

ラット腎腫瘍発生におけるリン酸塩の促進作用並びに クエン酸カリウムの抑制効果に関する研究

奈良県立医科大学第2病理学教室

西井清治

A STUDY OF MODULATION BY PHOSPHATE SALTS AND POTASSIUM CITRATE ON RAT RENAL TUMORIGENESIS

KIYOHARU NISHII

The Second Department of Pathology, Nara Medical University

Received May 31, 1993

Summary: Medium organ bioassays to shorten the experimental duration with unilateral nephrectomy for early detection of renal tumors were investigated in male Wistar rats after N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine (EHEN) administration. Animals were fed 1000 ppm EHEN diet for 2 weeks and the left kidney was removed at week 3. They received several promoting agents and non-promoting agents as negative control for 18 weeks. Within a relatively short period of 20 weeks, the promoting effect on rat renal tumorigenesis can be detected as a significant increase of preneoplastic lesions, such as simple or adenomatous hyperplasias with increased levels of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-labeled renal cortical tubular epithelia.

Various kinds of salts and metals contained in the diet were tested at concentrations more than 20 times the normal doses in a preliminary experiment for nephrotoxicity over 8 weeks. Potassium dibasic phosphate (PDP), potassium aluminum sulfate (PAS) and copper sulfate (CS) induced nephropathy. Therefore, these three salts were investigated in this medium-term bioassay for renal tumorigenesis. Treatment with 5% PDP induced renal calcification with severe nephropathy and promoted the development of preneoplastic lesions, but that with 5% PAS or 0.5% CS did not. To study the effect of alkalization on renal mineralization, animals concomitantly received 5% potassium citrate (PC).

The addition of PC to PDP diet reduced the promoting effect on renal tumorigenesis; also indicated was retardation of renal calcium by histology, serum biochemistry and urinalysis. The promoting effects of PDP and inhibitory effects of PC were correlated to BrdU-labeling indices. Immunohistochemical study was used to examine α_{2u} -globulin accumulation; however, PDP-induced nephropathy did not appear to be related to α_{2u} -globulin, as evidenced by the negative results. A pathogenesis for renal carcinogenesis is suggested in which nephropathy associated with mineralization enhanced the development of renal cell tumors.

Index Terms

phosphate salt, promotion, inhibition, renal tumorigenesis

結 言

腎腫瘍の発生及び促進作用は、実験的に発癌二段階モデルによって数多くの化学物質において見出されている¹¹⁻¹²⁾。しかしながら、ヒトの場合は疫学的に腎毒性物質を含むいくつかの因子が腎腫瘍発生に関与していると考えられているが¹³⁻¹⁶⁾、確定的なものはない。腎においては、腎毒性と腎発癌の関係が強く示唆されており¹⁷⁾、腎発癌修飾作用を有する腎毒性物質は極めて多いと思われる。

一方、実験的腎発癌モデルは従来から長期の実験期間を要し、数多くの腎毒性物質を検索するうえで、その前癌性病変を指標とした中期発癌実験の開発が迫られていた。そこで著者は、まず従来の腎発癌モデルを再検討し、より短期でその発癌性を評価しうる発がん性試験法を開発したうえで、塩類や重金属など生体に混入される可能性のある多数の物質を腎毒性の有無によって分別し、腎発癌性を検討した。またこれらの発癌修飾作用がいかなる因子により左右されるかを免疫組織学的にも検索し、更にその要因を除去することで、発癌抑制効果があるか否かも検討し、腎腫瘍発生の機序について考察を行なった。

実験材料および方法

1. 実験動物

体重150~160g前後の6週齢Wistar系雄ラット500匹を日本エスエルシーK.K.より購入し、1週間の予備飼育後、実験に供した。

2. 飼育方法

ラットは40×25×25cmのステンレススチール網ゲージに3匹ずつ収容し、飲料水は水道水を用い、基礎食はオリエンタルMF固形飼料で実験期間中自由に摂取させた。飼育室は室温24±1℃、湿度55±5%に調節し、ラットは毎日観察し、死亡したものや死期に近いと思われるものは屠殺解剖した。

3. 発癌物質および被検物質

(a) N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine(半井化学, 以下EHENと略す)はチャールスリバー-CRF-1粉末食(日本チャールスリバーK.K.)に1000ppmの濃度で混合し実験食とした。

(b) Basic lead acetate(LA, 0.1%。半井化学, 以下同様), trisodium nitrilotriacetate monohydrate(NTA, 1.0%), potassium bromate(KB, 0.05%), potassium dibasic phosphate(PDP, 5%または10%), sodium phosphate(SP, 0.05%), potassium aluminum sulfate

(PAS, 5%), copper sulfate(CS, 0.05%)はそれぞれの濃度でCRF-1粉末基礎食に混合し実験食とした。

4. 実験方法

(a) 動物実験

実験1) Wistar系雄ラット110匹を用いて以下の7群を作成した(Fig. 1)。いずれの群も実験開始から2週間1000ppm EHENを連続投与し、第3週目に左腎摘出術を行っている。

第1群; β -Cyclodextrin(β -C)を45mg/100g体重で1週間毎日皮下注射した。

第2群; DL-Serin(DL-S)を100mg/100g体重で隔週毎に3回皮下注射した。

第3群; 第3週目より0.1% LAを連続投与した。

第4群; 第3週目より1.0% NTAを連続投与した。

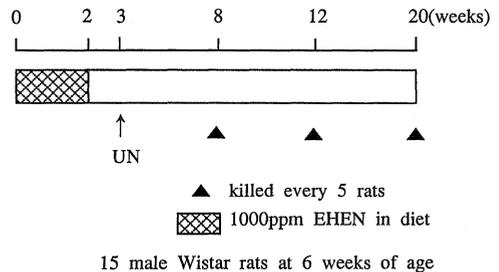
第5群; 第3週目より0.05% KBを連続投与した。

第6群; 第3週目よりdiethylene glycol(DEG)を5%濃度で水道水に混入し連続投与した。

第7群; 第3週目より基礎食のみとした。

各群を第8週目、12週目および実験終了時の20週目にエーテル麻酔下で屠殺し、右腎を摘出し、肝とともに重量を測定した後10%ホルマリン固定、パラフィン包埋した。

実験2) 予備実験として粉末基礎食中に含有される塩類および金属塩15種類を以下の濃度で8週連続投与し、腎の組織像を5-bromo-2'-deoxyuridine(Sigma Chemical Co., U. S. A, 以下BrdUと略す)標識による免疫組織的検索も加えて検討した。



Test chemicals

- 1) 45mg/100g body weight β -C/day S.C. \times 7
- 2) 100mg/100g body weight DL-serine S.C. biweekly \times 3
- 3) 1000ppm LA in diet
- 4) 10000ppm NTA in diet
- 5) 500ppm KB in diet
- 6) 5% DEG in drinking water for 2 days
- 7) Control

Fig. 1. Experimental design.

