総説

泌尿器科領域におけるメタロチオネイン

日本医科大学泌尿器科

秋 元 成 太

METALLOTHIONEIN STUDY IN UROLOGY

Masao Akimoto

Department of Urology, Nippon Medical School

はじめに

メタロチオネイン (Metallothionein, MT) は, アポタンパク質であるチオネイン (thionein) が金属と結合していることを意味している。

MT は, 1957年 ハーバード 大学 の Vallee と Margoshes¹⁾によってウマの腎皮質からみいだされた分子量約6,000の小さなタンパク質である。MT の構造式は (図1), 構成アミノ酸の約1/3をシステインが占めており, しかも S-S 結合を1つも持たずに全てのシステインのSH 基が遊離の形で存在している。そのために重金属との結合性が高く, 生体内に存在するMT は常に亜鉛や銅などの重金属と結合した状態にある。熱に対して比較的安定であり, 誘導をうけ合成されることもわかってきた。

MT の研究は, まず毒性学 (Toxicology) が中心になっておこなわれてきた。本邦でも, メチル水銀中毒の解明により進歩してきたといってよい。ところが最近になって, MT が重金属と生体内で結合することによって, 必須重金属の組織内濃度の調節に関与してい

ることもわかってきた。さらに重金属のみならず, アルキル化剤と結合することも判明した。つづいて, 体内において遊離基 (free radical) を生成することによって毒性を発現するような薬物または毒物に対しても, MT によって毒性軽減効果があることが解明され, 臨床上興味をひくようになってきている。

I. メタロチオネイン (Metallothionein MT) の特徴

すでにのべたように MT は, 最初にウマ腎から単離された。その後, 生物界に広く存在することがあきらかとなり, その性格, 特徴ははっきりしてきたが, それらをまとめるとつぎのようになる^{2)~5)}。

1. 低分子量 (6,000~7,000) であって,
2. 金属含有量が多く,
3. 特有のアミノ酸組成をもつこと,
4. 金属-チオール結合をもっており,
5. 特有のアミノ酸配列 (システイン残基の位置) を示す。

その後さらにヒト, サル, ウシ, ヒツジなどの哺乳

図1 ウマ腎より単離されたメタロチオネイン (Metallothionein) の構造式

Horse renal metallothionein-IB

動物の MT も同様の性質をもつことが判明し、このような蛋白に対してもメタロチオネイン (Metallothionein, MT) という名称がつけられた。

すべてのシステイン SH 基が遊離の形で存在しているので、重金属との間に高い結合力をもつ特徴があきらかとなった。したがって、生体内に存在する MT は、常に亜鉛や銅などの重金属と結合した形で存在している。

MT は、生命の維持に、なんらかの重要な役割をあたえていることは想像されるところであるがその本態は現在でもなおベールにつつまれているといつてよい。これまでの MT 研究の方向性は、重金属の生体内代謝についてのものが多くをしめていた。つまり重金属とくにメチル水銀³⁾のような有害な重金属が体内に侵入した際に、MT が多く合成される。この合成された MT が、重金属と強固に結合してその毒性発現をおさえる作用があることがわかってきた。

MT の各組織中の分布を調べてみると、中枢神経、毛根、生殖器官など亜鉛が重要な働きをしていると考えられる組織に MT が多く分布している点、MT と亜鉛との関連を示唆するうえで興味深い。

MT についての構造的な検討つまり三次元的な観察上、MT-I, II, III とに分類されている⁶⁾。

MT-I, II については、Kagi ら⁷⁾によって哺乳動物の肝、腎、腸から得られた細胞株を対象にイオン交換クロマトグラフィーより MT の分画について、詳細な研究がなされている。

最近、Uchida⁸⁾らや Palmiter⁹⁾らにより脳より MT-III を発見した。また、MT-I, MT-II の亜型について追究され、Hunziker¹⁰⁾らの研究によれば、ヒト MT-II は 1 種類のみであるが、ヒト肝 MT-I は、5 種類の isoform に分類できるという。

MT と MTmRNA レベルにおいて、加齢にともなう変化の研究がある。Panamangalore¹¹⁾らはラットで、Andrew¹²⁾らはマウスで、Clough¹³⁾らはヒトで、それぞれ胎児、新生児、成人の肝を対象として、MTmRNA の発現は胎児で高値を示すものの、以後漸減して成人に至ることを報告している。

Pauwels¹⁴⁾らは、ヒト単球の CDNA ライブラリーから、MT-I をさらに分類した。

彼らは、亜鉛が免疫細胞の活性に重要な役割を演じている点に着目して、ヒト単球 MT を対象に、PCR 法を中心にした研究結果を報告し、MT-I をさらに詳細に検索している。とくに CDNA の配列順序の比較か

ら MT-I を MT-Ie, MT-Ig と MTI-1 に分類し、このなかから、さらに MT-O, mRNA の存在も示唆している。

最近、Palmiter 一派^{15)~21)}は、ネズミ MT の遺伝子の研究中、MT-IV を発見してその遺伝子の局在を明らかにした。MT-IVmRNA の表現について現在検索中だという。

一方、MT のなかで金属とチオネイン (thionein) との分離した形態についても検討されてきている。すなわち MT から金属のない形を Apometallothionein (AMT) と名づけた。この AMT は現在まで in vitro の実験にかぎって存在が確認されているようであるが、Apostolova²²⁾らによればラット肝における AMT の検索に、reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) を使用した結果、in vivo と in vitro の実験で同様に AMT は MT とともに発見されたという。とくに、塩化カドミウム皮下注後ラット肝の MT の増加はみられ、AMT の減少がおこるという。

MT のヒト腎組織内濃度の加齢による変化をみると、濃度は 20 歳まではすくないが 20 歳以上で 60 歳までが多いという報告がある。

II. メタロチオネイン (MT) の誘導合成

生体にとって必須金属である亜鉛、銅を動物に与えると肝、つづいて腎組織中の MT 濃度の上昇がみられる。Lee²³⁾らは、亜鉛を与えたヒツジ肝、腎のなかの MT-Ia と MTII の mRNA を測定して、亜鉛を与えなかった対照群とを比較し、MT は肝で 4 倍、腎で 9 倍の濃度であったとしているが、十二指腸、筋、皮フにおける mRNA についてはその濃度の増加はみられなかったという。

MTmRNA の増加は、すなわち MT の増加につながるわけで、亜鉛や銅が MT 合成を誘導することになる。

亜鉛、銅以外の重金属として、水銀²⁴⁾、金、銀、白金、マンガ、ビスマスなども MT を誘導する。さらには、グルコルチコイド、カテコールアミン、インターフェロンのほか、アルキル化剤によっても MT が誘導合成される (表 1)。

ほかにも低温状態、運動負荷によっても同様に誘導されることが知られている。

MT の生理的意義について、小島³⁾は重金属の代謝 (吸収、輸送、貯蔵、恒常性維持) 解毒、保護作用に加えて、生体防御機構として、免疫現象、ストレス、フ

表1 メタロチオネイン (Metallothionein) が誘導合成される要因

金 属	そ の 他
Zn, Cu, Cd, Hg, Au, Ag	グルカゴン
Bi, Co, Ni, Mn, Pt など	インターフェロン
コルチコイドホルモン	インターロイキン
デキサメタゾン	パラコート
ブレドニゾロン	四塩化炭素
ヒドロコルチゾン	カラゲニン
アルキル化剤	エンドトキシン
ヨード酢酸ナトリウム	デキストラン
ジエチルマレイミド	アスコルビン酸
プロモベンゼン	5-アザシチジン
キレート剤	エタノール
ジエチルジチオカルバミン	インドメタシン
2,3-ジメチルカプトプロパノール	ビタミンD ₃
D, L-ペニシラミン	ホルボールエステル
カテコールアミン	低温状態
エピネフリン	運動負荷
ノルエピネフリン	放射線照射
	高濃度酸素暴露
	バクテリア感染
	絶食
	担がん

リーラジカルの捕捉, 放射線防護, 酸素毒性防護の各作用をあげている。

生理的ストレスにより MT が誘導されるのは興味深い, 同様に心理的ストレスや感覚的ストレス⁴⁾についても誘導されることがあきらかとなった。今後 MT 値がストレスの指標になりうるかどうかあらたな展開が期待される。

前にものべたが高酸素分圧下で放射線照射をおこなうと, MT が誘導されるという実験²⁵⁾があるが, さらに MT をあらかじめ誘導した動物は, 放射線に抵抗するという実験²⁶⁾もあり, MT と放射線抵抗性との関連の解明が今後の課題としてのこされる。

一方で, MT はフリーラジカル除去作用を有する²⁷⁾こともわかってきた。

Shiraga²⁸⁾らは, ラットに6-ハイドロオキシドパーミン (6-hydroxydopamine) を与えたところ, 亜鉛と同様に脳に MT が誘導されたという。このことは, パーキンソン氏病では, ドパーミン (dopamine) の欠乏状態が残存ニューロン内でのドパーミン合成を促進させる。その結果, 過剰な過酸化水素 (H_2O_2) が水酸化ラジカル (hydroxy radical, OH) に変化するので神経毒性が発現すると考えられている。これよりさきの展開で MT がフリーラジカル (free radical) のスカベン

