

## 基礎・診療の基礎

# 椎茸菌糸体抽出物の四塩化炭素肝障害に対する 防御効果

徳島大学 薬学部

寺田 弘

小林製薬株式会社

大原 豊実・山口 康代

上田 太郎・浅野 健治

### 要 約

椎茸菌糸体抽出物（以下 L.E.M. と略す）の四塩化炭素肝障害に対する防御効果を検討した。ラットに L.E.M. 300mg/kg を 3, 5, 10日間経口投与した後に四塩化炭素を腹腔投与したところ、肝障害により著しく上昇する血清 GOT, GPT 値に対して、いずれも上昇抑制傾向が見られた。この肝障害防御機序を解明するために、*in vitro* の肝ミトコンドリアの脂質過酸化について検討した結果、L.E.M. の脂質過酸化抑制効果が認められた。また、L.E.M. は 1,1-diphenyl-1,2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルに対して消去活性作用を有していた。これらの結果より、L.E.M. は肝障害防御効果を有しており、その作用機序は肝障害の原因となるフリーラジカルを消去し、過酸化を抑制することによると推測された。

### Protective Effects of the *Lentinus edodes* mycelia On Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury

Hiroshi Terada

*Faculty of Pharmaceutical Science, University of Tokushima*

Toyomi Ohara, Yasuyo Yamaguchi, Taro Ueda and Kenji Asano

*Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd.*

*30-3, 1-Chome, Toyokawa, Ibaraki-shi, Osaka 567-0057, Japan*

### Abstract

The Protective effects of *Lentines edodes* mycelia (L.E.M.) on rat hepatic injury by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) were examined. In terms of the release of intrahepatic enzymes into the blood, L.E.M. decreased these factors significantly.

And then L.E.M. was investigated for their inhibitory effects of lipid peroxidation in rat hepatic mitochondria. L.E.M. was shown to have inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria. The antioxidative activity of L.E.M. was also examined by the method to measure the decrease of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical. L.E.M. had strong scavenged activity of DPPH radical.

This study reports that L.E.M. protects the hepatic injury by  $\text{CCl}_4$  and this protective effect is connected with the inhibitory effect of lipid peroxidation in hepatic mitochondria.

## I 緒 言

肝臓は代謝、解毒を営む重要な臓器である。肝臓は外来のものを積極的に補足し、処理するという機能を持っており、細菌、ウイルスなどの微生物や、有害な化学物質もこの臓器に達し、それが原因となつてしばしば病理変化（肝炎）を引き起こす。肝炎は急性期・慢性期の病態を経て肝硬変へと進行し、最終的に肝癌に至ることがある。肝臓がこのような重篤な症状に至るのを防ぐために、肝炎の治療薬の研究が盛んになされている。

近年、スーパーオキシド、ヒドロキシラジカルなどのフリーラジカルの生体障害作用が数多く報告されている。これらフリーラジカルは生体内において殺菌作用、情報伝達、また不要となったタンパク質の破壊などの役割を担っているという点では不可欠なものである。しかし、過剰量のフリーラジカルはその高い反応性のために、生体にとって非常に有害なものとなることがある。その作用の1つが脂質過酸化反応である。フリーラジカルは生体膜の脂質を過酸化し、組織に損傷を与えるため、これが肝障害の原因物質となることがある。したがってフリーラジカルの働きを抑える抗酸化剤には肝障害防御効果が期待される。

椎茸菌糸体抽出物 (extract of cultured *Lentinus edodes* mycelia : 以下「L.E.M.」と略す) はサトウキビの搾りかすであるバガスを主成分とした固形培地に椎茸菌を培養し、発茸

前に熱水抽出した乾燥粉末である。L.E.M. は植物ホルモン作用<sup>1)</sup>、抗ウイルス作用<sup>2)3)</sup>、抗腫瘍作用<sup>4)5)</sup>、免疫調節作用<sup>6)</sup>などの生物活性を有することが報告されており、また、ウイルス性肝障害<sup>7)</sup>、ADCC (抗体介在性細胞作動性細胞傷害) 反応の関与する免疫性肝障害<sup>8)</sup>などの肝障害に対して防御効果を示すことが明らかになっている。最近では、HIV 感染例に対する感染抑制作用と免疫能の改善効果<sup>9)</sup>、HBe 抗原陽性慢性肝炎に対する肝機能改善効果<sup>10)</sup>、結核の改善療法中に見られる薬剤性肝障害に対する効果<sup>11)</sup>、軽度の高脂血症を伴う肝障害、アルコール肝障害および薬剤性肝障害に対する効果<sup>12)</sup>などが臨床報告されている。そこで今回我々は、L.E.M. について、ラジカル性肝障害モデルとして頻繁に用いられている四塩化炭素肝障害に対する防御効果を検討するとともに、その機序を解明するため、L.E.M. のラジカル消去活性および肝ミクロソームの脂質過酸化抑制作用について検討した。

