

## Cis-diamminedichloroplatinum の聴器毒性とその軽減法に関する実験的研究

河田 信

**cis-diamminedichloroplatinum (cisplatin, CDDP)** は、プラチナ原子を中心に塩素とアミンがシス位に相対している白金製剤で、泌尿器、産婦人科だけでなくすべての領域の悪性腫瘍に対し欠くことのできない抗癌剤として広く使用されている。CDDP の毒性は多彩で、**dose limiting factor** となる腎障害を始め、胃腸、骨髄、聴器等への副作用を有する。

この報告では、ゴールデンハムスターとニホンザルを用いて、CDDP の聴器毒性の様式と程度について聴性脳幹反応 (ABR) と走査電子顕微鏡 (SEM) で検討した。聴力は、ABR において閾値の上昇と潜時の延長が認められ、一過性の聴力低下を来すものもあった。形態的な障害は、外有毛細胞が中心であり、内有毛細胞に障害を認めなかった。外有毛細胞障害は、散在性で基底回転に強く、投与量、投与回数が増加にともない激しくなった。

CDDP の毒性を軽減するものとして **sodium thiosulfate, fosfomycin** 等があるが、この報告では、次硝酸ビスマス (**bismuth subnitrate: BSN**) の投与によって誘導される金属結合蛋白質 (**metallothionein: MT**) が、CDDP の腎毒性を軽減するということから、MT の聴器毒性に対する効果をゴールデンハムスターを用いて検討した。また、肝、腎における MT を **Cadmium-Hemolysate** 法 (簡易定量法) により Cd の値として、間接的に測定した。

BSN の投与により、CDDP の聴器毒性が軽くなり、また肝、腎における MT の増加が認められた。CDDP の毒性は、MT により軽減されたと考えられたが、聴器毒性の軽減が、MT の直接作用か、腎毒性の軽減により二次的に起こったものなのかさらに検討が必要と思われた。

(平成2年2月26日採用)

### An Experimental Study on Ototoxicity and Its Reduction of Cis-diamminedichloroplatinum

Makoto Kawata

Cis-diamminedichloroplatinum (cisplatin, CDDP) is a drug centering on the platinum atom with chlorine and ammine arranged in the cisposition. It is widely used not only in urology and gynecology but in almost all fields as an indispensable anti-cancer drug to treat malignant tumors.

CDDP's toxicity is variegated and it causes side-effects including first of all as a dose limiting factor, renal damage, but also against the gastrointestinal tract, the marrow and ear.

We studied the manner and degree of CDDP's ototoxicity using golden hamsters and Japanese monkeys.

In regard to hearing level, the auditory brainstem response (ABR) indicated a rise in the threshold level and a prolongation of the latency.

In some animals only a transitory decrease in hearing level was observed.

Morphological damage was observed mainly in the outer hair cells but not inner hair cells. Damage to the outer hair cells was sporadic, and most severe damage in the basal turn. This damage became more severe increases in dosage and frequency of administration.

As substances that reduce CDDP's toxicity STS and FOM are well known. Metallothionein (MT) induced by the administration of bismuth subnitrate (BSN) is said to reduce renal damage, this studied the effects of MT against ototoxicity using golden hamsters.

Judgement of results was based on the use of ABR and scanning electron microscopy.

Also, MT in the liver and kidneys was indirectly determined as the Cd value with Cd-hem method (simple quantification method).

CDDP's ototoxicity was reduced by administration of BSN. BSN administration brought about an increase in MT in the liver and kidneys. Although that CDDP's toxicity was reduced by MT, more studies are needed to determine whether this reduction in ototoxicity was due to the direct action of MT, or due to the reduction in renal toxicity. (Accepted on February 26, 1990) *Kawasaki Igakkaishi* 16 (1) : 47-65, 1990

**Key Words** ① Ototoxicity ② CDDP ③ Scanning electron microscopy  
④ Cytochrome c ⑤ Metallothionein ⑥ Bismuth subnitrate

## はじめに

cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) は、二つのアンモニウムと二つの塩素がシス位に相対した白金化合物で、泌尿器、産婦人科はもとより他の領域の悪性腫瘍に対しても必要不可欠の抗癌剤である。頭頸部領域の悪性腫瘍においても第一選択の薬剤として広く利用されているが、dose limiting factor となる腎障害を始めとして、消化管、骨髄、聴器などの多彩な副作用を有している。

聴器における毒性は、1973年 Schaeppi ら<sup>1)</sup>により報告され、以後も続いて報告されてきている。<sup>2)-6)</sup> それらによると、毒性は、外有毛細胞を中心とするもので血管条の障害は軽微であったとか、障害は外有毛細胞、血管条ともに

おこるなど多少の違いが認められる。

この報告では、聴器の毒性をゴールドンハムスター（ハムスター）とニホンザルを使用し、聴性脳幹反応（ABR）と走査電子顕微鏡（SEM）により検討し、その障害様式と程度を調べ報告した。

また、重金属の毒性を軽減すると報告<sup>7)-10)</sup>されている金属結合蛋白質の metallothionein (MT) が次硝酸ビスマス (BSN) の投与により体内で誘導され、CDDP の致死毒性、腎毒性を軽減するという事<sup>8),9)</sup>から、聴器毒性について防止効果があるかどうか、ハムスターを用いて検討した。

MT の特徴は、分子量が約 6,000 の低分子蛋白質で、アミノ酸の 1/3 がシステインであり、金属とは SH 基を介して結合している。また、

比較的熱に強く、生物界では酵母、真菌から哺乳類に至るまで広く分布している。<sup>7), 10)</sup> 臓器では肝、腎、脾、腸管に多く、<sup>11)</sup> 血中、尿中にも微量ながら存在する。重金属により著明に誘導されるが、放射線、ステロイド、熱傷、ストレス等でも誘導が認められる。<sup>10)</sup>

MT の測定は、ハムスターに BSN を投与した後、肝、腎を摘出し、Cadmium-Hemolysate 法<sup>12)</sup> (簡易定量法, Cd-hem 法) により、組織 1 g 当たりの Cadmium (Cd) 量として間接的に測定した。

### 実験方法

実験は 3 段階に分けた。

実験 1, ハムスターとニホンザルを用い、CDDP の聴器毒性を ABR と SEM にて観察した。

実験 2, ハムスターにおける CDDP の聴器毒性の軽減について、BSM を投与した場合の聴器毒性に対する効果を ABR と SEM にて観察した。

また BSN 投与、無投与による腎の障害を光学顕微鏡標本を作製して観察した。

実験 3, ハムスターに BSN を投与した場合に肝、腎中で MT の誘導が認められるかどうか、Cd-hem 法を使って検討した。

#### 〔実験 1〕

実験動物は、生後 2 カ月から 5 カ月の 120~160 g のハムスターと、体重 4~12 kg のニホンザルを用いた。

投与薬剤は、ランダ® (cis-diamminedichloroplatinum: CDDP, 日本化薬) を使用した。

投与方法 (Table 1) は、ハムスター 40 匹を 10 匹ずつ 4 群に分け、コントロール群は生食 2 ml を腹腔内注射 (ip) し、残りの 3 群は各々 8 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg の CDDP を原液のまま ip した。ニホンザルは、4 頭に CDDP を各々 5 mg/kg, 5 mg/kg×2, 8 mg/kg, 8 mg/kg×2 を生食とともに 1 時間で点滴静注した。また、CDDP を投与した際に 40~50 ml/kg の生食を輸液した。8 mg/kg もしく

は 8 mg/kg×2 の群では、投与後 7 日間連日、30~40 ml/kg の輸液を行った。2 回投与した群では、1 回目と 2 回目投与の間に休薬期間を 3 週間もうけた。毒性の観察は、ABR と SEM にて行った。

ABR は、ハムスターで、CDDP の投与前と投与後 7 日目に行い、ニホンザルは、1 回投与群が、投与前と 7 日目、2 回投与群が、投与前と最終投与の 3 週間後まで毎週施行した。

ABR の測定方法は Table 2 に示すとおりソムノペンチル® (pentobarbital sodium) をハムスターに 30 mg/kg ip し、ニホンザルは 10 mg/kg を筋注した。電極をハムスターでは、関電極が測定耳後部、不関電極が頭頂部、接地電極が鼻尖部、ニホンザルでは、関電極を測定側乳突部、不関電極を前頭部、接地電極を対側乳突部におき、皮膚切開を加え銅線電極を皮下へ刺入した。音刺激は、音刺激装置 (DA-502A, Dana Japan) より 4 KHz のクリック音を、100 msec の間隔で、tube stimulator (DA-5D, Dana Japan) から特製チューブを介して

Table 1. The table of the investigation of CDDP's ototoxicity using golden hamsters and Japanese monkeys

実験方法 (実験 1)			
投与薬剤: ランダ® (cis-diamminedichloroplatinum, CDDP)			
ゴールデンハムスター			
コントロール群	: 10 匹	生食	2 ml
A 群	: 10 匹	CDDP	8 mg/kg
B 群	: 10 匹	CDDP	10 mg/kg
C 群	: 10 匹	CDDP	12 mg/kg
すべての群で上記量を腹腔内へ 1 回注射			
ニホンザル			
No. 1	CDDP	5 mg/kg	
No. 2	CDDP	5 mg/kg×2	(3 週間の休薬期間をあけた)
No. 3	CDDP	8 mg/kg	
No. 4	CDDP	8 mg/kg×2	(3 週間の休薬期間をあけた)
すべての群で上記量を 1 時間点滴静注した。			
投与時 40~50 ml/kg の生食を輸液した。			
No. 3・4 は投与後 7 日間連日、生食 30~40 ml/kg の輸液を行った。			
聴力測定: 聴性脳幹反応 (ABR)			
形態観察: 走査電子顕微鏡 (SEM)			

行った。音圧は、105 dBSL (ダイヤル目盛り) より 10 dBSL step で下降させ閾値付近は 5 dBSL ずつ変化させて刺激した。測定は、生体用増幅器 (DA-55, Dana Japan) で増幅, filter は、30~3,000 Hz に設定し、データ処理装置 (ATAC-350, 日本光電) にて 500 回加算し、X-Y レコーダーで記録、後に閾値および潜時を求めた。

