MALOTILATE (DIISOPROPYL 1, 3-DITHIOL-2-YLIDENEMALONATE)による薬物性肝障害の抑制

野方 勝・加藤 稔・井西 静雄
杉本 達芳

日本農薬株式会社安全性研究所

PROTECTIVE EFFECT OF MALOTILATE (DIISOPROPYL 1, 3-DITHIOL-2-YLIDENEMALONATE) ON CHEMICAL-INDUCED HEPATOTOXICITY

Masaru NOKATA, Minoru KATOH, Shizuo INISHI
and Tatsuyoshi SUGIMOTO

Institute of Life Science Research, Nihon Nohyaku Co., Ltd.
4-31, Honda-cho, Kawachi-nagano, Osaka 586, Japan

Accepted June 18, 1986

Abstract.....Protective effect of malotilate on the liver injuries induced by several hepatotoxins was studied in mice and rats. Malotilate suppressed the elevation of plasma glutamate pyruvate transaminase (p-GPT) activity induced by chloroform (CHCl_3) in rats when the animals were treated with 25 mg/kg or more dose of malotilate at 6 hours prior to the treatment with CHCl_3 . The effect was observed even in the rats treated with malotilate 24 or 48 hours prior to the treatment with CHCl_3 . Malotilate, when orally administered 6 hours prior to treatment with hepatotoxins such as CHCl_3 , allyl alcohol, bromobenzene, dimethylnitrosamine or thioacetamide, suppressed the elevation of p-GPT activity, liver triglyceride content and/or the decrease of bromosulphalein clearance induced by these hepatotoxins in mice. Anethole trithione, which was used as a possible protective agent against chemical-induced hepatotoxicity, tended to normalize changes in the parameters induced by the most of these hepatotoxins, but enhanced the elevation of p-GPT activity induced by CHCl_3 . In a case of CHCl_3 -induced liver injury, the protective effect of malotilate was histopathologically confirmed.

Malotilate and anethole trithione reduced p-nitroanisole O-demethylation activity in rat liver 6 hours after the administration but increased or tended to

increase the activity 48 hours after the administration. Malotilate showed a protective effect on the liver injury induced by CHCl_3 even when the activity of drug metabolizing enzymes in the liver was increased, although anethole trithione enhanced the CHCl_3 -induced liver injury regardless of the activity of drug metabolizing enzymes.

Key words: Malotilate; Chloroform; Allyl alcohol; Bromobenzene; Dimethylnitrosamine; Thioacetamide; Liver injury; Mice; Rats.

緒 言

Carbon tetrachloride (CCl_4)を始め肝障害を惹起する化合物（以下、肝障害剤と総称する。）の多くは肝において代謝活性化されるが、代謝活性化に関与する酵素系および肝障害の発現部位や形態が肝障害剤によって異なることが知られ (Gregus ら 1982, Rikans 1984), CCl_4 と chloroform (CHCl_3)のような類縁の化合物でも肝障害の発現機序に違いが見られている (Uehleke ら 1975)。

Malotilate (diisopropyl 1, 3-dithiol-2-ylidenemalonate)は肝硬変治療剤であり、 CCl_4 , D-galactosamine あるいは ethionine による急性肝障害あるいは脂肪肝に対して発症抑制あるいは治療作用を有することが知られ (Nokata ら 1985, Imaizumi ら 1981, 広岡ら 1982, 中山ら 1979), 肝薬物代謝酵素活性に対しては阻害した後に誘導することが報告されている (Katoh ら 1981)。Malotilate によって肝薬物代謝酵素活性が誘導されている動物に CCl_4 を投与した場合にも肝障害の発症が抑制されたことから、我々は malotilate は単に肝障害剤の代謝活性化の阻害によって肝障害の発症を抑制するのではないと考えている (Nokata ら 1985)。本報告では CHCl_3 , allyl alcohol (AA), bromobenzene (BB), dimethylnitrosamine (DMN)および thioacetamide (TAA)を肝障害剤とし、malotilate と同様分子内にイオウを含み、薬物性肝障害の発症を抑制することが報告されている anethole trithione (Ansher ら 1983) を対照薬剤として、malotilate の薬物性肝障害に対する抑制作用を検討した。

実験材料および実験方法

1. 供試動物

4 週齢の ICR あるいは dd 系雄性マウスおよび SD 系雄性ラットを購入し、2 週間予備飼育した後 6 週齢で実験に供した。マウスは各群 4 ～ 8 匹、ラットは各群 5 匹を用いた。

