

博士論文

ラット動脈管の再開存に関する
実験的研究

1999

富樫宏史

博士論文

ラット動脈管の再開存に関する実験的研究

1999

富 樫 宏 史

目次

	ページ
緒論	1
第1章 PGE ₁ とPGE ₂ による動脈管の再開存	4
第1節 材料と方法	4
第2節 実験結果	7
第3節 考察	9
第4節 小括	10
第2章 動脈管の再開存に及ぼす非ステロイド性抗炎症剤の影響	12
第1節 材料と方法	13
第2節 実験結果	14
第3節 考察	16
第4節 小括	18
第3章 動脈管の再開存に及ぼすアンギオテンシン変換酵素阻害剤の 影響	20
第1節 材料と方法	21
第2節 実験結果	22
第3節 考察	23
第4節 小括	24

第4章 周生期のラットにおける肺の15-ヒドロキシ-プロスタグランジン デヒドロゲナーゼ活性と母体へのインドメタシンおよび エナラプリル投与の影響	25
第1節 材料と方法	26
第2節 実験結果	31
第3節 考察	32
第4節 小括	35
第5章 動脈管の中膜平滑筋細胞の増殖とアポトーシスおよび エナラプリルの影響	37
第1節 材料と方法	38
第2節 実験結果	45
第3節 考察	49
第4節 小括	52
結語	54
要約	56
謝辞	61
参考文献	62
図表	71
Abstract	126

緒 論

動脈管は胎生期に肺動脈と大動脈を結ぶバイパスとして大きく開存し、肺への血液流入の大部分を阻止し、大動脈へと迂回させている。動脈管は弾性線維に富む大動脈や肺動脈とは組織学的に異なり、血管壁の中膜に平滑筋を多く含む筋型動脈であり (Jones et al., 1969)、その構造と出生後に急激に収縮するという特徴から、他に類のない非常にユニークな血管である。動脈管の収縮は卵円孔の閉鎖、臍循環の停止と並んで胎生期循環から成体循環への移行に重要な役割を果たしており、出生後の動脈管の収縮が速やかに非可逆的に起ることは新生児の生存にとって極めて重要である。

動脈管の開存維持は拡張性に働くプロスタグランジン (PGs) と収縮性に働く酸素分圧のバランスにより制御されている (Clyman, 1987)。このPGsを生合成する酵素であるシクロオキシゲナーゼの働きは、インドメタシン等の非ステロイド性抗炎症剤によって阻害されることから、妊娠満期の母体ラットに非ステロイド性抗炎症剤を投与すると、胎子の動脈管は収縮し (Sharpe et al., 1975; Momma and Takeuchi, 1983; Arishima et al., 1991)、その影響は生後にも及ぶ。ヒト胎児においても、妊娠末期に動脈管が収縮すると胎児肺高血圧が生じ、出生後、新生児肺高血圧持続症あるいは胎児循環持続症が起こることが知られている (Momma and Takao, 1987)。

生後の動脈管収縮は血管壁の平滑筋の収縮により生じる機能的収縮と、続いて起こる内皮細胞の破壊、内膜下層の増殖、結合組織の形成そして管腔の密閉による永久的な解剖学的な収縮閉鎖の二段階に分けられ (Jager and Wollensman, 1942; Jones et al., 1969)、比較的長期間に及ぶ解剖学的閉鎖期の後、動脈管索として遺残する。出生後、動脈管の収縮が順調に進行せず、開存が維持されたままとなると動脈管開存症と呼ばれる。この疾患は新生児の生命の存

続と深い関わりを持ち小児科領域では重要である。また、一度収縮した動脈管において、 PGE_1 と PGE_2 による再開存がヒト、ウサギなどで起こることが報告されている (Sharpe and Larsson, 1975 ; Heyman and Rudlph, 1977 ; Momma et al., 1980) が、ラットにおいては検討されていない。

このように周生期における動脈管の開存の維持と収縮閉鎖に関しては未だ知られていないメカニズムが多い。特に一度収縮した動脈管が再開存する現象は非常に興味深く、この再開存現象の解明は動脈管開存症の発生メカニズムの解明にもつながるものと考えられる。