形態的観察は、SEM にて行った (Table 3)。ハムスターは、エーテル麻酔後に断頭し側頭骨を摘出、正円窓より 1.5% グルタルアルデヒド、0.5% パラホルムアルデヒドで灌流、ニホンザルは 30 mg/kg のソムノベンチル® 麻酔下に開胸し、大動脈起始部よりまず生食を灌流、右心房から瀉血して血液の薄くなったところで、1.5% グルタルアルデヒド、0.5% パラホルムアルデヒドを灌流、固定した後、側頭骨を摘出、再び 1.5% グルタルアルデヒド、

**Table 2.** The process of auditory brain-stem response in golden hamsters and Japanese monkeys

聴性脳幹反応 (ABR) の測定法									
麻酔法: ソムノベンチル® (pentobarbital sodium) を生食にて 10 倍希釈し、ハムスターでは 30 mg/kg を腹腔内投与、ニホンザルでは 10 mg/kg を原液で筋注した									
電 極: 銅線電極	<table border="0"> <tr> <td>ハムスター</td> <td>ニホンザル</td> </tr> <tr> <td>関電極 耳後部(測定耳)</td> <td>測定側乳突部</td> </tr> <tr> <td>不関電極 頭頂部</td> <td>前頭部</td> </tr> <tr> <td>接地電極 鼻尖部</td> <td>対側乳突部</td> </tr> </table>	ハムスター	ニホンザル	関電極 耳後部(測定耳)	測定側乳突部	不関電極 頭頂部	前頭部	接地電極 鼻尖部	対側乳突部
ハムスター	ニホンザル								
関電極 耳後部(測定耳)	測定側乳突部								
不関電極 頭頂部	前頭部								
接地電極 鼻尖部	対側乳突部								
刺 激: 4,000 Hz クリック音を 105 dBSL より 10 dBSL ステップで下降、閾値付近は 5 dBSL ステップで刺激、刺激装置 DA-502A より tube stimulator を介し特製 tube を外耳道に挿入									
記 録: 生体用増幅器 DA-55 で増幅後、ATAC-350 にて 500 回加算し、X-Y レコーダーにて記録									
ゴールデンハムスター: 投与前と投与後 1 週目の 2 回測定									
ニホンザル: No. 1・3 は投与前と投与後 1 週目の 2 回測定 No. 2・4 は投与前から 2 回投与後 3 週目まで 1 週ごとに 7 回測定									

0.5% パラホルムアルデヒドで正円窓より灌流した。後固定以後は、ハムスター、ニホンザルともに同じで 2% オスミウム酸溶液にて後固定を 90 分に行い、上昇エタノール系列で脱水、酢酸イソアミルに置換し臨界点乾燥を行った。その後骨壁を除去しコルチ器を露出、Au-Pd の蒸着ののち、SEM (HITACHI, S-570) にて観察、全回転を写真撮影した。

観察の中心はコルチ器の表面構造で、感覚毛の消失をもって感覚細胞の障害とし、ハムスターでは血管条、蓋膜、ライスネル膜も観察した。

撮影した写真を基に、蝸牛頂部より 1 mm ごとに外有毛細胞を数え cytocochleogram を作製した。

#### [実験 2]

ハムスターに CDDP を投与した際の聴器毒性が、MT を誘導する BSN の投与を行うことにより軽減されるかどうか検討した。

実験方法: CDDP を 1 回大量投与したものは、100~120g のハムスター 25 匹を 5 匹ずつ 5 群に分けて行った。5 群の内訳は、BSN のみを投与したもの、CDDP のみを 10 mg/kg もしくは 12 mg/kg 投与したもの、BSN を前投与した後に CDDP を 10 mg/kg もしくは 12 mg/kg

**Table 3.** Making process of the specimen for SEM

形態的観察	
ゴールデンハムスター	
1.	エーテル麻酔下に断頭し側頭骨を摘出
2.	正円窓より 1.5% グルタルアルデヒド-0.5% パラホルムアルデヒド混合液にて灌流(第一固定)
3.	2% オスミウム酸溶液にて第二固定
4.	上昇エタノール系列にて脱水後、臨界点乾燥
5.	Au-Pd 蒸着後走査電子顕微鏡 (HITACHI, S-570) にて観察
ニホンザル	
1.	ソムノベンチル® 30 mg/kg 投与下に開胸し、大動脈起始部より生食を灌流後、1.5% グルタルアルデヒド-0.5% パラホルムアルデヒド混合液を注入し、全身灌流固定を行った後に側頭骨を摘出
2.	その後はゴールデンハムスターに準ずる

投与したものである (Table 4).

投与薬剤は、CDDP と BSN (bismuth subnitrate, 保栄薬工) を使用した。

BSN は 50 mg/kg を生食 1 ml に混合、懸濁液として胃ゾンデを使用して 1 日 1 回、5 日間投与した。CDDP は第 1 日目か、BSN 投与後の第 6 日目に規定量を ip した。

CDDP を分割投与したものである、CDDP のみを投与した群と BSN の前投与、および BSN と CDDP の並行投与した群の 2 群でハムスターを各 10 匹ずつ使用した。

CDDP は両群ともに 1 回 3 mg/kg/day を 5 日間、計 15 mg/kg 投与した。BSN は 50 mg/kg/day を CDDP の投与前 5 日間と投与中 5 日間の計 10 回ゾンデを使用して経口投与した。

障害の判定は、実験 1 と同様に ABR, SEM にて行った。

**Table 4.** The No. 2 study's process. The investigation of the reducing method with BSN.

実験方法 (実験 2)

実験動物：ゴールデンハムスター

投与薬剤：ランダ® (cis-diamminedichloroplatinum (CDDP))

次硝酸ビスマス (bismuth subnitrate (BSN))

1 回投与群：

	BSN (50 mg/kg)	CDDP
A 群：5 匹	(+)	(-)
B 群：5 匹	(-)	10 mg/kg
C 群：5 匹	(-)	12 mg/kg
D 群：5 匹	(+)	10 mg/kg
E 群：5 匹	(+)	12 mg/kg

分割投与群：

BSN(-)群：10匹	(-)	3 mg/kg × 5
BSN(+)群：10匹	(+)	3 mg/kg × 5

BSN 50 mg/kg を生食 1 ml に混合、懸濁液として、ゾンデを使用し 1 日 1 回 5 日間投与した。分割投与のものではさらに 5 日間 CDDP と並行投与した。CDDP は 6 日目に原液を規定量だけ、腹腔内へ 1 回投与した。分割投与では、3 mg/kg/day の CDDP を 6~10 日目まで投与した。

聴力測定：聴性脳幹反応 (ABR)

形態観察：走査電子顕微鏡 (SEM)

腎障害の観察は、断頭蝸牛を摘出した際に開腹し腎も摘出し、10% ホルマリン溶液で固定、パラフィン包埋したのち切片を作製し、H-E 染色を施した。

[実験 3]

重金属の毒性を軽減するといわれている MT が、BSN の投与によりハムスターの体内で誘導されるかどうか検討した。

ハムスターに BSN 50 mg/kg/day を 5 日間ゾンデを使用して投与し、最終投与の 24 時間後エーテル麻酔下に断頭、肝、腎を摘出し測定した。ハムスターは無投与群、投与群各 10 匹、計 20 匹を使用した。

測定方法：Cd-hem 法で行った (Table 5)。

まず摘出した肝、腎に 5 倍量の 0.25 M ショ糖溶液を加えてホモゲナイズし、このホモジ

**Table 5.** The process of Cd-hem method. Metallothionein is determined indirectly as the Cd value.

Metallothionein 測定

方法：Cd-hem 法 (簡易定量法)

1. 測定臓器に 5 倍量の 0.25M ショ糖を加える
2. ホモゲナイズ
3. 15,000 rpm, 20 分間, 4°C にて遠心分離
4. 上清を得る
5. 上清に 30mM Tris-HCl Buffer (pH 8.0) を加える
6. CdCl<sub>2</sub> (10μg/ml) を加える
7. 5 分間室温で放置後
8. Hemolysate を加え、100°C, 1 分間加熱
9. 1,000 rpm, 5 分間遠心分離
10. 8, 9 を 3 回繰り返す
11. 上清を得る
12. 原子吸光法にて Cd 量を測定

Hemolysate 作製

1. モルモット血液 7 ml + 1.14% KCl ヘパリン液 3 ml
2. 3,000 rpm, 10 分間遠心分離
3. 沈殿を 10 ml の 1.14% KCl ヘパリン溶液にて洗浄
4. 3,000 rpm, 5 分間遠心分離
5. 3, 4 を 3 回繰り返す
6. 沈殿に Tris-HCl Buffer を 7 ml 加え溶血
7. 3,000 rpm, 5 分間遠心分離
8. 上清を得、5 倍量の Tris-HCl Buffer (pH 8.0) を加える
9. 使用前に Tris-HCl Buffer にて希釈

ネットを 15,000 rpm 4°C で 20 分間高速遠心分離して上清を得た。上清に 0.03M Tris-HCl Buffer (pH 8.0) を加えた後、MT に結合している金属を Cd に置換するために 10 µg/ml の Cd 溶液を添加、MT に結合していない遊離の Cd の除去を行う目的でヘモリセート処理を加えた。ヘモリセート処理とは、モルモット血液より得られた洗浄赤血球を Tris-HCl Buffer で溶血させて作製したヘモリセートを、Cd の添加された上清に加え熱処理を行い 1,000 rpm で 5 分間遠心分離することである。ヘモリセート処理にて得られた上清中の Cd 量を PERKIN ERMER 503 の原子吸光光度計 (フレーム法) を用いて測定した。

以上により得られた Cd 量は、MT に結合しているものだけと考えられ、この値の増加によって MT の誘導が行われたとみなした。

結 果

〔実験 1〕

まず、~~マ~~ムスターを使用した聴器毒性の観察では、聴力検査として行った ABR の閾値 (Table 6) は、CDDP の投与前後においてコントロール群と 8 mg/kg 群に閾値の上昇が認められなかったが、10 mg/kg、12 mg/kg 両群の投与後の閾値は前値に比較して有意に上昇していた。

