ビタミンE欠乏ラットのグルタチオン低下に伴う腎臓障害と グルタチオンエステル投与による防御

萩原 清和*, 小 篠 栄**
岡 純***, 市川 富夫*

* 国立健康・栄養研究所応用食品部

** 東京女子医科大学腎センター

*** 国立健康・栄養研究所老人健康・栄養部

Kidney Injury Induced by GSH Depletion and Vitamin E Deficiency in Rats and Prevention by GSH Ester Administration

Kiyokazu HAGIWARA,* Hisashi OZASA,** Jun OKA***
and Tomio ICHIKAWA*

* Division of Applied Food Research, National Institute of Health
and Nutrition, Shinjuku-ku, Tokyo 162

** Kidney Center, Tokyo Women's Medical College, Shinjuku-ku, Tokyo 162

*** Division of Geriatric Health Science, National Institute of Health
and Nutrition, Shinjuku-ku, Tokyo 162

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 45, 429~434 (1992)

Four-week-old male Wistar rats were fed a vitamin E (VE)-deficient diet for 8 weeks, followed by intraperitoneal injection of DL-buthionine-[S, R]-sulfoximine (BSO), an inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase, at 1 mmol/kg body weight. Rats in a glutathione (GSH) treatment group were intraperitoneally injected three times with GSH monoisopropyl ester at 1.7 mmol/kg body weight in addition to BSO administration. The TBA (2-thiobarbituric acid) value, GSH content, lipofuscin content and enzyme activities in the kidneys of rats, and BUN (blood urea nitrogen) content, creatinine content and LDH (lactate dehydrogenase) activity in their sera were measured. GSH depletion by BSO administration was accompanied by a decrease in the renal TBA value and a marked increase in the renal lipofuscin content. This increase in the renal lipofuscin content was prevented by GSH treatment. The increase in serum creatinine and the decrease in renal enzyme activities of rats administered BSO were inhibited by GSH treatment. GSH treatment did not completely prevent necrosis of the proximal renal tubule epithelia but such degeneration in rats treated with GSH was observed only in a narrow zone of the S₃ segment near the descending thin limb of Henle's loop. It seems that lipid peroxides produced by VE deficiency may cause the accumulation of lipofuscin in the presence of renal GSH depletion, followed by necrosis of the proximal renal tubule epithelia. These results suggest that GSH has an important role in preventing the production of lipofuscin by reaction of lipid peroxides with amino acids.

Key Words kidney injury, lipid peroxidation, vitamin E deficiency, GSH depletion, GSH monoisopropyl ester.

(Received January 14, 1992)

ビタミンE (VE) は主要な生体内抗酸化剤として知られ、グルタチオン (GSH) も生体内に最も多量に存在するチオールとしてその抗酸化作用に興味をもたれている。

*,*** 〒162 東京都新宿区戸山 1-23-1

** 〒162 東京都新宿区河田町 8-1

る。

無細胞画分における酵素的、非酵素的過酸化に対するVE^{1)~3)} や GSH^{4)~6)} の過酸化脂質生成阻止能については種々報告されている。一方、単離VE欠乏細胞を用い、そのGSH量を低下させると細胞崩壊が起こる。こ

れは VE 添加によって防御される⁷⁾。また、VE 欠乏ラットの肝細胞壊死が食餌性含硫アミノ酸の低下により著しく強められることが知られている⁸⁾。

Meister らは、L-buthionine-[S, R]-sulfoximine を幼若マウスに投与し、GSH 低下に伴う障害が骨格筋⁹⁾、肺¹⁰⁾、空腸や結腸¹¹⁾、目の水晶体¹²⁾で観察され、この障害は GSH ester 誘導体の投与によって抑制あるいは防御されることを報告している。

