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 γ -グルタミルシステイン投与による防御

萩原 清和*, 小 篠 栄**
矢野 友啓*, 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

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

Kiyokazu HAGIWARA,* Hisashi OZASA,** Tomohiro YANO*
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

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 47, 111~116 (1994)

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 glycine (Gly) and/or γ -glutamylcysteine ethyl ester (γ -GC)-treated groups were injected intraperitoneally with Gly and/or γ -GC three times at 0.7 mmol/kg body weight in addition to BSO administration. GSH depletion by BSO administration was accompanied by a decrease in the level of renal TBA (2-thiobarbituric acid) and a marked increase in the renal lipofuscin content. γ -GC treatment increased the renal GSH content and inhibited the increase in the renal lipofuscin content. The increase in serum creatinine and the decrease in renal enzyme activities in rats administered BSO were inhibited by γ -GC treatment. γ -GC treatment did not provide complete protection from epithelial necrosis in the proximal renal tubules, but such degeneration in rats treated with γ -GC was observed only in a narrow area of the S₃ segment near the descending thin limb of Henle's loop. These results suggest that GSH plays an important role in preventing lipofuscin production through reaction of lipid peroxides with amino acids.

Key Words kidney injury, vitamin E deficiency, glutathione depletion, DL-buthionine sulfoximine, γ -glutamylcysteine ethyl ester.

(Received July 15, 1993)

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がもたれている。

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

* 〒162 東京都新宿区戸山 1-23-1

** 〒162 東京都新宿区河田町 8-1

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⁾。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 量の低下により血清 LDH 活性やクレアチニン量等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、この腎臓障害発症への GSH の関与が強く示唆された¹⁵⁾。

Meister ら^{9)~12)} は、BSO 投与による GSH 低下に伴う組織障害は GSH ester 投与により抑制あるいは防御できていることから、本腎臓障害に対する GSH monoisopropyl ester (GSH ester) 投与効果を実験条件を変えて検討した¹⁶⁾¹⁷⁾ が、近位尿細管上皮細胞のうち近位直尿細管 (S₃ 部位) の上皮細胞に壊死が認められ、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¹⁷⁾。Meister ら^{9)~12)} の GSH ester 投与による組織障害の防御とわれわれの結果とに違いを生じる原因としては GSH ester 投与による外因性 GSH の有効性や、組織の違い、脂質過酸化に起因する障害であることなどが考えられ、本障害の防御にはそれらのうち、外因性 GSH の有効性よりも内因性 GSH のほうが有効と考えられた。

BSO は γ -glutamylcysteine 合成酵素の特異的阻害剤であることから、 γ -glutamylcysteine と glycine とから GSH 合成酵素により GSH を合成させ、内因性 GSH の上昇とそれによる腎障害の防御を目的に、 γ -glutamylcysteine ethyl ester (γ -GC) を投与し、その投与効果の検討を行った。また、glycine による防御についても併せて検討を行った。

実験方法

1. 飼料

油脂は市販サフラワー油 (油蠟薬品㈱) を活性炭処理して得た低 VE サフラワー油を使用した¹⁸⁾。VE 欠乏飼料 (VE 0.52 IU/kg diet) の組成はカゼイン 20%、シュクロース 50%、セルロースパウダー 5%、ミネラル混合¹⁹⁾ 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% である。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、パルミトリ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 5 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)。BSO や γ -GC などの処理を行わない群をコントロール群とした。他の 3 群のうち 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 γ -GC 0.7 mmol/kg 体重を腹腔内投与した (γ -GC 投与群)。 γ -GC と Gly、それぞれ 0.7 mmol/kg 体重を同様に処理した群 (Gly + γ -GC 投与群)、および Gly の同量を同様に処置した群 (Gly 投与群) に分けた。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% 塩化カリ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

溶血反応はジアルル酸法で測定した²⁰⁾。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²¹⁾。腎臓の TBA 値は Aust の方法²²⁾、リポフスチン量は Fletcher の方法²³⁾ で測定した。総 GSH 量は Tietze 法²⁴⁾ で測定し、グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-px) 活性²⁵⁾ およびグルタチオンリグクターゼ (GSSG-R) 活性²⁶⁾ 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²⁷⁾ で測定した。タンパク量は Lowry 法により測定した²⁸⁾。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 Jaffé 法、また乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性はピルビン酸を基質に 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 B.C.L. にて測定した。

各データは、平均値 ± 標準偏差で示した。コントロール群と BSO 投与群間の有意差検定は等分散性の認められるものは Student's *t*-test、それ以外のは Aspin-Welch test を用いた。コントロール群を除く 4 群間の有意差検定は Duncan's multiple range test によって行った。

