

線溶調節を行う血管細胞に対するカドミウム及び鉛の毒性発現に関する研究

山本 千夏

北陸大学薬学部環境科学教室, 〒920-1181 金沢市金川町ホ-3

Toxicity of Cadmium and Lead on Vascular Cells That Regulate Fibrinolysis

Chika YAMAMOTO

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University,
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan*

(Received January 26, 2000)

Cadmium and lead are heavy metals that cause vascular lesions such as atherosclerosis and hypertension. Toxicity of cadmium and lead on the regulation of fibrinolysis by vascular-composing cells was investigated using a cell culture system. It was found that cadmium promotes the synthesis of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) whereas lead inhibits the synthesis of tissue plasminogen activator (t-PA) in vascular endothelial cells; consequently, both heavy metals reduced fibrinolytic activity in the liquid phase. The responses of endothelial cells to cadmium and lead were different from those to other heavy metals and the release of the fibrinolytic proteins from vascular smooth muscle cells and fibroblasts was perturbed by cadmium and lead in different manners. In conclusion, the present study showed that cadmium and lead exhibit their toxicity on fibrinolysis regulated by vascular cells in different manners among cell types and the individual cell types respond to cadmium and lead in different manners with respect to the release of fibrinolytic proteins.

Key words—cadmium; lead; fibrinolysis; endothelial cell; vascular smooth muscle cell; fibroblast

はじめに

心疾患及び脳血管疾患は日本人の死因別死亡率において2位及び3位を占めるだけでなく、その死亡率の合計は第1位の悪性新生物を上回り、公衆衛生学上の重要な問題となっている。この2つの死因の中では、心筋梗塞及び脳梗塞が大きな比率を占めている。これらは、発症部位は異なるが、どちらも血管内の血栓形成を伴う疾患で、死亡率だけでなく、罹患率の面からも近年注目されている。動脈硬化症及び高血圧症は互いに危険因子であり、心筋梗塞及び脳梗塞の基礎疾患として重要である。

動脈硬化病変は、一般的には血管内膜における血管平滑筋細胞の増殖、血管内及び血管組織内血液凝固、血管内皮傷害などの所見を呈する血管病変である。すなわち、動脈硬化巣内には結合組織に被覆された血管平滑筋細胞、マクロファージ、Tリンパ球の浸潤及び壊死像、脂肪蓄積や血栓が一般的に観察される。¹⁻³⁾ Rossらはこのような変化を内皮傷害に対する動脈壁の反応として考え、傷害反応仮説としてまとめている。⁴⁾ それによると、血管内皮細胞の機能障害が生じると内皮細胞のターンオーバーの亢進や内皮下組織への単球の侵入が起こる。内膜に侵入した単球はマクロファージへと分化し、変性した

脂質を取り込んで泡沫化し、血管平滑筋細胞に対する遊走・増殖因子である血小板由来増殖因子(PDGF)⁵⁾などの増殖因子を放出し、平滑筋細胞の内膜への遊走と増殖を促進する。さらに、血管内皮細胞が剥離するような傷害が加わると血管壁の抗血栓性が失われ、血小板の活性化作用を有する内皮下組織が血液と直接接することによって血小板の粘着・凝集が起こり、このとき血小板からPDGFを初めとする平滑筋細胞遊走・増殖因子が大量に放出され、血管平滑筋細胞の内膜への遊走及び増殖が加速されて血管内膜の肥厚斑が形成される。したがって、動脈硬化病変の発症の理解には、その初期段階としての内皮細胞機能障害の解明が不可欠である。

血管は内腔を一層に覆う血管内皮細胞、中膜を構成する血管平滑筋細胞及び外膜の線維芽細胞から成り、それぞれが機能を発現している‘生きた組織’である。近年、血管内皮細胞が血液成分と内皮下組織との接触を妨げる障壁として存在しているだけでなく、様々な因子を産生放出し、血管と血液の恒常性維持に寄与していることが明らかになってきた。血管内皮細胞は、一酸化窒素を本体とする内皮細胞由来弛緩因子⁶⁾及び持続的血管収縮因子であるエンドセリン⁷⁾を産生放出し、血管のトーンズの調節に

積極的に関与している。また、血管内腔は抗血栓性を維持しており、血液が非常に凝固しやすいものであるにもかかわらず通常血管内では凝固しないが、ひとたび血管内皮細胞が傷害を受けたときは速やかな血液凝固によって止血され、血管は修復される。このとき、不必要な血栓は線溶系によって除去される。このような血液の凝固・線溶を通じた血管の恒常性の維持は血管内皮細胞によって巧妙に調節されている。血管内皮細胞による血液凝固の調節は、血小板凝集抑制作用を有するプロスタサイクリン⁸⁾及びヘパリン様活性を有するヘパラン硫酸^{9, 10)}の産生放出、並びにトロンビンの凝固活性を抑制し抗凝固活性へ転換するトロンボモジュリン^{11, 12)}の保持によって行われるのに対し、線溶系の調節は組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA)¹³⁾及びその阻害因子であるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 (PAI-1)^{14, 15)}の2つの因子のバランスによって調節されている。PAI-1は液相中に放出されるとそのほとんどがすぐに不活性型 PAI-1 となり活性型 PAI-1 のみが t-PA と結合して不活性型複合体を形成する。¹⁶⁾ t-PA の他に、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (u-PA) も内皮細胞によって産生放出され t-PA と同様の活性を示すが、u-PA がフィブリン親和性をほとんど示さないのに対し、t-PA はフィブリンと高い親和性を有し、しかもフィブリンと結合することでその活性が増強される^{17, 18)}ことから、t-PA と活性型 PAI-1 のバランスが血管内の線溶調節に重要であるとされる。血管内皮細胞だけでなく血管平滑筋細胞及び線維芽細胞もまた t-PA 及び PAI-1 産生能を有しており、¹⁹⁻²¹⁾ 血管内皮細胞層の傷害時あるいは血管の破綻時に内皮下組織が血液と接したときの線溶調節に関与していると考えられている。

ところで、重金属と血管病変との関連については、古くから多くの報告があるが、一連の報告には2つの特徴があった。第1は、動脈硬化を含む血管病変を引き起こすとされる重金属として、カドミウム及び鉛が特に多く報告されてきたことである。例えば、疫学的にカドミウムの汚染地区に動脈硬化発症率が高く、²²⁾ 血管病変と環境カドミウム曝露には関連が見出され、^{23, 24)} 鉛についても高血圧症との関係²⁵⁾が報告されている。また、動物実験において、カドミウム及び鉛は動脈硬化及び高血圧を誘発する²⁶⁻³¹⁾という。しかしながら、第2の特徴は、このように血管病変を引き起こすとされるカドミウム及び鉛の細胞レベルでの毒性発現機序が全く不明であったことである。血管内皮細胞の機能障害が血管病変の発症・進展に重要であること、また動脈硬化病変を含む血管病変は一般に凝固促進性あるいは線溶活性の低下の結果と考えられる血栓形成性を伴うことから、内皮細胞が介在する線溶調節に対するカドミウム及び鉛の毒性発現を明らかにする必要がある。

る。

そこで、血管内皮細胞が調節する線溶系に対するこれら重金属の毒性発現を明らかにすることを目的として、カドミウム及び鉛に曝露した培養血管内皮細胞からの線溶蛋白の産生放出の変化及びその結果生じる液相の線溶活性の変化を細胞培養系を用いて検討した。さらに、内皮細胞の傷害時に線溶調節を行うとされる血管平滑筋細胞及び線維芽細胞についても同様の検討を行った。以下にこれらの結果について述べる。

