

重金属の血管毒性に関する細胞生物学的研究

鍛冶利幸

Cell Biology of Heavy Metal Toxicity in Vascular Tissue

Toshiyuki KAJI

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

(Received November 25, 2003)

Cadmium and lead are heavy metals that have been shown to induce vascular disorders such as atherosclerosis in experimental animals. However, little is known about the mechanisms by which cadmium and lead induce vascular toxicity. The toxicity was investigated using a culture system of vascular endothelial and smooth muscle cells. Cadmium destroys the monolayer of endothelial cells and the cytotoxicity is protected by zinc and copper without metallothionein induction. On the other hand, lead does not exhibit cytotoxicity but inhibits the repair of endothelial monolayers after wounding by a lower response to endogenous basic fibroblast growth factor mediated by suppression of the synthesis of perlecan, a large heparan sulfate proteoglycan. In addition, cadmium and lead reduce endothelial fibrinolytic activity by induction of plasminogen activator inhibitor type 1 synthesis and by inhibition of tissue-type plasminogen activator, respectively. In vascular smooth muscle cells, cadmium and lead can promote their proliferation and influence proteoglycan synthesis and fibrinolysis in different manners. These results indicate that cadmium and lead have specific toxicities in the proliferation, fibrinolysis, and extracellular matrix formation of vascular endothelial and smooth muscle cells.

Key words—cadmium; lead; vascular toxicity; atherosclerosis; heavy metal

1. はじめに—重金属毒性研究は今日的課題

衛生薬学・公衆衛生学において、動脈硬化症、高血圧症、糖尿病などいわゆる生活習慣病が日本を含む先進国共通の重要問題となっている。このうち、動脈硬化症は、日本人の死因別死亡率の上位を占める虚血性心疾患や脳血管疾患の基礎病変として重要である。動脈硬化病変の pathogenesis は単純ではなく、また、その詳細には不明な点が多い。しかしながら、Ross らはこの病変を血管内皮の機能障害に対する血管壁の炎症性不可逆的応答として捉え、いわゆる Ross の傷害反応説としてそのメカニズムをまとめている。^{1,2)} すなわち、動脈血管は内腔を一層で被う血管内皮細胞とそれを取り囲む血管中膜を構成する血管平滑筋細胞、さらにそれを取り巻く線

維芽細胞から成るが、内皮細胞が慢性的な物理的あるいは機能的傷害を受けると、内皮細胞のターンオーバーの亢進や内皮下組織（血管内膜）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）などの種々の因子を放出し、平滑筋細胞の中膜から内膜への遊走とそこでの増殖を促す。さらに内皮細胞が剥離するような傷害が加わると、血管内皮の抗血栓性が低下し、血小板の粘着・凝集とそれに続く PDGF などの因子が大規模に放出され、血管平滑筋細胞の遊走と増殖がさらに加速され、血管内膜の肥厚、すなわち動脈硬化病変が進展していく（Fig. 1）。

重金属が動脈硬化症の重要な原因であるとする考えは広く認められているという訳ではない。しかしながら、重金属は多様な毒性を発現するので、動脈硬化症の直接的な原因ではないとしても、その発症と進展を加速する可能性は否定できない。実際、そ