## II 試 験 方 法

### 1. 試薬

NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form), LDH (Lactate dehydrogenase), MDH (Malate dehydrogenase) はオリエンタル酵母工業(株)より、四塩化炭素、オリーブ油, DL- $\alpha$ -alanine, L-aspartic acid は和光純薬工業(株)より購入したものをを用いた。硫化第一鉄 ( $\text{FeSO}_4$ ), 硫酸アンモニウム鉄 (III) 12水

( $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), チオバルビツール酸(TBA), BHT (2,6-di-t-butyl-p-cressol), 2,2-bipyridyl はナカライテスク(株)より購入したものをを用いた。他の試薬はすべて市販特級品を使用した。

## 2. 実験動物

実験には wistar 系雄性ラットを用いた。固型飼料を自由摂取させて馴化させた後、実験に用いた。

## 3. 動物処理法, 測定法

### 1) L.E.M. の肝障害誘発作用および投与期間の検討

1 群 3 匹として椎茸菌糸体投与群 (L.E.M. 群) とコントロール群に分け, L.E.M. 群は L.E.M. を 300mg/kg ずつ, コントロール群は水をそれぞれ 3, 5, 10 日間経口投与した。3, 5, 10 日後四塩化炭素-オリーブ油 20% (v/v) 溶液を 1.0ml/kg 腹腔内投与し, 肝障害を惹起した。四塩化炭素投与から 24 時間後, エーテル麻酔下開腹し, 腹部大静脈から採血して血清 GOT, GPT 活性を測定した。

### 2) 四塩化炭素肝障害に対する L.E.M. の影響

1 群 6 匹として L.E.M. を 300, 900, 2700mg/kg ずつ 10 日間経口投与し, 10 日後四塩化炭素-オリーブ油 20% (v/v) 溶液を 1.0ml/kg 皮下投与し, 肝障害を惹起した。四塩化炭素投与から 24 時間後, エーテル麻酔下開腹し, 腹部大静脈から採血して血清 GOT, GPT 活性を測定した。

## 4. ラジカル消去活性

50mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) 緩衝液, エタノール, 0.5mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) をそれぞれ 2:2:1 の割合で混合した反応液を 25℃ にてインキュベートし, 最終濃度が, 0.075, 0.15, 0.30mg/ml となるように L.E.M. を添加し, 517nm における吸光度を測定した。 $\alpha$ -トコフェロールは最終濃度が 20  $\mu\text{M}$  になるよう添加した。

## 5. ラット肝ミトコンドリア懸濁液の調整

ラット肝ミトコンドリア懸濁液 (RLM) は

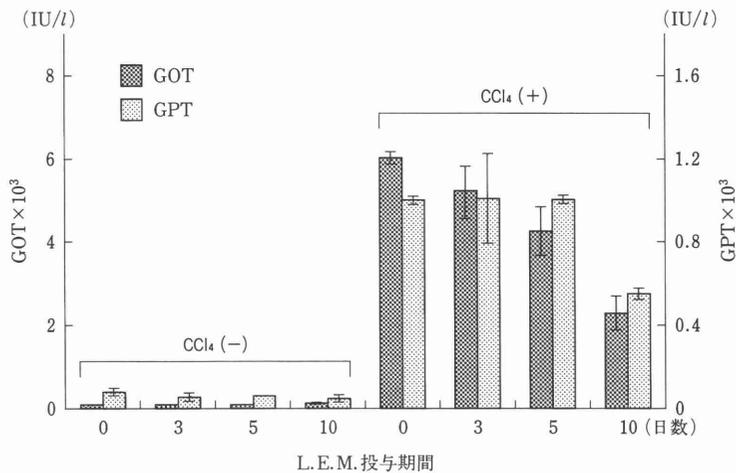
Myers と Slater の方法に従い以下の方法で調整した。成熟した wistar 系雄性ラットより肝臓を採取し, 氷冷下 250mM sucrose 溶液でホモジナイズした後, 10% ホモジネートとした。得られたホモジネートを 2500rpm, 5 分間遠心分離し, その上清を 7500rpm で 10 分間遠心分離した。得られた沈殿を 250mM sucrose で懸濁し, 12000rpm で 10 分間の遠心分離を 2 回繰り返す, 少量の 250 mM sucrose に懸濁してミトコンドリア懸濁液とした。ミトコンドリア懸濁液の蛋白濃度は, 標準物質としてウシ血清アルブミンを用い, Biuret 法により決定した。