われわれは、GSH と VE の *in vivo* における協同の役割を明らかにするため、VE 欠乏ラットに GSH 合成阻害剤の DL-buthionine-[S, R]-sulfoximine (BSO) を投与し GSH 含量を減少させたところ、腎臓のみが肥大し、他の臓器にはこのような現象は観察されなかった¹³⁾。VE 欠乏ラットの GSH 低下に伴い、腎臓肥大が観察されたことから、腎臓における組織障害を推定し、光学顕微鏡による検索を行ったところ、近位尿細管上皮細胞壊死が惹起し、VE 欠乏と GSH 低下がこの腎臓障害を発症させることを認めた¹⁴⁾。そこで、この腎臓障害の発症機序解明のため、経日的な検討を行ったところ、VE 欠乏時の過酸化脂質生成に伴い TBA 値が上昇し、BSO 投与後 GSH 量の低下により腎障害の診断に用いられる指標が経日的に上昇するとともに、経日的な TBA 値の低下を伴ってリポフスチン量が急激に増加した。これらのことから、過酸化脂質からのリポフスチンの大量生成とこれによる腎機能障害、さらに続いて近位尿細管上皮細胞の壊死が惹起し、腎臓障害が発症することを認め、この腎臓障害発症に GSH が深く関与することが示唆された¹⁵⁾。

Meister ら⁹⁾⁻¹²⁾は、BSO 投与による GSH 低下に伴う組織障害が GSH ester 投与により抑制あるいは防御できるとしていることから、本腎臓障害に対する GSH ester の効果を検討した。VE 欠乏ラットに BSO を 1 日 1 回 3 日間投与することにより GSH を低下させ、惹起する腎臓障害に GSH monoisopropyl ester (GSH ester) を投与し、過酸化脂質からのリポフスチン生成抑制への GSH の関与、腎機能低下や腎障害発症に関する GSH の防御効果などについて検討したが、近位尿細管上皮細胞のうち近位直尿細管 (S₁ 部位) の上皮細胞に広く壊死が認められ、障害を完全には防御することはできなかったことを報告した¹⁶⁾。

前報では BSO 投与条件が厳しすぎて、GSH ester の効果が明瞭に現れなかったと考えられたので、本研究では腎臓障害の程度を軽微にし、より緩和な条件下での腎機能低下や腎障害発症に対する GSH の防御効果を検討するため、BSO 投与を 1 回とし、さらに GSH ester の投与回数を多くして研究を行った。

実験方法

1. 飼料

油脂は市販サフラワー油（油蠟薬品(株)）を活性炭処理して得た低 VE サフラワー油を使用した¹⁷⁾。VE 欠乏飼料 (VE 0.52 IU/kg diet) の組成は次のようである。カゼイン：20%，シュクロース：50%，セルロースパウダー：5%，ミネラル混合¹⁸⁾：3.5%，ビタミン混合：1%，重酒石酸コリン：0.2%，コーンスターチ：10.3%，サフラワー油：10%。ビタミン混合は VE を除き AIN-76 組成¹⁹⁾ に準じて調製した。なお、サフラワー油の脂肪酸組成はミリスチン酸：1.5%，パルミチン酸：7.2%，ステアリン酸：2.6%，オレイン酸：12.2%，リノール酸：76.5% で、パルミトレイン酸およびリノレン酸は検出されなかった。

2. 実験動物および飼育方法

4 週齢 Wistar 系雄性ラット（日本クレア(株)）を上記飼料で 8 週間飼育後 3 群に分けた。1 群には BSO（シグマ(株)）1 mmol/kg 体重を 1 回腹腔内投与した（BSO 投与群）。他の 1 群は BSO 投与とともに、この投与の 1 時間前と 1 時間後、3 時間後の 3 回、それぞれ GSH ester 1.7 mmol/kg 体重を腹腔内投与した（GSH 投与群）。BSO や GSH ester などの処理を行わない群をコントロール群とした。飼料は毎日給餌し、飲料水とともに自由摂取とした。

