マウスにおけるシスプラチン腎障害の酸化的障害に
及ぼすアロプリノールの影響

並川清博,^{*,a} 平井完治,^a 北野隆志,^a 田中一平,^a 宮内浩典,^a
南 武志,^a 岡崎雄交,^a 門田永治^b
近畿大学薬学部臨床化学研究室,^a
市立岸和田市民病院病理検査部^b

Effects of Allopurinol for Oxidative Injury of Cisplatin-Induced
Nephrotoxicity in Mice

Kiyohiro NAMIKAWA,^{*,a} Kanji HIRAI,^a Takashi KITANO,^a
Ippei TANAKA,^a Kohsuke MIYAUCHI,^a Takeshi MINAMI,^a
Yuko OKAZAKI,^a and Eizi KADOTA^b

Department of Clinical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kinki University,^a 3-4-1 Kowakae, Higashiosaka, Osaka 577-8502, Japan
and Division of Pathology, Kishiwada Municipal Hospital,^b
2 Gakuhara cho, Kishiwada, Osaka 596-8501, Japan

(Received June 18, 1999)

The effects of allopurinol (Allop) on the lipid peroxidation in the nephrotoxicity of an antitumor drug, cisplatin (CDDP) were studied in mice. CDDP was administered intraperitoneally to two groups (CDDP+Allop group and CDDP+CMC-Na group) at single doses of 10 mg/kg, and mice were sacrificed 3 days after CDDP administration. The body weights of the CDDP-administered group gradually decreased to approximately 78% of the values of the control group (saline+Allop group and saline+CMC-Na group) within 3 days. Plasma urea nitrogen and creatinine, especially in the CDDP+Allop group, increased after 3 days. Lipid peroxides in the blood and kidney were monitored by measuring the production of malondialdehyde (MDA), which increased in the CDDP+CMC-Na group. On the other hand, MDA levels in the CDDP+Allop group increased in the kidney but remained unchanged in the blood. Changes were observed in tissue glutathione (reduced form, GSH; oxidized form, GSSG) levels in the CDDP+Allop group but not in the CDDP+CMC-Na group. Histomorphological examination demonstrated the degeneration of the proximal tubuli in the CDDP-administered groups. Especially in the CDDP+Allop group, the increase of mesangium cells in the glomeruli was observed.

From these results, it was suggested that Allop was not able to inhibit CDDP-induced lipid peroxidation in the kidney, and the kidney function became more severely impaired by the administration of Allop.

Key words—cisplatin (CDDP); allopurinol (Allop); lipid peroxide; glutathione; mouse

緒 言

抗悪性腫瘍剤であるシスプラチン (*cis*-diamminedichloroplatinum (II); CDDP) は、その著明な副作用として腎障害が知られているが、この腎障害のメカニズムとして酸化的障害の関与を指摘した報告がある。¹⁻⁷⁾ これらの報告は動物実験によるところが大きく、特にラットを対象とした研究が主である。CDDP を投与したラットの腎では投与3日後に腎組織、特に尿細管上皮の変性、壊死、あるいは上皮細胞の脱落等を主体とした組織障害像が認められる⁸⁻¹³⁾ ことからCDDP 投与後の腎障害時における過酸化脂質 (lipid peroxide; LPO) の関与とその増加のメカニズムについてさまざまな検討が行われてきた。LPO の増加と障害への関与について過去の報告では、i) CDDP による直接作用によるもの、^{1,2)} ii) CDDP の膜脂質への直接作用ではなく、他のメカニズムによる間接的要因によるもの、^{4,5)} iii) CDDP 投与後の組織障害の結果に基づく二次的なもの¹⁴⁾ など研究者により意見が異なっており、未だに定説はない。一方、臨床的には、CDDP と 5-fluorouracil (5-FU)、及び allopurinol (Allop) の組み合わせによる化学療法についての報告もある¹⁵⁻¹⁸⁾ が、この場合いずれも Allop は、CDDP と 5-FU の併用による骨髄毒性や消化管毒性を減じる目的で投与されている。痛風治療薬として用いられている Allop は、キサンチンオキシダーゼ系を阻害し脂質過酸化の増加を抑制する作用を有していることから、CDDP 投与による腎臓の過酸化脂質の増加を抑制する可能性も考えられるが、Allop 自身にも腎障害や消化管障害の副作用があることは既に周知のとおりである。