## 6. ラット肝ミトコンドリア懸濁液を用いた脂質過酸化反応に伴う過酸化脂質と酸素消費量の測定

RLM の脂質過酸化反応は, 25℃ 恒温にした緩衝液 (0.175M KCl-10mM Tris-HCl, pH7.4) に RLM を 0.7mg protein/ml となるように添加し, ADP および  $\text{FeSO}_4$  をそれぞれ 1mM, 0.1mM となるよう添加して反応を開始した。生成した過酸化脂質量は Ohkawa らの方法<sup>13)</sup> に従い TBA 法にてミトコンドリア懸濁液中の過酸化脂質量を malondialdehyde (MDA) 量として測定した。すなわち, 得られた反応液に 4% BHT を加えて (最終濃度 0.1%) 脂質過酸化反応を停止させ, その 400  $\mu\text{l}$  を分取して試料とした。なお, 標準物質として 1,1,3,3-tetraethoxypropane を用いた。試験管に試料および標準試料を 400  $\mu\text{l}$  とり, それぞれについて 8.1% SDS 100  $\mu\text{l}$ , 0.8% TBA 試薬 750  $\mu\text{l}$ , 20% 酢酸緩衝液 (pH 3.5) 750  $\mu\text{l}$  を添加し, 100℃ で 1 時間加熱した。加熱処理後, 流水で冷却し,  $\text{H}_2\text{O}$  0.5ml と TBA 呈色抽出溶媒 (n-butylalcohol : pyridine = 15 : 1) 2.5ml を加え, 振とうした。上層を分取し, 3000rpm で 10 分間遠心分離した後, 上層の 532nm における吸光度を測定した。

酸素消費量は, 脂質過酸化反応が連鎖的に進行する際に消費される酸素量を測定した。0.175 M KCl-10mM Tris-HCl (pH 7.4) を 25℃ に恒温にしたクラーク型酸素電極の密閉型セ

図1 L.E.M. の肝障害誘発作用およびL.E.M. の投与期間による防御効果



ル (2.2ml) の中に入れ、チャートレンジを調整した後に、ADP, FeSO<sub>4</sub>, RLM をそれぞれ最終濃度が1mM, 100μM, 0.7mg protein/ml になるように添加して酸素消費量を測定した。なお、25℃における飽和溶存酸素量は258 μM O<sub>2</sub>として計算した。

### 7. 二価鉄量の測定

反応混液を3ml分取し、2,2'-bipyridyl のエタノール溶液を最終濃度が5mMとなるように加えた後、522nmの吸光度を測定した。なお、二価鉄濃度は標準物質として硫化第一鉄(FeSO<sub>4</sub>)を用いて決定した。

### 8. 残存二価鉄量の経時変化の測定

0.175M KCl-10mM Tris-HCl (pH 7.4) を25℃恒温にしたセル(3ml)の中に入れ、L.E.M., 二価鉄を最終濃度がそれぞれ0~3.0 mg/ml, 0.1mMとなるように添加した後、2,2'-bipyridylを添加し、522nmにおける吸光度の変化を測定した。

### 9. 三価鉄生成量の測定

0.175M KCl-10mM Tris-HCl (pH 7.4) を25℃に恒温にしたセル(3ml)の中に入れ、L.E.M., 二価鉄をそれぞれ最終濃度が0~2.0 mg/ml, 0.1mMとなるように添加し、290nmにおける吸光度の変化を測定した。

## III 結 果

### 1. L.E.M. の肝障害誘発作用およびL.E.M. の四塩化炭素肝障害に対する防御効果

L.E.M. の肝障害誘発作用およびL.E.M. の肝障害防御効果について検討を行った。L.E.M.300mg/kgを3, 5, 10日間経口投与した結果、血清GOT, GPT値の変化は見られなかった。したがってL.E.M. は肝障害誘発作用を有していないことが確認された。L.E.M. 300mg/kgを3, 5, 10日間経口投与した後に四塩化炭素を投与した群では、肝障害により著しく上昇する血清GOT, GPT値に対して、投与期間の延長に伴い上昇抑制傾向が見られ、10日間投与の場合に最も高い防御効果が認められた(図1)。