3. 腎ホモジネートおよび細胞質画分の調製

BSO 投与 5 時間後にエーテル麻酔下、腹部大動脈より採血して殺し、臓器を摘出した。血液 1 ml を 0°C で 1 時間静置したのち、3,000 rpm、15 分間遠心分離し血清を得た。各群の腎臓は、重量の 9 倍量の 1.15% 塩化カルウム溶液でホモジナイズし、ホモジネートの一部は 2-チオバルビツール酸（TBA）値の測定に用いた。残りは 105,000×g、60 分間遠心分離し、得られる上清画分を cytoplasm 画分として酵素活性の測定に用いた。

4. 測定方法

溶血反応はジアル酸法で測定した¹⁹⁾。コントロール群の溶血率は 95% 以上であった。 α -tocopherol は HPLC を用い蛍光法で測定した²⁰⁾。腎臓の TBA 値は Aust の方法²¹⁾、リポフスチン量は Fletcher の方法²²⁾で測定した。総 GSH 量は Tietze 法²³⁾で測定し、グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-px) 活性²⁴⁾およびグルタチオンリダクターゼ (GSSG-R) 活性²⁵⁾は Burk の方法を用い、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 活性は 1-chloro-2,4-dinitrobenzene を基質に用い、Habig の方法²⁶⁾で測定した。タンパク量は Lowry 法により測定した²⁷⁾。血液尿素窒素 (BUN) 量はウレアーゼインドフェノール法、クレアチニン量はヤッセ法、また

乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性はビルビン酸を基質に UV 法で、それぞれ日立自動分析装置 736 型を用い(株)三菱油化ビーシーエルにて測定した。

各データは、Aspin-Welch test で検定を行った。

実験結果

1. 血清 BUN 量, クレアチニン量および LDH 活性

BSO 投与群の BUN 量, クレアチニン量および LDH 活性はコントロール群に比べそれぞれ 3.0, 5.7, 2.6 倍と急激な上昇が認められた。これに対し, GSH 投与群では BUN 量はコントロール群の 4.6 倍で BSO 投与群

Table 1. Effect of GSH monoester on BUN and creatinine contents and LDH activity in the sera of rats administered BSO.

	Control	Treated with BSO	Treated with BSO and GSH ester
LDH (U/l)	2210±220 ^{a)}	5800±1280 ^{a)b)}	3310±670 ^{b)}
BUN (mg/dl)	12.8±1.0 ^{a)}	39.5±2.8 ^{a)b)}	59.8±1.5 ^{b)}
Creatinine (mg/dl)	0.38±0.08 ^{a)}	2.15±0.14 ^{a)b)}	1.66±0.05 ^{b)}

Values are expressed as the means±SD for 5-6 rats.

Aspin-Welch test: Means sharing a common superscript letter are significantly different ($p < 0.05$). ^{a)}: Control group vs Group treated with BSO, ^{b)}: Group treated with BSO vs Group treated with BSO and GSH ester.

Table 2. Effect of GSH monoester on TBA value, lipofuscin content and enzyme activities in the kidneys of rats administered BSO.

	Control	Treated with BSO	Treated with BSO and GSH ester
Weight ^{*1}	2.06±0.12 ^{a)}	2.49±0.18 ^{a)b)}	3.11±0.21 ^{b)}
α-tocopherol ^{*2}	4.67±1.39 ^{a)}	6.78±2.23 ^{a)}	5.96±1.76
Total GSH ^{*3}	820.9±90.9 ^{a)}	78.7±8.8 ^{a)b)}	228.1±55.4 ^{b)}
TBA ^{*4}	0.67±0.04 ^{a)}	0.48±0.05 ^{a)b)}	0.68±0.06 ^{b)}
Lipofuscin ^{*5}	0.18±0.04 ^{a)}	0.83±0.13 ^{a)b)}	0.20±0.05 ^{b)}
GSH-px	131.8±8.8 ^{*6a)}	98.3±8.8 ^{a)b)}	123.0±12.4 ^{b)}
	152.2±9.9 ^{*7a)}	104.3±6.8 ^{a)b)}	130.0±13.0 ^{b)}
GSSG-R ^{*8}	43.7±3.6	42.7±5.2	44.1±5.1
GST ^{*9}	65.4±5.1	60.5±9.1 ^{b)}	73.4±8.8 ^{b)}