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 3.4 倍, 2.1 倍, 14 倍と急激な上昇が認められた。これに対し, γ -GC 投与群では BUN, クレアチニン量は BSO 投与群と同様な値を示したが, LDH 活性は BSO 投与群の 18% に低下し, コントロール群の 2.5 倍に相当する低値を示した。Gly + γ -GC 投与群ではクレアチニン量は BSO 投与群の 68% であり, コントロール群の 1.5 倍にあたり, γ -GC 投与群よりさらに低値を示した。また, LDH 活性は BSO 投与群の 13% であり, γ -GC 投与群よりさらに回復傾向を示した。Gly + γ -GC 投与群で BUN 量が BSO 投与群と同様な値を示したのは, BUN 量が食餌による影響を受けやすいことから, 投与した Gly や γ -GC の増加によるものと思われる。Gly 投与群は BSO 投与群とすべて同様な

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 投与群でコントロール群に比べ増加し, γ -GC 投与群, Gly + γ -GC 投与群では BSO 投与群よりさらに増加していた (Table 2)。GSH 量は BSO 投与群ではコントロール群の約 13% に減少した。 γ -GC 投与群は BSO 投与群の 1.5 倍, Gly + γ -GC 投与群では 1.7 倍の値を示し, これらはそれぞれコントロール群の約 21% および約 23% に相当し, 両群とも 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 2% に減少していたが, BSO 投与あるいは γ -GC などの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 48% に低下したのに対し, γ -GC 投与群, Gly + γ -GC 投与群で

Table 1. Effect of glycine and γ -GC on BUN and creatinine contents and LDH activities in serum of rats administered BSO.

	Control group	BSO group	Glycine group	γ -GC group	Gly + γ -GC group
BSO	—	+	+	+	+
LDH (U/l)	405.6 ± 266.5	5694.0 ± 1021.4 ^{*a}	6388.0 ± 2419.2 ^a	1026.3 ± 221.7 ^b	724.8 ± 115.2 ^b
BUN (mg/dl)	13.2 ± 0.4	45.0 ± 1.6 ^{*a}	49.3 ± 3.8 ^b	42.0 ± 2.2 ^a	42.5 ± 3.5 ^a
Creatinine (mg/dl)	0.85 ± 0.05	1.84 ± 0.09 ^{*a}	1.90 ± 0.20 ^{ab}	1.63 ± 0.26 ^{ac}	1.25 ± 0.15 ^d

Values are expressed as means ± SD for 5-6 rats. Means with a mark * are significantly different at $p < 0.05$ from those of control group as determined by Student's *t*-test. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ among BSO treated groups as determined by Duncan's multiple range test.

Table 2. Effect of glycine and γ -GC on TBA value, lipofuscin content and enzyme activities in kidney of rats administered BSO.

	Control group	BSO group	Glycine group	γ -GC group	Gly + γ -GC group
BSO	—	+	+	+	+
Weight ^{*1}	1.98 ± 0.22	2.43 ± 0.17 ^{*a}	2.44 ± 0.19 ^a	2.69 ± 0.22 ^{bc}	2.65 ± 0.11 ^{ac}
α -Tocopherol ^{*2}	1.58 ± 0.55	1.75 ± 0.66	1.98 ± 0.55	1.54 ± 0.55	1.90 ± 0.72
Total GSH ^{*3}	707.6 ± 67.8	95.0 ± 9.1 ^{*a}	94.0 ± 5.0 ^a	145.8 ± 14.6 ^b	164.7 ± 16.1 ^c
TBA ^{*4}	0.90 ± 0.07	0.43 ± 0.04 [*]	0.46 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.47 ± 0.03
Lipofuscin ^{*5}	0.24 ± 0.02	1.23 ± 0.19 ^{*a}	1.29 ± 0.22 ^a	0.43 ± 0.06 ^b	0.35 ± 0.06 ^b
GSH-px	139.4 ± 11.5 ^{*6}	104.8 ± 9.7 ^{*a}	142.1 ± 16.2 ^b	134.8 ± 15.5 ^b	148.4 ± 19.4 ^b
	149.7 ± 11.3 ^{*7}	122.6 ± 13.8 ^{*a}	147.4 ± 20.8 ^{ab}	151.1 ± 18.5 ^{ac}	165.2 ± 26.5 ^{bc}
GSSG-R ^{*8}	65.7 ± 4.5	57.2 ± 4.1 [*]	58.5 ± 6.4	55.0 ± 5.4	60.9 ± 4.9
GST ^{*9}	104.3 ± 9.8	66.6 ± 5.9 ^{*a}	68.1 ± 7.0 ^a	99.8 ± 14.2 ^b	113.2 ± 18.6 ^b

^{*1} g, ^{*2} ng/mg protein, ^{*3} μ g/g wet tissue, ^{*4} nmol MDA/mg protein, ^{*5} μ g 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 means ± SD for 6 rats. Means with a mark * are significantly different at $p < 0.05$ from those of control groups as determined by Student's *t*-test. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ among BSO treated groups as determined by Duncan's multiple range test.