(10% Calcium carbonate, 10% Calcium monobasic phosphate, 1% Magnesium carbonate, 10% Calcium citrate, 1% Magnesium sulfate, 10% Potassium dibasic phosphate, 10% Sodium chloride, 10% Potassium chloride, 0.5% Copper sulfate, 2% Ferric sulfate, 1% Manganese sulfate, 10% Potassium iodide, 10% Potassium aluminium sulfate, 1% Sodium fluoride, 0.05% Zinc chloride)

実験3) 実験2によって得られた腎障害をひきおこす物質について、実験1と同様のプロトコールに従い被検物資を投与した。

実験4) 腎障害の著しい群のうちでも、とくに腎結石形成を示す群には、5%の濃度で potassium citrate(クエン酸カリウム、以下PCと略す)を同時投与した。実験1~4については、各群5匹ずつ屠殺1時間前に100mg/Kg体重のBrdUをPBSに溶解し腹腔内投与した。また各群とも、24時間蓄尿および屠殺時の採血によって、尿中・血中の電解質測定を行った。

(b) α_{2u} -globulin に対する抗体の作製

α_{2u} -globulin は Kurtz¹⁸⁾ の変法によって Wistar 系雄ラットの尿から Sephadex G 75 カラムで純化した。この α_{2u} -globulin を 0.1 mg/0.5 ml の濃度に Freund's complete adjuvant で混合し、2週間毎 BALA/c マウスの背部に皮下注射した。ハイブリドーマ製作3日前に同量の α_{2u} -globulin を adjuvant なしで静注し、ブースターとした。ハイブリドーマの作製ならびにモノクローナル抗体については、Köhler らの変法を用いた¹⁹⁾²⁰⁾。

(c) 免疫組織学的検索

BrdU 免疫組織染色は、70%エタノール固定パラフィン包埋物質を脱パラフィン後、蒸留水で洗浄し、0.3% H_2O_2 を含むメタノールで内因性ペルオキシダーゼを除去した。0.05 M Tris-HCl バッファー (PH 7.6) で洗浄した後、正常家兎血清で非特異的反応を除去し、一次抗体である抗 BrdU 抗体 (DAKO-BrdUrd, Bu20a) を 100 倍に希釈し室温で 60 分間反応させた。二次抗体 (ビオチン化抗マウス IgG 抗体) ABC complex (ABC Kit; Vector Laboratories) は 37°C, 40 分間で各々反応させた。最後に diaminobenzidine (DAB) で発色させ、マイヤーのヘマトキシリンで核染色を施した²¹⁾。なお、染色の評価のため、同一ラットから採取した腸管粘膜上皮細胞の BrdU の取り込みを対照とした。BrdU の labeling index (L. I.) として、腎組織 1 片につき 5 視野における尿細管上皮細胞または間質細胞の陽性細胞数を計測し、1 mm² あたりの陽性細胞数に換算した。

(b) で作製された α_{2u} -globulin に対するモノクロー

抗体も同様の ABC 免疫組織染色を行った。一次抗体は腹水から回収した後、硫酸塩析し、凍結乾燥後 PBS にて希釈し、1 μ g/ml の濃度で室温 60 分間反応させた。陽性対照として、正常ラット腎組織を用いた。

5. 腎症および腎腫瘍性病変の組織学的分類

種々の被検物質によって惹起される(慢性)腎性を Grade 1 から 3 に分類した²²⁾。即ち、Grade 0 は正常腎組織、Grade 1 は糸球体毛細血管基底膜および皮質尿細管基底膜の肥厚が巣状に認められた場合、Grade 2 は更に拡張した尿細管とその中に hyaline cast が散見され、尿細管上皮は時として萎縮しており、Grade 3 は更に糸球体の硬化所見、ボーマン嚢との癒着とともに、間質はリンパ球を主体とする小円形細胞浸潤と線維化を伴ってくる場合とした。腎腫瘍および正常腎組織に認められない前腫瘍性病変は simple hyperplasia, adenomatous hyperplasia, renal cell tumor の 3 病変に分類した²³⁾。即ち、simple hyperplasia (photo. 1) は尿細管上皮の軽度の増加に伴い、尿細管径のやや大きくなった病変で周囲への圧迫所見の乏しいもの、adenomatous hyperplasia (photo. 2) は更に周囲への圧迫所見の加わったものであるが、その径が糸球体径の 3 倍以内であるものとした。Renal cell tumor (photo. 3) は糸球体の 3 倍以上で、明らかな腺腫性陽生を示す adenoma から、時に中心部壊死、細胞異型の加わった carcinoma までを含めて分類した。これらの腎病変は、腎を横断面で 4 切片作製し組織学的検索に供した。統計学的検定には、腫瘍の multiplicity には Student の t 検定を、腫瘍の発生頻度に関しては χ^2 検定を用いた。

結 果

実験1) 各被検物質投与群は、EHEN 単独投与群に比べ腎重量および腎体重比の増加傾向が認められ、有意に増加したものは β -C と LA 投与群であった。BrdU-L. I. の経時変化は 12 週と 20 週目では、尿細管上皮のいずれの群も正常腎に比べ有意の増加を示し、また adenomatous hyperplasia の病変を除いた腎組織での比較でも同様増加傾向を示し、腫瘍促進効果をもたない DEG に比べ、第 1, 2, 3 及び 4 群ではいずれも有意の増加を示した。8, 12 及び 20 週のいずれの時点でも、NTA 投与群が高値を持続し、LA や β -C も対照群と比較し高値を示した (Table 1)。組織学的変化については実験終了時の 20 週に simple hyperplasia は各群 100% 出現し第 6 群の DEG 投与群に比し、第 1 群から第 5 群までは有意の増加を認めた。同様の傾向が adenomatous hyperplasia においてもみられ、renal cell tumor が 20

週目で出現した(Table 2).