^{*1} g, ^{*2} ng/mg protein, ^{*3} μg/g wet tissue, ^{*4} nmol MDA/mg protein, ^{*5} μg Quinine sulfate/g wet tissue (Ex 345 nm, Em 435 nm), ^{*6} Se-dependent GSH-px activity, nmol NADPH/min/mg protein, ^{*7} Total GSH-px activity, nmol NADPH/min/mg protein, ^{*8} nmol NADPH/min/mg protein, ^{*9} nmol S-conjugate transformed/min/mg protein.

Values are expressed as the means±SD for 6 rats. ^{a),b)}: See the footnote of Table 1.

と同様な値を示したが, クレアチニン量および LDH 活性はそれぞれコントロール群の 4.4, 1.5 倍で BSO 投与群よりは低値を示した (Table 1)。

2. 腎臓の VE 量, GSH 量, リポフスチン量, TBA 値および酵素活性

腎臓重量は BSO 投与群, GSH 投与群ともにコントロール群に比べ増加していた (Table 2)。GSH 量は BSO 投与群ではコントロール群の約 10% に減少した。GSH 投与群はコントロール群の約 28% で, BSO 投与群の 2.9 倍の値を示し, GSH ester 投与による GSH 量の上昇が認められた。VE 量は VE 添加飼料 (VE 100 IU/kg diet) で飼育したラットの値の 4~6% に減少していたが, BSO 投与あるいは GSH ester 投与に伴う変化は観察されなかった。

VE 欠乏時に増加した過酸化脂質の指標となる TBA 値は, BSO 投与群においてコントロール群の約 70% に低下したが, GSH 投与群ではコントロール群と同様な値を示した。一方, 過酸化脂質とアミノ酸等との反応で生成するとされる リポフスチン量は, BSO 投与群では TBA 値の低下とは逆にコントロール群の 4.6 倍と急激な上昇が認められた。これに対し, GSH 投与群はコントロール群と同程度の値を示し, GSH ester 投与による リポフスチン生成抑制が認められた。

酵素活性では, GSH-px 活性は BSO 投与群ではコントロール群の約 70~75% に低下したが, GSH 投与群では活性がコントロール群の値にほぼ近い値にまで回復していた。GSSG-R 活性は 3 群間に差は認められなかった。GST 活性は GSH 投与群において BSO 投与群より上昇していた。

Fig. 1. Kidney of BSO-untreated rat. (H-E, $\times 16$)

Fig. 2. Kidney of BSO-treated rat.

Necrosis of the tubular epithelium is extensively observed in the S₃ segment of the proximal tubules. (H-E, $\times 16$)

Fig. 3. Kidney of BSO- and GSH-treated rat. Necrosis of the tubular epithelium is observed only in the S₃ segment of the proximal tubules near the descending thin limb of Henle's loop. (H-E, $\times 16$)

3. 腎臓の光学顕微鏡による検索

BSO 投与群の近位尿管上皮細胞は近位直尿管に壊死、剝離が、また髓放線 (medullary ray) に沿って同

様な現象が観察されるのに対し、GSH 投与群ではヘンレループの下行脚に近い部位に限定して非常に狭い範囲に壊死が認められるのみであり、GSH ester 投与による組織障害抑制が観察された (Fig. 1~3)。

考 察

腎臓は虚血再かん流時、酸化的ストレスに伴い GSH 量の減少による腎機能障害が認められる。それゆえこの障害の発症と GSH とが関連していることが知られている²⁸⁾²⁹⁾。しかし、その発症機序や GSH の防御機構については未だ明らかではない。