Fig. 1. Kidney of BSO-untreated rat. (H-E, $\times 10$)

Fig. 2. Kidney of BSO-treated rat.

Necrosis of the tubular epithelium is extensively observed in the S_3 segment of the proximal tubules. (H-E, $\times 10$)

は BSO 投与群とほぼ同様な値を示した。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 5.1 倍と急激な上昇が認められた。これに対し、 γ -GC 投与群は BSO 投与群の 35% に低下し、コントロール群の 1.8 倍、Gly + γ -GC 投与群では BSO 投与群の 28% で、コントロール群の 1.5 倍に相当する値を示した。

酵素活性では、GSH-px 活性、GST 活性は BSO 投与群でコントロール群より低下したが、 γ -GC 投与群、Gly + γ -GC 投与群ともコントロール群に近い値にまで回復していた。GSSG-R 活性は Gly + γ -GC 投与群において回復傾向が観察されたが、4 群間に差は認められなかった。

一方、Gly 投与群は、GSH-px 活性に回復傾向が認められるものの、GSH の低下抑制、リポフスチンの上昇抑制は観察されなかった。

Fig. 3. Kidney of BSO- and Gly + γ -GC-treated rat.

Necrosis of the tubular epithelium is observed only in the S_3 segment of the proximal tubules near the descending thin limb of Henle's loop. (H-E, $\times 10$)

3. 腎臓の光学顕微鏡による検索

BSO 投与群の近位尿細管上皮細胞に広く壊死、剥離が観察された。また、Gly 投与群も同様であった。これに対し、 γ -GC 投与群、Gly + γ -GC 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狭い範囲に壊死が認められるのみであった (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²⁹⁾³⁰⁾。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。

筆者らは、VE 欠乏 GSH 低下による腎臓障害モデルを初めて作成し、この腎臓障害の発症¹³⁾¹⁴⁾とその発症機構¹⁵⁾について報告した。また、腎臓の尿細管上皮細胞中には高濃度の GSH が存在する³¹⁾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、この障害に対し、外因性 GSH として GSH monoisopropyl ester を投与し、その防御効果¹⁶⁾¹⁷⁾についても報告した。

今回は、この近位尿細管上皮細胞壊死を伴う腎臓障害において、外因性 GSH よりも内因性 GSH のほうが有効と考え、 γ -glutamylcysteine ethyl ester を投与し、内因性の GSH の増加とそれによる防御について検討した。また、glycine による防御についても併せて検討を行った。

無酸素状態における近位尿細管障害³²⁾、腎かん流時の細い上行脚の障害³³⁾、シスプラチンの腎臓細胞毒性³⁴⁾などの研究で、glycine はこれらの障害に対し防御効果を

認めている。しかし、本腎臓障害においては、glycine にそのような効果を観察することはできなかった。障害の発症機序等の相違が考えられ、今後さらに検討する必要がある。

γ -GC 投与による内因性 GSH の増加に関しては、BSO 投与群でコントロール群の 13% に低下していたのに対し、 γ -GC 投与群、Gly+ γ -GC 投与群とも BSO 投与群より高値を示した。 γ -GC 投与群ではコントロール群の 21% に、Gly+ γ -GC 投与群では γ -GC 単独投与よりわずかに多い 23% に上昇していた。したがって、肝臓内 GSH 合成酵素による GSH の増加、そして腎臓への輸送による腎臓内 GSH の上昇が観察されたものと思われる。過酸化脂質からのリポフスチンの生成は、BSO 投与群ではコントロール群の 5 倍と急激な上昇が認められたのに対し、 γ -GC 投与群、Gly+ γ -GC 投与群ともそれぞれ BSO 投与群より低値を示し、リポフスチンの生成抑制が認められた。腎機能を示す指標においても、 γ -GC 投与群、Gly+ γ -GC 投与群で BSO 投与群よりも低値を示し、腎機能の回復が観察された。また、 γ -GC 投与群と Gly+ γ -GC 投与群との間では、Gly+ γ -GC 投与群のほうが γ -GC 単独投与よりその回復の程度が高かった。これは、腎臓内 GSH の増加が γ -GC 単独投与より Gly+ γ -GC 投与群で多かったことに起因するものと思われる。

