

を抑制する。このジギタリスのPQ延長は迷走神経刺激によって起こるものである。β-遮断薬も不応期を延長する作用がある。コリンエステラーゼ阻害剤は迷走神経効果を強めて房室ブロックを起こす。

ヒス束以下の興奮伝導系において伝導障害を生じると、心電図上QRSの幅が広がる。心室内興奮伝導の時間の遅延のほか伝導経路も変わること（脚ブロック）があるので、QRSに切痕（notch）が生じたりする。臨床的には、先天性心疾患、心肥大、冠循環障害、心筋炎などで起こるが、この部分に影響のある化学物質としては、キニジン、プロカインアミド等の抗不整脈薬がある。

心電図所見では、QT時間の延長がとくに重大視されているが、それは、QTが著明に延長すると、病的な心筋が早期後脱分極（early afterdepolarization）を起こしているとき、トルサードポワント（torsades de pointes. 多形性心室頻拍、倒錯頻拍ともいう）や心室細動のような重症の心室性不整脈を引き起こしやすいからである。QT延長の成因は単一のものではなく、心筋興奮後の再分極の遅延（活動電位の持続時間の延長）によるほか、心室内伝導遅延によっても延長する。QTは心拍数と連動して変化するため、延長短縮の判断のためには補正が必要である。通常ヒトについて行われる補正； $QT_c = QT/\sqrt{RR}$ 式が用いられるが、これは標準心拍数を60すなわち $RR = 1(s)$ とするものであり、毒性試験においては本来は実験動物の正常心拍数に基づく補正式が必要である。

QT延長は心筋障害で起こるが、薬物や電解質異常で誘発される場合もある。カリウム（ K^+ ）チャネルを遮断する抗不整脈薬であるアミオダロンは、再分極を遅延することによって抗不整脈作用を現すが、延長したQTは次の心室興奮が重なってR on Tの形となりやすく、再分極の途中の心筋の受攻期（vulnerable period）に刺激が加わることになると心室細動やトルサードポワントなどの危険な事態を起こしやすくなる。キニジンやプロカインアミド、ジソピラミドなどの抗不整脈薬は、ナトリウム（ Na^+ ）チャネルを遮断する主作用のほかに、 K^+ チャネルを遮断する作用もあるため、こうした重症不整脈を誘発する場合がある。抗不整脈薬以外でQTの延長から重症不整脈を誘発する副作用が報告されている薬物に、ヒスタミン H_1 受容体遮断薬ターフ

エナジンおよびアステミゾールが知られている。これらの薬物は K^+ チャネルを遮断する作用があり、副作用としてQTを延長し、重症不整脈を発生することがある。また、エリスロマイシンやケトコナゾールはこれらの薬物と併用するとその肝における代謝（CYP3A4による）を阻害し、血中濃度を高めて、この不整脈を起こしやすくする薬物相互作用が知られている。さらに、低カリウム血症や徐脈があるとトルサードポワントが起こりやすい。低カリウム血症はカリウム排泄を促進する利尿薬（フロセミド等）の過剰使用で起こる。利尿薬は心不全の浮腫の治療のために用いられるので、低カリウム血症にはとくに注意する必要がある。

低カリウム血症にもQT延長が記載されている。ただし、実際にはQT延長ではなく、T波の平低化とU波の増高によってそのようにみえる場合が多い。一方、高カリウム血症は、心電図上T波の増高を示すが、血中カリウム濃度が極度に高まると興奮伝導遅延によってQRS幅の拡大、心室細動をきたす。高カリウム血症は腎不全に伴う症状であるが、カリウムイオンを含む薬液、主として輸液製剤の不適切な投与によっても誘発される。

6.11.4 心筋の収縮機能と心不全

a. 解剖生理の基礎 心筋の収縮は、他の種類の筋の収縮と基本的に同じく、収縮タンパクアクチンとミオシンの立体配置の変化によって起こる。心筋の場合、筋細胞（筋線維ともいう）の長軸に沿って束ねられた筋原線維（myofibrils）が一斉に収縮することによって筋の収縮が起こる。筋原線維はミオシンのつくる太いフィラメントとアクチンからなる細いフィラメントによって組み立てられて、電子顕微鏡像では濃い帯（A-帯）と明るい帯（I-帯）が交互に繰り返される構造になっている。I-帯は中間のZ-帯で2部に仕切られている。2つのZ-帯の間を筋節（sarcomere）といい、収縮の基本単位である。

心筋の収縮は、膜の脱分極に伴って細胞外から流入するカルシウムイオン（ Ca^{2+} ）と筋小胞体（sarcoplasmic reticulum, SR）から遊離される Ca^{2+} がトロポニンと結合すると収縮抑制タンパクトロポミオンがはずれ、アクチンがミオシンとの位置関係を変えて滑走し、筋節の長さが変化することで起こる。

b. 心臓の拍出機能 心臓は、左心室から大動

脈を通じて全身へ、また右心室から肺動脈幹を通じて肺循環へ血液を拍出している。1回拍出量 (stroke volume) に1分間の心拍数 (heart rate) を掛けると心拍出量 (分時拍出量, cardiac output) が得られる。心室が1拍ごとに拍出する血液量は、そのつど心房から送り込まれる量であり、それは静脈還流量 (venous return) そのものである。流入する血液量が増加すると心室の容積は増大し、心室筋は引き伸ばされる。心筋の発生張力は静止時の長さに比例する性質があるので、容積が増大するときにもそれに対応して効率的な収縮が行われる。しかし、こうした基本的な筋の性質が保てなくなると拍出が不十分になり、末梢での血液の貯留が起こってくる。これをうっ血性心不全 (congestive heart failure) という。

c. 心収縮機能に対する毒性 心筋の興奮時に上昇する $[Ca^{2+}]_i$ を増加させる作用は収縮力を強める。すなわち陽性変力作用または強心作用がある。各種の交感神経作用アミンにこの作用がある。一方、陰性変力作用は交感神経活動の抑制 (β -アドレナリン受容体遮断) で起こる。 β -遮断薬プロプラノロールの場合は受容体遮断作用を超えた大量で、それとは別の心筋抑制作用が現れる。これは心不全にもつながる。

6. 11. 5 心毒性物質リスト

心機能に影響する毒性を有するものは数多い。心疾患治療薬でも効果が過剰になると、薬効と同じ作用機序でも不都合な影響に変わるものが少なくない。ジギタリス類強心配糖体製剤は治療量の安全域が狭く、また蓄積を起こしやすい性質があるので、過剰効果による副作用を起こしやすい。医薬品の過剰効果も含めて、心毒性を有する物質とその毒性および作用機序の概要を表 6. 42 に示す。

6. 11. 6 血管の毒性学

a. 血管の構造と機能 血管系は心臓から拍出される血液を全身末梢器官に送って、組織に酸素と栄養素を供給し、かつ組織代謝老廃物を搬出する経路をなしている。血管系は大動脈および肺動脈幹から次々に分岐して、太さを変えて中動脈から小動脈、細小動脈、毛細血管を経て、また同様に太さの異なる各種の径の静脈系を経て心臓に戻る。血管の基本構造は、1層の内皮細胞が基底層の上に配列する内膜、結合組織 (弾性線維, 膠原線維) と平滑筋が主

体の中膜、その外側を囲む結合組織の外膜である。大動脈は中膜の弾性線維が発達し、心室の収縮期に拍出する血液を受けて伸展し、拍出された圧力を緩和し、心室の拡張期には反動で収縮し、血液の末梢への送達に寄与する。細小動脈は平滑筋が壁の主体をなし、交感神経の支配を受けて収縮し、血流に対する抵抗を形成している。毛細血管は、壁がほとんど内膜のみの細い管で、ここで血液と組織の間のガス交換および物質の交換が行われる。細静脈は細動脈に比して内腔が広く、平滑筋は動脈ほど多くないが、神経支配を受けて収縮し、血管の容積の調節にかかっている。

血管平滑筋は、交感神経から放出されるあるいは血流によって運ばれてくるノルエピネフリンが細胞膜の受容体と結合すると興奮し、カルシウムイオン細胞内流入が起こって収縮する。平滑筋のアドレナリン作動性受容体は α_1 -受容体が収縮を、 β_2 -受容体が弛緩を起こす。皮膚、内臓等を灌流する血管には α -受容体が、骨格筋、心筋の血管には β -受容体が、多く分布する。