インドメタシンは最も強力なシクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドール酢酸系の非ステロイド性抗炎症剤の1つであり、現在、ヒト未熟児の動脈管開存症の治療に用いられているが、必ずしも成功率は高くない (Heyman et al., 1976 ; MaCarthy et al., 1978) 。また、妊娠後期の母体ラットに過剰のインドメタシンを投与すると、出生後の動脈管の収縮が遅れ (Konishi et al., 1986) 、インドメタシンは使用時期によっては動脈管収縮に逆効果を生じる。

アンギオテンシン変換酵素阻害剤であるマレイン酸エナラプリル (以下、エナラプリル) は、他の降圧剤と比べ、交感神経作用を維持したまま、脳、心臓、腎臓への血流量を増加させ降圧作用をもたらすという理由から、ヒト妊婦によく使用されている (Johnston, 1984 ; Lund-Johansen, 1984) 。近年、妊娠中期から後期にエナラプリルを服用した妊婦から、新生児の動脈管開存症との関連が報告されている (Kreft-Jais et al., 1988 ; Pryde et al., 1993) 。

以上のことから本論文では動脈管の再開存と、動脈管開存症との関連性が報告されているインドメタシンやエナラプリルの動脈管開存に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、次のような各方面からのアプローチを試みた。

第1に、解剖学的閉鎖期の動脈管の再開存について、特に PGE_1 と PGE_2 によって生じる動脈管の再開存について検討した。

第2に、出生後のPGE₂による動脈管の再開存が母体へのシクロオキシゲナーゼ阻害剤の投与により修飾を受けるのではないかと推測されるので、妊娠末期の非ステロイド性抗炎症剤がPGE₂による動脈管の再開存に与える影響を検討した。

第3に、妊娠後期の母体ラットにエナラプリルを連続投与したときのPGE₂による動脈管の再開存に及ぼす影響について検討した。

第4に、動脈管と肺におけるPGE₂の代謝分解に注目し、PGE₂の主要な代謝分解酵素である肺の15-ヒドロキシ-プロスタグランジンデヒドロゲナーゼ (PGDH) 活性と動脈管の再開存との関連について検討した。

第5に、動脈管の中膜平滑筋細胞の増殖とアポトーシス (プログラム細胞死) について検討し、エナラプリル投与が、動脈管の細胞増殖とアポトーシスに及ぼす影響を検討した。

第1章 PGE₁とPGE₂による動脈管の再開存

緒論で述べたように、周生期の動脈管は拡張性に働くプロスタグランジン (PG) と収縮性に働く血中酸素分圧のバランスによって維持されており (Clyman, 1987)、動脈管の拡張に作用するPGはPGE₂であると報告されている (Clyman et al., 1981)。胎生期には血中酸素分圧が低いため、シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドメタシンなどが経胎盤的に投与されると、血中のPGEsの低下により胎子の動脈管は収縮する。一方、新生子においても、PGE₁とPGE₂により動脈管が再開存することはヒト、ウサギで報告されている (Sharpe and Larsson, 1975; Heyman and Rudolph, 1977; Momma et al., 1980) が、ラットにおけるPGE₁とPGE₂による動脈管の再開存についての報告はない。

以上のことから、本章ではラット新生子の一度収縮した後の動脈管におけるPGE₁とPGE₂による再開存について、その作用の程度、用量依存性を検討した。さらにPGEsによる動脈管の再開存が生後のいつまで観察されるのか検討した。

第1節 材料と方法

1) 供試動物および飼育環境

供試動物はCrj:Wistarラットを自家繁殖させて得た10~15週齢の雌動物を用いた。動物は室温24±2°C、相対湿度55±10%、換気回数15回/時間、オールフレッシュ方式、照明時間12時間 (午前6時点灯、午後6時消灯) に設定された麻布大学生物科学総合研究所で飼育した。飼料と飲水は固形飼料 (CE-2: 日本クレア, 東京) および水道水を自由摂取させた。妊娠動物は雌雄ラットを一晩同居させ、翌日膣スメア内に精子が認められた日を妊娠0日と設定し、起算した。妊娠満期は21日となる。飼育には263 x 425 x 178mmのポリカー