1 血管内皮細胞の線溶調節に対するカドミウムの毒性発現³²⁻³⁶⁾

血液線溶系は血管内皮細胞が産生放出している t-PA と PAI-1 のバランスによって調節されている。線溶系の亢進あるいは凝固亢進による相対的な線溶活性の低下は、血栓症や全身出血傾向及びそれらに続く臓器の虚血性病変 (梗塞) の要因となる。血中の PAI-1 レベルの増大が血栓症の発症に重要な要因とする臨床的報告もあり、^{37, 38)} t-PA と PAI-1 のバランスの異常を明らかにすることは、動脈硬化病変に含まれる血栓形成を理解する上で重要である。そこで、まず培養血管内皮細胞を用いて線溶蛋白 (t-PA 及び PAI-1) の放出に対するカドミウムの作用を調べ、その結果生じる液相の線溶活性の変化について検討を加えた。線溶蛋白の放出及び液相の線溶活性に対するカドミウムの作用を Fig. 1 示す。血管内皮細胞からの t-PA 抗原 (t-PA: Ag) の放出は、2 μ M までのカドミウムによる影響を受けなかった。これに対し、PAI-1 抗原 (PAI-1: Ag) の放出は、1 μ M 以上のカドミウムによって濃度依存的に有意に増加していた。この結果は、カドミウムが血管内皮細胞からの PAI-1: Ag 放出を選択的に増加させることを示している。

カドミウムが PAI-1: Ag の放出を促進することが認められたので、次に、液相中の線溶活性に及ぼ

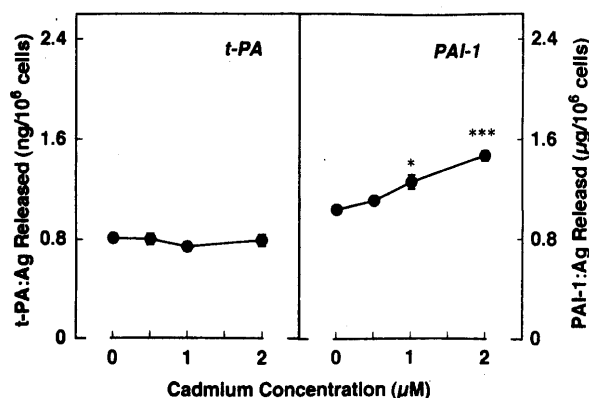


Fig. 1. Effect of Cadmium on the Release of t-PA: Ag and PAI-1: Ag from Cultured Vascular Endothelial Cells

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.5, 1 or 2 μ M). Values are means $\pm$ S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, * p < 0.05; *** p < 0.001.

Human umbilical vein endothelial cells

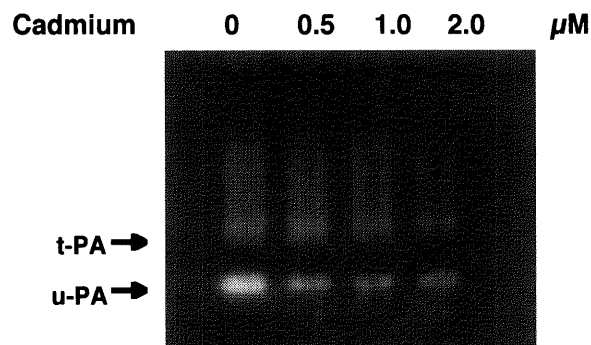


Fig. 2. Fibrin Zymography of the Conditioned Medium of Cultured Vascular Endothelial Cells

Confluent cultures of endothelial cells were incubated 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.5, 1 or 2 μM).

Table 1. Effect of Heavy Metals on the Release of PAI-1: Ag from Cultured Vascular Endothelial Cells

	PAI-1: Ag released (μg/10 ⁶ cells)
Control	1.291 ± 0.025
Cadmium	1.735 ± 0.002**
Lead	1.146 ± 0.074
Copper	1.487 ± 0.070
Nickel	1.650 ± 0.111*
Zinc	1.324 ± 0.039

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride, lead chloride, copper chloride, nickel chloride, and zinc sulfate at 1 μM each. Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the control, **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

すカドミウムの影響をカドミウム処理血管内皮細胞の培養上清のフィブリンゼイモグラフィー³⁹⁾によって検討した (Fig. 2). 培養上清には t-PA 及び u-PA の活性が認められたが、カドミウムは濃度依存的にそれぞれの活性を低下させていた。すなわち、血管内皮細胞において、カドミウムが選択的に PAI-1 産生を促進する結果、液相中の線溶活性が低下することが示された。

カドミウムで認められた PAI-1 の放出促進作用は、重金属に一般的な作用である可能性が考えられる。そこで、鉛、銅、ニッケル及び亜鉛に曝露した血管内皮細胞からの PAI-1 : Ag 放出を検討し、カドミウムの作用と比較した。Table 1 に示すように、カドミウム及びニッケルに PAI-1 : Ag 放出の促進作用が認められたが、カドミウムにおいてより強い促進が認められた。しかしながら、鉛、銅及び亜鉛にはそのような促進作用は認められなかった。したがって、カドミウムは血管内皮細胞において PAI-1 : Ag の放出を選択的に増加させる重金属の 1 つであり、重金属に一般的な作用ではないことが示され

Table 2. Accumulation of Cadmium in Cultured Vascular Endothelial Cells

	Cadmium accumulation (pmol/μg DNA)
Cotrol	N.D.
0.5 μM Cadmium	148.9 ± 5.2
1 μM Cadmium	167.3 ± 4.0
2 μM Cadmium	178.5 ± 8.2

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.5, 1, 2 or 5 μM). Values are means ± S.E. of five samples.

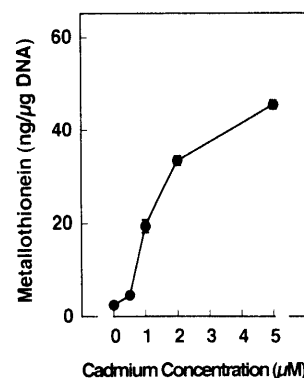


Fig. 3. Accumulation of Metallothionein in Cultured Vascular Endothelial Cells

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.5, 1 or 2 μM). Values are means ± S.E. of five samples.

た。

カドミウムによる血管内皮細胞から PAI-1 : Ag 放出促進作用が明らかになったが、カドミウムが細胞内に取り込まれているかどうかを確認するために、血管内皮細胞内へのカドミウムの蓄積を調べた (Table 2). 細胞内カドミウムの蓄積は、カドミウムの処理濃度に依存的に増加していた。そこで、重金属の毒性を軽減することが知られている低分子量蛋白であるメタロチオネイン⁴⁰⁾の蓄積を調べたところ (Fig. 3), 血管内皮細胞においてもメタロチオネインはカドミウムによって濃度依存的に誘導されており、PAI-1 : Ag 放出が細胞毒性が発現されないレベルのカドミウムによって起こることが示唆された。実際、本実験条件下では培地中への乳酸脱水素酵素 (LDH) の逸脱の増加は認められず、また酸不溶性画分への [¹⁴C] ロイシンの取り込みの阻害も認められなかった。

ところで、血管内皮細胞は自己分泌型機能調節因子の産生能を有している。塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は血管内皮細胞が産生している代表的な自己分泌型機能調節因子であるが、その分子中にはシグナル配列が存在せず、重篤に傷害された内皮細胞あるいは死細胞から逸脱し、その活性を発現すると考えられている。^{41, 42)} したがって、カドミウム

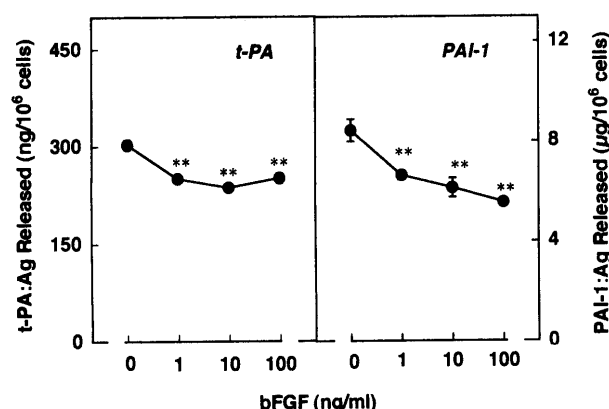


Fig. 4. Effect of bFGF on the Release of t-PA : Ag and PAI-1 : Ag from Cultured Vascular Endothelial Cells

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of bFGF (1, 10 or 100 ng/ml). Values are means $\pm$ S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, * p < 0.05; ** p < 0.01.