血管内皮は血流に対する滑らかな接触面をつくるだけでなく、血管緊張 (トーン) の調節 (血管平滑筋作動物質の産生)、血管新生の調節 (血管構成細胞の誘導, 増殖, 分化) に関与し、活性酸素の産生も行っている。

b. 血圧調節とその異常 血圧とは一般に全身循環の中動脈 (上腕動脈, 大腿動脈等) における血圧をいう。血圧は心拍出量と末梢血管抵抗によって規定されるが、心拍出量 (分時拍出量) は1回拍出量と心拍数によって定まり、これらは循環血液量と交感神経活動の影響を受けている。心臓 (心室) は、正常の場合、静脈から戻ってきた血液 (静脈還流) をすべて拍出するので、循環血液量の増加は心拍出量の増加になる。一方、心拍数が増加すれば、同じ循環血液量でも循環速度が高まり、心拍出量が増す。運動時には心拍出量は安静時の数倍に増加する。末梢血管抵抗は全身の細動脈 (抵抗血管) の径 (総断面積) によって定まる。この部分の血管は交感神経の強い支配を受け、血管径を調節している。さらに、血液の粘性、局所組織の活性物質 (キニン類, プロスタグランジン類)、代謝産物 (CO_2 , pH, アデノシン) および血管平滑筋による筋原性の自動調節が血管抵抗には関与している。しかし、血圧が恒常的

表 6.42 心毒性物質一覧

物質名	心臓作用	作用機序
I. 医薬品		
1. 強心作用薬		
強心配糖体： ジギトキシン ジゴキシン ウアバイン	収縮力増大，活動電位幅拡大 徐脈，房室伝導抑制 不整脈（心室性期外収縮，房室ブロック等）	Na-KATPase 抑制， $[Ca^{2+}]_i \uparrow$ 副交感神経刺激作用
交感神経作用アミン： ノルエピネフリン エピネフリン ドバミン イソプロテレノール ドブタミン サルブタモール プロカテロール	頻脈，不整脈，心筋壊死（巣状） 血圧上昇，血管収縮 頻脈，不整脈，心筋壊死（巣状） 頻脈	α, β -アドレナリン受容体刺激， $[Ca^{2+}]_i \uparrow$ 酸化ストレス β -アドレナリン受容体刺激 酸化ストレス β -アドレナリン受容体刺激
メチルキサンチン類： テオフィリン アミノフィリン カフェイン	頻脈，不整脈，前胸部痛	ホスホジエステラーゼ阻害
2. 抗不整脈薬		
Ia：キニジン プロカインアミド ジソピラミド ビルメノール	興奮伝導障害 QT延長，徐脈 重症不整脈	Na ⁺ チャネル抑制 K ⁺ チャネル抑制
Ib：リドカイン メキシレチン フェニトイン	興奮伝導障害 (QT短縮傾向)	Na ⁺ チャネル抑制
Ic：プロパフェノン フレカイニド	興奮伝導障害，PQ延長 QRS幅，QT延長，徐脈	Na ⁺ チャネル抑制
II：プロプラノロール アセプトロール	心拍数減少，心拍出量低下 房室ブロック 心不全増悪	β -アドレナリン受容体遮断 キニジン様作用 心筋抑制作用 K ⁺ チャネル遮断
III：アミオダロン ブレチリウム ソタロール	QT延長，興奮伝導障害 重症不整脈（トルサードドポワント） 心不全増悪	
IV：ベラパミル ジルチアゼム	房室ブロック，徐脈 血圧低下	Ca ²⁺ チャネル遮断 血管拡張作用
3. 中枢神経薬		
三環系抗うつ薬： アミトリプチリン イミプラミン デシプラミン ドキセピン	興奮伝導障害，ST-T変位，QT延長 不整脈（トルサードドポワント） 頻脈，起立性低血圧，突然死	NE取り込み抑制（アミントランスポーター抑制） ムスカリン受容体遮断，Ca ²⁺ チャネル抑制， キニジン様作用，Na ⁺ チャネル抑制 K ⁺ チャネル抑制
抗精神病薬： クロルプロマジン チオリダジン	起立性低血圧，頻脈，PQ延長 QT延長，心室性不整脈	α -アドレナリン受容体遮断 キニジン様作用 ムスカリン受容体遮断
全身麻酔薬： ハロタン エンフルラン エタノール	陰性変力作用，心拍数減少，血圧低下 陽性変力作用，不整脈誘発 (急性) 頻脈，血圧低下，興奮伝導抑制 (慢性) 高血圧，心筋症	Ca ²⁺ チャネル遮断， β -アドレナリン受容体の増感 血管拡張，アセトアルデヒド，血管運動中枢抑制 酸化ストレス，ミトコンドリア傷害
局所麻酔薬 コカイン	頻脈，血圧上昇 興奮伝導障害，心筋虚血，心不全	NE取り込み抑制 交感神経様作用，血管収縮
リドカイン，プロカイン	抗不整脈薬をみよ。	

<p>4. 抗ヒスタミン薬 <u>ターフェナジン</u> アステミゾール</p> <p>5. 抗腫瘍薬 アントラサイクリン系 抗生物質 ドキソルビシン ダウノルビシン エピルビシン 5-フルオロウラシル</p> <p>シクロホスファミド</p> <p>6. 抗菌性物質 アミノ配糖体 ゲンタマイシン アミカシン トブラマイシン マクロライド エリスロマイシン</p> <p>フルオロキノロン グレパフロキサシン</p> <p>アンホテリシン B イミダゾール系真菌剤 ケトコナゾール イトラコナゾール</p>	<p>QT延長, 不整脈 (トルサードポワント)</p> <p>不整脈, 頻脈, 血圧低下 心嚢炎, 心筋変性, 心不全</p> <p>胸痛, 心電図異常 (ST 上昇) 血圧低下 出血性の心筋壊死</p> <p>陰性変力作用</p> <p>QT延長, 不整脈 (トルサードポワント)</p> <p>QT延長, 不整脈 (トルサードポワント)</p> <p>陰性変力作用</p> <p>QT延長, 不整脈 (トルサードポワント)</p>	<p>K⁺電流の抑制</p> <p>活性酸素の産生 ミトコンドリア傷害 アポトーシス誘導 冠動脈れん縮 フルオロ酢酸の生成による代謝阻害 酸化ストレス</p> <p>内向き Ca²⁺電流の抑制</p> <p>遅延整流 K⁺電流の抑制 CYP3A4 代謝競合による薬物相互作用</p> <p>遅延整流 K⁺電流の抑制 CYP3A4 代謝競合による薬物相互作用 Ca²⁺チャネル遮断</p> <p>遅延整流 K⁺電流の抑制 CYP3A4 代謝競合による薬物相互作用</p>
II. 産業化学物質		
<p>有機溶剤 ハロゲン化炭化水素 クロロホルム トリクロロフルオロメタン 四塩化炭素 その他 トルエン メチルエチルケトン</p> <p>重金属 カドミウム コバルト 鉛</p>	<p>不整脈誘発</p> <p>不整脈誘発</p> <p>陰性変力作用, 高血圧, 心肥大 陰性変力作用, 心肥大 陰性変力作用, 不整脈, 心筋変性</p>	<p>心筋アドレナリン作用感受性亢進 中枢性副交感神経活動抑制</p> <p>心筋アドレナリン作用感受性亢進 中枢性副交感神経活動抑制</p> <p>Ca²⁺との干渉, 腎障害 Ca²⁺拮抗作用 複合物形成し Ca²⁺と干渉</p>
III. 天然物		
<p>強心配糖体: ジギタリス G-ストロファンテン <u>コンカナバリン A</u> スギラレン アコニチン (トリカブト毒)</p>	<p>徐脈, 房室伝導抑制, 不整脈</p> <p>不整脈</p>	<p>Na⁺系 K⁺ ATPase 抑制, [Ca²⁺]_i ↑</p> <p>Na⁺チャネルの不活性化の抑制</p>

に保たれるのには自律神経の緊張性支配によるところが大きい。

血圧は上記の多数の因子の関与により恒常性を保っているが、それらの因子の何らかの異常で変化する。入り組んだ調節機構によって、変動した血圧は反射的に正常値に戻る傾向を示すが、時には持続的な異常値を示す事態もある。持続的な血圧 (全身血圧) の上昇を高血圧 (症) という。ヒトの高血圧症

には、腎動脈の狭窄で腎血流量が欠乏するとき、レニンの分泌が刺激され、血中のアンギオテンシン-II 濃度が高まるために起こる腎血管性高血圧や、副腎髄質の褐色細胞腫 (ノルエピネフリン、エピネフリン分泌腫瘍)、副腎皮質のアルドステロン分泌腫瘍 (原発性アルドステロン症) で起こるものなど2次性 (症候性) 高血圧もあるが、大多数は遺伝的素因に基づく本態性高血圧である。