ボネート製ケージを用い、交配中は3匹ずつ、妊娠確認後は1匹飼育とした。

2) 試料の調製

PGE₁およびPGE₂のバイアル1mg (Sigma, St. Louis) を生理食塩水10mlに正確に溶解し100 μ g/ml の溶液とし、冷蔵庫に保存した。使用期限は調製後、1週間以内とした (山本と鹿取, 1986)。

3) 実験方法

3) -1 PGE₁およびPGE₂による動脈管の再開存

帝王切開3時間後の新生子を用い、4 μ gまたは10 μ g/匹のPGE₁およびPGE₂を背部皮下に投与し、解剖学的閉鎖期における動脈管の再開存を検討した。

妊娠21日の母体ラットを断頭放血後、帝王切開により新生子を得た。子宮から取り出した新生子は体に付着した粘液および血液等をキムタオルで拭き取り、37°Cの保温盤上に放置した。帝王切開3時間後、4 μ gまたは10 μ gのPGE₁およびPGE₂をガラス製シリンジを用いて新生子の背部皮下に投与した。投与直後、15分、30分、60分、90分および180分後に新生子をサンプリングした。対照群には、帝王切開3時間後にPGEs投与群と同容量 (50 μ l) の生理食塩水を新生子の背部皮下に投与し、投与直後から180分後まで経時的にサンプリングした。サンプリングした新生子はドライアイス・アセトン溶液で急速全身凍結し、観察まで-20°Cの冷凍庫に保存した。

3) -2 PGE₂による動脈管再開存の経時的变化

帝王切開3時間または6時間後および自然分娩12時間または24時間後の新生子に4 μ gのPGE₂を投与して動脈管の再開存を経時的に検討した。

出生3時間または6時間後の新生子は、3) -1と同様に妊娠21日の母体ラット

から帝王切開により得て、37°Cの保温盤上に一定時間放置した。また、出生12時間または24時間後の新生子は自然分娩により得た。妊娠満期日の前日から妊娠動物を観察し、自然分娩を確認後、出生12時間または24時間後に正常な新生子を選び実験に用いた。なお、新生子はPGE₂投与30分前まで母体ラットと同居させ、その後、3) -1と同様に37°Cの保温盤上に放置した。出生3、6、12および24時間後に3) -1と同様の方法で新生子の背部皮下に4 μgのPGE₂を投与し、投与15、30および60分後に新生子をサンプリングし全身凍結した。対照群には生理食塩水を投与し、投与直後または180分後に新生子をサンプリングし凍結した。なお、帝王切開3時間後にPGE₂を投与した実験群は3) -1のデータを使用した。

4) 新生子の体重、動脈管および肺動脈の内径の測定方法

凍結した新生子を-20°Cの冷凍庫から取り出し、化学天秤 (AND, EK-120A) で体重を測定した。雌雄鑑別を行なった後、新生子の剣状突起部から尾部にかけて腹部を外科用メスで切除した。次いで、新生子を簡易凍結装置 (KOMATU ELECTRONICS, ELECTROFREEZER, MCR 802A) (図-1) に固定した。この際、新生子の動脈管が凍結台に対して垂直になるように注意深く置いた (図-2)。新生子の背部を実体顕微鏡 (OLYMPUS, SZ40) (図-1) で観察しながら外科用メスで背部よりフリーハンドで削った。まず初めに胸椎および肋骨が認められ (図-3)、さらに削り進めると胸大動脈が現われる (図-4)。その後、中央に食道、その左側に動脈管と大動脈の分岐部が認められる (図-5)。そして、動脈管が大動脈から完全に分離し、動脈管の内径が最小になった所で動脈管の内径を測定した (図-6)。さらに削り進め左右の肺動脈が現われ、両者が合流して一本の肺動脈となったところ (図-7) で肺動脈の内径を測定した。動脈管および肺動脈の内径は実体顕微鏡の接眼レンズに装着したマイクロメー

夕で測定した。動脈管および肺動脈の内径の比 (DA/PA比) を求め、この比を動脈管の収縮閉鎖の指標とした。緒論で述べたように動脈管は出生後呼吸の開始とともに収縮し、内径は小さくなるが周生期の肺動脈の内径はほぼ一定なので、DA/PA比は出生直後の約1.0から出生90分後には約0となる (Takizawa et al., 1992)。