そこで今回我々は、CDDP の LD₅₀ がラットよりも高い ddY 系マウスを用いて、CDDP 投与による腎臓での酸化的障害、特に過酸化脂質の生成と腎障害の関係について、これまでのラットによる報告と比較、検討を行い、さらに Allop の投与が CDDP 投与により生じる腎臓での酸化的障害を抑制し、臨床的応用が可能か検討した。

実 験 の 部

1. 実験動物 日本 SLC(株) (浜松) から購入した生後5週齢の雄性 ddY 系マウスを室温 22±1℃、湿度 55±5% の室内で1週間の予備飼育をした後、体重が 30±2 g のものを実験に使用した。なおマウスは7匹を1ケージに入れ繁殖用固形飼料 (MF: オリエンタル酵母(株)、東京) を与え、飲料水には水道水を用いて給水ビンから自由に摂取させた。

2. 実験試薬 CDDP は、日本化薬(株)から購入したランダ注[®] (50 mg/100 ml) を用いた。血液自動分析用試薬として、デタミナー LUN、デタミナー CRE はキョウワメディックス(株)より購入したものをを用いた。還元型グルタチオン (GSH)、酸化型グルタチオン (GSSG)、2-チオバルビツール酸、1,1,3,3-テトラエトキシプロパン、牛血清アルブミン、*o*-フタルアルデヒド、*N*-エチルマレイミド、血液用過酸化脂質測定用キットはいずれも和光純薬(株)より購入したものをを用いた。なおその他の試薬、試液はいずれも和光純薬(株)製の特級品、又は生化学用試薬を用いた。

3. 投与方法 実験はあらかじめ投与量決定試験を行い、その結果に従って CDDP は、10 mg/kg を単回腹腔内に投与することとし、Allop は 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na: 生理食塩水中) に懸濁させて、20 mg/kg を CDDP 投与開始1時間前に経口投与を行い、以降 CDDP 投与3日後まで毎日1回経口投与を行った (CDDP+Allop 群)。また Allop の代わりに 0.5% CMC-Na を同様の方法で投与したものを CDDP 単独投与群とした (CDDP+CMC-Na 群)。コントロール群には、生理食塩水 20 ml/kg を単回腹腔内投与し、

CDDP を投与したものと同様の方法で Allop (saline+Allop 群) と CMC-Na (saline+CMC-Na 群) をそれぞれ投与した。CDDP 投与 3 日後にネンブタール麻酔下で開腹、腹部大動脈より約 1 ml の血液を 1/50 容量のヘパリンナトリウムを含ませたシリンジ中に採取した。採血終了後、ただちに左右の腎臓を摘出、左腎を過酸化脂質測定用、右腎をグルタチオン測定用としてそれぞれの重量を測定した後、冷生理食塩水でよく洗い、実験に用いるまで -85°C の冷凍庫に保存した。なおマウスは、1 群 7 匹として実験を行った。

4. 血液学的検査 得られた血液は、過酸化脂質の測定に用いた $50\mu\text{l}$ 以外は、直ちに 4°C 、 $8000\times g$ 、15 分間の条件で遠心分離 (Centrifuge micro 6 CFM-100, Iwaki; Tokyo) を行い、その上清を血液自動分析装置 TBA-30FR (東芝; 東京) を用いて、urea nitrogen (UN) は urease-indophenol method, creatinine (CRTN) は picric acid method を用いて行った。

5. 血液の過酸化脂質濃度の測定 測定用キットを用いて測定を行った。血液の $50\mu\text{l}$ を生理食塩水 1.0 ml と混合し、最終的にブタノール層を抽出、日立 F-3000 形分光蛍光光度計 (東京) にて励起波長 515 nm 、蛍光波長 535 nm にて測定し、次式により過酸化脂質の濃度は血液 1 ml 中のマロンジアルデヒド (MDA) 量として求めた。

$$\text{過酸化脂質含量} = f/F \times 21 \text{ (nmol/ml 血液)}$$

(F=標準の蛍光強度, f=検体の蛍光強度)

