

## 廃用性筋萎縮における活性酸素の産生機序と鉄の役割

近藤久雄\* 糸川嘉則\*  
(京都大学大学院医学研究科社会医学系)

### MECHANISM OF GENERATION OF ACTIVE OXYGEN AND ROLE OF IRON IN SKELETAL MUSCLE ATROPHIED BY IMMOBILIZATION

Hisao Kondo and Yoshinori Itokawa

*Department of Social Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University*

To clarify the mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization, we measured the activities of antioxidant enzymes and xanthine oxidase (XOD) in a typical slow red muscle, the soleus. Male Wistar rats (14 wk old) whose one ankle joints were immobilized in the fully extended position were killed after 4, 8, and 12 days. The activities of Mn-containing superoxide dismutase (Mn-SOD), Cu, Zn-containing superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD), Se-dependent glutathione peroxidase (Se-GSHPx), glutathione S-transferase, catalase, glutathione reductase were measured spectrophotometrically. The XOD activity and the concentrations of hypoxanthine, xanthine, and urate were measured using a high performance liquid chromatography. Increased Cu, Zn-SOD and decreased Mn-SOD in atrophy might reflect increased generation of superoxide anions in the cytoplasm rather than in the mitochondria. The source of superoxide anions in the cytoplasm might be the increased superoxide-producing XOD. Enhanced generation of superoxide anions and increased Cu, Zn-SOD activity in atrophy suggested the enhanced generation of hydrogen peroxide in the cytoplasm. Owing to the unchanged activity of Se-GSHPx and the unchanged or slightly increased activity of catalase in atrophy, the ability to degrade hydrogen peroxide might not increase so much. Hence, hydrogen peroxide is expected to be increased in atrophy. Because there is also an increase of iron in the microsome of atrophied muscles, the production of hydroxyl radicals, the most aggressive of radicals, might consequently be elevated.

Key Words: muscle atrophy, oxidative stress, immobilization, iron, xanthine oxidase

---

\*所在地：京都市左京区吉田近衛町（〒606-01）

酸素は生命維持に不可欠であるが、その一方で反応性の高い活性酸素を生じ、生体の機能・構造を破壊し得る。生体はこれに対応して種々の抗酸化システムを備えているが、それを超えて活性酸素が産生されるような状態を酸化ストレスと称している<sup>3)</sup>。

不使用に伴う骨格筋の萎縮、即ち廃用生筋萎縮は古くから知られている事象ではあるが、その機序に関しては依然不明のままである。我々は先に、動物実験を行って、廃用性萎縮筋に酸化ストレスが生じていることを初めて明らかにした<sup>11,12)</sup>。そこで本実験では、抗酸化酵素活性や鉄キレート剤投与と実験により、その発生機序の解明を目的として行った。

## 研究方法

### 1. 動物並びに試料

実験は全て14週齢の Wistar 系雄ラットを用いて行った。エーテル麻酔下で、片後肢に対して底屈位での足関節固定術を行い、その下肢に廃用生筋萎縮を生じさせた<sup>11,12)</sup>。固定期間は0 (control), 4, 8, 12日間とした。我々はこの固定術自体の影響が無視し得る程度であることを既に確認している<sup>12)</sup>。期間終了後、代表的な赤筋である soleus muscle を固定側 (atrophy 側) と非固定側 (contralateral 側) のそれぞれの下肢から採取した。筋重量の測定に際して、固定側と非固定側とも含水量は同じであったので、湿重量を測定している。

酸化ストレスの指標となる TBA 反応陽性物質 (TBARS) ならびにグルタチオンの測定のための試料は採取後直ちに測定に供され、その他の試料は測定まで液体窒素下で保存した。

### 2. 酸化ストレス指標の測定

酸化ストレスの評価に、TBA 反応陽性物質 (TBARS) 総グルタチオン (total GSH), 酸化型グルタチオン (GSSG) を測定した。

試料採取後の酸化還元変化を少なくするために、測定は試料採取後直ちに行い、さらに試料の homogenize に際してはアルゴンガス下で行った。TBARS の測定は Ohkawa らの方法<sup>18)</sup> を改良して行った。即ち測定中の脂質の過酸化反応の進行を防ぐため 0.0125vol. の butylated hydroxytoluene を反応液に添加した<sup>11)</sup>。GSH・GSSG の測定は Anderson らの方法<sup>2)</sup>で行った。

### 3. 抗酸化酵素の測定

superoxide dismutase (SOD), selenium-dependent glutathione peroxidase (GSHPx), glutathione S-transferase (GST), catalase, glutathione reductase (GSSGRx) を測定した。