ABR 潜時を I-L 曲線 (縦軸に潜時、横軸に音圧) (Fig. 1) に表すと、12 mg/kg 群において閾値付近で潜時が延長する感音性難聴

のパターンを呈していたが、残りの 3 群では有意な潜時の延長は認められなかった。

次に SEM による形態的観察を行った。

Table 6. The ABR threshold before injection and after injection of CDDP

	投与前 dBSL (mean±SD)	投与後 dBSL (mean±SD)
コントロール群	48.0±5.9	46.5±11.3
A 群 (8 mg/kg)	46.0±8.1	48.0± 6.0
B 群 (10 mg/kg)	47.5±6.7	*56.4± 6.9
C 群 (12 mg/kg)	47.5±5.4	**56.4± 6.9

\* p<0.05 \*\* p<0.01

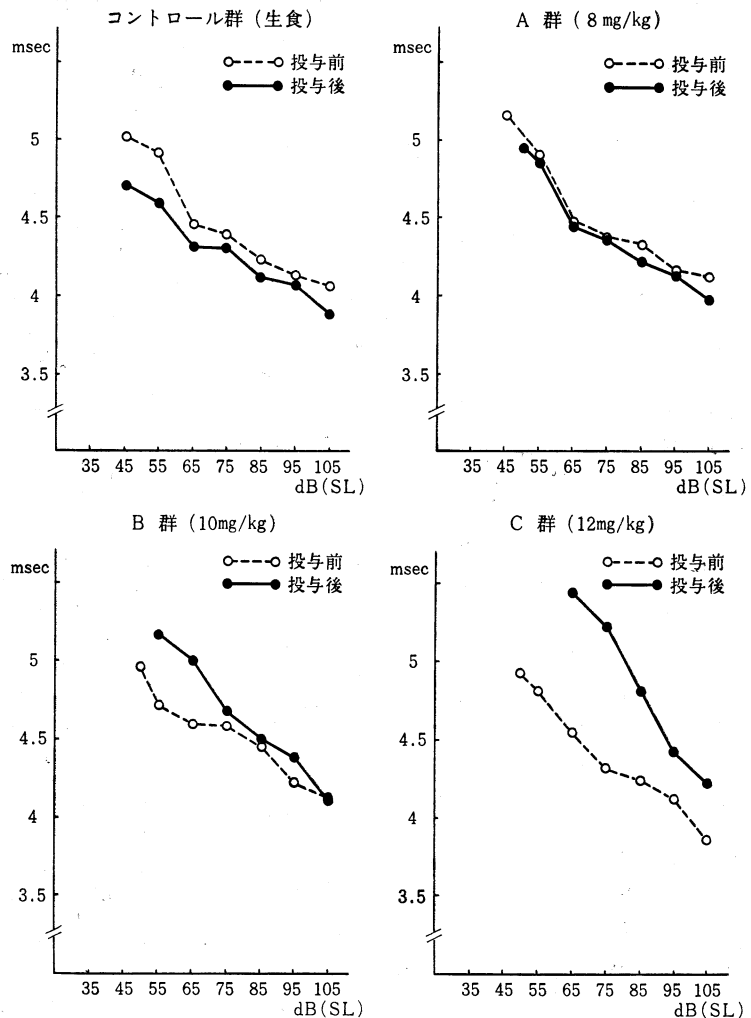


Fig. 1. The latency of ABR in golden hamsters given CDDP. In the C-group given 12 mg/kg, the latency was prolonged.

まずコルチ器の表面構造の観察では、コントロール群に障害を思わせるような所見はみられなかったが、8 mg/kg 群, 10 mg/kg 群, 12 mg/kg 群と投与量が増加するに従い外有毛細胞の障害が強くなり、12 mg/kg 群において、基底回転最下方の障害は100%近い値を示していた。

その障害の様式は、散在性であり基底回転に強く、投与量が多いものほど激しく障害されていた。

内有毛細胞については、4群とも基底回転ま

で観察することができ、障害を示すような所見は認められなかった (Fig. 2)。

cytococheleogram は内有毛細胞の障害が認められなかったことより外有毛細胞のみの状態をSEMの写真を基に作製した (Fig. 3)。

コントロール群は、ほぼ100%の残存率であった。8 mg/kg 群も比較的に外有毛細胞が残存していたが、散在性の障害を思わせるグラフとなっていた。10 mg/kg 群においては蝸牛頂部より2mmを過ぎると、急速に残存率が低下し、最下方では残存率が20%を割っていた。

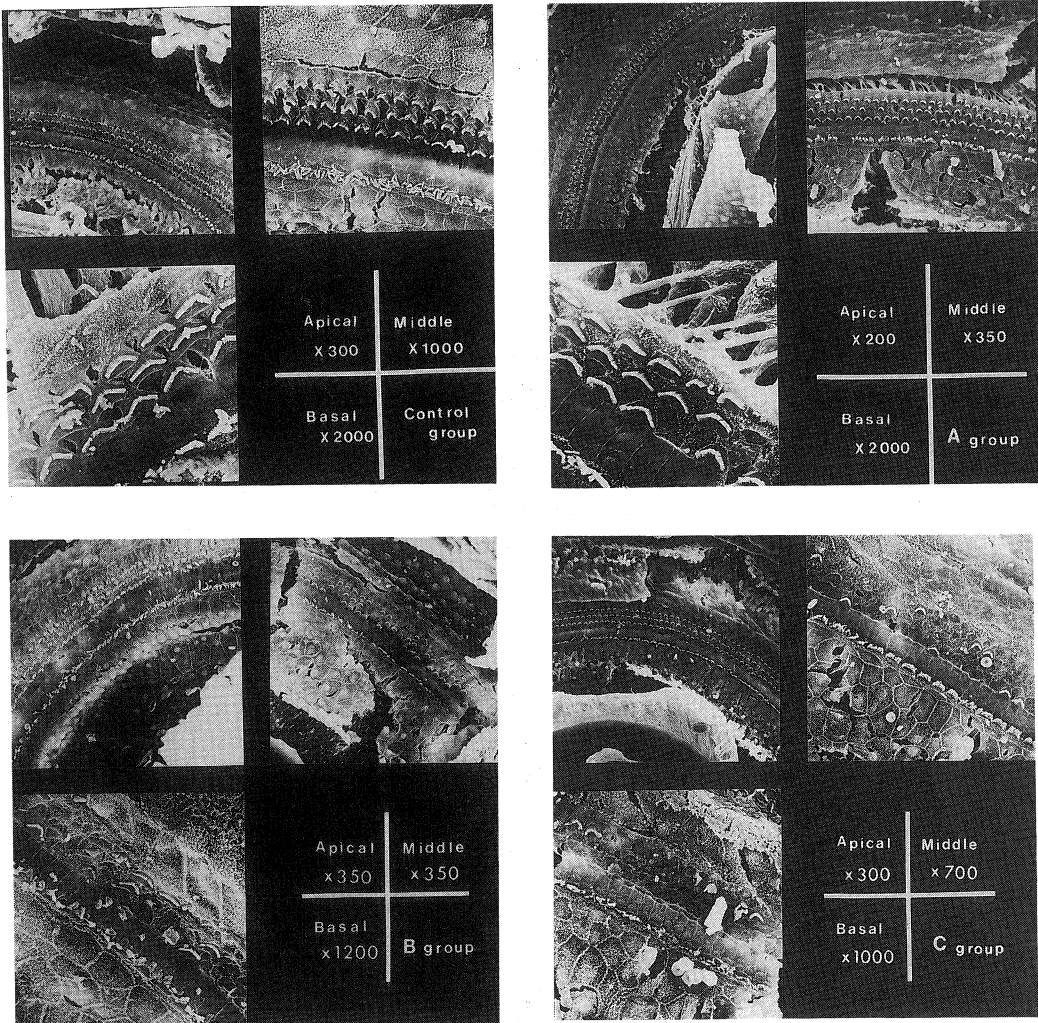


Fig. 2. The observation of the corti organs with SEM in golden hamsters given CDDP. The damage of the outer hair cells was sporadic, and most severe damage in basal turn. Morphological damage was not observed in the inner hair cells.

12 mg/kg 群になると更に障害は強くなり、7 mm あたりでは100%に迫る外有毛細胞の消失が認められた。

外有毛細胞の障害は、3例とも同様にみられ、列間差を認めなかった。

血管条、ライスネル膜、蓋膜のSEMによる観察では(Fig. 4)、すべての群において障害を思わせるような所見は認められなかったが、CDDP投与群の中に一部、血管条辺縁細胞の膨隆を疑わせる像もあった。しかし著明な変化とは言い難く有意な所見ではなかった。

ニホンザルでの聴器毒性の観察実験は次のごとくであった。5 mg/kgを1回または2回投与した群では、ABR 閾値に変化は認められなかった。8 mg/kg 1回投与群は7日後に20 dBの閾値上昇があり、2回投与したものでは、初回投与の1週後に15 dBの上昇を認めたにもかかわらず3週目には前値まで回復し、2回目の投与で再び閾値の上昇を来していた。しかし、最終(6週後)ABRでの閾値の回復は、初回投与後のときよりも軽度であった(Fig. 5)。

ABRの潜時は、各群1頭ずつと例数が少ないため一定の傾向は見い出せなかった。

SEMによる観察では(Fig. 6)、5 mg/kg、8 mg/kgの1回投与群に外有毛細胞の障害はほとんど認められず、2回投与した群に障害が出現していた。障害は、ハムスターと同様に散在性で基底回転に外有毛細胞

の消失が多く認められる状態であった。

cytococheleogram (Fig. 7)も基底回転に障害が強いことを示しており、投与量の多いものの方が残存率の低下が著明であった。

[実験2]

大量1回投与したCDDPの聴器毒性が、BSNにより軽減されるかどうかを行った実験において、ABR 閾値 (Table 7)は、CDDPを投与したものでBSNの投与の有無にかかわらず有意な閾値の上昇を認めた。BSNのみを投与した群には聴力の低下はなかった。潜時