つぎにL.E.M. の投与量による肝障害防御効果についての検討を行った(図2)。L.E.M. 900mg/kgを投与した際に、最も顕著な血清GOT, GPT値の低下が見られた。しかし、L.E.M. の投与量依存的な防御効果は見られなかった。

### 2. L.E.M. のラジカル消去活性の測定

L.E.M. のラジカル消去活性について、安定なラジカルであるDPPHを用いて検討を行っ

図2 四塩化炭素肝障害に対する L.E.M. の肝障害抑制効果

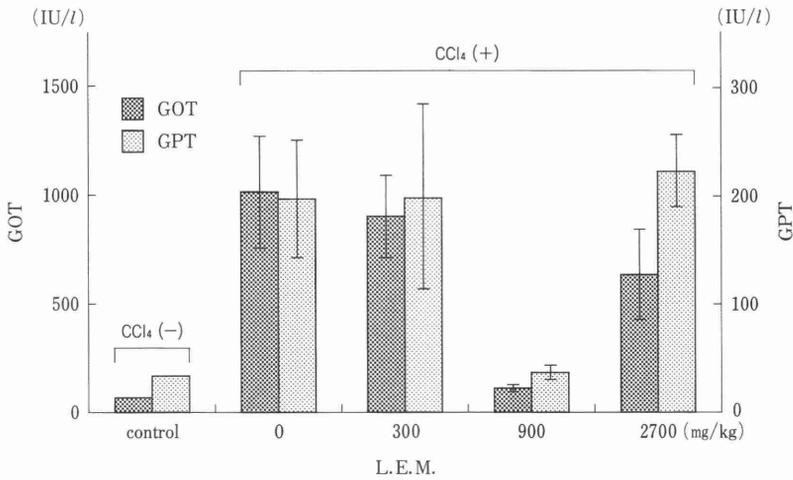
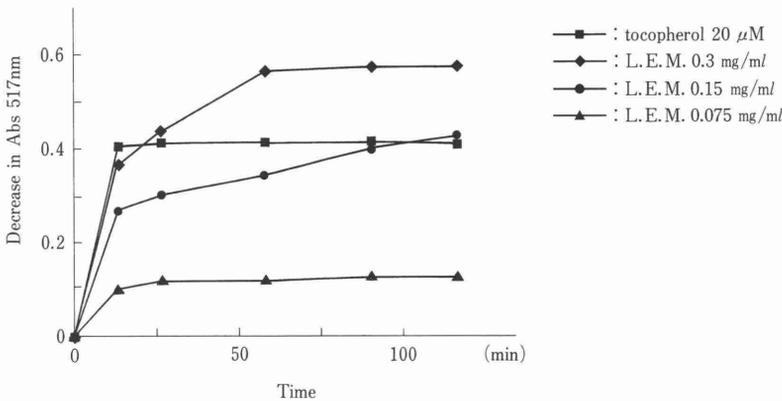


図3 L.E.M. のDPPH ラジカル消去活性



た (図3)。一般的で強力な抗酸化剤として知られている  $\alpha$ -トコフェロールと比べ、L.E.M. は反応開始直後の吸光度の減少効果は認められなかったが、濃度依存的なラジカル消去活性が確認された。

### 3. 脂質過酸化抑制作用

ラット肝ミトコンドリア懸濁液 (RLM) を用いて、脂質過酸化反応に対する L.E.M. の抑制効果を反応の進行に伴い増加する TBARS と酸素消費量を測定することで検討した。L.E.M. の添加濃度に依存して、反応進行に伴って生成される TBARS の量は抑制され (図4)、L.E.M.