5) 統計学的処理方法

各群の新生子の体重およびDA/PA比の平均値と標準誤差を求めた。各群間でStudentのt-testを行なった。P<0.05の場合、統計学的に有意差があると判断した。

第2節 実験結果

2-1 PGE₁とPGE₂による動脈管の再開存

結果を図-8、9および表-1に示した。

PGE₁またはPGE₂を投与した新生子の体重は正常であり各群に偏りはなかった。

帝王切開3時間後の新生子に4 μg/匹のPGE₁を投与すると、DA/PA比は投与時の0.00から15分後に0.37と最大値を示し、以後30分後には0.31、60分後には0.09、90分後には0.03と漸減し、180分後には0.00であった。一方、PGE₁の投与量が10 μg/匹の時は、観察時間のすべてにおいてDA/PA比は4 μg群よりも有意に高値を示した。DA/PA比の最大値は投与30分後に認められ0.52であった。

4 μgのPGE₂を同様に投与すると、DA/PA比は投与時の0.00から15分後に0.58、30分後に0.60と最大値を示し、60分後に0.41、90分後に0.19と漸減し、180分後には0.00であった。一方、PGE₂の投与量が10 μgの時は、DA/PA比

は観察時間のすべてにおいて4 μ g投与群と統計学的な有意差はなかった。投与後の最大値は0.52であり投与15分後に認められた。なお、対照群として用いた生理食塩水投与直後（帝王切開180分後）および180分後（帝王切開360分後）の新生子の動脈管は完全に収縮閉鎖してDA/PA比は0.00であった。

以上の結果から10 μ gのPGE₁またはPGE₂を投与すると、動脈管は投与15分から30分後に同様の再開存ピークを示し、その収縮過程も同程度であった。しかし、4 μ g群では投与15分後から90分後にかけて動脈管の再開存はPGE₂の方が有意に大きかった。このことから、ラットではPGE₁よりPGE₂の方が動脈管に対する効果が大きいと判断し次の実験ではPGE₂を用いた。

2-2 PGE₂による動脈管再開存の経時的变化

結果を図-10、11および表-2に示した。

出生3、6、12および24時間後にPGE₂を投与した新生子の体重は正常であり各群に偏りはなかった。

2-1の結果よりPGE₂の方がPGE₁より動脈管の再開存作用が強いため2-2ではPGE₂を用いた。

帝王切開3時間後に4 μ gのPGE₂を投与すると、DA/PA比は投与時の0.00から15分後に0.58、30分後に0.60、60分後には0.41を示した。PGE₂投与後のDA/PA比の最大値は投与30分後に認められた。帝王切開6時間後にPGE₂を投与すると、DA/PA比は帝王切開3時間後の新生子の場合と比べていずれの観察時間においても低値であり、統計学的にも有意であった。

自然分娩12時間後の新生子ではDA/PA比はさらに低値を示し、また、自然分娩24時間後の新生子では、DA/PA比は観察時間のすべてにおいて0.00であり、動脈管の再開存は認められなかった。

第3節 考察

本章の実験結果からPGE₁およびPGE₂は、解剖学的閉鎖期においても動脈管の再開存作用を有することが示された。4 μ gあるいは10 μ gのPGE₁またはPGE₂を投与すると、投与15分から30分後に動脈管の再開存は最大になり、60分から90分間持続し、90分から180分後には消失した。また、再開存はPGE₂の方がPGE₁よりも強力であった。PGE₁の場合には再開存の程度には明らかな用量依存性がみられたが、PGE₂の場合には用量依存性は明らかではなく、4 μ gおよび10 μ g投与ともに同程度の再開存であった。4 μ gのPGE₂は動脈管の再開存を引き起こすのに十分な量であり、そのためこの投与量で最大の反応が生じたものと考えられた。PGE₁およびPGE₂をラット新生子に投与すると、15分から30分後に再開存の最大値が得られ、投与60分から180分後にその作用が消失することは、出生60分後のウサギ新生子を用いた実験結果 (Momma et al., 1980) と一致する。

PGE₁やPGE₂の投与により再開存した動脈管が時間の経過とともに再び収縮閉鎖していくことは興味深い。Clyman (1987) によると、周生期の動脈管は血中の酸素分圧とPGE₂のバランスにより調整されており、本実験では帝王切開3時間後のすでに肺循環の確立した後の新生子を用いていることを考えると、投与されたPGE₁、PGE₂の肺における不活化が大きく関与しているものと推測される。