実験2) については腎重量の著明な増加を示したものは, potassium dibasic phosphate(PDF)投与群で, potassium aluminum sulfate(PAS)投与群も増加傾向を示し, copper sulfate(CS)投与群はわずかの重量増加で

ある(Table 3). 組織学的に腎尿細管上皮は細胞や尿管腔内に好酸性沈着物が認められた.

実験3) については各々の被検物質のみでは simple hyperplasia が対照群に比してわずかに増加しているが, adenomatous hyperplasia の発生は認められなかった.

Table 1. Average numbers of BrdU-labeled renal cells per mm² in rats treated with EHEN, unilateral nephrectomy

Group Treatment	8		12		20(weeks)	
	Cortical tubules	Interstitium	Cortical tubules	Interstitium	Cortical tubules	Interstitium
1 EHEN+β-C	16.20±4.32	5.56±2.36	15.33±0.58 ^{a,b)} (12.59±1.28) ^{b)}	3.69±0.33	11.80±1.30 ^{a)} (7.08±2.89)	5.78±2.44
2 EHEN+DL-S	15.25±2.99	4.89±1.69	13.25±2.22 ^{a,b)} (13.26±2.88) ^{b)}	6.67±2.65 ^{a)}	13.80±1.64 ^{a)} (6.18±2.25)	6.00±0.82 ^{a)}
3 EHEN+LA	13.40±1.82	5.22±2.14	14.40±4.58 ^{a)} (10.49±2.23) ^{b)}	5.14±1.83 ^{a)}	18.40±2.88 ^{a,b)} (9.86±2.41)	9.44±1.42 ^{a,b)}
4 EHEN+NTA	17.60±5.86	4.89±1.72	19.40±4.16 ^{a,b)} (11.53±2.77) ^{b)}	5.31±1.36 ^{a)}	22.20±4.09 ^{a,b)} (13.26±2.50) ^{b)}	8.67±2.50 ^{a,b)}
5 EHEN+KB	13.40±2.07	4.00±1.00	12.25±1.89 ^{a,b)} (7.92±1.17)	3.89±1.58	13.60±1.34 ^{a)} (6.67±2.93)	3.19±1.15
6 EHEN+DEG	10.20±3.19	2.67±1.19	9.75±0.50 ^{a)} (6.46±1.10)	4.72±3.58	11.75±2.22 ^{a)} (6.39±1.96)	3.33±2.39
7 EHEN only	NA	NA	6.50±1.79	2.22±1.58	6.25±1.89	3.30±1.76

EHEN, N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine; β-C, β-cyclodextrin; DL-S, DL-serine; LA, basic lead acetate; NTA, trisodium nitrilotriacetate monohydrate; KB, potassium bromate; DEG, diethylene glycol. (): Numbers of BrdU-labeled renal cells without adenomatous hyperplasia and adenomas. NA, not performed.

^{a)} Significantly different from Group 7 (p<0.05).

^{b)} Significantly different from Group 6 (p<0.05).

Table 2. Histological findings in kidneys of rats treated with EHEN, unilateral nephrectomy and test chemicals

Group Treatment	Effective No. of animals (weeks)	Simple hyperplasias (SH)						Adenomatous hyperplasias(AH)			Renal cell tumors(RCT)		
		No. of rats with SH(%)			No. of SH per rat			Total number (No. of rats)			Total number (No. of rats)		
		8	12	20	8	12	20	8	12	20	8	12	20
1 EHEN+β-C	5	5	5	5	19.8±1.0	5.8±2.5 ^{a,b)}	6.6±1.9 ^{a,b)}	0	2	10	0	0	1
		(100) ^{a)}	(100) ^{a)}	(100) ^{a)}				(1)	(4)				(1)
2 EHEN+DL-S	5	4	3	5	12.4±1.6	4.6±1.5 ^{a,b)}	8.4±1.1 ^{a,b)}	0	0	7	0	0	2
		(80) ^{a)}	(60)	(100) ^{a)}						(5)			(2)
3 EHEN+LA	5	2	4	5	0.8±1.0	2.2±1.7	11.4±6.6 ^{a,b)}	0	2	6	0	0	1
		(40)	(80) ^{a)}	(100) ^{a)}					(1)	(4)			(1)
4 EHEN+NTA	5	3	5	5	0.6±0.8	8.6±3.4 ^{a,b)}	12.2±7.2 ^{a,b)}	0	19	27	0	0	8
		(60)	(100) ^{a)}	(100) ^{a)}					(4)	(4)			(3)
5 EHEN+KB	5	1	5	5	0.4±0.5	1.4±1.1	9.2±2.7 ^{a,b)}	0	3	8	0	0	1
		(20)	(100) ^{a)}	(100) ^{a)}					(2)	(3)			(1)
6 EHEN+DEG	5	0	4	5	0	1.4±0.8	2.6±0.5 ^{a)}	0	0	1	0	0	0
			(80) ^{a)}	(100) ^{a)}						(1)			
7 EHEN only	5	0	0	2	0	0	0.6±0.5	0	0	0	0	0	0
				(40)									

EHEN, N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine; β-C, β-cyclodextrin; DL-S, DL-serine; LA, basic lead acetate; NTA, trisodium nitrilotriacetate monohydrate; KB, potassium bromate; DEG, diethylene glycol.

^{a)} Significantly different from Group 7 (p<0.05).

^{b)} Significantly different from Group 6 (p<0.05).

第1群の5% PDP投与群には simple hyperplasia 及び adenomatous hyperplasia ともに第4群の EHEN 単独投与群に比し有意の増加が認められる。またこの群のみ renal cell tumor の発生を認めた。腎症も著明で、近位および遠位尿細管に石灰沈着をみるとともに (Photo. 4)、発生した腎腫瘍組織内にも石灰沈着が散見された (Photo. 5)。第2群 (PAS 投与群) 及び第3群 (CS 投与

群) は simple hyperplasia 及び adenomatous hyperplasia とも第4群に比し増加傾向はみられず、腎症も概して軽度で、石灰沈着は認められなかった (Table 4)。

実験4) クエン酸カリウム (PC) のアルカリ療法による腎症や石灰沈着の軽減の程度を検討するため、PDP の投与量を10%に増加し、第2及び第6群を PC との併用投与群とした (Table 5)。更にカルシウム沈着の機序を