2. 供試化合物

Malotilate は Fig. 1 に示す化学構造を有する薬剤であり、malotilate および anethole trithione は日本農薬株式会社で合成および精製された純度 99.5% 以上の原末を用いた。肝障害剤として CHCl_3 (片山化学工業), AA (東京化成工業), BB (片山化学工業), DMN (東京化成工業) および TAA (和光純薬工業) を用いた。Bromosulphalein (BSP) はヘパトサルファレイン注射液 (5% W/V, 第一化学薬品), その他は試薬特級を用いた。

Fig. 1 Chemical structure of malotilate

3. 投与および試料の調製

Malotilate および anethole trithione はそれぞれ olive oil に溶解あるいは懸濁し、肝障害剤投与前の所定時間に経口投与した。肝障害剤は olive oil に溶解もしくは懸濁して投与した。肝障害剤の投与用量、投与経路およびそれぞれの肝障害の指標を Table 1 に示した。DMN を投与した15時間後、あるいは CHCl_3 , AA, BB または TAA を投与した24時間後に diethyl ether による麻酔下で heparin 処理した試験管に頸静脈より採血し、その後肝を摘出した。血液は 2,500 rpm で15分間遠沈して血漿を分離した。肝は3倍量の生理食塩水を加えて磨碎し、25% homogenate を得た。肝 p-nitroanisole 0-demethylation (NADM)活性を測定する場合は、薬物を投与した一定時間後に動物を屠殺し、肝を摘出した。肝に3倍量の 1.15% KCl 水溶液を加えて磨碎し、25% homogenate とした。この homogenate を $9,000 \times g$ で20分間遠心分離し、得られた上清を粗酵素として用いた。

Table 1 Hepatotoxins and determined parameters as indicator of liver injury.

Hepatotoxin	animal	Dose (ml or mg*/kg)	Route of administration	Parameter
CHCl_3	mouse	0.2	oral	p-GPT
	rat	0.5	oral	p-GPT
AA	mouse	0.75	oral	BSP clearance
BB	mouse	0.5	oral	p-GPT, liver TG
DMN	mouse	0.05	intraperitoneal	p-GPT, BSP clearance
TAA	mouse	100*	oral	p-GPT, BSP clearance

4. 検査項目

血漿 glutamate pyruvate transaminase (p-GPT)活性は Reitman ら (1957) の方法あるいは柴田ら (1969) の方法で測定し、肝中 triglycerides (TG)含量は Van Handel ら (1957) の方法で測定した。BSP の排泄能は、動物に BSP を 100 mg/kg の割合で尾静脈より注射し、その30分後に採血して血漿を分離し、血漿中に残存する BSP の濃度を比色定量して調べた。肝の NADM 活性は Kinoshita ら (1966) の方法で測定した。肝の一部を摘出して 10% formalin で固定し、常法に従って paraffin 包埋後薄切し、hematoxylin-eosin (H. E.)染色を行い病理組織学的検査に供した。

結 果

1. Malotilate のラットにおける CHCl_3 肝障害に対する発症抑制

Malotilate を CHCl_3 の投与 6 時間前に 25~250 mg/kg の割合でそれぞれ経口投与し、 CHCl_3 による p-GPT 活性の上昇を抑制するのに有効である用量について調べた (Table 2)。Malotilate を 25 mg/kg 以上の割合で前投与することによって p-GPT 活性の上昇はほぼ完全に抑制されていた。

CHCl_3 投与の96時間前から直前までに malotilate を 50 mg/kg の割合で単回経口投与し、p-GPT 活性の上昇に対する抑制作用の持続時間を調べた (Table 3)。 CHCl_3 投与の12時間前から直前の間に malotilate を投与した場合、 CHCl_3 による p-GPT 活性の上昇は完全に抑制され、24時間前投与でも明らかな抑制作用が認められた。 CHCl_3 を投与したラットの肝では小葉を中心に空胞化および細胞浸潤を伴った壊死が著しく認められた (Photo. 1)。しかし、malotilate 6 時間前投与により CHCl_3 による肝細胞の変性の発現が抑制され、肝細胞はほぼ正常な構造を示した (Photo. 2)。24時間前投与においても肝細胞の変性、特に壊死の発現が明らかに抑制され (Photo. 3)、48時間前投与においても同様の傾向が認められた (Photo. 4)。

Table 2 Effect of pretreatment with malotilate at various doses on p-GPT activity after administration of CHCl_3 in rats.