ウサギを用いた *in vivo* の実験では、PGE₁およびPGE₂の動脈管拡張作用は同等であると報告されている (Momma et al., 1980)。本章の結果では動脈管の再開存についてはPGE₂の作用がPGE₁よりも明らかに強かった。このウサギとラットの実験結果の違いは、出生後の動脈管の収縮過程の違い、または、PGEsに対する動脈管の感受性の違いなどが関与していると考えられる。ウサギでは出生2分後の動脈管の内径は出生直後の1/4、そして、30分後にほとん

ど収縮閉鎖する (Hörnblad, 1967) が、ラットでは出生30分後では動脈管は開存していることが報告されている (Takizawa et al., 1992)。

本章の実験結果から、PGE₂による動脈管の再開存は出生3時間後の新生子のほうが6時間後の新生子よりも強いこと、さらに出生12時間後のラット新生子ではわずかに動脈管は再開存するものの、出生24時間後では全く再開存せず、PGE₂に対する感受性が失われたことが示された。この出生12時間から24時間後にPGE₂に対する動脈管の反応性が消失することはウサギ新生子を用いたPGE₁およびPGE₂による実験結果 (Momma et al., 1980) と一致する。

この動脈管の感受性の変化の原因は不明であるが、Jarkovskáら (1989) や Jonesら (1969) による電子顕微鏡を用いた生後の動脈管を観察した報告によると、時間の経過とともに内皮細胞の変性、壊死、中膜の平滑筋細胞の変性等が生じるとされているので、これらの器質的な変化も関与していると考えられる。また、新生子のPGE₂代謝能の変化等も推測されるが、さらに検討を必要とする。

以上のことからPGE₁およびPGE₂をラット新生子に投与すると、解剖学的閉鎖期においても動脈管の再開存が認められた。その作用はPGE₂の方がPGE₁より強かった。また、動脈管のPGE₂に対する感受性は時間とともに減少し、出生24時間後には全く消失していることが示された。

第4節 小 括

ラット新生子を用いて解剖学的閉鎖期の動脈管におけるPGE₁とPGE₂による再開存を検討した。

すでに動脈管が収縮閉鎖している帝王切開3時間後の新生子を用い、背部皮下に4 μ gまたは10 μ gのPGE₁およびPGE₂を投与した。投与15、30、60、90および180分後に新生子を急速全身凍結しDA/PA比を求めた。PGE₁および

PGE₂投与により、投与15分から30分後とともに再開存の最大値が認められ、DA/PA比は0.4から0.6（胎生期の動脈管の約40%から60%）に達した。動脈管の再開存は投与90分後まで持続したが、180分後には消失した。また、PGE₁による再開存は用量相関的に認められたが、PGE₂では明らかでなかった。PGE₂による再開存の方がPGE₁より有意に強かった。

次に、帝王切開3時間および6時間後の新生子と自然分娩12時間および24時間後の新生子を用いて、PGE₂による動脈管の再開存の経時的変化を検討した。帝王切開6時間後に投与した新生子のDA/PA比は、帝王切開3時間後に投与した新生子と比較して有意に減少していた。また、自然分娩12時間後の新生子では、PGE₂による再開存はわずかに認められたが、24時間後には全く消失していた。

以上のことから、1) PGE₁およびPGE₂は解剖学的閉鎖期のラット新生子においても動脈管を再開存させ、その作用はPGE₂がPGE₁より強い。2) PGE₂による動脈管の再開存は出生後の時間とともに急激に減少することが明らかになった。

第2章 動脈管の再開存に及ぼす非ステロイド性抗炎症剤の影響

緒論で述べたように、胎生期の動脈管の拡張維持にはPGsと酸素分圧が関与している。また、第1章で示したように、ラット新生子において一度収縮後の動脈管はPGE₁とPGE₂により再開存し、その作用はPGE₂の方が強力だった (Takizawa et al., 1995)。シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドメタシンを妊娠満期の母体ラットに投与すると、血中のPGsが低下し、胎子の動脈管は収縮する (Sharpe et al., 1975 ; Momma and Takeuchi, 1983) が、投与24時間後までには回復するという。このインドメタシンに対する動脈管の感受性は、ラットでは妊娠時期により異なっている (Arishima et al., 1991)。また、ヒトでもインドメタシンに対する動脈管の感受性は胎生期の時期により異なると報告されている (Clyman et al., 1980)。