肺循環系における血圧も同じような機構で調節されているが、通常測定されることが少ない。肺高血圧症は多くの場合肺病変または右心系の異常が発展して起こる。

i) 高血圧を起こす毒性影響：一過性の血圧上昇を起こす物質は多数あって、医薬品としては、交感神経作用アミン類(喘息治療のためのエピネフリン、エフェドリン)、バゾプレッシン(尿崩症治療のための下垂体後葉ホルモン製剤には血管作用をもたない選択的 V_2 -受容体作用薬が開発されているが、ピトレシンには副作用として血管収縮作用がある)。毒性学的に記載すべきものとしては、モノアミン酸化酵素阻害剤投与中にチラミンを含む食品(チーズ、ワイン、魚介類)を摂取して起こる急性血圧上昇がある。ニコチンは自律神経節刺激作用があるが、心血管系に対しては交感神経系の刺激効果が現れやすく、心拍数増加(頻脈)、血圧上昇を起こす。

持続的な血圧上昇を起こす物質には、血圧調節にかかわるホルモン(副腎皮質ステロイド剤等)の製剤の副作用があるが、類似のものとしてカンゾウ(甘草, licorice root)があり、長期連用するときその成分グリチルリチンの鉱質コルチコイド様作用のため、ナトリウム貯留、循環血液量の増加を起こし、高血圧の誘発につながる。経口避妊薬はエストロゲン作用によってアンジオテンシノゲンの産生が増加するので、高血圧の素因をつくる。エタノールが高血圧を起こすことは飲酒者の疫学調査から確認されている。腎障害を起こす物質は高血圧を誘発しやすく、フェナセチンの慢性毒性として腎障害に伴う高血圧が知られている。

血管を傷害する物質は血管抵抗を増大して血圧上昇をきたすことが多い。鉛中毒で血管内皮傷害からくる高血圧がみられ、カドミウム塩による高血圧も血管傷害が原因と考えられる。カドミウムはメタロチオネインの少ない血管壁に沈着して傷害を起こすといわれる。ただし、カドミウムは腎尿細管の障害も起こすので、その結果ナトリウム排泄の異常が起こると血圧の推移には複雑な影響がある。その他、血管障害のある重金属にはヒ素、水銀、セレン、タリウムが挙げられる。

ii) 低血圧を起こす毒性影響：高血圧治療薬は過剰効果によって血圧低下を起こす。とくに血管拡張薬は末梢抵抗の減少によって血圧低下を起こす。こ

のとき、通常は循環反射を介して頰脈を併発し、心拍出量を増加して血圧低下をある程度代償する。 β -アドレナリン遮断薬の併用などによってこの反射が抑制された状態では、血圧の低下はより著明になる。心収縮力を抑制する物質は結果として血圧低下をきたす。中枢神経系抑制薬は過量投与によって血圧低下を起こす。その他、一般に急性中毒の激しいものでは血圧低下がみられるが、その機序は心抑制、血管の弛緩、脱水等の複合したものである。

iii) ショック：血圧低下が高度となって末梢器官への血液循環が不十分になる状態をショックというが、その原因はさまざまである。失血性ショック、外傷性ショック、心原性ショック、敗血症性ショック等の他に、毒性と関係するものとしては、中毒性ショック、薬物ショック、アナフィラキシーショックが挙げられ、心毒性(収縮力抑制、不整脈誘発)によるショック状態、血管拡張薬の過剰効果による高度の低血圧も数えられる。

c. 血管傷害性毒性の影響

i) 局所循環障害：器官組織の栄養血管の強い収縮が起こるとその血液供給が途絶し、その器官の機能不全や組織の壊死が起こる。強い持続的な血管収縮はその部の血管自身にも傷害を起こし、さらに変化を悪化させる。未熟児治療中の過度の酸素供給によって起こる血管の収縮から網膜の傷害が発生することが注目されている。麦角中毒における末梢の壊疽も血管れん縮に基づく変化と考えられる。

ii) 血管透過性の異常

①浮腫：毛細血管の部分では血液と組織の間で物質の交換を行っているが、血管の透過性が高まると血液の高分子成分が漏出し、浮腫が生じる。ヒスタミン、セロトニン、ブラジキニン等は局所で血管透過性を高める。これらの血管作動物質は、細静脈を収縮してその上流に血液うっ滞を起こして浮腫の原因となる。

②出血素因：血管壁の傷害によって血液の漏出が起こり、点状出血を生じることがある。上記のような局所のうっ血で起こる。血管の結合織の構造に異常が起こり、血管が脆弱になる場合がある。ビタミンCの欠乏症(壊血病)がそれであるが、中毒で同じような異常を起こすものにラチルス(スイートピーのアルカロイド)の中毒がある。この結合織合成阻害が太い血管で起こると、動脈瘤の形成、血管

の破裂が起こる。

iii) 血栓形成促進：血管内皮の傷害が生じると、通常その部位に血栓が形成される。損傷の防御機構として働く血栓は、一方で局所の血流の障害となり、あるいは剝離して栓塞を起こすこともある。内皮に傷害を及ぼす化学物質としては、シクロホスファミド、アクロレイン、ホモシステイン、鉛などがある。さらに、血液成分に働いて血栓形成を促進する物質が、エピネフリン、セロトニン、経口避妊薬など多数ある。

iv) 動脈硬化症の誘発：血管内皮が傷害されると、平滑筋細胞の増殖、内膜の肥厚、細胞の変性が起こり、そこに結合織の増殖と脂質の沈着が起こる。高脂血症（高コレステロール血、高リポタンパク血）

があるところの変化は助長される。このような変化は最終的には局所に多量の脂質を蓄積したアテローム（粥腫）を生じ、炎症細胞を交えて管壁の線維化亢進を伴うアテローム性硬化（粥状硬化）となる。しばしば石灰沈着が伴う。血管は弾性を失い、内腔の狭窄が起こり、時に血栓を伴って閉塞に至る。大動脈、冠動脈、腎動脈、大腿動脈および頸動脈に好発し、狭窄や閉塞の発生する個所によって特有の病状が生じる。

動脈硬化症は通常「自然発生」性の疾患と考えられ、生活習慣病に位置づけられるが、その初期変化は血管内皮の傷害であると考えられるので、化学物質の毒性による血管傷害が最終的に動脈硬化に発展することも考えられる。

表 6.43 血管毒性物質一覧

物質	血管作用	作用機序
1. 医薬品		
血管作動薬		
麦角製剤		
ジヒドロエルゴタミン	血管れん縮（網膜）	静脈 α -受容体刺激, 他血管 α -受容体遮断
エルゴタミン	血管れん縮誘発, 血栓形成, 末梢組織壊疽	血管 α -受容体遮断/刺激, トリプタミン受容体刺激
エルゴノビン	血管れん縮（冠動脈）, 狭心症, 中膜萎縮	血管トリプタミン受容体刺激, α -受容体刺激
メセチルジド	冠血管疾患, 冠血管閉塞	血管トリプタミン受容体刺激, 血管内皮増殖
自律神経薬		
交感神経作用アミン	血管収縮, 内皮障害, 血栓形成促進	α -アドレナリン受容体刺激, 循環障害, 血小板凝集促進
ニコチン	心筋梗塞・脳梗塞増悪	ニコチン性受容体刺激, プロスタサイクリン産生阻害
コカイン	内皮障害, 局所壊死	α -アドレナリン受容体刺激, 局所循環障害
抗腫瘍薬		
5-フルオロウラシル	血栓性微小血管障害	
ドキソルピシン	血栓性微小血管障害	
マイトマイシン	血栓性微小血管障害	
ヴィンブラスチン	血栓形成促進	血小板凝集促進
非ステロイド抗炎症薬		
アスピリンほか	消化管粘膜びらん, 内皮障害, 細小血管閉塞	プロスタグランジン産生阻害
経口避妊薬	血栓症, 深部静脈血栓, 血栓栓塞症	血管壁脂質沈着促進, 血小板凝集促進
血管造影剤	血栓栓塞症	
2. 産業化学物質		
アルキルアミン類		
アリルアミン	動脈硬化症	血管内膜・平滑筋損傷
重金属		
カドミウム	動脈硬化症, 高血圧, 大動脈内皮傷害	血管壁内沈着, 微小循環傷害
鉛	高血圧(?)	血管内皮傷害
水銀		腎血管収縮
ヒ素	動脈硬化症, 黒足病（血管閉塞性壊死）	血管内皮傷害, 毛細血管拡張・滲出
ニトロ化芳香属		
2,4-, 2,6-ジニトロトルエン	動脈硬化症	血管平滑筋増殖傷害
芳香属炭化水素		
ベンゾピレン	動脈硬化誘発・促進	血管内皮・平滑筋細胞増殖
3-メチルコラントレン	動脈硬化誘発・促進	血管内皮・平滑筋細胞増殖
1,3-ブタジエン	血管肉腫（心, 肝, 肺, 腎）	