Parameter	control	CHCl_3	malotilate+ CHCl_3			
			Dose(mg/kg) of malotilate			
			25	50	100	250
p-GPT (Karmen unit)	18±2	453±177*	33±4**	29±4*	22±1+	23±3+

Each value is a mean±S. E. of 5 rats. Malotilate was orally given 6 hr prior to CHCl_3 (0.5 ml/kg p. o.) administration. Significant difference from control group: * (p<0.05); ** (p<0.01). Significant difference from CHCl_3 group: + (p<0.05). For further details, see MATERIALS AND METHODS.

Table 3 Duration of the effect of pretreatment with malotilate on p-GPT activity after administration of CHCl_3 in rats.

Parameter	control	CHCl_3	malotilate+ CHCl_3								
			Intervals(hour) between the treatments								
			0	1	3	6	12	24	48	72	96
p-GPT (Karmen unit)	17±1	186±40**	23±7++	20±2++	14±2++	13±3++	16±1++	35±7*	92±27*	98±26*	64±8**

Each value is a mean±S. E. of 5 rats. Malotilate (50 mg/kg) was orally given at selected intervals before CHCl_3 (0.5 ml/kg p. o.) administration. Significant difference from control group: * (p<0.05); ** (p<0.01). Significant difference from CHCl_3 group: ++ (p<0.01). For further details, see MATERIALS AND METHODS.

Photo. 1 Liver section from rat treated with chloroform alone (0.5 ml/kg, po). Centrilobular necrosis associating with vacuolation and infiltration is evident. (H. E. $\times 40$)

Photo. 2 Liver section from rat pretreated with malotilate (50 mg/kg, po) 6 hours prior to chloroform treatment (0.5 ml/kg, po). The appearance is essentially normal. (H. E. $\times 40$)

Photo. 3 Liver section from rat pretreated with malotilate (50 mg/kg, po) 24 hours prior to chloroform treatment (0.5 ml/kg, po). The necrosis induced by chloroform is suppressed. (H. E. $\times 40$)

Photo. 4 Liver section from rat pretreated with malotilate (50 mg/kg, po) 48 hours prior to chloroform treatment (0.5 ml/kg, po). The necrosis induced by chloroform is suppressed. (H. E. $\times 40$)

2. Malotilate のマウスにおける各種薬物性肝障害に対する発症抑制

Malotilate が CHCl_3 肝障害の発症抑制に有効であったことから、 CHCl_3 およびその他肝障害剤投与の6時間前に malotilate あるいは anethole trithione を 100 mg/kg の割合で投与し、肝障害剤投与15あるいは24時間後の p-GPT 活性、肝中 TG 含量あるいは BSP 排泄能に対する影響を比較検討した (Table 4)。 CHCl_3 の経口投与によって、対照群では27カーメン単位であった p-GPT 活性が372カーメン単位にまで上昇したが、あらかじめ malotilate を投与した群 (malotilate 前投与群) ではその上昇はほぼ完全に抑制された。しかし、anethole trithione を投与しておいた群 (anethole trithione 前投与群) では全個体で p-GPT 活性が1,000カーメン単位以上に上昇した。AA の単独投与によって血漿中に残存する BSP の濃度は対照群の約3倍になり、BSP 排泄能の低下が見られたが、malotilate 前投与群では BSP 排泄能が改善される傾向が認められた。BB 単独投与群では p-GPT 活性は240カーメン単位まで上昇し、肝中 TG 含量は対照群の約3倍の 17.9 mg/g に増加したのに対して、malotilate 前投与群ではそれぞれ22カーメン単位および 10.0 mg/g であり、それらの上昇および増加は抑制された。DMN あるいは TAA 単独投与群では p-GPT 活性が顕著に上昇し、BSP 排泄能も明らかに低下したが、malotilate 前投与群では p-GPT 活性の上昇は抑制され、BSP 排泄能の低下も有意に抑制された。 CHCl_3 以外の肝障害剤による各指標の変化は、anethole trithione 前投与群においても malotilate 前投与群と同様に抑制された。

