

学 位 申 請 論 文

ラットにおけるパラコートの胎子動脈管 収縮作用に関する実験的研究

第1章 緒言	11
第2章 総論	13
第3章 実験	16
第4章 結論	35
第5章 参考文献	4
第6章 謝辞	5
第7章 抄録	6
第8章 英文抄録	7
第9章 英文抄録	8
第10章 英文抄録	9
第11章 英文抄録	10
第12章 英文抄録	11
第13章 英文抄録	12
第14章 英文抄録	13
第15章 英文抄録	14
第16章 英文抄録	15
第17章 英文抄録	16
第18章 英文抄録	17
第19章 英文抄録	18
第20章 英文抄録	19
第21章 英文抄録	20
第22章 英文抄録	21
第23章 英文抄録	22
第24章 英文抄録	23
第25章 英文抄録	24
第26章 英文抄録	25
第27章 英文抄録	26
第28章 英文抄録	27
第29章 英文抄録	28
第30章 英文抄録	29
第31章 英文抄録	30
第32章 英文抄録	31
第33章 英文抄録	32
第34章 英文抄録	33
第35章 英文抄録	34
第36章 英文抄録	35
第37章 英文抄録	36
第38章 英文抄録	37
第39章 英文抄録	38
第40章 英文抄録	39
第41章 英文抄録	40
第42章 英文抄録	41
第43章 英文抄録	42
第44章 英文抄録	43
第45章 英文抄録	44
第46章 英文抄録	45
第47章 英文抄録	46
第48章 英文抄録	47
第49章 英文抄録	48
第50章 英文抄録	49
第51章 英文抄録	50
第52章 英文抄録	51
第53章 英文抄録	52
第54章 英文抄録	53
第55章 英文抄録	54
第56章 英文抄録	55
第57章 英文抄録	56
第58章 英文抄録	57
第59章 英文抄録	58
第60章 英文抄録	59
第61章 英文抄録	60
第62章 英文抄録	61
第63章 英文抄録	62
第64章 英文抄録	63
第65章 英文抄録	64
第66章 英文抄録	65
第67章 英文抄録	66
第68章 英文抄録	67
第69章 英文抄録	68
第70章 英文抄録	69
第71章 英文抄録	70
第72章 英文抄録	71
第73章 英文抄録	72
第74章 英文抄録	73
第75章 英文抄録	74
第76章 英文抄録	75
第77章 英文抄録	76
第78章 英文抄録	77
第79章 英文抄録	78
第80章 英文抄録	79
第81章 英文抄録	80
第82章 英文抄録	81
第83章 英文抄録	82
第84章 英文抄録	83
第85章 英文抄録	84
第86章 英文抄録	85
第87章 英文抄録	86
第88章 英文抄録	87
第89章 英文抄録	88
第90章 英文抄録	89
第91章 英文抄録	90
第92章 英文抄録	91
第93章 英文抄録	92
第94章 英文抄録	93
第95章 英文抄録	94
第96章 英文抄録	95
第97章 英文抄録	96
第98章 英文抄録	97
第99章 英文抄録	98
第100章 英文抄録	99

1998

本 谷 真 澄

目 次

緒 言	1
第1章 妊娠ラットおよび胎子におけるパラコート動態	
第1節 材料と方法	6
第2節 結果	8
第3節 考察	9
第4節 小括	10
第2章 パラコートの動脈管に対する影響 —収縮作用における用量依存性の検討および収縮した動脈管の形態学的観察—	
第1節 材料と方法	11
第2節 結果	13
第3節 考察	14
第4節 小括	15
第3章 パラコートの動脈管収縮作用の臨界期の検討	
第1節 材料と方法	17
第2節 結果	18
第3節 考察	19
第4節 小括	20

第4章	母体パラコート投与後における胎子PGE ₂ 直接投与による動脈管の変化	
第1節	材料と方法	21
第2節	結果	22
第3節	考察	23
第4節	小括	24
第5章	パラコートのプロスタグランジン合成酵素に対する作用の検討	
第1節	材料と方法	25
第2節	結果	26
第3節	考察	27
第4節	小括	28
第6章	パラコートの胎子血漿中プロスタグランジンE ₂ への影響	
第1節	材料と方法	30
第2節	結果	31
第3節	考察	32
第4節	小括	33
総括		34
結論		38
謝辞		39
引用文献		40
英文要旨		

緒 言

パラコートは1882年に英国で合成され、1962年に英国 I C I 社にて農薬として開発されたalkylbipyridylium系の化合物で、多くはparaquat dichloride (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium dichloride)の形で、多くの国々で多種類の雑草に対する有効な非選択的除草剤として使用されている。パラコートの除草剤としての作用機序は、酸化還元反応により生成される活性酸素が葉緑体などに作用して、植物の茎葉部分を枯死させるというもので、パラコートの農業分野における有用性は非常に高く、特に草根部分を残した除草効果は、傾斜地における果樹園等の除草において大きな利点となり、現在でも広く使用されているゆえんである。

ヒトにおけるパラコート中毒事故の内容をみると、散布中の事故による中毒は希であるが、不適当な取り扱いおよび誤飲による中毒事例は少なく、特に自殺あるいは他殺の目的で用いられることによって発生するパラコート中毒事故が数多くみられる（恒成と米満、1987；Vale et al., 1987）。我が国においてもヒトにおけるパラコート中毒の発生件数（自殺あるいは他殺目的での中毒も含む）は1965年から増加の一途をたどり、1986年には1,000件を越える死亡件数をもっている（井上堯子、1994）。販売された当初のパラコート製剤は、パラコートを24%含有するグラモキソンおよび38%含有のパラゼットであったが、このような多数の中毒死亡事故の発生がみられたことから、1979年以降に販売されたものには催吐剤が添加された。さらに、1982年には着色、1985年には着臭を製剤に施すことによって、経口的摂取の予防対策が講じられた。それでもパラコート中毒事故件数の減少には至らなかったため、1986年にパラコート含有量を下げて、かつパラコートと同様のalkyl-bipyridylium塩系の化学物質であるジクワットとを混合した製剤（商品名はプリグロックスLおよびマイゼットでパラコート5%・ジクワット7%を含有）への切り替えが行われた。当時、著者

はICIジャパン社の開発課にてこの承認申請業務に、またその後は安全対策課にて同製剤の安全使用に関する啓蒙活動業務に従事した。

これらの対策によってパラコートによる中毒事故件数（1986年以降はパラコートとジクワットの混合製剤による中毒を含む）は、1986年の1,202件をピークとしその後減少傾向を示したが、1992年の時点においてもなお420件の中毒が発生しており、農薬による中毒の発生原因では過去10年以上にわたり第1位という結果になっている。また、パラコート中毒は農薬による中毒事故数の約半数を占めるものでもある（井上堯子、1994）。

ところで、パラコートの毒性については、以前からヒトや動物に対して強い毒性を示すことが知られており（Haley、1979；Onyeama and Oehme、1984；Smith and Heath、1976）、動物種によって感受性に差があることも報告されている（Butler and Kleinerman、1971；Murray and Gibson、1972）。ヒトにおけるパラコート中毒の徴候は、初期には口腔、食道等のびらん、潰瘍などの消化器系臓器に対する障害およびショックである。パラコートが体内に吸収されると、急性期には肺、腎臓、肝臓、心臓、副腎など高血流臓器において毒性を示し、多臓器不全を引き起こして致死的経過をとる（荒井と名取、1981；名取、1979；Vale et al.、1987）。パラコート中毒の特徴は、他の一般的な化学物質とは異なり、重要な標的器官である肺には急性中毒期を脱した後でも、なお慢性的に非可逆的な進行性肺線維症を引き起こして、死に至らしめることにある（荒井と名取、1981；三砂ら、1984）。

これらの生体に対するパラコート毒性のメカニズムは、1975年当初はBusら（Bus et al.、1975；Bus et al.、1976）によって提唱された説が広く受け入れられていた。その説によると、パラコートはミクロソームのNADPH-リダクターゼ系で還元されると、その酸化還元サイクルによって生じたスーパーオキシドアニオンは一重項酸素へと変化し、これが脂質の過酸化を生じさせることで細胞膜の障害を引き起こすというのである。その後の研究から、パラコート毒性

のメカニズムは嫌氣的条件下で還元型パラコートと過酸化水素との反応で生じたヒドロキシラジカルがパラコート毒性の原因であるとの説 (Winterbourn、1981 ; Youngman and Elstner,1981)、また、パラコート誘発の肺障害には脂質の過酸化は関わらない(Misra and Gorsky ,1981)との説、さらには、細胞内に取り込まれたパラコートがヒドロキシラジカルを生じさせ、これによる過酸化脂質の生成が細胞障害を引き起こす(Smith ,1987)との説など、諸説が提唱されてきている。近年では、パラコートはミトコンドリアへの毒性がその本質であるとの報告(Hirai et al., 1985 ; Yamada and Fukushima,1993)もみられるが、今日でもなお、パラコートの毒性機序については再検討の時期にあると考えられる。

このように、パラコートは成体に対する影響やその毒性学的メカニズムについては多くの研究がなされてきているが、その発生・生殖毒性に関しては、少数の報告がみられるのみである。これらによると、パラコートは胎盤を通過し胎子へ移行するもののその胎子にに対する毒性は、成体に対するものと比較するとわずかであるという (Bus et al., 1975; Ahmed et al., 1988; Khera and Whitta, 1968)。

ところで、胎仔は、栄養分や酸素を母体から胎盤を通して吸収しており、また、羊水中で生活しているため、肺は機能していない。そのため、末梢から心臓へ送られた血液は肺を経由せず、成体で見られる循環とは異なる独自の循環系を持っている。胎仔循環の特徴として、臍動脈と臍静脈の存在・胎盤の存在・卵円孔および動脈管の存在がある。卵円孔とは、心房中隔に存在する孔で右心房と左心房を連絡するものであり、動脈管とは、肺動脈を直接大動脈へと結ぶ太いバイパスである。

この動脈管は、胎生期においては重要な循環系の一翼を担っており、成体には見られない独特の血管である。この血管は弾性線維に富む肺動脈や大動脈と異なり、極めて平滑筋に富む中膜を有する筋型動脈である。

動脈管は妊娠末期に向かって徐々に内径を増すが、出生後は肺呼吸の開始と

ともに収縮閉鎖する (Rudolph, 1974)。呼吸開始後、動脈管の収縮閉鎖に要する時間は、ヒトでは、10~15時間 (Rudolph, 1974)、ウサギでは 60~90分 (Momma et al., 1980)、ラットでも60~90分 (Hörnblad and Larrson, 1976; Pawell and Cochrane, 1978) といわれている。動脈管は収縮後、時間の経過とともに動脈管索として遺残する。動脈管が収縮閉鎖することにより、胎仔循環から成体循環、つまり、肺循環へと移行する。しかし、この動脈管の生後の収縮閉鎖が順調に行なわれないと、新生仔に循環器障害が引き起こされ、危険な状態に陥ることもある (Rudolph, 1974)。

動脈管は極めて特異な性質を持つ血管であり、その一つとして、動脈管はそれを流れる血液中のPO₂の濃度変化に敏感に反応するといわれている (Dawes, 1968)。生後の動脈管の収縮を引き起こす原因の一つとして、血液中のPO₂の上昇が考えられている (Rudolph, 1974)。

また、もう一つの特異な性質として、胎仔の動脈管の拡張維持はプロスタグランデジンの作用によるとされている (Cocconi and Olley, 1973; Clyman et al., 1978; Momma et al., 1980)。この動脈管の拡張維持作用は、プロスタグランデインの生合成を阻害するグルココルチコイドおよび非ステロイド性抗炎症薬インドメタシンなどを投与することによって、動脈管が収縮することから確かめられている (Kantrowitz et al., 1975; Hong and Lewis, 1976)。このように、インドメタシンを直接胎仔へ、あるいは母体へ投与 (胎盤を経由) すると動脈管が収縮することが、ヒツジ (Clyman, 1980)、ウサギ (Sharpe, et al., 1975) およびラットで確かめられている。さらに、近年、抗炎症薬ではない化学物質によって、つまり母体が摂取したアルコールによって胎子の動脈管が収縮すること (Arishima et al., 1993) や、カルシウム拮抗薬ベラパミル (Takizawa et al., 1994)、アンギオテンシン I 変換酵素阻害薬エナラプリル (Takizawa et al., 1994)、 β -受容体遮断薬プロプラノロール (Arishima et al., 1996) などが出生後の動脈管の収縮閉鎖を遅延させることなどが明らかにされ、種々の化学物質の動脈管に

に対する作用が注目されている。

そこで、本研究では、医薬品の安全性評価に用いられる方法で、その指標となる動脈管を観察することによって、パラコートの胎子に対する影響およびその作用機序について、ラットを用いて検討することとした。まず、第1章では、妊娠ラットにパラコートを単回皮下投与した場合の、胎子におけるパラコートの動態について検討した。第2章では、母体パラコート投与による胎子動脈管の変化を形態学的に検討した。第3章では、パラコートの動脈管収縮作用が胎生期のいつの時期に感受性を示すのかを検討した。第4章では、パラコートによって一旦収縮した動脈管のPGE₂に対する反応性を検討した。第5章では、プロスタグランジン合成酵素であるプロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ（シクロオキシゲナーゼおよびヒドロキシオキシゲナーゼ）に対するパラコートの *in vitro* における影響を検討した。第6章では、*in vivo* におけるパラコートのPGE₂に対する作用を検討した。

第 1 章

妊娠ラットおよび胎子におけるパラコートの動態

ラット胎子動脈管へのパラコートの影響を実験的に検討するにあたり、本章では基礎的な検討として、パラコートを妊娠ラットに単回皮下投与した場合、その母体および胎子の血漿中パラコート濃度がどのように推移するかについて検討した。

第 1 節 材料と方法

1) 被験物質

被験物質のパラコートはゼネカ（株）農薬事業部より供与されたもの（paraquat dichloride、純度99.4%）を用いた。その分子量はパラコートイオンとして186.2、dichlorideとしては257.2である（図-1）。

2) 使用動物および飼育条件

動物は交配の際に12～15週齢に達した雌のWistar系ラットを用いた。動物の飼育は、温度 22 ± 3 ℃、湿度 $55 \pm 10\%$ に設定された動物室で行った。飼料として固形飼料 Labo-MR-Breeder および水道水を自由に給与した。妊娠動物を得るために、雌雄ラットを終夜同じケージに入れ置き、翌朝、雌腔内に精子の存在を調べた。精子の確認された日を妊娠0日または胎齢0日とし、その時から、妊娠雌を個別のケージで飼育した。