自動車排気ガスや煙草煙に含まれる有害物質であるアリルアミン（3-アミノプロペン）は実験的に動物で動脈硬化を誘発することが知られている。これは血管壁で酸化代謝を受けて反応性の強いアルデヒド、アクロレインに変化すると、細胞のタンパク変性、核酸合成阻害を行う。反復してこの作用を受けると平滑筋細胞の増殖が盛んになることがラットで認められており、リン脂質代謝の変化、プロテインキナーゼCの活性化、遺伝子の発現も起こる。芳香族炭化水素のあるもの（3-メチルコラントレン、ベンゾ[a]ピレン等）は血管毒性があり、アテローム性硬化を増強することが動物実験で観察されている。

v) 腫瘍誘発性傷害：血管傷害に対する反応として増殖性の変化が起こり、動脈硬化に発展する機序は、腫瘍の発生と相似であることが指摘されている。1,3-ブタジエンに暴露されたスチレン工業作業場で、血管腫の頻度が高まることが疫学調査で知られた。実験動物でこの物質の血管内皮傷害作用が認められており、長期的にもアテローム硬化症を起こすが、内皮由来の腫瘍の発生が起こる。腫瘍は、心内膜、肝、肺、腎の血管に発生する。塩化ビニルのモノマーによっても肝に血管内皮腫、内皮肉腫が発生することが知られている。肝の血管性腫瘍には酸化トリウムによるものも知られているが、これはかつて造影剤として使われたものである。

化学物質の血管毒性の一覧を表 6.43 に示す。

[小野 宏]

6.12 消化器毒性

6.12.1 消化管の構造と生理機能

消化器系の役割は、摂取した食物を利用可能な形に変えて吸収し、不要物を排泄することである。それを効率よく行うには、摂取した食物を、処理能力に見合った速度で移送し、消化吸収を秩序だてて行う必要がある。そのために、消化器系には、中枢の支配に全面的には依存しない、ある程度自律的な制御機構が存在している。消化器系は、口腔から肛門に至る連続した管である消化管と、それに付随する臓器（唾液腺、肝臓、胆嚢、膵臓など）からなるが、この節では主に消化管を取り扱う。

消化管は、他の自律神経支配器官と同様、交感神

経と副交感神経の2重支配を受けている。消化機能に対しては一般に副交感神経が促進性、交感神経が抑制性の調節を行うが、個々の具体的な機能については必ずしもこの原則に当てはまらず複雑である。消化管壁内には壁内神経叢が存在する。外来性の自律神経終末は、直接粘膜細胞や平滑筋細胞に入力する以外に、これら神経叢へ入力することでも調節機能を発揮し、さらに壁内神経叢間にも複雑なネットワークが形成されており、簡単な情報処理は中枢から独立して行うことができる。

消化器の機能は、さらに種々の消化管ホルモンによっても制御されている。消化管ホルモンはその構造類似性から、表 6.44 に示す各群に分類されている。これらのほとんどは、ホルモンあるいは神経伝達物質として脳内および消化管壁内神経叢に共通に見出されており、脳腸ペプチドと呼ばれる。これらホルモンは、巨大な前駆体から組織特異的なプロセッシングを受けて生成される場合があり、作用も構造も類似したものが数多く存在し、全体像をつかむのにはかなり困難が伴う。たとえばグルカゴン前駆体からは、グルカゴンの他、グリセンチン、オキシントモジュリン、GLP-1、GLP-2 など、多数の分子形態のホルモンがつくられ、それぞれの分泌部位や生理的作用が微妙に異なる。

消化管ホルモンの分泌は、自律神経あるいは視床下部ホルモンによっても制御されているが、生理的にもっとも重要な情報は、消化管腔内容物による物理的・化学的刺激である。消化管ホルモン分泌細胞は他の内分泌器官と異なり、腺構造をとらず、消化管粘膜に散在している場合が多く、それぞれの局所における状況に応じた制御を行っている。たとえば酸分泌刺激ホルモンであるガストリンの分泌は、胃の拡張刺激や胃腔内の化学物質による刺激で促進され、幽門前提部粘膜表面の pH が低下すると抑制される。したがって、オメプラゾールなどのプロトンポンプ阻害薬やシメチジン、ファモチジンなどの H_2 -受容体拮抗薬を連投して高度な酸分泌抑制状態を創り出すと、ネガティブフィードバックがはずれ、高ガストリン血症をきたす。ガストリンは酸分泌促進だけでなく、胃底腺増殖細胞帯および ECL 細胞 (enterochromaffin-like cell) に対して増殖作用を示すので、ECL 細胞の過形成をきたすこととなり、ラットにおける長期投与では ECL 腫瘍（胃カルチ

In: Advances in male mediated developmental Toxicity (Robaire B and Hales BF et al)

Kluwer Academic/Plenum Publishers

INCREASED INCIDENCE OF MALFORMATIONS IN THE OFFSPRING OF MALE MICE PRENATALLY EXPOSED TO SYNTHETIC ESTROGENS

Tetsuji Nagao¹, Nao Kagawa², Madoka Nakagomi¹ and Kazuo Fujikawa²

¹Laboratory of Developmental Biology, Department of Life Science, Kinki University, Kowakae 3-4-1, Higashiosaka, Osaka 577-8502, Japan

²Laboratory of Animal Genetics, Department of Life Science, Kinki University, Kowakae 3-4-1, Higashiosaka, Osaka 577-8502, Japan

INTRODUCTION

In parallel with increasing concern about the reproductive effects of endocrine disrupters in the environment, evidence has been accumulating that developmental exposure to estrogenic hormones can cause a variety of abnormalities on the male reproductive tract (reviewed by Nagao, 1999). However, little is still known about transgenerational toxicity of estrogens, except for the potential of a transgenerational carcinogenic effect of diethylstilbestrol (DES) reported in mice by Walker (1984) and others. We carried out the present study as an attempt to fill this gap in our knowledge.

In the present study, male ICR mice were exposed as embryos to estradiol benzoate (EB), ethinyl estradiol (EE) or the anti-estrogen, tamoxifen (TAM), and their fetal offspring were examined for evidence of a transgenerational teratogenic effect of the drug. The effect was examined on external characteristics because external malformations are expressed early in life and can be monitored easily either phenotypically or quantitatively. Outbred ICR mice were used because teratogenesis mediated by males has been studied extensively using this strain. Histopathological changes in the reproductive tract of the treated males were also examined. We report here evidence that developmental exposure of males to estrogenic drugs is hazardous not only for development of the reproductive organs but also for embryonic development in the subsequent generation.

MATERIALS AND METHODS

Animals

ICR mice, 6-8 weeks old, were purchased from Charles River (Atsugi, Japan) and housed individually in polycarbonate cages with hard chip bedding in a room in which the temperature and relative humidity were controlled at 24±1° and 50±5%, respectively, with

Advances in Male Mediated Developmental Toxicity, edited by Bernard Robaire and Barbara F. Hales. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

lights on daily from 07:00 to 19:00. Animals were given free access to CE-2 food (CLEA Japan, Inc.) and tap water. To obtain pregnant females, 10 week old virgin females were individually cohoused overnight with single males. The next morning, females with vaginal plugs were regarded as pregnant, and this was designated as day 0 of gestation.

Treatment of Dams with Synthetic Estrogens and Sampling of Treated Males

Synthetic hormones, estradiol benzoate (EB), ethinyl estradiol (EE) and tamoxifen (TAM), were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Immediately before use, they were dissolved in corn oil (Nakalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan).

At a defined time (12:00) on gestational days 9 through 16, test solution for EB or TAM was administered subcutaneously to pregnant mice at 2 ml/kg, and EE solution was given orally at 5 ml/kg. The number of dams in each of treated group was 7 to 9. Daily doses used for EB were 0.15 or 0.3 mg/kg, and for EE and TAM were 0.2 mg/kg and 0.5 mg/kg, respectively. In a preliminary study, we found that none of these drugs caused external malformations in fetuses, decreased fetal viability or reduced fetal weight gain when they were administered at these daily doses to pregnant mice for 8 days (data not shown). An adverse effect noticed in the preliminary study was a delay in delivery after treatment with 0.3 mg/kg/day EB. Therefore, all the treated dams and untreated controls in the present study were subjected to cesarean section on day 18 of gestation to obtain treated and control fetuses as live neonates. The day of cesarean section was considered as postnatal day 0.