Malotilate の CHCl_3 肝障害に対する発症抑制作用をさらに病理組織学的に検討した (Photo. 5 および 6)。 CHCl_3 の投与によって肝細胞の空胞化および細胞浸潤を伴う壊死が慢性に認められた (Photo. 5)。しかし、malotilate 前投与群での肝組織ではそれらの変化は殆ど見られなかった (Photo. 6)。

3. Malotilate と anethole trithione のラットにおける CHCl_3 肝障害発症に対する作用の比較

マウスでは anethole trithione は malotilate とは逆に CHCl_3 肝障害を増悪させた。そこでラットを用いて両剤の CHCl_3 肝障害発症に対する作用を、肝薬物代謝酵素活性への影響と共に比較した。Malotilate あるいは anethole trithione をラットに経口投与し、6 あるいは48時間後に一部の動物より肝を摘出して NADM 活性を測定した。残りの動物には CHCl_3 を投与し、 CHCl_3 による p-GPT 活性の上昇に対する影響を比較した (Table 5)。Malotilate あるいは anethole trithione 投与6時間後の肝 NADM 活性はそれぞれ対照群の26あるいは36%に阻害された。Malotilate 投与6時間後に CHCl_3 を投与した群ではマウスの場合と同様に p-GPT 活性の上昇は完全に抑制され、anethole trithione を前投与した群では CHCl_3 による p-GPT 活性の上昇はさらに促進されていた。

Malotilate 投与48時間後の肝 NADM 活性は対照群の144%に上昇し、anethole trithione 投与においても活性は上昇する傾向にあった。この時点で CHCl_3 を投与した場合も malotilate は p-GPT 活性の上昇を抑制する傾向を示し、anethole trithione はさらに上昇させた。Malotilate は肝薬物代謝酵素活性を誘導している場合にも CHCl_3 による p-GPT 活性の上昇を抑制し、anethole trithione は肝薬物代謝酵素活性の変化に関わらず p-GPT 活性の上昇を強めることが

Table 4 Effect of pretreatment with malotilate or anethole trithione on p-GPT activity, BSP concentration in plasma and TG content in liver after administration of various hepatotoxins in mice.

Treatment	CHCl ₃	AA	BB	
	p-GPT (Karmen unit)	BSP (mg/dl)	p-GPT (Karmen unit)	TG (mg/g)
control	27 ± 2	8.6 ± 0.9	17 ± 1	6.7 ± 1.0
hepatotoxin	372 ± 30**	27.2 ± 7.3*	240 ± 62*	17.9 ± 1.9**
hepatotoxin + malotilate	49 ± 7+	16.0 ± 4.0	22 ± 3+	10.0 ± 2.1+
hepatotoxin + anethole trithione	>1,000	17.3 ± 6.7	23 ± 2+	11.7 ± 2.2

Treatment	DMN		TAA	
	p-GPT (Karmen unit)	BSP (mg/dl)	p-GPT (Karmen unit)	BSP (mg/dl)
control	15 ± 2	1.5 ± 0.5	22 ± 2	3.0 ± 0.9
hepatotoxin	434 ± 48**	33.8 ± 3.5**	>950	19.1 ± 1.3**
hepatotoxin + malotilate	211 ± 35**	10.0 ± 2.0**	39 ± 7	12.9 ± 6.0
hepatotoxin + anethole trithione	192 ± 54*	17.6 ± 2.7**	164 ± 78	7.1 ± 1.4*+

Each value is a mean ± S. E. of 4-8 mice. The doses of malotilate and anethole trithione were 100 mg/kg p. o. each. Significant difference from control group: * (p<0.05); ** (p<0.01). Significant difference from hepatotoxin group: + (p<0.05); ++ (p<0.01). Four or 5 animals were used for each group except for hepatotoxin groups of BB and DMN where 8 animals were used. For further details, see MATERIALS AND METHODS.

Table 5 Effects of malotilate and anethole trithione on NADM activity and changes of p-GPT activity after administration of CHCl₃ in rats.