北陸大学薬学部環境科学教室（〒920-1181 金沢市金川町ホ-3）

e-mail: t-kaji@hokuriku-u.ac.jp

*本総説は、平成14年度宮田記念学術論文賞の受賞を記念して記述したものである。

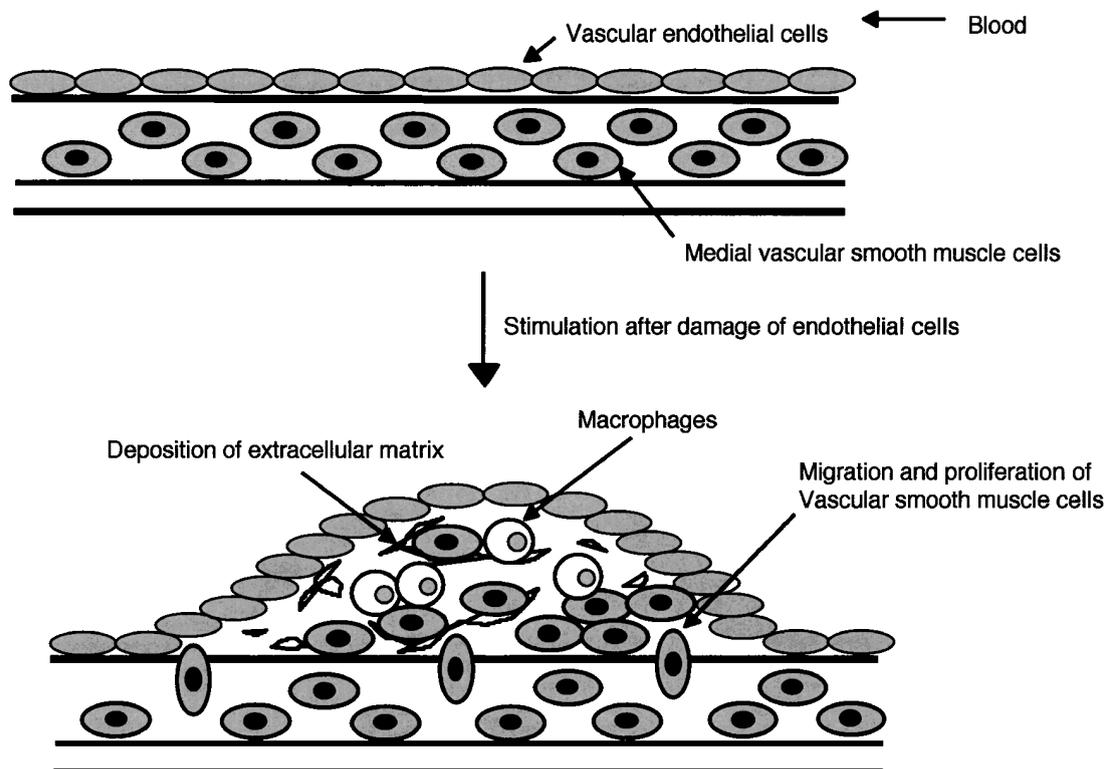


Fig. 1. “Response to Injury Theory” by Ross

In atherosclerosis, vascular smooth muscle cells proliferate in the intima of vascular wall after damage of vascular endothelial cells.

うした観点からこれまで多くの研究が行われてきた。その結果、重金属の中で特にカドミウムと鉛が疫学的研究や動物実験において動脈硬化症やそのリスクファクターの1つである高血圧症を誘発することが報告されてきた。³⁻¹⁷⁾ その他の重金属については報告がない訳ではないが、カドミウムと鉛に関する報告が特別に多い。すなわち、少なくともカドミウムと鉛については、動脈硬化症と関連する血管毒性を発現すると推察することができる。

一方、カドミウムの急性毒性が基本的に血管傷害の二次的影響である¹⁸⁾ という仮説が提唱されたように、血管毒性の解明は重金属毒性とそのメカニズムの理解に不可欠である。しかしながら、カドミウムと鉛の血管毒性に関する研究は、疫学的調査や動物実験に留まり、細胞レベルあるいは分子レベルでの研究が遅れていた。

そこで筆者らは血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の培養系を用いて重金属、特にカドミウムと鉛の血管毒性について研究を行ってきた。以下にその結果を概説する。

2. 内皮細胞に対するカドミウムの毒性発現

前述のように、動脈硬化病変の発症には内皮細胞傷害が極めて重要である。そこで最初に、内皮細胞層の維持に対するカドミウムの作用について検討した。¹⁹⁾ カドミウムは内皮細胞に対して極めて高い細胞毒性を示し、その結果、細胞層に空隙を発生させた。カドミウムの細胞毒性に対し、ヒト肝由来 Chang liver 細胞やブタ腎上皮 LLC-PK₁ 細胞に比べ内皮細胞及び血管平滑筋細胞は高い感受性を示し、これは血管の細胞ではメタロチオネイン誘導が十分でない上にカドミウムが蓄積し易いためであることが分かった。^{20,21)} 次に、カドミウムの内皮細胞に対する細胞毒性に及ぼす他の重金属の影響を調べた。その結果、亜鉛と銅にカドミウムの細胞毒性の軽減効果があることが分かった。^{22,23)} しかも、興味深いことに、そのような軽減効果は従来確立されているメカニズムとは異なったメカニズムで起こっていた。すなわち、例えば、亜鉛によるカドミウムの毒性の軽減はよく知られている現象であるが、これは亜鉛がメタロチオネインを誘導し、それにより親和性の高いカドミウムが結合することによって解毒