The neonates obtained by cesarean section were fostered to untreated ICR females, one litter to each female. On postnatal day 4, all female pups were discarded, male pups were weighed, and the number of males per litter was adjusted to 4 or 5 for each foster female. The males were weaned on postnatal day 21 and then individually housed in polycarbonate cages, where they were allowed to grow to sexual maturity.

Examination of Reproductive Toxicity of Synthetic Estrogens in Males of the Treated Generation

At 12 weeks of age, the males were individually mated with single untreated ICR females, and thereafter they were allowed to copulate repeatedly for 2 or 3 weeks with different partners. Copulation was confirmed by the presence of a vaginal plug. Fertility of the males that copulated was confirmed by the presence of implants in the uterus of the partners on day 18 of gestation. Males that failed to copulate or impregnate females were classified as impotent.

At an age of 14 to 15 weeks, all males in the control and the treatment groups were weighed; their testes, epididymides and seminal vesicles were then weighed and fixed. Fixatives used for the testes and epididymides, and for the seminal vesicles were Bouin's solution and phosphate buffered 10% formalin, respectively. Fixed organs were embedded in paraffin, sectioned at a thickness of 5 μ m and stained with hematoxylin and eosin according to standard procedures. Stained sections were observed microscopically at a magnification of 100x for evidence of pathological changes.

Evaluation of Transgenerational Toxicity of Synthetic Estrogens

Upon examination of the uterine contents of females impregnated by control or treated males on gestational day 18, the numbers of implants, early and late resorptions and live fetuses were recorded. Each live fetus was weighed, sexed and inspected for external malformations including abnormalities of the oral cavity under a dissecting microscope. Fetuses weighing less than 70% of the average of the rest of the litter were classified as

showing dwarfism and were included in the category of externally malformed offspring. Frequency of post-implantation loss was calculated as embryonic mortality for each litter by dividing the number summed for early and late resorptions by that of implantation sites. Frequency of malformed fetuses was calculated in litter units as the ratio of malformed to live fetuses. Data not shown in this report are available on request.

RESULTS

Reproductive Function of Males Prenatally Exposed to Synthetic Hormones and Histopathological Changes in the Reproductive Organs

As shown in Table 1, all males in the group prenatally treated as embryos for 8 days with 0.15 mg/kg/day of EB or 0.5 mg/kg/day of TAM succeeded in fertilizing untreated females when mated at 12-14 weeks old. On the other hand, one of 22 males in the group treated with 0.30 mg/kg/day of EB did not copulate. When mated at 12-15 weeks old, two of 22 males in the EE-treated group did not copulate, and one of the 20 males that did copulate in this group failed to impregnate females.

Table 1. Reproductive Functions of Male Mice Prenatally Exposed to Synthetic Hormone EB, EE or TAM and the Number of Males showing Histopathological Changes (HPC) in their Reproductive Organs

Treatment ^a (mg/kg/day)	No. of males			
	mated	copulated	fertile	with HPC
Control	23	23	23	0
EB 0.15	20	20	20	0
0.30	22	21	21	12 ^b
EE 0.2	22	20	19	3 ^c
TAM 0.5	20	20	20	0

^aSubcutaneous (EB and TAM) or oral (EE) administration in dams on gestational days 9 through 16 at the indicated daily dose.

^bAll were fertile males including 7 with dilated seminiferous tubules and epididymal ducts, plus epididymal cysts, 2 with epididymal cysts, and 3 with dilated seminiferous tubules and epididymal ducts.

^cAll were impotent males and showed epididymal cysts and reflux of semen in the seminal vesicle; each had atrophic seminiferous tubules, oviduct-like structures in the epididymis or a uterus-like duct along the vas deferens in addition to these two abnormalities.

As determined histopathologically after the completion of the mating experiments, all males from the groups treated with 0.15 mg/kg/day of EB and 0.5 mg/kg/day of TAM showed no appreciable signs of adverse effects of the drugs in the reproductive organs within the limits of the resolving power of the histological methods used (Table 1). On the other hand, 12 fertile males among 22 males treated with 0.30 mg/kg/day of EB had epididymal cysts, dilated seminiferous tubules and epididymal duct, or both (Table 1); one impotent male from this group showed no abnormalities in the reproductive tract. The three impotent males from the EE-treated group all showed semen reflux in the seminal vesicle and epididymal cysts. All three of these males had atrophic seminiferous tubules, oviduct-like cysts in the epididymis or uterus-like ducts along the vas deferens in addition to these abnormalities. None of the fertile males in this group had any conspicuous changes in the reproductive organs (Table 1). The mean weight of the testes, epididymides, or seminal vesicles measured immediately before fixation of the organs for

histopathological examination did not show significant deviation in any of the treated groups from the control weights of 0.25 ± 0.01 , 0.11 ± 0.01 , and 0.48 ± 0.03 g, respectively.

Reproductive Outcomes of Males Prenatally Exposed to Synthetic Hormones

In any of the treated series, there was no significant deviation from the control in frequency of post-implantation loss or in the number of implants per litter (Table 2). On the other hand, the frequency of externally malformed fetuses increased significantly over the control level among the offspring whose sires had been prenatally treated with 0.30 mg/kg/day of EB or 0.2 mg/kg/day of EE. This was not the case among fetuses from males treated with a lower daily dose of EB or 0.5 mg/kg/day of TAM. The control frequency of malformed fetuses recorded in the present study ($0.23 \pm 0.16\%$, $N=58$) does not differ significantly from the historical control value of $0.31 \pm 0.08\%$ ($N=287$) based on information gathered for the ICR strain over the last 10 years in our laboratory at the Hatano Research Institute. Therefore, we concluded that prenatal exposure of ICR males to EB at a high dose or EE caused malformations in the subsequent generation.

Table 2. Frequencies of Postimplantation Loss and Malformed Fetuses in the Offspring of Male Mice Prenatally Exposed to Synthetic Hormone EE, EB or TAM

Treatment ^a (mg/kg/day)	No. of implants per litter	Frequency of postimplantation loss (%)	No. of live fetuses per litter	Frequency of malformed fetuses (%)
Control	$14.2 \pm 0.3^b(58)^c$	7.5 ± 1.1^b	13.2 ± 0.3^b	0.23 ± 0.16^b
EB 0.15	14.5 ± 0.3 (95)	6.5 ± 0.9	13.7 ± 0.4	0.17 ± 0.11
0.30	14.6 ± 0.4 (112)	7.7 ± 1.2	13.5 ± 0.4	$1.31 \pm 0.25^{**}$
EE 0.2	14.1 ± 0.3 (212)	9.1 ± 1.0	12.8 ± 0.3	$0.85 \pm 0.28^*$
TAM 0.5	14.0 ± 0.3 (87)	7.5 ± 1.5	13.5 ± 0.6	0.24 ± 0.20

^aSubcutaneous (EB and TAM) or oral (EE) administration in dams for parental males on gestational days 9 through 16 at the indicated dose.

^bMean \pm SE.

^cTotal number of pregnant females examined.

*Significantly different from the control by the Mann-Whitney *U* test at $P = 0.05$.

**Significantly different from the control by the Mann-Whitney *U* test at $P = 0.01$.

As shown in Table 3, dwarfism, cleft palate and exencephaly were detected as malformations in the fetal offspring of males pre-natally exposed to 0.30 mg/kg/day of EB. In addition to these two types of malformations, open eyelid and polydactyly were observed in the offspring of males exposed in utero to 0.2 mg/kg/day of EE. None of these five types of malformation are atypical, and all occur spontaneously in ICR mice as shown in the last two columns of Table 3. The numerical ratios of cleft palate : dwarfism : exencephaly in the EB-treated, EE-treated and control series were 15:4:1, 15:6:1 and 29:7:2, respectively. These values did not differ significantly from each other ($\chi^2 = 0.67$, d.f.=2, $P > 0.05$). The frequencies of fetuses with cleft palate in the EB- and EE-treated series were 0.98 (=15/1529) and 0.55% (=15/2688), respectively, both of which were significantly higher than the spontaneous frequency of 0.20% (=28/13329) as tested by Fisher's exact test at $P = 0.05$. When the two sets of data from the treated series were combined, the resulting frequency of dwarfism ($10/4217=0.48\%$) was significantly higher than the spontaneous frequency of 0.06% (=7/13329). These observations reconfirm the transgenerational teratogenic effects of EB and EE.