の PAI-1 : Ag 放出促進作用がカドミウムによって傷害された血管内皮細胞から逸脱した bFGF による二次的な作用である可能性が考えられるが、bFGF による線溶蛋白の産生放出の調節は不明であった。また、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) は血管内皮細胞からの PAI-1 放出を選択的に促進することが知られているサイトカインであるが、血管内皮細胞は TGF- β の産生能も有している。^{43,44)} そこでカドミウムの作用が TGF- β を介した二次的な作用である可能性も考えられる。

さらに、エンドセリン-1 は、血管内皮細胞において細胞内カルシウム依存性の経路を介してその産生放出が刺激されることが知られている血管収縮ペプチドである。カドミウムは細胞内においてカルシウムアナログとして働き得ることが知られている⁴⁵⁾ ので、カドミウムがカルシウム依存性の経路を刺激し、エンドセリン-1 の産生放出を増加させた結果、二次的に PAI-1 放出が促進された可能性も考えられる。しかしながら、エンドセリンによる線溶蛋白の産生放出への影響も不明であった。

そこで、カドミウムによる血管内皮細胞からの PAI-1 : Ag 放出促進作用が血管内皮細胞が産生する bFGF, TGF- β 及びエンドセリンを介した二次的な作用である可能性について検討した。

まず、血管内皮細胞からの線溶蛋白放出に対する bFGF の作用を検討した。Fig. 4 に示すように 1 ng/ml 以上の bFGF は血管内皮細胞からの PAI-1 : Ag 放出を濃度依存的に有意に抑制していた。t-PA : Ag 放出も bFGF によって有意に抑制されていた。線溶蛋白の放出に対する bFGF のこのような作用様式は、PAI-1 放出を選択的に促進させたカドミウムの作用様式とは全く異なっており、カドミウムの作用が bFGF を介したものであることが示唆された。

次に、エンドセリンについても同様の検討を行っ

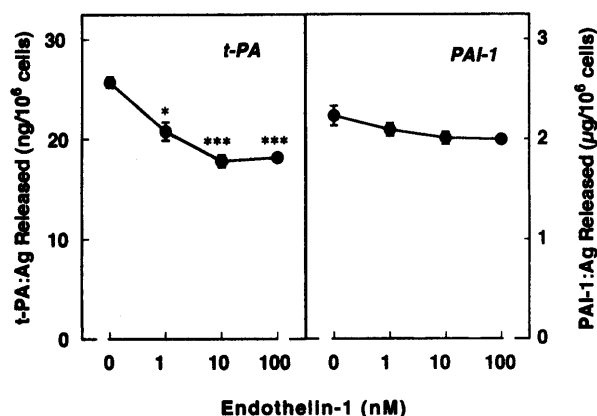


Fig. 5. Effect of Endothelin-1 on the Release of t-PA : Ag and PAI-1 : Ag from Cultured Vascular Endothelial Cells

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of bFGF (1, 10 or 100 nM). Values are means $\pm$ S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, * p < 0.05; *** p < 0.01.

Table 3. Effect of Anti-TGF- β Antibody on Cadmium-Induced Stimulation of PAI-1 : Ag Release from Vascular Endothelial Cells

	PAI-1 : Ag released (μ g/10 ⁶ cells)
Control	0.491 $\pm$ 0.018
Cadmium	0.622 $\pm$ 0.028
Anti-TGF- β antibody	0.729 $\pm$ 0.031
Cadmium + anti-TGF- β antibody	1.069 $\pm$ 0.036
Anti-IgG antibody	0.841 $\pm$ 0.023
Cadmium + anti-IgG antibody	1.106 $\pm$ 0.065

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride at 2 μ M each. Values are means $\pm$ S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, * p < 0.01; *** p < 0.001.

たところ、Fig. 5 に示すように 1 nM 以上のエンドセリン-1 は血管内皮細胞からの t-PA : Ag 放出を濃度依存的に有意に抑制していた。これに対し、PAI-1 : Ag 放出はエンドセリン-1 による影響を受けなかった。線溶蛋白の放出に対するエンドセリン-1 のこのような作用様式もカドミウムの作用様式とは全く異なっていた。したがって、カドミウムの PAI-1 放出促進作用がエンドセリン-1 を介したものであることも示唆された。

カドミウムの PAI-1 放出促進作用が TGF- β を介した二次的な作用である可能性を抗 TGF- β 中和抗体の存在下におけるカドミウムの作用を調べることによって検討した。Table 3 に示すように、カドミウムによる PAI-1 : Ag 放出促進作用は、抗 TGF- β 抗体の存在下においても認められた。したがって、カドミウムの PAI-1 放出促進作用が TGF- β を介したものであることも示唆された。

以上から、カドミウムが血管内皮細胞の PAI-1 の産生放出を選択的に促進する結果、液相中の線溶活

性を低下することが示された。すなわち、カドミウムが血管内皮細胞表層において血液を抗線溶に傾けることが示唆された。このようなカドミウムの作用は、自己分泌型機能調節因子による二次的な作用であるというよりも細胞内に蓄積した毒性発現型のカドミウムが PAI-1 産生を選択的に促進する細胞内情報伝達経路を刺激したものと推察された。カドミウムは単に直接的に血液凝固を促進する⁴⁶⁾だけでなく、血管内皮細胞が調節する線溶活性を低下させることを通じて血液の凝固促進性を強めることが推察された。

2 血管内皮細胞の線溶調節に対する鉛の毒性発現⁴⁷⁾

鉛は、カドミウムと同様に動脈硬化及び高血圧を引き起こすことが知られている^{26, 29-31)}が、細胞レベルでの毒性発現機序が不明であった重金属である。前述したように、カドミウムが血管内皮細胞からの PAI-1 放出を選択的に促進する結果、液相中の線溶活性を低下させることが明らかとなった。そこで、カドミウムと同様に血管病変を誘発する鉛についても、線溶蛋白の放出に対する作用を明らかにすることが必要である。そこで、培養血管内皮細胞を用いて t-PA 及び PAI-1 の放出に対する鉛の作用を調べ、その結果生じる液相の線溶活性の変化についても検討を加えるとともに、血管内皮細胞の線溶蛋白の放出を指標としたときの鉛の毒性発現様式をカドミウムの作用様式と比較した。

カドミウムの場合と同様にまず線溶蛋白の放出について検討した (Fig. 6)。t-PA : Ag については、2 μM 以上の鉛による有意な放出の抑制が認められた。これに対し、PAI-1 : Ag 放出については、10 μM までの鉛による有意な変化は認められなかった。この結果は、血管内皮細胞において鉛が t-PA 放出を選択的に抑制することを示している。血管内皮細胞の培養上清中の線溶活性をフィブリンゼイモグラフィで調べたところ、Fig. 7 に示すように、t-PA 及び u-PA の活性が認められたが、鉛による u-PA 活性の変化は認められず、一方 t-PA 活性は 5 μM の鉛によって低下していた。