3) 実験方法

妊娠21日の午後1時を剖検時間と定めて、剖検1、2、3、6および24時間前パラコートを25 mg/kgの用量で母体に皮下投与した。剖検の際、母体はエーテル麻酔下にて開腹し腹大動脈より採血した。胎子は帝王切開によって取り出した。胎子の血液は胎子の腋窩部を切り、流出する血液をキャピラリーチューブによって採取した。採取した母体および胎子の血液はEDTA用いて抗凝固処理した後、3,000 rpm、15分間の遠心分離にて血漿を分離し、血漿中パラコート濃度の測定のための試料とした。また、得られた血漿は測定に供するまで-80℃にて凍結保存を行った。

4) 血漿中パラコート濃度の測定方法

血漿中パラコート濃度の測定は、山本らの方法(1989)を一部変更して高速液体クロマトグラフィー(以下HPLC)により行った。

測定試料の前処理は、被験血漿に0.5 N過塩素酸を2倍量加え、ボルテックスミキサーにて混和後、6,500 rpmにて10分間遠心分離することで除蛋白を行い、この上清をミリポアフィルター(0.22 μ m)(日本ミリポア工業(株))にて濾過し、これを被験液として用いた。

測定条件は以下の通りである。

分析に用いたカラムは逆相分配型カラムCOSMOSIL 5C18(ナカライテスク(株))、4.6 mm(I.D.) \times 150 mm(L.)を使用し、カラムの前にCOSMOSIL用フィルターカラム(1 μ m)を接続した。移動相はメタノール：超純水=25：75を用い、これにイオン対試薬として5 mMヘプタンスルホン酸ナトリウムおよび50 mM過塩素酸ナトリウムを加え、リン酸にてpH 2.2に調整したものを用いた。HPLCシステムはLC-10A(島津製作所(株))を用い、流速1 ml/min、カラム温度40℃の条件で紫外分光光度計検出器にて254 nmでの吸光度を測定し、血漿中PQ濃度を算出した。

5) データの解析方法

血漿中パラコート濃度に基づく動態学的パラメーターの算出は非線形最小二乗法解析プログラムMULTI (Yamanaka et al., 1981) によりパーソナルコンピュータを用いて行った。また、血漿中濃度曲線下面積 (AUC) については台形法により算出した。

第2節 実験結果

1) 母体の血漿中パラコート濃度の推移

母体の血漿中パラコート濃度は、投与後1時間において最高血漿中濃度 (観測値; $43.65 \pm 4.76 \mu\text{g/ml}$) を示し、その後急速に低下し、投与後6時間以降は投与後2-4時間までゆるやかな減少を示した。(図-2)。

また、血漿中パラコート濃度の推移から算出した第1相目の半減期は0.59時間、 $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ は $87.1 \mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ であった。

2) 胎子の血漿中パラコート濃度の推移

胎子の血漿中パラコート濃度は、投与後2時間において最高血漿中濃度 (観測値; $3.49 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$) を示し、その後はゆるやかに減少した(図-2)。

また、血漿中パラコート濃度の推移から算出した半減期は21.5時間、 $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ は $46.9 \mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ であった。

第3節 考察

本章においては、パラコートを妊娠ラットに皮下投与した時、母体および胎子の血漿中パラコート濃度がどのように推移について検討した。

Bus et al. (1975) は、妊娠13、16および21日のラットに $[^{14}\text{C}]$ -パラコートを15 mg/kg の用量で静脈内投与し、その後の胎子中の放射能活性を測定した。その結果から、これらの各日において、パラコートは胎盤を通過し胎子へ移行すると報告している。また、Ingebrigtsen et al. (1984) は、妊娠20日のラットに55 $\mu\text{Ci/kg}$ の用量で $[^{14}\text{C}]$ -パラコートを静脈内投与し、その後経時的に全身オートグラフィーによってその分布を報告している。ここでも投与後24時間においても胎盤および胎子に放射能活性が認められ、胎子への移行が示されている。本章で得られた結果からも、皮下投与によってパラコートを母体に投与した場合、パラコートは母体に吸収された後、胎盤を通過し胎子へと移行することが、確認された。

母体と胎子の血漿中パラコート濃度の推移を比較すると、最高血漿中濃度では、母体の $43.65 \pm 4.76 \mu\text{g/ml}$ に対して、胎子では $3.49 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ と低かった。また、母体においては投与後1時間に最高血漿中濃度に到達し、その後投与後6時間まで急激にその濃度を減少させ (β 相)、投与後6時間から投与後24時間では徐々にその濃度を減少 (γ 相) させ2相性の減少を示した。これに対し、胎子では投与後2時間で最高血漿中濃度に到達した後、投与後24時間まで母体と比べて緩やかな1相性の濃度の減少がみられた。また、投与後6時間以降では、胎子は母体と比べて高い血漿中濃度を示していた。これらのことは、母体においては、パラコートは単回皮下投与後速やかに吸収され、急速に排泄されていくのに対して、胎子では分布がやや遅れるものの、排泄は非常にゆっくりで時間がかかることを示している。

血漿中濃度の推移から算出された半減期においても、母体の0.59時間である

のに対し、胎子では21.5 時間であり、約36倍の差がみられ、その排泄の遅延が伺われる。さらに、AUC_{0-24h} の値においても、母体では 87.1 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ に対し、胎子は 46.9 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ である。このように動態学的パラメーターからも胎子では最高血漿中濃度は低いものの、排泄が遅いため長時間分布がみられることが示された。

第4節 小括

妊娠21日の午後1時を剖検時間とし、剖検1、2、3、6および24時間前に妊娠ラットにパラコートを 25 mg/kg の用量で単回皮下投与した。剖検時、母体および胎子の血液を採取し、血漿を得た。得られた血漿中のパラコート濃度を HPLCにて測定した。

母体の血漿中パラコート濃度は、投与後1時間において最高血漿中濃度（観測値； 43.65 \pm 4.76 $\mu\text{g/ml}$ ）を示し、その後急速に低下し、投与後6時間以降は投与後24時間までゆるやかな減少を示した。一方、胎子においては、最高血漿中濃度（観測値； 3.49 \pm 0.36 $\mu\text{g/ml}$ ）は投与後2時間に観察され、その後はゆるやかに減少した。また、これらの血漿中パラコート濃度の推移から算出された母体および胎子における半減期はそれぞれ0.59時間、21.5 時間で、またAUC_{0-24h} は、 87.1 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ 、 46.9 $\mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ であった。

本章で実施した実験から、パラコートはラットにおいて胎盤を通過し胎子へ移行すること、また、母体の血漿中濃度と比較すると胎子では非常に低い血漿中濃度を示すものの、その排泄は遅く長時間にわたって分布することが確認された。

第 2 章

パラコートの動脈管に対する影響 —収縮作用における用量依存性の検討および 収縮した動脈管の形態学的観察—

第1章において論じたように、パラコートは母体に単回皮下投与されると胎子に移行し、その血漿中濃度は投与後2時間に最高血漿中濃度を示し、投与後24時間においてもその存在が確認され、長時間におよぶ分布がみられている。そこで本章では、パラコートの胎子動脈管に対する影響を検討する目的で、パラコートを母体に数段階の用量で投与し、その後経時的に胎子の動脈管の変化を観察した。

第1節 材料と方法

1) 被験物質

使用したパラコートは第1章に記したものと同一である。

2) 使用動物および飼育条件

使用動物および飼育条件は第1章に記したものと同一である。

3) 実験方法

妊娠21日の午後1時を剖検時間と定め、剖検1、3、6および24時間前にパラコート[®]を2、7および25 mg/kgの用量で母体に皮下投与した。

剖検の際、胎子は帝王切開によって取り出し、無呼吸の下に冷却器（クールパイプ200D、タイテック（株））によって、-45~-50℃に調節されたアセトン中にて凍結した。凍結した胎子は観察まで-20℃にて保存した。

4) 動脈管の観察方法

動脈管の観察方法は、Arishimaら（1991）の急速全身凍結法によった。方法は以下のとおりである。

観察の際には、頭部および胸骨剣状軟骨部より後方の部分を割断して除去し、残りの胸部を電子冷却式マイクローム（MC-802A、小松エレクトロニクス（株））の凍結台上に背面を上にして乗せ、動脈管が垂直になるように、頭方をやや高く、胴体の下に水滴を入れて調節固定した（図-3、4）。

切り出し方は以下のとおりである。

胎子の背面を水平にわずかに切り削ぐと胸椎が白く見え（図-5、6）、左右に肋骨があり、さらに切り進めていくと、中央に胸大動脈が見えてくる（図-7）。さらに切り進めていくと、中央に食道が現れ、食道を削っていくと大動脈と肺動脈の分岐部が認められ、ついには動脈管と大動脈に分離する。動脈管が大動脈から完全に分離したところで削るのをやめ、そこで動脈管の内径を実体顕微鏡の接眼レンズに挿入したマイクロメーターで、動脈管の内径を計測した（図-8）。

5) 形態学的観察方法

対照群およびパラコート投与後3時間の母体から、帝王切開によって胎子を取り出し、胎子の胸腔を開け、動脈管を肺動脈および大動脈とともに摘出し、

ブアン液に固定後、パラフィン包埋し、5 μ m の連続切片を作成した。染色は、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

6) 統計学的処理方法

急速全身凍結法によって得られた胎子動脈管の内径のデータは、各群ごとに平均値を算出し、一元配置分散分析を行い、群間に差の見られたものについては、さらにTukeyの多重比較検定によって各群間の差の検定を行った。

第2節 実験結果

1) 収縮作用の用量依存性の検討

2 mg/kg 投与群では、観察したすべての時間において有意な変化はみられなかった (図-9)。

7 mg/kg 投与群では、パラコート投与後3時間において対照群と比べて有意な動脈管の収縮がみられたが、投与後1、6および24時間においては有意な変化は認められなかった (図-10)。

25 mg/kg 投与群では、パラコート投与後3および6時間において、対照群と比べて有意な動脈管の収縮がみられたが、投与後1および24時間においては、有意な変化は認められなかった。また、パラコート投与後3時間と投与後6時間を比較してみると、投与後3時間の方がより強い収縮がみられた (図-11、12、13)。

さらに、パラコート投与後3時間の動脈管の収縮を7 mg/kg 投与群と25 mg/kg 投与群で比較してみると、25 mg/kg 投与群の方がより強い収縮がみられた。

2) 収縮した動脈管の形態学的観察

対照群の動脈管は、内膜、中膜、外膜から構成されており、中膜には扁平な平滑筋細胞がみられた(図-14)。パラコート25 mg/kg 投与後3時間の胎子動脈管は、内皮細胞が血管腔に突出しており、また中膜を構成する平滑筋の配列の乱れがみられた(図-15)。

第3節 考察

本章では、妊娠末期のラットにパラコートを単回皮下投与した後、その胎子の動脈管の変化について検討した。

パラコート2 mg/kg 投与群では、観察した全ての時間で胎子動脈管に変化は認められなかったが、7 mg/kg 投与群では投与後3時間に、25 mg/kg 投与群では投与後3および投与後6時間に、対照群と比べて有意な動脈管の収縮が観察された。また、これらの変化を7 mg/kg 投与群と25 mg/kg 投与群で比較してみると、投与後3時間でみられた収縮の程度は25 mg/kg 投与群の方が著しく、さらに25 mg/kg 投与群では、7 mg/kg 投与群では変化の認められなかった投与後6時間においても、有意な収縮が認められていることから、用量依存的な変化と考えられた。

一方、7 mg/kg 投与群では、投与後3時間で動脈管の収縮が認められているのに対し、投与後6および投与後24時間では収縮が認められていない。同様に、25 mg/kg 投与群においても、投与後3時間で最も強い動脈管の収縮が観察された後、投与後6時間では、収縮はしているものの投与後3時間と比べると動脈管の内径は増加しており、投与後24時間では有意な差は認められていない。このことは、母体パラコート投与によって引き起こされる胎子動脈管の収縮は、

投与後3時間でその作用が最も強く現れ、その後再び拡張に向かうという可逆性の変化であることを示している。このように、動脈管は一旦収縮しても、再び拡張するという事は、インドメタシン (Arishima et al., 1991)、甲状腺ホルモン (Takizawa et al., 1993) やアルコール (Arishima et al., 1993) でも報告がなされている。

形態学な観察においては、最も強く収縮のみられる 25 mg/kg 投与群の投与後3時間にのみ実施したが、対照群と比較して内皮細胞の血管腔への突出および中膜を構成する平滑筋細胞の配列の乱れが観察された。これらの変化は、生後の動脈管が収縮する過程にみられる変化と同様であり (Jones et al., 1969)、中膜の平滑筋の収縮によって動脈管自体は収縮して、その内径を減少させる。その結果、動脈管内腔の表面積が減少したことにより、内皮細胞が管腔内へと突出したものであろう。

以上のように、本章で実施した実験成績より、妊娠末期のラットにパラコートを投与すると、その胎子動脈管に用量依存的な収縮が引き起こされること、および、パラコートによる動脈管のこの収縮は一旦収縮した後、再び拡張するという可逆性の変化であることが明らかとなった。

第4節 小括

妊娠21日の午後1時を剖検時間と定め、その1、3、6および24時間前に妊娠ラットにパラコートを2、7および25 mg/kgの用量で皮下投与した。剖検時、胎子は無呼吸のもとに、冷却器によって-45~-50℃に冷却したアセトン中で凍結した。得られた胎子は全身凍結法にて動脈管の内径を測定した。2 mg/kg 投与群では有意な変化はみられなかったが、7 mg/kg 投与群では投与後3時間に動脈管の有意な収縮がみられた。25 mg/kg 投与群では投与後3および投与後6

時間に有意な収縮がみられた。収縮した動脈管を、光学顕微鏡で形態学的に観察したところ、内皮細胞が血管腔に突出しており、また中膜を構成する平滑筋の配列の乱れが観察された。

これらの結果から、パラコートは妊娠末期のラット胎子の動脈管に対して収縮作用を持つこと、また、この収縮作用は用量依存的な変化であることが示された。

第 3 章

パラコートの動脈管収縮作用の臨界期の検討

前章において、パラコートが胎齢21日のラット胎子動脈管に対して収縮作用を及ぼし、その影響は用量依存的な変化であることを述べた。そこで、本章においては、このパラコートによる動脈管収縮作用が胎生期のいつの時期から、感受性を示すのかを検索することを目的とした。本研究では、このような胎生期における影響の起こり始める時期を、臨界期（Critical period）として取り扱う。

第1節 材料と方法

1) 被験物質

使用したパラコートは第1章に記したものと同一である。

2) 使用動物および飼育条件

使用動物および飼育条件は第1章に記してあるものと同じである。

3) 実験方法

妊娠19日の午前10時および午後1時、妊娠20日の午前10時および妊娠21日の午前10時にパラコートを25 mg/kgの用量で皮下投与した。剖検は、パラコート投与後3時間にそれぞれ行った（妊娠19日の午後1時および午後4時、妊娠20