Table 3. Average kidney weights in rats treated with various salts for 8 weeks

Group	Test chemicals	Dose(%)	Kidney(g)	Kidney/B.W.(%)
1	Calcium carbonate	10	0.722	0.29
2	Calcium monobasic phosphate	10	0.742	0.32
3	Magnesium carbonate	1	0.728	0.27
4	Calcium citrate	10	0.665	0.28
5	Magnesium chloride	1	0.727	0.28
6	Potassium dibasic phosphate	10	1.270	0.76
7	Sodium chloride	10	0.641	0.34
8	Potassium chloride	10	0.654	0.34
9	Copper sulfate	0.5	0.640	0.32
10	Ferric sulfate	2	0.732	0.30
11	Manganese sulfate	1	0.755	0.28
12	Potassium iodide	10	0.640	0.31
13	Potassium aluminium sulfate	10	0.672	0.37
14	Sodium fluoride	1	NA	NA
15	Zinc chloride	0.05	0.672	0.29
16	Control		0.881	0.30

Table 4. Numbers of renal lesions and BrdU-labeled cells in nephrectomized rats treated with EHEN and test chemicals

Group	Treatment	Simple hyperplasia	Adenomatous hyperplasia	Renal cell tumors	BrdU (cells/mm ²)	Nephropathy (Grade)	Mineralization
1	EHEN + 5% PDP	6.70 ± 2.45 ^{a)}	2.25 ± 1.25 ^{a,b)}	0.35 ± 0.58	8.05 ± 1.72 ^{a,b)} (4.05 ± 0.87)	3	+
2	EHEN + 5% PAS	1.70 ± 1.26 ^{a)}	0.23 ± 0.56	0	6.80 ± 0.53 ^{a,b)} (4.13 ± 1.16)	1	-
3	EHEN + 0.5% CS	2.00 ± 1.13 ^{a)}	0.20 ± 0.41	0	6.90 ± 1.09 ^{b)} (4.00 ± 0.86)	1	-
4	EHEN	3.20 ± 1.79 ^{b)}	0.40 ± 0.57	0	4.73 ± 1.36 (2.73 ± 1.01)	0	-
5	5% PDP	0.88 ± 0.95	0	0	7.15 ± 0.38 ^{a,b)} (2.90 ± 0.68)	3	+
6	5% PAS	0.70 ± 0.73	0	0	6.60 ± 1.63 ^{b)} (4.55 ± 1.18)	1	-
7	0.5 CS	0.60 ± 0.74	0	0	5.10 ± 0.26 ^{b)} (2.85 ± 0.50)	1	-
8	Control	0.40 ± 0.55	0	0	3.40 ± 0.86 (2.95 ± 0.79)	0	-

EHEN, N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine; PDP, potassium dibasic phosphate; PAS, potassium aluminum sulfate; CS, copper sulfate.

(): Numbers of BrdU-labeled cortical cells without adenomatous hyperplasia and adenoma.

^{a)} Significantly different from Group 7 ($p < 0.05$).

^{b)} Significantly different from Group 8 ($p < 0.05$).

検討するため、新たに calcium phosphate(CP)を PDP と同量投与する実験群を設けた。BrdU-L. I.は5% PDP 投与に比べ、10% PDP 投与は著明に増加するとともに、腎症や石灰沈着の程度は著しかった。しかし、10% CP 投与群である第2, 6ではBrdU-L. I.の減少とともに腎症や腎石灰沈着の程度も平行して軽減されていた。Simple hyperplasiaは第1, 2, 5及び6群で多数の発生を認め、計測不能であった。対照群においても20週で100%発生しうるが、1匹あたりの発生頻度は極めて低く、adenomatous hyperplasiaは認められなかった。これは10% CP 投与群とほぼ同様の変化であった。10% PDP+5% PC 併用投与群は、10% PDP 単独投与群に比べ有意差をもって renal cell tumor の発生頻度が、1匹あたりの発生数を抑制していた(Table 6)。血清および尿中の電解質濃度については10% PDP 投与群に、

BUN, クレアチニンの上昇及び、血中Ca⁺⁺, Cl⁻の低下が認められた。しかし5% PCの併用投与群では、これらの指標に改善傾向がみられた。尿中においては電解質の変動が血中とほぼ逆転して認められた。10% CP 投与群は血中、尿中ともに大きな変動を示すことはなかった(Table 7, 8)。

正常 Wistar 雄ラットから採取した尿を Sephadex G 75 カラムで純化して得た α_{2u}-globulin を用いて、モノクローナル抗体を作製したところ、クローン 2C5 において α_{2u}-globulin と強く反応する抗体を ELISA (Enzyme linked immunosolvent assay) によって検出した。この抗体は IgG₁ に分画され、Western blot にて 18,700 dalton の分子量を認識した。この抗体を用いて免疫組織的検索を行ったところ、正常腎組織では尿管上皮細胞および尿管管内にところどころ強く反応する沈着

Table 5. BrdU-labeled cells, nephropathy and mineralization in nephrectomized rats treated with EHEN and test chemicals

Group	Treatment	BrdU LI (cells/mm ²)	Nephropathy grade	Mineralization ^{d)}
1	EHEN → 10%PDP	28.60±3.01 ^{a,b)}	3	+++
2	EHEN → 10%PDP+5%PC	14.50±2.54 ^{a,b,c)}	2	++
3	EHEN → 10%CP	2.92±1.56	0	-
4	EHEN → BD	3.80±0.95	0	-
5	BD → 10%PDP	25.20±1.75 ^{a,b)}	3	+++
6	BD → 10%PDP+5%PC	16.10±1.94 ^{a,b)}	2	++
7	BD → 10%CP	0.88±0.27 ^{a,b)}	0	-
8	BD (control)	3.15±0.68	0	-

PDP, potassium dibasic phosphate; PC, potassium citrate; CP, calcium phosphate.

^{a)} Significantly different from Group 8 (p<0.05). ^{b)} Significantly different from Group 7 (p<0.05). ^{c)} Significantly different from Group 1 (p<0.05). ^{d)} +++: severe, ++: moderate, +: mild. BrdU-labeled cells were counted in renal cortical tubular epithelia without preneoplastic lesions.