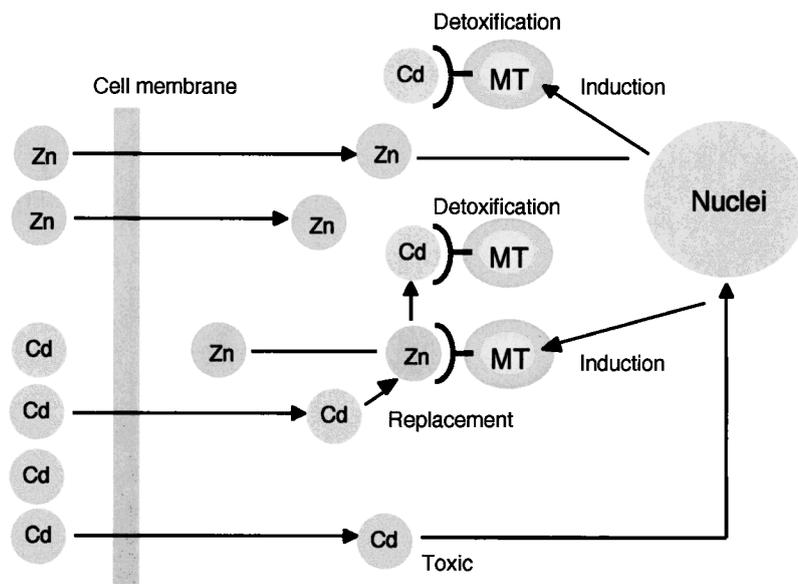


Fig. 2. The Established Mechanism for Zinc Protection against Cadmium Toxicity

Zinc enters cells and induces metallothionein that sequesters cadmium. In addition, zinc bound to metallothionein is replaced by cadmium. As the result, cadmium toxicity is protected by zinc.

されることによると理解されてきた (Fig. 2)。実際、カドミウムは内皮細胞に対して強い細胞毒性を示すが、メタロチオネインに結合したカドミウムは細胞毒性を示さない。²⁴⁾ 一方、内皮細胞に対するカドミウムの細胞毒性は、メタロチオネインの誘導ではなく亜鉛や銅が細胞内へのカドミウムの蓄積を減少することによって起こっていた。

3. 内皮細胞に対するカドミウムと亜鉛の相互作用メカニズム—“希釈効果”

そこで、内皮細胞におけるカドミウムと亜鉛の相互作用メカニズムについて詳細に検討した。カドミウムと亜鉛を共存させたとき、カドミウムによる内皮細胞層の空隙の発生は著明に抑制されたが、このとき亜鉛及び亜鉛とカドミウムの共存によるメタロチオネインの誘導は全く認められず、細胞内へのカドミウムの蓄積の顕著な減少と亜鉛の蓄積増加が観察された。²⁵⁾ 同様の結果は、内皮細胞をあらかじめ亜鉛で前処理し、その後に亜鉛フリーの培地でカドミウムによって処理した場合にも認められた。²⁶⁾ この結果は、内皮細胞におけるカドミウムと亜鉛の相互作用が両重金属の取り込み段階における単純な拮抗によるものではないことを示唆している。

さらに内皮細胞以外の cell type についても同様の検討を行い、血管平滑筋細胞、Chang liver 細胞及び LLC-PK₁ 細胞においてメタロチオネイン誘導

に依存しないメカニズムで亜鉛がカドミウムの細胞毒性を軽減することを確認した。^{27,28)} しかしながら、例えば Chang liver 細胞においては、高レベルの亜鉛で前処理したときにはメタロチオネインの高い誘導が起こり、そのことによってカドミウムの細胞毒性が効率よく軽減されることも確認した。²⁸⁾ すなわち、亜鉛はメタロチオネイン誘導に必要な細胞内濃度を得られるまではカドミウムの細胞内蓄積を抑制することによってその細胞毒性を軽減し、いったんメタロチオネイン誘導に必要な閾値を超えるとその誘導によってカドミウムを解毒することが示唆された。

このうち、特に内皮細胞で明瞭に観察された、亜鉛によるメタロチオネイン誘導に依存しないカドミウム毒性の軽減メカニズムを筆者らは以下のように考えている。細胞内に侵入した亜鉛は一部メタロチオネインを誘導するが、これはカドミウムの細胞毒性を軽減するためには十分ではない。他方、細胞内でイオンとして滞留した亜鉛は細胞外のカドミウムと拮抗する。すなわち、細胞内の亜鉛はあたかもカドミウムの濃度勾配を低下させるイオンとして働き、カドミウムの細胞内への受動輸送と蓄積が低下するので、その細胞毒性は軽減される。したがって、細胞内では見掛け上、カドミウムが亜鉛によってその濃度が希釈されている状態となる。そこで、