鉛が血管内皮細胞からの t-PA 放出を抑制することが明らかになったので、鉛の作用の特異性を検討した。Table 4 に示すように、鉛、カドミウム、銅、ニッケル及び亜鉛に曝露した血管内皮細胞からの t-PA : Ag 放出を調べたところ、鉛にのみ有意な放出の抑制が認められた。このとき、ニッケルにも t-PA : Ag 放出を低下させる傾向が認められたが有意ではなく、その他の重金属には t-PA : Ag 放出抑制作用は認められなかった。すなわち、鉛は血管内皮細胞において t-PA の放出を選択的に促進する特有の重金属であることが示された。

鉛が血管内皮細胞からの t-PA 放出を抑制することが示されたが、このような作用が生理的因子に介

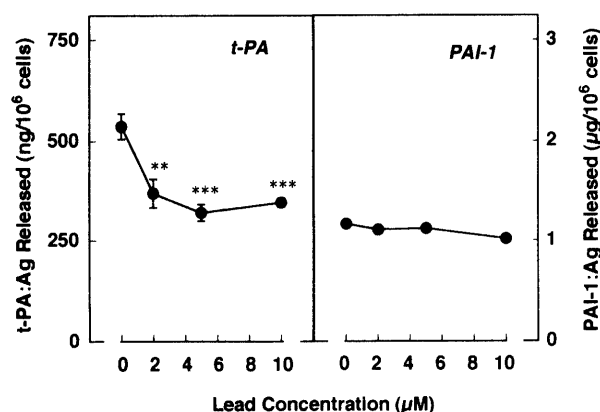


Fig. 6. Effect of Lead on the Release of t-PA : Ag and PAI-1 : Ag from Cultured Vascular Endothelial Cells

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (2, 5 or 10 μM). Values are means $\pm$ S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Human umbilical vein endothelial cells

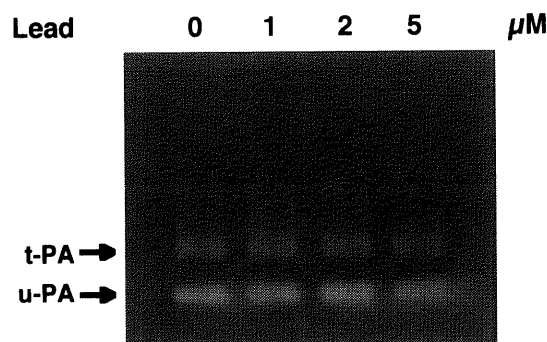


Fig. 7. Fibrin Zymography of the Conditioned Medium of Cultured Vascular Endothelial Cells

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (1, 2 or 5 μM).

Table 4. Effect of Heavy Metals on the Release of t-PA : Ag from Cultured Vascular Endothelial Cells

	t-PA : Ag released (ng/10 ⁶ cells)
Control	144.4 $\pm$ 4.5
Lead	128.4 $\pm$ 4.0*
Cadmium	149.8 $\pm$ 8.7
Copper	134.7 $\pm$ 0.5
Nickel	126.5 $\pm$ 7.3
Zinc	134.3 $\pm$ 5.2

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride, cadmium chloride, copper chloride, nickel chloride, and zinc sulfate at 1 μM each. Values are means $\pm$ S. E. of four samples. Significantly different from the control, * $p < 0.05$.

在される線溶調節に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、t-PA 放出を促進することが報告されているトロンビン⁴⁸⁾と先に t-PA 放出を抑制すること

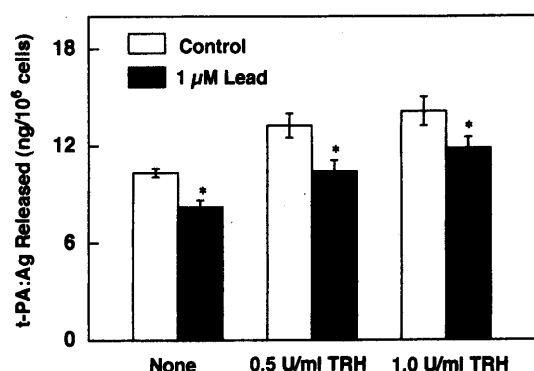


Fig. 8. Effect of Lead on the Thrombin-Induced Increase in the Release of t-PA:Ag from Cultured Vascular Endothelial Cells

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead (1 μM) combined with or without thrombin (0.5 or 1.0 NIH units/ml). Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, **p* < 0.05. THR, thrombin.

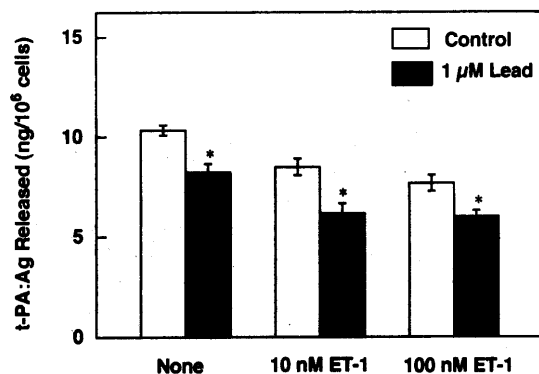


Fig. 9. Effect of Lead on the Endothelin-1-Induced Increase in the Release of t-PA:Ag from Cultured Vascular Endothelial Cells

Confluent cultures of endothelial cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead (1 μM) combined with or without endothelin-1 (10 or 100 nM). Values are means ± S.E. of four samples. Significantly different from the corresponding control, **p* < 0.05. ET-1, endothelin-1.

が明らかになったエンドセリン-1⁴⁹⁾存在下における鉛の作用について調べた。Fig. 8に、トロンビン存在下における鉛の作用を示す。血管内皮細胞からのt-PA:Ag放出はトロンビンによって有意に促進された。これに対し、鉛はトロンビン存在下においてもt-PA:Ag放出を有意に抑制し、トロンビンによる刺激は減弱された。次に、エンドセリン-1存在下における鉛の作用を検討したところ、Fig. 9に示すように、鉛のt-PA:Ag放出抑制作用はエンドセリン-1存在下でも認められた。すなわち、エンドセリン-1による血管内皮細胞のt-PA:Ag放出の抑制が鉛によって強められることが示された。

これらの結果から、生理的因子であるトロンビン及びエンドセリン-1によるt-PA放出の調節が、鉛によって抑制的な修飾を受けることが示唆された。

以上の結果から、鉛が自発的なt-PA放出を抑制するだけでなく、生理的因子によるt-PA放出の促

進的調節に対しては阻害的に作用し、抑制的調節に対しては過剰な抑制を誘発し、線溶系の正常な調節を妨げることが示唆される。

鉛によるt-PA放出の減少の機序としては(i)プロテインキナーゼCの阻害⁵⁰⁾(ii)細胞内cyclic AMP量の増加⁵¹⁾(iii)細胞内カルシウムの増加⁴⁹⁾の可能性が考えられる。鉛処理血管内皮細胞における[¹⁴C]ロイシンの取り込み及びLDHの培地中への逸脱を調べたが変化はなく、鉛の作用が細胞傷害及び非特異的蛋白合成の変化による可能性は排除できる。鉛は細胞内カルシウムを増加させるだけでなく⁵²⁾細胞内でカルシウムアナログとして作用し得る⁵³⁾。しかしながら、エンドセリンは細胞内カルシウム量を増加させ^{54,55)}その結果t-PAの産生放出を抑制する⁴⁹⁾にもかかわらず、エンドセリン-1存在下でも鉛によるt-PA放出の抑制が認められたことから、鉛の作用が細胞内カルシウム依存性の経路を介しているとは考えにくい。最近著者らは鉛がアデニレートシクラーゼ活性化剤フォルスコリンの存在下においてもt-PA:Ag放出を抑制するが、ホスホジエステラーゼ阻害剤IBMX及び8-bromo cyclic AMPの存在下では鉛の作用は消失し、鉛がホスホジエステラーゼを阻害することによって細胞内cyclic AMPを増加させ、t-PAの産生放出を抑制する可能性を示している⁵⁶⁾。

