

1日150mgまたは300mgの α -トコフェロールアセテートを14ないし42日間服用後（最終薬剤服用後5ないし6時間）の血漿 α -トコフェロール濃度は2.2倍（5例）増加した。一方、精漿 α -トコフェロール濃度は1.7倍、2.1倍と増加した2例とほとんど増加しなかった4例に分れた。

文 献

- 1) Barnes MMCG, Smith AJ: The effects of vitamin E deficiency on some enzymes of steroid hormone biosynthesis. *Internat J Vit Nutr Res* 45: 396-403, 1975
- 2) Barnes MMCG, Smith AJ, Leonard PJ: The excretion of 17 oxosteroids by rats deficient in vitamin E. *Intern J Vit Nutr Res* 44: 46-52, 1974
- 3) Bieri JG, Prival EL: Vitamin E activity and metabolism of N-methyltocopheramines. *Biochemistry* 6: 2153-2158, 1967
- 4) Caygill CPJ, Diplock AT: The dependence on dietary selenium and vitamin E of oxidant-labile liver microsomal non-haem iron. *FEBS Lett* 33: 172-176, 1973
- 5) Caygill CPJ, Lucy JA, Diplock AT: The effect of vitamin E on the intracellular distribution of the different oxidation states of selenium in rat liver. *Biochem J* 125: 407-416, 1971
- 6) Caygill CPJ, Diplock AT, Jeffery EH: Studies on selenium incorporation into, and electron-transfer function of, liver microsomal fractions from normal and vitamin E-deficient rats given phenobarbitone. *Biochem. J.*, 136: 851-858, 1973
- 7) Century B, Horwitt MK: Role of arachidonic acid in nutritional encephalomalacia: interrelationship of essential and nonessential polyunsaturated fatty acids. *Arch Biochem Biophys* 104: 416-422, 1964
- 8) Chow CK, Tappel AL: An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats. *Lipids* 7: 518-524, 1972
- 9) Crider Q, Alaupovic P, Johnson BC: Function and metabolism of vitamin E. III. Vitamin E and antioxidants in the nutrition of the rat. *J Nutr* 73: 64-70, 1961
- 10) Dam H: Effect of cod liver oil and rancidity on certain vitamin E deficiency symptoms. *Proc Soc Exp Biol Med* 52: 285-287, 1943
- 11) Desai ID, Lee M: Vitamin E status of Indians of Western Canada. *Canad J Public Health* 65: 191-196, 1974
- 12) Dillard CJ, Dumelin EE, Tappel AL: Effect of dietary vitamin E on expiration of pentane and ethane by the rat. *Lipids*, 12: 109-114, 1977
- 13) Diplock AT: Possible stabilizing effect of vitamin E on microsomal, membrane-bound, selenide-containing proteins and drug-metabolizing enzyme systems. *Am J Clin Nutr* 27: 995-1004, 1974
- 14) Diplock AT, Lucy JA, Verrinder M, Zieleniewski A: Alfa-tocopherol and the permeability to glucose and chromate of unsaturated liposomes. *FEBS Lett* 82: 341-344, 1977
- 15) Evans HM, Bishop KS: On the relationship between fertility and nutrition. II. The ovulation