先に筆者らは、VE 欠乏 GSH 低下による腎臓障害の経日的検討を行い、VE 欠乏時に生成した過酸化脂質は BSO 投与による GSH の低下に伴い経日的に減少し、BSO 投与 3 日目ではコントロール群の半分に減少していたのに対し、過酸化脂質とアミノ酸等との反応で生成するとされるリポフスチンは、BSO 投与 1 日目から増加し、2 日目では 6 倍に達することを見いだし¹⁵⁾、VE 欠乏時に増加していた過酸化脂質のうち TBA 値の減少した部分はリポフスチン生成に関与することを示唆した。一方、GSH の低下がないときにはリポフスチンの大幅な生成が認められないことから、GSH はリポフスチンの生成抑制に寄与していると考えられることを報告した¹⁴⁾¹⁵⁾。

Meister らの研究^{9)~12)}によると BSO 投与による GSH 低下を伴う組織障害は GSH ester 誘導体を投与することで防御できるとしている。

筆者らは先に、VE 欠乏ラットに BSO を投与し GSH 低下に伴う腎臓障害に対し、GSH monoisopropyl ester (GSH ester) を投与し、過酸化脂質からのリポフスチン生成抑制への GSH の関与、さらに腎機能低下や腎障害発症に関する GSH の防御効果について検討したが、GSH ester 投与においても近位直尿管上皮細胞に広く壊死が認められ、障害を完全には防御することはできないことを報告した¹⁶⁾。

そこで今回、この近位尿管上皮細胞壊死を伴う腎臓障害において、この障害の程度を軽微にした上で GSH の防御効果を観察する目的で、BSO の投与回数を減らし、さらに GSH ester の投与回数および投与時期を変更して、腎臓機能低下および組織障害に対する GSH ester の投与効果を検討した。腎臓中の GSH 量は BSO 投与群と比較し、GSH 投与群においてその量に増加が認められた。BSO 投与群の TBA 値はコントロール群に比し低下を示したのに対し、GSH 投与群のそれは BSO 投与群より高値でコントロール群とほぼ同値を示した。一方、リポフスチン量は BSO 投与群で急激な上昇が観察されたのに対し、GSH 投与群のそれはコント

ロール群とほぼ同値を示した。腎臓中の GSH 量が GSH 投与群においてその量に増加が認められたことと考え合わせ、過酸化脂質からのリポフスチンの生成抑制に GSH が強く関与していることが示唆された。

腎機能を示すクレアチニン量は BSO 投与群でコントロール群の 5.7 倍の値を示したのに対し、GSH 投与群では 4.4 倍を示し、GSH ester 投与による機能の回復が認められた。GSH 投与群の BUN 量は BSO 投与群と同様高値を示し、クレアチニン量の変化と類似した変化は観察されなかったが、BUN 量は食餌による影響を受けやすいことから、GSH 投与群が高値を示したのは投与した GSH ester による GSH 量の増加によるものと思われる。BSO 投与によるクレアチニン量と BUN 量の増加は近位尿管上皮細胞の膨化や壊死に伴う尿管内圧力の増加による糸球体濾過率の低下に起因すると考えられる。リポフスチン生成が抑制された GSH 投与群の LDH 活性は BSO 投与群の約半分の値を示した。LDH 活性の上昇が完全には抑制されず、半分の値までしか低下できなかったことは、光学顕微鏡による検索でも明らかなように GSH ester 投与によっても近位尿管上皮細胞壊死は完全には抑制されておらず、近位尿管の非常に限定された部位ではあるが、上皮細胞に変性が認められたことによるものと思われる。

LDH 活性以外の酵素活性に関しては、BSO 投与で低下した GSH-px 活性は GSH ester 投与によってほぼ完全に回復し、GSH の効果が認められた。GSSG-R 活性および GST 活性は 3 群間でほとんど差は認められなかった。

