

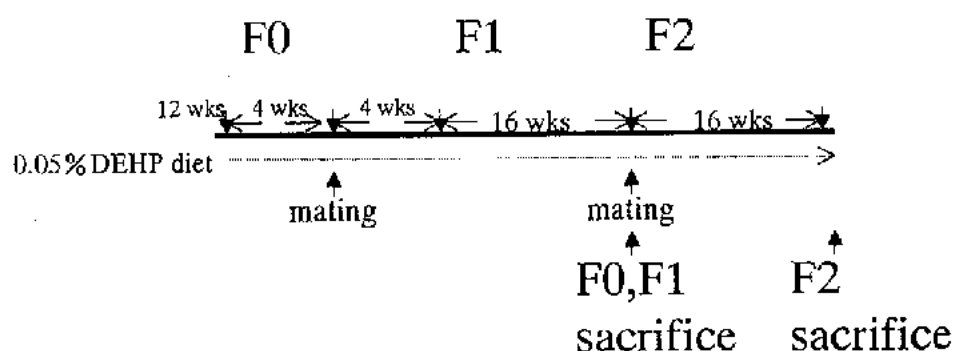


図 1 DEHP 曝露の概略

Table 1 Fertility and reproductive performance of mating mice

	Control	F1	F2
Wild-type mice			
No. Fertile/No. cohabited	12/12	12/12	12/12
Newborn pups per pair	6.5±1.9 (78)	6.3±1.7 (76)	4.4±1.5 (53)
Live pups per pair ^a	6.3±2.1 (75)	5.9±1.6 (70)	2.3±2.7* (28)
Percentage of live pups(%)	96.2	92.1	52.8
M/F(n)	41/34	29/41	10/18
PPAR α -null mice			
No. Fertile/No. cohabited	12/12	12/12	12/12
Newborn pups per pair	6.3±1.8 (75)	6.5±2.1 (78)	5.3±1.5 (64)
Live pups per pair ^a	5.3±2.1 (63)	5.6±2.9 (67)	4.5±1.9 (54)
Percentage of live pups(%)	84.0	85.9	84.4
M/F(n)	33/30	37/30	23/31

^aPups lived more than three days

*Controlと比較して有意差あり

Table 2 Sex of fetus and newborn pups

	Mating ^a	Fetus ^b		Mating ^a	Pups ^c	
	(M/F)	Male	Female	(M/F)	Male	Female
Wild-type mice						
Control	6/6	21	19	6/6	19	18
DEHP	6/6	22	20	12/12	9	17
PPAR α -null mice						
Control	6/6	15	16	6/6	14	12
DEHP	6/6	16	15	6/6	11	15

^aF1 x F1

^b18-19 day

^ctwo-day-old newborn pups

3. マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響と その分子機構の解析に関する研究

研究者 小路 武彦（長崎大学医学部第三解剖学教授）

研究要旨

平成 11 年度は、特に成熟マウス精子形成過程で生じる生殖細胞アポトーシスの光顕的及び電顕的解析を進めると共に、エストロゲン並びにジエチルスチルベストロール（DES）の影響を検討し、精子形成過程精母細胞の減数分裂期前後でのアポトーシスの顕著な誘導を明らかにした。更にその誘導分子機構として Fas/Fas ligand 系の関与を見い出した。また平成 12 年度の本格的実験に向けて、ビスフェノール A 等他の環境毒性或いは生殖毒性物質の投与条件の検討、妊娠動物或いは胎仔への投与条件の検討、生殖器系の構造と機能を制御する視床下部－下垂体系への影響の評価系の検討並びにこれら化学物質代謝で発生する活性酸素への防御反応系の評価システム等の検討を行った。

研究者協力者

菱川 善隆（長崎大学医学部第三解剖学講師）
進 正志（長崎大学医学部第三解剖学助手）
和泉 伸一（長崎大学医学部第三解剖学助手）
近藤 宇史（長崎大学医学部病態生化学教授）
植田 弘師（長崎大学薬学部分子薬理学教授）
佐藤 浩（長崎大学医学部実験動物学助教授）