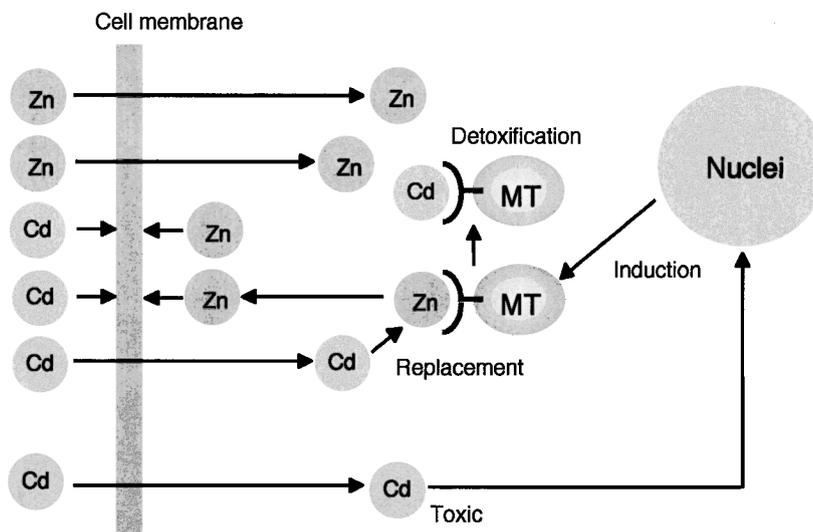


Fig. 3. “Dilution Effect, A New Theory” of Interaction between Zinc and Cadmium

Entrance of cadmium into cells (typically vascular endothelial cells) is prevented by zinc within the cells. Concentration of intracellular cadmium is apparently diluted by intracellular zinc, resulting in a prevention of cadmium toxicity.

筆者らはこの相互作用を「希釈効果」と呼んでいる (Fig. 3).

内皮細胞においては、亜鉛によるメタロチオネイン誘導は低い。²⁵⁾ そのため希釈効果がより顕著に重要に機能するものと思われる。実際、いくつかの金属イオンについて内皮細胞に対するメタロチオネイン誘導能を調べ、ビスマスが比較的強い誘導金属であることを見つけているが、²⁹⁾ ビスマスもカドミウムの細胞毒性を軽減することができなかった。³⁰⁾ したがって、内皮細胞や血管平滑筋細胞^{20,21)} ではメタロチオネイン誘導が低いことが特性の1つであり、それには何らかの生理的意義があるものと思われるが、詳細は不明である。

4. 線維素溶解現象（線溶）に対するカドミウム及び鉛の作用

線溶は血栓（フィブリン塊）をプラスミンが溶解する現象である。この現象に対する重金属の作用の解明は、重金属の血管毒性を理解する上で、極めて重要な課題である。通常、血管組織において線溶調節を最も重要に担っているのは内皮細胞である。内皮細胞は組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) を合成・分泌しており、³¹⁾ これが血液中のプラスミノゲンをプラスミンに変換する。プラスミンは血液凝固の結果生成したフィブリン塊を溶解する。一方、内皮細胞は t-PA 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 型

(PAI-1) も合成・分泌している。³²⁾ PAI-1 は液相に分泌されると速やかに潜在型となりその活性を失うが、一部は活性型として t-PA と不活性型複合体を形成しこれを失活させる。³³⁾ 内皮細胞は t-PA と同様の活性を持つウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (u-PA) も合成・分泌しているが、t-PA がフィブリンと高い親和性を有し、しかもフィブリンとの結合によってその活性が増大するのに対し、u-PA はフィブリンとの親和性がほとんどないことから、線溶調節には t-PA の方が中心的役割を果たしていると考えられている。^{34,35)} また、t-PA と PAI-1 の合成調節はかならずしもカップリングしておらず、線溶活性は最終的に t-PA と活性型 PAI-1 のバランスに依存する。

