

【総説】

生体分子のオゾン化反応生成物の生物学的作用(その 1)

三浦敏明

日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.17, No.4, 83-89. (2010)

総説 生体分子のオゾン化反応生成物の生物学的作用(その1)

北海道大学名誉教授 三浦 敏明

はじめに

オゾンは極めて反応性の高い化学種であり、最初に接触する部位の生体分子と反応して消失する。したがって、呼吸器系に対する有害作用やオゾン療法における治療効果の発現のいずれにおいても、オゾンの直接的作用よりも、オゾンと生体分子の反応で生成する化学種(二次生成物)が主要な役割を演じていると考えられている。オゾン療法においてこのような役割を担っている二次生成物を Bocci や Viebahn-Hänsler らは「Bioregulator」あるいは「Second messenger」とよび、いくつかの分子を想定しているが[1, 2]、治療効果との関連で二次生成物の生物学的作用を実験的に調べた例はほとんど知られていない。一方、オゾンによる呼吸器障害作用のメカニズムについては、二次生成物に注目した研究が活発に展開されており、炎症メディエーターやサイトカイン産生に対する二次生成物の役割が次第に明らかになってきた[3-5]。これらの知見は、オゾン療法の作用メカニズムを説明する上でも参考になることが多いと考えられるので、以下に、解説を加えながら、代表的な研究例を紹介する。

1. 生体内脂質とオゾンとの反応生成物

呼吸器障害に関与する二次生成物を生成する候補分子としては、①呼吸器系組織の表面に存在し、吸入オゾンと最初に接触する可能性の高い分子であり、②オゾンとの反応性が高く、しかも、③その二次生成物は比較的長寿命であり、細胞膜を通過できるものと考えられる。このような分子として、Pryor らのグループは不飽和脂肪酸を含むリン脂質に注目した[6, 7]。

吸入されたオゾンが最初に接触するのは、肺や気道組織表面の上皮細胞やそれを覆っている液状の薄い層(Epithelial cell lining fluid: ELF)である。この ELF の約 90% は脂質であり、そのうち、図 1 に示したホスファチジルコリン(PC)が 68-73%、ホスファチジルグリセロール(PG)が 10-12%、ホスファチジルエタノールアミン(PE)が 3-8% である。また、これらのリン脂質には構成不飽和脂肪酸として、オレイン酸が 11-47%、パルミトレイン酸が 4-8%、リノール酸が 1-8%、アラキドン酸が 0-5% 含まれている[6-11]。

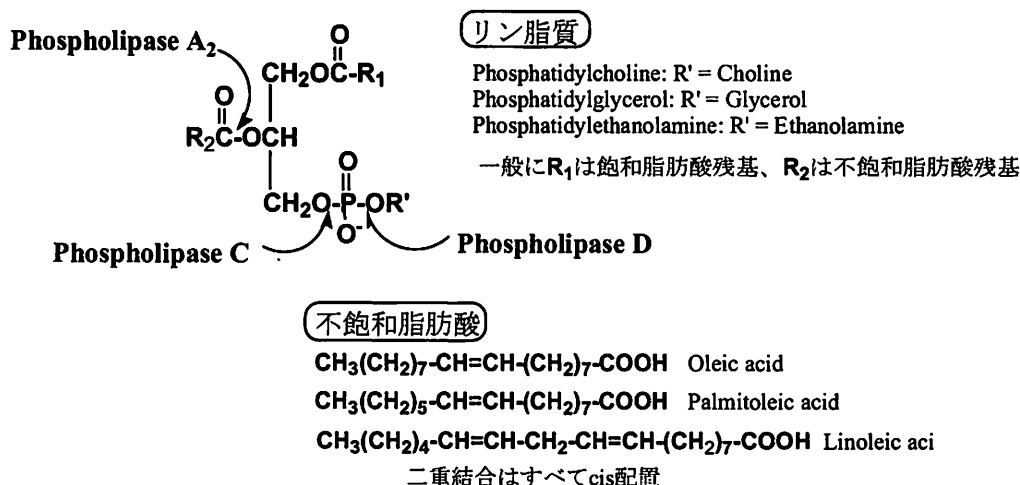


図 1 脂質の構造とホスホリパーゼの作用部位

不飽和脂肪酸はオゾンとの反応性が高く、共存するビタミン E や C、グルタチオンなどの抗酸化剤と競争するものの[12]、一部はオゾンと反応して種々の生成物(Lipid Ozonation Product: LOP)を与える。不飽和脂肪酸のようなオレフィンとオゾンの水系での反応は図 2 のように進行する。初期生成物であるトリオキシランはカルボニルオキシドとアルデヒドに分解するが、両者が再結合すると Criegee ozonide (オゾンニド)が生成する。しかし、水系での反応では、カルボニルオキシドが水とも反応してヒドロキシヒドロペルオキシド(Hydroxyhydroperoxide: HHP)を与える。これが分解するとアルデヒドと過酸化水素が生じる[13]。