ジャー (scavenger) としてどのような作用を有するのか?, 泌尿器科領域からみても興味をもたれる。

このように, MT は多くの機能をもつことが次第にはっきりしてきたので, 多機能蛋白質という見解²⁹⁾もある。一方では多方面にわたる生理的役割の増加がみられる反面, MT の特異性という観点からみると, 泌尿器科臨床面からその価値を低下させているのも否めない事実であろう。

ヒトや実験動物以外に, MT は広く生物界に存在することも, あきらかとなった。たとえば, ニワトリ, コイ, カレイ, ウナギ, ニジマス, ムラサキガイ, ミミズ, のほかラン藻にもその存在が確認されている事実を強調したい。

炎症による MT の誘導について, Choudhuri²⁹⁾らは, 細菌性外毒素 (bacterial exotoxin) として toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) を使用して, マウス肝での MT の増加を確認している。

Sato³⁰⁾らは, ラットを対象として炎症性サイトカインのうちインターロイキン6 (inter leukin-6, IL6) と α 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) による MT の誘導を実験している。IL-6 と TNF- α 注射後3時間で肝 MT-I 濃度は上昇したが, 肺, 心においては IL6 注射後 MT-I はほとんど増加しないが, TNF- α を与えると MT-I の上昇をみたという。

肝 MT は, すでにのべてきたようにさまざまな原因によって誘導されるが, 細菌内毒素 (bacterial endotoxin) による誘導も知られている。この内毒素は, マクロファージを活性化し, 各種サイトカインを放出させる。サイトカインが介在することで生体内における MT の誘導がなされるものと考えられている。

各種金属間における MT 誘導合成の強弱について, Cosson²⁴⁾は鯉を対象に, 一定の濃度のカドミウム, 銀, 水銀の溶液中を泳がせたのち, 肝における MT 誘導の程度を多い方からのべると水銀>銀>カドミウム>亜鉛の順であったという。

Szymanska³¹⁾らによると, ビスマス投与による肝, 腎における MT 誘導合成は, 肝, 腎のなかの銅と亜鉛量に比例することをのべているが, その実態については不明の点が多い。

腫瘍における MT, 亜鉛の恒常性 (homeostasis) については, philcox³²⁾らはラットの乳癌について興味ある報告をしている。低亜鉛血症は, 腫瘍増大時に亜鉛を必要とするためにおこるものであるが, この際には腫瘍 MT も肝 MT も低亜鉛血症とは関連はないもの

といっている。

III. 重金属とメタロチオネイン (MT)

MT 研究が、重金属の検討中毒から始まったことはすでにのべた。重金属を中心とした毒性学 (Toxicology) において、MT についての研究が中心的役割をはたしてきたといっても過言ではない。

毒性学における MT 研究の目的は、重金属の毒性を中和するための生体防御機構にどのように関与しているかを解明することであった。

たとえば、生体内にカドミウム (Cd) が侵入すると肝において MT が誘導合成される。合成された MT は重金属をとり込んで無毒化する。この過程で、Cd の一定量までの無毒化は可能であるが、生成された MT 容量以上の重金属が摂取されたときには、Cd は自由なイオンとしてあふれ出してこれが毒性を発揮することになる。

A) カドミウム (Cd) 毒性とメタロチオネイン (MT)

重金属のなかでも、カドミウムは MT の誘導能がもっとも強い。一方、カドミウムはとくに汚染されないときでも、ヒトや動物の組織中に見出される。そのため従来より、MT の解毒機構解明上、カドミウムがもっともよく研究の対象となってきた。

カドミウムの急性毒性は、致死量は別にしても、それよりすくない量では標的臓器として腎、精巣、肝などがあげられる。

カドミウムの腎蓄積性と腎毒性の関連については、1974年に、すでに Kimura³³⁾らが報告している。その後も Suzuki³⁴⁾ら、Onosaka³⁵⁾ら、Squibb³⁶⁾³⁷⁾らのカドミウム腎毒性と MT の誘導とその腎機能保護機構についてふれている。

ただし、カドミウムにより誘導されたカドミウムと MT の結合した Cd-MT の形態のものは、このものの単独に与えると腎毒性をもつことが知られている。Zalups³⁸⁾らは、この Cd-MT を片側腎摘除ラットに使用し、用量依存的に腎障害がおこることを認めた。

Min³⁹⁾らも同様な報告をしているが興味あることは、あらかじめ少量のカドミウムを与えておいて MT を誘導合成させておくと、致死率を下げるができることが、すでに1960年代より知られている⁴⁰⁾。この効果は投与後3日間はつづくが、その後は減少していくことがあきらかとなった⁴⁰⁾。

長期にわたるカドミウム投与による肝毒性と腎毒性との関連を、Dudley⁴¹⁾らは、カドミウム MT を放出することでひきおこされたカドミウム肝障害が、カドミ

ウム腎障害をきたす要因の一つとなりうると考えられるとのべ、カドミウム MT の意義について言及している。

Hopf⁴²⁾らは、ラットに Cd とエタノールの併用投与をすると、カドミウムはとくにエタノールの毒性を増悪させる働きはないとしている。

A-1) カドミウム (Cd) による精巣毒性

カドミウムが精巣に対する毒性をもつことはすでにのべた。少量のカドミウムの前投与により、精巣障害をふせげることでも証明されている。

一方では、すでにのべてきたカドミウムと MT が結合した Cd-MT を注射しただけでは、精巣障害はおこらない⁴³⁾ことも認められている。

さらに亜鉛 (Zn) の前投与によっても急性のカドミウム精巣毒性の予防が可能であることも報告されている。この理由として、亜鉛が亜鉛チオネインを誘導合成した結果、これがカドミウムをより捕捉しやすくなるためではないかと考えられている。ただし、精巣はほかの臓器よりも亜鉛を多く含んでいることから、Zn の前投与による MT の合成のみで、カドミウムに対する精巣の防禦機構における亜鉛の役割のすべてを説明できないとする報告もみられ、一定した考え方はない。

A-2) カドミウム (Cd) の腎毒性

くり返すが、カドミウムを含むメタロチオネインそのものが腎毒性をもつという報告がある。このことは、カドミウムイオンからカドミウムチオネインへの変化が、肝や精巣にとっては解毒的に作用するが、他方腎には有毒的に働くということになる。さらに腎上皮細胞に対するカドミウム毒性についての実験で、①細胞内で合成されたカドミウムを含む MT は、カドミウムの毒性を軽減する作用があるものの、②細胞外に加えられたカドミウム含有 MT は毒性を示したという。この事実は、カドミウム含有 MT の毒性は、細胞膜を通過するときにうける変化で、腎上皮細胞に与える毒性に差が出てくるということを示しているが、この本態については解明されていない。

いずれにせよカドミウムの毒性発現について、MT がおこきな役割をはたしていることは事実であろう。

A-3) カドミウム (Cd) 汚染とメタロチオネイン (MT)

疫学的検索をカドミウム汚染地域におこなって MT 尿と腎機能障害との関連をみた報告がある。Shaikh⁴⁶⁾らは、アメリカにおけるカドミウム製練者について調べた成績では、腎機能正常者と比較すると腎

機能異常者における MT の排泄は有意義に上昇しており, MT が腎機能異常発見のモニターとして役立つ可能性があるとのべている. つづいて Shaikh⁴⁷⁾らは, 本邦におけるカドミウム汚染地における MT 尿の出現頻度は, カドミウム汚染米を摂取した年数に応じて上昇する傾向を示し, MT はカドミウムの環境汚染時における腎機能異常の示標となりうることをのべている.

A-4) カドミウム (Cd) と発癌

Waalkes^{48)~51)}らは, まず最初に, ラット精巣機能異常をきたすカドミウム量 ($5.0\mu\text{mol/kg}$) 程度でも, 前立腺腫瘍の発現頻度が増加することを確認した. たとえ Cd による精巣機能異常を亜鉛を与えることでおさえたとしても, 多量 ($30\mu\text{mol/kg}$, S.C.) のカドミウムでは前立腺腫瘍の出現頻度が増加することを示した. 餌にふくまれるカドミウムを $25\sim 200\mu\text{g/g}$ とすると, 前立腺に悪性変化がみられるとのべ, このラットの成績は, カドミウム汚染が, ヒト前立腺癌発生上の役割をかなりはっきりとさせた報告と思われる.

さらに Waalkes⁵²⁾らは, カドミウムによるラット精巣腫瘍 (間質細胞由来) の発癌に成功している.

そのカドミウムによる精巣腫瘍発生の予防については, あらかじめ亜鉛を与えることで MT を誘導し, カドミウム蓄積による精巣腫瘍発生を予防している.