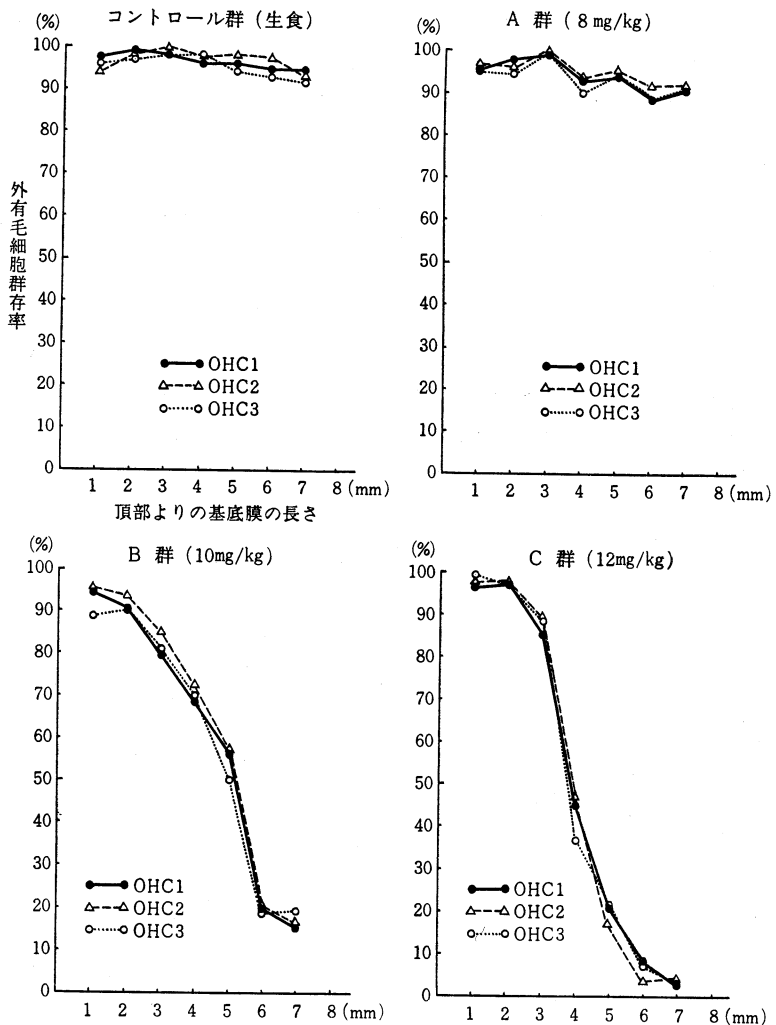
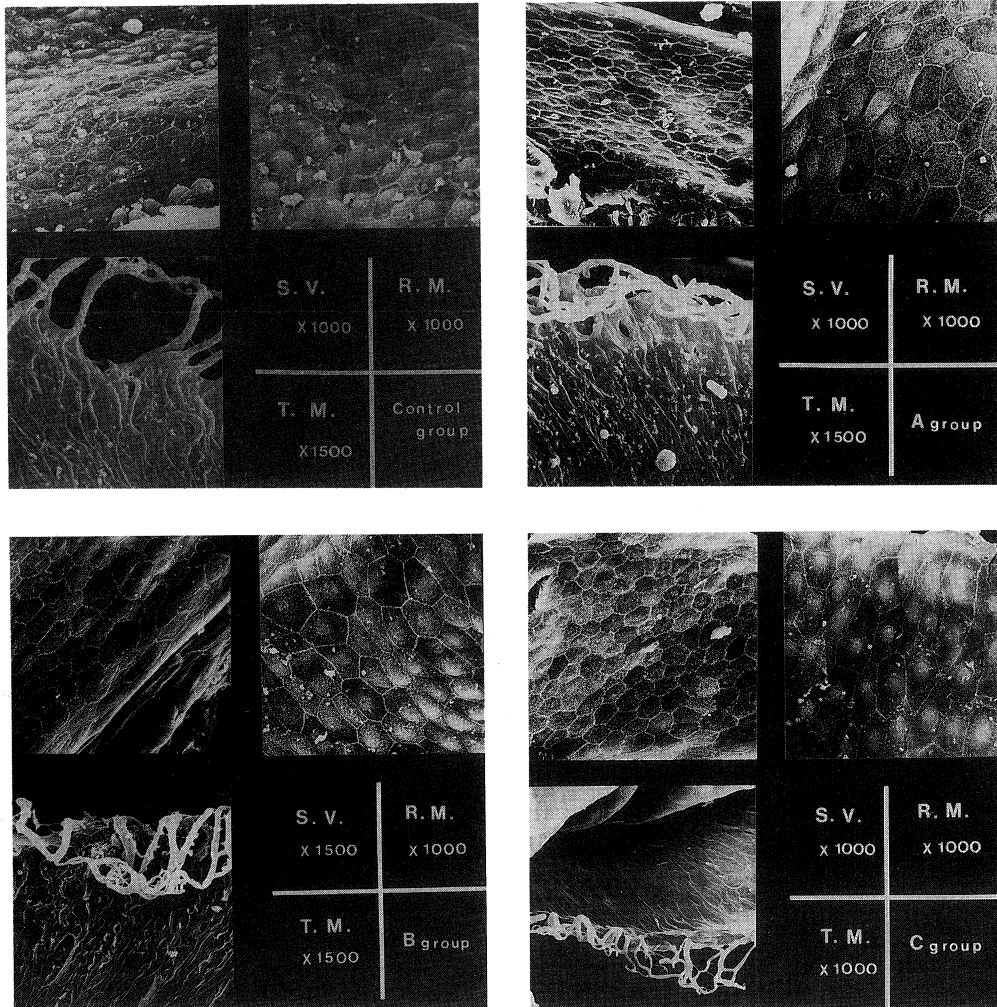
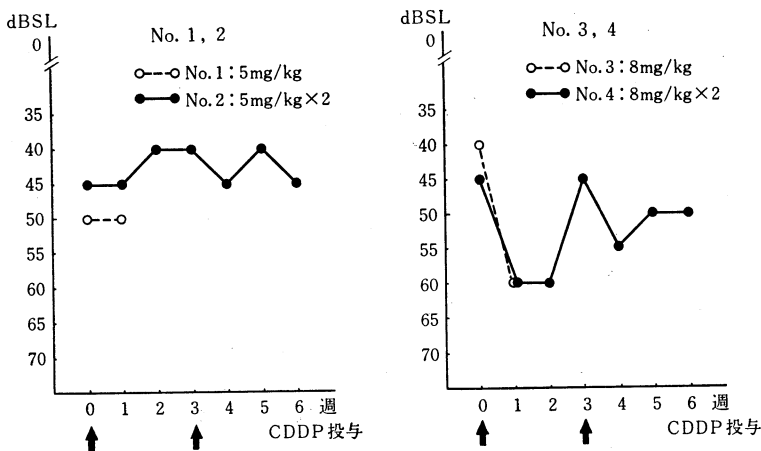


Fig. 3. Representative cytochleograms of the golden hamsters given CDDP. The outer hair cells remaining was lower in the basal turn in B and C-group.

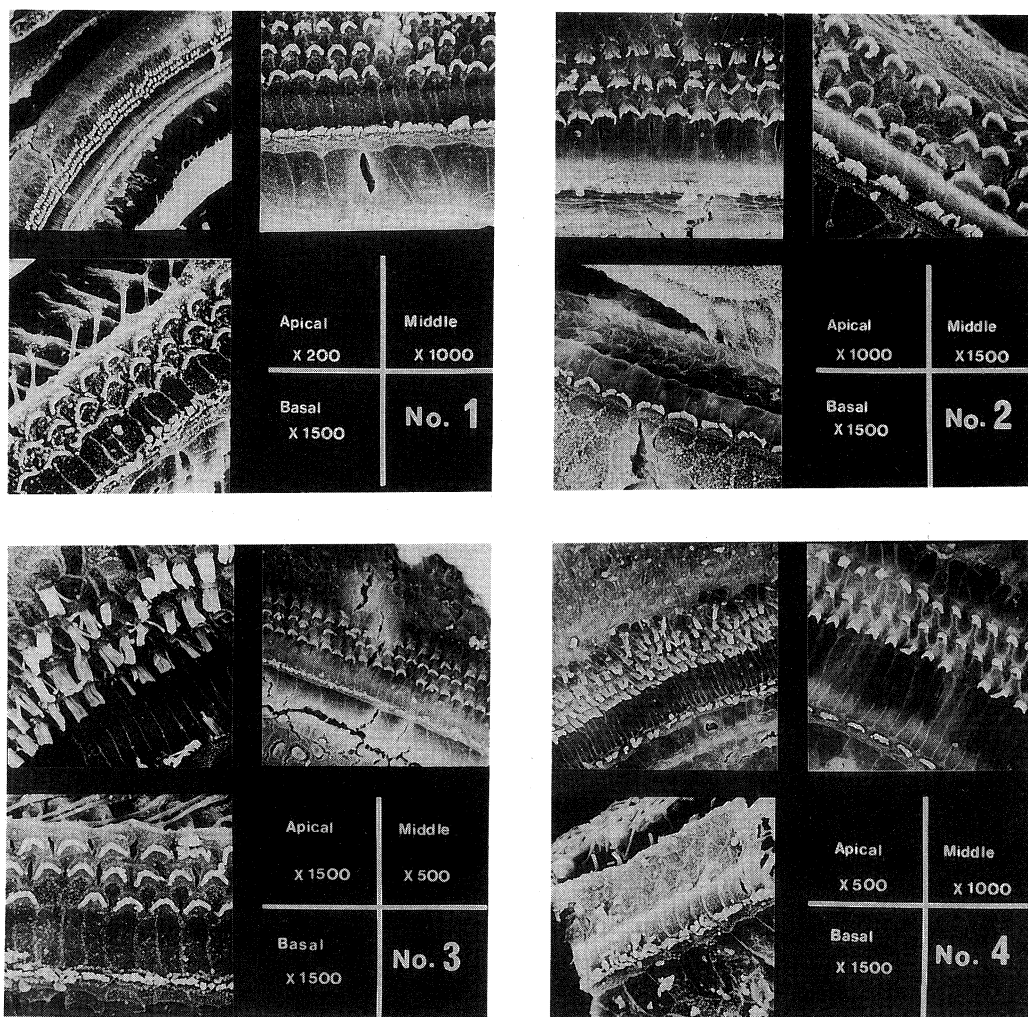




**Fig. 4.** The observation of S. V., R. M. and T. M. with SEM. Damage was not observed in these parts. S. V.: stria vascularis R. M.: Reissner's membrane T. M.: tectorial membrane



**Fig. 5.** Representative audiograms in Japanese monkeys with ABR. In No. 4 group, a rise in threshold was observed transiently.