インドメタシンは最も強力なシクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドール酢酸系の非ステロイド性抗炎症剤の1つであり、現在、ヒト未熟児の動脈管開存症の治療に用いられているが、必ずしも成功率は高くない (Heyman et al., 1976 ; MaCarthy et al., 1978)。また、妊娠後期の母体ラットに過剰のインドメタシンを投与すると、出生後の動脈管の収縮が遅れ (Konishi et al., 1986)、インドメタシンは使用時期によっては動脈管収縮に逆効果を生じる。

以上のことから、インドメタシンはPGE₂による動脈管の再開存を修飾する可能性があると考えられる。また、この可能性が、インドメタシンに特有な現象なのか、あるいはシクロオキシゲナーゼ阻害剤に共通する現象であるのか特定するために、インドメタシンに加えて、臨床常用量 (10mg/kg) (日本医薬情報センター編、1993a) で動脈管の高度の収縮を起こすサリチル酸系のアスピリン、臨床常用量 (8mg/kg) (日本医薬情報センター編、1993b) で軽度

の収縮を起こすフェニールプロピオン酸系のイブプロフェンを妊娠末期の母体ラットに投与して得た新生子を用いて、PGE₂による動脈管の再開存を検討した。

第1節 材料と方法

1) 供試動物および飼育環境

第1章に記したものと同一である。

2) 試料の調製

インドメタシン（和光純薬, 大阪）、アスピリン（和光純薬）およびイブプロフェン（和光純薬）を化学天秤（Mettler, H80）で正確に秤量して、生理食塩水にそれぞれ懸濁し、インドメタシン1mg/10mlおよび3mg/10ml懸濁液、アスピリン100mg/10mlおよび300mg/10ml懸濁液、イブプロフェン10mg/10mlおよび30mg/10ml懸濁液を作製した。

プロスタグランジンE₂は第1章と同様に調製した。

3) 実験方法

妊娠18、19および20日にインドメタシン、アスピリンおよびイブプロフェンを投与した母体から得た新生子を用いて、PGE₂による動脈管の再開存を検討した。インドメタシン（1、3mg/kg/日）、アスピリン（100、300mg/kg/日）、イブプロフェン（10、30mg/kg/日）を妊娠18日から3日間午後1時に母体ラットに経口投与した。投与容量はいずれも10ml/kgとした。妊娠21日の午後1時に母体ラットを断頭放血により殺処分した後、帝王切開により新生子を取り出し、37°Cに設定した保温盤上に放置した。帝王切開3時間または6時間後に4μg/匹のPGE₂をガラス製シリンジを用いて新生子の背部皮下に投

与した。投与直後、15分、30分、60分、90分および180分後に新生子を急速全身凍結し、 -20°C の冷凍庫に保存した。

4) 新生子の体重、動脈管と肺動脈の内径の測定方法

凍結した新生子は第1章に記した方法に従い、体重および動脈管と肺動脈の内径を測定した。

5) 統計学的処理方法

各群の新生子の体重とDA/PA比の平均値および標準誤差を求め、各群間で分散分析 (ANOVA) を行ない、群間に差異が認められた時Bonferroniの方法を用いて多重比較を行なった。P < 0.05の場合、統計学的に有意差があると判断した。

第2節 実験結果

2-1 インドメタシンの影響

結果を図-12、13および表-3に示した。

インドメタシン3mg群の新生子の体重は無処置群に比べて有意に減少していた。

無処置の母体から得た新生子に帝王切開3時間後に $4\mu\text{g}$ の PGE_2 を投与すると、投与15分から60分後にDA/PA比は0.41から0.60を示した。一方、インドメタシン1mg群の母体から得た帝王切開3時間後の新生子に $4\mu\text{g}$ の PGE_2 を投与すると、DA/PA比は投与15分から90分後に0.72から0.60を示し、投与180分後には0.23と低下した。DA/PA比の最高値は PGE_2 投与15分後の0.72であった。 PGE_2 投与60分から90分後にかけてDA/PA比は無処置群に比べて有意に高値であった。