A. 研究目的

「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」（環境庁）でも指摘されているように、内分泌攪乱物質或いは環境毒性物質の作用に関する多くの知見が、科学的な因果関係の直接的証明がないためしばしば一つの可能性として語られている。既に約 70 種類以上の化学物質がその容疑者として数え上げられており、特にこれらの物質が生殖細胞障害や生殖器系異常を誘発する事から、人類に対し世代を越えた深刻な影響をもたらす可能性が高く、それらの危険性の評価は現在最も急務な内分泌学並びに生殖生物学上の問題である。そこで本研究に於いては、胎仔期から成熟期に至るマウス発生の様々な過程で毒性物質を投与し雌雄生殖細胞死特に精子形成過程への影響を検討すると共にその分子機構の解明を行う。

B. 研究方法

平成 11 年度は、エストロゲンとして estradiol-3-benzoate（EB）を用い、エストロゲン活性を強く示す内分泌攪乱物質として知られる diethylstilbestrol（DES）の効果を中心として解析し、更にビスフェノール A（BPA）に関し投与プロトコルの基礎的検討とこれら化学物質の作用機構の解析方法の予備的検討を行った。具体的には、成熟雄マウスへ EB 並びに DES を種々の量で投与し、精子形成細胞死への影響を terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling（TUNEL）法を中心として検討した。また雌雄胎仔生殖細胞死への影響を検討するための予備調査として、妊娠マウスへの腹腔投与による胎仔発育過程への影響を解剖学的に検討した。更に EB 及び DES による生殖細胞死誘導機構として Fas/Fas ligand 発現の関与を免疫組織化学的に検討した。また、これら環境毒性物質による活性酸素障害に対する生殖細胞防御機構への作用を検討するため、グルタチオン、グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）、グルタチオンペルオキシダーゼ（GPX）やスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）活性の測定条件の最適化並びにス

テロイドによる受容体・G 蛋白質活性化の指標である $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合活性に対するこれら環境毒性化学物質の効果を検討する為の予備的研究を行った。

尚、これら環境毒性物質の研究の施行に当たり、長崎大学医学部動物実験施設動物実験委員会より安全面と倫理面での審査が行われ本動物実験計画の実行許可を与えられている。

C. 研究結果

1) 30, 60, 120 $\mu\text{g}/\text{head}$ の EB を 5 日毎に成熟マウスに投与したところ、120 $\mu\text{g}/\text{head}$ では 20 日で精巣重量は半減し、精子細胞以降の生殖細胞の消失が観察された。30 $\mu\text{g}/\text{head}$ の投与では、30 日あたりから精子形成過程の阻害が認められ、60-90 日では顕著な TUNEL 陽性細胞の増大と精子細胞以降の生殖細胞の消失が観察された (図 1)。連続切片を用いた詳細な検討により、この生殖細胞死は Fas 発現を介するものであり、セルトリ細胞より発現された Fas ligand により誘導されていることが明らかとなった。また 20mg 及び 100mg/kg の DES を 5 日毎に成熟マウスに皮下投与したところ、low dose 投与マウスにおいて投与後 20 日で精子形成細胞での TUNEL 陽性細胞数の有意な増大を検出した (図 2)。しかし面白いことに、high dose 投与マウス精巣ではむしろ精子形成細胞死の頻度低下が認められた。

2) 妊娠マウス (妊娠 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 日目) に、3.4 mg/kg (LD50 の 1/10 量) と 17mg/kg (LD50 の 1/2 量) の DES を腹腔投与し、20 日目にその胎仔に対する影響を検討したところ、high dose では全ての胎仔が吸収されており、low dose でも 2/3 の個体で全ての胎仔が吸収されていた (表 1)。また胎仔を得た個体でもその匹数は通常の 1/5-1/4 程度であった。一方、ビスフェノール A を同様に 15 mg/kg (LD50 の 1/10 量) と 75 mg/kg (LD50 の 1/2 量) で投与したところ全ての妊娠マウスより一見正常な胎仔を得た。EB (0.33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と 3.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 投与群でも同様であった。