カドミウム蓄積に, どのような形で MT が関与しているか? またその関与によりどのような機構でカドミウム排泄につながっているか? については, あきらかではない.

IV. メタロチオネイン (MT) の発現と免疫組織学的研究

泌尿生殖器の正常組織, とくに細胞レベルにおける MT の発現を検索した成績は, Nishimura⁵³⁾らによるラット精巣, 精巣上体, 精囊, 前立腺についての詳細な報告がある.

免疫組織学的手法をもちいて, MT の局在を検索した成果はつぎの通りであった.

① 精巣: ラット精巣内の成熟精子の出現がある精細管では, 全体として MT の染色性は弱かったが, そのなかでも精子を含んでいる細胞は, 強い染色性を示していた. ライディッヒ細胞 (Leydig cell) は染色されなかった. 加齢にともなう変化として, MT は生後 7 日で支持細胞で認められ, 14 日では基底膜に接した精祖細胞でみられ, 21 日では, 精細管の中心部の精母細胞に局在していた. 精巣輸尿管だけは例外であった

が, 基底細胞における MT の染色性は高度であった.

② 前立腺: もっとも強い染色性が側葉 (lateral lobe) において認められている. 背葉 (dorsal lobe) ではアポクリン分泌部に局在していた.

③ Suzuki⁵⁴⁾らは, ヒト精囊についても同様な検索をおこない, MT が上皮の細胞質を核に局在し, さらに腔内分泌物液中にも認められたという. 上皮細胞内においても MT の分布は不均等であったとのべ, 平滑筋細胞では陽性で, ほかの結合組織細胞では陰性であったという. またエストロゲン服用後では高度の反応性を示す物が多いが, 細胞分泌物では陰性であったという. これらの成績から, ヒト精囊上皮と上皮分泌物液中では MT の合成はすすむが, ホルモン療法影響下では MT の合成がおさえられることをあきらかにしている.

参考までに, 泌尿生殖器以外に MT が高濃度でみられる臓器としては, 肺, 肝, 脾, 腸管⁵⁵⁾⁵⁶⁾のほか, 組織の一部に限局してみられるものに, 脳, 胎盤などがあげられる.

組織学的に前立腺と乳腺は類似点が多いことは知られている. 正常の乳腺では MT は筋上皮細胞 (myoepithelial cell) にみられるが, この傾向は線維腺腫 (fibroadenoma) や腺管内乳頭腫の筋上皮細胞に多いという. 他科領域における MT についての免疫組織学的研究のうち, 泌尿器領域に応用可能と思われる報告もすくなくない.

肝 MT に対するモノクローナル抗体を作成し⁵⁸⁾, 筋上皮細胞 (myoepithelial cell) の免疫組織学的検討に有用であったとする報告もある.

Meskel⁵⁹⁾らも DNA フローサイトメトリーを使って, 乳癌と大腸癌を対象に検索して上皮増殖変化の指標として MT 染色は悪性度を判定するのに役立つとのべている.

Douglas-Jones⁶⁰⁾らは, MT の immunobelling 分布を正常ラット肝細胞とカドミウム負荷ラット肝細胞とで比較した. その成績から MT の分布は, 正常ラット肝細胞のなかで, 実質細胞 (parenchymal cell) 高度陽性, 上皮細胞 (epithelial cell) 中等度陽性, クッパー細胞 (Kupffer cell) は軽度陽性, 星状細胞 (Stellate cell) 陰性と, 機能別細胞毎では差異があきらかであったという.

超微形態的研究もおこなわれており, たとえばカドミウム負荷ラット肝細胞に対して cryo-immunocytochemical technique をもちいて MT の

分布、とくに核を中心に電顕的に検索し、MTの局在についてのべている。

④ 泌尿生殖器腫瘍におけるMTの発現ならびに免疫組織学的研究

本邦では、すでに膀胱癌および腎細胞癌についての雑賀⁶¹⁾⁶²⁾らの研究がある。パラフィン包埋標本を対象に、抗MT抗体を用いてABC染色法によりMTの発現を検索している。腫瘍より対照とした正常膀胱粘膜に強いMT発現を認めたほか、正常腎尿細管でも強いMT発現がみられた。MT発現は、異常増殖の盛んな低分化癌では低下する傾向があることと、腎細胞癌は膀胱癌よりもMT発現頻度は高く、腎細胞癌が抗癌化学療法の効果が低い原因の一つと考えられるとしている。同様な方法での検討で、耐性培養細胞では親株に比べてMT発現が増強していること、反復継続した抗癌剤投与によりMTが誘導され、抗癌剤耐性を獲得する可能性についてのべている。Bahnson⁶³⁾らもヒト膀胱移行上皮癌9例を対象に免疫組織学的手法をもちいて、MTの局在について検索した。MTの発現は、正常の尿路上皮には高度にみられ、さらに細胞質以外のところに局在し、過形成や上皮内癌の部位で高度陽性を示したが浸潤部位ではMT発現は弱いか、さまざまな状態を示したという。さらに治療成績からみても併用化学療法として現在おこなわれているM-VAC療法は、膀胱上皮内癌に対しては有効性に乏しいのはよく知られている。たとえばScher⁶⁴⁾らによるスローンケタリング癌センターでのM-VAC療法後膀胱全摘したものの病理組織学的検討で、浸潤癌は消失したのに膀胱、尿管、尿道内のそれぞれの上皮内癌は残存していたとの結果は、Bahnson⁶³⁾らの結果と合わせて興味深い。

Kontzoglou⁶⁵⁾らも、ヒト精巣腫瘍(胎児性癌)9例における免疫化学的手法(ABC法)によりMTの局在を観察している。その結果、MTが、腫瘍増殖産物(oncodevelopmental product)そのものと考えられる所見も認められ、腫瘍マーカーとしての有用性についてもふれている。Kuo⁶⁶⁾らも、ヒト膀胱癌株(T24)を対象にepitope-specific antibodiesを利用する方法がヒトMT-II-Aの細胞内局在検索に有用であったとして、この方法が今後MT-isoformsの細胞内局在検索に役立つ可能性をのべている。

Suzuki⁶⁷⁾らは、正常前立腺と肥大前立腺を対象として、免疫組織学的検討をおこなった。MT局在部位は前立腺のperipheral zoneに多く認められ、前立腺液

中にも分泌されていることを証明している。同様な方法で、Cd負荷したラット精囊では、基底細胞(basal cell)にMTの局在がみられることと、MTは毒性金属から細胞傷害をふせぐ役目が考えられると報告している。

V. 制癌剤による腎毒性とその防御におけるメタロチオネインの意義

MTの生理機能として、もっともよく研究されてきた領域は重金属の生体内代謝とMTの関連であった。つまり重金属が生体内に侵入するとMTの合成が促進され、この合成されたMTが、つぎに侵入してくる重金属と強力な結合力を発揮して、その毒性の発現を抑制することがわかってきたからである。一方、シスプラチンは泌尿生殖器腫瘍に対して高い有効性がみられる。しかもシスプラチンはプラチナ誘導体のなかでも最も早く登場した重金属由来の制癌剤である。現在でもこのシスプラチンが泌尿器科領域における併用化学療法の中心的役割をはたしてきている。シスプラチンの用量規制因子(dose limiting factor)が、腎毒性であることはよく知られている。この副作用はシスプラチンの重複使用により増加する。臨床上投与量の増加とともに、水負荷による軽減効果のみで腎毒性防御が十分ではないことは臨床上よく経験する。シスプラチン登場後まだわずかの期間しか経過していないので本剤について長期にわたる副作用に関する文献がすくなく、腎毒性の実態がつかめないのが現状であろう。

A. シスプラチンによる急性腎不全実験

玄番⁶⁹⁾は、シスプラチンによる急性腎不全モデルとして、Sprague-Dawley系雄性ラットにシスプラチンを腹腔内に単回投与し、①8mg/kgとすると2日目より、②5ng/kgにすると3日目よりBUNは有意に上昇するという。このようにシスプラチンによる急性腎不全は、その発症まで数日を要すが静脈内投与による方が実験的急性腎不全の発生日にバラツキが少ないという。

B. 培養腎上皮細胞に対するシスプラチンの腎毒性

培養腎上皮細胞株として、①ブタ腎由来のLLC-PK細胞(近位尿管様の性質をもつとされる)と、②イヌ腎由来のMDCK細胞(遠位尿管や皮質部集合管様の性質をもつとされる)が利用されている。もちろんほかにも樹立された株はすくなくない。腎毒性をみる時には細胞継代の際に、あらかじめ、 $1\mu\text{M}$ ~ $10\mu\text{M}$ に調整しておいたシスプラチンを加えるとその量に応じて、2日目または3日目より、LDHの漏出増大⁷⁰⁾が

みられるという。ラットにシスプラチンを投与すると血液中の濃度は数 μM とされているので、培養メジウム中のシスプラチン濃度は、血液中の同様の濃度であって、この際みられる腎細胞障害は細胞膜透過性増大の結果だという。