添加濃度 0.5mg/ml ではおよそ 35%、また、2.0mg/ml の濃度ではおよそ 85% という高い割合で抑制された (図5)。一方、酸素消費量を測定した結果 L.E.M. を添加した場合、酸素消費速度は異なる二段階の型式を示した (図6)。すなわち、脂質過酸化を誘起するのに必要なフリーラジカルの生成、蓄積に基づいた緩やかな酸素消費 (lag-time) が誘導後に観測され、次いで連鎖反応に基づく急激な酸素消費が観測された。L.E.M. 添加 1.0mg/ml および 2.0mg/ml においては最終的に酸素消費を抑制したが、0.5mg/ml においては最終的に酸素消費が増加

図4 L.E.M. の脂質過酸化抑制効果の経時的变化

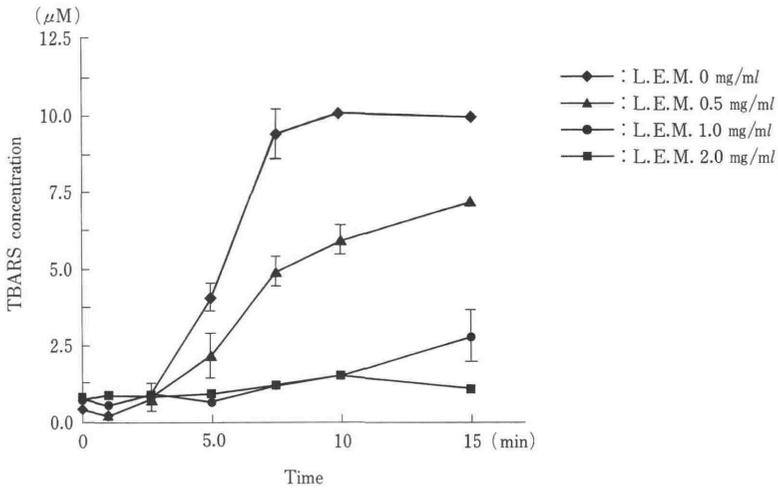
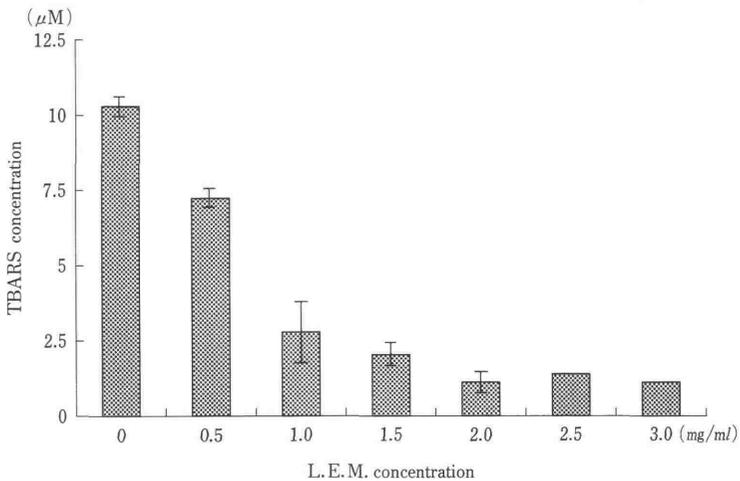


図5 脂質過酸化に対する L.E.M. の濃度依存的抑制効果



していた。また、過酸化反応開始5分間には、L.E.M. の濃度に依存して急速な酸素消費が起こり、lag-timeの消失が見られた。

4. 二価鉄および三価鉄に対する L.E.M. の影響

L.E.M. の二価鉄に与える影響を検討するために、ADP 共存下、および非共存下における二価鉄の酸化に伴う酸素消費量の測定を行った。L.E.M. 0.1mg/ml, ADP 1.0mg/ml を添加した後、FeSO<sub>4</sub> を 0.1mM 添加し、反応の進行に伴う酸素消費量を測定した。L.E.M. の添加に

より酸素消費量の増加が見られたが、ADP 共存下、非共存下においてはどちらも酸素消費量にあまり差がない結果であった(図7)。また、ADP 非共存下、L.E.M. と二価鉄の反応による残存二価鉄量を測定した結果、L.E.M. 0.5mg/ml 添加においては二価鉄の急激な減少が見られたが、1.0mg/ml 以上では濃度依存的に減少抑制効果が見られた(図8)。更に、二価鉄に対する L.E.M. の影響について三価鉄の生成量から検討を行った。二価鉄と L.E.M. の反応により三価鉄の生成が認められ、図9に示すよう