Table 6. Incidences of renal lesions in nephrectomized rats treated with EHEN and test chemicals

Group	Treatment	No. of rats with (%)			Multiplicity		
		Simple hyperplasia	Adenomatous hyperplasia	Renal cell tumor	Simple hyperplasia	Adenomatous hyperplasia	Renal cell tumor
1	EHEN → 10%PDP	ND	15(100) ^{a)}	15(100) ^{a,b)}	ND	4.13±1.27 ^{a,b)}	2.00±1.00 ^{a,b)}
2	EHEN → 10%PDP+5%PC	ND	14(100) ^{a)}	4(28.6) ^{a,c)}	ND	2.43±1.50 ^{a)}	0.43±0.73 ^{c)}
3	EHEN → 10%CP	18(100)	10(55.6) ^{a,b)}	3(16.7)	3.56±1.54 ^{a,b)}	0.83±0.83 ^{a)}	0.17±0.37
4	EHEN → BD	20(100)	18(90.0) ^{a)}	5(25.0) ^{a)}	3.50±1.41 ^{a)}	1.75±1.20 ^{a)}	0.25±0.43
5	BD → 10%PDP	ND	15(100) ^{a)}	0(0)	ND	0.92±0.86 ^{a)}	0
6	BD → 10%PDP+5%PC	ND	15(100) ^{a)}	0(0)	ND	0.33±0.47 ^{b)}	0
7	BD → 10%CP	18(90.0)	4(20.0) ^{b)}	0(0)	0.79±0.77 ^{a,b)}	0.21±0.41 ^{b)}	0
8	BD (control)	20(100)	0(0)	0(0)	0.88±0.78 ^{b)}	0	0

PDP, potassium dibasic phosphate; PC, potassium citrate; CP, calcium phosphate.

BD: basal diet; ND: Not detectable.

^{a)} Significantly different from Group 8 (p<0.05). ^{b)} Significantly different from Group 7 (p<0.05).

^{c)} Significantly different from Group 1 (p<0.05).

Table 7. Serum biochemistry values of nephrectomized rats treated with EHEN and test chemicals

Group	Treatment	BUN	Cr	Na	K	Ca	Cl	P
1	EHEN → 10 %PDP	44.1 ^{a)}	1.56 ^{a)}	147.0 ^{a)}	5.86 ^{a)}	3.26 ^{a)}	94.9 ^{a)}	13.5 ^{a)}
2	EHEN → 10 %PDP + 5 %PC	62.6 ^{a)}	1.57 ^{a)}	146.4 ^{a)}	5.77	3.73 ^{a)}	97.1 ^{a)}	10.5 ^{a)}
3	EHEN → 10 %CP	30.0 ^{b)}	0.83 ^{b)}	144.1 ^{b)}	4.60 ^{b)}	5.11 ^{b)}	101.2 ^{b)}	6.5 ^{b)}
4	EHEN → BD	26.0 ^{b)}	0.68 ^{b)}	142.9 ^{b)}	4.96 ^{b)}	5.04 ^{b)}	103.0 ^{b)}	6.2 ^{b)}
5	BD → 10 %PDP	60.6 ^{a)}	1.98 ^{a)}	149.8 ^{a)}	5.81 ^{a)}	3.03 ^{a)}	93.6 ^{a)}	17.1 ^{a)}
6	BD → 10 %PDP + 5 %PC	27.5 ^{b)}	1.11 ^{a,b)}	148.0 ^{a)}	6.16 ^{a)}	4.81 ^{b)}	97.4 ^{a)}	10.0 ^{a)}
7	BD → 10 %CP	26.6 ^{b)}	0.76 ^{b)}	144.3	4.69 ^{b)}	4.87 ^{b)}	102.6 ^{b)}	5.3 ^{b)}
8	BD (control)	27.8 ^{b)}	0.70 ^{b)}	142.5 ^{b)}	4.79 ^{b)}	5.00 ^{b)}	102.9 ^{b)}	5.8 ^{b)}

PDP, potassium dibasic phosphate; PC, potassium citrate; CP, calcium phosphate.

BD: basal diet.

^{a)} Significantly different from Group 8 ($p < 0.05$).

^{b)} Significantly different from Group 1 ($p < 0.05$).

Table 8. Urine analysis of nephrectomized rats treated with EHEN and test chemicals

Group	Treatment	BUN	Cr	Na	K	Ca	Cl	P	pH
1	EHEN → 10 %PDP	300 ^{a)}	13.6 ^{a)}	54.8 ^{a)}	38.6 ^{a)}	1.04 ^{a)}	37.8 ^{a)}	87.9 ^{a)}	8.0 ^{a)}
2	EHEN → 10 %PDP + 5 %PC	200 ^{a)}	36.4 ^{a)}	46.8 ^{a)}	13.6 ^{a,b)}	1.26 ^{a)}	34.0 ^{a)}	87.6 ^{a)}	8.1 ^{a)}
3	EHEN → 10 %CP	1552 ^{a)}	101.2	86.0 ^{a)}	584.2 ^{a)}	7.92	85.2 ^{a)}	131.2	8.4 ^{a)}
4	EHEN → BD	2577	107.8	114.0	294.6	13.32	185.5	144.7	6.7
5	BD → 10 %PDP	288 ^{a)}	12.8 ^{a)}	46.0 ^{a)}	33.4 ^{a)}	1.04 ^{a)}	32.4 ^{a)}	102.8 ^{a)}	8.0 ^{a)}
6	BD → 10 %PDP + 5 %PC	168 ^{a)}	14.8 ^{a)}	47.8 ^{a)}	33.0 ^{a)}	0.82 ^{a)}	28.2 ^{a)}	85.4 ^{a)}	8.0 ^{a)}
7	BD → 10 %CP	2112	123.6	126.0	679.0 ^{a)}	6.62 ^{a)}	112.4	227.4	8.4 ^{a)}
8	BD (control)	2456	128.2	103.0	284.8	10.86	158.4	193.8	6.2

PDP, potassium dibasic phosphate; PC, potassium citrate; CP, calcium phosphate.

BD: basal diet.

^{a)} Significantly different from Group 8 ($p < 0.05$).

^{b)} Significantly different from Group 1 ($p < 0.05$).

物を認めたが、PDP, PAS, CS のいずれの投与群においてもその増加は認められず、特に PDP 投与群ではほとんど検出されなかった(Photo. 6).