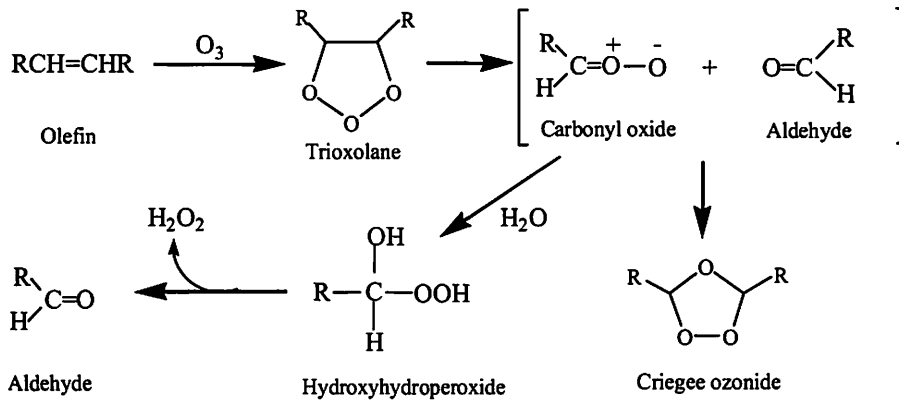


図 2 水系におけるオレフィンとオゾンの反応

オレフィンが不飽和脂肪酸や、それを含むリン脂質の場合でも、それぞれに対応するオゾニド、アルデヒド、HHP が過酸化水素とともに生成する。水系におけるオゾニドと HHP/アルデヒドの生成割合は 1 : 9 と見積もられている[14]。

ELF と吸入オゾンとの間でも同様な反応が進行すると考えられるが、事実、オゾン曝露したラットから得られた気管支洗浄液中にはオレイン酸およびパルミトレイン酸のオゾン分解生成物であるノナナール (C9 アルデヒド) およびヘプタナール (C7 アルデヒド) が検出されている[15, 16]。

Pryor らは、ELF のオゾン化反応で生成が予想される LOP (図 3) はいずれも安定あるいは準安定な低分子であり、組織内拡散性もあると考えられることから、これらがオゾンの毒性発現に関与する二次生成物の候補分子と推定し、図 3 に示した各種の LOP を調製した[17]。これらの LOP は、リン脂質の 1 種である 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine から生成するものであり、多種類のリン脂質を含む ELF のオゾン化では、さらに多くの種類の LOP が生成することになる。