インドメタシン3mg群の母体から得た帝王切開3時間後の新生子にPGE₂を投与すると、DA/PA比は投与15分から90分後にかけて約0.9以上の値を示し、投与180分後でも0.71であった。最高値はPGE₂投与30分後の1.01であった。DA/PA比はPGE₂投与15分から180分後にかけて無処置群およびインドメタシン1mg群と比較しても有意に大きかった。

インドメタシン1mg群の母体から得た帝王切開6時間後の新生子に4 μ gのPGE₂を投与すると、DA/PA比は投与15分から60分後に0.31から0.42を示し、90分後に0.11、180分後には0.00であった。DA/PA比の最高値はPGE₂投与30分後の0.42であった。PGE₂投与15分から90分後にかけてDA/PA比は無処置群に比べて有意に高値であった。

インドメタシン3mg群の母体から得た帝王切開6時間後の新生子にPGE₂を投与すると、DA/PA比は投与15分から90分後にかけて0.40から0.60の値を示し、180分後には0.08と減少した。最高値はPGE₂投与30分後の0.60であった。PGE₂投与15分から90分後にかけてDA/PA比は無処置群と比べて有意に高値であった。

2-2 アスピリンおよびイブプロフェンの影響

結果を図-14、15および表-4に示した。

アスピリン300mgおよびイブプロフェン30mg群の新生子の体重は無処置群と比較して有意に減少していた。

無処置群の母体から得た帝王切開3時間後の新生子に4 μ gのPGE₂を投与すると、DA/PA比は投与15分から60分後に0.41から0.60を示した。

アスピリン100mg群の母体から得た新生子のDA/PA比は、PGE₂投与60分後を除いて無処置群と同様であった。一方、アスピリン300mg群では、DA/PA比は投与15分から90分後に0.73から0.81を示し、投与180分後でも0.21であっ

た。最高値はPGE₂投与30分後の0.81であった。DA/PA比はPGE₂投与15、60および90分後で無処置群と比較して有意に大きかった。

イブプロフェン10mg群の母体から得た帝王切開3時間後の新生子に4 μ gのPGE₂を投与すると、DA/PA比は無処置群と同様であった。一方、イブプロフェン30mg群ではDA/PA比は、投与15分から90分後に0.64から0.73を示し、投与180分後でも0.17であった。最高値はPGE₂投与30分後の0.73であった。DA/PA比はPGE₂投与60分および90分後で無処置群と比較して有意に大きかった。

第3節 考 察

実験結果から、インドメタシンを妊娠18、19および20日の母体ラットに投与した後、帝王切開して得た新生子に4 μ gのPGE₂を投与すると、PGE₂による動脈管の再開存は母体ラットに投与したインドメタシンの投与量に依存して著しく増強されることが示された。すなわち、動脈管の再開存の最大値については、無処置の母体ラットから得た新生子ではPGE₂投与15分から30分後にDA/PA比は約0.7のピークを示したのに対して、インドメタシン3mgを母体ラットに投与した新生子では、PGE₂投与15分から30分後にDA/PA比は約1.0となった。再開存の持続時間はさらに顕著であり、対照群では180分後のDA/PA比は0、つまり、動脈管は再び収縮しているのに対し、インドメタシン投与群ではDA/PA比は約0.7であり、再開存の持続時間が延長していた。これらの結果が、酸素の豊富な外気に曝された新生子で得られたことを考慮すると、PGE₂の拡張作用が持続しているためと考えられる。

外因性のPGE₂に対しては投与15分から30分後に最大効果があり、60分後にはその効果はわずかになり、120分後には効果がなくなると報告されている

(Momma et al., 1980)。この報告と併せて考えると、外因性のPGE₂が投与180分後においても新生子の動脈管に強い再開存作用を持続させていることは、

PGE₂の代謝機構に異常が生じたことを示唆している。正常新生児では、肺循環の確立によって血中PGE₂が肺を通過すると、15-ヒドロキシ-プロスタグランジンデヒドロゲナーゼ (PGDH) によって約90%が不活化される (Piper et al., 1970) ので、このPGDHの酵素活性に異常が生じている可能性がある。