図6 酸素消費量を指標とした脂質過酸化反応に対する L.E.M. の影響

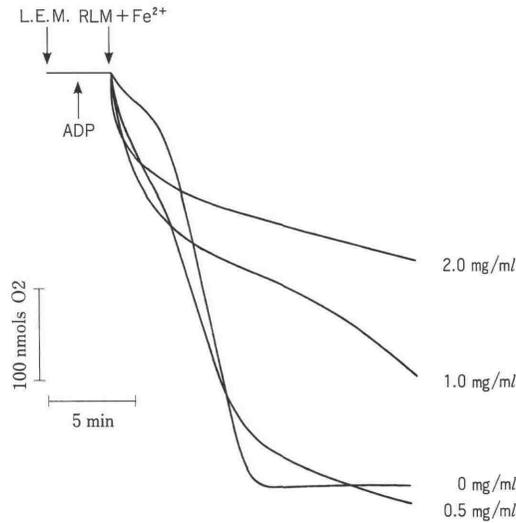
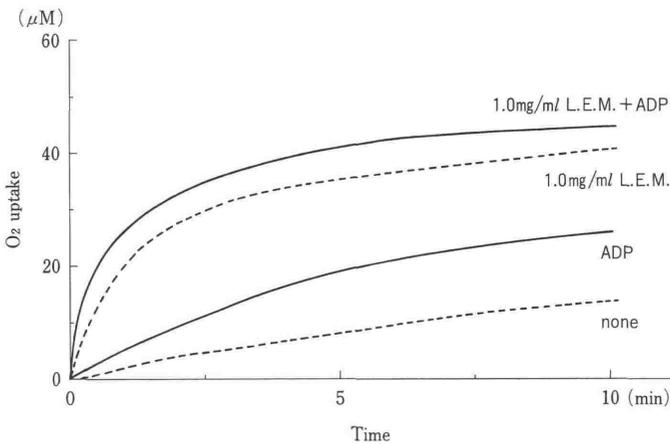


図7 Fe<sup>2+</sup> との反応における酸素消費量



に三価鉄の生成は、L.E.M. の添加濃度に依存して抑制された。更に、三価鉄に対する L.E.M. の影響について二価鉄量の経時変化から検討を行った。三価鉄と L.E.M. との反応により二価鉄が生成し、その生成量は L.E.M. の濃度に依存して増加した (図10)。

#### IV 考 察

今回、我々は四塩化炭素肝障害に対する L.E.M. の防御効果について検討した。L.E.M. に肝障害誘発作用がないことを確認した後、

L.E.M. 投与期間による肝障害防御効果の検討を行った結果、L.E.M. を10日間投与したときに、最も有効な肝障害防御効果を示すことが明らかとなった。つぎに、L.E.M. の投与量について検討を行った結果、900mg/kg 投与量で、血清 GOT, GPT 値の顕著な上昇抑制効果を示すことが明らかとなった。しかし、投与量依存的でなかったことから、活性発現には至適投与量が存在することが示唆された。以上の四塩化炭素肝障害試験結果より、L.E.M. は四塩化炭素肝障害に対して防御効果を有することが明ら