6. 腎組織内過酸化脂質濃度の測定 得られた左腎に 1.15% の塩化カリウム溶液を加えて 10% のホモジネート液とし、この液を試料溶液として内山・三原¹⁹⁾の方法に従い、過酸化脂質の測定を行った。測定は、二波長分光光度計 UV-1600 型 (島津; 京都) を用い、 520 nm 、 535 nm における吸光度の差を求め、この差を過酸化脂質濃度とした。なお標準液として、 10 nmol/ml のテトラエトキシプロパン・メタノール溶液を用いた。また過酸化脂質濃度は、最終的に Lowry らの方法²⁰⁾ にて組織中のタンパク量を測定し、この組織タンパク 1 mg あたりの MDA 量で表した。

7. 腎組織中の還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) 濃度の測定

得られた右腎に 0.1 M リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.8$; 5 mM EDTA 含有)、及び 25% メタリン酸溶液を加えて 20% のホモジネート液とし、 4°C 、 $100000\times g$ で 30 分間遠心分離 (Automatic Preparative Ultracentrifuge 70p-72, Hitachi, Tokyo) を行い、その上清を用いて Hissin²¹⁾ らの方法に準じて GSH, GSSG の測定を行った。なお蛍光度測定は、日立 F-3000 形分光蛍光光度計にて励起波長 350 nm 、蛍光波長 420 nm にて測定した。GSH, GSSG の濃度はいずれも組織重量 1 g あたりの量で表した。

8. 組織学的検査 各群とも、別にそれぞれ 5 匹ずつを用いて組織学的検査を行った。すなわち、ネンブタール麻酔下開腹後、経大動脈的に生理食塩水にて十分脱血した後、10% 中性緩衝ホルマリン液にて還流固定を行い、左腎を

Fig. 1. Changes of Body Weight after CDDP Administration to Mice

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 7 mice. Significant differences from saline+Allop group values are indicated by $p < 0.05$ (*). Significant differences from saline+CMC-Na group values are indicated by $p < 0.05$ (*). ●, saline+CMC-Na; △, saline+Allop; □, CDDP+CMC-Na; ○, CDDP+Allop.

Table 1. Results of Relative Tissue Weights in Kidney and Plasma Levels of UN and CRTN after CDDP Administration to Mice

	Tissue/weight (100 g)	UN (mg/dl)	CRTN (mg/dl)
Saline+CMC-Na	0.71±0.02	21.77± 1.21	0.10±0.01
Saline+Allop	0.77±0.04	33.32± 2.58	0.15±0.02
CDDP+CMC-Na	0.65±0.04	39.55± 6.74	0.32±0.05 ^{a)}
CDDP+Allop	0.72±0.03	117.18±26.49 ^{a)}	0.54±0.10 ^{b)}

Each value represents the mean±S.E. of 7 mice.

a) Significance differences from saline+CMC-Na group levels are indicated by $p < 0.05$.

b) significance differences from saline+CMC-Na group and saline+Allop group levels are indicated by $p < 0.05$.

摘出, 直ちに 10% 中性緩衝ホルマリン液中で 2 日間固定した. 定法に従い, 脱水, 包埋, 薄切後, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い光学顕微鏡下観察を行った.

9. 統計処理 結果は, Smirnov の棄却検定を行った後, 平均値±標準誤差 (S.E.) で表し, 統計学的有意差検定は, 一元配置分散分析を行った後, Tukey の多重比較検定を行い, $p < 0.05$ の場合に統計学的に有意とみなした. ($p < 0.05$)

結 果

1. CDDP 投与後のマウスの体重変化, 及び腎臓 (左腎) の相対重量の結果 CDDP 投与後のマウスの体重変化は, コントロール群 (saline+CMC-Na 群, 及び saline+Allop 群) では実

Fig. 2. The MDA Levels in Blood after CDDP Administration to Mice

Each point represents the mean±S.E. of 7 mice. Significant differences from saline+CMC-Na group values are indicated by $p < 0.05$ (*). Significant differences from CDDP+CMC-Na group values are indicated by $p < 0.05$ (※).