**Fig. 6.** The observation of the corti organs in Japanese monkeys with SEM after injection of CDDP. The groups given CDDP for twice had the severe damage in basal turn.

(**Fig. 8**) については、CDDP のみを 12 mg/kg 投与した群に潜時の延長が認められただけで、他の群においてその傾向はなかった。

形態的には、BSN 単独投与群に障害を認めないだけで、他の CDDP を投与した 4 群には、散在性で基底回転に障害の強いパターンを呈していた (**Fig. 9**)。cytococholeogram (**Fig. 10**) に表すと、BSN 投与群と無投与群の間に軽度ではあるが外有毛細胞残存率に差を認めた。それは蝸牛頂部より 3 mm~4 mm 付近の外有毛細胞であり、基底回転最下方の状態は BSN

の投与の有無にかかわらず高度の障害を示していた。

CDDP を分割投与した実験は、CDDP 単独投与群で、投与後 6 日目までに 10 匹中 4 匹が死亡したため、BSN 無投与群 6 匹、投与群 10 匹のデータで検討した。

BSN 投与の有無にかかわらず ABR 閾値に差が認められず、両群に約 15 dB の閾値の上昇が起こった。SEM での観察 (**Fig. 11**) においては、外有毛細胞の消失が BSN 投与群で軽減されていた。

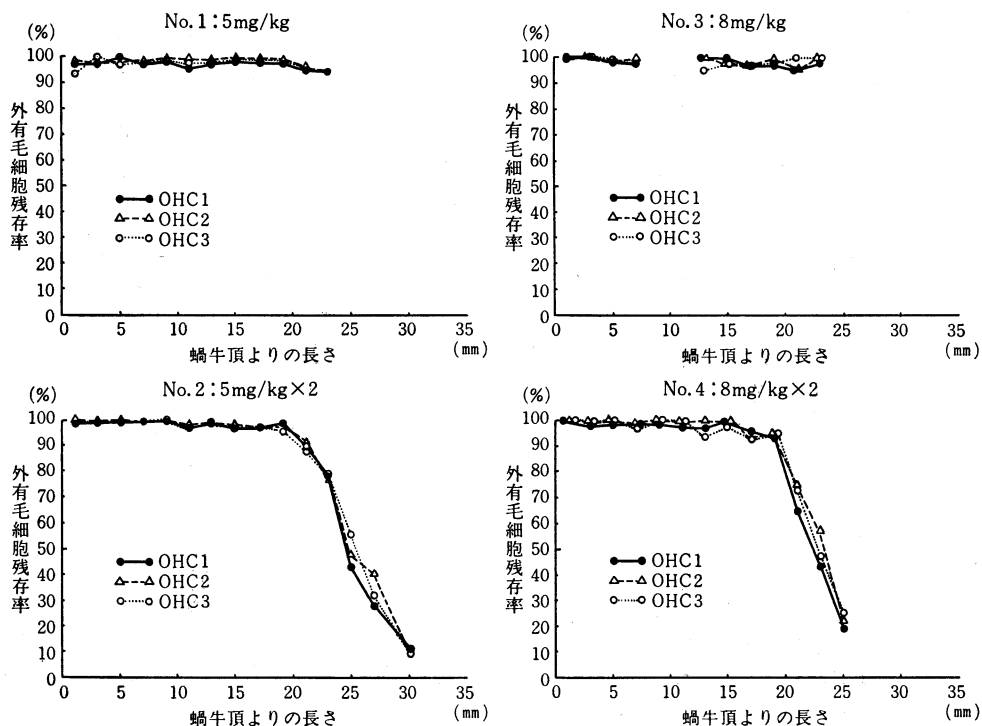


Fig. 7. Representative cytochleograms in Japanese monkeys. The groups given CDDP one time did not have the damage, but the groups given two times had the severe damage in basal turn.

Table 7. The ABR threshold before injection and after injection of CDDP with BSN or without BSN

群	BSN (50mg/kg)	CDDP (mg/kg)	前 dBSL (mean±SD)	後 dBSL (mean±SD)	有意差 p<0.05
A	(+)	(-)	37±2.74	40 ± 3.54	(-)
B	(-)	10	41±2.5	55 ± 9.13	(+)
C	(-)	12	44±4.18	52.5± 5.0	(+)
D	(+)	10	39±4.18	49 ±10.25	(+)
E	(+)	12	43±5.7	55 ±12.75	(+)

cytochleogram に表すと更に明確となった。蝸牛頂部から2mmを過ぎる付近よりその差がはっきりしたものとなり、多いところでは30~40%もの違いが認められた (Fig. 12).

腎の障害もBSN投与群においては軽度であったが、無投与群は、尿細管上皮の脱落、空胞形成等が認められ、高度の障害を示していた (Fig. 13).

〔実験3〕

Cd-hem 法によって測定した組織1g 当たりに含まれるCd量は、BSNを投与することにより有意に上昇していた (Table. 8).

肝でのBSN無投与時の値が、2.88±1.23 μg (mean±SD), 投与後が7.20±2.20 μgであった。腎は、無投与4.13±0.34 μg, 投与後8.49±3.40 μgであった。

考 察

CDDP は、1967年 Rosenberg ら<sup>13)</sup> によって見出された白金化合物である。悪性腫瘍に対する効果がすばらしく、泌尿器科領域で抗腫瘍効果が確認されて以来、すべての診療科において第一選択の抗癌剤として用いられている。しかし、その副作用は多彩で、重度の腎障害をはじめ、胃腸障害、骨髄抑制、聴器毒性<sup>15)</sup>

等が知られている。聴器毒性は、はじめ臨床において、耳鳴、耳閉感、難聴等の蝸牛症状を訴える患者がいることから動物実験による研究が行われた。実験動物は、モルモット、ラット<sup>2), 4)~6), 16), 17)</sup>等を用いた実験が多くみられ、少数ではあるがサル<sup>1), 3)</sup>を使用した論文も発表されている。これまでの報告では、

外有毛細胞を中心とした障害で、血管条への障害は軽微であるとの報告<sup>4), 6)</sup>や、障害は外有毛細胞、血管条ともにある<sup>18), 19)</sup>また、基底回転では内有毛細胞にも消失があり、外有毛細胞の消失だけではなかったとも報告<sup>5)</sup>されていて、外有毛細胞の障害については共通であるものの、他の部位については多少の違いが認められた。そこで、

著者は、ゴールデンハムスターとニホンザルを用いてCDDPの聴器毒性を観察した。結果は、過去の報告にみられたように、ハムスターやニホンザルにおいて

も、外有毛細胞を中心としたものであった。その障害様式は、散在性で、下方回転に強く、投与量、投与回数の増加によって激しくなっていた。内有毛細胞には障害が認められず、基底回転の最下方まで観察することができた。これは、Stadnicki<sup>3)</sup>やTange<sup>5)</sup>の報告した所見と異なっており、ハムスターとモルモットの内有毛細胞の易障性の違いも考えられたが、モルモットでも内有毛細胞の障害はないかまたは軽微との報告<sup>1), 6), 17), 20)</sup>があることから考えると、

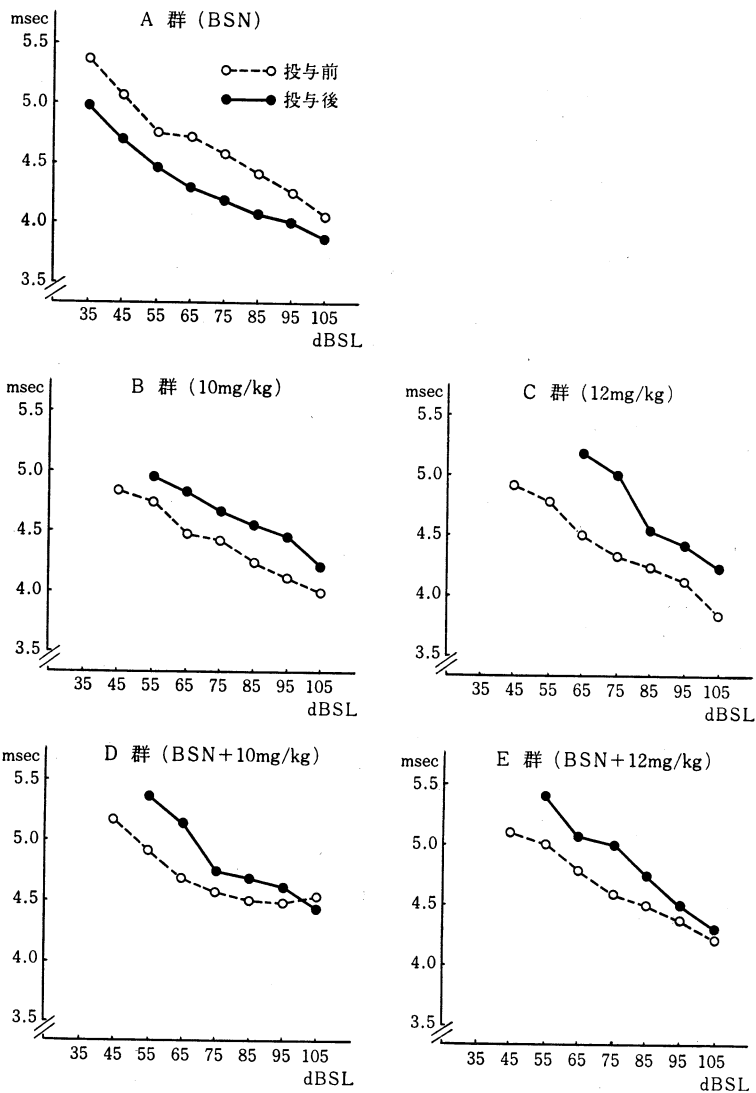


Fig. 8. Representative intensity-latency curve. In the C-group, the latency was prolonged.