カドミウムが血管内皮細胞からのPAI-1放出を選択的に促進することによって液相の線溶活性を低下させるのに対し、鉛はt-PA放出を選択的に抑制することによって液相の線溶活性を低下させることが示された。すなわち、血管内皮細胞の線溶調節において、カドミウムはPAI-1の産生放出に対して毒性を発現するのに対し、鉛はt-PAの産生放出に対して毒性を発現することが明らかとなった。これらの結果は、カドミウムと鉛が血管内皮細胞の線溶調節に対して異なる作用様式で共に線溶活性を低下させる重金属であることを示していた。

3. 血管平滑筋細胞及び線維芽細胞の線溶調節に対するカドミウム及び鉛の毒性発現^{57,58)}

動脈は、内腔を一層に覆う血管内皮細胞、中膜の血管平滑筋細胞及び外膜の線維芽細胞から構成されている。血管内皮細胞が血液と直接接する唯一の細胞であり血液凝固・線溶系の調節を通じて血管内凝固を防ぐことを最も重要な役割としているのに対し、血管平滑筋細胞及び線維芽細胞の主な役割はそれぞれ血管のトーンスの調節及び血管組織構造の維持であるとされる。しかしながら、ひとたび内皮細胞層が重篤に傷害を受けた場合及び血管が破綻した場合、血管平滑筋細胞及び線維芽細胞は血液と接することになり、このとき凝固・線溶系の調節に関与すると考えられる。

ところで、血管平滑筋細胞は動脈硬化病変の進展にともない中膜へ遊走・増殖し内膜肥厚斑を形成す

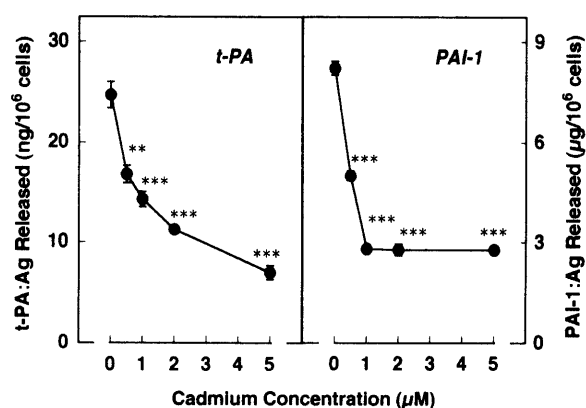


Fig. 10. Effect of Cadmium on the Release of t-PA : Ag and PAI-1 : Ag from Cultured Vascular Smooth Muscle Cells

Confluent cultures of vascular smooth muscle cells were incubated 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (2, 5 or 10 μM). Values are means ± S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Human vascular smooth muscle cells

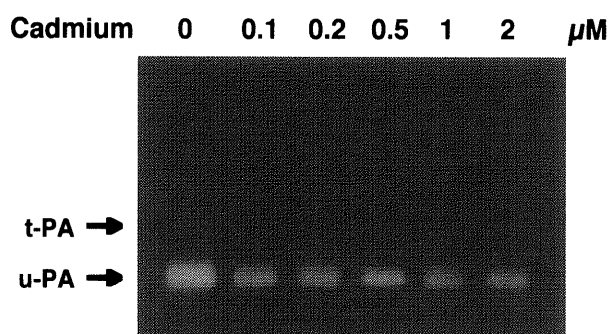


Fig. 11. Fibrin Zymography of the Conditioned Medium of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells

Confluent cultures of vascular smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.1, 0.2, 0.5, 1 or 2 μM).

るが、そのような場合には一般的に血栓が存在し、凝固促進性と動脈硬化病変との関連が示唆される。血管内皮細胞だけでなく、血管平滑筋細胞及び線維芽細胞も t-PA 及び PAI-1 の産生能を有し、¹⁹⁻²¹⁾ 生理的には血管内皮細胞層の傷害時及び血管破綻時の線溶活性の調節に関与するものと考えられている。しかしながら、内皮下組織における線溶活性が低下したときフィブリン塊の除去が不十分となり、結果的に凝固促進性の所見を呈することが起こり得る。実際、動脈硬化病変を含む動脈で PAI-1 遺伝子の発現が亢進している例が報告されている。³⁸⁾ したがって、動脈硬化病変の発症・進展に寄与し得るとされるカドミウム及び鉛が、内皮下組織を構成する血管平滑筋細胞及び線維芽細胞の線溶調節にどのような作用様式で毒性を発現するのかを明らかにする必要がある。

これまでの検討において、カドミウムは PAI-1 放出の選択的な促進を通じて、また鉛は t-PA 放出の

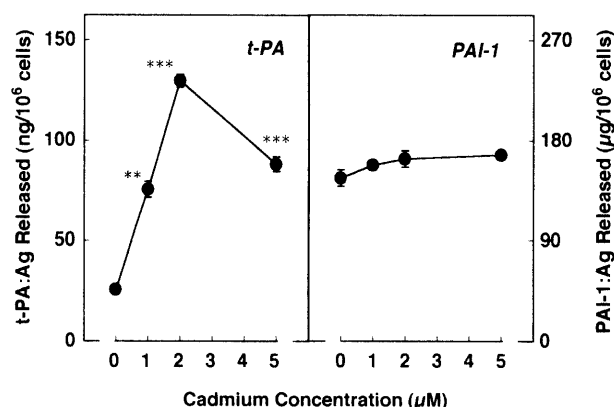


Fig. 12. Effect of Cadmium on the Release of t-PA : Ag and PAI-1 : Ag from Cultured Fibroblasts

Confluent cultures of fibroblasts were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (1, 2 or 5 μM). Values are means ± S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Fibroblastic IMR-90 cells

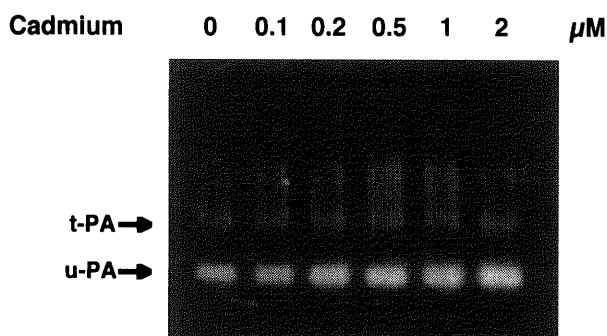


Fig. 13. Fibrin Zymography of the Conditioned Medium of Cultured Fibroblasts

Confluent cultures of fibroblasts were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of cadmium chloride (0.1, 0.2, 0.5, 1 or 2 μM).