筆者らはカドミウムと鉛が内皮細胞の線溶活性を低下させる特異的な重金属であることを見出し、その作用様式について検討した。その結果、カドミウムによる線溶活性の低下が protein kinase C の活性化に基づく PAI-1 の合成誘導によって起こること、それに対し、鉛による線溶活性の低下は細胞内 cAMP の増加に基づく t-PA の分泌が低下することに起因することを明らかにした (Fig. 4)。³⁶⁻³⁹⁾ また、カドミウムと鉛は血管平滑筋細胞及び線維芽細胞に対しても線溶活性を低下させるが、線溶蛋白の分泌に対してはそれぞれ内皮細胞とは異なる様式で作用することも示した。^{40,41)} すなわち、線溶蛋白の

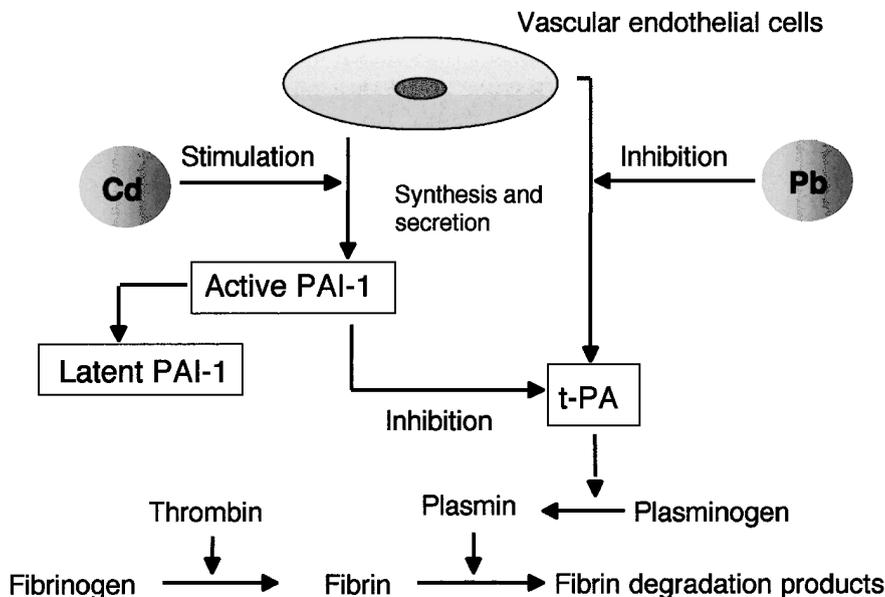


Fig. 4. Fibrinolytic System Mediated by Vascular Endothelial Cells

Fibrinolytic activity depends on the balance between t-PA and active PAI-1 synthesized and secreted by vascular endothelial cells. Cadmium stimulates the synthesis and the secretion of PAI-1, whereas lead inhibits those of t-PA. As the result, both heavy metals reduces the fibrinolytic activity of vascular endothelial cells.

合成・分泌については、それぞれの cell type は特定の重金属に対して異なる応答を示し、一方、それぞれの重金属は特定の cell type に特有の作用を示すことが分かった。以上の詳細については、Yamamoto の優れた総説⁴²⁾に詳しく述べられている。

5. 内皮細胞に対する鉛の作用

鉛はカドミウムとともに血管毒性を発現する重金属として知られてきた重金属である。しかしながら、前述のようにカドミウムが細胞毒性を発現し内皮細胞層に空隙を発生させるのに対し、鉛にはそのような作用は認められなかった。⁴³⁾ 一方、内皮細胞層をあらかじめ人為的に傷害し、その修復の過程に鉛を作用させたところ、鉛による修復の強い阻害が観察された。⁴⁴⁾ 形態学的観察から、鉛が内皮細胞増殖を阻害していることが推察されたので、それについて検討したところ、鉛が内皮細胞の増殖を強く阻害する特異な重金属であることが分かった。⁴⁵⁾ 細胞傷害性の強いカドミウムを別とすれば、内皮増殖の阻害は鉛にのみ認められ、他の重金属では起こらない。⁴¹⁾ 亜鉛は鉛とは逆に内皮細胞の増殖を促進し、⁴⁶⁾ 傷害内皮の修復を促す。⁴⁷⁾

ところで、内皮細胞増殖は通常自らが発現している内因性塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) に