日の午後1時、妊娠21日の午後1時)。

剖検の際、胎子は帝王切開によって取り出し、無呼吸の下に冷却器によって-45~-50℃に調節されたアセトン中にて凍結した。凍結胎子は観察まで-20℃にて保存した。

4) 動脈管の観察方法

第2章で述べた急速全身凍結法を用いて動脈管の観察を行った。

5) 統計学的処理方法

急速全身凍結法によって得られた胎子動脈管の内径のデータは、各群ごとに平均値を算出し、Student's t-testによって各群間の差の検定を行った。

第2節 実験結果

対照群の胎子動脈管は、日齢をおうごとに徐々にその内径を増していた。

妊娠19日の午前10時にパラコートを投与し午後1時に剖検した群では、対照群とパラコート投与群で有意な変化はみられなかった。妊娠19日の午後1時に投与し午後4時に剖検した群では、対照群と比べて有意な動脈管の収縮が認められた。同様に、妊娠20日の午後1時および妊娠21日の午後1時に剖検したパラコート投与群においては、対照群と比べて有意な動脈管の収縮がみられた(図-16)。

第3節 考察

本章では、パラコートによる動脈管収縮作用が胎生期のいつから始まるか、すなわち、臨界期（Critical period）について、検討を行った。

妊娠19日の午後1時に剖検した群では、対照群とパラコート投与群で有意な変化はみられなかった。妊娠19日の午後4時、妊娠20日の午後1時および妊娠21日の午後1時に剖検したパラコート投与群においては、対照群と比べて有意な動脈管の収縮がみられた。これらの結果は、パラコートのラット胎子動脈管収縮の臨界期が、胎齢19日1/2（午後1時）と胎齢19日2/3（午後4時）の間にあることを示すものである。

また、各胎齢における動脈管の収縮率をみると、胎齢21日1/2では対照の約66%まで収縮しているのに対して、胎齢20日1/2および胎齢19日2/3では、それぞれ、約85%、87%までしか収縮していない。従って、妊娠満期（胎齢21日1/2）の動脈管に比べ、妊娠満期以前（胎齢20日1/2、胎齢19日2/3）の動脈管は母体パラコート投与による収縮が軽度であると考えられた。

ラットにおけるインドメタシンの動脈管収縮作用の臨界期を検討したSharpe et al. (1975) の実験では、胎齢17日の胎子動脈管では母体インドメタシン投与によって収縮は引き起こされないが、胎齢19日では収縮するという。また、この時、胎齢21日でみられた動脈管の収縮と比べ、胎齢19日の胎子動脈管の収縮は軽度であったという。また、Arishima et al. (1991) においても、インドメタシンの動脈管収縮作用の臨界期は、ラットにおいて胎齢19日の後半にあるという。本章で得られた結果と考え合わせると、動脈管の化学物質に対する収縮機構が、この時期に発現することが推察された。

第4節 小括

パラコートの動脈管収縮作用が胎生期のいつの時期に感受性を示すのかを明らかにするために、妊娠19、20および21日のラットにパラコートを25 mg/kgの用量で皮下投与し、投与後3時間の胎子動脈管の内径の変化を急速全身凍結法にて計測した。

その結果、胎齢19日の午後4時、胎齢20および21日の胎子では、動脈管の収縮がみられたが、胎齢19日の午後1時の胎子においては、動脈管の収縮は観察されなかった。

本章で得られた実験成績より、胎子動脈管のパラコートに対する感受性の臨界期は、胎齢19日の後半にあることが示唆された。

第 4 章

母体パラコート投与後における胎児PGE₂直接投与 による動脈管の変化

緒言でも述べたように、胎生期の動脈管はPGE₂によってその拡張が維持されている (Clyman et al., 1978, Coceani and Olley, 1973)。また、インドメタシンなどの抗炎症剤は、プロスタグランジン合成酵素であるシクロオキシゲナーゼを阻害することによって、動脈管に対して収縮作用を及ぼすとされており (Hong and Levine, 1976, Kantrowitz et al., 1975)、インドメタシンによって収縮した動脈管は外来的にPGE₂を投与することによって再び拡張するという (Arishima et al., 1991)。そこで本章では、パラコートによって引き起こされた動脈管の収縮に対して、外来的にPGE₂を補った時の動脈管の変化について検索した。

第1節 材料と方法

1) 被験物質

使用したパラコートは第1章に記したのと同じである。PGE₂はシグマ社より購入したものをを用いた。

2) 使用動物および飼育条件

使用動物および飼育条件は第1章に記してあるものと同じである。

3) 実験方法

妊娠21日の午後1時を剖検時間と定め、剖検の3時間前にパラコートを25 mg/kgの用量で母体に皮下投与し、その2時間後に母体をエーテル麻酔下で開腹し、子宮壁を通して胎子にPGE₂ 4 μgを直接皮下投与した。対照胎子は、パラコートを投与した母体の無処置 (PGE₂ を投与しない) 胎子および妊娠21日の無処置母体から得られた胎子とした。

4) 動脈管の観察方法

第2章で述べた急速全身凍結法を用いて動脈管の観察を行った。

5) 統計学的処理方法

急速全身凍結法によって得られた胎子動脈管の内径のデータは、各群ごとに平均値を算出し、一元配置分散分析を行い、群間に差の見られたものについては、さらにTukeyの多重比較検定によって各群間の差の検定を行った。

第2節 実験結果

パラコートを投与した母体の無処置胎子は、無処置母体から得られた胎子と比べて、有意な動脈管の収縮がみられた。しかしながら、パラコート投与後2時間にPGE₂を胎子に投与した群では、無処置母体から得られた胎子と比較して、その動脈管に有意な変化はみられなかった (図-17)。

第3節 考察

本章では、パラコートによって収縮した動脈管が、外来的に投与されたプロスタグランジンE₂にどのように反応するかどうかを、検討した。

その結果、パラコート投与の母体から得られたプロスタグランジンE₂を投与していない胎子では、動脈管の有意な収縮がみられたが、同腹のプロスタグランジンE₂を直接投与した胎子では、動脈管の内径は有意な変化がみられなかった。従って、この外来的にプロスタグランジンE₂を投与した胎子においては、プロスタグランジンE₂の投与によって、動脈管の収縮が抑制されたか、あるいは、パラコートによって一旦収縮した動脈管が、プロスタグランジンE₂によって、再び対照と同程度まで拡張したと考えられた。

これまでも、述べたようにプロスタグランジンE₂は胎生期において、最も強力な動脈管拡張物質であり、化学物質による動脈管収縮作用の抑制、あるいは、一旦収縮した動脈管に対しても強い拡張作用を示すことが伺われる。

一方で、パラコートは生体に投与された時、ラットではプロスタグランジンE₂濃度を増加 (Giri et al., 1980)、また、イヌでは減少させるとの報告

(Chandler and Giri, 1981) がある。しかしながら、ラットでの報告は、Sprague-Dawley系、雄 (体重450~550 g) を用いて 45 mg/kg という大量腹腔内投与しているのに対し、本研究では対象が妊娠母体および胎子であり、また投与量および投与経路も異なる (25 mg/kg、皮下投与) ことから、これらのデータを外挿することは困難である。そこで、次章以降において、パラコートのプロスタグランジンE₂に対する作用について検討することとした。

第4節 小括

パラコートによって一旦収縮した胎子動脈管のプロスタグランジンE₂に対する反応性を検討するために、妊娠21日のラット母体にパラコートを25 mg/kgの用量で皮下投与してから2時間後に、胎子に直接プロスタグランジンE₂を皮下投与し、その1時間後の胎子動脈管の内径を測定した。

パラコートを投与した母体の胎子動脈管は生理的食塩水を投与した母体の無処置胎子と比べて有意に収縮していたが、母体パラコート投与後、プロスタグランジンE₂を投与した胎子動脈管は、対照と同様に拡張していた。

第 5 章

パラコートのプロスタグランジン合成酵素に対する作用の検討

パラコートのプロスタグランジン生合成に及ぼす影響を検索するために、パラコートがプロスタグランジン合成酵素であるプロスタグランジンエンドペルオキシドシンセターゼ（シクロオキシゲナーゼおよびヒドロキシオキシゲナーゼ）阻害作用を有するかどうかを、*in vitro* において検討した。

第 1 節 材料と方法

1) 被験物質

使用したパラコートは第 1 章に記したのと同じである。

2) 実験方法

パラコートのプロスタグランジンエンドペルオキシドシンセターゼ（シクロオキシゲナーゼ、ヒドロキシオキシゲナーゼ）に対する影響の検索方法は、以下の通りである。

ヒツジ精囊ミクロソームアセトン粉末 0.5 mg（乾燥重量）、 $1\ \mu\text{M}$ のウシ血液ヘモグロビン、 $50\ \mu\text{M}$ の $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ アラキドン酸 (2×10^5 cpm)、 1mM のパラコートを含む全容 0.1 ml の反応溶液を、 24°C で 1 分間インキュベートした。これに、0.3 ml のエチルエーテル/メタノール/1 M クエン酸 (30 : 4 : 1、あらかじめ氷浴中で冷却) を混和して反応を停止した後、0.5 g の無水硫酸ナトリウムを混和

した。上層の有機溶媒層の50 μ lを Slicagel F254 glass plate (Art.11798、Merck)に帯状にのせ、標品としてプロスタグランジンB₁を同時にスポットした後、エチルエーテル/石油エーテル/酢酸 (85 : 15 : 0.1) の展開溶媒を用いて15 cm 展開した (約40分)。その後、紫外線ランプを用いてPGB₁の展開位置をマークした後、X線フィルムに密着固定して48時間オートラジオグラフィーを行い、放射性生成物の展開位置を確認した。アラキドン酸、プロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の展開部分をかきとり、液体シンチレーションスペクトロメーター (LSC-3500、アロカ (株)) を用いてそれぞれの放射能を測定し生成量を算出した。また、同様の実験を0.01 μ M~1mMのインドメタシンを用いて行い、その結果を比較検討した。

第2節 実験結果

インドメタシン 0.01 μ M 存在下では、プロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量は、対照とほぼ同等であったが、0.1 μ M 以上の存在下では、濃度依存的なプロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量の減少がみられ、1 mM 存在下では、そのその生成はほぼ完全に阻害されていた (図-18)。

一方、パラコート1 mM 存在下においては、プロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量は、なんら影響を受けず、対照とほぼ同等の生成量であった (図-19)。

第3節 考察

プロスタグランジンエンドペルオキシドはアラキドン酸カスケードにおける重要な代謝物であり、プロスタグランジンG₂とプロスタグランジンH₂がある。それぞれプロスタノ骨格の15位に15(S)-OOH、5(S)-OH基を有し、9、11位にエンドペルオキシド結合をもっている。プロスタグランジンエンドペルオキシドの生合成は、前駆体の不飽和脂肪酸（主としてアラキドン酸）からシクロオキシゲナーゼによってプロスタグランジンG₂へ、ついでこのプロスタグランジンG₂がヒドロペルオキシターゼによってプロスタグランジンH₂へと合成されていく。このように、プロスタグランジンエンドペルオキシドシンセターゼ（シクロオキシゲナーゼとヒドロペルオキシターゼ）は、すべてのプロスタグランジン合成に不可欠な酵素であり、本研究において対象となる酵素であるプロスタグランジンE₂も、プロスタグランジンH₂より、プロスタグランジンエンドペルオキシド-プロスタグランジンE₂-イソメラーゼによって合成されるものである。

緒言にも述べたように、胎生期における動脈管の拡張維持は主としてプロスタグランジンE₂の作用によると考えられている（Clyman et al., 1978; Cocceani and Olly, 1973; Momma et al., 1980）。また、インドメタシンなどの抗炎症薬は、前述のプロスタグランジンエンドペルオキシドシンセターゼのひとつであるシクロオキシゲナーゼを阻害することによって、プロスタグランジンE₂の合成を阻害し、動脈管に収縮を引き起こすと報告されている（Hong and Levine, 1976; Kantrowitz et al., 1975）。Momma and Takeuchi(1983)、Momma et al. (1984)による各種抗炎症薬の動脈管収縮作用の強さを検討した報告においても、シクロオキシゲナーゼ阻害作用の強い酸性抗炎症薬では動脈管の強い収縮作用が認められている。本章では、抗炎症薬のプロスタグランジン生合成に対する影響を検討する場合に一般的に行われている、アラキドン酸を基質としてプロスタグランジンエンドペルオキシドシンセラーゼを多く含有するヒツジ精囊腺マイクロソー

ムを反応させる *in vitro* の実験系で、パラコートのこれらの酵素に対する影響を検討した。陽性対照として用いたインドメタシンにおいては、 $0.01 \mu\text{M}$ の濃度での存在下では、プロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量は、対照とほぼ同等であったが、 $0.1 \mu\text{M}$ 以上の濃度での存在下では、濃度依存的にプロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量の減少がみられ、 1mM 存在下では、その生成はほぼ完全に阻害されていた。プロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の両方の生成が抑制されていることから、インドメタシンはプロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼのうちシクロオキシゲナーゼを強力に阻害することが、本章で実施した実験の成績からも確認された。一方、パラコートにおいては 1mM という高濃度存在下においても、プロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量は、なんら影響を受けず、対照とほぼ同等の生成量であった。この結果は、パラコートには*in vitro* においては、プロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ（シクロオキシゲナーゼおよびヒドロキシオキシゲナーゼ）阻害活性はないものを示すものと考えられた。

第4節 小括

プロスタグランジン合成酵素であるプロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ（シクロオキシゲナーゼおよびヒドロキシオキシゲナーゼ）に対するパラコートの*in vitro* での影響を検討した。

アラキドン酸を基質として、パラコート存在下でプロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼを含有するヒツジ精囊ミクロソームを作用させ、プロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量を測定した。

その結果、プロスタグランジンG₂およびプロスタグランジンH₂の生成量は

影響を受けなかったことから、*in vitro* においては、パラコートはこれらのプロスタグランジン合成酵素に対して影響を及ぼさないことが示唆された。

第 6 章

パラコートの胎子血漿中プロスタグランジンE₂への影響

第5章において、パラコートはin vitro においてプロスタグランジン合成酵素であるエンドペルオキシドシンターゼを阻害する作用を持たないことを明らかにした。しかしながら、生体においてはプロスタグランジンの合成やその代謝に複雑な因子が関与するため、本章では、実際に妊娠ラットにパラコートを投与し、その胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度を測定した。

第1節 材料と方法

1) 被験物質

使用したパラコートは第1章に記したものと同一である。

2) 使用動物および飼育条件

使用動物および飼育条件は第1章に記したものと同一である。

3) 実験方法

妊娠21日の午後1時を剖検時間と定め、剖検の3時間前にパラコートを25 mg/kgの用量で母体に皮下投与した。剖検の際、胎子は帝王切開によって取り出した。胎子の血液は胎子の腋窩部を切り、流出する血液をキャピラリーチュ