培養腎上皮細胞からの酵素漏出は、LDH のみならず、NAG や γ -glutamyl transpeptidase もみられるが、これらは、腎障害の程度に応じて増加する。

いずれにしても、動物実験と同じようにインビトロの実験でも、腎細胞障害発現までに数日を要する点は共通している。

C. シスプラチンの腎内代謝と分布

シスプラチンをラットに与えたあと、血液にその代謝産物として7種類が同定される⁷³⁾という。これらの代謝産物は腎尿細管上皮細胞へ輸送系を介して基底細胞膜からとりこまれたシスプラチンが細胞障害を発現する⁷³⁾。

代謝産物の併用部位は近位尿細管のS3セグメントに障害をひきおこされることがわかってきた。

シスプラチンの腎毒性については、①腎皮質切片において過酸化脂質を増強させることで細胞障害性を高め⁷⁵⁾、抗酸化剤により腎毒性は軽減し⁷⁶⁾、腎内グルタチオン量を低下させるとその障害は増加する⁷⁷⁾という。これらの結果からシスプラチン腎毒性にフリーラジカル発生の関与が示唆されているが、その発生機構の解明は今後の課題である。

ラットにシスプラチンを与えると、4日目においては、シスプラチンは血漿の37倍濃度が腎に存在するという。このように腎内に長期間蓄積することが腎障害発現の一因となりうることが考えられる。シスプラチンは腎細胞内では細胞質内に広く分布し、高分子物質および低分子物質とそれぞれ結合しているが、この結合の意味もまだ十分には解明されていない。

D. シスプラチン腎毒性とメタロチオネイン (MT)

Naganuma ら⁷⁸⁾は、MT を腎内にあらかじめ合成することでシスプラチンの腎毒性を軽減できることを、はじめてあきらかにした。Boogaara らも、ラットをもちいた実験でほぼ同様な結果を得た。さらに、亜セレン酸によるシスプラチン毒性に対する軽減効果を証明する⁸⁰⁾とともに、シスプラチンの抗腫瘍性には全く影響を与えずに、腎毒性を選択的に軽減することをあきらかにした⁸¹⁾。

さらに、Naganuma ら⁸²⁾は、腸管から比較的吸収されにくい、次硝酸ビスマス (bismuth subnitrate) を用

いて、50mg/kg、1日1回ずつ25日間マウスに経口投与することで、35 $\mu\text{mol/kg}$ のシスプラチン投与による致死毒性および腎毒性が、完全に抑制されることを報告し、ビスマスの臨床応用の可能性を示唆している。

ビスマスは、すでに局方の次硝酸ビスマスとして腸管内で硫化水素と結合するため、潰瘍、下痢などに効果があるとされる。ただし長期大量連用をおこない、さらに便秘をきたすと、亜硝酸中毒(頭痛、記憶減退、高度では精神神経障害)をおこす危険性はあるが、これらの症状はすべて投与中止後数週から数箇月で消退する。

つぎに、Kondo⁸³⁾らはヒト膀胱腫瘍を移植したヌードマウスに対して、次硝酸ビスマス (bismuth subnitrate, BSN) を与えておくことで、シスプラチンの抗腫瘍効果を減弱することなく、腎毒性を軽減させた。ヌードマウス腎内MTとビスマス濃度は、シスプラチン投与前にビスマス投与することは腎内MTと腎内ビスマスの濃度を上昇させ、さらには腎機能障害を軽減させ、病理組織学的にも腎障害を防止することを示している。Kondo ら⁸⁴⁾はさらに、より臨床的な投与方法、つまりシスプラチンのプロトコールと同様ヒト膀胱腫瘍をマウスに移植後シスプラチンをくり返し与える方法(5サイクル)で、実験をこころみている。対照としたシスプラチン単独群は、BUN値は100mg/dl以上で、シスプラチン併用ビスマス前投与群ではBUN値は正常値よりやや上昇したものの40mg/dl以下となり、くり返して行うシスプラチン療法でも有効性を示している。ビスマスの腎組織内濃度は投与ごとに増加するが、MTは2回投与時に最高値に達し以後増加しない。これに反して、ビスマスの腫瘍内濃度は、初回以後有意な増加を示さない。MT濃度は投与前と投与後とで有意差はみられなかったという。この成績から、シスプラチン投与群にあらかじめビスマスを投与しておけば、腫瘍内にMTの誘導なしに腎内にMTの誘導合成が起こることを示している。

Naganuma⁸⁵⁾らは、マウスにエールリッヒ癌を移植してビスマス前投与後、アドリアマイシンを与えたが、抗腫瘍効果に影響せずに、致死毒性、心毒性、骨髄毒性を軽減させたとのべ、MT誘導の意義について報告している。

Sato⁸⁶⁾は、マウスを用いてシスプラチンとアドリアマイシンとの併用化学療法においても、それぞれの用量規制因子(dose limiting factor)とされる腎毒性、心毒性のほか骨髄毒性についても検討した。

亜硝酸ビスマス(50mg/kg、5日間連続)を、前投

与した群については、シスプラチン $40\mu\text{mol/kg}$ とアドリアマイシン $30\mu\text{mol/kg}$ 併用群で、生存率86%、シスプラチン $45\mu\text{mol}$ とアドリアマイシン $35\mu\text{mol/kg}$ の併用群で生存率57%となり、亜硝酸ビスマスの非投与群（対照群）では0%の成績で致死毒性についてはあきらかに亜硝酸ビスマスの効果を認めている。

アドリアマイシンの作用機序として、生体内でフリーラジカルを生成し、この作用が抗腫瘍性ならびその副作用を示すとの考え方がある。この点、すでにのべてきたようにMTが重金属毒性軽減作用とともに、フリーラジカル除去作用もあるので、心毒性では過酸化脂質の増加、骨髄毒性では白血球減少を指標に検索し、アドリアマイシンの抗腫瘍性に影響なく、心毒性と骨髄毒性を軽減している。さらに、Naganumaら⁸⁷⁾は、マウスを使用してアドリアマイシンのほかに、放射線照射に対してもビスマス前投与の有効性をのべるとともに、プレオマイシン、ペプロマイシン、5-フロウラシルも抗腫瘍効果をそこなわずに、ビスマス前投与により致死毒性を軽減することをのべた。

すでに臨床的にも、泌尿器科領域以外でシスプラチン腎毒性に対する軽減効果を期待してビスマスの投与が行われている。産婦人科領域において陳ら⁸⁸⁾は、次硝酸ビスマスの前投与の有用性を認めている。谷脇ら⁸⁹⁾は、ビスマスの累積投与量が多量になったときに腎毒性が軽減されるかどうかは不明とし、さらに次硝酸ビスマスの投与方法と、シスプラチンの抗腫瘍効果の関係をみると、次硝酸ビスマスの投与量が増加すると、抗腫瘍効果がやや弱くなる傾向を示すとのべている。以上の2点は今後解明すべき課題であろう。

高橋ら⁹⁰⁾は、シスプラチン 150mg を1時間持続点滴法を行ったが、9例に次硝酸ビスマス 2.5g を、投与前5日間経口投与している。対象群では腎尿管障害の指標であるN-acetyl-B-D-glucosaminidase (NAG)と β_2 -microglobulin (MCG)排泄量の著しい増加がみられたのに、次硝酸ビスマス併用群では増加が認められなかったという。

浜田ら⁹¹⁾も、肺癌44名を2群に分け、次硝酸ビスマス 4g を、シスプラチン投与前5日間投与した群(22名)と非投与群(22名)にわけて検討している。非小細胞癌に対するシスプラチンを含む併用化学療法を行い、シスプラチンを含むこの療法の抗腫瘍効果が次硝酸ビスマスにより抑制されないことを確認している。つづいてこの療法を4サイクル行っているが次硝酸ビスマス投与群に比較して非投与群では、シスプラチンの投

与回数が増えるにしたがって血清クレアチニンおよび血清尿素窒素が上昇し、二群間に大きな差がみられ次硝酸ビスマスによる腎毒性軽減効果が認められている。

Kondoら⁹²⁾も、次硝酸ビスマスの腸管吸収をより効率よくするために、健康男性を対象にクエン酸塩(sodium citrate)を併用して服用させた群(次硝酸ビスマス 1g を1日3回、5日間)と、非併用群(次硝酸ビスマス 2g を1日3回、5日間)との比較を、尿中ビスマス量で行い併用群に有意の増加を認めたという。さらに、クエン酸塩併用次硝酸ビスマス服用群のヒト腎細胞癌4例の摘出腎について、その正常部でのビスマス濃度は、癌組織に比べて5倍～10倍と極めて高濃度に分布していたという。MTについても、正常部ではやや増加する傾向をみていたが、腎細胞癌部ではほとんど変化していないとのべ、この成績から次硝酸ビスマスの服用をより効率よく吸収させるためには、クエン酸塩との併用がよいことがわかる。