Meister ら⁹⁾⁻¹²⁾ は BSO 投与による GSH 低下を伴う組織障害は GSH ester 誘導体を投与することで防御できるとしているが、脂質過酸化あるいは GSH の抗酸化作用等には言及していない。腎臓の尿管上皮細胞中には高濃度の GSH が存在³⁰⁾することから、たんに GSH 低下による組織障害とすれば GSH ester 投与により防御できると考えられる。しかし、本研究で惹起した VE 欠乏 GSH 低下による腎臓障害において、GSH ester 投与により腎臓内リポフスチン生成抑制、血清クレアチニン量の上昇抑制、また腎臓内酵素活性の回復が認められたものの、腎臓機能や組織障害を完全には抑制あるいは防御することはできなかった。その理由として、BSO 投与による腎臓内 GSH 量の低下が著しいことや GSH ester 投与による腎 GSH 量の増加、さらに形態学的にみた回復の程度などから考えると、腎臓の部位により GSH の必要量が異なるためであることが推測される。

Okada らは、鉄ニトロロ三酢酸 (Fe-NTA) をラットに腹腔内投与すると投与初期には強い近位尿管壊死が起こり、長期投与で腎臓に高率に腺がんを発生し³¹⁾、

VE はこの腎臓における脂質過酸化を阻止し、組織学的変性を抑制した³²⁾³³⁾とし、脂質過酸化による腎臓障害を報告している。筆者らがこれまでにを行った本腎臓障害においても、GSH の低下に伴い、VE 欠乏時に生成していた過酸化脂質と細胞内成分、あるいは細胞膜を構成するタンパク質などとの反応によるリポフスチンの大量生成とそれによる腎臓機能障害、さらに続いて細胞崩壊が起こり、腎障害の増大が進行すると推測され¹⁵⁾、脂質過酸化がこの障害を惹起すると考えられた。また、BSO 投与と同時に GSH ester を投与することにより近位尿管上皮細胞壊死が若干抑制できたことから、GSH はこの過酸化脂質からのリポフスチン生成の抑制、さらには腎機能低下や組織障害の防御に強く関与している可能性を示唆し¹⁶⁾、今回、これまでよりも障害の程度を軽減にし、より緩和な条件下で GSH の防御効果を観察した。その結果、GSH ester の投与により完全な防御は認められなかったものの、近位尿管上皮細胞の中でも非常に狭い範囲にのみ限定して壊死が観察される程度に障害をとどめることができた。Meister ら⁹⁾⁻¹²⁾による組織障害の GSH ester 誘導体投与による防御と結果を異にすることに関しては、GSH の投与量、投与方法、投与時期あるいは生体外からの GSH 投与の有効性など種々考えられるが、彼らの組織とは違い腎臓であること、また VE 欠乏により過酸化脂質の生成が高まった条件下での腎臓障害である点に大きな違いがあるように思われる。今後、さらに γ -glutamylcysteine 投与による内因性 GSH の効果や他の抗酸化剤の影響などを検討し、この腎臓障害の防御について研究する必要がある。

要 約

VE 欠乏ラットの GSH 低下による腎臓障害に対する GSH monoisopropyl ester の投与効果を明らかにするため、この障害の程度を前報¹⁶⁾よりも軽減にしたより緩和な条件下でリポフスチン生成および腎臓機能や組織障害を指標に検討を行った。

- 1) GSH ester 投与は腎臓内 GSH 量を増加させ、リポフスチン量の急激な上昇を抑制した。
- 2) GSH ester 投与は血清クレアチニン量の増加、腎臓内酵素活性の低下を抑制した。
- 3) GSH ester 投与は近位尿管上皮細胞壊死を完全には防御することはできなかったが、近位尿管上皮細胞のうちヘンレループの下行脚に近い部位に限定して非常に狭い範囲にのみ壊死が観察できる程度にとどめることができた。
- 4) GSH は過酸化脂質からのリポフスチン生成を抑制し、腎機能低下や腎障害の防御に関与する可能性が強く示唆された。