図8 L.E.M. と  $Fe^{2+}$  の反応における  $Fe^{2+}$  量の経時的変化

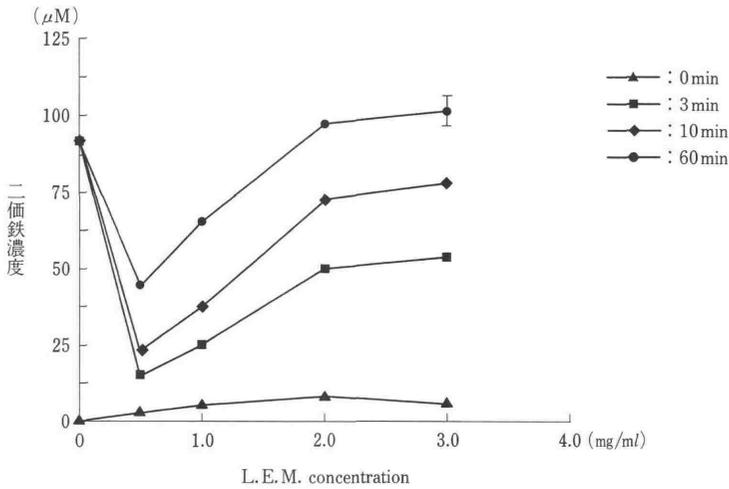


図9  $Fe^{2+}$  との反応における  $Fe^{3+}$  の生成量

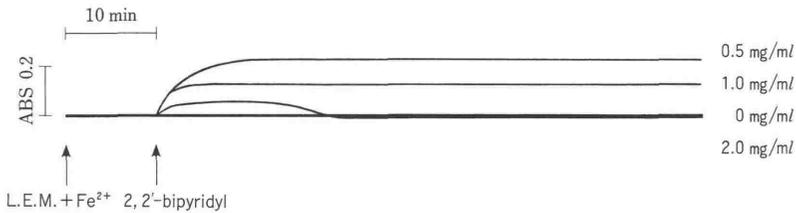
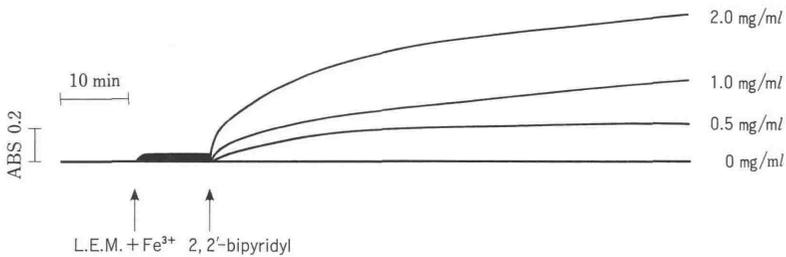


図10  $Fe^{3+}$  との反応における  $Fe^{2+}$  の生成量



かとなった。

四塩化炭素が肝障害を誘起する起因の1つは、四塩化炭素が肝の小胞体（ミクロゾーム）に局在するNADPH-P450還元酵素とチトクロームP-450を介する薬物代謝酵素によって代謝される際に発生するトリクロロメチルラジカル ( $CCl_3 \cdot$ ) などのフリーラジカルがミクロゾーム膜をはじめ、ミトコンドリア膜や細胞膜の脂

質を過酸化することによると考えられている<sup>14)15)</sup>。L.E.M.の四塩化炭素肝障害の防御機序は、このラジカルを消去し、脂質過酸化反応を抑制することによると推測した。

そこで、安定なラジカルとして知られているDPPHラジカルを用いてL.E.M.のラジカル消去活性を測定した。その結果、L.E.M.は濃度依存的にDPPHラジカルを消去することが明

らかになった。更に、生体膜モデルとしてラット肝ミトコンドリアを用いてADPと二価鉄により誘導した脂質過酸化反応に対するL.E.M.の影響について検討した。その結果、反応の進行に伴う過酸化脂質の生成はL.E.M.の濃度に依存して減少した。したがって四塩化炭素肝障害に対するL.E.M.の防御機序は、これら肝ミトコンドリア膜の脂質過酸化反応に対する抑制効果によることが示唆された。

また、脂質過酸化は反応の進行とともに酸素が消費されるため酸素消費量を指標として過酸化反応を検討した。L.E.M.を添加した場合、lag-timeの消失が観測された。L.E.M.高濃度においては最終的な酸素消費量は抑制されていたが、低濃度においては増加していた。L.E.M.低濃度において見られた酸素消費量の増加は過酸化脂質の生成を反映していないことから、L.E.M.は複雑な抗酸化作用を有していることが示唆された。

ついで、L.E.M.の脂質過酸化抑制作用の機序をより詳細に検討するために、L.E.M.と二価鉄の反応性について検討した。L.E.M.の添加により脂質過酸化反応開始5分間に急速な酸素消費が観測され、lag-timeの消失が見られたことから、L.E.M.はlag-time中に起こる二価鉄の酸化反応に関与していることが推測された。L.E.M.と二価鉄の反応において酸素消費量の増加が見られたことから、L.E.M.は二価鉄の酸化を誘導することが示唆された。L.E.M.と二価鉄を添加したときの酸素消費量はADPと二価鉄の2倍であったため、L.E.M.はADPよりも遙かに強く二価鉄の酸化を誘導すると考えられた。また、L.E.M.を添加した場合、ADP共存下、非共存下において酸素消費量にあまり差がなかったことから、ADPと二価鉄の反応よりも、L.E.M.と二価鉄の反応の方がより速く起こるのではないかと考えられた。また、L.E.M.の添加による二価鉄の残存量を測定した結果、L.E.M.低濃度においては二価鉄量の減少が見られた。これらの結果よりL.E.M.は