Fig. 3. The MDA Levels in Kidney after CDDP Administration to Mice

Each point represents the mean±S.E. of 7 mice. Significant differences from saline+CMC-Na group values are indicated by $p < 0.05$ (*). Significant differences from saline+Allop group values are indicated by $p < 0.05$ (※).

験期間中、変化は認められなかった。一方、CDDP+Allop 群では投与 1 日後には既に減少が認められ、3 日後の減少率は約 22% であった。また、CDDP+CMC-Na 群も投与 2 日後に体重の低下が認められ、3 日後には saline+CMC-Na 群と比較して有意な減少を認めた。しかし、CDDP+Allop 群と CDDP+CMC-Na 群との比較では、投与 3 日後では有意の差は認められなかった (Fig. 1)。腎臓の相対重量の変化では、Allop を投与した群 (saline+Allop 群, CDDP+Allop 群) では上昇傾向を示したが、いずれの群間にも有意の差は認められなかった (Table 1)。

2. 血液学的検査の結果 CDDP + CMC-Na 群の CRTN 値は、saline + CMC-Na 群と比較して有意に高値を示していた。また UN 値も有意の差は認められなかったが、上昇傾向を示した。次に CDDP + Allop 群では、control 群 (saline+CMC-Na 群、及び saline+Allop 群) と比較して、CRTN 値の有意な上昇が認められ、また UN 値でも saline+CMC-Na 群と比べて有意な上昇が認められた。さらに CDDP+Allop 群と CDDP+CMC-Na 群との比較では、UN 値、CRTN 値とも有意の差は認められなかったが、いずれの値も CDDP+Allop 群の方が高値を示していた。saline+Allop 群と Saline+CMC-Na 群の比較では、saline+Allop 群の UN 値に上昇傾向を認めた (Table 1)。

Fig. 4-b. The GSSG Levels in Kidney after CDDP Administration to Mice

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 7 mice.

Fig. 4-a. The GSH Levels in Kidney after CDDP Administration to Mice

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 7 mice.

Fig. 4-c. The Ratio of GSSG in Total Glutathione in Kidney after CDDP Administration to Mice

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 7 mice.

3. 血液中の過酸化脂質濃度の結果 CDDP+CMC-Na 群の血液中の過酸化脂質濃度は、saline+CMC-Na 群と比較して、有意に高値を示した。一方、CDDP+Allop 群はコントロール群と比較しても有意の差は認められず、CDDP+CMC-Na 群との比較では、有意に低値を示した (Fig. 2)。

4. 腎組織内過酸化脂質濃度の結果 腎組織中の過酸化脂質の測定では、CDDP+Allop 群は saline+CMC-Na 群、及び saline+Allop 群と比較して、いずれも有意に高値を示した。また、CDDP+CMC-Na 群も saline+CMC-Na 群よりも有意に高値を示した。しかし、CDDP+Allop 群と CDDP+CMC-Na 群の比較では有意の差は認められなかったが、CDDP+Allop 群の方が高値を示していた (Fig. 3)。

5. 腎組織内グルタチオン濃度 (GSH, GSSG) の結果 組織内グルタチオンの測定では、GSH 量はいずれの群間にも有意な変化は認められなかったが、CDDP+Allop 群では減少傾向が認められた (Fig. 4-a)。一方、GSSG 量の測定においてもいずれの群間にも有意の差は認められなかったが、CDDP+Allop 群は上昇傾向を示していた (Fig. 4-b)。この結果を total グルタチオン量に占める酸化型グルタチオン量の割合で比較してみると、CDDP+Allop 群は他のいずれの群よりも上昇傾向を示していた (Fig. 4-c)。

6. 光学顕微鏡観察の結果 コントロール群における saline+CMC-Na 群と saline+Allop 群との比較では、変化は認められなかった。次に、コントロール群と CDDP+CMC-Na 群との比較では、CDDP 投与群の腎尿細管上皮における変性や上皮細胞の剥離、核破片の存在といっ

Fig. 5. Histological Appearance of Mouse Specimens in Each Group

(A) saline+CMC-Na group ($\times 100$). (B) saline+Allop group ($\times 100$). (C) CDDP+CMC-Na group ($\times 200$). Necrotic tubules with cell debris (arrowhead) in the lumen can be seen. (D) CDDP+Allop group ($\times 200$). Necrotic tubules with cell debris (arrowhead) in the lumen can be seen. Especially in this group, the increase of mesangium cells (arrow) in the glomeruli (G) was observed.