3) 活性酸素障害に対する生殖細胞防御機構として、グルタチオン量、GST 活性、GPX 活性並びに SOD 活性の測定条件を以下のように確立した。

A) グルタチオンの定量：グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンの三つのアミノ酸から成るトリペプチドで、ほとんどの細胞に高濃度に存在して、活性酸素による細胞障害の防御、生理活性物質の合成や DNA の合成、癌細胞の抗癌剤耐性の獲得などにおいて重要な役割を果たすなど、多彩な生理的機能を有する物質である。表 2 にその機能を示す。グルタチオンは、二段階の酵素反応によって合成される。その第一段階を触媒する酵素は、 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -GCS) で、第二段階を触媒する酵素は、グルタチオン合成酵素であるが、グルタチオン合成を律速するのは、第一段階を触媒する γ -GCS である。グルタチオンは、還元型 (GSH) と酸化型 (GSSG) が存在するが、細胞内では大多数が GSH で、GSSG は数%以下である。定量は、DTNB-酵素リサイクリング法と呼ばれる以下の方法で行う。まず、測定試料は、トリクロロ酢酸 (TCA) などのタンパク変性剤による処理を行い、タンパク質を除く。除タンパク試料中の過剰の TCA は、ジエチルエーテルで除去する。これに、5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) を加えると、試料中の GSH と反応して 2-ニトロ-5-安息香酸が生成される。2-ニトロ-5-安息香酸は、412nm に吸収を持つので、生成量を分光光度計で測定できる。しかし、実際には、GSH と DTNB の反応の際に副反応的に GSSG が生じて DTNB との反応が進まなくなる。そこで、反応系にグルタチオン還元酵素を加えて、生じた GSSG を GSH に還元し DTNB と連続的に反

応させ、412 nm の吸光の増加速度を測定する。この 412nm の吸光の増加速度は、存在する GSH と GSSG の総量に比例することから、これらの総グルタチオン量を測定することができる。GSSG のみを測定するためには、除タンパク試料に N-エチルマレイミドを加えて高濃度に存在する GSH をマスキングする前処理が必要となる。

B) GST 活性の測定：GST は、種々の薬剤のグルタチオン抱合を触媒する他に、脂質や核酸の過酸化物の還元を触媒するなど、生体の解毒酵素として働く一方、生理活性物質の合成に関わるなど、多機能酵素として知られる。GST は、昆虫から哺乳類に至る動物一般に広く分布するほか、トウモロコシなどの植物にも存在する。GST には多くの分子種が存在するが、各分子種の発現は臓器によって異なる。各分子種の基質特異性は低く、一つの基質に対し、多くの分子種が活性を示す。GST 活性は、多くの分子種の基質となる、1-クロロ 2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) を用いて、GSH と CDBN との反応物 (CDNB のグルタチオン抱合体、ジニトロフェニルグルタチオン (GS-DNP)) の生成を測定する。GS-DNP は、340nm に吸収を持つので、分光光度計で測定することができる。CDNB は前述の通り、多くの GST 分子種の基質となり感度も高いので、総 GST 活性の測定に用いられる。活性は、GS-DNP のモル吸光係数を基に計算する。

C) GPX 活性測定：GPX は、必須微量元素セレンを含有する酵素で、セレンはその活性中心にセレノシステインの形で存在する。本酵素は、GSH の酸化に共役して、過酸化水素、脂肪酸過酸化物、リン脂質過酸化物などの種々のヒドロペルオキシド (ROOH) を還元す

ることで、活性酸素の消去や細胞膜などの酸化損傷を除去し、生体防御に重要な役割を担っている。この反応に伴って生じた GSSG は、GSH サイクルを構成するグルタチオン還元酵素 (GR) により還元されて GSH に再生される。この際、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型 (NADPH) が消費されるが、NADPH はペントースリン酸経路より再生される。そこで GPX の活性は、反応系に GR、NADPH を共存させ、基質として t-ブチルヒドロペルオキシドを用い、反応の結果生成する GSSG を GR で還元する際に起こる NADPH の減少を 340nm の吸光の変化として測定する。活性は、NADPH のモル吸光係数を基に計算する。本法では、セレン依存性の GPX 活性の他に、セレン非依存性の GPX (ある種の GST) 活性も測定される。セレン依存性の GPX 活性のみを測定する場合には、基質として t-ブチルヒドロペルオキシドではなく、過酸化水素を用いる。