CDDPは内有毛細胞にはあまり影響を及ぼさないと結論づけたほうが良いと思われた。このことは、アミノ配糖体の聴器障害と大きく異なる特徴であった。

蓋膜、ライスネル膜はSEMによる今回の観察において、全く障害を認めなかった。

血管条では、CDDP投与群で軽度の辺縁細胞の隆起がみられたものの有意な変化とは認め難く、障害は軽微であり、村上<sup>4)</sup>やNakai<sup>6)</sup>が報告しているのと同様であった。しかし、

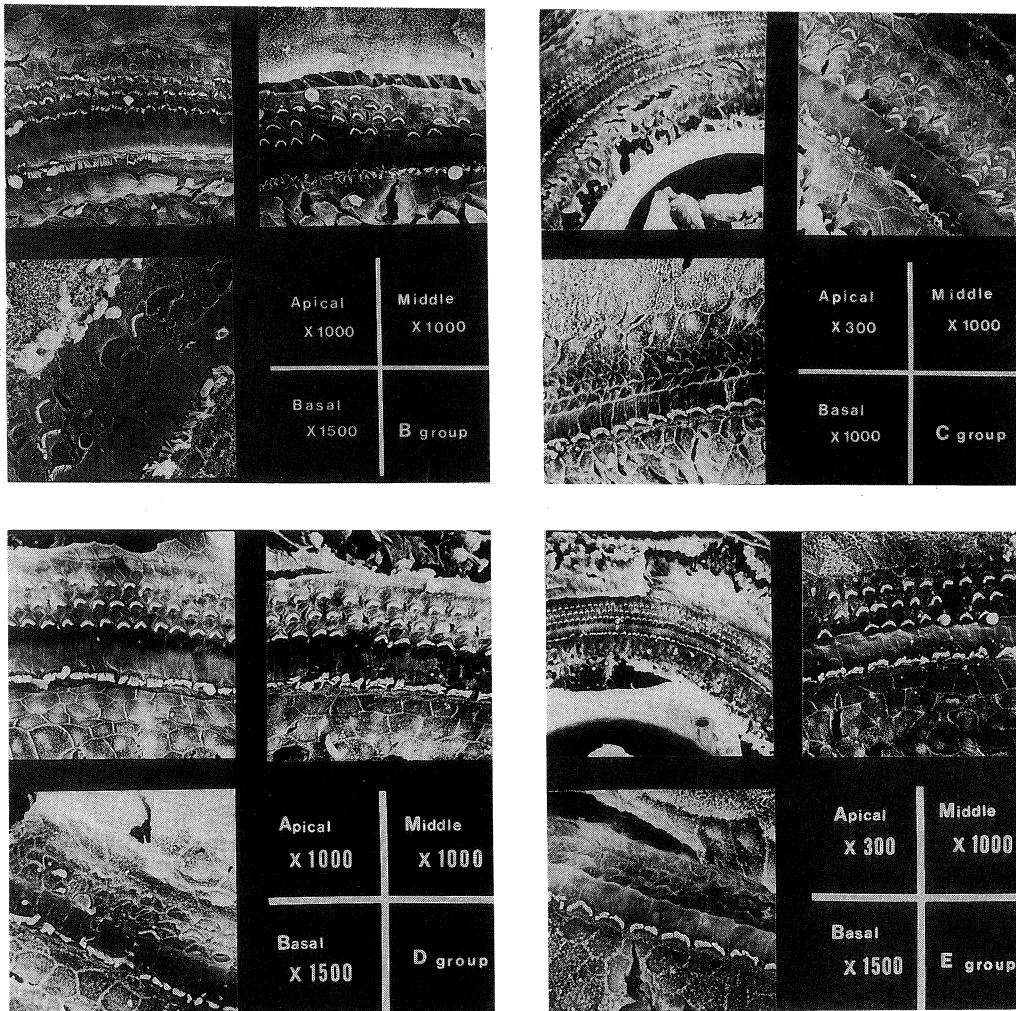
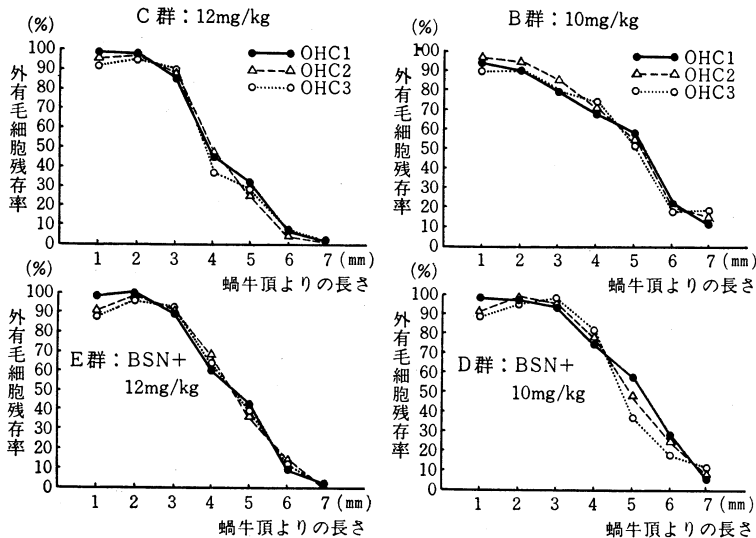


Fig. 9. The observation of corti organs with SEM. The clear difference between the groups given CDDP with BSN and the groups given CDDP without BSN was not observed.

鳥谷ら<sup>19)</sup>が述べているように CDDP を投与することにより内リンパの虚脱が認められたり、聴力低下に比べ外有毛細胞の障害が軽度であったり、ABR で一過性の聴力低下が観察されたりしている。<sup>3), 16)</sup> 今回ニホンザルを用いて投与後の ABR を経時的に記録した結果では、やはり一時的な聴力の低下がみられ、血管系にも影響があると考えられた。一過性の聴力低下も他の薬物には認められない CDDP の障害の特徴である。<sup>3), 18)</sup>

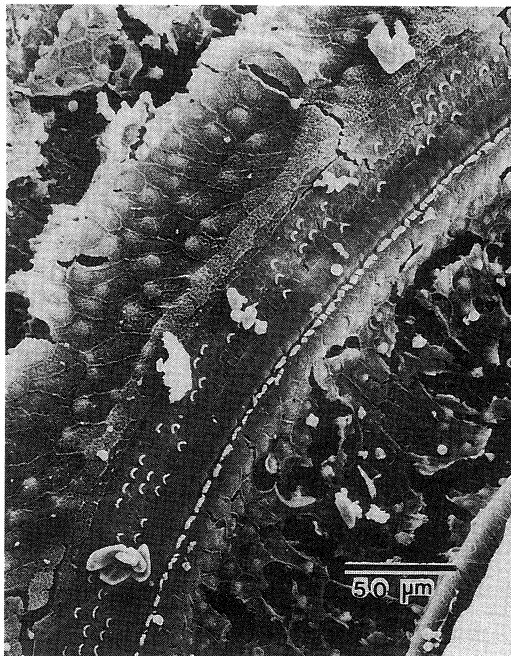
CDDP の毒性を、どのように防ぐか 幾つか

の報告がなされている。腎毒性では、李ら<sup>21)</sup>の sodium thiosulfate (STS) や、井村<sup>22)</sup>や Berry ら<sup>23)</sup>の亜セレン酸、Hygby ら<sup>24)</sup>の penicillamine が軽減作用を有し、大谷ら<sup>25)</sup>や、Schweitzer<sup>26)</sup>は抗生物質である fosfomycin (FOM) が障害を軽減すると報告している。聴器毒性については、大谷ら<sup>27)</sup>や、安齋<sup>28)</sup>により FOM の投与が、外有毛細胞の消失を軽減させたと報告している。penicillamine や STS は解毒剤であり、CDDP と同時に同経路より投与した場合に、その抗腫瘍効果を減弱する

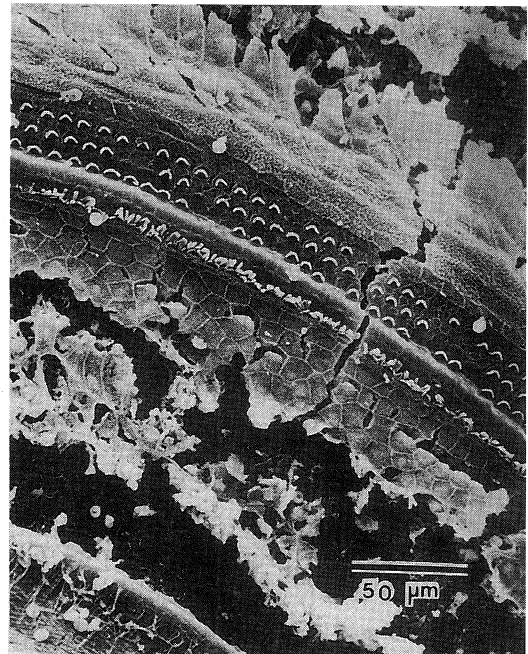


**Fig. 10.** Representative cytochrome c histograms. The rate of the outer hair cells remaining was higher in the groups BSN than in the groups ungiven BSN at the place of 3~4 mm from apex.

恐れがあり,<sup>29)</sup> STS では、2 経路注入方式化学療法として、動注と静注、<sup>30), 31)</sup> 腹腔内と静注<sup>32)</sup> など CDDP と STS を別経路から投与方法が行われている。FOM の作用は、腎尿管上皮のライソゾーム膜が安定化することでアミノ配糖体の腎障害が軽減すること<sup>33), 34)</sup> から、アミノ配糖体や CDDP の聴器毒性を軽減するといわれている。<sup>27), 28), 35)</sup> 抗腫瘍効果については大槻ら<sup>36)</sup> が担癌マウスを用いて検討しており、CDDP の効果に悪影響を及ぼすことはなかったと報告している。

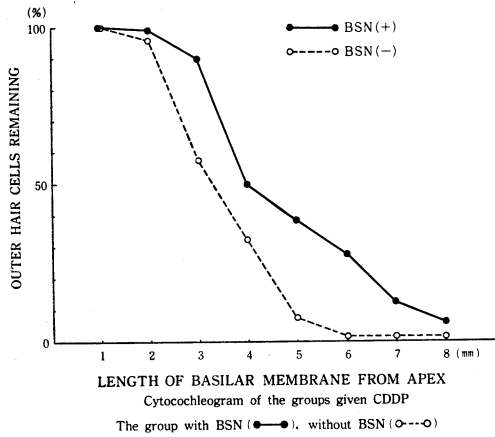


CDDP 3 mg/kg×5, BSN (-)



CDDP 3 mg/kg×5, BSN (+)

**Fig. 11.** The observation of the corti organs with SEM (2.5 mm from apex). In the group given BSN, the outer hair cells high remaining was observed.