た所見が認められた。さらに CDDP+Allop 群と CDDP+CMC-Na 群との比較では、尿細管上皮の変性、上皮細胞の剥離、あるいは核破片の存在などの所見には違いは認められなかったが、CDDP+Allop 群の腎糸球体ではメサングウム細胞の増加が認められた (Fig. 5)。

考 察

Besi ら¹⁷⁾ の食道癌患者に対する CDDP と 5-FU の併用投与による治療報告では、これらの組み合わせによる副作用は軽度のものであり、その障害は可逆的であるとしている。彼らは、この併用に Allop を CDDP や 5-FU の副作用である骨髄抑制や胃腸管障害を軽減する目的で投与しているが、Allop にも食欲不振や下痢、あるいは腎障害の副作用があることは既に知られており、CDDP と併用した場合、その障害が悪化する可能性も考えられる。Besi らの報告では、Allop と CDDP を併用した場合の腎障害及び血液学的検査について十分な検討は行われていない。さらに CDDP 投与により生じるといわれている酸化的障害に対する Allop の抑制効果については、実験的にも検討した過去の報告は見当たらない。今回著者らは、キサンチンオキシダーゼ阻害薬でもある Allop が、CDDP 投与によって生じる酸化的障害を抑制し、その結果 CDDP による腎障害を軽減し、臨床的応用が可能か検討したものである。

今回、CDDP 投与後認められた体重の低下は CDDP 投与によるものであり、Allop の影響はないものと考ええる。しかし、3 日後の肉眼的解剖所見では、特に CDDP+Allop 群において胃の膨満が認められ、腸管はほぼ空の状態であり、この肉眼的所見及び CDDP 投与後に認められた体重減少の結果から Allop は、CDDP 投与による胃腸管障害を抑制していないものと思われた。また、腎の相対重量の変化について CDDP+CMC-Na 群は saline+CMC-Na 群より減少傾向を示した。この結果はラットの腎では相対重量の上昇を認めた Sadzuka ら⁴⁾ の報告とは一致せず、むしろ Betamipron (*N*-benzoyl- β -alanine) を併用しその防御効果を検討した Tokunaga ら²²⁾ の報告と一致する。CDDP は腫瘍細胞の DNA 合成を阻害することにより抗腫瘍効果を示すことから、通常の組織においても DNA 合成を阻害することが考えられる。したがって、今回認められた CDDP+CMC-Na 群の相対重量の低下は、CDDP 投与による DNA 合成の阻害によるものではないかと考えられた。反対に、相対重量が上昇傾向を示した Allop 投与群では、Sadzuka⁴⁾ らの報告にもあるように投与後の生化学的、あるいは組織学的変化と関係した腎機能の低下が関与しているのではないかと考えられた。

過酸化脂質の測定結果では、Allop が CDDP 投与後の血中過酸化脂質の上昇を抑制していることが認められた。Gemba ら²⁾ は、CDDP を投与したラットにおける腎障害は、脂質過酸化レベルの上昇と関係があり、その増加は CDDP の直接作用であるとしている。これに対して Sadzuka ら^{5,6)} あるいは Somani ら²³⁾ は、*in vivo* で認められた CDDP 投与後のラットの腎における過酸化脂質の上昇は、CDDP による膜脂質の直接的な過酸化ではなく、他のメカニズムによる間接的な要因であり、特に脂質過酸化防御酵素の活性の低下によるものであると報告している。一方、山田¹⁴⁾ は、病理組織学的に明らかな組織障害が認められた後の CDDP 投与 7 日後に腎組織において過酸化脂質の上昇を認めたことから、過酸化脂質の上昇は CDDP 投与による組織障害の結果による二次的変化の可能性を指摘している。このように過去のラットにおける報告では、CDDP 投与後の腎組織における過酸化脂質の上昇とそのメカニズム、及び腎障害への関与についてはさまざまな意見があり確定されてはいない。今回我々が検討した Allop は、キサンチンオキシダーゼ (XOD) を競合的に阻害し、その結果ヒポキサンチンやキサンチンからの尿酸生成を抑制して血中や尿中の尿酸値を低下させることが知られている。一方、白