実験に際し GSH monoisopropyl ester をご供与くださいました山之内製薬(株)に感謝いたします。

文 献

- 1) Tinberg, H.M. and Baker, A.A.: *J. Nutr.*, **100**, 413 (1970)
- 2) Fukuzawa, K., Chida, H., Tokumura, A. and Tsukatani, H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **206**, 173 (1981)
- 3) Ohki, K., Takamura, T. and Nozawa, Y.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **30**, 221 (1984)
- 4) Tappel, A.L.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **203**, 12 (1972)
- 5) Burk, R.F.: *Biochim. Biophys. Acta*, **757**, 21 (1983)
- 6) Haenen, G.R.M.M. and Bast, A.: *FEBS Lett.*, **159**, 24 (1983)
- 7) Hishinuma, I. and Nakamura, T.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **34**, 11 (1988)
- 8) György, P. and Goldbaltt, H.: *J. Exp. Med.*, **89**, 245 (1949)
- 9) Mårtensson, J. and Meister, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 471 (1989)
- 10) Mårtensson, J., Jain, A., Frayer, W. and Meister, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5296 (1989)
- 11) Mårtensson, J., Jain, A. and Meister, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1715 (1990)
- 12) Mårtensson, J., Steinhertz, R., Jain, A. and Meister, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8727 (1989)
- 13) 萩原清和, 津田明子, 市川富夫: 栄食誌, **42**, 377 (1989)
- 14) Hagiwara, K., Naitou, K., Kurokawa, Y. and Ichikawa, T.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **37**, 99 (1991)
- 15) 萩原清和, 岡 純, 小篠 栄, 市川富夫: 栄食誌, **44**, 391 (1991)
- 16) 萩原清和, 岡 純, 小篠 栄, 市川富夫: 栄食誌, **45**, 55 (1992)
- 17) 毛利佳世, 道本千衣子, 活州はるみ, 五十嵐脩: 栄食誌, **36**, 122 (1983)
- 18) Bieri, J.G., Stoewsand, G.S., Briggs, G.M., Phillips, R.W., Woodard, J.C. and Knapka, J.J.: *J. Nutr.*, **107**, 1340 (1977)
- 19) 池畑秀夫, 杉山嘉子: ビタミン, **37**, 31 (1968)
- 20) 石橋恭子, 阿部皓一, 大前雅彦, 阿部 靖, 勝井 五一郎: ビタミン, **51**, 415 (1977)
- 21) Buege, J.A. and Aust, S.D.: *Methods in Enzymology* (Fleischer, S. and Packer, L., eds.), **302** (1978), Academic Press (New York)
- 22) Fletcher, B.L., Dillard, C.J. and Tappel, A.L.: *Anal. Biochem.*, **52**, 1 (1973)
- 23) Tietze, F.: *Anal. Biochem.*, **27**, 502 (1969)
- 24) Lawrence, R.A. and Burk, R.F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952 (1976)
- 25) Xia, Y., Hill, K.E. and Burk, R.F.: *J. Nutr.*, **115**, 733 (1985)
- 26) Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: *J. Biol. Chem.*, **22**, 7130 (1974)
- 27) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 28) Paller, M.S.: *Kidney Int.*, **33**, 843 (1988)
- 29) McCoy, R.N., Hill, K.E., Ayon, M.A., Stein, J.H. and Burk, R.F.: *Kidney Int.*, **33**, 812 (1988)
- 30) Brehe, J.E., Chan, A.W.K., Alvey, T.R. and Burke, H.B.: *Am. J. Physiol.*, **231**, 1536 (1976)
- 31) Hamazaki, S., Okada, S., Ebina, Y., Fujioka, M. and Midorikawa, O.: *Am. J. Pathol.*, **123**, 343 (1986)
- 32) Okada, S., Hamazaki, S., Ebina, Y., Li, J.L. and Midorikawa, O.: *Biochim. Biophys. Acta*, **922**, 28 (1987)
- 33) Hamazaki, S., Okada, S., Ebina, Y., Li, J.L. and Midorikawa, O.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **92**, 500 (1988)

(1992年1月14日受理)