- rhythm in the rat on inadequate nutritional regimes. *J Metab Res* 1: 319~356, 1922
- 16) Evans HM, Emerson OH, Emerson GA: The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having properties of vitamin E. *J Biol Chem* 113: 329~332, 1936
- 17) Fernholtz E: On the constitution of α -tocopherol. *J Am Chem Soc* 60: 700~705, 1938
- 18) Fong KL, McCay PB, Poyer JL, Keele BB, Misra H: Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J Biol Chem* 248: 7792~7797, 1973
- 19) Frigg M, Rohr HP: Ultrastructural and stereological study on the effect of vitamin E on liver mitochondrial membranes. *Exp Mol Pathol* 24: 236~243, 1976
- 20) Fukuzawa K, Uchiyama M: A mechanism of the acceleration of lipid peroxide formation in liver homogenates and subcellular fractions of vitamin E-deficient mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 19: 433~453, 1973
- 21) Hafeman DG, Hoekstre WG: Lipid peroxidation in vivo during vitamin E and selenium deficiency in the rat as monitored by ethane evolution. *J Nutr* 107: 666~672, 1977
- 22) Hamburg M, Svensson J, Samuelsson B: Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Nat Acad Sci USA*, 72: 2994~2998, 1975
- 23) Hauswirth JW, Nair PP: Some aspects of vitamin E in the expression of biological information. *Ann NY Acad Sci* 203: 111~122, 1972
- 24) Hochstein P, Eruster L: ADP-activated lipid peroxidation coupled to the TPNH oxidase system of microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 12: 388~394, 1963
- 25) Karrer P, Fritzsche H, Ringier BH, Salomon H: α -Tocopherol, *Helv Chim Acta* 21: 520~525, 1938
- 26) Kelleher J, Losowsky MS: The absorption of α -tocopherol in man. *Br J Nutr* 24: 1033~1047, 1970
- 27) King MM, Lai EK, McCay PB: Singlet oxygen production associated with enzyme-catalyzed lipid peroxidation in liver microsomes. *J Biol Chem* 250: 6496~6502, 1975
- 28) Kitabchi AE: Adrenal glands in vitamin E deficiency: in vitro corticoid synthesis by quartered adrenal glands of rats deprived of vitamin E. *Nature* 203: 650~651, 1964
- 29) Krishnamurthy S, Bieri JG: The absorption, storage, and metabolism of α -tocopherol- C_{14} in the rat and chicken. *J Lipid Res* 4: 330~336, 1963
- 30) Lantos PL, Ketterer B, Holt ST: The ultrastructure of the hepatocyte of the vitamin E deficient rat and the effect of a single intraperitoneal dose of N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene on the stability of its fractionated polysomes. *Exp Mol Pathol* 18: 68~79, 1973
- 31) Leonard PJ, Doyle E, Harrington W: Levels of vitamin E in the plasma of newborn infants and of the mothers. *Am J Clin Nutr* 25: 480~484, 1972
- 32) Lucy JA: Functional and structural aspects of biological membranes: A suggested structural role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability. *Ann NY Acad Sci* 203: 4~11, 1972
- 33) Lucy JA: Structural interaction between vitamin E and polyunsaturated phospholipids. *In* Tocopherol, Oxygen and Biomembranes. ed. de Duve C, Hayaishi O, Elsevier, pp.109~120, Amsterdam, 1978
- 34) MacMahon MT, Neale G: The absorption of α -tocopherol in control subjects and in patients with intestinal malabsorption. *Clin Sci* 38: 197~210, 1970
- 35) McCormick EC, Cornwell DG, Brown JB: Studies on the distribution of tocopherol in human serum lipoproteins. *J Lipid Res* 1: 221~228, 1960
- 36) Mellors A, Barnes MMCC: The distribution and metabolism of α -tocopherol in the rat. *Br J Nutr* 20: 69~77, 1966
- 37) Molenaar I, Vos J, Hommes FA: Effect of vitamin E deficiency on cellular membranes. *Vitam Horm* 30: 45~82, 1972
- 38) Nair PP, Patnaik RN, Hauswirth JW: Tocopherol, Oxygen and Biomembranes. ed deDuve

- C, Hayaishi O, p.121, Elsevier, Amsterdam, 1978
- 39) Nakano M, Noguchi T, Sugioka K et al: Spectroscopic evidence for the generation of singlet oxygen in the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent microsomal lipid peroxidation system. *J Biol Chem* **250**: 2404~2406, 1975
- 40) Ng TKW, Chong YH: Serum tocopherol (vitamin E) status of Malaysians. *Med J Malaysia* **30**: 169~174, 1975
- 41) Peake IR, Windmueller HG, Bieri JG: A comparison of the intestinal absorption, lymph and plasma transport and tissue uptake of-and-tocopherols in the rat. *Biochem Biophys Acta* **260**: 679~688, 1972
- 42) Pederson TC, Aust SO: The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation promoted by xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **52**: 1071~1078, 1973
- 43) Pinelli A, Formento ML: Urinary steroid profile in vitamin E deficient rats. *Pharmacol* **9**: 201~203, 1973
- 44) Quaife ML, Swanson WJ, Dju MY, Harris PL: Vitamin E in foods and tissues. *Ann NY Acad Sci* **25**: 300~305, 1949
- 45) Samuelsson B, Goldyne M, Granstrom E, Hamburg M, Hammerstrom S, Malmstem C: Prostaglandins and thromboxanes. *Ann Rev Biochem* **47**: 997~1029, 1978
- 46) Tappel AL: Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* **32**: 1870~1874, 1973.
- 47) Tappel AL: Selenium-glutathione peroxidase and vitamin E. *Am J Clin Nutr* **27**: 960~965, 1974
- 48) Tappel AL: Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Ann New York Acad Sci* **203**: 12~28, 1972
- 49) Vatassery GT, Stadlan EM, Alter M: Tocopherol (vitamin E) levels in human cerebrospinal fluid. *Neurology* **23**: 446~447, 1973
- 50) Vobecky JS, Vobecky J, Shapcott D, Blanchard R: Vitamin E and C levels in infants during the first year of life. *Am J Clin Nutr* **29**: 766~771, 1976
- 51) Wills ED: Lipid peroxide formation in microsomes. Relationship of hydroxylation to lipid peroxide formation. *Biochem J* **113**: 333~341, 1969
- 52) 阿部皓一・勝井五一郎: 血清中のトコフェロール同族体の高速液体クロマトグラフィーによる定量. *ビタミン* **49**: 259~263, 1975

(1981年1月6日受付)