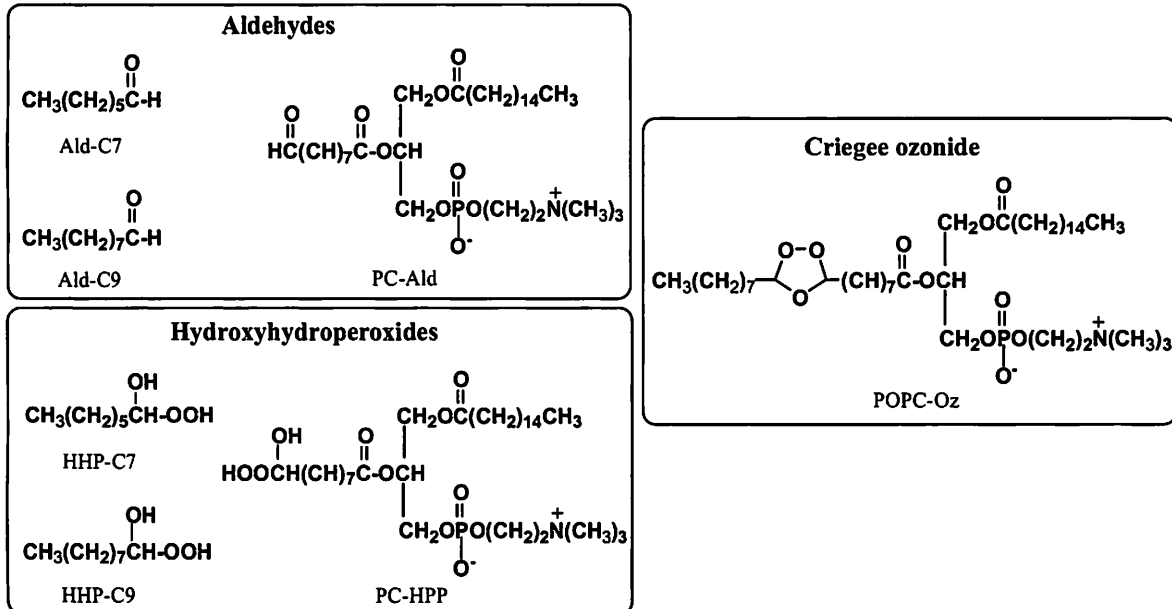


図 3 各種 LOP の構造

2. 二次反応生成物 LOP のホスホリパーゼに対する影響[18]

図 3 に記載の 7 種類の LOP の生物学的作用を調べるため、Pryor のグループは最初にヒト気管支上皮細胞 (BEAS-2B) を用いて、ホスホリパーゼに対する LOP の影響を調べた。ホスホリパーゼ A₂, C および D は図 1 に示したように、リン脂質を水解することによって、炎症反応を発動する種々の脂質メディエーターの生成に関与するからである。なお、本実験は、細胞培養メディウム中濃度として 1~100 μM の LOP を用いているが、乳酸脱水素酵素の溶出から判定したところ、有意な細胞毒性が認められていないとしている。

また、これらの LOP 濃度は、オゾン曝露されたヒト呼吸器組織表面に存在しうる濃度であると考察されている[3]。

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) に対する影響

炎症性メディエーターの生成経路の一つであるアラキドン酸カスケードは、細胞膜を構成するリン脂質の C2 位のアラキドン酸の放出からはじまり、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン類を生成する。したがって、アラキドン酸の放出を触媒する PLA₂ は炎症反応の進展におけるカギ酵素の一つである。本実験では最初にアラキドン酸放出に対する LOP の影響を調べた。すなわち、³H-標識アラキドン酸を取り込ませた BEAS-2B 細胞層の表面を、10 μM の LOP を含むメディウムで覆って 60 分培養した (Ca²⁺濃度は 0.15 mM)。次いで、表面と側面のメディウムを採取し、表面のメディウムから細胞を除いた上清中の ³H-標識アラキドン酸放出量を求めた。その結果、ALD-C7、ALD-C9、HHP-C7 および HHP-C9 はアラキドン酸放出量に有意な影響を及ぼさなかったが、リン脂質構造を維持している PC-ALD、PC-HHP および POPC-OZ は、それぞれの対照 (LOP 無添加) 値に比較して、アラキドン酸放出量を 291%、81% および 214% 上昇させた。 これら 3 種の LOP は 1~100 μM の濃度範囲で用量依存的にアラキドン酸放出量を上昇させ、その上昇は、POPC-OZ を除くと、1 μM でも有意であった。

次いで、これらのアラキドン酸放出活性が PLA₂ のどのアイソザイムの活性上昇によるものかを調べる目的で、アイソザイムの一つである細胞質 PLA₂ (cPLA₂、Ca²⁺依存性) の活性に対する PC-ALD (10 μM) の影響を種々の Ca²⁺濃度の下で調べた。cPLA₂ の活性は、LOP 曝露後の細胞を洗浄し、その細胞質画分を用い、Arachidonoyl-thio-PC を基質として測定した。その結果、Ca²⁺や Mg²⁺無添加で培養した細胞の cPLA₂ 活性 (8±1 nmol/min/ml) は対照値 (1±0.2 nmol/min/ml) に比して有意に増大した。0.15 mM Ca²⁺存在下での活性上昇は Ca²⁺無添加の場合と差がなかったが、高濃度 (1.2 mM) の Ca²⁺存在下での cPLA₂ 活性はさらに増大した (23±2 nmol/min/ml)。

もう一つのアイソザイムである分泌型 PLA₂ (sPLA₂、蜂毒で増大) の活性は、LOP 曝露後のメディウムを用い、同じく、Arachidonoyl-thio-PC を基質として測定した。しかし、PC-ALD の曝露によっても、Ca²⁺添加の有無にかかわらず、また、Ca²⁺イオノホアーを添加しても、sPLA₂ 活性は検出されなかった。

さらに、Ca²⁺非依存性の PLA₂ (iPLA₂) の特異的阻害剤である Bromeonal lactone の添加は、PC-ALD による ³H-標識アラキドン酸放出の上昇を阻害しなかった。