よって制御されている。FGF-2 にはシグナル配列がなく、内皮細胞が傷害されたときや生理的に死に至ったとき細胞外へと逸脱し、これが近傍の内皮細胞に作用して内皮細胞層の修復を促す。⁴⁸⁾ 一方、FGF-2 はそのレセプターに結合して活性を発現するが、この結合はヘパラン硫酸によって加速される。⁴⁹⁾ そこで、鉛による内皮細胞増殖の阻害メカニズムを検討したところ、鉛がヘパラン硫酸プロテオグリカンの大型分子種パルカンの合成を選択的に阻害し、そのことによって内因性の FGF-2 に対する内皮細胞の応答性が低下することが分かった。^{50,51)} このようなプロテオグリカン合成の異常に基づく内皮増殖の阻害というメカニズム⁵²⁾は極めてユニークなものである (Fig. 5)。

6. 血管平滑筋細胞増殖に対するカドミウム及び鉛の作用

カドミウムと鉛は作用様式こそ異なるが、内皮細胞層の維持と言う点では共通してこれを傷害することが示されたので、次に血管平滑筋細胞に対する作用を検討した。血管平滑筋細胞はカドミウムの細胞毒性に対して極めて高い感受性を示すが、^{20,21)} カドミウムの濃度レベルが低いときには逆にその増殖は促進された。⁵³⁾ 前述のように、鉛は内皮細胞に対しては強い増殖阻害作用を示すが、血管平滑筋細胞に

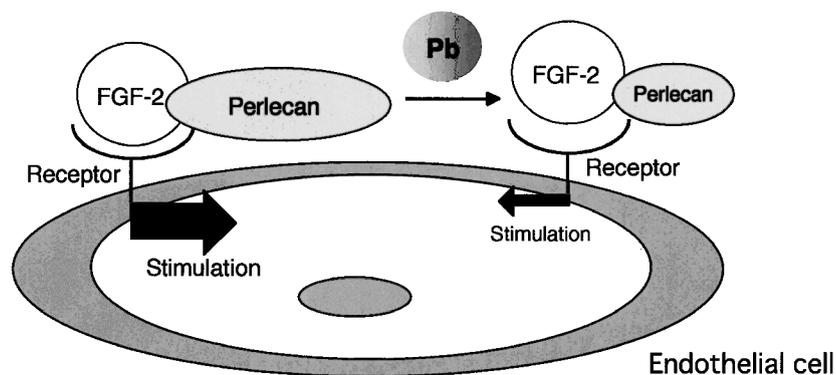


Fig. 5. A Possible Mechanism for Lead Inhibition of Vascular Endothelial Cell Proliferation

Lead inhibits the synthesis of perlecan, a large heparan sulfate proteoglycan that promotes the binding of endogenous FGF-2 to the receptor.

対しては増殖促進作用を示した。⁵⁴⁾ これに対し、亜鉛は単独では血管平滑筋細胞の増殖に影響を及ぼさなかったが、トロンボスポンディン⁵⁵⁾やFGF⁵⁶⁾による増殖刺激を増強した。これらの結果は、必須微量元素である亜鉛は、生理的に血管壁の修復が必要ときに細胞増殖因子の活性増強を通じてその修復過程に寄与するのに対し、毒性重金属であるカドミウムと鉛はそのような細胞増殖因子との相互作用を介さず血管壁の修復とは無関係に血管平滑筋細胞の増殖を刺激し動脈硬化病変の進展に寄与する可能性が推察される。

7. おわりに

以上、細胞レベルにおける重金属（特にカドミウムと鉛）の血管毒性に関する筆者らの研究について概説した。上記以外にも、動脈硬化病変の形成と血管平滑筋細胞の増殖に関わるプロテオグリカン代謝の異常について検討を進めてきているが、⁵⁷⁻⁶⁵⁾ 未解決の問題が多く残っている。さらに、内皮細胞と血管平滑筋細胞の機能調節におけるメタロチオネインの特有な役割や必須微量元素の代謝など、今後検討すべき課題も多い。これらの諸課題が、ヒトへの健康の問題⁶⁶⁾と関連させられつつ重金属毒性学の立場から詳細に解明されることを期待する。

謝辞 本研究の一部は科学研究費補助金並びに北陸大学特別研究助成により遂行された。その遂行に当たり、富山医科薬科大学 故 狐塚 寛名誉教授及び小泉富美朝名誉教授からは終始ご指導と激励を賜った。また、本研究は、北陸大学薬学部環境科学教室において遂行されたが、教室の山本千夏講