Treatment		NADM (μg p-nitrophenol/hour/20 mg liver)	p-GPT (Karmen unit)
control		2.73 ± 0.11	23 ± 1
CHCl ₃			165 ± 53*
malotilate	6 hours ^{a)}	0.71 ± 0.13**	28 ± 6+
anethole trithione	6 hours	0.97 ± 0.18**	1,454 ± 331**
malotilate	48 hours	3.93 ± 0.14**	100 ± 11**
anethole trithione	48 hours	3.19 ± 0.18	815 ± 354

Each value is a mean ± S. E. of 5 rats. The doses of malotilate, anethole trithione and CHCl₃ were 100 mg/kg p. o., 100 mg/kg p. o. and 0.5 ml/kg p. o., respectively. Significant difference from control group: * (p<0.05); ** (p<0.01). Significant difference from CHCl₃ group: + (p<0.05); ++ (p<0.01). ^{a)}: The period shows the interval between malotilate treatment and sacrifice for NADM activity and the interval between malotilate and CHCl₃ treatments for p-GPT activity. For further details, see MATERIALS AND METHODS.

Photo. 5 Liver section from mouse treated with chloroform alone (0.2 ml/kg, po). Diffuse necrosis associating with vacuolation and infiltration is evident. (H. E. $\times 40$)

Photo. 6 Liver section from mouse pretreated with malotilate (100 mg/kg, po) 6 hours prior to chloroform treatment (0.2 ml/kg, po). The appearance is essentially normal. (H. E. $\times 40$)

明らかとなった。

考 察

Malotilate の前投与により, CHCl_3 , AA, BB, DMN および TAA による p-GPT 活性の上昇, 肝中 TG 含量の増加および血中 BSP 排泄率の低下が抑制され, 肝障害の発症抑制が認められた。今回供試した肝障害剤はいずれも生体内で代謝活性化されて肝毒性を発現するため (Pohl 1980, Gregus ら 1982, Branchflower ら 1983, Lorr ら 1984, Chieli ら 1985), 肝薬物代謝酵素活性の変動はこれらの剤による肝障害の発症に大きく影響すると考えられる。しかしながら, Maling ら (1974) は dibenamine による薬物性肝障害の発症抑制作用を検討し, dibenamine は肝薬物代謝酵素活性を抑制することにより CCl_4 , TAA および DMN による肝障害の発症を抑制するが, AA および BB による肝障害は抑制し得ないことを報告し, 肝障害剤の代謝活性化の機構には違いがあることを推察している。また, CHCl_3 は CCl_4 の類縁化合物であり, CCl_4 の中間代謝物として認められているが (Reynolds ら 1984), Uehleke ら (1975) は CCl_4 と CHCl_3 から生成した free radical の肝 microsome での共有結合の様相が異なることから, 肝障害発現機構に違いのあることを推察している。Anethole trithione は CCl_4 肝障害の発症を抑制することが報告されており (Ansher ら 1983), 本試験においては CHCl_3 以外の肝障害剤による障害の発症を抑制したが, CHCl_3 肝障害に対しては肝 NADM 活性を阻害しているにもかかわらず逆に増悪した (Table 5)。この事実も薬物性肝障害の発症機構に違いがあることを示唆している。しかし, malotilate は既に報告している CCl_4 (Nokata ら 1985) および D-galactosamine (広岡ら 1982) に加えて, dibenamine あるいは anethole trithione で効果のなかった CHCl_3 , AA および DMN による肝障害をはじめ, 今回検討したすべての肝障害の発症を抑制した。このことは, 肝障害発現機構の違いに関わらず malotilate が非特異的に薬物性肝障害の発症を抑制することを示している。

要 約

- Malotilate による各種薬物性肝障害の発症抑制作用をマウスおよびラットを用いて検討した。
- (1) ラットに対して malotilate を 25 mg/kg 以上の割合で CHCl_3 投与 6 時間前にあらかじめ投与することによって p-GPT 活性の上昇はほぼ完全に抑制され, しかもその作用は 24 あるいは 48 時間前に投与した場合でも認められた。
  - (2) マウスにおいて malotilate は CHCl_3 , AA, BB, DMN あるいは TAA による p-GPT 活性の上昇, 肝中 TG 含量の増加あるいは BSP 排泄能の低下を抑制し, いずれの肝障害に対しても発症を抑制した。 CHCl_3 による肝障害においては肝病理組織学的にもその抑制作用が認められた。対照薬剤として用いた anethole trithione は CHCl_3 による p-GPT 活性の上昇をさらに促進し, 肝障害を増悪した。
  - (3) Malotilate は肝 NADM 活性を阻害していない場合でも CHCl_3 による p-GPT 活性の上昇および肝の病理組織学的変化を抑制した。Anethole trithione は肝 NADM 活性の変化に関