以上の結果から、アラキドン酸の遊離に関与している主なアイソザイムは cPLA₂ であり、このアイソザイムが PC-ALD で活性化されることによってアラキドン酸の放出が促進されると考えられている。

ホスホリパーゼ C (PLC) に対する影響

PLC によってリン脂質が水解されると、ジグリセリド (DG) が生成する。リン脂質がホスファチジルイノシトールの場合には、DG とともにイノシトール-1-リン酸が、ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸の場合にはイノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP₃) が生成する (図 4)。DG と IP₃ はともに細胞のシグナル伝達や脂質シグナリングにおけるセカンドメッセンジャーとして働く。たとえば、DG は後述するプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化し、活性化された PKC は核内転写因子である NFκB の阻害タンパク質 IκB をリン酸化する (NFκB の活性化)。したがって、PLC も PLA₂ と同様に炎症におけるカギ酵素である。

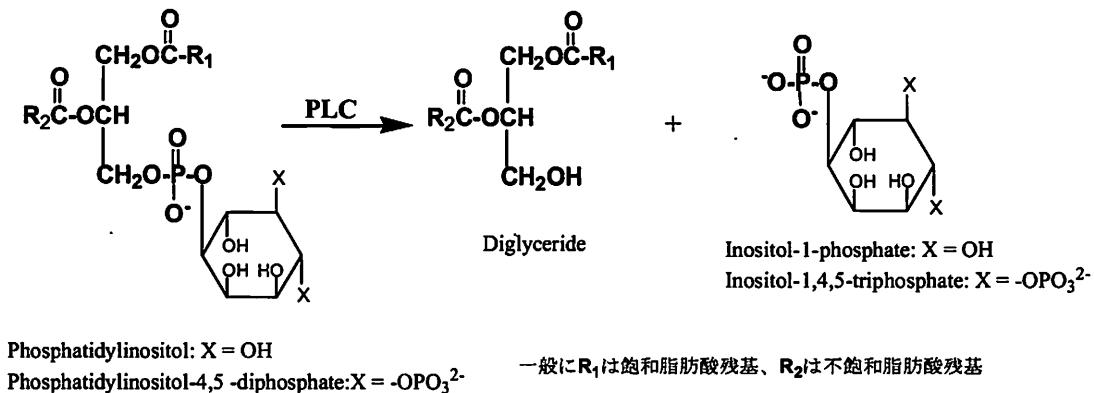


図 4 PLC によるホスファチジルイノシトール (ジリン酸) の水解

本実験において PLC 活性は、 ^3H -標識ミオイノシトールを取り込ませた BEAS-2B 細胞を用い、LOP 曝露 (10 μM 、30 分) によってホスファチジルイノシトールからイノシトールモノリン酸を経て生成する ^3H -標識イノシトール量を測定することにより求めた。その結果、試験した 7 種類の LOP のうち、PLC 活性を上昇させたのは 3 種類の HHP のみであった。すなわち、対照値に比して PC-HHP は 45%、HHP-C9 は 39% 活性を上昇させた。この両者は 1 μM でも有意に PLC 活性を上昇させたが、100 μM では活性上昇が認められなかった。一方、HHP-C7 は 10 μM では影響を与えなかったが、100 μM で PLC 活性を有意に上昇させた。

HHP-C9 による PLC 活性の上昇は、PLC 阻害剤である U-73122 によって 85% 阻害され、その不活性型アナログである U-73343 で阻害されなかったことから、確認された。

HHP はアルデヒドと H_2O_2 との反応でも生成し、この反応は可逆反応であるので、HHP-C9 による PLC 活性の上昇は HHP-C9 自体によるのか、あるいはアルデヒドや H_2O_2 が関与するのか不明である。そこで、ALD-C9 (20 μM) 単独、 H_2O_2 (10 μM) 単独の場合の効果を同様に調べたが、いずれも PLC 活性を上昇させず、両者が共存してはじめて活性上昇が認められた。したがって、PLC 活性の上昇は HHP によると考えられている。

ホスホリパーゼ D (PLD) に対する影響

PLD 活性は、 ^3H -標識ミスチン酸を取り込ませた BEAS-2B 細胞を用い、LOP 曝露 (10 μM 、60 分) で遊離する ^3H -標識ホスファチジン量から求めた。その結果、試験した 7 種類の LOP のうち、ALD-C7 と HHP-C7 を除く 5 種の LOP に PLD 上昇作用が認められた (構造と活性の関係は特にみられない)。これら 5 種のうち、1 および 100 μM でも活性上昇が認められたのは PC-ALD と PC-HHP のみであったが、いずれも用量依存性を示さなかった。