ープによって採取した。採取した胎子の血液はEDTAおよびインドメタシンを加えた後、3,000rpm、15分間の遠心分離にて血漿を分離した。

4) 血漿中プロスタグランジンE₂測定方法

母体および胎子の血漿は、2Nの塩酸に加えpHを3.5に調整した後、C18カートリッジカラム (Sep-Pak C18 Cartridges、Waters) に保持した。蒸留水に塩酸を加えpHを3.5に調整したもので妨害物質を除去した後、メタノールによってプロスタグランジンE₂を溶出させた。これを窒素気流下で濃縮乾固しプロスタグランジンE₂を析出させた。

分離抽出したプロスタグランジンE₂はProstaglandin E₂ [¹²⁵I] RIA Kit (Dupont)を用いてRIA法によって測定した。

5) 統計学的処理方法

得られたデータは、各群ごとに平均値を算出し、Student's t - test によって平均値の差の検定を行った。

第2節 実験結果

対照胎子と母体パラコート投与後3時間の胎子血漿中プロスタグランジンE₂濃度に有意な変化は認められなかった (図-20)。

第3節 考察

本章では、実際に妊娠ラットにパラコートを投与し、その胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度を測定した。その結果、母体にパラコートを投与しても胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度に変化は認められず、パラコートは胎子におけるプロスタグランジンE₂の合成および代謝経路に、なんら影響を与えないことが明らかとなった。

胎子の動脈管の拡張維持は、主としてプロスタグランジンE₂の作用によるものと考えられている。成体においては、プロスタグランジンは局所で生産され、局所で作用、すぐに代謝されると考えられている。しかしながら、胎子動脈管において、プロスタグランジンE₂の合成と代謝認められている (Clyman, 1980; Pace-Asciak and Rsnagaraj, 1977; Pace-Asciak and Rangaraj, 1978) もの、プロスタグランジンE₂の合成は少なく (Clyman et al., 1980)、また、成体と比べて肺でのプロスタグランジンの代謝能が低いために血漿中プロスタグランジン濃度は高く保たれている (Clyman et al., 1980; Clyman et al., 1981; Challis et al., 1976)。そのために、主として胎盤などで生産されたプロスタグランジンが胎子血漿中に存在し、これが拡張維持に働き、動脈管の拡張維持と胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度はよく相関しているという (Coceani et al., 1986)。しかしながら、本研究で得られた結果は、パラコートによって胎子血漿中プロスタグランジンE₂濃度は変化していないにも関わらず、胎子動脈管の収縮がみられている。このことは、胎子の動脈管拡張維持に他の大きな因子が関与していることを示唆するものと考えられる。

エンドセリンはブタの血管内皮細胞培養液上清から抽出された、アミノ酸21個からなる血管収縮性ペプチドである (Ynanagisawa et al., 1988)。エンドセリンは血管平滑筋に作用してこれを収縮させるだけでなく、血管内皮細胞にも作用して内皮由来弛緩物質 (一酸化窒素) を放出し血管を弛緩させるという

(De Nucci et al., 1988)。近年、このエンドセリンや内皮由来性弛緩物質についても動脈管に対する影響が検討され始めている。Cocconi et al. (1994)の実験によると、これら2つの因子は補助的には作用しているものの、あまり積極的な作用はないという。しかしながら、本研究では、プロスタグランジンE₂以外の動脈管調節物質の存在を示しており、パラコートの毒性機序にラジカル反応が大きく関与していることを考えると、これらの因子の動脈管に対する影響を再検討する必要があるだろう。

以上のように、本章ではパラコートが胎子血漿中プロスタグランジンE₂濃度に影響を及ぼさないことを明らかにし、前章までに示したパラコートの動脈管収縮作用が、これまで動脈管収縮作用を持つ化学物質として示されてきたプロスタグランジンE₂を介したものではないことを立証した。

第4節 小括

パラコートに *in vivo* におけるプロスタグランジンE₂に対する作用を検討するために、妊娠21日のラットにパラコートを25 mg/kgの用量で皮下投与し、その3時間後の胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度をRIA法にて測定した。

その結果、胎子の血漿中プロスタグランジンE₂濃度は対照との間に有意な変化は認められず、パラコートは *in vivo* においてもプロスタグランジンE₂に対して影響を及ぼさないことが示唆された。

総 括

本研究に用いたパラコート（1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylum）は有効性の高い除草剤として今日なお、世界中で使用されている。パラコート毒性の標的器官は肺であり、出血や水腫といった急性期の変化を特徴とする。また、ヒトではこの初期の変化の後に致死的な経過をとる肺線維症が誘発されることが知られている。

一方、胎子に対するパラコート毒性は、成体に対する毒性に比べ比較的低いと考えられている。胎子は栄養分や酸素を母体から胎盤をとおして吸収しており、また、羊水中で生活しているため肺は機能していない。そのため、末梢から心臓へ送られた血液は肺を経由せず、成体で見られる循環とは異なる独自の循環系を持っている。胎子循環の特徴のひとつとして動脈管の存在がある。動脈管は肺動脈を直接大動脈へと結ぶ太いバイパスで、胎子循環系の重要な役割を果たしている。また、動脈管は胎生期においては拡張し肺への血液流入を大部分阻止する役目を果たしており、出生後は呼吸の開始とともに次第に収縮閉鎖し動脈管索として遺存する。

この動脈管は胎子血液PO₂ が低いことと、胎子と胎盤で生合成されるプロスタグランジンE₂（PGE₂）の作用によってその拡張が維持されているが、近年、インドメタシンなどの抗炎症薬がPGE₂の合成を阻害することによって、動脈管に対して収縮作用を持つとの報告がなされた。胎生期における動脈管の収縮は胎子肺高血圧症を引き起こしその影響は出生後も残ることから、動脈管に対するインドメタシンと同様の作用を持つ種々の化学物質の検索が注目されるようになった。

これまでパラコートの胎子動脈管への影響を調べた報告はない。そこで、本研究はパラコート（PQ）の胎子に対する毒性、とくに動脈管に対する作用およ

びその機序についてラットを用いて究明した。

第1章では、妊娠ラットおよび胎子でのPQの動態を調べるために、妊娠21日の母親ラットにPQ 25 mg/kg を皮下投与し、その後の母体および胎子の血漿中PQ濃度を測定した。その結果、母体の血漿中PQ濃度は、投与後1時間において最高血漿中濃度を示し、その後急速に低下し、投与後6時間以降は投与後24時間までゆるやかな減少を示した。一方、胎子においては、最高血漿中濃度は投与後2時間に観察され、その後はゆるやかに減少した。母体と胎子の血漿中PQ濃度の推移を比較すると、最高血漿中濃度では、母体の $43.65 \pm 4.76 \mu\text{g/ml}$ に対し胎子では $3.35 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ と低く、また、投与後24時間では母体 ($0.83 \pm 0.32 \mu\text{g/ml}$) と比べて胎子 ($1.51 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$) の血漿中PQ濃度がより高かった。このように、PQは容易に胎盤を通過し胎子へ移行すること、また、母体と比べ胎子では血漿中濃度は低いものの、その排泄は非常に遅く、血漿中濃度が長時間維持されることを明らかにした。

第2章では、PQが胎子動脈管に対し収縮作用を有するかどうかを調べるために、妊娠21日の午後1時を剖検時間と定め、剖検の1、3、6および24時間前に母親ラットにPQ 2、7および25 mg/kg を皮下投与し、胎子動脈管の内径の変化を急速全身凍結法にて計測した。その結果、PQ 2 mg/kg 投与群では対照群に比べ有意な差はみられなかったが、PQ 7 mg/kg 投与群では投与後3時間に動脈管の有意な収縮がみられた。PQ 25 mg/kg 投与群では投与後3時間および投与後6時間に有意な収縮がみられた。これらの結果から、PQは妊娠末期のラット胎子の動脈管に対して強い収縮作用を持つこと、また、この収縮作用は用量依存的な変化であることを立証した。

第3章では、PQの動脈管収縮作用が胎生期のいつの時期に感受性を示すのかを明らかにするために、妊娠19、20および21日の母親ラットにPQ 25 mg/kg を皮下投与し、その3時間後の胎子動脈管の内径の変化を急速全身凍結法にて計測した。その結果、胎齢19日2/3、20日および21日の胎子動脈管

では収縮がみられたが、胎齢19日1/2の胎子動脈管においては観察されなかった。したがって、胎子動脈管のPQに対する感受性の臨界期は、胎齢19日1/2と19日2/3の間にあることを究明した。

第4章では、PQによって一旦収縮した動脈管のPGE₂に対する反応性を検討するために、妊娠21日のラット母体にPQ 25 mg/kgを用量で皮下投与してから2時間後、胎子に直接PGE₂を皮下注射し、その1時間後の胎子動脈管の内径を測定した。その結果、PQを投与した母体の胎子の動脈管は対照群と比べて有意に収縮していたが、母体PQ投与後、PGE₂を投与した胎子動脈管は対照群と同様に拡張していた。

第5章では、プロスタグランジン合成酵素であるプロスタグランジンエンペルオキシドシンセターゼ（シクロオキシゲナーゼおよびヒドロキシオキシゲナーゼ）に対するPQの*in vitro*における影響を検討した。すなわち、アラキドン酸を基質として、PQ存在下でプロスタグランジンエンペルオキシドシンセターゼを含有するヒツジ精囊ミクロソームを作用させて、PGG₂およびPGH₂の生成量を測定した。その結果、PGG₂およびPGH₂の生成量はPQ存在下においても影響を受けなかったことから、PQはプロスタグランジン合成酵素に対して影響を与えない (*in vitro*) ことを明らかにした。

第6章では、*in vivo*におけるPQのPGE₂に対する作用を検討するため、妊娠21日の母親ラットにPQ 25 mg/kgを皮下投与し、その3時間後の母体および胎子の血漿中PGE₂濃度をRIA法を用いて測定した。その結果、母体および胎子の血漿中PGE₂濃度は対照群との間で有意な差は認められず、PQは *in vivo*においてもPGE₂に対して影響を及ぼさないことを立証した。

以上、本研究では

- 1) PQはラット母体に皮下投与した時、胎子に移行すること。
- 2) PQを妊娠末期のラット母体に投与すると、その子の動脈管に用量依存的

な収縮を引き起こすこと、また、この動脈管の収縮は可逆的な変化であること。

- 3) PQのラット動脈管収縮作用の臨界期は、ラットにおいて胎齢19日1/2から胎齢19日2/3の間にあること。
- 4) PQは *in vitro* において、プロスタグランジン合成酵素（プロスタグランジンエンペルオキシドシンセターゼ；シクロオキシゲナーゼおよびヒドロキシオキシゲナーゼ）に対して影響を及ぼさないこと。
- 5) PQはラット母体に投与しても、その子の血漿中PGE2濃度には影響を及ぼさないこと。

を証明した。

結 論

1. 妊娠ラットおよび胎児におけるパラコートのトキシコキネティクス
2. パラコートの胎児動脈管に及ぼす影響
3. 胎児動脈管のパラコートに対する感受性の臨界期
4. パラコート動脈管収縮作用の機序

以上のように、筆者は、パラコートが胎児動脈管に対して収縮作用のあることを明らかにし、さらに、このパラコートの動脈管収縮作用の機序はPGE₂を介したのではないことを立証した。

謝 辞

本研究は麻布大学獣医学部薬理学講座赤堀文昭教授のご指導と御鞭撻ならびに御校閲の賜物であり、ここに深く謝意を表わします。

また、本研究の遂行ならびに論文の作成にあたり、絶えざる御指導を賜りました病理学第一講座野村靖夫教授ならびに実験動物学講座二宮博義教授に深謝いたします。

さらに、論文のとりまとめに関して、解剖学第二講座有島和義教授ならびに動物試験・毒性学研究室政岡俊夫教授に対して、厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行にあたって、多大の御協力と御支援をいただいた麻布大学獣医学部薬理学講座白井明志助教授および教室員の諸氏に謝意を表します。

引用文献

1. Ahmed, A. A., Soliman, M. M., Khalifa, B. A. A., El Sadek, S. E., Nounou, A. H. : Embryocidal and teratogenic effects of paraquat on chick embryos and white rats. *Arch. Exper. Vet. Med.*, 42: 848-853, 1988.
2. 荒井達夫、名取博 : パラコート肺. *内科* 47, 243-249, 1981.
3. Arishima, K., Takizawa, T., Yamamoto, M., Ueda, Y., Kusanagi, M., Eguchi, Y., : Onset of the constrictive effect of indomethacin on the ductus arteriosus in fetal rats. *Acta Anat.*, 142: 231-235, 1991.
4. Arishima K., Yamamoto, M., Takizawa, T., Sohmiya, H., Eguchi, Y., Shiota, K. : Effect of acute maternal alcohol consumption on the fetal ductus arteriosus in the rat. *Biol. Neonate*, 63: 40-43, 1993.
5. Arishima, K., Takizawa, T., Oda, T., Yamamoto, M., Togashi, H., Somiya, H., Eguchi, Y. : Propranolol inhibits the spontaneous closure of the ductus arteriosus in newborn rats. *J. Vet. Med. Sci.*, 57: 443-444, 1996.
6. Butler, C. I. I., Kleinerman, J. : Paraquat in rabbit. *Brit. J. Industr. Med.*, 28: 67-71, 1971.
7. Bus, J. S., Aust, S. D., Gibson, J. E. : Lipid peroxidation: A possible mechanism for paraquat toxicity. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 11: 31-38, 1975.
8. Bus, J. S., Preache, M. M., Cagen, S.Z., Posner, H. S., Eliason, B. C., Sharp, C. W., Gibson, J. E. : Fetal toxicity and distribution of paraquat and diquat in mice and rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 33: 450-460, 1975.
9. Bus, J. S., Cagen, S. Z., Olgaard, M., Gibson, J. E. : A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 35: 501-513, 1976.

10. Clyman, R. I., Munuary, C., Roman, C., Rudolph, A. M. : PGE₂ is a more potent vasodilator of the lamb ductus arteriosus than is either PGI₂ or 6 keto PGF₁. *Prostaglandins*, 16 : 259-264, 1978.
11. Clyman, R. I. : Ontogeny of the ductus arteriosus response to prostaglandins and inhibitors of their synthesis. *Semin. Perinatol.*, 4: 115-124, 1980.
12. Clyman, R. I., Mauray, F., Demers, L. M. :Dose oxygen regulate prostaglandin induced relaxation in the lamb ductus arteriosus? *Prostaglandins*, 19: 489-498, 1980.
13. Clyman, R. I., Maurau, F., Roman, C. : Circulating prostaglandin E₂ concentrations and patent ductus arteriosus in fetal and neonatal lambs. *J. Pediatr.*, 97: 455-461, 1980.
14. Clyman R. I., Mauray, F., Heyman M. A. : Effect of gestational age on pulmonary metabolism of prostaglandin E₁ and E₂. *Prostaglandins*, 21: 505-513, 1981.
15. Challis, J. R. G., Dilley, S. R., Robinson, C. : Prostaglandins in the circulation of the fetal lamb. *Prostaglandins*, 11: 1041-1052, 1976.
16. Chandler, D. B., Giri, S. N. : Effects of acute paraquat toxicity on circulating levels of arachidonic acid, PGF₂ α and PGE₂ in the beagle. *Prostagl. Med.*, 7: 571-579, 1981.
17. Coceani, F., Olley, P. M. : The response of ductus arteriosus to prostaglandins. *Canad. J. Physiol, Pharmacol.*, 51: 220-225, 1973.
18. Coceani, F., Huhtanen, D., Hamilton, N. C., Bishai, I., Olley, P. M. : Involvement of intramural prostaglandin E₂ in prenatal patency of the lamb ductus arteriosus. *Can. J. Physiol. Pharamacol.*, 64: 737-747, 1986.