内因性 GSH に関しては、ウシ心臓の再かん流時の障害抑制³⁵⁾、マウスにおける抗白内障効果³⁶⁾、ラット肝臓の虚血-再かん流時の障害防御³⁷⁾に GSH の前駆物質の γ -glutamylcysteine の ethyl ester 体が効果を示し、その効果は内因性 GSH の低下抑制、あるいは上昇による障害の抑制・防御であることが報告されている。しかし、光学顕微鏡による形態学的検索でも明らかのように、 γ -GC 投与群、Gly+ γ -GC 投与群の両群とも γ -GC 投与によっても近位直尿管上皮細胞壊死は完全には防御されていなかった。GSH monoisopropyl ester 投与実験では、腎臓内 GSH はコントロールの 28% であった¹⁷⁾ のに対し、本実験ではそれ以下の 21~23% であり、障害の完全な防御には、防御可能な量まで内因性 GSH を上昇させる工夫が必要と考えられた。しかし、 γ -GC 投与による内因性 GSH の増加によりこの障害を完全に防御できる可能性が示唆された。

上記 γ -GC 投与による組織障害抑制^{35)~37)}と結果を異にすることに関しては、動物、組織、投与方法の違いなど種々考えられるが、それらの組織と違い腎臓であること、VE 欠乏状態であること、過酸化脂質生成が高まった条件下での腎障害であること、BSO 投与による腎臓内 GSH 量の急激な低下、腎臓内の部位により GSH の必要量が異なると考えられることなどいくつかの点に大きな

相違があるように思われた。今後、これらの点に留意し、本障害の発症とその防御における GSH の関与についてさらに検討する必要がある。

要 約

VE 欠乏ラットの GSH 低下による腎臓障害に対する γ -glutamylcysteine ethyl ester の投与効果を明らかにするため、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) γ -GC 投与および Gly+ γ -GC 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) Gly+ γ -GC 投与は血清クレアチニン量の増加、LDH 活性の上昇、および腎臓内酵素活性の低下を抑制した。
- 3) γ -GC 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、Gly+ γ -GC 投与は近位直尿管上皮細胞の壊死が観察される程度に障害を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、 γ -glutamylcysteine ethyl ester をご供与いただきました帝人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 Goldblatt, 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., Steinhilber, 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) 萩原清和, 小篠 栄, 岡 純, 市川富夫: 栄食誌, **45**, 429 (1992)
- 18) 毛利佳世, 道本千衣子, 活州はるみ, 五十嵐脩: 栄食誌, **36**, 122 (1983)
- 19) Bieri, J.G., Stoewsand, G.S., Briggs, G. M., Phillips, R. W., Woodard, J.C. and Knapka, J.J.: *J. Nutr.*, **107**, 1340 (1977)
- 20) 池畑秀夫, 杉山嘉子: ビタミン, **37**, 31 (1968)
- 21) 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)
- 22) Buege, J.A. and Aust, S.D.: Methods in Enzymology (Fleischer, S. and Packer, L., ed.), 302 (1978), Academic Press (New York)
- 23) Fletcher, B.L., Dillard, C.J. and Tappel, A.L.: *Anal. Biochem.*, **52**, 1 (1973)
- 24) Tietze, F.: *Anal. Biochem.*, **27**, 502 (1969)
- 25) Lawrence, R.A. and Burk, R.F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952 (1976)
- 26) Xia, Y., Hill, K.E. and Burk, R.F.: *J. Nutr.*, **115**, 733 (1985)
- 27) Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: *J. Biol. Chem.*, **22**, 7130 (1974)
- 28) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 29) Paller, M.S.: *Kidney Int.*, **33**, 843 (1988)
- 30) McCoy, R.N., Hill, K.E., Ayon, M.A., Stein, J.H. and Burk, R.F.: *Kidney Int.*, **33**, 812 (1988)
- 31) Brehe, J.E., Chan, A.W.K., Alvey, T.R. and Burke, H.B.: *Am. J. Physiol.*, **231**, 1536 (1976)
- 32) Mandel, L.J., Schnellmann, R.G. and Jacobs, W.R.: *J. Clin. Invest.*, **85**, 316 (1990)
- 33) Silva, P., Rosen, S., Spokes, K. and Epstein, F.H.: *Kidney Int.*, **39**, 653 (1991)
- 34) Heymann, S.N., Rosen, S., Silva, P., Spokes, K., Egorin, M.J. and Epstein, F.H.: *Kidney Int.*, **40**, 273 (1991)
- 35) Nisinaka, Y., Kitahara, S., Sugiyama, S., Yokota, M., Saito, H. and Ozawa, T.: *Br. J. Pharmacol.*, **104**, 805 (1991)
- 36) Ohtsu, A., Kitahara, S. and Fujii, K.: *Ophthalmic Res.*, **25**, 51 (1991)
- 37) Kobayashi, H., Kurokawa, T., Kitahara, S., Nonami, T., Harada, A., Nakao, A., Sugiyama, S., Ozawa, T. and Takagi, H.: *Transplantation*, **54**, 414 (1992)

(1993年7月15日受理)