金化合物は、XOD system, あるいはマクロファージにおける活性酸素生成能を亢進するという報告がある。²⁴⁾ XOD は、さまざまな動物の組織及び血中に存在し、その主な存在場所は肝臓であり、腎臓の XOD 活性は多くの動物で肝臓の約 10% 程度であるという報告もある。²⁵⁾ 今回、CDDP+Allop 群の血中 MDA 値が CDDP+CMC-Na 群に比べて減少したのは、CDDP 投与によって生じた肝臓での酸化障害に対しては Allop が抑制的に作用した結果ではないかと考える。一方、腎臓では XOD 活性が少なく、さらに CDDP の主な障害部位が腎尿細管上皮細胞であることを考えると CDDP 投与で生じる過酸化反応を Allop が十分に抑制できず、むしろ Allop 自体が持つ腎障害が CDDP と相乗的に作用した結果ではないかと考えられた。

また CDDP を投与したラットでは、腎組織内グルタチオン濃度が減少することから CDDP の腎障害にはグルタチオン濃度の枯渇、^{23, 26)} 特に還元型グルタチオンの関与^{27, 28)} を指摘した報告もある。Somani²³⁾ らは、*in vitro* で腎皮質を用いた実験で観察された GSH の減少は、過酸化脂質の増加と関係があると報告している。マウスに CDDP を投与した今回の結果では、CDDP+CMC-Na 群の腎組織内過酸化脂質量、及び GSH, GSSG の結果が必ずしも過去の報告^{23, 26)} とは一致しないが、過酸化脂質濃度が最高値を示した CDDP+Allop 群では、有意の差は認められなかったものの腎組織内 GSH の減少傾向、及び GSSG の上昇傾向を認め、さらに total glutathione 量に占める GSSG 量も他の群よりも上昇傾向を示していたことから、今回の実験結果の一部は、過去の報告と一致しているのではないかとと思われる。また、腎臓の重金属毒性に対してその抑制には細胞内 GSH が重要な役割を果たしているが、カドミウムや水銀の大量投与による障害に対しては GSH は防御効果が認められないという報告^{29, 30)} もあるが、今回の結果からは判断できず、今後これらの重金属毒性との比較も検討すべきであろうと思われる。

さらに組織学的観察の結果もその出現時期、及び所見とも過去のラットにおける報告とほぼ一致していたが、特に CDDP+Allop 群では腎糸球体におけるメサングウム細胞の増加が認められ、この結果は血液学的検査の結果とも一致していると考えられた。

以上の結果より、今回のマウスへの CDDP 投与による腎障害には酸化障害が関与しており、また組織学的変化が認められた投与 3 日後には MDA 測定による過酸化脂質の上昇も認められたことから、その障害には過酸化脂質も関与している可能性が示唆された。しかし過酸化脂質の関与と組織障害の関係については、特に山田の報告¹⁴⁾ とは明らかに異なる。この理由として実験に用いた抗酸化剤 (*N,N'*-diphenyl-*p*-phenylenediamine と Allop) の違い、ラットとマウスにおける LD50 量と投与量の違い、あるいはラットとマウスでは CDDP を投与することによる腎障害の作用機序が異なっている可能性も考えられた。このことは GSH、及び GSSG の結果にも共通して考えられることである。さらに血液学的検査の結果、CDDP+Allop 群は、saline+Allop 群に比べて UN や CRTN の上昇が認められ、この値は CDDP+CMC-Na 群と比較しても高値を示したことから Allop を CDDP と併用すると腎機能障害がさらに悪化する可能性が組織学的検査の結果からも示唆された。しかしながら、今回の Allop の経口投与は人間に対して用いる場合とは明らかに異なっていることから、Allop の併用はさらに検討する必要があるものと考ええる。

引用文献

- 1) Sugihara K., Nakano S., Koda M., Tanaka K., Fukuisky N., Gemba M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **43**, 247—252 (1987).
- 2) Gemba M., Sugihara K., *Dev. Toxicol. Environ. Sci.*, **14**, 169—177 (1986).