Saijoらは、無作為選択方式(randomized controlled trial)にて、腎癌4症例に次硝酸ビスマス 25mg/kg 1日2回、5日間投与し、MT濃度をみると正常部は腎癌部に比してあきらかに高値を示しており、Kondoと同様に、次硝酸ビスマスによって腎正常部で誘導されるMTが、癌部では誘導されないことを報告している。

ビスマスのかわりに、亜鉛や銅を使用すると、ビスマスとは異なった態度をとることはよく知られている。例えば亜鉛と銅は腫瘍組織中にMTを合成誘導してしまうので、腎毒性軽減効果はみられるもののシスプラチンの抗腫瘍効果を減じてしまうという。

Satoら⁹⁴⁾は、マウス膀胱癌株(MBT-2)をもちいて、亜鉛を与えることで腫瘍細胞内と腎細胞内のMT濃度が上昇することと、同様に抗腫瘍効果と腎障害がともに低下することを確認したのち、プロパルギルグリシン(propargylglycine, PPG)を使って、興味ある実験をこころみている。亜鉛とともにPPGを与えると、腎MTに影響なく、腫瘍MTを減少させた。このことは、亜硝酸ビスマスと同様、PPGはシスプラチンによる抗腫瘍効果を低下させることなしに、腎障害を軽減したことになる。

シスプラチン以外の薬剤の腎毒性についてYangら⁹⁵⁾⁹⁶⁾は、MTが、水酸化ラジカル(hydroxy radicals)のスカベンジャー(scavenger)としての働きがあるので、ゲンタマイシン腎毒性に対して有効であること、

さらには、その部位がラット近位尿管であり、MT によるあきらかな保護使用がみられることを報告し、薬剤の腎毒性と MT との関連を検索している。

VI. 制癌剤耐性とメタロチオネイン

Bakka ら⁹⁷⁾は、カドミウムに対して耐性を示し、しかも MT 含量の高いヒトおよびマウス細胞が、シスプラチンに対しても耐性を示すことと見出している。シスプラチンはプラチナを含む錯化合物であって、MT にシスプラチンのなかのプラチナ部分が結合することによって⁹⁸⁾⁹⁹⁾細胞毒性が軽減されると考えられている。

さらに、Andrews ら¹⁰⁰⁾は、興味ある実験をしている。(a) カドミウムに対して耐性を示す含量の多いヒト卵巣がん由来細胞 (2008/MT) は、(b) カドミウムに耐性でない視細胞と比較すると、細胞内へのシスプラチンのとりこみは(a)と(b)との間に差はない。しかしながらとりこまれたシスプラチンのなかのプラチナ部分が、MT との間の結合力は、(a)は(b)の4倍以上みられたとのべ、シスプラチン耐性と MT との関連を示している。

なお、2008/MT 細胞は、シスプラチン耐性獲得因子の一つと考えられているグルタチオン (glutathion, GSH) も高濃度に含有している。しかしカドミウム耐性である2008/MT 細胞が示すシスプラチン耐性は、グルタチオン合成阻害剤の影響を受けないことがはっきりしているので、MT が2008/MT 細胞のシスプラチン耐性獲得に大きく関与している可能性が示唆されたという。

つぎに、この2008/MT 細胞からシスプラチン耐性細胞(2008/DDP)を作り出してみると、この2008/DDP の MT 含量は、親細胞である2008株とほとんど増減していないことがわかった。すなわち、シスプラチン耐性獲得には MT 以外の因子も考えに入れる必要がある。

グルタチオン (GSH) は、MT と同様に細胞内解毒因子^{101)~103)}であるが、耐性因子の一つとも考えられている。これは、越知の報告¹⁰⁴⁾によると膀胱癌株 T24 (CL-7) より樹立したシスプラチン耐性株 CL-7/CDDP は、CL-7に比較して、細胞内 GSH と MT は高値を示したという。ほかにも、同様な研究もすくなくない¹⁰⁵⁾¹⁰⁶⁾。

Timmer-Bosscha らも、(a) ヒト胎児性癌株 Tera をもちいて、シスプラチン耐性株である (b) Tera-CP を作成して両者を比較している。グルタチオン (GSH)

で、(b)は(a)の1.4倍、グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性 (glutathion S-transferase activity) で、(b)は(a)の1.5倍を示しており、ヒト精巣腫瘍株のうちシスプラチン耐性株の樹立を報告している。

一方、アルキル化剤を含めてではあるがプラチナ化合物の耐性において MT のはたしている役割については、すでにのべたようにあきらかにされているわけではないが、Kelly⁷⁷⁾らによれば、MT の過剰な発現 (over expression) が、プラチナ化合物とアルキル化剤の耐性に関連しているという。

Doz¹⁰⁸⁾らも、制癌剤の殺細胞性効果 (cytotoxic effects) に対する耐性における MT の生理的役割は十分には解明されていないが、癌治療上、MT と癌化学療法剤との関係を十分に理解することが癌化学療法について重要であるとのべている。

Morton¹⁰⁹⁾らは、シスプラチン耐性と MT の関係について、トランスフェクションした株として、transfected NIH/3T3株を用い、カドミウムによって腫瘍内 MT が増加するときは、シスプラチン耐性になることは問題ないとしているが、一方 transfected NIH/3T3 株は、MT を発現していても、シスプラチン耐性とはならなかったとのべて、MT とシスプラチン耐性との関連は、別な要素も考えなければならない複雑な関係にあるという。

一方、Weffer¹¹⁰⁾らは、ヒト前立腺癌株 (DU145) を使って、カドミウム耐性細胞 (Cdr) とカドミウム感受性細胞 (Cds) とにわけて実験した成績を報告している。(a) MT の増加はアドリアマイシンに対してカドミウム耐性細胞の耐性を増加させ、(b) MT の減少はアドリアマイシンに感受性をあげさせ、(c) アドリアマイシンは、MT 誘導をおさえた。これらのことを総合すると、臨床的にはアドリアマイシンを含む制癌剤療法をおこなうには、つぎの方法が考えられるという。それはアドリアマイシン感受性を示す前立腺癌に対して、アドリアマイシン投与2回目に、より効果的に作用することになるが、比較的増殖がゆっくりした前立腺癌に対しては、同様な効果は期待できず2回目に与えるアドリアマイシンの投与法になんらかの工夫をこらしたらどうか、という。

Chin¹¹⁾らは、ヒト精巣腫瘍 (セミノーマ10例、非セミノーマ23例) について免疫組織学的手法を用いて MT 染色性についてつぎの成績を得ている。(a) セミノーマは、弱いかほとんど染色されずしかも臨床病期とは関係なかった。(b) 非セミノーマは、MT に染色

性は高く、さらに臨床病期と比例していた。しかしながら治療効果との関連はあきらかでなく、シスプラチン耐性の解明は今後の問題としている。

横溝ら¹¹²⁾らものべているように最近多剤耐性の獲得が目されてきている。これは多剤耐性株、*mdr-1*遺伝子の単離、*mdr-1*遺伝子がコードする膜局在P糖蛋白の解析、同定により多剤耐性獲得機構がわかりはじめてきている。P糖蛋白以外にも、多剤耐性獲得のもう一つの新しい遺伝子として、MRP (multi-drug resistance associated protein) 遺伝子も単離されている。これらの解明もいそがねばならないが、MTが、腫瘍増大時に産生されるので、マーカー(biomarker)としての有用性を考えている研究者もある。将来への展望も含めて、Hart¹¹³⁾らは、切除した肺癌11例(6腺癌、2小細胞癌、1混合癌、1扁平上皮癌、1転移癌)の検討から、肺癌組織中MT、銅が正常組織よりあきらかに多くみられ、MTは幼児肺組織には多く含まれていることなどから、biomarkerとしての発展も考えられるとしており、泌尿器科領域においても今後の課題として残されていることを結びとしたい。