Table 3. Distribution of Malformations in the Fetal Offspring of Male Mice Exposed Prenatally to Synthetic Hormone EB or EE

Type of Malformations	Abnormal offspring of males exposed to 0.30 mg/kg/day of EB				0.2 mg/kg/day of EE				Untreated control ^a	
	No.	F (%)	No.	F (%)	No.	F (%)	No.	F (%)	No.	F (%)
Dwarfism	4	0.26	4	0.15	6	0.05				
Cleft palate	15	0.98	13	0.48	27	0.20				
Cleft palate + dwarfism	^b		2	0.07	1	0.01				
Cleft palate + brain hernia	-		^b		1	0.01				
Open eyelid	-		1	0.04	2	0.02				
Exencephaly	1	0.07	1	0.04	^b					
Exencephaly + polydactyly	-		-		1	0.01				
Exencephaly + microphthalmus	-		-		1	0.01				
Polydactyly	-		1	0.04	3	0.02				
Microphthalmus	-		-		3	0.02				
<i>Total</i>	20	1.31	22	0.82	45	0.34				
Total no. of fetuses examined		1529		2688						13329

F = Frequency of malformed fetuses per 100 fetuses.

^aData pooled for concurrent and historical controls.

^bNot detected.

DISCUSSION

The results from the present study have shown that prenatal exposure of ICR males to estrogenic compounds is hazardous not only for the development of the reproductive tract in the treated mice, but also for embryonal development in the subsequent generation. Toxic effects on the reproductive tract were detected as histopathological changes in males treated with EB at 0.3 mg/kg/day or EE at 0.2 mg/kg/day (Table 1). An increased incidence of malformations was recorded in the fetal offspring of these males (Table 2).

With one exception, all reproductive tract abnormalities detected after EB or EE treatment were of types that had not been reported to occur in ICR mice either spontaneously or experimentally. The exception was atrophy of seminiferous tubules in one impotent male from the EE-treated group. This type of abnormality had been reported by Yasuda et al. (1985) after prenatal exposure of ICR males to EE. These authors further reported that prenatal EE exposure can produce ovotestis and intra-abdominal testis with Mullerian and Wolfian ducts. In the present study, a feminization effect of EE was seen as formation of oviduct- and uterus-like structures in the reproductive tract of treated males. Epididymal cysts, which were observed in the EB- and the EE-treated males, have been reported to occur in CD-1 mice after prenatal exposure to DES.

In contrast to the reproductive tract abnormalities, all of the external malformations detected in the fetal descendants of males exposed pre-natally to EB at 0.30 mg/kg/day or EE at 0.2 mg/kg/day were of types known to occur in ICR mice (Table 3). Namely, with regard to the types of malformations, the transgenerational effect observed in the present study is neither atypical for ICR mice nor specific to the drugs tested or the stage of germ-cell development at the time of treatment, as shown by the following observations. The relative ratios of cleft palate: dwarfism: exencephaly in the EB-treated, EE-treated and control series were 1:0.3:0.07, 1:0.4:0.07 and 1:0.2:0.07, respectively. Similarly, cleft palate was the most common, followed by dwarfism and exencephaly in this order among external malformations produced in the offspring of ICR males treated with a mutagen at the spermatogonial stem cell or the post-meiotic stage (Nagao, 1987, 1988; Nagao and Fujikawa, 1990; Nagao and Fujikawa, 1998). Taken together, it seems that heritable damage was induced in embryonic germ cells (i.e., primordial germ cells) after exposure to EB or EE, and the offspring inherited the damage and were sensitized to spontaneous teratogenesis. Primordial germ cells are at risk for chemical induction of transmissible change, as shown by the induction of specific locus mutations and dominant skeletal mutations with ethylnitrosourea (Shibuya et al., 1993; Wada et al., 1994). However, it is not clear whether the germ-cell damage responsible for the effects observed in the present study was genetic or epigenetic in nature.

Despite such uncertainty, the results of the present study on male-mediated teratogenesis agree with those of previous reports on transgenerational carcinogenicity of DES (Turusov et al., 1992; Walker and Kurth, 1995) in suggesting vulnerability of developing germ cells to estrogenic drugs. Considering the differences in the kind of drugs tested, the strain of mice used, and the effects examined between the present and the previous studies, transgenerational effects of estrogenic drugs do not seem to be a rare phenomena in mice. Studies of the molecular mechanisms of the effects are required to evaluate the implications of these observations in human situations.

ACKNOWLEDGEMENTS

These studies were supported by a grant from The Science and Technology Agency of the Japanese Government: Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology

REFERENCES

- Nagao, T., 1987, Frequency of congenital defects and dominant lethals in the offspring of male mice treated with methylnitrosourea. *Mutation Res.* 177:171-178.
- Nagao, T., 1988, Congenital defects in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea. *Mutation Res.* 202:25-33.
- Nagao, T., 1999, Multigeneration effects of endocrine disrupting chemicals with special reference to teratogenesis by paternal exposure to synthetic hormones. *Environ Mutagen Res.* 21:267-272.
- Nagao, T., and Fujikawa, K., 1990, Genotoxic potency in mouse spermatogonial stem cells of triethylenemelamine, mitomycin C, ethylnitrosourea, procarbazine, and propyl methanesulfonate as measured by F₁ congenital defects. *Mutation Res.* 229:123-128.
- Nagao, T., and Fujikawa, K., 1998, Modified susceptibility to teratogenesis in the offspring of male mice exposed to mutagens. *Cong Anom.* 38:1-8.
- Shibuya, T., Murota, T., Horiya, N., Matsuda, H., and Hara, T., 1993, The induction of recessive mutations in mouse primordial germ cells with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *Mutation Res.* 290:273-280.
- Shibuya, T., Horiya, N., Matsuda, H., Sakamoto, K., and Hara, T., 1996, Dose-dependent induction of recessive mutations with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea in primordial germ cells of male mice. *Mutation Res.* 357:219-224.
- Turusov, V.S., Trukhanova, L.S., Parfenov, Y.D., and Tomatis, L., 1992, Occurrence of tumors in descendants of CBA male mice prenatally treated with diethylstilbestrol. *Int J Cancer.* 50:131-135.
- Wada, A., Sato, M., Takashima, H., and Nagao, T., 1994, Congenital malformations in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea at the embryonic stage. *Teratogen Carcinogen Mutagen.* 14:271-279.
- Waker, B.E., 1984, Tumors in female offspring of mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *J Natl Cancer Inst.* 73:133-140.
- Waker, B.E., and Kurth, L.A., 1995, Multigenerational carcinogenesis from diethylstilbestrol investigated by blastocyst transfer in mice. *Int J Cancer.* 61:249-252.
- Yasuda, Y., Kihara, T., Tanimura, T., and Nishimura, H., 1985, Gonadal dysgenesis induced by prenatal exposure to ethinyl estradiol in mice. *Teratology.* 32:219-227.

24

Toxicogenomics Applied to Hematotoxicology

Yoko Hirabayashi and Tohru Inoue

24.1

Introduction: Forward and Reverse Genomics

Microarray [1, 2] and/or gene chip [3] technologies have enabled the survey of a large number of gene expressions. Specifically, along with the progress in the human and the mouse whole-genome sequencing projects [4, 5], nearly complete gene expression profiling for not only cellular physiological phenotypes, but also for pathological and clinical phenotypes, can also be done with the newly developed genomics methodology. In contrast, prediction and identification of a variety of physiological and pathologic phenotypes solely by gene expression profiling, that is, predictive genomics, is also presumed to be possible by this strategy, once a comprehensive database has been established. The former is called forward genomics, and the latter reverse genomics (Figure 24.1) [6]. The application of microarray and gene chip technologies in toxicology is called toxicogenomics [7]. Toxicogenomics can contribute to elucidating the toxicological mechanism (inductive toxicogenomics) and to predicting various possible toxic phenotypes solely on the basis of similarity in gene expression profiling without annotation of chemical characteristics (deductive toxicogenomics). The former is intended to define an unknown gene profiling marker, and consequently, proteomics markers, whereas the latter is intended to predict various possible toxicological phenotypes even without annotative information. The predictability of the latter strategy should be enhanced by using a database resulting from collaboration between the above-mentioned inductive and deductive approaches. These are analogous to the clinical use of genomics for human tissue samples and using informatics on clinical data to predict the diagnosis of diseases, responses to treatment, and consequent individual prognoses. Such medical and medicinal genomics information (including knowledge of single nucleotide polymorphisms; SNPs) may eventually make custom-made personal treatment protocols possible, and the newly established methodology should also make SNP-oriented human ecotoxicological risk evaluation possible.