D) SOD 活性測定：SOD は、活性酸素の一種である O_2^- を不均化する酵素で、生体内に広く存在する。哺乳類の細胞内には、細胞質に局在し、分子内に銅と亜鉛を含有する Cu,Zn-SOD とミトコンドリアに局在し、分子内にマンガン含有する Mn-SOD が存在する (表 3)。その反応は、 $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ である。SOD の活性測定では、基質の O_2^- が不安定であるため、通常以下のようにして行う。まず、キサントシンとキサントシンオキシダーゼの存在下で O_2^- を産生させ、これにニトロブルーテトラゾリウム (NBT) を共存させて、 O_2^- の産生量に比例して NBT が発色する系を設ける。この系に活性測定用試料を加えると、試料中に存在する SOD が O_2^- の産生を阻害するので、NBT の発

色が抑えられる。この阻害が 50%である時、SOD の酵素活性が 1 ユニットあると定義する。Cu,Zn-SOD と Mn-SOD の区別は、シアンにより Cu,Zn-SOD の活性が阻害されるため、反応系にシアンを加えて活性測定を行えば、Mn-SOD のみの活性が得られる。

4) [35 S]GTP γ S 結合活性の測定条件を以下のように確立した。

環境毒性化学物質による神経系への作用を解析することを目的として、主として受容体 G 蛋白質連関に着目した [35 S]GTP γ S 結合活性測定法の開発・改良を行った。内分泌攪乱化学物質の作用点として、神経系のステロイドであるニューロステロイドの細胞膜受容体に着目しているが、まずこの受容体を共有するシグマリガンによる G 蛋白質活性化能について解析を行った。

脳の膜標品にシグマ受容体アゴニストである (+)-pentazocine を作用させ、その [35 S]GTP γ S 結合活性の変化と検討したところ、アゴニスト濃度依存的に [35 S]GTP γ S 結合量の増大が観察された。この G 蛋白質活性化は百日咳毒素処理により消失した。関連する G 蛋白質の同定を行うため、この百日咳毒素処理により活性を消失した膜標品に、バキュロウイルス発現系により作製した組換え G 蛋白質を再構成し、アゴニスト依存的な [35 S]GTP γ S 結合活性の変化を測定したところ、Gi1 再構成により [35 S]GTP γ S 結合能の回復が見られたが、GoA 再構成によっては回復が見られなかった。このことから脳膜標品に存在するシグマ受容体は Gi1 と機能的連関がある受容体であることが明らかとなった。次に、臓器別のシグマ受容体アゴニストによる [35 S]GTP γ S 結合活性の変化を検討した。脳膜標品には比較的多くの [35 S]GTP γ S 結合活性が認められた。脳以外の部位については (+)-pentazocine 結合量の多い肝臓において [35 S]GTP γ S 結合活性が著しく少なく、脾臓、精巣において [35 S]GTP γ S 結合活性が多いことが明らかとなった。活性の多かった、脾臓について *in situ* [35 S]GTP γ S オー

トラジオグラムによる解析を行ったところ (+)-pentazocine 依存的な [35 S]GTP γ S 結合活性の上昇が観察された。

一方、G 蛋白質活性化の *in vivo* アッセイ系として、末梢性疼痛試験法を利用できる可能性について検討するため、この試験法で見られる応答の基礎的な情報伝達機構について解析を行った。その結果、非常に低用量で G 蛋白質連関型受容体刺激を検出でき、Gi あるいは Gq の活性化、ホスホリパーゼ C、IP₃、Ca²⁺ 動員系の活性化の関与が *in vivo* において解析できる系であることを明らかにした。

D. 考察

成熟マウス精巣への EB 及び DES の効果は、ラットやハムスター等の結果と比較してそれ程重篤ではないが、長期投与によって特に減数分裂を前後して生殖細胞の消失が認められた。その本質はアポトーシスの誘導であり、原因遺伝子として Fas/Fas ligand 系の関与を見いだした。一方、幹細胞である精粗細胞は消滅することなく、高濃度の EB や DES 存在下でも長期間ほぼ正常に細胞分裂を行い精子形成細胞を供給していることも明らかとなった。これらの結果を基に、1) 更にこれらホルモンの低濃度の影響を検討すると共に、幼若並びに胎仔精巣への影響の全体像を明らかにする、2) 他の生殖毒性物質の影響をこれらホルモンの効果との比較に於いて評価する、3) *in vitro* での胎仔へのこれら毒性物質の直接的影響を検討することが必要と思われる。