氷冷した 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) 1 mM EGTA の solution を試料の 20vol. 加えて homogenize した後、45秒間 sonicate したものを、超遠心分離 (100,000g×60min) した。その上清を -80℃ で保存して、測定に供した<sup>14)</sup>。

SOD 活性の測定は、MaCord&Fridvich の方法<sup>16)</sup> で分光的に測定した。SOD には、細胞質に局在する Cu と Zn を含む SOD (Cu, Zn-SOD) とミトコンドリアに局在し Mn を含む SOD (Mn-SOD) がある。KCN により Cu, Zn-SOD 活性は阻害され、Mn-SOD 活性は阻害されないことを利用して、この二つの SOD の分離定量を行った。

GSHPx 活性は、 $H_2O_2$  を基質として glutathione disulfide の生成に付随する NADPH の酸化を通して分光的に測定した<sup>5)</sup>。GST 活性の測定は、Habig らの方法<sup>7)</sup>で 1-chloro-2,4-dinitrobenzene を基質として行った。Catalase 活性は Aebi の方法<sup>1)</sup>で測定した。GSSGRx 活性は、NADPH の酸化通じて分光的に測定した<sup>4)</sup>。

蛋白定量は Lowry の方法で行った<sup>15)</sup>。

#### 4. Xanthine oxidase 活性と hypoxanthine, xanthine, urate 濃度の測定

基本的には Podzuweit らの方法<sup>20)</sup>を用いて測定した。

Xanthine oxidase (XOD) 活性の測定は、xanthine を基質として、生成された urate を高速液体クロマトグラフィーで定量することにより行った。XOD には、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-dependent XOD (type-D) と oxygen-dependent superoxide-producing XOD (type-O) の二つのタイプがある。そこで反応液中の NAD の有無により、この二つの分離定量を行った。なお測定中における二つのタイプの変換を防止するため、100mM EDTA, 100mM DTE, 200mM PMSF (各々最終濃度) を Homogenizing solution に加えた。

urate, hypoxanthine, xanthine の定量は、電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で行った。HPLC system は、Waters 社製 M600 Multisolute delivery system, Waters 社製 U6 K Injector, 医理化工業製  $\Sigma$ 875 アンペロメータからなり、カラムは Merck 社製 Lichrosorb RP-18 (250  $\times$  4 mm, 5  $\mu$ m) を用いた。移動相として 5 mg/l EDTA を含む 0.1M リン酸アンモニウム緩衝液 (pH4.8) を用い、流速は 1.0 ml/min で行った。電気化学検出器の apply voltage は、XOD 活性測定のための urate 測定時のみ 0.5V で、その他は 0.85V で行った。

#### 5. 鉄キレート剤投与実験

鉄キレート剤として deferoxamine (Ciba-Geigy Co.) を用いた。15匹のラットを 3 群を分け、蒸留水 (control 群), 450mM deferoxamine (DFX 群), 450mM iron-saturated deferoxamine (DFX + Fe 群) を投与した。薬剤は、浸透圧ポンプ (type 2 MLI; ALZA Co.) を皮下に埋め込むことによって、固定後 4 日目から一日に体重 1 kg 当り 0.21mmol の量を連続的に皮下投与した<sup>13)</sup>。

#### 6. 統計処理

データは、平均土標準誤差で示されている。固定期間の異なったデータの比較、さらに鉄キレート剤投与実験には多重比較法の Bonferroni 法を用い、萎縮側と対側 (contralateral) との比較には paired t-test 法を用いた。

## 結 果

#### 1. 萎縮の進行 (Fig.1)

soleus muscle の重量はラットによって大きく異なるので、萎縮の程度を評価するのに、「萎縮度」として、萎縮による筋重量の減少の割合を表した。

筋萎縮は最初の 8 日間で急速に進行し、8 日目で萎縮度は 50% 弱までに達するが、その後は緩やかとなった (Fig.1)。

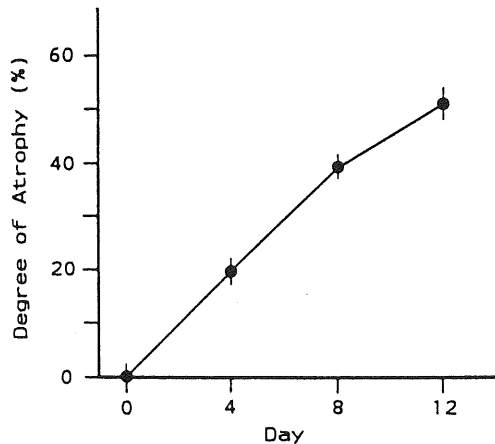


図1 筋萎縮の進行

Fig. 1. Changes in degree of atrophy (ordinate) as function of no of days (abscissa) after immobilization began. Each point is mean  $\pm$  SE (n=5).