19. Coceani, F., Kelsey, L., Seidlitz, E., Occurrence of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide in the lamb ductus arteriosus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 72: 82-88, 1994.
20. Dawes, G. S., Mott, J. C., Widdicombe, J. G. : The patency of the ductus arteriosus in newborn lambs and its physiological consequences. *J. Physiol.*, 128: 361-383, 1955.
21. De Nucci, G., Ythomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T. D., Vane, J. R. : Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 9797-9800, 1988.
22. Giri, S. N., Hollinger, M. A., Schiedt, M. J. : The effects of ozone and paraquat on PGF₂ α and PGE₂ levels in plasma and combined pleural effusion and lung lavage of rats. *Environ. Res.*, 21: 467-476, 1980.
23. Haley, T. J. : Review of the toxicology of paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium chloride). *Clin. Toxicol.*, 14: 1-46, 1979.
24. Hirai, K., Witschi, H., Cote, M. G.: Mitochondrial injury of pulmonary alveolar epithelial cells in acute paraquat intoxication. *Exp. Mol. Pathol.*, 43 : 242-252, 1985.
25. Hong, S-C. L., Lewis, I. Inhibition of arachidonic acid release from cells as the biochemical action of antiinflammatory corticoid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73: 1730-1736, 1976.
26. Hörnblad, P. Y., Larsson, K. S. : Studies on closure of the ductus arteriosus. 1. Whole body freezing as improvement of fixation procedure. *Cardiologia*, 51: 231-235, 1976.

27. Ingebrigtsen, K., Nafstad, I., Andersen, R.A. : Disdistribution and transplacental transfer of paraquat in rats and guinea-pigs. *Gen. Pharmacol.*, 3: 201-204, 1984.
28. 井上堯子: わが国における中毒死の現状. *中毒研究* 7 : 341-345, 1994.
29. Jones, B. A., Barrow, M. D., Wheat, M. D. : An ultrastructural evaluation of the closure of the ductus arteriosus in rats. *Surgery*, 66: 891-898, 1969.
30. Kantrowitz, F., Robinson, D. R., McGuire, M. B. : Corticosteroids inhibit prostaglandins production by rheumatoid synovia. *Nature*, 258: 734-737, 1975.
31. Khera, K. S., Whitta, L. L. : Embryopathic effects of diquat and paraquat in the rat. *Ind. Med. Surg.*, 37: 257-261, 1968.
32. 三砂将裕、千田豊、由宇宏貴、花岡陽一、長谷川治、中島康秀、黒岩昭夫、加治木章、原田進、城戸優光、堀江昭夫: パラコート中毒の1剖検例 -臓器内パラコートイオン濃度分布-. *日胸* XLIII : 298-304, 1984.
33. Misra, H. P., Gorsky, L. D.: Paraquat and NADPH-dependent lipid peroxidation in lung microsomes. *J. Biol. Chem.* 256 : 9994-9998, 1981.
34. Momma, K., Uemura, S., Nishihara, S., Ohta, Y. : Dilation of the ductus arteriosus by prostaglandins and prostaglandin's precursors. *Pediatr. Res.*, 14: 1074-1077, 1980.
35. Momma, K., Takeuchi, H. : Constriction of fetal ductus arteriosus by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Prostaglandins*, 26: 631-644, 1983.
36. Momma, K., Takeuchi, H. : Constriction of fetal ductus arteriosus by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Study of additional 34 drugs. *Prostaglandins*, 27: 527-536, 1984.

37. Murray, R. E., Gibson, J. E.: A comparative study of paraquat intoxication in rats, guinea pigs and monkeys. *Exp. Molecul. Pathol.* 17 : 317-325, 1972.
38. 名取博: パラコート中毒. *救急医学* 3 : 1317-1325, 1979.
39. Onyeama, H. P., Oehme, F. W. : A literature review of paraquat toxicity. *Vet. Hum. Toxicol.* 26 : 494-502, 1984.
40. Pawell, J. G., Cochrane, R. L. : The effect of the administration of fenoprofen or indomethacin to rat dam during late pregnancy, with special reference to the ductus arteriosus of the fetuses and neonate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 25: 783-796, 1978.
41. Pace-Asciak, C. R., Rangaraj, G. : The 6 keto-prostaglandin F α pathway in the lamb ductus arteriosus. *Biochem. Biophys. Acta*, 486: 583-585, 1977.
42. Pace-Asciak, C. R., Rangaraj, G. : Prostaglandin biosynthesis and catabolism in the lamb ductus arteriosus, aorta and pulmonary artery. *Biochem. Biophys. Acta.*, 529: 13-20, 1978.
43. Rudolph, A. M. : Congenital disease of heart. pp. 29-48, 168-184, Year book Medical Publ., Chicago, 1974.
44. Sharpe, G. L., Larsson, K. S. : Studies on closure of ductus arteriosus. X. In vivo effect of prostaglandin. *Prostaglandins*, 9: 703-719, 1975.
45. Smith, P., Heath, D.: Paraquat. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 411-445, 1976.
46. Smith, L. L. : Mechanism of paraquat toxicity in lung and its relevance to treatment. *Hum. Toxicol.* 6 : 31-36, 1987.

47. Takizawa, T., Arishima, K., Yamamoto, M., Shirai, M., Somiya, H., Eguchi, Y. : constrictive effect of thyroxine on the ductus arteriosus in fetal rat. *J. Vet. Med. Sci.*, 55: 379-381, 1993.
48. Takizawa, T., Oda, T., Arishima, K., Yamamoto, M., Masaoka, T., Somiya, H., Akahori, F., Shiota, K. : A calcium channel blocker verapamil inhibits the spontaneous closure of the ductus arteriosus in newborn rats. *J. Toxicol. Sci.*, 19: 171-174, 1994.
49. Takizawa, T., Arishima, K., Yamamoto, M., Somiya, H., Shiota, K. : Transplacentally-administered enalapril inhibits the closure of the ductus arteriosus in the newborn rat. *Cong. Anom.*, 34: 19-23, 1994.
50. 恒成茂行、米満孝聖: パラコート中毒の法医学的問題. *医学のあゆみ* 142 : 146-148, 1987.
51. Vale, J. A., Meredith, T. J., Buckley, B. M.: Paraquat poisoning: clinical features and immediate general management. *Hum. Toxicol.* 6 : 41-47, 1987.
52. Winterbourn, C. C. : Production of hydroxyl radicals from paraquat radicals and H₂O₂. *FEBS Lett.* 128: 339-342, 1981.
53. Yamada, K., Fukushima, T. : Mechanism of cytotoxicity of paraquat. II. Organ specificity of paraquat-stimulated lipid peroxidation in the inner membrane of mitochondria. *Exp. Toxic. Pathol.*, 45 : 375-380, 1993.
54. 山本好男, 瀧野嘉紹 : 逆相高速液体クロマトグラフィーによる血中パラコートの迅速定量法. *中毒研究*, 2: 419-424, 1989.
55. Yamanaka, K., Tanigawa, Y., Nakagawa, T., Uno, T. : A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharm. Dyn.*, 4: 879-885, 1981.

56. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Massaki, T. : A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vasucular endothelial cells. *Nature*, 332: 411-415, 1988.
57. Youngman, R. J., Elstner, E. F.: Oxygen species in paraquat toxicity: The crypto-OH radical. *FEBS Lett.* 129: 265-268, 1981.

Studies on the Effects of Paraquat on Fetal Arterial Duct Constriction in Rats

The fetus does not yet have a fully functioning lung system since it is located within the amniotic fluid and intakes nutrients and oxygen from the mother through the placenta. Thus, the blood flow from the peripherals to the heart does not go through the lung, resulting in a unique circulatory system that differs from that seen in mature rats. One of the characteristics in the fetal circulatory system is the presence of the arterial duct. It is a large bypass which provides a direct connection between the pulmonary artery and aorta, and serves an important role in the fetal circulatory system. Moreover, the arterial duct dilates during the prenatal stage in order to block a large portion of the blood flow to the lung. However, upon birth and initiation of breathing, the arterial duct gradually constricts and finally closes to form arterial ligament.

The fetal blood PO₂ level is low, since the arterial duct can be maintained in a dilated state through the action of Prostaglandin (PGE₂) biosynthesized by the fetus and placenta. However, in recent years, anti-inflammatory agents such as indomethacin have been reported to inhibit the synthesis of PGE₂, resulting in a constrictive action on the arterial duct. Arterial duct constriction in the prenatal stage causes fetal pulmonary hypertension whose effect remains after birth. Hence, the search for chemical substances which possess a similar action on the arterial duct as indomethacin has come to be focused upon.

The paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium) used in this study is an effective herbicide used today throughout the world. The target organ for paraquat toxicity is the lung, characterized by the changes in the acute phase such as hemorrhaging and edemas. Moreover, pulmonary fibrosis has been known to be induced, resulting in death after these changes occurred in the early stages. Conversely, paraquat's toxicity for the fetus is

considered low compared with that in a mature rat. However, its effect on the fetal arterial duct has yet to be reported.

Therefore, the purpose of our study is to clarify the toxicity of paraquat (PQ) on the rat fetus, specifically focusing on its action on the arterial duct and the mechanism involved.

In the first chapter, to investigate the PQ kinetics on pregnant rats and their fetuses, we administered PQ to the mother at 25mg/kg s.c. on day 21 of gestation and measured the serum levels of PQ in the mother and fetus. The results showed that serum PQ concentration in the mother was highest at 1 h after administration, subsequently dropped and then gradually decreasing between the 6 and 24 h after administration. Whereas, the highest PQ concentration in the fetus was observed at the 2 h after administration, slowly decreasing thereafter. Comparing the changes of PQ concentration in the mother and fetus sera showed that the highest level was $43.65 \pm 4.76 \mu\text{g/ml}$ in the mother compared to a much lower level of $3.35 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ in the fetuses. However, the serum PQ level of the fetuses ($1.51 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$) was higher than that of the mother rats ($0.83 \pm 0.32 \mu\text{g/ml}$) at 24 h after administration. This demonstrates that PQ readily passes through the placenta to the fetus. It also revealed that, although the serum concentration of the fetuses was lower than that in the mother rats, the serum PQ concentration was maintained for a long time since the excretion of PQ in the fetuses was quite slow.

In the second chapter, to determine whether PQ displayed a constrictive action on fetal arterial ducts, we administered PQ to the mother rats at the levels of 2, 7, and 25mg/kg s.c. on 1, 3, 6 and 24 h before performing a pathological autopsy at 13:00 on day 21 day of gestation. After administering PQ, the changes in the internal diameter of the fetal arterial duct were measured using rapid total body freezing. The results showed no significant difference between the 2mg/kg group and the control group, however a

significant difference in constriction was observed at 3 h after PQ administration in the 7mg/kg group. Moreover, a significant amount of constriction was observed at the 3 and 6 h in 25mg/kg group. These results demonstrate that PQ has a strong constrictive action on the arterial duct of the fetus in the late stage of gestation. It was also indicated that the constrictive action was a dose-dependent change.

In the third chapter, to clarify at which prenatal stage the constrictive action on the arterial duct can be induced by PQ administration, we administered PQ to the mother rats at 25mg/kg s.c. on day 19, 20, and 21 of gestation. The changes in the internal diameter of the fetal arterial duct were measured at 3 h after PQ administration by rapid total body freezing. The results showed constriction in the fetal arterial duct at the 19 2/3, 20 and 21 days of fetal age. However no constriction was observed in the fetal arterial duct on day 19 1/2 of fetal age. Hence, it was revealed that the critical period of sensitivity of the fetal arterial duct on PQ was between the fetal ages of 19 1/2 and 19 2/3.

In the fourth chapter, to investigate the reaction of the arterial duct to PGE₂, which had once been constricted by PQ administration, we injected PGE₂ subcutaneously to the fetus 2 h after administering PQ to the maternal body at 25mg/kg s.c. on day 21 of gestation. Then the internal diameter of the fetal arterial duct was measured 1 h later. The results indicated that the arterial ducts of the fetuses whose mothers had been administered PQ showed significantly more constriction than the control group. However, the fetal arterial ducts showed similar dilation as that in the control group, when PGE₂ were administered following PQ injection to the maternal body.

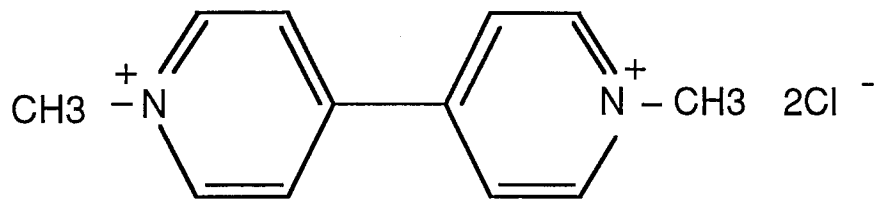
In the fifth chapter, we investigated the effects of PQ on the prostaglandin synthase, prostaglandin endoperoxide synthase such as cyclooxygenase and hydroxyoxygenase under in vitro conditions. Using an arachidonic acid as a substrate, we

activated lamb seminal vesicle microzomes containing prostaglandin endoperoxide synthase in the presence of PQ and measured the production of PGG₂ and PGH₂. The results demonstrated that the production of PGG₂ and PGH₂ was not influenced by the presence of PQ, revealing that PQ has no effect on prostaglandin synthase in vitro.