文 献

- Margoshes, M. and Vallee, B.L.: A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813—4814, 1957.
- 森田正敏: メタロチオネインとその生物学的役割. 代謝, **20**, 615—623, 1983.
- 小島 豊: メタロチオネイン. 最新医学, **45**, 788—795, 1990.
- Oh, S.H., Deagen, J.T., Whanger, P.D. and Weswig, P.H.: Biological function of metallothionein. V. Its induction in rats by ration stresses. *Am. J. Physiol.*, **234**, E282—E285, 1985.
- Miura, K. and Imura, N.: Mechanism of methylmercury cytotoxicity. *Toxicology*, **18**, 215—243, 1987.
- Kille, P., Hemmings, A. and Lunney, E.A.: Memories of metallothionein. *Biochimica et Biophysica. Acta*, **1205**, 151—161, 1994.
- Kägi, J.H.R. and Kojima, Y.: Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experienta (Suppl.)*, **52**: 25—62, 1987.
- Uchida, Y., Takio, K.K., Titani, K., Ihara, Y. and Tomonaga, M.: The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, **7**, 337—347, 1991.
- Palmiter, R.P., Findley, S.D., Whitmore, T.E. and Durnam, D.M.: MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 6333—6337, 1992.
- Hunziker, P.E. and Kägi, J.H.R.: Isolation and characterization of six human hepatic isometallothioneins. *Biochem. J.*, **231**, 375—381, 1985.
- Panamangalore, M., Banerjee, D., Onasaka, and Cherian, M.G.: Changes in the intracellular accumulation and distribution of metallothionein in rat liver and kidney during perinatal development. *Dev. Biol.*, **97**, 95—102, 1983.
- Andrews, G.K., Admson, E.D. and Gedamu, L.: The ontogeny of expression of murine metallothionein: Comparison with the α -fetoprotein gene. *Dev. Biol.*, **103**, 294—303, 1984.
- Clough, S.R., Mitra, R.S. and Kulkarni, A.P.: Qualitative and quantitative aspects of human fetal liver metallothioneins. *Biol. Neonate*, **49**, 241—254, 1986.
- Pauwels, M., van Weyenbergh, J., Sossumsillion, A., Poost, P. and DeLey, M.: Induction by Zinc of specific metallothionein isoforms in human monocytes. *Eur. J. Biochem.*, **220**, 105—110, 1994.
- Compere, S.J. and Palmiter, R.D.: DNA Methylation Controls the Inducibility of the mouse metallothionein I Gene in lymphoid cells. *Cell*, **25**, 233—240, 1981.
- Cox, D.R. and Palmiter, R.P.: The metallothionein-I gene maps to mouse chromosome 8: Implications for human menkes' disease. *Hum. Genet.*, **64**, 61—64, 1983.
- Durnam, D. and Palmiter, R.D.: Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *J. Biol. Chem.*, **256**, 5712—5716, 1981.
- Durnam, D.M., Perrin, F., Gannon, F. and Palmiter, R.D.: Isolation and characterization of the mouse metallothionein-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 6511—6515, 1980.
- Palmiter, R.D., Sandgren, E.P., Koeller, D.M., Findley, S.D. and Brinster, R.L.: Metallothionein genes and their regulation in transgenic mice. Metallothionein III. Suzuki, K.T., Imura, N. and Kimura, M. (eds.), Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, pp. 399—406, 1993.
- Searle, P.F., Davison, B.L., Stuart, G.W., Wilkie, T.M., Norstedt, G. and Palmiter, R.D.: Regulation, linkage and sequence of the mouse metallothionein-I, and II genes. *Mol. Cell Biol.*, **4**, 1221—1230, 1984.

- 21) Yagle, M.K. and Palmiter, R.D.: Coordinate regulation of mouse metallothionein I and II genes by heavy metals and glucocorticoids. *Mol. Cell Biol.*, **5**, 291–294, 1985.
- 22) Apostolova, M., Bontchev, P.R., Nachev, Ch. and Sirakova, I.: Apometallothionein in rat liver. *J. Chromatogr.*, **620**, 191–197, 1993.
- 23) Lee, J., Treloar, B.P. and Grace, N.D.: Metallothionein and trace element metabolism in sheep tissues in response to high and sustained zinc dosage. II. Expression of metallothionein mRNA. *Aust. J. Agric. Res.*, **45**, 321–332, 1994.
- 24) Cosson, R.P.: Heavy metal intracellular balance and relationship with metallothionein induction in the liver of carp after contamination by silver cadmium and mercury following or not pre-treatment by Zinc. *BioMetals*, **7**, 9–10, 1994.
- 25) 白石則之, 青野 要, 井上豊治, 宮原正信, 内海構造: X線照射によるメタロチオネインの増加とその役割. *医学のあゆみ*, **122**, 248–250, 1982.
- 26) Matsubara, J.: Alteration of radiosensitivity in metallothionein induced mice and a possible role of Zn-Cd-thionein in GSH-peroxidase system. In *Metallothionein II, Experiential, Suppl.* 52, (Kgi, J.H.R. and Kojima, Y., eds.), pp. 603–612. Birkhuser Verlag Basel, Boston, 1987.
- 27) Thormally, P. and Vasak, M.: Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. *Biochem. Biophys. Acta*, **827**, 36–44, 1985.
- 28) Shiraga, H., Pfeiffer, R.F. and Ebadi, M.: The effect of 6-hydroxydopamine and oxidative stress on the level of brain metallothionein. *Neurochem. Int.*, **23**, 561–566, 1993.
- 29) Chondhuri, S., McKim, J.M. Jr. and Klassen, C. D.: Induction of metallothionein by superantigenic bacterial exotoxin: Probable involvement of the immune system. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1225**, 171–179, 1994.
- 30) Sato, M., Sasaki, M. and Hojo, H.: Differential induction of metallothionein synthesis by interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in rat tissue. *Int. J. Immunopharmac.*, **16**, 187–195, 1994.
- 31) Szymanska, J.A., Chmielnicka, J., Kulczynski, E. and Papierz, W.: Influence of bismuth on the metabolism. *Biom. Environ. Science*, **6**, 134–144, 1993.
- 32) Philcox, J.C., Tilley, M.H., Coyle, P. and Rofo, A.M.: Metallothionein and zinc homeostasis during tumor progression, effect of methotrexate treatment. *Biol. Trace Elem. Res.*, **40**, 295–308, 1994.
- 33) Kimura, M., Otaki, N., Yoshiki, S., Suzuki, M., Horiuchi, N. and Suda, T.: The isolation of metallothionein and its protective role in cadmium poisoning. *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 340–348, 1974.
- 34) Suzuki, K.T. and Yamanaka, M.: Rat kidney metallothionein induced by injection of Cd-thionein: Changes of chromatographic properties with time and their relation to copper content and kidney dysfunction. *Toxicol. Lett.*, **5**, 131–138, 1980.
- 35) Onosaka, S., Yoshiya, S., Min, K., Hukuhara, T. and Tanaka, K.: The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rat after injection of various metals. *Eisei Kagaku*, **29**, 221–225, 1983-C.
- 36) Squibb, K.S. and Fowler, B.A.: Intracellular metabolism and effects of circulating cadmium-metallothionein in the kidney. *Environ. Health Perspect.*, **54**, 31–35, 1984.
- 37) Squibb, K.S., Pritchard, J.B. and Fowler, B.A.: Cadmium-metallothionein nephropathy: Relationship between ultrastructural/biochemical alterations and intracellular cadmium binding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **229**, 311–321, 1984.
- 38) Zalups, R.K., Gelein, R.M. and Cherian, M.G.: Shifts in the dose-effect relationships for the nephropathy induced by cadmium-metallothionein in rats after a reduction in renal mass. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**, 1256–1266, 1992.
- 39) Min, K.S., Hatta, A., Onosaka, S., Ohta, N., Okada, Y. and Tanaka, K.: Protective role of renal metallothionein against Cd Nephropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **88**, 294–304, 1987.
- 40) Onosaka, S., Min, K., Fukuhara, C. and Tanaka, K.: Role of renal metallothionein in acute cadmium toxicity in mice. *Eisei Kagaku*, **32**, 109–113, 1986.
- 41) Webb, M. and Verseyhoyle, R.D.: An investigation of the role of metallothioneins in protection against the acute toxicity of the cadmium ion. *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 673–679, 1976.
- 42) Dudley, R.E., Gammal, L.M. and Klassen, C.D.: Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: Likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **77**, 414–426, 1985.
- 43) Hopf, G., Böcker, R., Bischoff, J., Werner, M.G.