本研究結果での特筆すべき事実は、DES 投与による成熟マウス精子形成細胞死誘導作用において high dose ではむしろ生殖細胞アポトーシス頻度を低下させるという現象であり、この点に関しては更なる実験の追加による詳細な検討を必要とする。本報告書では詳細しないが、研究協力者である近藤等による予備実験によりマウス肝でのグルタチオン量が low dose の DES 投与では半減するが high dose では逆に倍増する知見が得られており活性酸素への細胞死防御機構の観点から興味ある知見と考える。更に、通常毒性の影響の検討に

おいてしばしば高濃度の毒性物質投与が行われ有害・無害が論じられる訳であるが、本研究の結果は低濃度で特に強い生殖毒性が認められる場合の存在を示唆しており研究計画作成上の新たな指針を示していると考えられる。

また生殖毒性を考える上で視床下部一下垂体系への検討が必要であるが、今後それらのG蛋白系への効果を指標とした研究が可能となっており、種々の下垂体ホルモンの発現状況と比較検討する予定である。更に、卵子形成細胞へのこれら毒性物質の影響の検討も不可避であり、生殖細胞死の誘導機構への洞察を広げるためのBcl-2/Bax系の関与や活性酸素障害への防御機構の検討を進め、毒性の人為的な中和法などの開発に取り組む必要がある。

E. 結 論

成熟雄マウスへのエストロゲン及びその類似物質の精巣への影響を検討し、その中心的な作用点が精母細胞減数分裂過程であり、アポトーシスのFas/Fas ligand系を介した誘導が明らかとなった。またDESによる生殖細胞アポトーシス誘導がhigh doseでむしろ抑制されることを見出し、今後の更なる検討が必要となった。また更に、今回得られた基礎的投与条件の検討結果を基に、幼若並びに胎仔マウスへのこれら環境生殖毒性物質の検討を行うと共に他の毒性物質の検討も行いこれらの生殖細胞死誘導効果に於ける異同を明らかにしたい。

F. 研究発表

1) 論文発表

- ・ Koji, T. (1999) In situ localization of gene-specific transcription regulatory factors by Southwestern histochemistry. *Acta Histochem. Cytochem.*, 32 (3) ; 255-260.
- ・ Ejima, K., Koji, T., Nanri, H., Kashimura, M. and Ikeda, M. (1999) Expression of thioredoxin and thioredoxin reductase in placenta of pregnant mice exposed to lipopolysaccharide. *Placenta*, 20 (7) ; 561-566.
- ・ Razzaque, M. S., Koji, T., Harada, T. and Taguchi, T. (1999) Localization in situ of type VI collagen protein and its mRNA in mesangial proliferative glomerulonephritis using formalin-fixed paraffin embedded renal biopsy sections. *Histochem. Cell Biol.*, 111; 1-6.
- ・ Sakai, H., Tsurusaki, T., Kanda, S., Koji, T., Xuan, J. W. and Saito, Y. (1999) Prognostic significance of β -microseminoprotein mRNA expression in prostate cancer. *Prostate*, 38; 278-284.
- ・ Tsurusaki, T., Kanda S., Sakai, H., Kanetake, H., Saito, Y., Alitalo, K. and Koji, T. (1999) Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Brit. J. Cancer*, 80 () ; 309-313.
- ・ Baba, N., Koji, T., Itoh, M. and Mizuno, A. (1999) Reciprocal changes in the expression of Bcl-2 and Bax in hypoglossal nucleus after axotomy in adult rats: possible involvement in the induction of neuronal cell death. *Brain Res.*, 827 (2) ; 122-129.
- ・ Makino, Y., Kanemaki, M., Kurokawa, Y., Koji, T. and Tamura, T. (1999) A rat RuvB-like protein, TIP49a, is a germ cell-enriched novel DNA helicase. *J. Biol. Chem.*, 274 (22) ; 15329-15335.
- ・ Razzaque, M. S., Koji, T., Kumatori, A. and Taguchi, T. (1999) Cisplatin-induced apoptosis in human proximal tubular epithelial cells is associated with the activation of the Fas/Fas ligand system. *Histochem. Cell Biol.*, 111; 359-365.
- ・ Shiraishi, M., Hiroyasu, S., Koji, T., Muto, Y. and Koyama, Y. (1999) Early detection of the Fas-FasL system in hepatic graft-versus-host disease after small-bowel transplantation. *Transplant Proc.*, 31 (1/2) ; 567-568.
- ・ Hiroyasu, S., Shiraishi, M., Koji, T., Mamadi, T., Sugawa, H., Hye H. and Muto, Y. (1999) Analysis of the Fas system and Bcl-2 in rat