考 察

発癌過程は一般に直接または間接的に DNA 損傷をきたすことにより癌を発生させる場合と、DNA に影響をおよぼさないもののその過程で修飾ないし促進的に働く場合に分けられる。前者は多くの化学発癌物質として諸臓器において報告されている²⁴⁾。しかしながら、我々の日常生活環境中には、食餌を含む発癌修飾因子が数多く存在すると推定され、むしろ後者の nongenotoxic な物質の検討が急がれている。

腎においては腎毒性と腎発癌性の関係が従来から指摘されており¹⁷⁾²²⁾²⁵⁾²⁶⁾、著者は数多くの腎毒性を示す物質中とくに塩類の腎におよぼす影響について検討してきた。即ち、塩類の過剰摂取がもたらす腎障害と、その修飾機転から生じる細胞の再生～過形成性変化が腎発癌修飾に関与する可能性があると考えられるからである。

数多くの腎毒性を有する物質を比較的短期でその発癌性について検討するためには、従来の腎発癌二段階法では少なくとも 32 週以上有していた^{1)~6)}。多数の化学物質の全てについてその発癌性試験を実施することは現実的に難しく、そこで発癌性物質予知のための短期スクリーニング法として Ames 法や染色体異常法などが用いられているが、これらの長期発癌性試験と必ずしも一致した結果を示さないことがある。近年、発癌過程に出現する前癌病変などを指標として中期発癌試験法が各臓器において開発されてきた²⁷⁾。著者は片側腎摘出によって生じる残存腎組織の再生および過形成性変化が既知の腎腫瘍促進物質投与により腫瘍性病変へ進展していくか否かをまず検討した。その結果、非促進物質である diethylene glycol では、BrdU に示される尿細管上皮の細胞増殖能は高くはなく、adenomatous hyperplasia の発生も極めて低く、同時に腎腫瘍の発生は認められなかった。ところが他の腎腫瘍発生促進物質はいずれも adenomatous hyperplasia や renal cell tumor の発生が認められ、この発生頻度は従来報告されていた長期の発

癌実験における頻度と比較的相関するもので¹⁾。被検物質の作用強度に比例しているものと思われた。よって著者は、これらの前癌病変と BrdU-L. I. を指標とすることによってかなり早期に発癌性の有無を予測しようと考えた²⁹⁾。塩類の中でも、実際に生体におよぼす影響の可能性の高いものとして、動物の実験基礎食中に含有される塩類のうち尿細管に障害をおよぼし、再生像を伴うものを予備実験にて選択した。この中でもリン酸二カリウム (PDP) は予備実験投与の半分の濃度においても、この腎中期発癌実験で前腫瘍性病変ばかりか腎腫瘍の発生をも示した。他の硫酸アルミニウムカリウム (PAS) や硫酸銅 (CS) は強くないが再生尿細管上皮の増生傾向をみたものの、発癌修飾の因子となりえなかった。この PDP の腎発癌促進作用は、他の 2 被検物質と同様、血中電解質の変動は乏しいものの、わずかにカルシウムの低下とリンの上昇が認められたため、腎のカルシウム代謝に関わる腎毒性が腎発癌修飾に大きな因子となりうることを示唆させた。カルシウムの細胞内外におけるホメオスタシスの乱れが、細胞障害から細胞死に至り²⁹⁾、これらの一部に腫瘍発生促進作用を有するものが報告されている³⁰⁾。今回の実験では、リン酸カルシウムとして腎結石を形成し、これによる腎障害並びに慢性的腎症が腎腫瘍発生における促進作用あるいは修飾作用を示す原因と考えられた³¹⁾。そこで石灰沈着による慢性腎症を軽減する目的で、ヒトの尿管アシドーシスに用いられるアルカリ療法中、腎結石形成の阻害作用を有するクエン酸カリウムの投与を試みた³²⁾³³⁾。その結果では、腎石灰沈着の軽減が、腎症の軽減と相関し、これらはまた前腫瘍性病変の抑制効果をもたらした。また実験 4 の 10% PDP 投与群は、実験 3 の 5% PDP 投与群と比較して adenomatous hyperplasia や renal cell tumor の発生頻度の増加に用量相関関係を示した。以上の事実は、リン酸塩の過剰摂取によって高リン血症をきたし、カルシウムの排泄促進が生じ、低カルシウム血症となったと考えられる。その結果として、高濃度のリン酸とカルシウムが腎に排泄され尿細管にカルシウムの沈着が生じ、これに伴う腎症が相乗的に発生したと考えられた。これらの過程で EHEN によって initiate された尿細管上皮細胞は、再生及び過形成反応を通じて細胞増殖が高められ、腎腫瘍発生の母地となったと思われる。しかしながらリン酸カルシウム群では腎における石灰沈着も、また腎症も乏しく、これに相関して腎腫瘍の発生促進はみられなかった。同じリン酸塩で石灰沈着の本体であるカルシウム塩であるにも拘らずリン酸二カリウムと同様の発癌修飾作用がみられなかった。この理由としてリン酸カルシウムの吸収不良が考え

られた。即ち、リン酸カルシウムは解離係数が極めて低いために摂取しても溶解せず、吸収されなかったと推定される。

近年、無鉛ガソリンはじめ種々の腎毒性を存する物質が実験動物において腎発癌修飾ないし促進作用を有していることが明かとなってきた³⁴⁾⁻³⁶⁾。この機序として近位尿細管内への細胞内 α_{2u} -globulin の沈着が大きな役割を果たしていると考えられ、この物質の沈着による細胞障害と修復過程が問題となっている。この機序を明らかにする目的で、著者は α_{2u} -globulin に対する抗体を用いて尿管上皮細胞の障害との関係について検索したが、正常腎組織に比べむしろ減少していた。 α_{2u} -globulin が関与する発癌性と、塩類によって生じる特に石灰沈着との関係は全くないと考えられた。

尿路系の腫瘍、とりわけ膀胱³⁷⁾⁻⁴⁰⁾と腎⁴¹⁾⁻⁴³⁾ではその結石が腫瘍発生に関与するという報告があるが、今回の実験はこれらの報告と一致するもので、今後腎腫瘍発生の予防について一つの示唆を与えるものと思われる。以上、腎腫瘍の発生、促進および抑制作用について、塩類を中心とした腎毒性と腎発癌性について検討した。

結 語

ラットを用いた実験的腎腫瘍において、その中期発がん検索法を確立し、これを用いて種々の塩類を中心とした腎毒性物質と腎発癌修飾、促進作用ならびに抑制作用について検討し、以下の結論を得た。

1. EHEN 投与後、リン酸二カリウム (PDP) を連続投与すると、腎腫瘍性病変を増加させ、更に用量相関関係を示した。
2. 5% クエン酸カリウム (PC) によるアルカリ療法は、PDP により促進した腎腫瘍の発生を抑制した。
3. 以上の傾向は BrdU-labeling index と相関するとともに、腎症や腎の石灰沈着の程度と関連を示した。
4. PDP による腎症は α_{2u} -globulin が関与せず、これが腎腫瘍発生機序の要因ではないと考えられた。