- and Estler, C.T.: Investigation into the combined effects of ethanol and cadmium on rat liver and kidneys. *Arch. Toxicol.*, **64**, 470—473, 1990.
- 44) Parizek, J.: The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. *J. Endocrinol.*, **15**, 56—63, 1957.
 - 45) Gabbiani, G., Baic, D. and Daziel, C.: Studies on tolerance and ionic antagonism for cadmium or mercury. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **45**, 443—450, 1967.
 - 46) Nordberg, M. and Nordberg, G.F.: Distribution of metallothionein-bound cadmium chloride in mice. Preliminary studies. *Envir. Health Perspect.*, **12**, 103—108, 1975.
 - 47) Shaikh, Z.A., Tohyama, C. and Nolan, C.V.: Occupational exposure to cadmium: Effect on metallothionein and other biological indices of exposure and renal function. *J. Arch. Toxicol.*, **59**, 360—364, 1987.
 - 48) Shaikh, Z.A., Kido, T., Kito, H., Honda, R. and Nogawa, K.: Prevalence of metallothioneinuria among the population living in the Kakehashi River basin in Japan — An epidemiological Study. *Toxicology*, **64**, 59—69, 1990.
 - 49) Waalkes, M.P., Rehm, S., Riggs, C.W., Bare, R. M., Devor, D.E., Poirier, L.A., Wenk, M.L., Henneman, J.R. and Balaschak, M.S.: Cadmium carcinogenesis in the male Wistar [CrI: (WI) BR] rat: Dose-response analysis of tumor induction in the prostate and testes and at the injection site. *Cancer Res.*, **48**, 4656—4663, 1988.
 - 50) Waalkes, M.P., Rehm, S., Riggs, C.W., Bare, R. M., Devor, D.E., Poirier, L.A., Wenk, M.L. and Henneman, J.R.: Cadmium carcinogenesis in the male Wistar [CrI: (WI) BR] rat: Dose-response analysis of effects of Zinc on tumor induction in the prostate and in the testes and in the injection site. *Cancer Res.*, **49**, 4282—4288, 1989.
 - 51) Waalkes, M.P., Rehm, S., Perantoni, A.O. and Coogan, T.P.: Cadmium exposure in rats and tumors of the prostate. Cadmium in the human environment: Toxicity and Carcinogenicity. Ed. Nordberg, G.F., Herber, R.F.M. and Alessio, L., Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 391—400, 1992.
 - 52) Waalkes, M.P., Perantoni, A. and Rehm, S.: Tissue susceptibility factors in cadmium carcinogenesis: Correlation between cadmium-induction of prostatic tumors in rats and apparent deficiency of metallothionein. *Biological Trace Element Research*, **21**, 483—490, 1989.
 - 53) Waalkes, M.P. and Perantoni, A.P.: In vitro assessment of target cell specificity in cadmium carcinogenesis: Interactions of cadmium and zinc with isolated interstitial cells of the rat tests. *In Vitro Cell Develop. Biol.*, **24**, 558—565, 1988.
 - 54) Nishimura, H., Nishimura, N. and Tohyama, C.: Localization of metallothionein in the genital organs of the male rat. *J. Histochem. Cytochem.*, **38**, 927—933, 1990.
 - 55) Suzuki, T., Yamanaka, H., Nakajima, K., Suzuki, K., Kanatani, K., Kimura, M., Ohma, C. and Otaki, N.: Immunohistochemical study of metallothionein in human seminal vesicles. *Tohoku J. Exp. Med.*, **167**, 127—134, 1992.
 - 56) Onosaka, S. and Cherian, M.G.: The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rats in response to metal. II. Influence of Zinc status and specific effect on pancreatic metallothionein. *Toxicology*, **23**, 11—20, 1982.
 - 57) Suzuki, K., Nakajima, K., Otaki, N., Kimura, M., Kawaharada, U., Uehara, K., Hara, F., Nakazato, Y. and Takatama, M.: Localization of metallothionein in aged human brain. *Pathology International*, **44**, 20—26, 1994.
 - 58) Suzuki, K., Nakajima, K., Kawaharada, U., Uehara, K., Otaki, N., Kimura, M., Fukuda, T. and Takayama, M.: Metallothionein in the human breast. *Acta Histochem. Cytochem.*, **25**, 601—607, 1993.
 - 59) Van den Oord, J.J., Sunardhi-Widyaputra, S., Van Damme, B. and DeLey, M.: Monoclonal antibody to liver metallothionein: A novel marker for myoepithelial cells. *Path. Res. Pract.*, **189**, 1187—1190, 1993.
 - 60) Meskel, H.H., Cherian, V.J., Martinez, L.A., Veinot, L.A. and Frei, J.V.: Metallothionein as an epithelial proliferative compartment marker for DNA flow cytometry.
 - 61) Douglas-Jones, A.G., Thomas, N.D., Elmes, M. E. and Jasani, B.: Immunocytochemically detectable metallothionein in granulation tissue Surrounding mucosal ulceration. *Histochem. J.*, **24**, 40—50, 1992.
 - 62) 雑賀隆史, 津島知晴, 那須保友, 明比直樹, 野田雅俊, 小橋賢二, 松村陽右, 大森弘之: 膀胱癌および腎癌におけるMetallothioneinの免疫組織学的検討. *日泌尿会誌*, **83**, 636—642, 1992.
 - 63) 雑賀隆史: 膀胱腫瘍におけるMetallothioneinの発現に関する研究. *日泌尿会誌*, **83**, 643—649,

- 1992.
- 64) Bahnson, R.R., Banner, B.F., Ernstoff, M.S., Lazo, J.S., Cherian, M.G., Banerjee, D. and Chin, J.L.: Immunohistochemical localization of metallothionein in transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, **146**, 1518–1520, 1991.
 - 65) Scher, H.I., Yagoda, A., Herr, H.W., Sternberg, C.N., Bosl, G., Morse, M.J., Sogani, P.C., Watson, R.C., Pershaw, D.D., Reuter, V., Geller, N., Hollander, P.S., Vaughan, E.D. Jr., Whitmore, W.F. Jr. and Fair, W.R.: Neoadjuvant MVAC (methotrexate, Vinblastin, doxorubicin and cisplatin) effect on the primary bladder lesion. *J. Urol.*, **139**, 470–474, 1988.
 - 66) Kontozoglon, T.E., Banerjee, D. and Cherian, M.G.: Immunohistochemical localization of Metallothionein in human testicular embryonal carcinoma cells. *Virchows. Archiv. A. Pathol. Anat.*, **415**, 545–549, 1989.
 - 67) Kuo, S.M., Kondo, Y., Defilippo, J.M., Ernstoff, M.S., Bahnson, R.R. and Lazo, J.S.: Subcellular localization of metallothionein Ii A in human bladder tumor cells using a novel epitope-specific antiserum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **125**, 104–110, 1994.
 - 68) Suzuki, T., Umeyama, T., Ohma, C., Yamanaoka, H., Suzuki, K., Nakajima, K. and Kimura, M.: Immunohistochemical study of metallothionein in normal and benign prostatic hyperplasia of human prostate. *Prostate*, **19**, 35–42, 1991.
 - 69) Suzuki, T., Suzuki, K., Nakajima, K., Ohma, C., Hayashi, M., Kuroyama, K. and Yamanaka, H.: Immunohistochemical study of cadmium-induced metallothionein in the seminal vesicle, coagulating gland, ampullary gland and constrictor's of the rat. *Acta Histochem. Cytochem.*, **26**, 563–568, 1993.
 - 70) 玄番宗一: シスプラチンによる急性腎不全。腎と透析, **31**(Suppl), 421–425, 1991.
 - 71) Fukuishi, N. and Gemba, S.: Use of culture renal epithelial cells for the study of cisplatin toxicity. *Japan J. Pharmacol.*, **50**, 247–259, 1989.
 - 72) 玄番宗一: 毒性試験代替法の最近の進歩。4. 培養腎上皮細胞について。 *J. Toxicol. Sci.*, **14**(Suppl. III), 115–121, 1989.
 - 73) 玄番宗一: 薬物性腎障害とラジカル。腎と透析, **36**, 49–53, 1994.
 - 74) Daley-Yates, P.T.: The metabolites of platinum antitumor drugs and their biological significance. in BcBrien, D.C.H., Slater, T.F., (eds.), *Biochemical Mechanism of Platinum Antitumor Drugs*, pp. 121–132, IRL Press, 1986.
 - 75) Litterst, C.L., Torres, I.L. and Guarino, A.M.: Plasma level and organ distribution of platinum in the rat, dog and dogfish shark following single intravenous administration of cis-dichlorodiammine platinum II. *J. Clin. Haematol. Oncol.*, **7**, 169–181, 1977.
 - 76) Sugihara, K., Nakano, S. and Gemba, M.: Effect of cisplatin on in vitro production of lipid peroxides in rat kidney cortex. *Japan J. Pharmacol.*, **44**, 71–76, 1987.
 - 77) Dobyan, D.C., Bull, J.M., Strebel, F.R., Sounderland, B.A. and Boulger, R.E.: Protective effects of O-beta-hydroxyethyl-rutoside on cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Lab. Invest.*, **55**, 557–563, 1986.
 - 78) Gemba, M.: Enhancement by glutathione depletion of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Effect of anti-oxidant pretreatment in nephrotoxicity. Bach, P.H., (eds.), pp. 315–320, Marcel Dekker, New York, 1991.
 - 79) Naganuma, A., Satoh, M., Koyama, Y. and Imura, N.: Protective effect of metallothionein inducing metals on lethal toxicity of cis-diamminedichloroplatinum in mice. *Toxicol. Letter.*, **24**, 203–207, 1985.
 - 80) Boogaard, P.J., Slikkerveer, A., Nagelkerke, J. F. and Mulder, G.J.: The role of metallothionein in the reduction of cisplatin-induced nephrotoxicity by Bipretreatment in the rat in vivo and in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 369–375, 1991.
 - 81) Naganuma, A., Satoh, M., Yokoyama, M. and Imura, H.: Selenium efficiency depressed toxic side effect of cis-diamminedichloroplatinum. *Res. Commun. Chem., Pathol. Pharmacol.*, **42**, 127–134, 1983.
 - 82) Naganuma, A., Satoh, M. and Imura, N.: Effect of selenite on renal toxicity and antitumor activity of cis-diamminedichloroplatinum in mice inoculated with Ehrlich ascites tumor cell. *J. Pharmacobiol. Dyn.*, **7**, 217–220, 1984.
 - 83) Naganuma, A., Satoh, M. and Imura, N.: Prevention of lethal and renal toxicity of cis-diamminedichloroplatinum (II) by induction of metallothionein synthesis without compromising its antitumor activity in mice. *Cancer Res.*, **47**, 983–987, 1987.
 - 84) Kondo, Y., Satoh, M., Imura, N. and Akimoto, M.: Effect of bismuth nitrate given in combi-