師、藤原泰之講師、三島 篤博士、大河原 晋博士、平賀祥一博士他、学生諸君の多大な協力をいただいた。これらの方々に深甚なる謝意を表する。

REFERENCES

- 1) Ross R., *New Engl. J. Med.*, **340**, 115-126 (1999).
- 2) Ross R., *Nature*, **362**, 801-809 (1993).
- 3) Schröder H. A., *J. Chronic Dis.*, **18**, 647-665 (1965).
- 4) Revis N. W., Major T. C., Horton C. Y., *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **4**, 293-303 (1980).
- 5) Revis N. W., Zinsmeister A. R., Bull R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 6494-6498 (1981).
- 6) Niwa A., Suzuki A., *J. Toxicol. Sci.*, **7**, 51-60 (1982).
- 7) Evans D. E., Weingarten K., *Toxicology*, **61**, 275-281 (1990).
- 8) Subramanyam G., Bhaskar M., Govindappa S., *Indian Heart J.*, **44**, 177-180 (1992).
- 9) Staessen J. A., Amery A., Bernard A., Bruaux P., Buchet J. P., Bulpitt C. J., Claeys F., De Plaen P., Ducoffre G., Fagard R., Lauwers R. R., Lijnen P., Nick L., Saint Remy A., Roels H., Rondia D., Sartor F., Thijs L., *Am. J. Epidemiol.*, **134**, 257-267 (1996).
- 10) Dingwall-Fordyce I., Lane R. E., *Br. Ind. Med.*, **20**, 313-315 (1963).
- 11) Pirkle J. L., Schwartz J., Landis J. R., Harlan W. R., *Am. J. Epidemiol.*, **121**, 246-258 (1985).
- 12) Tomera J. F., Harakal C., *Arch. Int. Phar-*

- macodyn.*, **283**, 295–302 (1986).
- 13) Perry H. M., Erlanger M. W., Perry E. F., *Environ. Health Perspect.*, **78**, 107–111 (1988).
 - 14) Lal B., Murthy R. C., Anand M., Chandra S. V., Kumar R., Tripathi O., Srimal R. C., *Drug Chem. Toxicol.*, **14**, 305–318 (1991).
 - 15) Schwartz J., *Environ. Health Perspect.*, **91**, 71–75 (1991).
 - 16) Watts S. W., Chai S., Webb R. C., *Toxicology*, **99**, 55–65 (1995).
 - 17) Houtman J. P., *Sci. Total Environ.*, **138**, 31–36 (1993).
 - 18) Nolan C. V., Shaikh Z. A., *Life Sci.*, **39**, 1403–1409 (1986).
 - 19) Kaji T., Mishima A., Yamamoto C., Sakamoto M., Koizumi F., *Toxicology*, **71**, 267–276 (1992).
 - 20) Kaji T., Suzuki M., Yamamoto C., Imaki Y., Miyajima S., Fujiwara Y., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicol. Lett.*, **89**, 131–137 (1996).
 - 21) Kaji T., Yamamoto C., Miyajima S., Suzuki M., Fujiwara Y., Sakamoto M., Koizumi F., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1392–1395 (1995).
 - 22) Kaji T., Mishima A., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicol. Lett.*, **66**, 247–255 (1993).
 - 23) Kaji T., Fujiwara Y., Koyanagi E., Yamamoto C., Mishima A., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicol. Lett.*, **63**, 13–20 (1992).
 - 24) Kaji T., Mishima A., Machida M., Yabusaki K., Suzuki M., Yamamoto C., Fujiwara Y., Sakamoto M., Kozuka H., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **54**, 501–506 (1995).
 - 25) Kaji T., Mishima A., Koyanagi E., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **76**, 257–270 (1992).
 - 26) Mishima A., Kaji T., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicol. Lett.*, **75**, 85–92 (1995).
 - 27) Mishima A., Yamamoto C., Fujiwara Y., Kaji T., *Res. Commun. Pharmacol. Toxicol.*, **1**, 199–210 (1996).
 - 28) Mishima A., Yamamoto C., Fujiwara Y., Kaji T., *Toxicology*, **118**, 85–92 (1997).
 - 29) Kaji T., Suzuki M., Yamamoto C., Imaki Y., Mishima A., Fujiwara Y., Sakamoto M., Kozuka H., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **86**, 25–35 (1994).
 - 30) Kaji T., Mishima A., Yamamoto C., Fujiwara Y., Sakamoto M., Kozuka H., Koizumi F., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **56**, 630–634 (1996).
 - 31) Levin E. G., Loskutoff D. J., *J. Cell Biol.*, **94**, 631–636 (1982).
 - 32) Mourik J. A. V., Lawrence D. A., Loskutoff D. J., *J. Biol. Chem.*, **259**, 14914–14921 (1984).
 - 33) Levin E. G., *Blood*, **67**, 1309–1313 (1986).
 - 34) Hoylaerts M., Rijken D. C., Lojnen H. R., Collen D., *J. Biol. Chem.*, **257**, 2912–2919 (1982).
 - 35) Randy M., *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 461–469 (1982).
 - 36) Yamamoto C., Kaji T., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **83**, 215–223 (1993).
 - 37) Yamamoto C., Kaji T., *J. Health Sci.*, **48**, 55–61 (2002).
 - 38) Kaji T., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **73**, 219–227 (1992).
 - 39) Yamamoto C., Kaji T., *J. Health Sci.*, **45**, 119–125 (1999).
 - 40) Yamamoto C., Kaji T., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **106**, 179–185 (1996).
 - 41) Yamamoto C., Miyamoto A., Sakamoto M., Kaji T., *Toxicology*, **117**, 153–161 (1997).
 - 42) Yamamoto C., *Yakugaku Zasshi*, **120**, 463–473 (2000).
 - 43) Kaji T., Suzuki M., Yamamoto C., Mishima A., Sakamoto M., Kozuka H., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 168–172 (1995).
 - 44) Fujiwara Y., Kaji T., Sakurai S., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **117**, 193–198 (1997).
 - 45) Kaji T., Fujiwara Y., Hoshino M., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **95**, 87–92 (1995).
 - 46) Kaji T., Fujiwara Y., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Life Sci.*, **55**, 1781–1787 (1994).
 - 47) Kaji T., Fujiwara Y., Sakurai S., Yamamoto C., Kozuka H., Koizumi F., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **89**, 189–198 (1995).
 - 48) Rifkin D. B., Moscatelli D., *J. Cell Biol.*, **190**, 1–6 (1989).
 - 49) Yayon A., Klagsbrun M., Esko J. D., Leder P., Ornitz D. M., *Cell*, **64**, 841–848 (1991).