ホスホリパーゼに対する他の酸化剤の影響

他の酸化剤として H_2O_2 、tBuOOH および AAPH (ラジカル開始剤) について同様に検討した。これらの中で影響が認められたのは、tBuOOH と AAPH による PLC 活性の上昇および tBuOOH による PLD 活性の上昇のみであり、ホスホリパーゼに対する LOP の影響は、これらの酸化剤とは明らかに異なっていた。

以上のように、リン脂質とオゾンの反応で生成する LOP は明らかにホスホリパーゼ A₂、C および D の活性を上昇させる。モルモットの気管支上皮細胞を 0.3 および 1.0 ppm のオゾンガスに 1 時間曝露すると PLA₂、PLC および PLD 活性が上昇すると報告されているが[19]、本実験の結果から、これらホスホリパーゼのオゾンによる活性上昇は二次生成物である LOP を介するものであると推定できる。ただし、LOP の構造の違いにより影響するホスホリパーゼの種類は異なり、リン脂質構造を維持している PC-ALD、PC-HHP および POPC-OZ は PLA₂ 活性を上昇させ、PLC 活性を上昇させるのは 3 種の HHP のみであった。いずれにしても、LOP はホスホリパーゼの活性化を介して炎症メディエーターの産生を促し、呼吸器系組織の過度の炎症反応を引き起こすものと考えられる。オゾン毒性の発現に至るこのような一連の連鎖的反応を、Pryor らは「LOP をセカンドメッセンジャーとする、オゾン毒性のカスケードメカニズム」とよんでいる[7]。

3. 二次反応生成物 LOP による炎症性メディエーターの誘導[3]

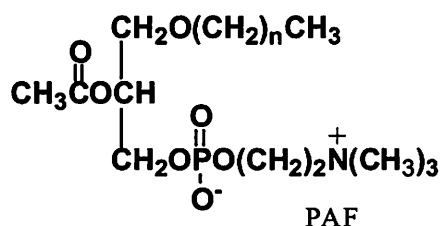
次に Pryor らのグループが目にしたのは、気管支上皮細胞の炎症メディエーター産生に対する LOP の影響である。オゾンに曝露されたヒトの気管支洗浄液にはプロスタグランジン E₂ (PGE₂)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-8 (IL-8) などの炎症メディエーターが検出されている。たとえば、ヒトに 0.4 ppm のオゾンを経験してから採取した気管支洗浄液では好中球、フィブロンectin、総タンパク質、乳酸脱水素酵素、PGE₂、IL-6、トロンボキサン B₂ などのレベルが上昇している[20]。

気管支上皮細胞は吸入オゾンの標的細胞であり、上皮細胞にオゾンを経験すると、アラキドン酸、血小板活性化因子 (PAF)、PGE₂、IL-6、IL-8 などの放出量が増加することを示す *in vitro* 試験の報告例も多い。たとえば、ヒトの気管支上皮細胞 (BEAS-2B) を 0.1~1.0 ppm のオゾンガスに 4 時間曝露した場合、IL-6 とフィブロンectin 放出量の有意な増加が認められている[21]。これら *in vivo* および *in vitro* における上皮細胞からの炎症メディエーターの放出にも、ホスホリパーゼの活性化を介して LOP が関与している可能性があり、Pryor らは、PLA₂ を活性化する PC-ALD および PLC を活性化する HHP-C9 の炎症メディエーター産生に対する影響を調べた。

血小板活性化因子 (PAF) の放出

^3H -標識リゾ PAF を取り込ませた BEAS-2B 細胞層の表面を、 $10\ \mu\text{M}$ の PC-ALD を含むメEDIUMで覆い、1 時間曝露してから、表面と側面のメEDIUMを採取して、それぞれに放出された PAF を測定したところ、表面のメEDIUMには、対照値に比較して $113\pm 11\%$ の PAF 放出量の増加が認められた (側面では対照との差がなかった)。前述したように PC-ALD は PLA2 を活性化することから [18]、予め PLA2 阻害剤である Mepacrine で細胞を処理してから同様に PC-ALD に曝露したところ、PAF 放出増加量の $90\pm 6\%$ が抑制された。したがって、PC-ALD は PLA2 の活性化を介して PAF の放出量を増加させると考えられる。