謝 辞

稿を終るに当たり、終始御指導、御校閲を賜りました恩師日浅義雄教授に深甚の謝意を捧げるとともに、論文の御校閲、御助言を賜りました泌尿器科学教室岡島英五郎教授ならびに腫瘍病理学教室小西陽一教授に深謝いたします。更に直接御指導頂きました小西 登講師に感謝するとともに、第 2 病理学教室諸兄姉に感謝の意を表します。なお本研究の一部は厚生省がん研究助成の援助によった。本論文の一部は、第 81 回日本病理学会、第 51

回日本癌学会, 第9回日本毒性病理学会において発表した。

文 献

- 1) **Hiasa, Y.** and **Ito, N.** : Experimental induction of renal tumors. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **17** : 279-343, 1987.
- 2) **Tabata, S., Ohzono, H., Yamaguchi, H., Kitagawa, H., Uemura, H., Matsuki, H., Samma, S., Hirao, Y., Okajima, E., Kitahori, Y.** and **Hiasa, Y.** : Induction of nephrosis by β -cyclodextrin in beagles. *J. Toxicol. Pathol.* **4** : 67-73, 1991.
- 3) **Hiasa, Y., Ohshima, M., Kitahori, Y., Konishi, N., Fujita, T.** and **Yuasa, T.** : β -Cyclodextrin : promoting effect on the development of renal tubular cell tumors in rats treated with N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine. *J. Natl. Cancer Inst.* **69** : 963-967, 1982.
- 4) **Hiasa, Y., Enoki, N., Kitahori, Y., Konishi, N.** and **Shimoyama, T.** : DL-Serine : promoting activity on renal tumorigenesis by N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **73** : 297-299, 1984.
- 5) **Hiasa, Y., Ohshima, M., Kitahori, Y., Yuasa, T.** and **Miyashiro, A.** : Basic lead acetate : promoting effect on the development of renal tubular cell tumors in rats treated with N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine. *J. Natl. Cancer Inst.* **70** : 761-765, 1983.
- 6) **Hiasa, Y., Kitahori, Y., Konishi, N., Enoki, N., Shimoyama, T.** and **Miyashiro, A.** : Trisodium nitrilotriacetate monohydrate : promoting effects on the development of renal tubular cell tumors in rats treated with N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine. *J. Natl. Cancer Inst.* **72** : 483-489, 1984.
- 7) **Kurokawa, Y., Takahashi, M., Kokubo, T., Ohno, Y.** and **Hayashi, Y.** : Enhancement by potassium bromate of renal tumorigenesis initiated by N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine in F-344 rats. *Gann* **74** : 607-610, 1983.
- 8) **Shirai, T., Masuda, A., Imaida, K., Ogiso, T.** and **Ito, N.** : Effects of phenobarbital and carbazole on carcinogenesis of the lung, thyroid, kidney, and bladder of rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Jpn. J. Cancer Res.* **79** : 460-465, 1988.
- 9) **Hirose, M., Shirai, T., Tsuda, H., Fukushima, S., Ogiso, T.** and **Ito, N.** : Effect of phenobarbital, polychlorinated biphenyl and sodium saccharin on hepatic and renal carcinogenesis in unilaterally nephrectomized rats. *Carcinogenesis* **2** : 1299-1302, 1981.
- 10) **Diwan, B. A., Ohshima, M.** and **Rice, J. M.** : Promotion by sodium barbital of renal cortical and transitional cell tumors, but not intestinal tumors, in F344 rats given methyl(acetoxy-methyl)nitrosamina, and lack of effect of phenobarbital, amobarbital, or barbituric acid on development of either renal or intestinal tumors. *Carcinogenesis* **10** : 183-188, 1989.
- 11) **Diwan, B. A., Nims, R. W., Ward, J. M., Hu, H., Lubet, R. A.** and **Rice, J. M.** : Tumor promoting activities of ethylphenylacetylurea and diethylacetylurea, the ring hydrolysis products of barbiturate tumor promoters phenobarbital and barbital, in rat liver and kidney initiated by N-nitrosodiethylamine. *Carcinogenesis* **10** : 189-194, 1989.
- 12) **Shirai, T., Ohshima, M., Masuda, A., Tamano, S.** and **Ito, N.** : Promotion of 2-(ethyl-nitrosamine)ethanol-induced renal carcinogenesis in rats by nephrotoxic compounds : positive response with folic acid, basic lead acetate and N-(3,5-dichlorophenyl)succinamide but not with 2,3-dibromo-1-propanol-phosphate. *J. Natl. Cancer Inst.* **72** : 477-482, 1984.
- 13) **Landrigan, P. J., Goyer, R. A., Clarkson, T. W., Sandler, D. P., Smith, J. H., Thun, M. J.** and **Wedeen, R. P.** : The work-relatedness of renal disease. *Arch. Environ. Health* **39** : 225-230, 1984.
- 14) **McLaughlin, J. K., Blot, W. J., Mehl, E. S.** and **Fraumeni, J. F.** : Relation of analgesic use to renal cancer : population-based findings. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **69** : 217-222, 1985.
- 15) **Shalat, S. L., True, L. D., Fleming, L. E.** and **Pau, P. E.** : Kidney cancer in utility workers exposed to polychlorinated biphenyls(PCBs).