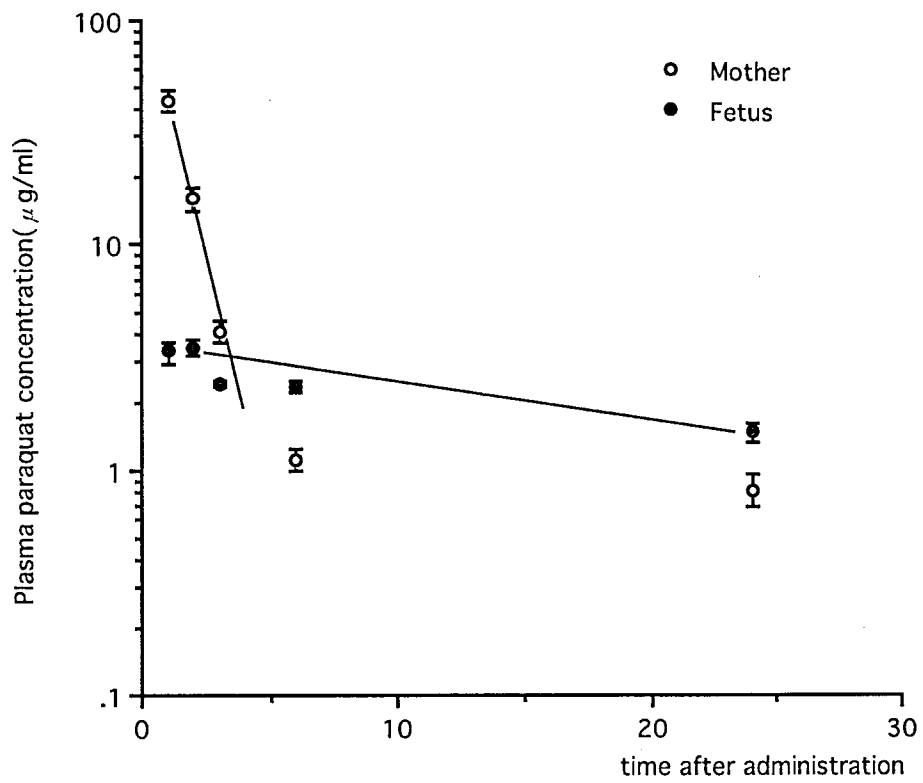
In the sixth chapter, to investigate the action of PQ on PGE₂ in vivo, we administered PQ to mother rats at 25mg/kg s.c. on day 21 of gestation. Then, we measured the serum PGE₂ concentrations in the mother and fetus by RIA at 3 h after PQ administration. The results showed no significant difference on PGE₂ concentration in either the mothers nor fetuses between the respective control and 25mg/kg groups, indicating that PQ has no effect on PGE₂ in vivo either.

The above results demonstrated that 1) PQ passed readily into the fetus after being subcutaneously injected into the maternal body; 2) Injecting PQ into the maternal body in the final stage of gestation causes dose-dependent, yet reversible, constriction in the respective fetus's arterial duct; 3) The critical period of arterial duct constriction due to PQ administration is between the fetal ages of 19 1/2 and 19 2/3; 4) PQ has no effect on prostaglandin synthase, prostaglandin endoperoxide synthase such as cyclooxygenase and hydroxyoxygenase. 5) PQ administration can have no effect on a fetus's serum PGE₂ concentration, even if injected into the mother.

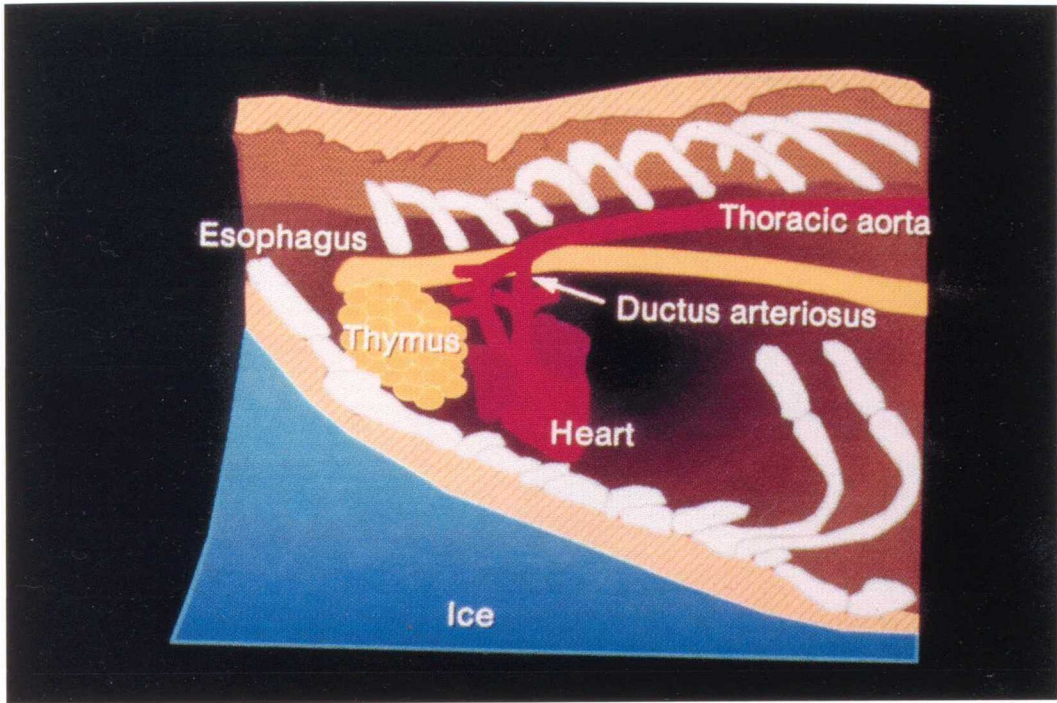
It was thus revealed that Paraquat has a constrictive effect on fetal arterial ducts, yet the mechanism does not involve PGE₂.



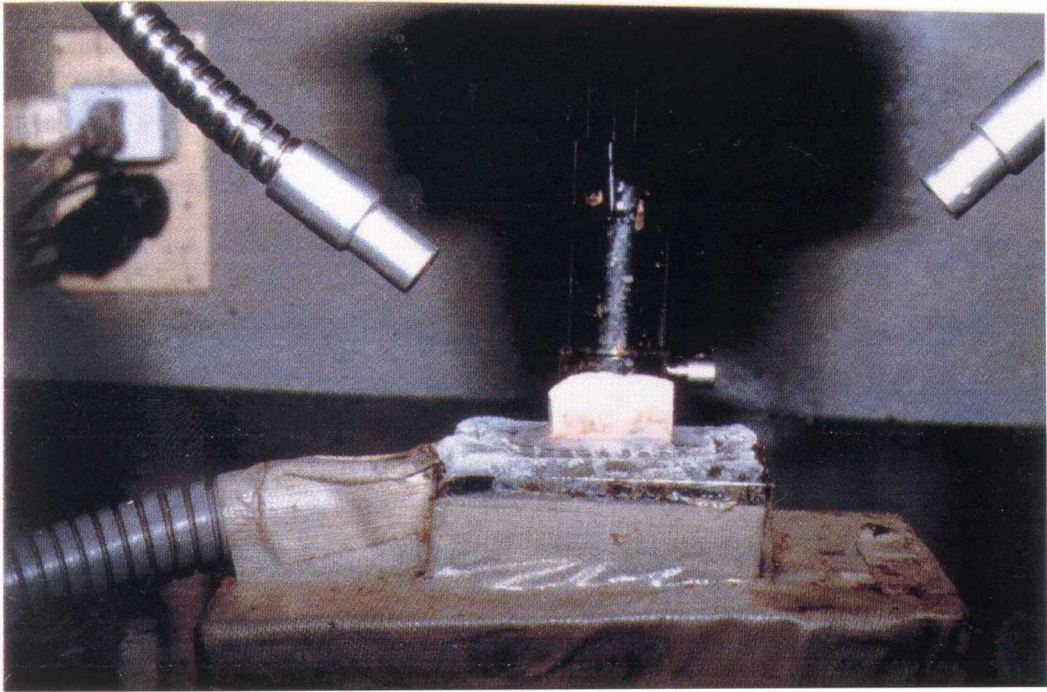
図一 1 パラコート(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium dichloride)の
化学構造式



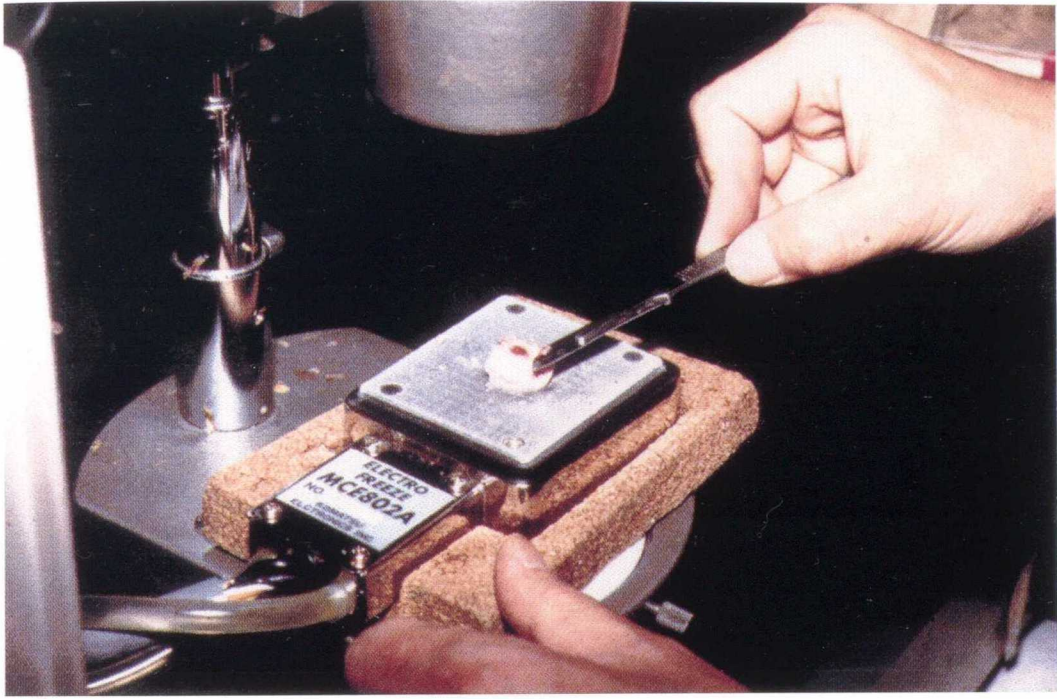
図一2 母体パラコート投与後の母体および胎子血漿中PQ濃度の推移



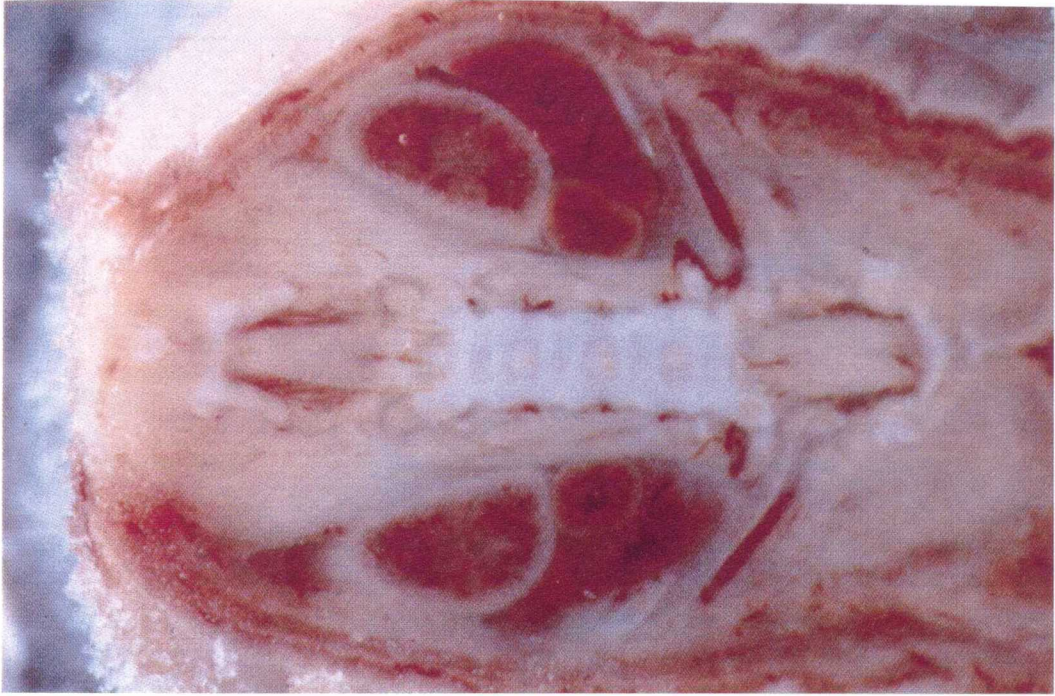
図一3 動脈管の観察方法（1）
胎子胸部の模式図
動脈管（ductus arteriosus）が垂直になるよう、この角度で
電子冷却式マイクロトームの凍結台に固定した。



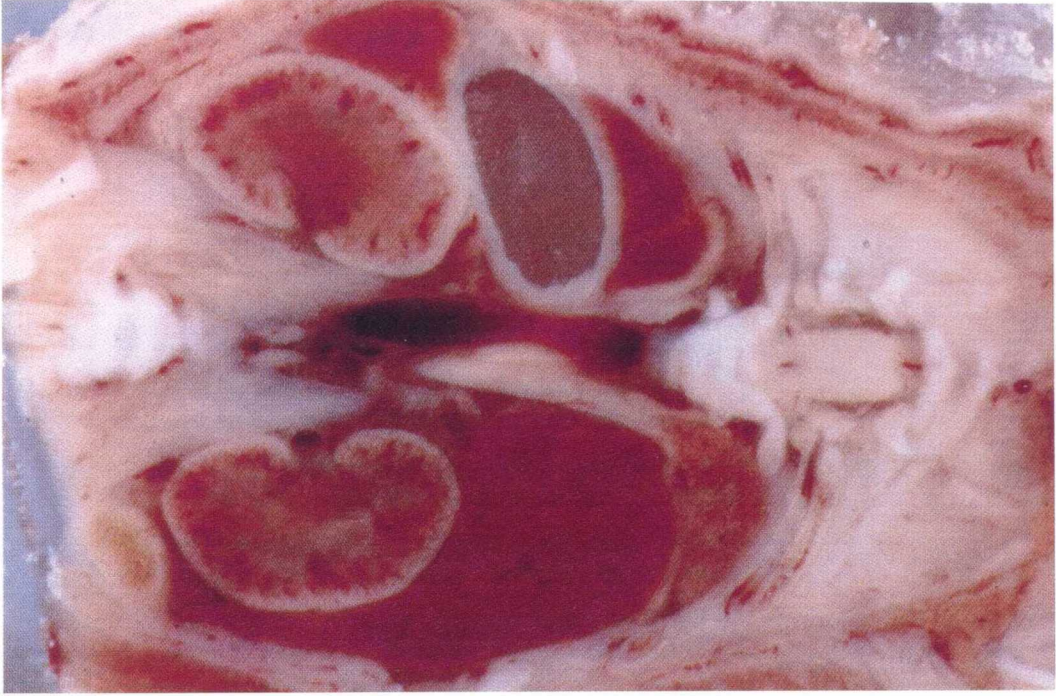
図一4 動脈管の観察方法(2)
胎子胸部を電子冷却式マイクロームの凍結台に固定したところ。