## 2. 抗酸化酵素活性 (Fig.2-7)

superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) を代謝して hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) を産生する酵素である SOD には、細胞内の局在を異にする 2 種があるが、萎縮の進行にともなって、この 2 種の SOD の活性は全く異なった変化を示した。Cu, Zn-SOD 活性は、4 日目から増加する傾向を示し、8 日・12 日目では有意に増加していた (Fig.2)。特に 12 日目では約 90% も上昇していた。一方、Mn-SOD 活性は、8 日目から減少する傾向を示し、12 日目では有意に約 40% も減少した (Fig.3)。

GSHPx は、 $H_2O_2$  を除去する酵素であるが、その活性は萎縮筋において変化がみられなかった (Fig.4)。同じく  $H_2O_2$  を除去する酵素である catalase の活性は、8 日目まで変化がみられなかったが、12 日になると有意に約 35% 上昇した (Fig.5)。GST は、GSHPx と同様に glutathione peroxidase 活性を示すが、GSHPx とは対照的に 4 日目から上昇する傾向を示し、8 日・12 日目では有意に各々約 60%・85% の増加を示した (Fig.6)。

GSSGRx は、酸化型グルタチオンに働いて還元型にする酵素であるが、萎縮筋において増加した (Fig.7)。

## 3. Xanthine oxidase (XOD) 活性 (Fig.8) と Hypoxanthine, Xanthine, Urate 濃度 (Fig.9)

XOD の活性は萎縮筋において有意に増加した。特に、 $O_2^{\cdot-}$  を産生する XOD (type-O) の活性は約 2.2 倍に上昇していた。また総 XOD に占める type-O の割合も萎縮筋において、有意に約 60% の増加を示した (Fig.8)。

一方、XOD の基質である hypoxanthine と xanthine, さらに XOD による反応の生成物である urate の、萎縮筋中での濃度を示したのが Fig.9 である。萎縮筋において、hypoxanthine, xanthine urate とも有意に増加し、コントロール筋の約 2.3~2.4 倍の濃度を示した。

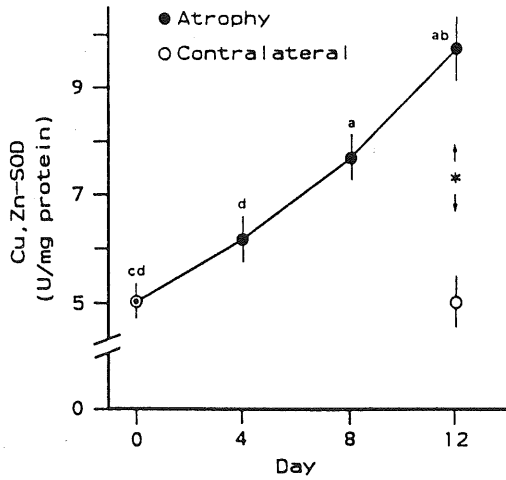


図2 筋萎縮進行過程における Cu, Zn-superoxide dismutase 活性の変化

**Fig. 2.** Changes in Cu, Zn-containing superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) activity in atrophied and contralateral muscles (ordinate) as function of no. of days (abscissa) after immobilization began. Day 0 is control. Each point is mean  $\pm$  SE (n=5). a, b, c, and d indicate significant differences at  $p < 0.05$  compared with 0, 4, 8, and 12 day, respectively. \*Significant difference at  $p < 0.05$  between atrophied and contralateral muscles.

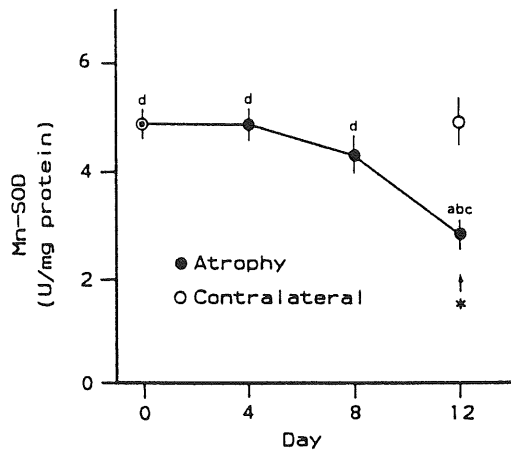


図3 筋萎縮進行過程における Mn-superoxide dismutase 活性の変化

**Fig. 3.** Changes in Mn-containing superoxide dismutase (Mn-SOD) Activity in atrophied and contralateral muscles (ordinate) as function of no. of days (abscissa) after immobilization began. Day 0 is control. Each point is mean  $\pm$  SE (n=5). a, b, c, and d indicate significant differences at  $p < 0.05$  compared with 0, 4, 8, and 12 day, respectively. \*Significant difference at  $p < 0.05$  between atrophied and contralateral muscles.