- 50) Fujiwara Y., Kaji T., *Toxicology*, **133**, 147–157 (1999).
- 51) Fujiwara Y., Kaji T., *Toxicology*, **133**, 159–169 (1999).
- 52) Fujiwara Y., Kaji T., *J. Health Sci.*, **46**, 1–4 (2000).
- 53) Fujiwara Y., Watanabe S., Kaji T., *Toxicol. Lett.*, **94**, 175–180 (1998).
- 54) Fujiwara Y., Kaji T., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **98**, 105–110 (1995).
- 55) Kaji T., Fujiwara Y., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1264–1266 (1995).
- 56) Fujiwara Y., Kaji T., *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **97**, 95–106 (1997).
- 57) Kaji T., Ohkawara S., Inada M., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 454–457 (1994).
- 58) Kaji T., Ohkawara S., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Toxicology*, **94**, 161–171 (1994).
- 59) Kaji T., Ohkawara S., Inada M., Yamamoto C., Sakamoto M., Kozuka H., *Arch. Toxicol.*, **68**, 560–565 (1994).
- 60) Ohkawara S., Yamamoto C., Fujiwara Y., Sakamoto M., Kaji T., *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **3**, 187–194 (1997).
- 61) Fujiwara Y., Tsumura N., Yamamoto C., Kaji T., *Toxicology*, **170**, 89–101 (2002).
- 62) Fujiwara Y., Yamamoto C., Kaji T., Plaas A. H., *J. Health Sci.* **49**, 534–540 (2003).
- 63) Kaji T., Ohkawara S., Nakajima M., Yamamoto C., Fujiwara Y., Miyajima S., Koizumi F., *Toxicology*, **118**, 1–10 (1997).
- 64) Fujiwara Y., Kaji T., *J. Health Sci.*, **48**, 460–466 (2002).
- 65) Fujiwara Y., Yamamoto C., Kaji T., *Toxicology*, **154**, 9–19 (2000).
- 66) Satoh M., Koyama H., Kaji T., Kito H., Tohyama C., *Tohoku J. Exp. Med.*, **196**, 23–32 (2002).