同様な方法で、PLC の活性化作用を有する HHP-C9 [18] についても BEAS-2B 細胞に曝露したところ、表面のメEDIUMには、対照値に比較して $134\pm 40\%$ の PAF 放出量の増加が認められた (側面では対照値との差がなかった)。また、予め PLC 阻害剤である U73122 で細胞を処理した場合は、PAF 放出増加量の $86\pm 6\%$ が抑制された。したがって、HHP-C9 は PLC の活性化を介して PAF の放出量を増加させると考えられている。



PAFは細胞膜上の受容体を介して血小板、好中球、マクロファージなどを活性化する。強い血圧降下作用、血管透過性亢進作用も有し、アレルギー、アナフィラキシー、炎症の進展に関わっている。

図 5 血小板活性化因子 (PAF) の構造と作用

PGE₂ の放出

PGE₂ 産生への LOP の影響は、シクロオキシゲナーゼ活性を有し、PGE₂ 産生能のあるヒト気管支上皮細胞 NHBE を用いた。この細胞に、1、10 および $100\ \mu\text{M}$ の PC-ALD を含むメEDIUMを加え、4 時間培養した後、細胞を除いた上清中の PGE₂ を酵素免疫法で測定した。NHBE 細胞を $10\ \mu\text{M}$ の PC-ALD に曝露した場合は対照値に比較して PGE₂ の放出量は $127\pm 21\%$ 増加したが、1 および $100\ \mu\text{M}$ では放出量に有意差は認められなかった。また、 $10\ \mu\text{M}$ における PGE₂ の放出量の増加は、予め PLA2 阻害剤である Mepacrine で細胞を処理することにより $96\pm 1\%$ 阻害された。したがって、PC-ALD による PGE₂ の放出量の上昇は PLA2 の活性化を介して起こると考えられた。

PGE₂ 産生に対する LOP の影響については別のグループによる研究例もある [22, 23]。アブストラクトしか入手できなかったため詳細は不明であるが、Leikauf らは、炭素数 3、6 および 9 個の直鎖アルデヒドおよび HHP のエイコサノイド (アラキドン酸やエイコサペンタエン酸などから生成される一連の生理活性物質群) の代謝に対する影響を検討している。ヒト気管支上皮細胞にこれらの LOP ($100\ \mu\text{M}$ 以上) を曝露すると、主要な代謝物として PGE₂、PGF_{2 α} 、15-Hydroxyeicosatetraenoic acid が放出される。これらの活性は HHP の方がアルデヒドよりも高く、いずれも炭素数が長いほど高い。また、これらの作用は、細胞崩壊を引き起こす濃度よりも低い濃度の LOP で現れる。この実験において、HHP やアルデヒドが PLA2 の活性化を介してエイコサノイドの産生を促しているとするれば、「ALD-C7、ALD-C9、HHP-C9 はアラキドン酸放出活性に影響しない」とする Pryor らの結果 [18] と矛盾することになる。

IL-8 の放出

BEAS-2B 細胞の層に 10 および $100\ \mu\text{M}$ の HHP-C9 を含むメEDIUMを加え、4 時間培養した後、細胞表面および側面のメEDIUM中の IL-8 を酵素免疫法 (ELISA) で測定した。IL-8 の放出には、PLA2 を活性化する LOP である PC-ALD ($100\ \mu\text{M}$ 、4 時間) は影響しなかったが、PLC を活性化する HHP-C9 では $100\ \mu\text{M}$ で、細胞表面メEDIUM中への IL-8 の放出量が対照値に比較して $101\pm 23\%$ 上昇した (側面のメEDIUM中では差がなかった)。ただし、 $100\ \mu\text{M}$ で 1 時間や $10\ \mu\text{M}$ で 4 時間の曝露では有意な IL-8 放出量の増加はみられなかった。細胞を PLC 阻害剤 (U-73122) で前処理した場合は、HHP-C9 ($100\ \mu\text{M}$ 、4 時間) による IL-8 放出増加が 93% 阻害されたことから、この IL-8 放出増加は PLC の活性化を介したものと考えられている。

前述したように、PLC が活性化されると、DG の産生が促進される。DG はプロテインキナーゼ-C (PKC) を活性化するので、この PKC の関与を調べた。すなわち、細胞をプロテインキナーゼ-C (PKC) の阻害剤

で前処理した場合、HHP-C9 (100 μM、4 時間) による IL-8 放出増加は、Calphostin C と Sphingosine では有意に抑制され、Staurosporine では阻害されなかった。この阻害剤選択性は、PKC の活性化剤であるホルボールエステル (PMA) による IL-8 の産生に対するものと同じであったことから、HHP-C9 の IL-8 放出作用は PKC (ある種のアイソザイム) の活性化を介して発現していると考えられる。