- Brit. J. Indust. Med. **46** : 823-824, 1989.
- 16) **Smith, A. H., Shearn, V. I. and Wood, R.** : Asbestos and kidney cancer : The evidence supports a causal association. *Am. J. Indust. Med.* **16** : 159-166, 1989.
 - 17) **Lock, E. A.** : Studies on the mechanism of nephrotoxicity and nephrocarcinogenicity of halogenated alkenes. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **19** : 23-42, 1988.
 - 18) **Kurtz, D. T., Sippel, A. E. and Feigelson, P.** : Effect of thyroid hormones on the level of the hepatic mRNA for α_{2u} -globulin. *Biochemistry* **15** : 1031-1036, 1976.
 - 19) **Konishi, N., Kitahori, Y., Shimoyama, T., Lin J.-C. and Hiasa, Y.** : Monoclonal antibody against rat renal cell tumor associated antigen as a new tool for the analysis of renal tumorigenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* **80** : 771-777, 1989.
 - 20) **Köhler, G. and Milstein, C.** : Contaneous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256** : 495-497, 1975.
 - 21) **Konishi, N., Diwan, B. A. and Ward, J. M.** : Amelioration of sodium barbital-induced nephropathy and regenerative tubular hyperplasia after a single injection of streptozotocin does not abolish the renal tumor promoting effect of barbital sodium in male F344/NCr rats. *Carcinogenesis* **11** : 2149-2156, 1990.
 - 22) **Konishi, N. and Ward, J. M.** : Increased levels of DNA synthesis in hyperplastic renal tubules of aging nephropathy in female F344/NCr rats. *Vet. Pathol.* **26** : 6-10, 1989.
 - 23) **小西 登** : 実験的腎腫瘍発生における形態学的変化と腫瘍関連抗原の発現に関する研究. *奈医誌.* **37** : 697-714, 1986.
 - 24) **伊東信行, 高橋道人** : 毒性試験講座 13, 発がん性. 地人書館, 東京, p169 1991.
 - 25) **Vamvakas, S. and Anders, M. W.** : Perturbation of calcium homeostasis as a link between acute cell injury and carcinogenesis in the kidney. *Toxicol. Lett.* **53** : 115-120, 1990.
 - 26) **Henschler, D. and Dekant, W.** : Nephrocarcinogenic xenobiotics. *Toxicol. Lett.* **53** : 105-110, 1990.
 - 27) **伊東信行, 高橋道人** : 毒性試験講座 13, 発がん性. 地人書館, 東京, p55, 1991.
 - 28) **Hiasa, Y., Konishi, N., Nakaoka, S., Nakamura, M., Nishii, S., Kitahori, Y. and Ohshima, M.** : Possible application to medium-term organ bioassays for renal carcinogenesis modifiers in rats treated with N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine and unilateral nephrectomy. *Jpn. J. Cancer Res.* **82** : 1385-1390, 1991.
 - 29) **Farber, J. L.** : Biology of disease : Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab. Invest.* **47** : 114-123, 1982.
 - 30) **Trump, B. G. and Berezsky, J.** : Iron regulation, cell injury and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **8** : 1027-1031, 1987.
 - 31) **Hiasa, Y., Konishi, N., Nakaoka, S., Nakamura, M., Nishii, K. and Ohshima, M.** : Promoting effects of potassium dibasic phosphate on early-stage renal carcinogenesis in unilaterally nephrectomized rats treated with N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine. *Jpn. J. Cancer Res.* **83** : 688-694, 1992.
 - 32) **Preminger, G. M., Sakhaee, K. and Pak, C. Y. C.** : Alkali action on the urinary crystallization of calcium salts : contrasting responses to sodium citrate and potassium citrate. *J. Urol.* **139** : 240-242, 1998.
 - 33) **Sakhaee, K., Nicar, M., Jacobson, H. and Pak, C. Y. C.** : Potassium alkali therapy of uric acid lithiasis may prevent complication of calcium stones. *Clin. Res.* **30** : 403A, 1982.
 - 34) **Short, B. G., Burnett, V. L., Cox, M. G., Bus, J. S. and Swenberg, J. A.** : Site-specific renal cytotoxicity and cell proliferation in male rats exposed to petroleum hydrocarbons. *Lab. Invest.* **25** : 264-577, 1987.
 - 35) **Shrot, B. G., Burnett, V. L. and Swenberg, J. A.** : Elevated proliferation of proximal tubule cells and localization of accumulated α_{2u} -globulin in F344 rats during chronic exposure to unleaded gasoline or 2, 2, 4-trimethylpentane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **101** : 414-431, 1989.
 - 36) **Goldsworthy, T. L., Lyght, O., Burnett, V. L.**

- and **Popp, J. A.** : Potential role of alpha-2u-globulin, protein droplet accumulation, and cell replication in the renal carcinogenicity of rat exposed to trichloroethylene, perchloroethylene and pentachloroethane. *Toxicol. Appl. Appl. Pharmacol.* **96** : 367-379, 1988.
- 37) **Shirai, T., Ikawa, E., Fukushima, S., Masui, T. and Ito, N.** : Uracil-induced urolithiasis and the development of reversible papillomatosis in the urinary bladder of F344 rat. *Cancer Res.* **46** : 2062-2067, 1986.
- 38) **Shirai, T., Tagawa, Y., Fukushima, S., Imaida, K. and Ito, N.** : Strong promoting activity of reversible uracil-induced with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Cancer Res.* **47** : 6726-6730, 1987.
- 39) **Miyakawa, M. and Yoshida, O.** : Induction of tumors of the urinary bladder in female mice following surgical implantation on glass beads and feeding of bracken fern. *Gann* **66** : 437-439, 1975.
- 40) **Chapman, W. H., Kirchhein, D. and McRoberts, J. W.** : Effect of the urine and calculus formation on the incidence of bladder tumors in rats implanted with paraffin wax pellets. *Cancer Res.* **33** : 1225-1229, 1973.
- 41) **Oesterling, J. E., Kerr, L. A. and Segura, J. W.** : Branched, struvite calculus and clear cell carcinoma in the same kidney. *Urology* **36** : 273-276, 1990.
- 42) 津久井 厚 : サンゴ状結石に合併した腎細胞癌の1例. *泌尿紀要* **26** : 321-325, 1980.
- 43) 倉内洋文, 町田豊平, 大石幸彦, 小野寺昭一, 赤坂雄一郎, 大西哲郎, 池本 庸, 山崎春城 : 手術中に偶然発見した腎腫瘍の2例. *泌尿紀要* **34** : 1617-1620, 1988.

Explanation of photos

- Photo. 1. Simple hyperplasia in a rat treated with EHEN, unilateral nephrectomy at week 20, showing a tubular pattern(HE X100).
- Photo. 2. Adenomatous hyperplasia in a rat treated with EHEN, unilateral nephrectomy and β -C at week 20, consisting of cells with abundant cytoplasm(HE X100).
- Photo. 3. Renal cell tumor in a rat treated with EHEN, unilateral nephrectomy and NTA at week 20. The lesion was larger than 3 times glomerular size (HE X40).
- Photo. 4. Lymphocyte accumulation and calcification (arrow) of kidney in a nephrectomized rat treated with EHEN and PDP (HE X250).
- Photo. 5. Calcification in a renal cell tumor of a nephrectomized rat treated with EHEN and 5 % PDP (HE X100).
- Photo. 6. Negative immunostaining of α_{2u} -globulin in the kidney of a nephrectomized rat treated with EHEN and 10 % PDP. Scattered positive tubular cell in the control kidney (insert) (ABC method, counter-stained with hematoxylin X40).