選択的な抑制を通じて、ともに血管内皮表層の線溶活性を低下させることが明らかになった。そこでこれらの知見を基に、血管平滑筋細胞及び線維芽細胞の線溶蛋白放出に対するカドミウム及び鉛の作用を検討し、内皮下組織の線溶調節に対するカドミウム及び鉛の毒性発現様式を調べた。

Fig. 10 に、血管平滑筋細胞からの t-PA : Ag 及び PAI-1 : Ag 放出に対するカドミウムの作用を示す。t-PA : Ag 及び PAI-1 : Ag 放出は、カドミウム濃度に依存的にともに抑制されていた。そこで、カドミウム処理血管平滑筋細胞の液相の線溶活性をフィブリンザイモグラフィーで検討したところ、Fig. 11 に示すように、カドミウム処理血管平滑筋細胞の培養上清中には u-PA 活性は検出されたが、t-PA 活性は検出されなかった。この u-PA 活性はカドミウム濃度に依存的に低下していた。カドミウムに曝露した血管平滑筋細胞から培地中へ逸脱した LDH の活性及び細胞層酸不溶性画分への [³H] ロイシンの取り込みを調べたところ、t-PA : Ag 及び PAI-1 : Ag 放

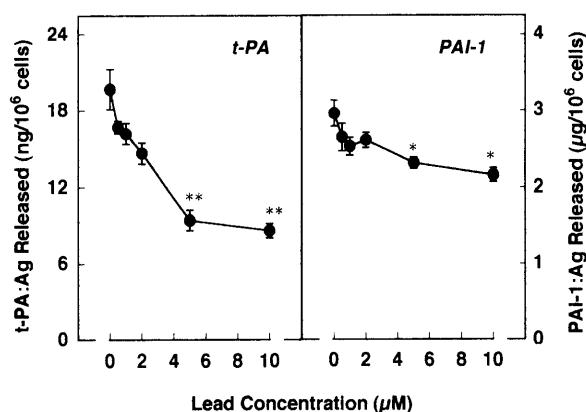


Fig. 14. Effect of Lead on the Release of t-PA : Ag and PAI-1 : Ag from Cultured Vascular Smooth Muscle Cells

Confluent cultures of vascular smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (0.5, 1, 2, 5 or 10 μM). Values are means ± S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, * p < 0.05; ** p < 0.01.

Human vascular smooth muscle cells

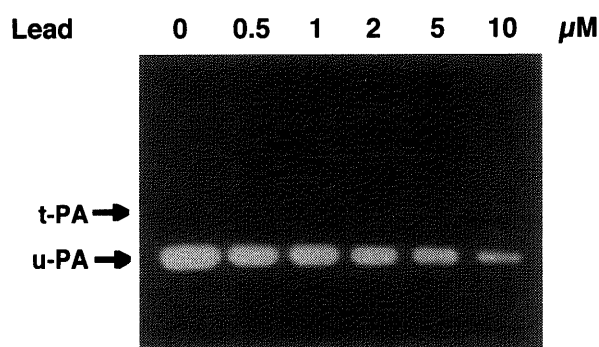


Fig. 15. Fibrin Zymography of the Conditioned Medium of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells

Confluent cultures of vascular smooth muscle cells were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (0.5, 1, 2, 5 or 10 μM).

出の抑制が認められた濃度のカドミウムによる LDH の逸脱増加及び [³H] ロイシンの取り込みの減少は認められず、血管平滑筋細胞においてカドミウムが細胞毒性の発現や蛋白合成の抑制を伴わずに t-PA 及び PAI-1 放出を抑制し得ることが示唆された。

Fig. 12 に、線維芽細胞の線溶蛋白の放出に対するカドミウムの作用を示す。線維芽細胞からの t-PA : Ag 放出は、1 μM 以上のカドミウムによって有意に増加していた。これに対し、PAI-1 : Ag 放出は 5 μM 以下のカドミウムによる影響を受けなかった。カドミウム処理線維芽細胞の液相の線溶活性を調べたところ、t-PA 及び u-PA の活性が認められ、ともにカドミウム濃度に依存的に上昇していた (Fig. 13)。この条件下では、[³H] ロイシンの取り込みに有意な変化は認められなかった。カドミウムによる t-PA : Ag 放出の促進が 2 μM で最大となり 5 μM のカドミウムでは抑制されているのは細胞毒性

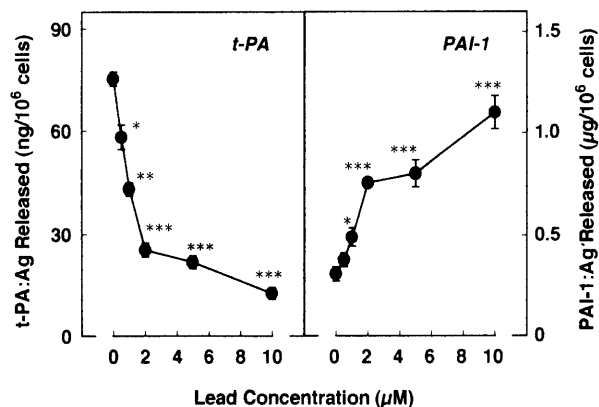


Fig. 16. Effect of Lead on the Release of t-PA : Ag and PAI-1 : Ag from Cultured Fibroblasts

Confluent cultures of fibroblasts were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (0.5, 1, 2, 5 or 10 μM). Values are means ± S.E. of six samples. Significantly different from the corresponding control, * p < 0.05; ** p < 0.001.

Fibroblastic IMR-90 cells

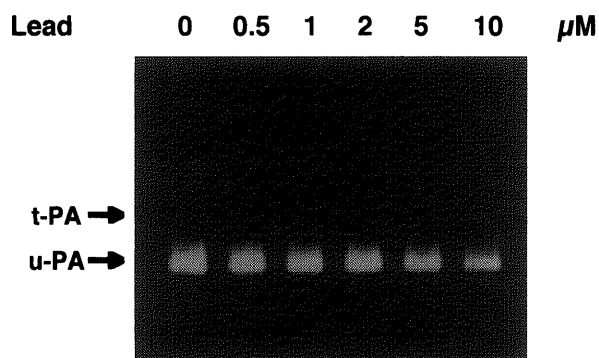


Fig. 17. Fibrin Zymography of the Conditioned Medium of Cultured Fibroblasts

Confluent cultures of fibroblasts were incubated at 37°C for 24 h in the presence or absence of lead chloride (0.5, 1, 2, 5 or 10 μM).

を発現したためと LDH の結果から推察される。しかしながら、2 μM 以下のカドミウムは細胞毒性の発現及び非特異的な蛋白合成の変化を伴わずに線維芽細胞からの t-PA 放出を選択的に促進し、その結果液相の線溶活性が上昇することが示唆された。

Fig. 14 に、血管平滑筋細胞からの線溶蛋白の放出に対する鉛の作用を示す。t-PA 及び PAI-1 放出は鉛によってともに有意に抑制されていたが、t-PA 放出においてより強い抑制が認められた。液相の線溶活性については、u-PA 活性だけが検出されたが、鉛による活性低下が観察された (Fig. 15)。

Fig. 16 に、線維芽細胞からの t-PA : Ag 及び PAI-1 : Ag の放出に対する鉛の作用を示す。線維芽細胞においては、鉛は t-PA : Ag 放出を濃度依存的に抑制していた。しかしながら、PAI-1 : Ag 放出は逆に鉛濃度に依存的に増加していた。このとき、鉛処理線維芽細胞の液相の線溶活性は低下していた (Fig. 17)。

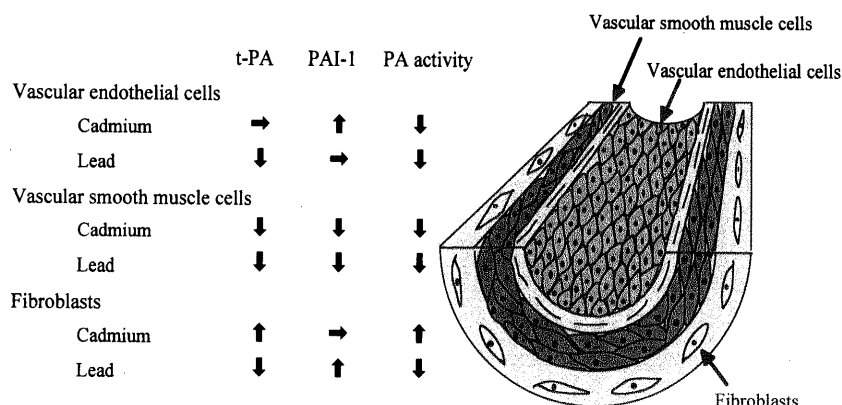


Chart 1. The Release of Fibrinolytic Proteins and the Fibrinolytic Activity in the Liquid Phase of Vascular Cells after Exposure to Cadmium or Lead.