- 3) Sugihara K., Nakano S., Gemba M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **44**, 71—76 (1987).
- 4) Sadzuka Y., Shoji T., Takino Y., *Toxicol. Lett.*, **57**, 159—166 (1991).
- 5) Sadzuka Y., Shoji T., Takino Y., *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1872—1875 (1992).
- 6) Goldstein R. S., Mayor G. H., *Life Sci.*, **32**, 685—690 (1983).
- 7) McGuinness J. E., Proctor P. H., Demonpoulos H. B., Hokanson J. A., Kirkpatrick D. S., *Physiol. Chem. Phys.*, **10**, 267—277 (1978).
- 8) Jones T. W., Chopra S. Kaufman J. S., Flamenbaum W., Trump B. F., *Lab. Invest.*, **52**, 363—374 (1985).
- 9) Choie D. D., Longnecker D. S., Del Campo A. A., *Lab. Invest.*, **44**, 397—402 (1981).
- 10) Chopra S., Kaufman J. S., Jones T. W., Hong W. K., Gehr M. K., Hamburger R. J., Flamenbaum W., Trump B. F., *Kidney Int.*, **21**, 54—64 (1982).
- 11) Dobyan D. C., Levi J., Jacobs C., Kosek J., Weiner M. W., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **213**, 551—556 (1987).
- 12) Safirstein R., Winston J., Moel D., Dikman S., Guttenplan J., *Int. J. Androl.*, **10**, 325—346 (1987).
- 13) Suzuki C. A. M., Cherian M. G., *Toxicol.*, **64**, 113—127 (1989).
- 14) 山田久陽, 愛知医大医誌, **22**, 279—318 (1994).
- 15) Weiss G. R., Green S., Hannigen E. V., Boutselis J. G., Surwit E. A., Wallace D. L., Alberts D. S., *Gynecol. Oncol.*, **37**, 354—358 (1990).
- 16) Greenberg B., Ahmann F., Garewal H., Koopmann C., Coulthard S., Berzes H., Alberts D., *Cancer*, **59**, 1860—1865 (1987).
- 17) De Besi P., Sileni V. C., Salvagno L., Tremolada C., Cartei G., Fosser V., Paccagnella A., Peracchia A., Fiorentino M., *Cancer Treat Rep.*, **70**, 909—910 (1986).
- 18) De Besi P., Sileni V. C., Salvagno L., Toso S., Paccagnella A., Fosser V., Tremolada C., Peracchia A., Fiorentino M., *Recent. Results Cancer Res.*, **110**, 196—197 (1988).
- 19) Uchiyama M., Mihara M., *Anal. Biochem.*, **86**, 271—278 (1978).
- 20) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275 (1951).
- 21) Hissin P. J., Hilf R., *Anal. Biochem.*, **74**, 214—226 (1976).
- 22) Tokunaga J., Kobayashi M., Kitagawa A., Nakamura C., Arimori K., Nakano M., *Renal Fail.*, **20**, 27—38 (1998).
- 23) Somani S. M., Ravi R., Rybak L. P., *Drug Chem. Toxicol.*, **18**, 151—170 (1995).
- 24) Oyanagui Y., *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 473—476 (1977).
- 25) Khalidi A. L., Chaglassian T. H., *Biochem. J.*, **97**, 318—320 (1965).
- 26) Kameyama Y., Gemba M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **55**, 174—176 (1991).
- 27) Nakano S., Gemba M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **50**, 87—92 (1989).
- 28) Zunino F., Pratesi G., Micheloni A., Cavalletti E., Sala F., Tofanetti O., *Chem. Biol. Interact.*, **70**, 89—101 (1989).
- 29) Anderson M. E., Naganuma A., Meister A., *FASEB J.*, **4**, 3251—3255 (1990).
- 30) Singhal R. K., Anderson M. E., Meister A., *FASEB J.*, **1**, 220—223 (1987).