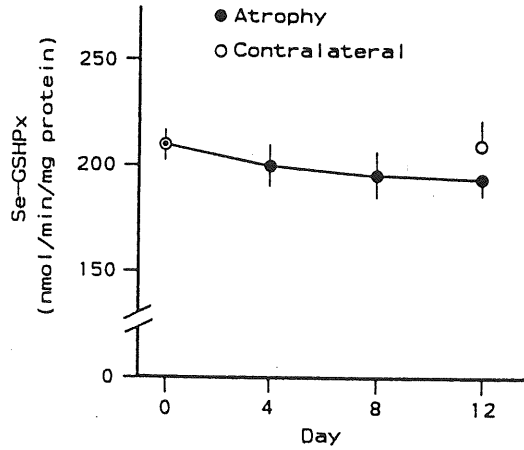


図4 筋萎縮進行過程における glutathione peroxidase 活性の変化

Fig. 4. Changes in Se-dependant glutathione peroxidase (Se-GSHPx) activity in atrophied and contralateral muscles (ordinate) as function of no. of days (abscissa) after immobilization began. Day 0 is control. Each point is mean  $\pm$  SE (n=5)

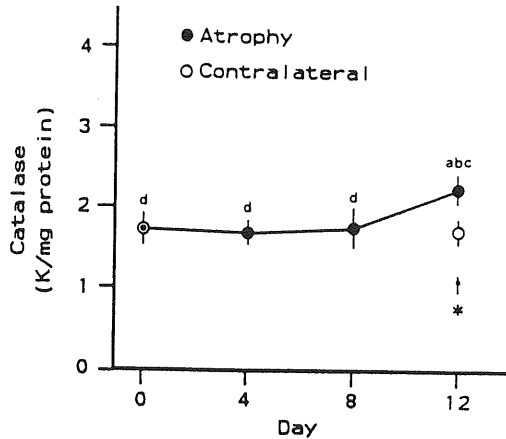


図5 筋萎縮進行過程における catalase 活性の変化

Fig. 5. Changes in catalase activity in atrophied and contralateral muscles (ordinate) as function of no. of days (abscissa) after immobilization began. Day 0 is control. Each point is mean  $\pm$  SE (n=5) a, b, c, and d indicate significant differences at  $p < 0.05$  compared with 0, 4, 8, and 12 day, respectively. \*Significant difference at  $p < 0.05$  between atrophied and contralateral muscles

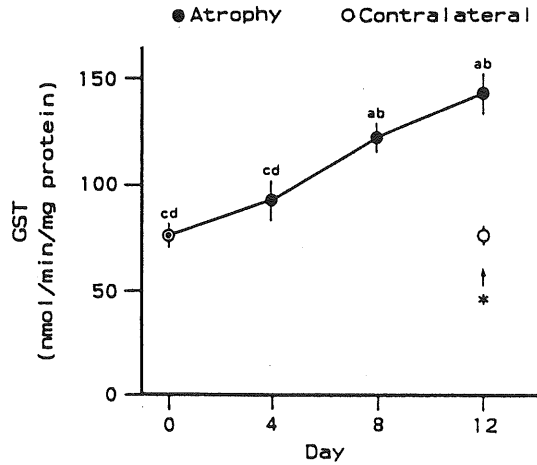


図6 筋萎縮進行過程における glutathione S-transferase 活性の変化

**Fig. 6.** Changes in glutathione S-transferase (GST) activity in atrophied and contralateral muscles (ordinate) as function of no. of days (abscissa) after immobilization began. Day 0 is control. Each point is mean  $\pm$  SE ( $n=5$ ) a, b, c, and d indicate significant differences at  $p<0.05$  compared with 0, 4, 8, and 12 day, respectively. \*Significant difference at  $p<0.05$  between atrophied and contralateral muscles.

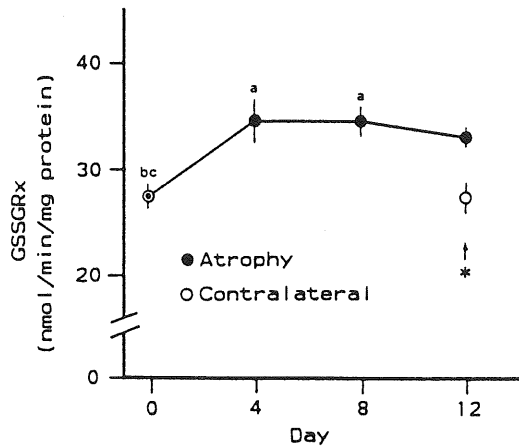


図7 筋萎縮進行過程における glutathione reductase 活性の変化

**Fig. 7.** Changes in glutathione reductase (GSSGRx) activity in atrophied and contralateral muscles (ordinate) as function of no. of days (abscissa) after immobilization began. Day 0 is control. Each point is mean SE ( $n=5$ ) a, b, c, and d indicate significant differences at  $p<0.05$  compared with 0, 4, 8, and 12 day, respectively. \*Significant difference at  $p<0.05$  between atrophied and contralateral muscles.