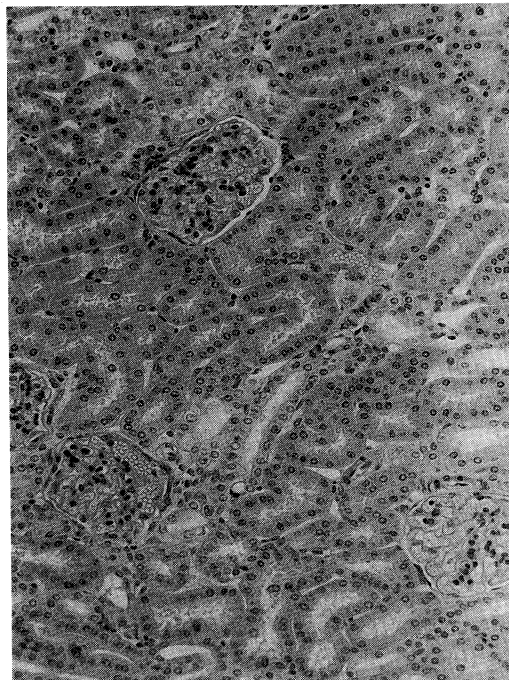
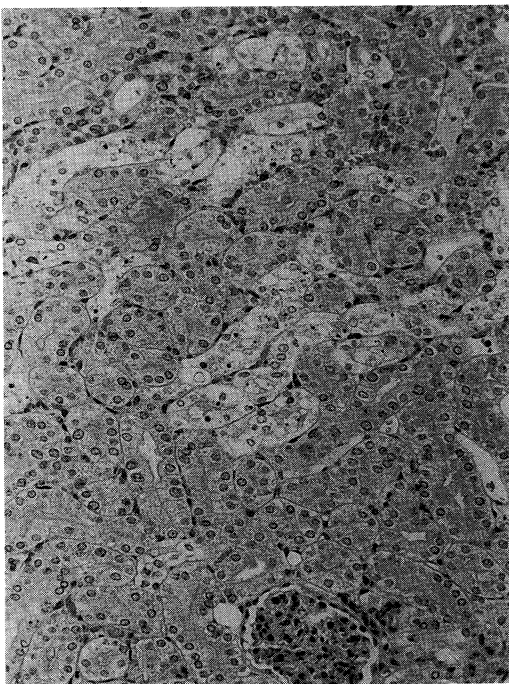
**Fig. 12.** Representative cytochleogram. The clear difference between the group given BSN and the ungiven group was observed at the place 2~7 mm from apex.

CDDP は重金属の白金を中心に持つ薬剤で、腎障害などは他の重金属と同様であるとも報告されている。<sup>7),15)</sup> そこで重金属の毒性を防ぐ metallothionein; MT が CDDP の毒性を減少させるのではないかと考えられた。

MT は分子量が約 6,000 の低分子蛋白質で、細胞質内で合成されており、外来の有害金属が体内に侵入してくると生成は活発になり、増加した MT が有害金属と結合しそれによる毒性を軽減する。<sup>7),37),38)</sup> Bakka ら<sup>39)</sup> は MT を多く含む培養細胞が CDDP に対して抵抗性を持

**Table 8.** The Cd value in the liver and the kidneys with BSN or without BSN after determination by Cd-hem method

部位	組織 1 g 当たりの Cd 量 (mean ± SD)		有意差 (危険率 1%)
	BSN(-) μg/g	BSN(+) μg/g	
肝	2.88 ± 1.23	7.20 ± 2.20	あり n=10
腎	4.13 ± 0.34	8.49 ± 3.40	あり n=10



**Fig. 13.** The observation of the kidneys in golden hamsters given and ungiven BSN. In the group ungiven BSN, the damage (tubular necrosis) was observed, but in the given BSN, not observed (hematoxylin-eosin stain, ×250).

つと報告し、Naganumaら<sup>40)</sup>はマウスに少量の銅を投与しMTの誘導が行われた後にCDDPを投与することで、致死毒性が著明に減少し、また止瀉剤として用いられている次硝酸ビスマスを前投与することによってもやはり致死率が低下し、それは腎障害の軽減によるものであると述べた。<sup>82), 91), 41)</sup> 今回の実験でも、CDDP投与後の腎組織を光顕で観察した結果BSN投与群にはほとんど障害を認めず、無投与のものでは尿細管の激しい変性がみられた。CDDPの抗腫瘍効果は、BSNの投与により影響されないという永沼ら<sup>91), 42), 43)</sup>の報告から、臨床においても、陳ら<sup>44), 45)</sup>や、谷脇ら<sup>46)</sup>が悪性腫瘍の患者に使用して効果を挙げている。

以上のことなどより、BSNを投与することによって誘導されたMTが、CDDPの聴器毒性をも軽減するのかどうかを検討した。

ハムスターにCDDPを1回大量投与し、BSNの投与の有無による聴力の変動とコルチ器の観察を行った。ABRによる閾値の変化は、投与の有無にかかわらず10dB前後の閾値の上昇を認めたが、潜時ではCDDPのみ12mg/kg投与したもので、感音性難聴パターンがより明確であった。SEMでは、外有毛細胞を中心とするコルチ器の表面構造を観察したが、BSN投与による障害防止効果は軽度と思われた。cytococholeogramに表すと、BSN投与群の残存率が無投与群に比べて高い傾向が認められた。これらは、BSNの投与によってMTが誘導されてCDDPの毒性を減少させたものと考えられた。

しかしその軽減効果は予想よりも小さく、そこでCDDPを分割投与し、BSNも前投与に加え並行投与したところ、軽減効果は1回大量投与の際に比較して大であり、外有毛細胞残存率はBSNの投与の有無で、30~40%の差を認めた。このことは、小野坂ら<sup>38)</sup>が述べている、MTの重金属に対する防御作用にも限界が認められるということと同様であると考えられた。

すなわち、一度に大量のCDDPに曝された場

合、MTがCDDPを処理しきれず、しかも、MTは2~3日で消失する<sup>47)</sup>にもかかわらずCDDPの方は、緩やかに排出されるという性質があるため、CDDPを分割投与し、BSNの前投与および並行投与を行うと、MTの値はある程度で維持され、軽減効果の増強が認められたと考えた。

実際にハムスターの体内で、MTがBSNにより誘導されるかCd-hem法を用いて測定した。その結果は、肝、腎において無投与のものと比較して有意に上昇していた。この値は、永沼ら<sup>41), 42)</sup>やOnosakaら<sup>48)</sup>の報告と種差、測定法、投与経路が異なり一概には比較できないが、近い値をしめしていた。

この結果からも、CDDPの毒性がBSNを投与したことによって軽減されたという裏づけになった。しかし、聴器毒性がMTの直接作用により軽くなったのか、腎障害の軽減に伴い起こったことなのか、結論づけることには無理があり今後の検討が必要になると考えられた。

MTは、金属結合作用を有するだけでなく、それ自身がフリーラジカルを抑制するとの報告がある。<sup>42), 49)</sup>そして、プラチナイオンはフリーラジカルを活性化するといわれており、<sup>50)</sup>今回のCDDPの毒性軽減にMTの金属結合作用だけでなくsuperoxide dismutase様作用も関与している可能性が考えられた。

## ま と め

CDDPの聴器毒性は、ゴールデンハムスターにおいても過去の報告と同様であった。それは、外有毛細胞障害が中心で、散在性、下方回転に強くみられた。また、投与量、投回数に依存していた。内有毛細胞、蓋膜、ライスネル膜には障害を認めなかったが、血管条には影響があると考えられた。

CDDPの聴器毒性は、BSNの投与で誘導されるMTにより軽減された。しかし、MTが聴器に対して直接働きかけたか、腎毒性の軽減に伴って起きた現象か、断定できなかった。



稿を終るにあたり、ご指導ご校閲をいただきました川崎医科大学耳鼻咽喉科 折田洋造教授に深く感謝いたします。また実験にご協力くださった当教室研究補助員の守屋真理子さんに謝意を表します。

なお、本論文の一部は、第14回日本耳鼻咽喉科学会

中国地方部会連合講演会（昭和63年6月5日）、第33回日本オージオロジー学会総会（昭和63年10月21日）、第36回日本基礎耳科学会（平成1年2月10日）、第37回日本基礎耳科学会（平成2年2月10日）にて発表した。