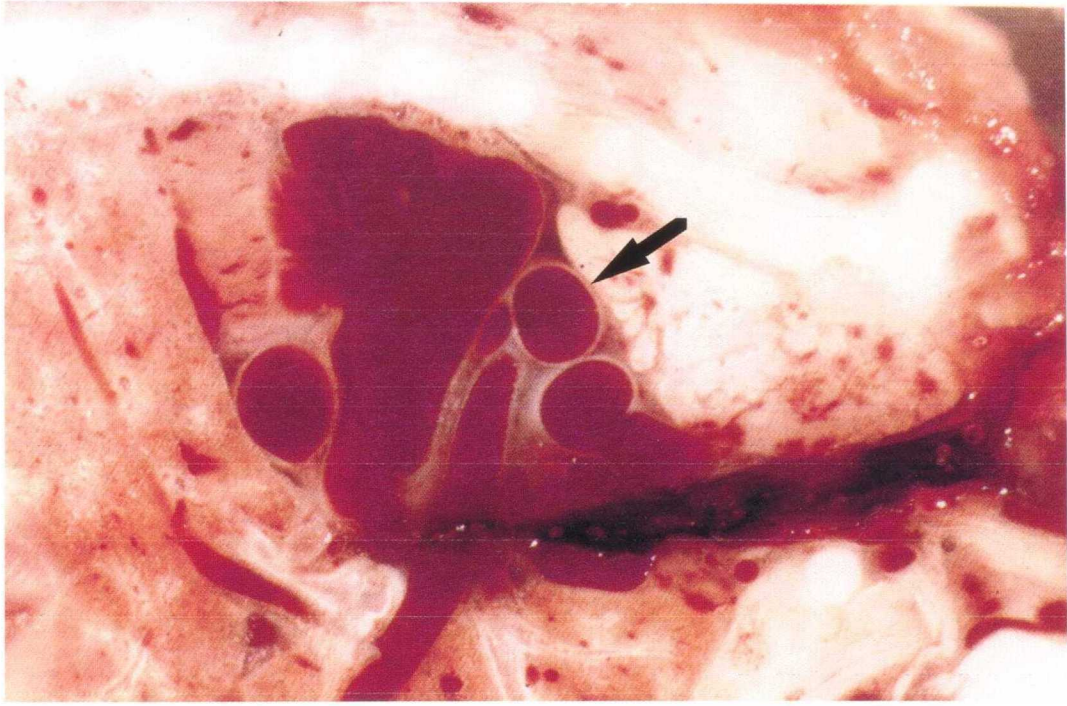
図—5 動脈管の観察方法（3）
電子冷却式マイクロームの凍結台に固定した胎子胸部
を図のように実体顕微鏡下でメスを用いて、フリーハ
ンドにて切り進める。



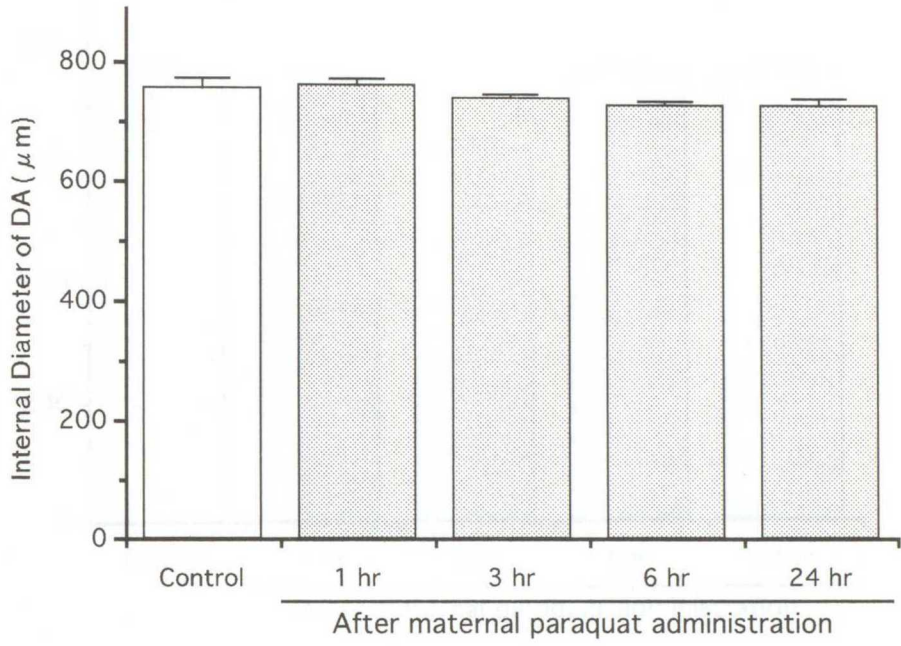
図一6 動脈管の観察方法(4)
胸椎の位置まで切り進めたところ。



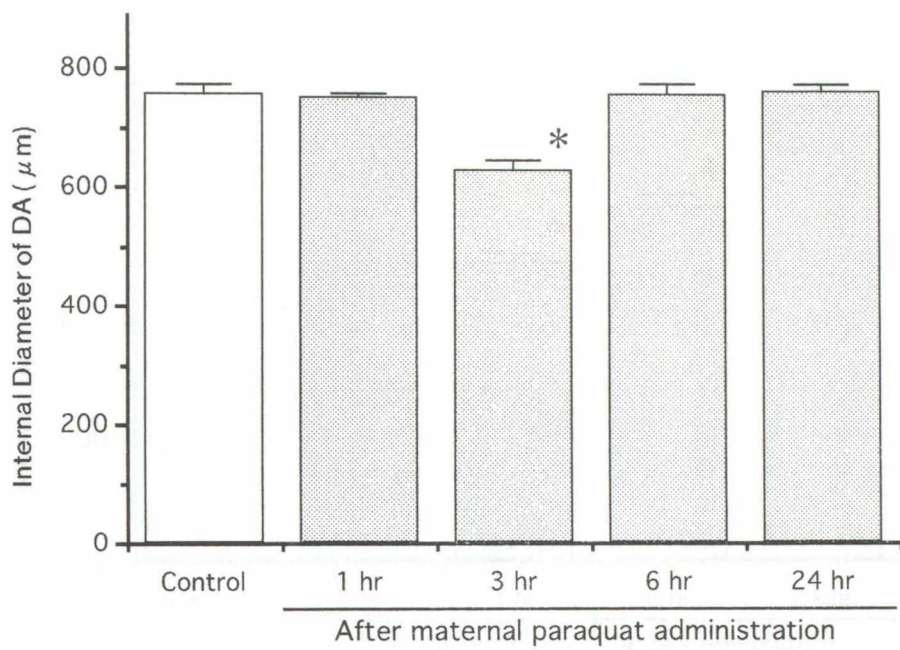
図—7 動脈管の観察方法（5）
胸大動脈の位置まで切り進めたところ。



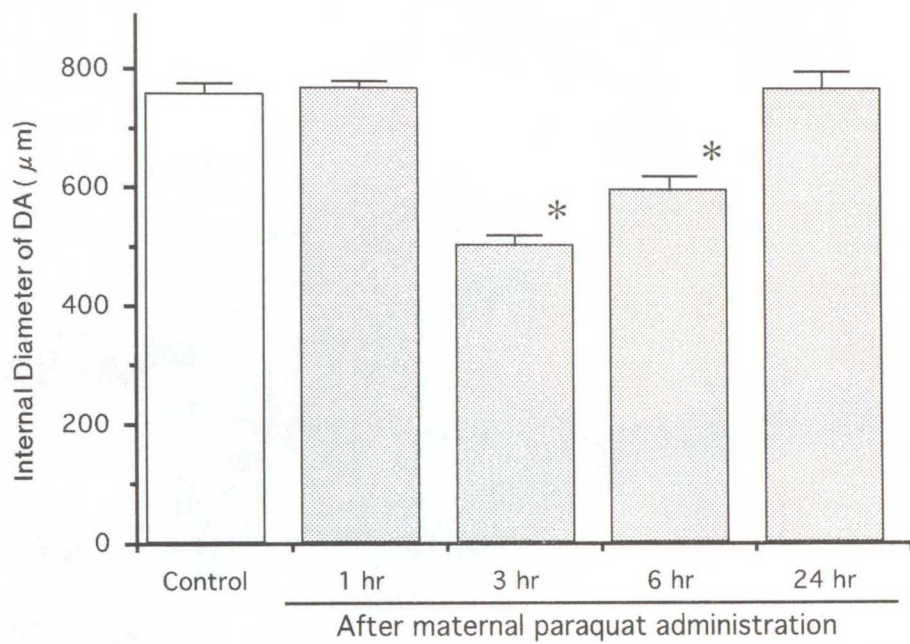
図一八 動脈管の観察方法（6）
動脈管（矢印）の位置まで切り進めたところ。



図—9 パラコート 2 mg/kg 投与群の胎子動脈管の変化
* : $p < 0.05$ で対照群と有意差あり。



図—10 パラコート 7 mg/kg 投与群の胎子動脈管の変化
* : $p < 0.05$ で対照群と有意差あり。



図—11 パラコート 25 mg/kg 投与群の胎子動脈管の変化
* : $p < 0.05$ で対照群と有意差あり。

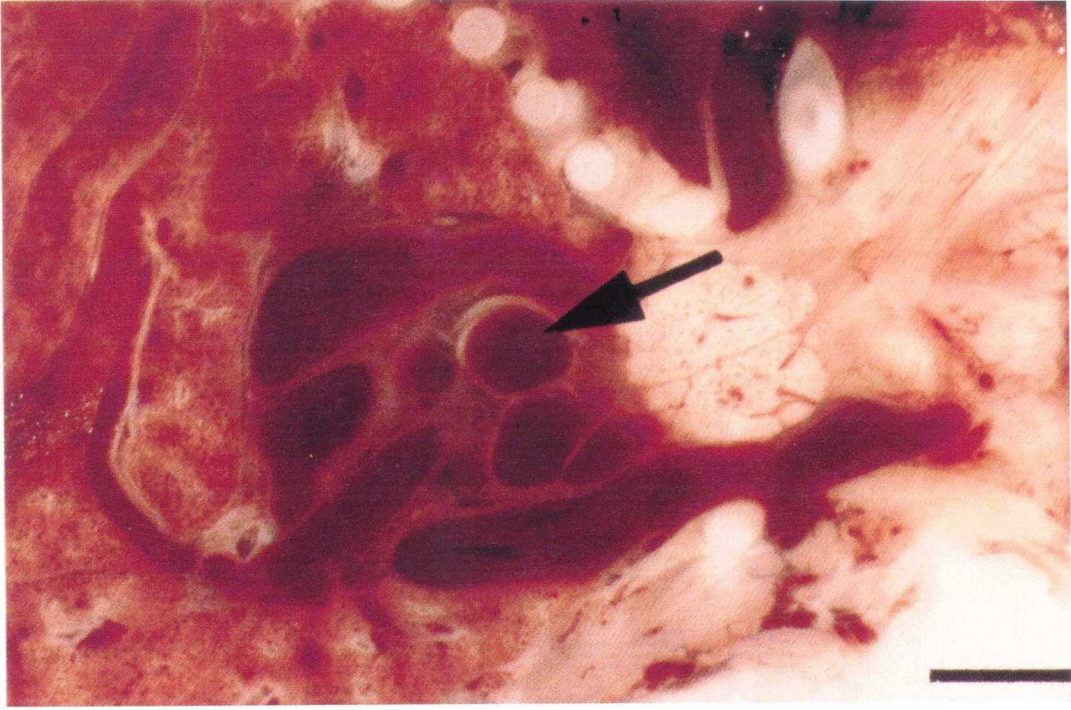


図-12 対照群の胎子動脈管 (矢印) (×14)

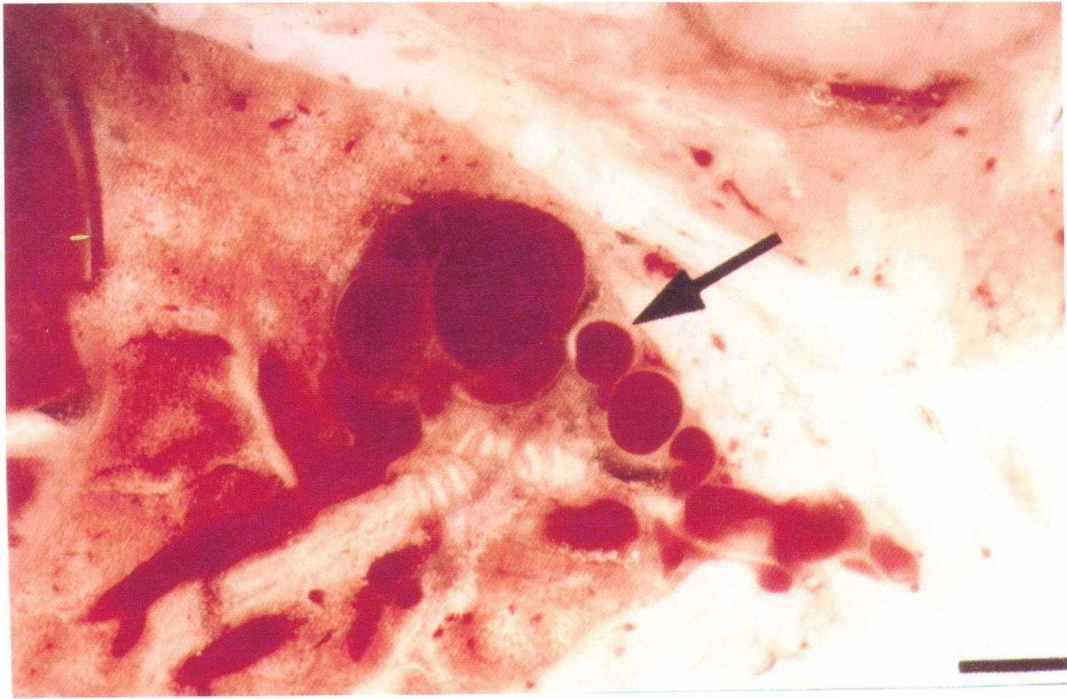


図-13 パラコート 25 mg/kg 投与群の胎子動脈管 (矢印)
投与後 3 時間 (×14)