- nation with cis-diamminedichloroplatinum (II) on the antitumor activity and renal toxicity of the latter in nude mice inoculated with human bladder tumor. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **29**, 19–23, 1991.
- 85) Kondo, Y., Satoh, M., Imura, N. and Akimoto, M.: Tissue-specific induction of metallothionein by bismuth as a promising protocol for chemotherapy with repeated administration of cis-diamminedichloroplatinum (II) against bladder tumor. *Anticancer Research*, **12**, 2303–2308, 1992.
 - 86) Naganuma, A., Satoh, M. and Imura, N.: Specific reduction of toxic side effect of adriamycin by induction of metallothionein in mice. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 406–411, 1988.
 - 87) Satoh, M., Naganuma, A. and Imura, N.: Metallothionein induction prevents toxic side effects of cisplatin and adriamycin used in combination. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **21**, 176–178, 1988.
 - 88) Naganuma, A., Satoh, M. and Imura, N.: Utilization of metallothionein inducer in cancer therapy. *Metallothionein III*, Suzuki, K.T., Imura, N. and Kimura, M., (eds.), Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland, pp. 255–268, 1993.
 - 89) 陳 端東, 黒川賀重, 中山一武, 斎藤 潔, 坂本和利, 福田耕一, 平井康夫, 浜田哲郎, 藤本郁野, 山内一弘, 荷見勝彦, 増淵 正: 次硝酸ビスマスによるCisplatinの毒性軽減に関する臨床的検討—特に腎毒性軽減効果について—. *日産婦会誌*, **93**, 815–822, 1987.
 - 90) 谷脇雅史, 横田 平, 西田一弘, 津田昌一郎, 枝川潤一, 三沢信一, 滝野辰郎, 阿部達生: シスプラチンの腎毒性に対する次硝酸ビスマスの予防効果. *癌と化学療法*, **15**, 531–533, 1988.
 - 91) 高橋 朗, 高木 亮, 菱田 広, 坂本康孝, 高木 憲生, 天野博史, 小倉幸夫: Cisplatin 投与方法の違いによる体内動態と腎障害 (第2報). 一次硝酸ビスマス, 十分大補湯による腎障害軽減効果—*癌と化学療法*, **16**, 2405–2410, 1989.
 - 92) 浜田隆博, 西脇 裕, 児玉哲郎, 林辺 晃, 忽滑谷直孝, 佐々木拓子, 森川哲行, 広沢利幸, 松山智治: 次硝酸ビスマスによるシスプラチン腎毒性軽減の試み. *癌と化学療法*, **16**, 3587–3593, 1989.
 - 93) Kondo, Y., Yamagata, K., Satoh, M., Naganuma, A., Imura, N. and Akimoto, M.: Clinical use of bismuth compound as an adjunct in chemotherapy with cis-DDP against human urogenital tumors. *Metallothionein III*, Suzuki, K.T., Imura, N. and Kimura, M., Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland, pp. 269–278, 1993.
 - 94) Saijo, N., Miura, K. and Kasahara, K.: The role of metallothionein for the reduction of adverse effect of cisplatin and the induction of resistance to cisplatin. *Metallothionein III*, Suzuki, K.T., Imura, N. and Kimura, M., (eds.), Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland, pp. 279–291, 1993.
 - 95) Satoh, M., Koth, D.M., Kadhim, S.A., Chin, J.L., Naganuma, A., Imura, N. and Cherian, M.G.: Modulation of both cisplatin nephrotoxicity and drug resistance in murine bladder tumor by controlling metallothionein synthesis. *Cancer Res.*, **53**, 1829–1832, 1993.
 - 96) Yang, C.L., Du, X.H., Zou, W.Z. and Chen, W.: Protective effect of Zinc-induced metallothionein synthesis on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Ren. Fail.*, **13**, 227–232, 1991.
 - 97) Yang, C.L., Du, X.H., Zhao, J.H., Chen, W. and Han, Y.X.: Zinc-induced metallothionein synthesis could protect from gentamicin nephrotoxicity in suspended proximal tubules of rats. *Ren. Fail.*, **16**, 61–69, 1994.
 - 98) Bakka, A., Endresen, L., Johnsen, A.B.S., Edminson, P.P. and Rugstad, H.E.: Resistance against cis-dichlorodiammineplatinum in cultured cells with a high content metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **61**, 215–226, 1981.
 - 99) Zelazowski, A.J., Garvey, J.S., Hoeschele, J.D.: In vivo and in vitro binding of platinum to metallothionein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **229**, 246–252, 1984.
 - 100) Sharma, R.P. and Edwards, I.R.: Cisplatin: Subcellular distribution and binding to cytosolic ligands. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 2665–2669, 1983.
 - 101) Andrews, P.A., Murphy, M.P. and Howell, S'. B.: Metallothionein-mediated Cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **19**, 149–154, 1987.
 - 102) Meijer, C., Mulder, N.H. and de Vries, E.G.E.: The role of detoxifying systems in resistance of tumor cells to cisplatin and adriamycin. *Cancer Treat. Res.*, **17**, 389–407, 1990.
 - 103) 永沼 章, 井村伸正: メタロチオネインの示す薬物毒性軽減作用とその送薬への応用. *蛋白質・核酸・酵素*, **32**, 1031–1040, 1987.
 - 104) Hiratsuka, A., Kawashima, K. and Watanabe, T.: Detoxication of ultimate carcinogens by rat liver zinc-metallothionein. *J. Hyg. Chem.*, **32**, 6–10, 1986.
 - 105) 越知淳三: Cis-diamminodichloroplatinum 耐性

- ヒト膀胱癌培養細胞株の樹立とその特性. 日泌尿会誌, 82, 1045—1052, 1991.
- 106) Hamilton, T.C., Winker, M.A., Louie, K.G., Batist, G., Behrens, B.C., Tsuruo, T., Grotzinger, K.R., Mckoy, W.M., Young, R.C. and Ozols, R.F.: Augmentation of Adriamycin, melphalan and cisplatin cytotoxicity in drug-resistant and sensitive human ovarian carcinoma cell lines by buthionine-sulfoximine-mediated glutathione depletion. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2583—2586, 1985.
 - 107) Hospers, G.A.P., Mulder, N.H., de Jong, B., de Ley, L., Uges, D.R.A., Fischtinger-Schepman, A. S.M.J., Scheper, R.J. and de Vries, E.G.E.: Characterization of a human small cell lung carcinoma cell line with acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum-(II) in vitro. *Cancer Res.*, **48**, 6803—6807, 1988.
 - 108) Timmer-Bosscha, H., Timmer, A., Meijer, C. de Vries, E.G.E., de Jong, B., Oosterhuis, J.W. and Mulder, N.H.: Cis-diammine dichloroplatinum II resistance in vitro and vivo in human embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.*, **53**: 5707—5713, 1993.
 - 109) Doz, F., Roosen, N. and Rosenblum, M.L.: Metallothionein and anticancer agents: The role of metallothionein in cancer chemotherapy. *J. Neuro-oncol.*, **17**, 123—129, 1993.
 - 110) Morton, K.A., Jones, B.J., Sohn, M.H., Datz, F. L. and Lynch, R.E.: Enrichment for metallothionein does not confer resistance to cisplatin in transected NIN/3T3 cells. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **267**, 697—702, 1993.
 - 111) Webber, M.M., Rehman, S.M.M. and James, G. T.: Metallothionein induction and reinduction in human Prostatic carcinoma cells: Relationship with resistance and sensitivity to adriamycin. *Cancer Res.*, **48**, 4503—4508, 1988.
 - 112) Chin, J.L., Banerjee, D., Kadhim, S.A., Kontozoglou, T.E., Chauvin, P.J. and Cherian, M.G.: Metallothionein in testicular germ cell tumors and drug resistance. *Cancer*, **72**, 3029—3035, 1993.
 - 113) 溝 昇, 谷口 堅, 長谷川周二, 阿部竜也, 植野好成, 和田 正, 河野公俊, 桑野信彦: Atypical MDR, 癌と化学療法, **8**, 1123—1129, 1994.
 - 114) Hart, B.A., Voss, G.W. and Vacek, P.M.: Metallothionein in human lung carcinoma. *Cancer Letters*, **75**, 121—128, 1993.
-