表1 deferoxamine 投与が筋萎縮に及ぼす効果  
Table 1. Effect of deferoxamine on muscle atrophy.

	Control		DFX		DFX+Fe	
	C	A	C	A	C	A
muscle weight (mg)	158.2±3.3*	73.6±2.6	144.4±6.2*	84.3±4.3 <sup>b</sup>	156.9±6.3*	68.8±2.4
degree of atrophy (%)	53.5±1.3		41.6±1.1 <sup>ab</sup>		56.1±0.7	
TBARS (nmol MDA/g)	24.6±1.2*	38.6±1.5	25.3±1.0	27.7±1.5 <sup>ab</sup>	25.8±1.6*	38.5±2.0
total GSH (nmol GSH/G)	2928±118*	1805±59	2867±180*	1883±85	2753±112*	1869±57
GSSG (nmol GSH/g)	51.6±7.3*	64.0±4.7	57.6±5.2*	33.0±3.5 <sup>ab</sup>	56.0±11.5	59.0±5.3
GSSG/total GSH (%)	1.75±0.22*	3.60±0.33	2.04±0.20	1.95±0.26 <sup>ab</sup>	1.68±0.41*	3.21±0.23

Values are mean ± SE (n=5). Control; double-distilled water injection group, DFX; deferoxamine injection group, DFX+Fe; iron-saturated deferoxamine injection group. C; contralateral muscle, A; 12-day atrophied muscle.

\*; significant difference at  $p < 0.05$  compared to atrophied muscle by paired t-test.

a, b; significant difference at  $p < 0.05$  compared to Control and DFX+Fe group, respectively, by Bonferroni method.

#### 4. 鉄キレート剤投与実験 (Table 1)

鉄キレート剤である deferoxamine (DFX) 投与の12日間の筋萎縮に及ぼす影響を示したのが Table 1 である。DFX 投与群では、他の群に比べて、TBARS・酸化型グルタチオン (GSSG) は有意に低値を示した。萎縮筋の総グルタチオンに対する酸化型グルタチオンの割合は、Control, DFX+Fe 群では対側より有意に高いが、DFX 投与群では対側と同じレベルまで低下していた。また、DFX 投与群では筋萎縮度も軽く、コントロール群に比べると有意に約22%も筋萎縮が軽減された。萎縮筋の総グルタチオンについては、三つの群では有意な差は認められなかった。

## 考 察

### 1. 抗酸化酵素活性

Nemeth らは、廃用性筋萎縮ではミトコンドリアの量は変化しないことを報告している<sup>17)</sup>。従って、ミトコンドリアに存在する酵素 (Mn-SOD など) の活性値は、そのミトコンドリアあたりの酵素量を反映しているのであって、ミトコンドリア自体の量的変化によるものではないと言える。また GSHPx 活性については、生体内では基質であるグルタチオンがこの酵素を律速することが知られている<sup>5)</sup>。萎縮筋ではグルタチオンが減少している<sup>12)</sup>、萎縮筋の GSHPx 活性測定データは Fig.4 に見られるように有意な変化が認められなかったものの、萎縮筋における GSHPx の実質的な働きは低下していると思われる。

GSSGRx はグルタチオンの酸化型を還元型に変換する酵素であるが<sup>4)</sup>、萎縮筋においてこの酵素活性は上昇していた (Fig.7)。一方、萎縮筋では酸化型の割合が増加している<sup>11)</sup>。このことは、酸化的ストレスが GSSGRx の増加を上回って増加していることを示しているに他ならない。萎縮筋では GST 活



性も萎縮早期から増加していた (Fig.6)。GST は, glutathione peroxidase 活性の他に, グルタチオン包合反応を介しての解毒作用をもっている (glutathione transferase 活性)<sup>7)</sup>。萎縮筋では総グルタチオンが減少するが<sup>12)</sup>, 酸化的ストレスを抑制してもその総グルタチオンの減少は戻らない (Table 1) ことから, GST の glutathione transferase 活性がこの萎縮筋における総グルタチオンの減少に関与していることが予想される。