↑, stimulation; ↓, inhibition; →, no effect.

血管内皮下組織構成する血管平滑筋細胞及び線維芽細胞も t-PA 及び PAI-1 産生能を有し、内皮細胞層の傷害時あるいは血管組織の破綻時の線溶系を調節するとされる。カドミウム及び鉛がともに血管平滑筋細胞からの t-PA 及び PAI-1 放出を抑制することが示された。PAI-1 は液相に放出されると大部分が潜在型となって t-PA との不活性型複合体の形成能を失い、一部の活性型だけが線溶系の調節に関与する¹⁶⁾ ので、カドミウム及び鉛に曝露した血管平滑筋細胞においては、t-PA 放出の減少が線溶活性に強く反映したものと推察される。血管平滑筋細胞の培養上清においては t-PA 活性が検出されなかったが、カドミウム及び鉛による u-PA 活性の低下が認められ、t-PA が液相で減少していたことから t-PA 活性も低下し、全体として線溶活性は低下していると推察される。

一方、線維芽細胞においては、カドミウムは t-PA 放出を選択的に刺激し、結果として液相の t-PA 活性が上昇した。これに対し、鉛は t-PA 放出を顕著に抑制し、PAI-1 放出を逆に顕著に促進する結果、液相の線溶活性を低下させた。すなわち、線溶蛋白の放出を指標としたとき、線維芽細胞はカドミウムと鉛に対して全く異なった応答を示した。このようなカドミウムと鉛の毒性発現様式の違いは、血管内皮細胞においても認められたものであり、同一の重金属が細胞種に依存した様式で毒性を発現するだけでなく、同一の細胞種が異なる重金属に対して異なる様式で応答することが明らかとなった。

以上より、線溶蛋白の放出を指標としたとき、同一の重金属が血管内皮細胞、血管平滑筋細胞及び線維芽細胞に対して細胞種に依存した様式で毒性を発現するだけでなく、同一の細胞種がカドミウム及び鉛に対して異なった様式で応答し得ること、さらに t-PA 放出及び PAI-1 放出のカドミウム及び鉛に対する応答が必ずしも共役していないことが明らかになった。これらの結果は、血管組織においてカドミウム及び鉛が線溶調節の制御を複雑に攪乱すること

を示唆し、これらの重金属によって引き起こされる血管病変²⁶⁾ や出血性血管傷害⁵⁹⁾ の発症機序に線溶調節の異常が含まれる可能性を示していた。

おわりに

血管病変を誘発するとされるカドミウム及び鉛の細胞レベルでの毒性発現を明らかにする目的で、血管病変を理解する上で重要な血管内皮細胞、血管平滑筋細胞及び線維芽細胞の線溶調節に対するカドミウム及び鉛の毒性発現様式を細胞培養系を用いて検討し、以下の結果を得た。

1) 血管内皮細胞において、カドミウムは細胞毒性の発現及び蛋白合成レベルの変化を起こさない条件下で t-PA の産生放出には影響を及ぼさず PAI-1 の産生放出を選択的に促進し、液相の線溶活性を低下させることが示された。このような PAI-1 の産生放出促進は、カドミウムに特有な作用であった。したがって、カドミウムは PAI-1 の産生放出を選択的に促進する特有の重金属として、内皮細胞が調節する線溶活性の低下を通じて血液の凝固促進性を強め、動脈硬化を含む血管病変の発症と進展に寄与するものと考えられた。

2) これに対し、鉛は血管内皮細胞による PAI-1 の産生放出に影響を及ぼさずに t-PA 放出を選択的に抑制し、液相の線溶活性を低下させることが示された。鉛は内皮細胞による t-PA の産生放出を選択的に抑制する特有の重金属であった。したがって、鉛はカドミウムと同様に、内皮細胞が調節する線溶活性の低下を通じて血液の凝固促進性を強め、動脈硬化を含む血管病変の発症と進展に寄与するものと考えられたが、その毒性発現様式はカドミウムとは全く異なることが明らかとなった。

3) 血管平滑筋細胞において、カドミウム及び鉛はともに t-PA 及び PAI-1 の産生放出を抑制し、結果として液相の線溶活性を低下させることが示唆された。一方、線維芽細胞においては、カドミウムが PAI-1 の産生放出には影響を及ぼさず t-PA の産生放出を選択的に促進することによって液相の線溶活

性を上昇させるのに対し、鉛は t-PA の産生放出を抑制するだけでなく PAI-1 の産生放出を促進することによって液相の線溶活性を低下させることが示された。したがって、カドミウム及び鉛は同一の細胞種に対して異なる様式で毒性を発現するだけでなく、各細胞種は同一の重金属に対して異なる様式で応答することが明らかとなった (Chart 1)。

著者らの研究室では、カドミウム及び鉛が細胞層の維持,⁶⁰⁾ 修復,⁶¹⁾ 増殖,^{62, 63)} やヘパラン硫酸代謝^{64, 65)} など血管構成細胞に対して多様な毒性を発現することを明らかにしている。本研究の結果は、カドミウム及び鉛が血管を構成する細胞が行う線溶調節を攪乱することを示すとともに、カドミウム及び鉛に対する血管内皮細胞、血管平滑筋細胞及び線維芽細胞の多様な応答様式と各細胞種に対するカドミウム及び鉛の特有な毒性発現様式を明らかにするものであった。

謝辞 本研究の細部にわたり終始御懇篤な御指導を賜りました北陸大学薬学部環境科学教室 鍛冶利幸助教授に深甚なる感謝の意を表しますとともに、御指導並びに御鞭撻を賜りました富山医科薬科大学狐塚 寛名誉教授並びに小泉富美朝名誉教授に深謝致します。本研究は北陸大学環境科学教室で行われたものであり、同教室の皆様にご心より御礼申し上げます。また、有意義な御助言を頂きました富山医科薬科大学薬学部毒性学教室 根本信雄教授に深く感謝致します。最後に、本研究は、文部省科学研究費補助金奨励研究 (A) 及び北陸大学特別研究助成によって遂行されましたことを付記します。