In the toxicological application of toxicogenomics using experimental animals, toxicogenomics appears to have two definitive advantages: first, a reduction in the number of test animals and a shortening of the test period, and second, the use of

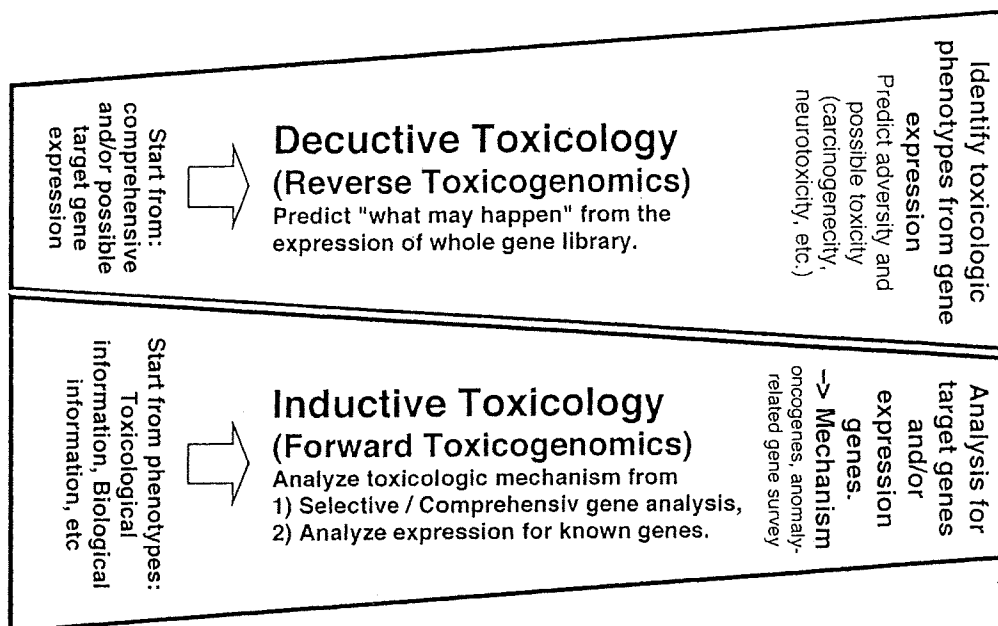


Fig. 24.1 Structures of inductive toxicology vs. deductive toxicology. The former begins its analyses from various toxicological phenotypes, including gross and/or pathological findings, and laboratory information, and proceeds toward the mechanism, whereas the latter focuses on pre-

dicting toxicological phenotypes solely on the basis of similarities in gene expression profiles without annotation of chemical characteristics. Nominally, the information on various phenotypes can be more diverse and far larger than the information on original gene expression profiling.

simpler technologies applying established expression profiles as new biomarkers, rather than sophisticated technologies requiring skills and experience. Since various phenotypes, including animal behaviour, are ultimately linked to the expression of genes and appear in consequence of the expression of a limited number of genes, much information can be condensed into a gene expression profile. At this moment, generalized reverse toxicogenomics is still a theory, except for the use of chips for customized purposes. However, the general applicability of species differences, including the extrapolation of responses from experimental animals to humans, the extrapolation of changes *in vitro* to responses *in vivo*, the possibility of analyzing multiple of toxicities from multiple toxicants, as well as the ability to extrapolate from high-dose markers to possible low-dose responses, and the discovery of early gene markers for long-term endpoints, are all promising future challenges [7].

In hematotoxicological applications, because the cellular targets of hematopoietic repertoires vary depending on the position of hierarchical structures along with their immaturity (that is, their 'stemness') and differentiation status, an accurate cell-separation technique for obtaining a reliable homogeneous fraction for relevant and repeatable comparison is necessary, such as flow-cytometric cell sorting with or without various markers for cellular identification or differentiation. Although it is generally accepted that such profiling differences are affected by sampling timing in various tissues in living animals, the hematopoietic tissue, as a continuously proliferating tissue, specifically shows a significantly different and labile profile in the micro-

array between the tissues immediately after damage and other tissues in the recovery phase. Furthermore, controversial time-sequenced responses differ between immature and differentiated cell compartments; thus, the timing of tissue sampling and the relevant comparison of fractionated blood cell compartments are critical for establishing a repeatable outcome [7].

In the following section, first, a brief overview of the physiological characteristics of hematopoietic stem/progenitor cells is given as a cellular biological basis of hematotoxicology. This is followed by a review of gene expression profiling, that is, molecular signatures, for stem cells. Two case studies on hematotoxicological toxicogenomics, involving radiation and benzene hematotoxicities, are then described so as to review two human ultimate leukemogens and their leukemogenic/hematotoxic profiling obtained by using a microarray. In the section on benzene exposure, gene expression profiling is specifically focused on in comparing p53 knockout (KO) and wild-type (WT) mice.

24.2

Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in Hematotoxicology

Since the hematopoietic system consists of a mixture of heterogeneous cells with respect to not only functionally different cellular lineages, but also different stages in differentiation, an unfractionated blood sample may give differing gene expression profiles, and microarray data may not always provide an efficient and predictable outcome. As briefly described in the Introduction, specific attention should be paid to the preparation and interpretation of microarray data; thus, this section provides an overview of the hematopoietic system with respect to the nature of hematopoietic stem/progenitor cells and with special reference to microarray data processing and its interpretation.

The concept of a multipotent hematopoietic stem cell dates back to the radiation studies of Jacobson and coworkers in 1949–1950 [8–10], who observed autonomous hematopoietic recovery in lethally irradiated mice whose spleen or bone marrow had been shielded during otherwise lethal radiation exposure. In 1961, Till and McCulloch discovered that when normal bone marrow cells are transplanted into lethally irradiated mice, their spleens develop macroscopically visible colonies originating from regenerated hematopoietic cells and that the number of colonies directly correlates with the number of bone marrow cells injected, based on the hypothesis that each colony is derived from a single stem (termed spleen colony-forming unit, CFU-S) [11]. In 1965, they confirmed the clonogenic nature of CFU-S and then developed the currently used spleen colony assay for hematopoietic clonality [12]. Since Till and McCulloch's discovery, CFU-S was assumed to be the hematopoietic stem cells for more than 40 years; however, after the discovery of cells possessing a long-term repopulating ability in lethally irradiated mice, which were in addition found not to produce spleen colonies [13], CFU-Ss were renamed pluripotent hematopoietic progenitor cells, and the name of the cells in the common stem/progenitor cell compartment discussed here was changed to hematopoietic stem/progenitor cells.

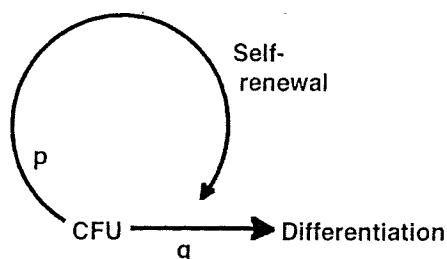


Fig. 24.2 Stem cell capability. Stem cells are capable of both proliferation (p) and differentiation (q), where p and q are independent variables; the ratio between the two is probabilistic. In the steady state, $p + q = 1$ [16].

Hematopoietic stem/progenitor cells, by definition, are targets of toxicological effects [14, 15]. Stem cells are capable of undergoing self-renewal (p) and/or differentiation (q), where p and q are independent variables. In the steady state, $p + q = 1$ (Figure 24.2) [16]. The progeny of hematopoietic stem/progenitor cells can be represented as a hierarchy of self-replicating, differentiating, and/or maturing daughter cells whose frequency depends on the relative probability of self-renewal during colony growth [16–19]. Relatively primitive hematopoietic stem cells, termed long-term repopulating stem cells (LTRCs), possess a relatively high capacity for multilineage differentiation and tend to generate mixed lymphomyeloid colonies in culture [18]. The mechanism of molecular switching of lineage-specific differentiation is not yet fully understood, but over-expression of TAL-1, a transcription factor involved in myeloid differentiation, inhibits lymphoid differentiation in ectopic over-expressing mice [20]. The mechanism of molecular switching was extensively studied by Lemischka's group [21] (see next section). The uncommitted hematopoietic progenitor cell, termed the *in vitro* colony-forming unit (CFU-C), can generate various lineage-specific colonies in semisolid culture, depending on the specific hematopoietic growth factors used to supplement the culture medium [16, 22].