## 文 献

- 1) Schaeppi, U., Heyman, I. A., Fleischman, R. W., Rosenkranz, H., Illievski, V., Cooney, D. A. and Davis, R. D.: Cis-dichlorodiammineplatinum (II); preclinical toxicological evaluation of iv injection in dogs, monkeys, and mice. *Toxicol. appl. Pharmacol.* 25 : 230—241, 1973
- 2) Fleischman, R. W., Stadnicki, S. W., Ethier, M. F. and Schaeppi, U.: Ototoxicity of cis-dichlorodiammineplatinum (II) in the guinea pig. *Toxicol. appl. Pharmacol.* 33 : 320—332, 1975
- 3) Stadnicki, S. W., Fleischman, R. W., Schaeppi, U. and Merriam, P.: Cis-dichlorodiammineplatinum (II) (NSC-119875): Hearing loss and other toxic effects in rhesus monkeys. *Cancer Chemother. Rep.* 59 : 467—480, 1975
- 4) 村上嘉彦, 水島則夫, 石井雍良, 水島 昇, 小山英明, 長谷川 等: Cisplatin の聴器毒性について—第1報 蝸牛ラセン器の病態—。耳鼻展望 23 : 521—526, 1980
- 5) Tange, R. A., Conijn, E. A. J. G. and von Zeiji, G. P. M.: The cortitoxic effects of cis-diamminedichloroplatinum in the guinea pig. *Arch. Otorhinolaryngol.* 237 : 17—26, 1982
- 6) Nakai, Y., Konishi, K., Chang, C., Ohashi, K., Morisaki, N., Minowa, Y. and Morimoto, A.: Ototoxicity of the anticancer drug cisplatin. An experimental study. *Acta Otolaryngol.* 93 : 227—232, 1982
- 7) 鈴木和夫: 最近の研究動向からみたメタロチオネイン。医のあゆみ 116 : 611—620, 1981
- 8) Naganuma, A., Satoh, M., Koyama, Y. and Imura, N.: Protective effect of metallothionein inducing metals on lethal toxicity of cis-diamminedichloroplatinum in mice. *Toxicol. Lett.* 24 : 203—207, 1985
- 9) 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
- 10) 森田昌敏: メタロチオネインとその生物学的役割。代謝 20 : 615—623, 1983
- 11) Waalkes, M. P. and Klaassen, C. D.: Postnatal ontogeny of metallothionein in various organs the rat. *Toxicol. appl. Pharmacol.* 74 : 312—320, 1984
- 12) 小野坂敏見, 田中慶一, 土井雅子, 岡原國男: 動物臓器中の Metallothionein の簡易定量法。衛化 24 : 128—131, 1978
- 13) Rosenberg, B., Renshaw, E., van Camp, L., Hartwick, J. and Drobnick, J.: Platinum induced filamentous growth in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 93 : 716—721, 1967
- 14) Ward, J.M. and Fauvie, K.A.: The nephrotoxic effects of cis-diamminedichloroplatinum (II) (NSC-119875) in male F344 rats. *Toxicol. appl. Pharmacol.* 38 : 535—547, 1976
- 15) Rossof, A. H., Slayton, R. E. and Perlia, C. P.: Preliminary clinical experience with cis-diamminedichloroplatinum (II) (NSC-119875, CACP). *Cancer* 30 : 1451—1456, 1972
- 16) Komune, S., Asakuma, S. and Snow, J. B.: Pathophysiology of the ototoxicity of cis-diamminedichloroplatinum. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 89 : 275—282, 1981
- 17) Estrem, S. A., Babin, R.W., Ryu, J.H. and Moore, K. C.: Cis-diamminedichloroplatinum (II) ototoxicity in the guinea pig. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 89 : 638—645, 1981

- 18) Tange, R. A.: Differences in the cochlear degeneration pattern in the guinea pig as a result of gentamicin and cis-platinum intoxication. *Clin. Otolaryngol.* 9 : 323—327, 1984
- 19) 鳥谷陽一, 平島健二郎, 朝隈真一郎: Cis-diamminedichloroplatinum 投与後のモルモット有毛細胞の微細変化. *耳鼻と臨* 28 : 347—351, 1982
- 20) 森田一郎, 細川 智, 平出文久, 井上鐵三: Cisplatin の聴器毒性について. *耳鼻臨* 78 : 561—568, 1985
- 21) 李 漢栄, 澤村正之, 久保田哲郎, 石橋 晃, 河村栄二: 超大量のシスプラチンと sodium thiosulfate rescue を用いた実験的薬学療法. *癌と化療* 12 : 875—879, 1985
- 22) 井村伸正: セレンの生理機能. *代謝* 20 : 635—644, 1983
- 23) Berry, J. P., Pauwells, C., Tlouzeau, S. and Lespinats, G.: Effect of selenium in combination with cis-diamminedichloroplatinum (II) in the treatment of murine fibrosarcoma. *Cancer Res.* 44 : 2864—2868, 1984
- 24) Hygby, D. J.: Reduction of cis-diamminedichloroplatinum by penicillamine compounds in animal models and humans. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 16 : 131, 1975
- 25) 大谷 敏: Cis-platin の毒性に対する fosfomycin の軽減作用に関する研究. *癌と治療* 11 : 2400—2407, 1984
- 26) Schweitzer, V. G., Dolan, D. F., Abrams, G. E., Davidson, T. and Snyder, R.: Amelioration of cisplatin-induced ototoxicity by fosfomycin. *Laryngoscope* 96 : 948—958, 1986
- 27) 大谷 敏, 大槻好正, 相川 通, 佐藤洋子, 安齋友博, 大内 仁: 抗悪性腫瘍剤 cisplatin の聴器毒性に対する fosfomycin の軽減作用に関する実験的研究. *日耳鼻会報* 87 : 833—840, 1984
- 28) 安齋友博: Cisplatin の副作用に対する fosfomycin の軽減効果に関する実験的, 臨床的研究. *耳鼻臨(補)* 10 : 1—24, 1987
- 29) 李 漢栄, 澤村正之, 石橋 晃, 小柴 健, 久保田哲郎, 河村栄二: Sodium thiosulfate rescue がシスプラチンの抗腫瘍効果へおよぼす影響. *J. Jpn. Soc. Cancer Ther.* 21 : 601—608, 1986
- 30) 木場文男, 辻 秀男, 安部良二, 麻生 宰, 宮崎総一郎, 白坂千秋, 竹内義彦, 有永信哉, 和田哲哉, 内田一郎, 秋吉 毅, 馬場恒男: 肝癌(原発性および転移性)に対する2経路注入式動注化学療法の試み. *癌と化療* 10 : 1684—1690, 1983
- 31) 古川 侃, 滝元 徹, 加勢 満, 瀧口哲也, 岩脇淳一, 梅田良三: 頭頸部癌に対するシスプラチンとその拮抗剤による2経路注入方式動注化学療法の試み. *耳鼻展望* 27 : 609—614, 1984
- 32) 波多江正紀: ヒト及び mongrel dog による intraperitoneal two channel chemotherapy (ip TCC) における cis-platinum 及び sodium thiosulphate の薬理動態. *J. Jpn. Soc. Cancer Ther.* 21 : 609—620, 1986
- 33) Morin, J. P., Bendirdjian, J. P., Fillastre, J. P. and Vaillant, R.: Interference of fosfomycin with lysosomal membrane integrity of rat kidney cell. *Drugs exp. clin. Res.* 4 : 63—66, 1978
- 34) 藤田公生, 藤田弘子, 阿曾佳郎: アミノ配糖体系抗生物質の腎蓄積に対するホスホマイシンの効果. *Jpn. J. Antibiot.* 36 : 3392—3394, 1983
- 35) 大槻好正, 大谷 敏, 相川 通, 佐藤洋子, 安齋友博, 大内 仁, 斎藤武郎: アミノ配糖体による聴器障害に対する fosfomycin の軽減作用とその機序に関する研究. *日耳鼻会報* 86 : 1488—1496, 1983
- 36) 大槻好正, 大谷 敏, 相川 通, 安齋友博, 大内 仁, 斎藤武郎, 長谷川嘉成, 森田真寿行: Cisplatin の抗腫瘍作用に対する fosfomycin の影響について. *日耳鼻会報* 88 : 1298, 1985
- 37) 小野坂敏見, 関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一: マウスの急性カドミウム中毒に対する肝臓中のメタロチオネインの役割. (第2報) カルシウムの効果. *衛化* 29 : 407—411, 1983
- 38) 小野坂敏見, 関 庚善, 福原千佳子, 田中慶一: マウスの急性カドミウム中毒に対する肝臓中のメタロチオネインの役割. (第3報) 高濃度のメタロチオネインの効果. *衛化* 31 : 133—136, 1985

- 39) Bakka, A., Endresen, L., Johnsen, A. B. S., Edminson, P. D. and Rugstad, H. E.: Resistance against cis-dichlorodiammineplatinum in cultured cells with a high content of metallothionein. *Toxicol. appl. Pharmacol.* 61 : 215—226, 1981
- 40) Naganuma, A., Satoh, M. and Imura, N.: Effect of copper pretreatment on toxicity and antitumor activity of cis-diamminedichloroplatinum in mice. *Res. Commun. chem. Pathol. Pharmacol.* 46 : 265—274, 1984
- 41) Naganuma, A., Satoh, M., Koyama, Y. and Imura, N.: Protective effect of metallothionein inducing metals on lethal toxicity of cis-diamminedichloroplatinum in mice. *Toxicol. Lett.* 24 : 203—207, 1985
- 42) 永沼 章, 井村伸正: メタロチオネインの医療への応用. *トキシコロジーフォーラム* 10 : 383—390, 1987
- 43) 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医療への応用. *蛋・核・酵* 32 : 1031—1040, 1987
- 44) 陳 瑞東, 荷見勝彦, 増淵一正: 次硝酸ビスマスによる CDDP 腎毒性の軽減作用. *産婦の実際* 35 : 1753—1759, 1986
- 45) 陳 瑞東, 黒川康夫, 中山一武, 斎藤 潔, 坂本和利, 福田耕一, 平井康夫, 浜田哲郎, 藤本邦野, 山内一弘, 荷見勝彦, 増淵一正: 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* 39 : 815—822, 1987
- 46) 谷脇雅史, 横田昇平, 西田一弘, 津田昌一郎, 枝川潤一, 三澤信一, 瀧野辰郎, 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. *癌と化療* 15 : 531—533, 1988
- 47) 田中慶一, 土井雅子, 小野坂敏見, 岡原國男: カドミウム1回投与による生成 metallothionein の金属組成およびその経時変化. *栄と食糧* 34 : 253—257, 1981
- 48) Onosaka, S., Min, K. S., Fukuhara, C. and Tanaka, K.: Role of renal metallothionein in acute cadomium toxicity in mice. *衛化* 32 : 109—113, 1986
- 49) Shiraiishi, M., Utsumi, K., Morimoto, S., Joja, I., Iida, S., Takeda, Y. and Aono, K.: Inhibition of nitroblue tetrazolium reduction by metallothionein. *Physiol. Chem. Phys.* 14 : 533—537, 1982
- 50) Oyanagui, Y.: Stimulatory effect of platinum (IV) ion on the production of superoxide radical from xanthine oxidase and macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 26 : 473—476, 1977