REFERENCES

- 1) Moore S., *Diabetes*, **30**, 8-13 (1981).
- 2) Wight T. N., *Arteriosclerosis*, **69**, 1-20 (1989).
- 3) Small D. M., *Arteriosclerosis*, **8**, 103-129 (1988).
- 4) Ross R., *Nature* (London), **362**, 801-809 (1993).
- 5) Ross R., *Science*, **248**, 1009-1012 (1990).
- 6) Palmer R. M. J., Rees D. D., Ashton D. S., Moncada S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 1251-1256 (1987).
- 7) Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T., *Nature* (London), **332**, 411-415 (1988).
- 8) Moncada S., Vane J. R., *Pharmacol. Rev.*, **30**, 293-331 (1979).
- 9) Shimada K., Kusumoto I., Ozawa T., *Experientia*, **41**, 671-673 (1985).
- 10) Marcum J. A., Atha D. H., Fritze L. M. S., Nawroth P., Stern D., Rosenberg R. D., *J. Biol. Chem.*, **261**, 7507-7515 (1986).
- 11) Esmon D. T., Owen W. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 2249-2252 (1981).
- 12) Maruyama I., Salem H. H., Majerus P. W., *J. Clin. Invest.*, **74**, 224-230 (1984).
- 13) Levin E. G., Loskutoff D. J., *J. Cell Biol.*, **94**, 631-636 (1982).
- 14) Mourik J. A. V., Lawrence D. A., Loskutoff D. J., *J. Biol. Chem.*, **259**, 14914-14921 (1984).
- 15) Gelehrter T. D., Sznycer-Laszuk R., *J. Clin. Invest.*, **77**, 165-169 (1986).
- 16) Levin E. G., *Blood*, **67**, 1309-1313 (1986).
- 17) Hoylaerts M., Rijken D. C., Lojnen H. R., Collen D., *J. Biol. Chem.*, **257**, 2912-2919 (1982).
- 18) Ranby M., *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 461-469 (1982).
- 19) Herbert J. M., Lamarche I., Prabonnaud V., Dol F., Gauthier T., *J. Biol. Chem.*, **269**, 3076-3080 (1994).
- 20) Wojta J., Gallicchio M., Zoellner H., Hufnagel P., Last K., Filoonzi E. L., Binder B. R., Hamilton J. A., McGrath K., *Thromb. Haemost.*, **70**, 469-474 (1993).
- 21) Hala E. G., Wikson E. L., Dowdle E. B., *Cell*, **34**, 273-279 (1983).
- 22) Houtman J. P., *Sci. Total Environ.*, **38**, 31-36 (1993).
- 23) Carroll R. E., *J. Am. Med. Assoc.*, **198**, 267-269 (1966).
- 24) Engvan J., Perk J., *Arch. Environ. Health*, **40**, 185-190 (1985).
- 25) Menditto A., Morisi G., Spagnolo A., Menotti A., *Environ. Health Perspect.*, **102**, 107-111 (1994).
- 26) Revis N. W., Zinsmeister A. R., Bull R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 6494-6498 (1981).
- 27) Schroeder H. A., Vinton W. H., *Am. J. Physiol.*, **202**, 515-518 (1962).
- 28) Perry H. M., Erlanger M. W., Perry E. F., *Arch. Environ. Health*, **38**, 80-85 (1983).
- 29) Perry H. M., Erlanger M. W., Perry E. F., *Environ. Health Perspect.*, **78**, 107-111 (1988).
- 30) Chai S. S., Webb R. C., *Environ. Health Perspect.*, **78**, 85-89 (1988).
- 31) Lal B., Murthy R. C., Anand M., Chandra S. V., Kumar R., Tripathi O., Srimal R. C., *Drug Chem. Toxicol.*, **14**, 305-318 (1991).
- 32) Yamamoto C., Kaji T., Sakamoto M., Koizumi F., *Thromb. Res.*, **67**, 619-624 (1992).
- 33) Yamamoto C., Kaji T., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **83**, 215-223 (1993).
- 34) Yamamoto C., Kaji T., Furuya M., Sakamoto

- M., Kozuka H., Koizumi F., *Thromb. Res.*, **73**, 255-263 (1994).
- 35) Kaji T., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., Koizumi F., *Life Sci.*, **54**, 1563-1569 (1994).
- 36) Yamamoto C., Kaji T., Sakamoto M., Kozuka H., Koizumi F., *Thromb. Res.*, **74**, 163-168 (1994).
- 37) Dawson S., Henny A., *Atherosclerosis*, **95**, 105-117 (1992).
- 38) Schneiderman J., Sawdey M. S., Keeton M. R., Bordin G. M., Bernstein E. F., Dilley R. B., Loskutoff D. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 6998-7002 (1992).
- 39) Matsuo C., Fukao H., Matsuo O., *J. Cell. Physiol.*, **134**, 253-260 (1988).
- 40) Probst G. S., Bousquet W. F., Miya T. S., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **39**, 61-69 (1977).
- 41) Gajdusek C. M., Carbon S., *J. Cell. Physiol.*, **139**, 570-579 (1989).
- 42) Rifkin D. B., Moscatelli D., *J. Cell Biol.*, **109**, 1-6 (1989).
- 43) Keski-Oja J., Raghow R., Sawdey M., Loskutoff D. J., Postlethwaite A. E., Kang A. H., Moses H. L., *J. Biol. Chem.*, **263**, 3111-3115 (1988).
- 44) Schleef R. R., Bevilacqua M. P., Sawdey M., Gimbrone M. A., Loskutoff D. J., *J. Biol. Chem.*, **263**, 5797-5803 (1988).
- 45) Habermann E., Crowell K., Janicki P., *Arch. Toxicol.*, **54**, 61-70 (1983).
- 46) Carson S. D., Konigsberg W. H., *Science*, **208**, 307-309 (1980).
- 47) Kaji T., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **73**, 219-227 (1992).
- 48) Levin E. G., Marzec U., Anderson J., Harker L. A., *J. Clin. Invest.*, **74**, 1988-1995 (1984).
- 49) Kaji T., Yamamoto C., Sakamoto M., Koizumi F., *Blood Coagulat. Fibrinol.*, **3**, 5-10 (1992).
- 50) Grulich-Henn J., Müller-Burghaus G., *Blut*, **61**, 38-44 (1990).
- 51) Francis R. B. Jr., Neely S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1012**, 207-213 (1989).
- 52) Goldstein G. W., Wolinsky J. S., Csjetey J., *Ann. Neurol.*, **1**, 235-239 (1977).
- 53) Goldstein G. W., Ar D., *Life Sci.*, **33**, 1001-1006 (1983).
- 54) Takuwa Y., Kasuya Y., Takuwa N., Yanagisawa M., Goto K., Kasaki T., Yamashita K., *J. Clin. Invest.*, **85**, 653-658 (1990).
- 55) Yokoyama K., Kohno M., Yasunari K., Murakawa K., Takeda T., *Hypertension*, **18**, 304-315 (1991).
- 56) Yamamoto C., Kaji T., *J. Health Sci.*, **45**, 119-125 (1999).
- 57) Yamamoto C., Kaji T., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **106**, 179-185 (1996).
- 58) Yamamoto C., Miyamoto A., Sakamoto M., Kaji T., Kozuka H., *Toxicology*, **117**, 153-161 (1997).
- 59) Arvidson B., *Environ. Res.*, **32**, 240-246 (1983).
- 60) Kaji T., Mishima A., Yamamoto C., Sakamoto M., Koizumi F., *Toxicology*, **71**, 267-276 (1992).
- 61) Fujiwara Y., Kaji T., Sakurai S., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **117**, 193-198 (1997).
- 62) Kaji T., Fujiwara Y., Hoshino M., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **95**, 87-92 (1995).
- 63) Fujiwara Y., Kaji T., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **98**, 105-110 (1995).
- 64) Ohkawara S., Yamamoto C., Fujiwara Y., Sakamoto M., Kaji T., *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **3**, 187-194 (1997).
- 65) Kaji T., Ohkawara S., Nakajima M., Yamamoto C., Fujiwara Y., Miyajima S., Koizumi F., *Toxicology*, **118**, 1-10 (1997).