IL-6 の放出

IL-8 の場合と同様に、PMA は BEAS-2B 細胞の IL-6 の放出も促す。この IL-6 の放出は Calphostin C によって有意に抑制されるが、Sphingosine と Staurosporine では阻害されない。IL-6 の放出は HPP-C9 (100 μM、4hr) でも促進されたが (対照値に比して 178% の増加)、PLC 阻害剤 (U-73122) による前処理で抑制された。また、HHP-C9 による IL-6 放出に対する上記 3 種の PKC の阻害剤選択性は、PMA の場合と同様であった。したがって、IL-6 の放出にも PKC の活性化が関与していると考えられている。

IL-6 と IL-8 は代表的な炎症性サイトカインで、様々な炎症像を演出する。たとえば、IL-6 はマクロファージを刺激して急性炎症反応を誘導し、IL-8 は好中球の走化性を誘導する。したがって、HHP-C9 は IL-6 や IL-8 の産生を促すことによって炎症反応を進展させていると考えられている。

4. オゾン毒性(呼吸器系組織の炎症反応)のカスケードメカニズム

以上の実験結果に基づいて、Pryor らのグループが推定しているオゾンによる呼吸器障害 (炎症反応) のカスケードメカニズムは、①オゾンと脂質との反応による LOP の生成、②LOP によるホスホリパーゼの活性化、特に PC-ALD による PLA2 の活性化および HHP-C9 による PLC と PKC の活性化、③PAF、PGE₂、IL-6、IL-8 などの炎症性メディエーターの産生、④炎症性メディエーターの過剰産生による炎症反応の過度の進行、からなっている。図 6 にこのカスケードメカニズムの図示を試みた。彼らのここまでの研究では、LOP の標的分子はホスホリパーゼに限られているようであるが、その後の LOP についての研究では核内転写因子への影響にも注目している [4, 5]。この点については次回に紹介する予定である。

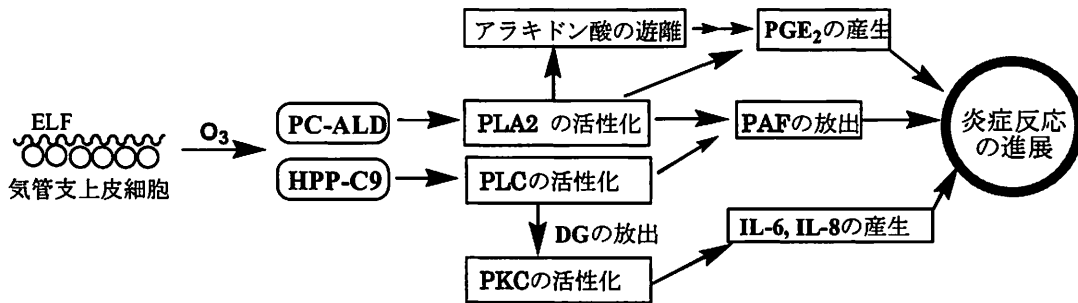


図 6 オゾンによる呼吸器障害 — オゾン毒性のカスケードメカニズム —

なお、LOP の一つであり、ホスホリパーゼ C (PLC) やプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化することが確認された HHP は、Viebahn-Hänsler がオゾン療法における「Bioregulator (Second messenger)」として想定しているものでもある。彼女は HHP の作用として抗酸化系の誘導を推定している [2]。

To be continued.....

文 献

[1] V. Bocci, Oxygen-ozone therapy: A critical evaluation. Kluwer Academic Publishers, 2001.
 [2] R. Viebahn-Hänsler, Proceedings of 19th Ozone World Congress of the International Ozone Association, Tokyo, Aug. 31-Sept 3, 2009
 [3] R.M. Kafoury, W.A. Pryor, G.L. Squadrito, M.G. Salgo, X. Zou and M. Friedman, Induction of inflammatory mediators in human airway epithelial cells by lipid ozonation products. *Am J Respir Crit Care Med.*160 (1999) 1934-1942.
 [4] R.M. Kafoury, J.M. Hernandez, J.A. Lasky, W.A. Toscano and M. Friedman, Activation of transcription factor IL-6 (NF-IL-6) and nuclear factor-κB (NF-κB) by lipid ozonation products is crucial to interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells. *Environ. Toxicol.* 22 (2007) 159-168.
 [5] C. Cappello, B. Saugel, K.C. Huth, A. Zwergal, M. Krautkrämer, C. Furman, M. Rouis, B. Wieser,