- liver allograft rejection. *J. Surg. Res.*, 84 (2); 204-211.
- **Hishikawa, Y., Koji, T., Dhar, D. K., Kinugawa, S., Yamaguchi, M. and Nagasue, N.** (1999) Metallothionein expression correlates with metastatic and proliferative potential in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Brit. J. Cancer*, 81 (4); 712-720.
 - **Razzaque, M. S., Shimokawa, I., Koji, T., Higami, Y. and Taguchi, T.** (1999) Life-long caloric restriction suppresses age-associated Fas expression in the Fischer 344 rat kidney. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, 1; 82-85.
 - **Sugimoto, Y., Koji, T. and Miyoshi S.** (1999) Modification of expression of stem cell factor by various cytokines. *J. Cell. Physiol.*, 181 (2); 285-294.
 - **Hiroyasu, S., Shiraishi, M., Koji, T., Mamadi, T., Sugawa, H., Tomori, H. and Muto, Y.** (1999) Analysis of Fas system in pulmonary injury of graft-versus-host disease after rat intestinal transplantation. *Transplantation*, 68 (7); 933-938.
 - **Ejima, K., Koji, T., Tsuruta, D., Kashimura, M. and Ikeda, M.** (2000) Induction of apoptosis in placentas of pregnant mice exposed to lipopolysaccharides: Possible involvement of Fas/Fas ligand system. *Biol. Reprod.*, 62; 178-185.
 - **Nishihara, E., Nagayama, Y., Inoue, S., Hiroi H., Muramatsu, M., Yamashita, S. and Koji, T.** (2000) Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor α and β in rat pituitary gland detected by immunohistochemistry. *Endocrinology*, 141 (2); 615-620.
 - **小路武彦** (1999) 精子形成とアポトーシス。産婦人科の世界, 51 (1); 49-58.
 - **小路武彦** (1999) 分子組織細胞化学の最近の進歩。解剖学雑誌, 74; 399-409.
 - **小路武彦** (1999) In situ hybridization: 原理と基本操作。[組織細胞化学 1999] (日本組織細胞化学会編)、学際企画、東京、pp. 120-129.
 - **大庭茂喜、小路武彦** (1999) アポトーシス関連タンパク質などの免疫組織化学染色。[新アポトーシス実験法] (辻本賀英、刀祢重信、山田武編)、羊土社、pp. 37-41.
 - **小路武彦** (2000) 精巣とアポトーシス。In: 臓器別アポトーシス証明法 (大槻勝紀、小路武彦、渡辺慶一編)、pp.180-183、南江堂。
 - **Kondo, T., Higashiyama, Y., Goto, S., Iida, T., Cho, S., Iwanaga, M., Mori, K., Tani, M. and Urata, Y.** (1999) Regulation of g-Glutamylcysteine synthetase expression in response to oxidative stress. *Free Rad. Res.*, 31; 325-334.
 - **Goto, S., Iida, T., Cho, S., Oka, M., Kohno, S. and Kondo, T.** (1999) Overexpression of glutathione S-transferase p enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free Rad. Res.*, 31; 549-558.
 - **Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Todoroki, S., Iida, T., Cho, S., Honma, K. and Kondo, T.** (1999) Melatonin induces g-glutamylcysteine synthetase mediated by activator proteine-1 in human vascular endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.*, 27 (7/8); 838-849.
 - **Beutler, E., Gelbart, T., Kondo, T. and Matsunaga, A. T.** (1999) The molecular basis of a case of g-glutamylcysteine synthetase deficiency. *Blood*, 94 (8); 1-7.
 - **Tanaka, T., Uchiumi, T., Nomoto, M., Kohno, K., Kondo, T., Nishio, K., Saijo, N., Kuwano, M.** (1999) Cellular balance of glutathione levels through the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione thiol transferatse genes in human hepatic cells resistant to a glutathione poison. *Biochim. Biophys. Acta*, 1427 (3); 367-377.
 - **Sakamaki, H., Akazawa, S., Ishibashi, M., Izumino, K., Takino, H., Yamasaki, H., Yamaguchi, Y., Goto, S., Urata, Y., Kondo, T. and Nagataki, S.** (1999) Significance of glutathione-dependent antioxidant system in