SOD は基質の  $O_2^-$  によって誘導されることがよく知られており<sup>9)</sup>, SOD レベルは  $O_2^-$  の産生を反映しているとも考えられる。また  $O_2^-$  は一般に生体膜を通過できない<sup>8)</sup>。これらを考え合わせると, 萎縮筋においての細胞質に局在する Cu, Zn-SOD 活性の増加 (Fig.2), ミトコンドリアに局在する Mn-SOD 活性の減少 (Fig.3) は,  $O_2^-$  の産生が主に細胞質でなされ, ミトコンドリアではむしろ減少していることを示していると考えられる。

萎縮早期からの Cu, Zn-SOD 活性の増加は, その反応生成物である  $H_2O_2$  の産生が細胞質において早期から増加していることも併せて示している<sup>16)</sup>。 $H_2O_2$  を除去する酵素として, GSHPx と Catalase とがある。萎縮筋の GSHPx 活性の測定データは有意な変化を示さなかったが, むしろ前述のようにその働きは生体内で低下していると考えられる。もう一つの Catalase にしても12日まで増加はみられない (Fig.5)。GST は, GSHPx と同様に glutathione peroxidase 活性を持ち<sup>7)</sup>, 萎縮筋では早期から活性が増すが (Fig.8),  $H_2O_2$  を基質として利用できない<sup>7)</sup>。以上から, 細胞質の  $H_2O_2$  濃度は萎縮早期から上昇していると考えられる。

## 2. superoxide anion ( $O_2^-$ ) の産生源

次に問題となるのは, 萎縮筋における  $O_2^-$  の産生源である。萎縮筋では, 核酸の合成は低下し, 核酸代謝は分解に傾いている<sup>22)</sup>。この核酸代謝の律速段階となるのは, 細胞質に存在する XOD であるので<sup>16)</sup>, 萎縮筋における XOD 活性に興味をもたれた。結果は, Fig.8 に示したように, XOD 活性は有意に増加していた。さらに, XOD には type-O と type-D があるが, 萎縮筋では  $O_2^-$  を産生する type-O が特に増加し, コントロール筋の約2.2倍にもなっていた。また XOD の基質である hypoxanthine, xanthine は萎縮筋においてそれぞれ2倍程の増加を示し, XOD による反応生成物である urate も2倍以上に増加していた (Fig.9)。以上から, 萎縮筋では  $O_2^-$  産生性の XOD (type-O) 活性は確かに増加すると考えられ, これが  $O_2^-$  の主要な産生源と考えられる。

総 XOD に対する type-O の割合は, 萎縮筋で約50%上昇しており, 萎縮筋において XOD の type-D から type-O への変換が起きていることになる。この変換には, カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) が関与することが報告されている<sup>19)</sup>。我々は先に, 萎縮筋において細胞内カルシウムが4倍近く増加していることを報告している<sup>12)</sup>。この増加したカルシウムの多くは蛋白結合性であろうが, 同時にフリーのカルシウムも増加していると考えられ, これが CAMP を活性化し, type-D から type-O への変換を進める大きな要因であると思われる。

## 3. 鉄キレート剤投与実験

通常, 生体内では Harber-Weiss 反応は緩徐で,  $O_2^-$  や  $H_2O_2$  があっても, 反応性が非常に高く危険な  $\cdot OH$  radical は殆ど産生されない。ところが鉄などの遷移金属が存在すると, その反応は急速に進行

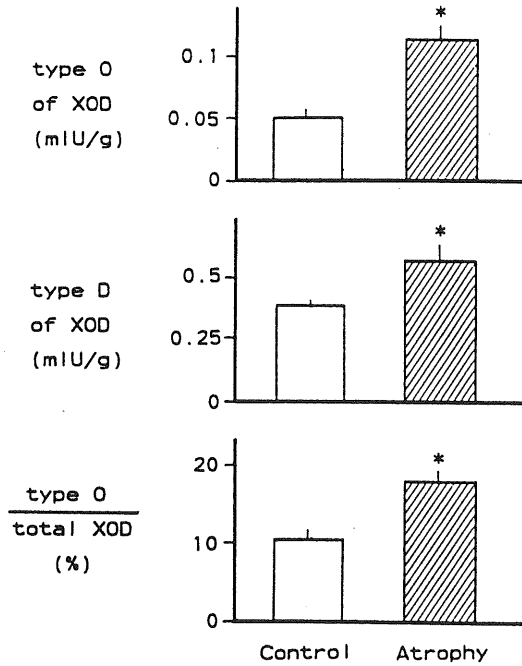


図8 筋萎縮における xanthine oxidase 活性

Fig. 8. Activities of oxygen-dependent superoxide-producing xanthine oxidase (type-O of XOD) and NAD-dependent xanthine oxidase (type-D of XOD), and ratio of type O to total XOD activity in 12-day atrophied and contralateral (control) muscles. Data are means  $\pm$  SE (n=5). \*Significant difference at  $p < 0.05$  compared with control.