Primitive stem cells and differentiating progenitor cells differ in kinetic characteristics. A method of evaluating stem cell kinetics *in vivo*, called the BUUV method, is available, and its use is introduced in Section 24.5.1. Once primitive stem cells (which tend to be predominantly in G_0) enter the cell cycle, they tend to proliferate at a more rapid rate than early progenitor cells [23]. Thus, elucidation of stemness is of special interest (see next section). One particular characteristic of the stem/progenitor function is explained by the significance of the activity of telomerase, a reverse transcriptase, as it is associated with the replicating potential of stem/progenitor cells. That is, primitive stem cells have a lower telomerase activity than do early progenitor cells, whereas early progenitor cells have high telomerase activity; however, as they mature or after repeated bone marrow transplantation, progenitor cells lose their telomerase activity [24, 25].

The shape of a hematopoietic colony growing in semisolid culture reflects its differentiation characteristics which, in turn, depend on the receptors expressed by its stem/progenitor cells and on the growth factor(s) used to supplement the culture medium (Figure 24.3). Colonies derived from immature stem cells are characterized by compactness, a high self-renewal capability, and a relatively low differentiation activity. Early uncommitted CFU-C generate an aggregation of several subcolonies called a mixed colony, indicating coexistence of a high self-renewal capacity and active differentiation ability. Although these colony-forming units in culture are

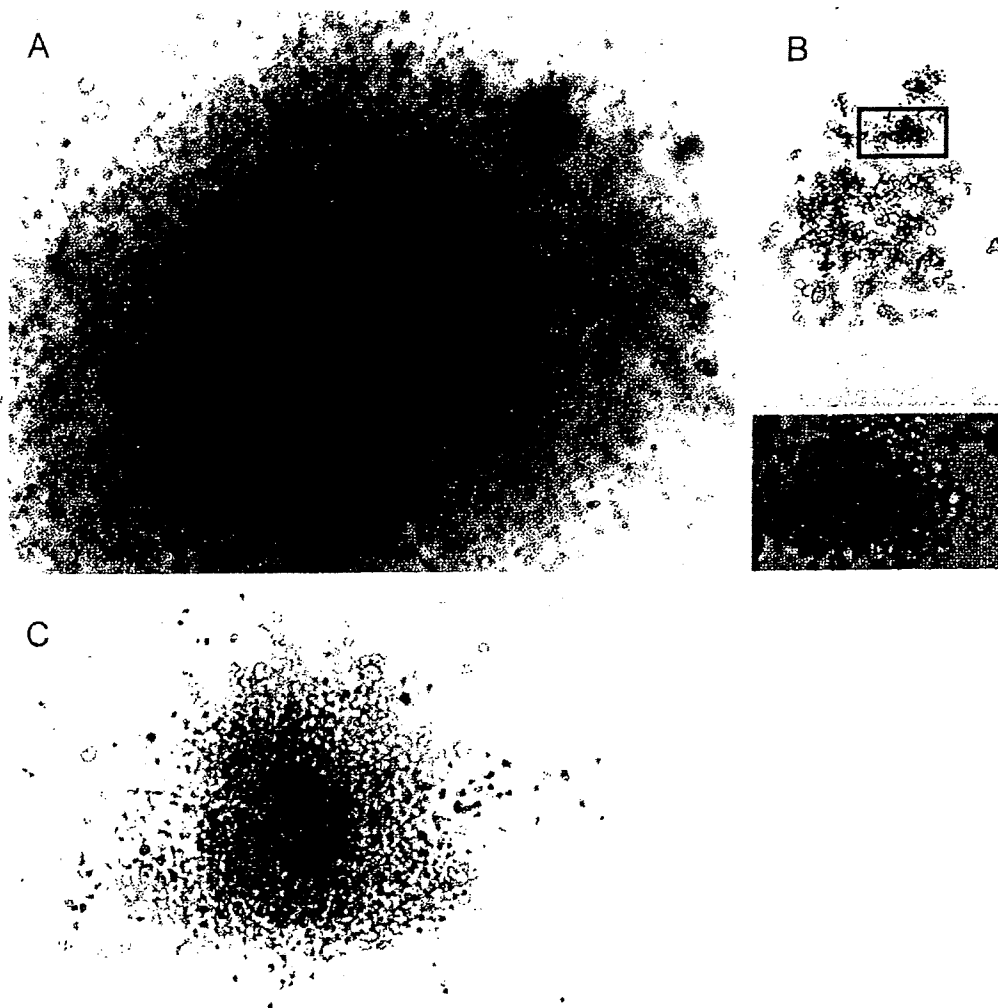


Fig. 24.3 Various hematopoietic colonies. Cultures of colonies were started from bone marrow cells, 2×10^4 cells mL^{-1} , grown in semisolid media with 0.8% methylcellulose in alpha MEM supplemented with 30% FCS (HyClone Lab.), 1% BSA, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ interleukin 3, and 2 U mL^{-1} erythropoietin. (A) Colony-forming unit with granulo-macro-

phage-megakaryocyte elements (original magnification, $\times 15$); (B) burst colony-forming unit composed of erythroid elements (the inset at the bottom is a higher-magnification view of the boxed daughter aggregate at the top) (original magnification, $\times 15$, top; and $\times 225$ bottom); (C) colony-forming unit granulo-macrophage in the right (original magnification, $\times 15$).

thought to be more differentiated progenitors than CFU-S, there are more primitive stem/progenitor cells, which are thought not to produce spleen colonies but which support the survival of lethally irradiated mice (LTRCs) [18, 26]). The hierarchy of the hematopoietic stem/progenitor cells mentioned above appears to express their own gene-expression profiling (see next section).

Correlating patterns of hematopoietic colony growth with changes in rates of hematopoietic stem/progenitor cell self-renewal and differentiation may be a useful tool for toxicological evaluation. That is, a large colony is derived from a progenitor cell whose

progeny has a high rate of both proliferation and differentiation, whereas an aggregate of numerous smaller colonies indicates derivation from a stem/progenitor cell with a high rate of self-renewal but a low rate of differentiation. Early stem/progenitor cells tend to generate compact colonies, whereas the more mature (committed) progenitor cells tend to produce dispersed colonies. The differentiation status may also reflect specific gene expression profiling (see next section). The shape and size of a hematopoietic colony can be an index of a stem/progenitor cell's kinetic status [23].

Current progress in the study of stem-cell plasticity is significant. The capability of stem cells to differentiate into various tissues is virtually unlimited. Not only have embryonic stem cells been shown to be able to differentiate into hematopoietic stem cells [27] or neuronal stem cells [28] and adipocytes [29], but hematopoietic stem cells have also been shown to be able to differentiate into hepatic oval cells [30] and hemangio-endothelial cells [31]. Moreover, bone marrow stromal cells appear to be capable of differentiating into neuronal stem cells [32], hematopoietic stem cells [33], and cardiac muscle cells [34]. Such transorganism tissue stem cell systems may express common gene profiling on one hand, but each tissue stem cell system, including embryonic stem cells, expresses its own specific gene profiling [35] (see next section).

24.3

Molecular Signature of Stemness of Hematopoietic Stem/Progenies

Hematopoietic tissue consists of various blood cells and stromal cells, which form the hierarchy of the blood family. The proliferation and differentiation of blood cells are regulated by the interaction between blood cells, between blood cells and stromal cells, and between stromal cells indirectly through various cytokine secretions. Various blood lineages originate from each progenitor, which are different from common hematopoietic stem cells. Importantly, each progenitor cell expresses different molecular signatures (gene profiles), which enable them to maintain their particular characteristics. In this section, some trials to determine such particular gene-expression profiling of physiological stem/progenitor cells are introduced.

To elucidate the molecular signatures of hematopoietic stem/progenitor cells, it is important to characterize each expression profile that is specifically linked to each cell compartment, which is fractionated into various groups of bone marrow cells along with their differentiation from stem cells through progenitor cells to terminally differentiated cells. Thus, before microarray analyses, obtaining the expression profile of the specific fraction of the hematopoietic compartment provides essential information useful in future microarray analysis. Lemischka and coworkers analyzed a genome-wide gene expression defining regulatory pathways in stem cells [35] (Figure 24.4A). They fractionated $Sca^{pos}AA4.1^{pos}Kit^{pos}Lin^{neg/lo}$ [21, 36] and obtained cells from the fraction. cDNA libraries were obtained by removing of the $AA4.1^{neg}$ fraction [21]. According to the report of Phillips et al. [21], 42% of the genes studied either exactly matched data in PubMed queries or were homologous to known protein sequences, 39% were found in a list of expression sequence tag (EST) homology, and 14% of the genes studied found no match. Based on the functions predicted