ADPと同様に二価鉄と錯体を形成し酸化反応を誘導しているのではないかと推測された。しかし、L.E.M.が高濃度になるにつれ、二価鉄量がやや増加していることから、L.E.M.は二価鉄を酸化するだけでなく、別の反応も寄与していることが示唆された。L.E.M.と二価鉄の反応中の二価鉄残量は時間とともに増加し、またL.E.M.の濃度にも依存して増加した。この際、生成する三価鉄の変化を測定した結果、L.E.M.の濃度が増加するほど生成量は抑制された。更に、L.E.M.と三価鉄の反応によって生成する二価鉄量の変化を測定した結果、L.E.M.の濃度に依存して二価鉄の生成は増加した。これらの結果からL.E.M.は三価鉄還元作用を有することが明らかとなった。

以上の結果をまとめると、L.E.M.は直接的なラジカル消去作用と三価鉄還元作用を有しており、これらの抗酸化作用により、肝ミトコンドリア膜の脂質過酸化を抑制し、肝障害防御効果を発揮していることが明らかとなった。

動脈硬化、癌、白内障、老化なども脂質過酸化が関与する疾患といわれており、治療および予防のために抗酸化物質の研究が盛んに行われている。本研究結果より、L.E.M.は抗酸化作用を有していることが明らかになった。L.E.M.の肝障害以外の脂質過酸化が関与する疾患に対する有用性の検証を今後行っていきたい。

## 文 献

- 1) Mitsuhashi-Kato, M., Fujii, T. : Promotion and rooting in azukia cutting by possible glycoproteins extracted from *Lentinus edodes* culture, *Plant Cell Physiol.* 26, 221~228, 1985.
- 2) Tochilura, T. S., Nakashima, H., Ohashi, Y. et al. : Inhibition (*in vitro*) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia, *Med. Microbiol. Immunol.* 177, 235~244, 1988.

- 3) Sorimachi, K., Niwa, A., Yamazaki, S. et al. : Anti-viral activity of water-solubilized libnin derivatives *in vitro*, Agric. Biol. Chem. **54**, 1337~1339, 1990.
- 4) Sugano, N., Hibino, Y., Choji, Y. et al. : Anticarcinogenic actions of water-soluble and alcohol-insoluble fractions from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia, Cancer Lett. **17**, 109~114, 1982.
- 5) Sugano, N., Choji, Y. et al. : Anticarcinogenic action of an alcohol-insoluble fraction (LAP1) from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia, Cancer Lett. **27**, 1~6, 1985.
- 6) 市川裕三, 溝口靖紘, 小林絢三, 森沢成司 : 腹腔滲出マクロファージの細胞内遊離カルシウムイオン濃度に及ぼす椎茸菌糸体培養抽出物 (LEM) の影響, 和漢医薬学会誌 **8**, 162~166, 1991.
- 7) Suzuki, H., Okubo, A., Yamasaki, S. et al. : Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM), Biochem. Biophys. Res. Commun. **160**, 367~373, 1989.
- 8) 溝口靖紘, 児玉千枝, 北村瑞穂ほか : *Lentinus edodes* mycelia 培養抽出物 (L.E.M.) の免疫学的肝細胞障害および抗体産生に及ぼす影響, 肝胆膵 **15**, 127~135, 1987.
- 9) Suzuki, H., Okubo, A., Yamasaki, S. et al. : Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (L.E.M.), Biochem. Biophys. Res. **160**, 367~335, 1989.
- 10) 原田 尚, 兼高達貳 : HBe 抗原陽性慢性肝炎に対する LEM による治療 — 他施設間 open study による検討, 肝胆膵 **14**, 367~335, 1987.
- 11) 螺良英郎, 西本光廣, 西井一雅 : 肺結核の化学療法で併発した薬剤性肝障害に対する椎茸菌糸体抽出物顆粒の使用経験, Prog. Med. **19**, 128~134, 1999.
- 12) 梶本修身, 山口康代ほか : シイタケ菌糸体抽出物における境界域および軽度肝機能障害に対する臨床的検討, 日本臨床栄養学会雑誌 **22**, 22~31, 2000.
- 13) Ohkawa, H., Ohnishi, N., Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, Anal. Biochem. **95**, 351~358, 1979.
- 14) Slater, T. F. : Free-radical mechanisms in tissue injury, Biochem. J. **222**, 1~15, 1984.
- 15) James, J. L., Moody, D. E., CHAN, C. H., Smuckler, E. A. : Biochem. J. **206**, 203~210, 1982.