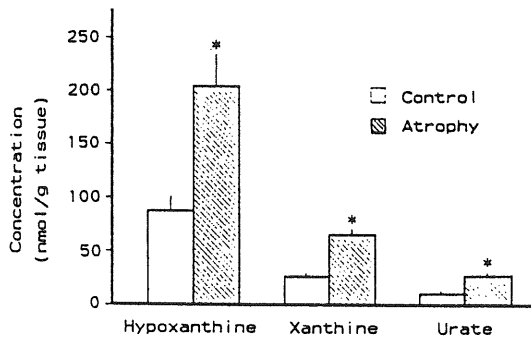


図9 筋萎縮における hypoxanthine, xanthine, urate の濃度

Fig. 9. Concentrations of hypoxanthine, xanthine, and urate in 12-day atrophied and contralateral (control) muscles. Data are means  $\pm$  SE (n=5). \*Significant difference at  $p < 0.05$  compared with control.

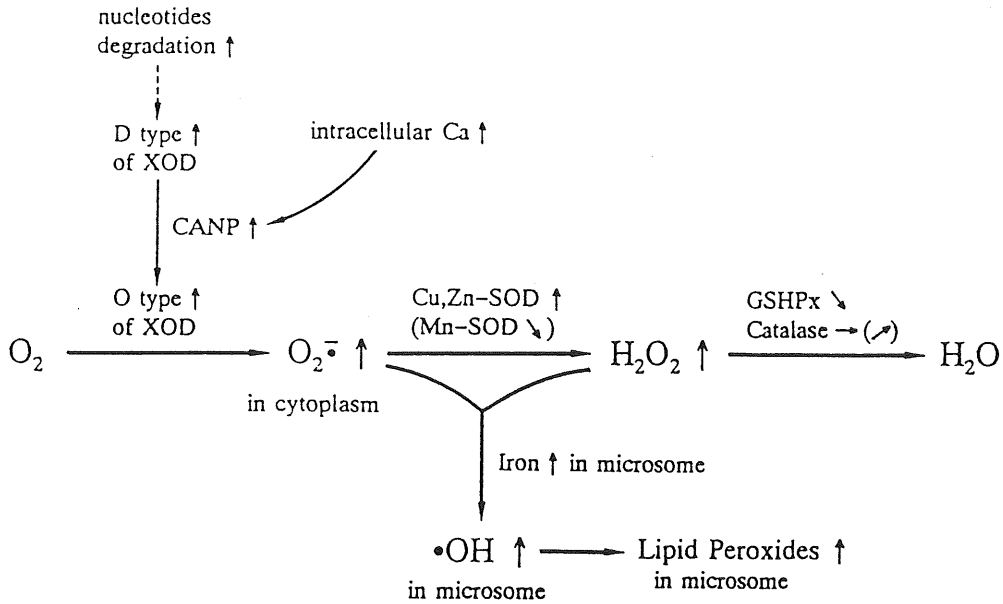


図10 廃用性筋萎縮における酸化的ストレスの機序

Fig. 10. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization.  $O_2$  : molecular oxygen,  $O_2^{\cdot -}$  : superoxide anion,  $H_2O_2$  : hydrogen peroxide,  $\cdot OH$  : hydroxyl radical,  $H_2O$  : water, D-type of XOD : NAD-dependent xanthine oxidase, O-type of XOD : superoxide-producing xanthine oxidase, CANP : calcium activated neutral protease, Cu, Zn-SOD : cytoplasmic form of superoxide dismutase, Mn-SOD : mitochondrial form of superoxide dismutase. GSHPx : Se-dependent glutathione peroxidase.

し、結果として $\cdot OH$  radical が産生されるようになる<sup>8)</sup>。

我々は先に萎縮の進行に伴って鉄の濃度が上昇することを報告している<sup>12)</sup>。萎縮筋では、前述したように $O_2^{\cdot -}$ と $H_2O_2$ が増加しており、この様に鉄の増加した状態では $\cdot OH$  radical の産生が増大し、それに続いての過酸化脂質の増加が予想される。