わず CHCl_3 による p-GPT 活性の上昇をさらに促進し、肝障害を増悪した。

文 献

- Ansher, S. S., Dolan, P. and Bueding, E. (1983): Chemoprotective effects of two dithiolthiones and butylhydroxyanisole against carbon tetrachloride and acetaminophen toxicity. *Hepatology*, **3**, 932-935.
- Branchflower, R. V., Schulick, R. D., George, J. W., et al (1983): Comparison of the effects of methyl-N-butyl ketone and phenobarbital on rat liver cytochrome P-450 and the metabolism of chloroform to phosgene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **71**, 414-421.
- Chieli, E. and Malvaldi, G. (1985): Role of the P-450 dependent and FAD-containing monooxygenases in the bioactivation of thioacetamide, thiobenzamide and their sulphoxides. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 395-396.
- Gregus, Z., Watkins, J. B., Thompson, T. N., et al. (1982): Resistance of some phase II biotransformation pathways to hepatotoxins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **222**, 471-479.
- 広岡慎吾, 田中哲二, 野方 勝, 他 (1982): Malotilate の D-Galactosamine 肝障害の発症抑制, 医薬品研究, **13**, 1046-1052.
- Imaizumi, Y., Sugimoto, T. and Kasai, T. (1981): Effect of diisopropyl 1, 3-dithiol-2-ylidenemalonate (NKK-105) on fatty liver induced by carbon tetrachloride. *Japan. J. Pharmacol.*, **31**, 15-21.
- Katoh, M., Kitada, M., Satoh, T., et al. (1981): Further studies on the *in vivo* effect of diisopropyl 1, 3-dithiol-2-ylidenemalonate (NKK-105) on the liver microsomal drug oxidation system in rats. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 2759-2765.
- Kinoshita, F. K., Frawley, J. P. and DuBois, K. P. (1966): Quantitative measurement of induction of hepatic microsomal enzymes by various dietary levels of DDT and Toxaphene in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **25**, 505-513.
- Lorr, N. A., Miller, K. W., Chung, H. R., et al. (1984): Potentiation of the hepatotoxicity of N-nitrosodimethylamine by fasting, diabetes, acetone, and isopropanol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 423-431.
- Maling, H. M., Higman, B., Williams, M. A., et al. (1974): Reduction of pretreatment with dibenamine of hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride, thioacetamide or dimethylnitrosamine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **27**, 380-394.
- 中山貞男, 酒井節代, 栗本 忠, 他 (1979): Diisopropyl 1, 3-dithiol-2-ylidenemalonate (NKK-105) の薬理学的研究(第 V 報): Ethionine 脂肪肝に及ぼす影響について, 昭和医学会誌, **39**, 613-620.
- Nokata, M., Katoh, M. and Sugimoto, T. (1985): Protective effect of malotilate (diisopropyl 1, 3-dithiol-2-ylidenemalonate) on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice and rats. *J. Toxicol. Sci.*, **10**, 279-288.
- Pohl, L. R. (1980): Biochemical toxicology of chloroform. Hodgson, E., Bend, J. R. and Philpot, R. M. ed. *Reviews in biochemicam toxicology*. vol. 1, pp79-107, Elsevier/North Holland, Inc., New York, Amsterdam, Oxford.
- Reitman, S. and Frankel, S. (1957): A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Amer. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56-63.
- Reynolds, E., Treinen, R., Farrish H. H., et al. (1984): Metabolism of [^{14}C] carbon tetrachloride to exhaled, excreted and bound metabolites. Dose-response, time-course and pharmacoki-

- netics. Biochem. Pharmacol., **33**, 3363-3374.
- Rikans, L. E. (1984): Influence of age on the susceptibility of rats to hepatotoxic injury. Toxicol. Appl. Pharmacol., **73**, 243-249.
- 柴田 進, 佐々木匡秀 (1969): 日常臨床医学超微量定量法, p. 276-280, 金芳堂.
- Uehleke, H. and Werner, Th. (1975): A comparative study on the irreversible binding of labeled halothane, trichlorofluoromethane, chloroform and carbon tetrachloride to hepatic protein and lipids *in vitro* and *in vivo*. Arch. Toxicol., **34**, 289-308.
- Van Handel, E. and Zilversmit, D. B. (1957): Micromethod for the direct determination of serum triglycerides. J. Lab. Clin. Med., **50**, 152-157.