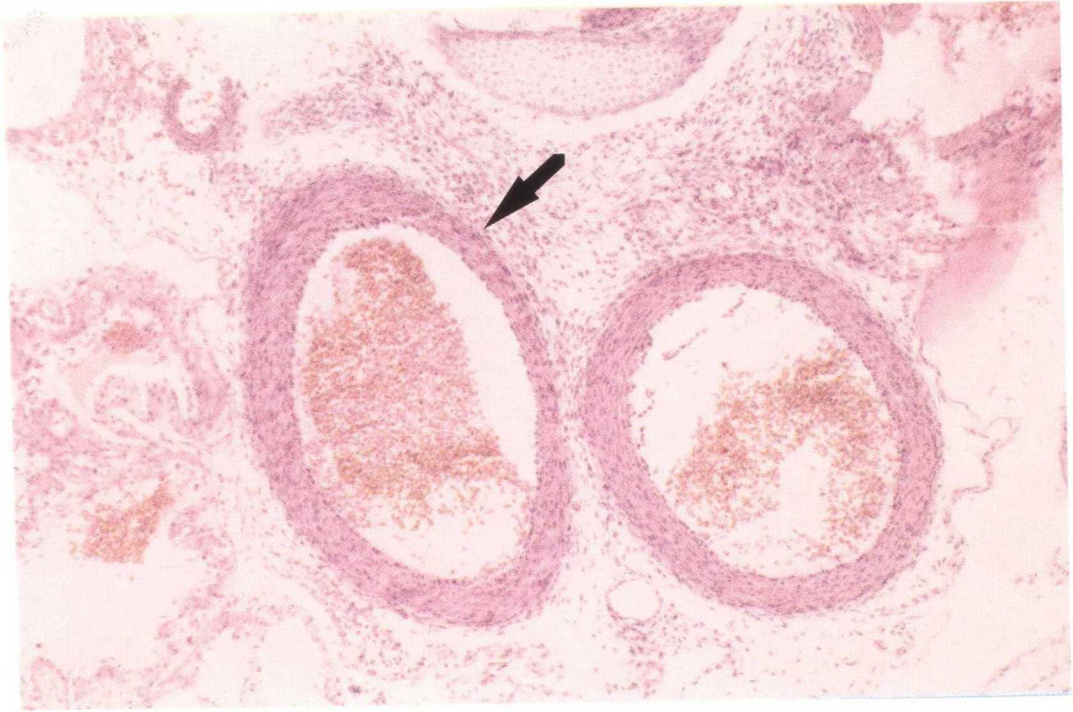
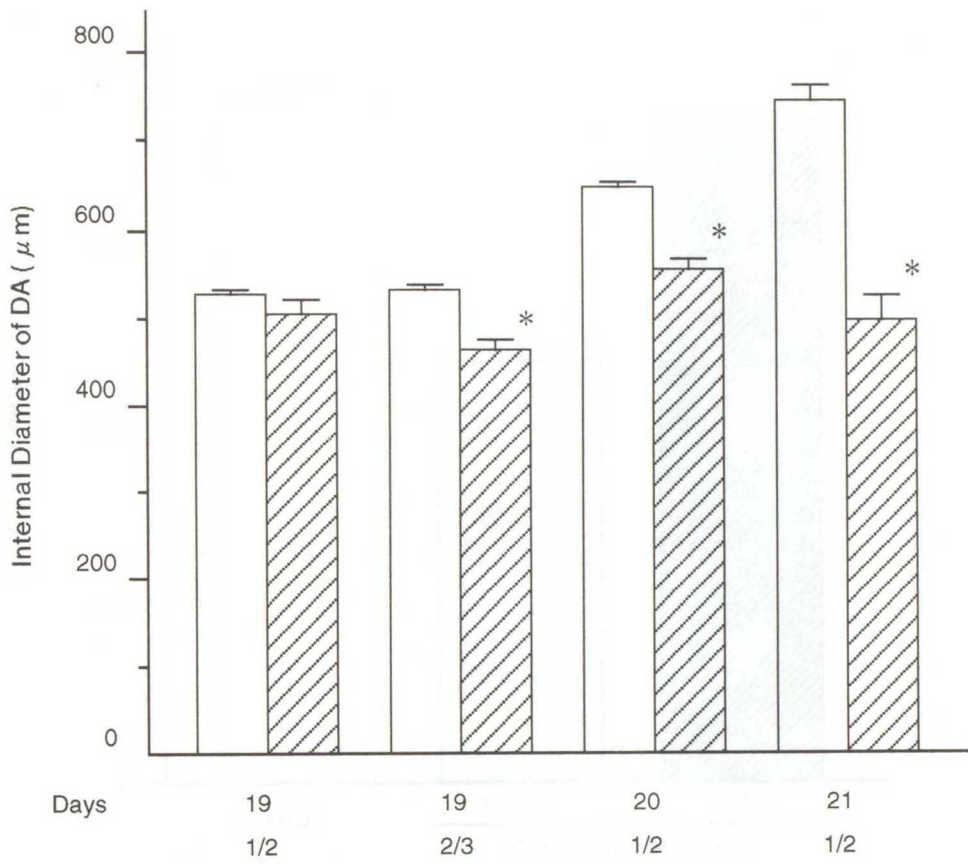


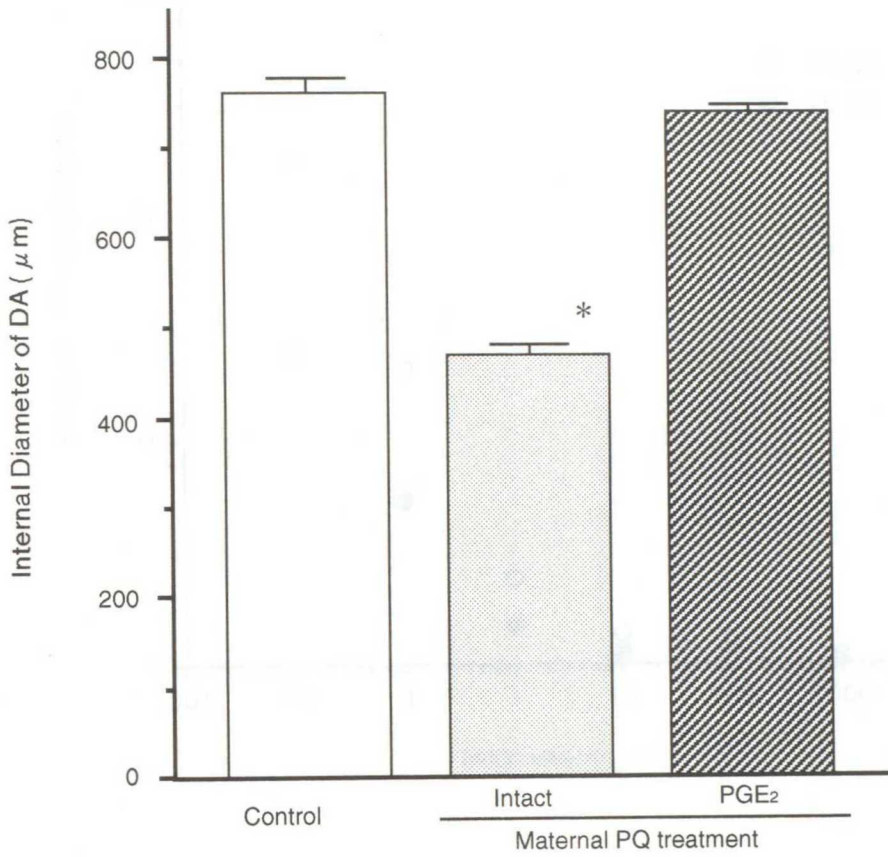
図-14 対照群の胎子動脈管 (矢印)
(H-E染色、 $\times 425$)



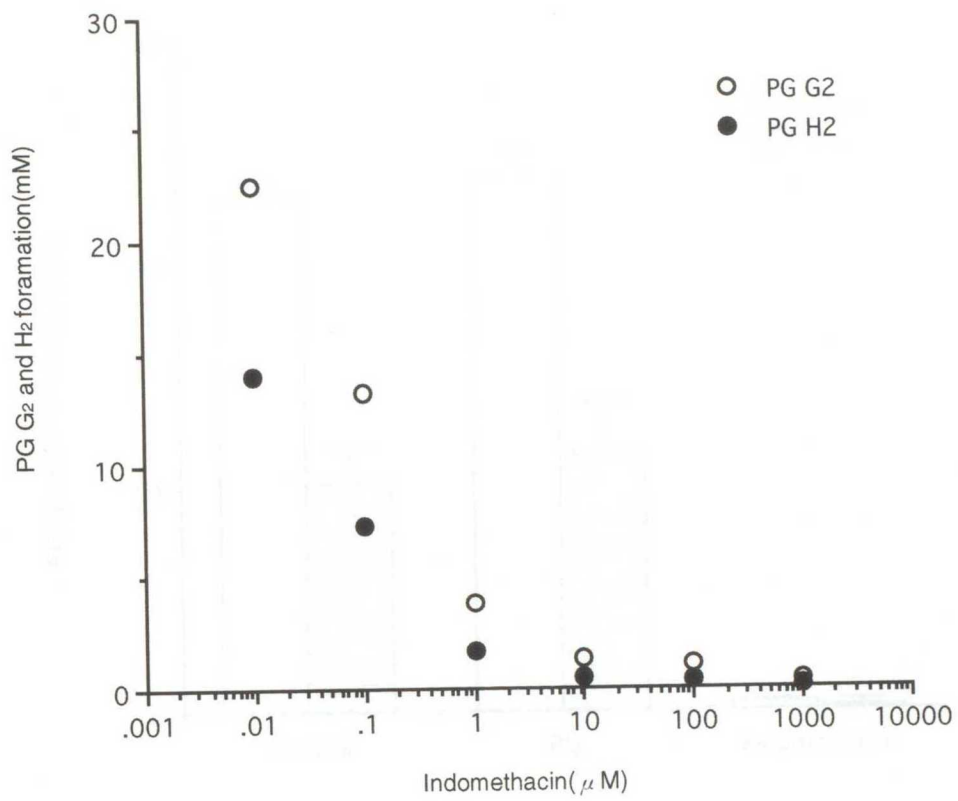
図-15 パラコート 25 mg/kg 群の胎子動脈管 (矢印)
(投与後 3 時間、H-E染色、×425)



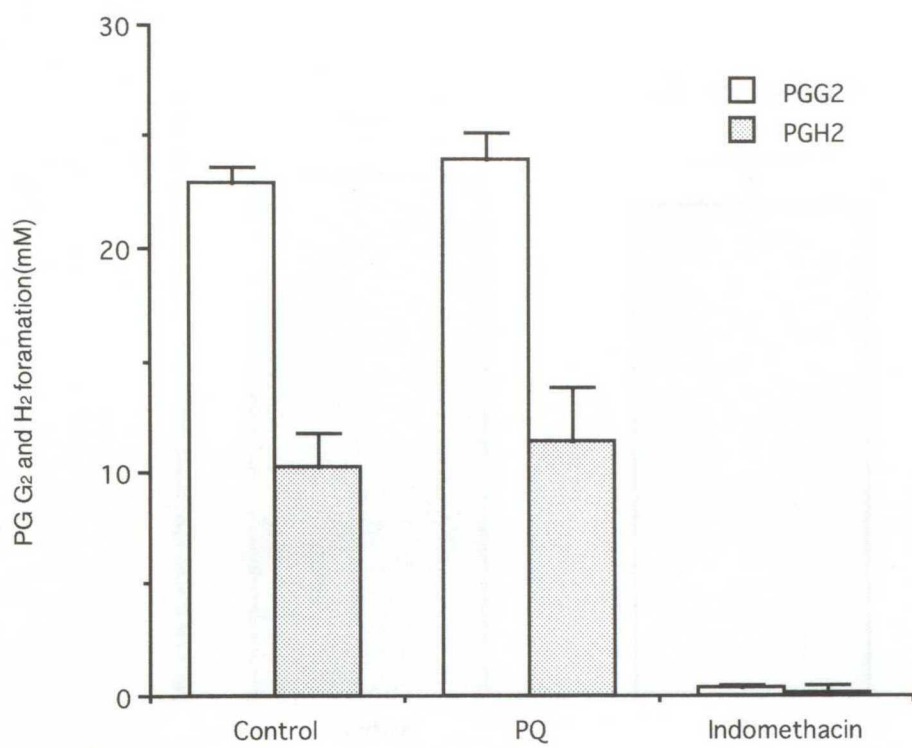
図一16 胎齡19日1/2～胎齡21日1/2における母体パラコート投与後の胎子動脈管の変化
 * : $p < 0.05$ で対照群と有意差あり。



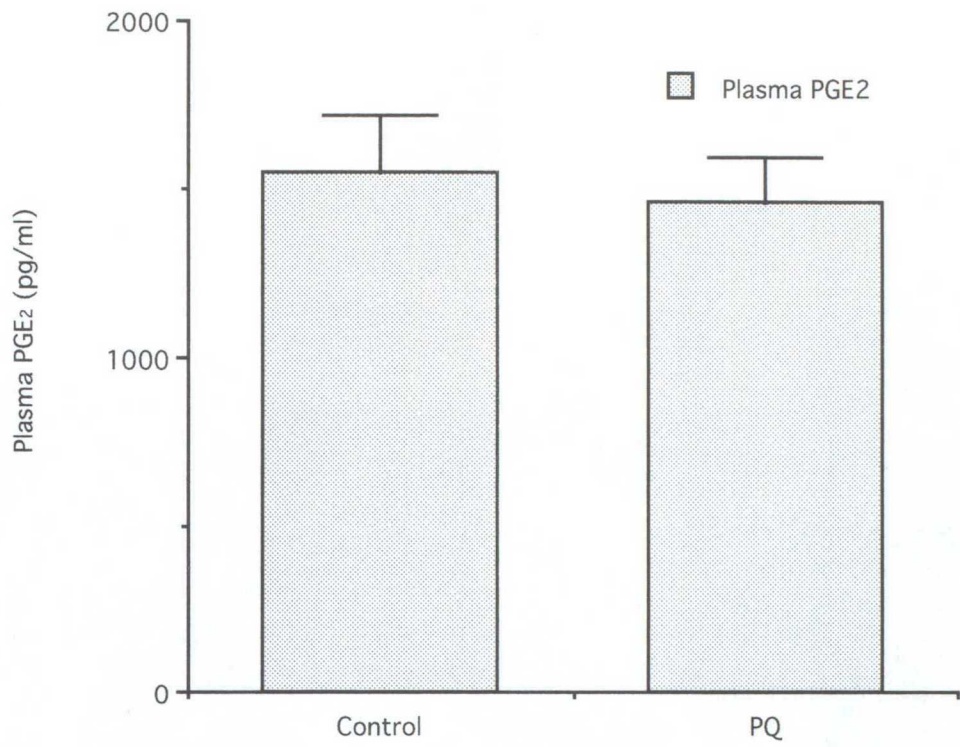
図一七 母体パラコート投与後、胎児PGE2直接投与による動脈管内径の変化



図—18 インドメタシン存在下におけるアラキドン酸からのPGG₂およびPGH₂の生成量



図—19 パラコート1 mM存在下におけるアラキドン酸からのPGG₂ およびPGH₂の生成量



図一20 母体パラコート投与後の胎子血漿中PGE₂濃度