そこで、萎縮筋での鉄の増加が酸化的ストレスに実際に関与しているかどうかを検討するために、鉄キレート剤であるDFXの投与実験を行った (Table 1)。DFX投与により、萎縮筋におけるTBARS・酸化型グルタチオンの増加が抑制された。これは、DFXが、廃用性萎縮筋に伴う酸化的ストレスの増加を抑制したことを示している。また総グルタチオンに対する酸化型の割合も減少し、非処置の対側と同じレベルまで戻った。この酸化型の割合は酵素活性の調節に重要な役割を果たすことが知られており<sup>6)</sup>、DFXは、萎縮により引き起こされた代謝変化の回復に貢献していると考えられる。一方、DFX+Fe投与では、DFX投与で見られたような作用は見られなかった。このことから、DFXの酸化的ストレスに対する抑制作用は、DFXの鉄キレート作用によるものであると考えられる。即ち、鉄が廃用性萎縮筋の酸化的ストレスに重要な役割を担っていることを示すに他ならない。

またDFX投与によっても筋萎縮は軽減された。我々は先に、抗酸化剤投与実験により、酸化的スト

レスが筋萎縮を促進することを示している<sup>11)</sup>。従って、この DFX の筋萎縮抑制作用は酸化的ストレスの抑制を介してのものだと推測される。

本研究で明らかにした廃用性筋萎縮における酸化的ストレスの機序について Fig.10 に図式的にまとめた。

### 参 考 文 献

- 1) AEBI H. (1984) : Catalase *in Vitro*. Meth. Enzymol., 105, 121-126.
- 2) ANDERSON, M. E. (1985) : Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Meth. Enzymol., 113, 548-552.
- 3) ASAYAMA K. AND KATO K. (1996) ; Oxidative muscular injury and its relevance to hyperthyroidism. Free Radical Biol. Med., 8, 293-303.
- 4) CARLBERG I. AND MANNERVIK B. (1985) : Glutathione reductase. Meth. Enzymol., 113, 484-490.
- 5) FLOHE L. AND GUNZLER W. A. (1984) : Assay of glutathione peroxidase. Meth. Enzymol., 105, 114-121.
- 6) GILBERT, H. F. (1982) : Biological disulfides : The third messenger?. J. Biol. Chem., 257, 12086-12091.
- 7) HABIG W.H., PABST M. J., AND JAKOBY W. B. (1974) : Glutathione S-transferase. J. Biol. Chem., 249, 7130-7139.
- 8) HALLIWELL, B. AND J. M. C. GUTTERIDGE (1986) : Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine. Arch. Biochem Biophys., 246,501-516.
- 9) HASSAN H. M. (1988) : Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. Free Radical Biol. Med., 5, 377-385.
- 10) KONDO, H., KIMURA, AND Y. ITOKAWA (1991) : Manganese, copper, zinc, and iron concentrations and subcellular distribution in two types of skeletal muscle. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 196, 83-88.
- 11) KONDO, H., MIURA, AND Y. ITOKAWA (1991) : Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. Acta Physiol. Scand., 142, 527-528.
- 12) KONDO, H., M. MIURA, I. NAKAGAKI, S. SASAKI, AND Y. ITOKAWA (1992) : Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. Am. J. Physiol., 262, E 583-E590.
- 13) KONDO, H., M. MIURA, J. KODAMA, S. M. AHMED, AND Y. ITOKAWA (1992) : Role of iron in oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. Pflügers Arch., 421,295-297.
- 14) KONDO, H., M. MIURA, AND Y. ITOKAWA (1993) : Antioxidant enzyme systems in skeletal muscle atrophied by immobilization. Pflügers Arch., 422, 404-406.
- 15) LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. J. AND RANDALL R. J. (1951) : Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275
- 16) MCCORD J. M. AND FRIDOVICH I. (1969) : Superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 244, 6049-6055.
- 17) NEMETH P. M., MEYER D. AND KARK R. A. P. (1980) : Effect of denervation and simple disuse on

- rates of oxidation and on activities of four mitochondrial enzymes in type I muscle. *J. Neurochem.*, 35, 1351-1360.
- 18) OHKAWA, H., N. OHISHI AND K. YAGI (1979) : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95, 351-358.
- 19) PARKS, D. A. AND N. GRANGER (1986) : Xanthine oxidase : biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand.*, 548, 87-99.
- 20) PODZUWEIT, T., W. BRAUN, A. MULLER, AND W. SCHAPER (1987) : Arrhythmias and infarction in the ischemic pig heart are not mediated by xanthine oxidase-derived free oxygen radicals. *Basic. Res. Cardiol.*, 82, 493-505.
- 21) STIRPE, J. AND E. DELLA (1969) : The regulation of rat liver xanthin oxidase : Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O) . *J. Biol. Chem.*, 244, 2855-2863.
- 22) WATSON P. A., J. P. STIN, AND F.W. BOOTH (1984) : Changes in actin synthesis and  $\alpha$ -actin-mRNA content in rat muscle during immobilization. *Am. J Physiol.*, 247, C39-C44.