- H.W. Schneider, D. Neumeier and K. Brand, Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NFκB and IRAK-1-associated signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27** (2007) 226-232.
- [6] W.A. Pryor, G.L. Squadrito and M. Friedman, A new mechanism for the toxicity of ozone. *Toxicol. Lett.* **82/82** (1995) 287-293.
- [7] W.A. Pryor, G.L. Squadrito and M. Friedman, The cascade mechanism to explain ozone toxicity: The role of lipid ozonation products. *Free. Radical Biol. Med.* **19** (1995) 935-941.
- [8] M. Hallman, R. Spragg, J.H. Harrell, K.M. Moser and L. Gluck, Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. In: *Study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity, and plasma myoinositol.* *J. Clin. Invest.* **70** (1982) 673-683.
- [9] T. Sadana, K. Dhall, S.N. Sanyal, A. Wali, R. Minocha and S. Majumdar, Isolation and chemical composition of surface active material from human lung lavage. *Lipids* **23** (1988) 551-558.
- [10] A.M. Gilfillan, A.J. Chu, D.A. Smart and S.A. Rooney, Single plate separation of lung phospholipids including disaturated phosphatidylcholine. *J. Lipid Res.* **24** (1983) 1651-1656.
- [11] S.A. Shelley, J.E. Paciga and J.U. Balis, Lung surfactant phospholipids in different animal species. *Lipids* **19** (1984) 857-862.
- [12] D.H. Giamalva, D.F. Church and W.A. Pryor, A comparison of the rates of ozonation of biological antioxidants and oleate and linoleate esters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133** (1985) 773-779.
- [13] W.A. Pryor, B. Das and D.F. Church, The ozonation of unsaturated fatty acids: Aldehyde and hydrogen peroxide as products and possible mediators of ozone toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **4** (1991) 341-348.
- [14] G.L. Squadrito, R.M. Uppu, R. Cueto and W.A. Pryor, Production of the Criegee ozonide during the ozonation of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes. *Lipids* **27** (1992) 955-958.
- [15] R. Cueto, G.L. Squadrito, E. Bermúdez and W.A. Pryor, Identification of heptanal and nonanal in bronchoalveolar lavage from rats exposed to low levels of ozone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188** (1992) 129-134.
- [16] W.A. Pryor, E. Bermudez, R. Cueto and G.L. Squadrito, Detection of aldehydes in bronchoalveolar lavage of rats exposed to ozone. *Fundam. App. Pharmacol.* **34** (1996) 148-156.
- [17] Salgo, M. G., G. L. Squadrito, and W. A. Pryor, Activation of phospholipase A₂ in 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine liposomes containing lipid ozonation products. *Chem. Res. Toxicol.* **7** (1994) 458-462.
- [18] R.M. Kafoury, W.A. Pryor, G.L. Squadrito, M.G. Salgo, X. Zou and M. Friedman, Lipid ozonation products activate phospholipases A₂, C, and D. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **150** (1998) 338-349.
- [19] D.T. Wight, K.B. Alder, N.J. AKley, L.A. Dailey and M. Friedman, Ozone stimulates release of platelet activating factor and activates phospholipases in guinea pig tracheal epithelial cells in primary culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **127** (1994) 27-36.
- [20] R.B. Devlin, W.F. McDonnell, S. Becker, M.C. Madden, M.P. McGee, R. Perez, G. Hatch, D.E. House and H.S. Koren, Time-dependent changes of inflammatory mediators in the lungs of humans exposed to 0.4 ppm ozone for 2 hr: a comparison of mediators found in bronchoalveolar lavage fluid 1 and 18 hr after exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **138** (1996) 176-185.
- [21] R.B. Devlin, K.P. McKinnon, T. Noah, S. Becker and H.S. Koren, Ozone-induced release of cytokines and fibronectin by alveolar macrophages and airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **266** (1994) L612-L619.
- [22] G.D. Leikauf, Q. Zhao, S. Zhou and J. Santrock, Ozonolysis products of membrane fatty acids activate eicosanoid metabolism in human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9** (1993) 594-602(Abstract).
- [23] G.D. Leikauf, Q. Zhao, S. Zhou and J. Santrock, Activation of eicosanoid metabolism in human airway epithelial cells by ozonolysis products of membrane fatty acids. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* **71** (1995) 1-15 (Abstract).