母体ラットに過剰のインドメタシンを投与すると、生まれた新生子は発育遅延のため体重が低いとの報告があり (Tsuruta and Mori, 1985)、本実験結果と一致する。この低体重により投与したPGE₂がより強い拡張作用を示したのではないかとも考えられる。しかし、この考えは第1章の結果から否定される。第1章において示したように、PGE₂の再開存は10 μg投与でも4 μg投与と同様であり、再開存の最大値も持続時間も変化しなかった (Takizawa et al., 1995)。このことから、本実験で示されたインドメタシンの作用は単純に発育遅延、低体重によるものではなく、別のメカニズムによるものと推測される。また、母体へのインドメタシン投与により新生子動脈管に形態学的・機能的な変化が生じ、その結果PGE₂に対する感受性が変化したことも推測されるが、この点についてはさらに検討が必要である。

実験結果からアスピリンおよびイブプロフェンを妊娠18、19および20日の母体ラットに投与すると、PGE₂による新生子動脈管の再開存は増強された。この結果はインドメタシンの場合と同様であったので、PGE₂による動脈管の再開存を増強させる働きは酸性のシクロオキシゲナーゼ阻害剤に共通する可能性がある。したがって、これらの薬剤は肺のPGDHによるPGE₂の代謝分解に異常を生じさせ、その結果PGE₂の拡張作用が延長した可能性が示唆される。

本実験に使用した低用量であるイブプロフェン10mgおよびアスピリン100 mgは、妊娠満期の母体ラットに投与すると胎子に約半分程度の動脈管の収縮を引き起こす用量である (Momma and Takao, 1987)。

本章の実験結果から、三種類の酸性抗炎症剤のPGE₂投与後の動脈管再開存

に及ぼす増強作用を比較すると、インドメタシン1mg群とイブプロフェン30mg群では、DA/PA比の最大値がそれぞれ0.72と0.73であり、持続時間も投与90分後でそれぞれ0.61と0.64、180分後では0.23と0.17とほぼ同様の推移を示した。一方、アスピリン100mg群はこの両者より弱い増強作用を示したのみであった。これらの値をヒト常用臨床量と比較すると、インドメタシンでは2から2.5倍、イブプロフェンでは3倍、アスピリンでは12倍であった。以上のことから常用臨床量を考慮してこれら三剤の増強作用の強弱を比較すると、インドメタシンとイブプロフェンはほぼ同等であり、アスピリンはこの両者より弱いと考えられる。

第4節 小 括

妊娠末期の母体ラットにインドメタシン、アスピリン、イブプロフェンを投与することにより、PGE₂により動脈管の再開存が修飾されるか否かを検討した。

インドメタシン1 mgまたは3 mgを妊娠18日から3日間母体ラットに経口投与し、妊娠21日に帝王切開して3時間あるいは6時間後の新生子の背部皮下に4 μgのPGE₂を投与し、その後経時的に新生子のDA/PA比を求めた。対照群には無処置の母体ラットから得た新生子に同様な処置を施し、DA/PA比を求めた。

対照群では帝王切開3時間後にPGE₂を投与すると、DA/PA比は、投与30分後に0.6の最大値を示し、徐々に低下して180分後には0になった。一方、インドメタシン1 mg群では、帝王切開3時間後にPGE₂を投与すると、DA/PA比は投与15分から90分後にかけて対照群よりも有意に増加し、動脈管の再開存が増強していた。インドメタシン3 mg群では、この再開存の増強は投与15分から180分後まで認められ、投与180分後においてもDA/PA比は0.7を示し、胎子

動脈管内径の70%を維持していた。また、インドメタシン投与による再開存の増強は用量依存的に認められた。帝王切開6時間後ではDA/PA比は帝王切開3時間後と比べていずれの群においても低値であったが、同じ傾向が認められた。インドメタシン3 mg群の新生子の体重は、対照群と比べて有意に減少していたが、1 mg群では差異は認められなかった。

アスピリン100mg群とイブプロフェン10mg群では、PGE₂による動脈管の再開存は対照群と同様であった。一方、アスピリン300 mg群とイブプロフェン30 mg群では、投与15分から90分後にかけて動脈管の再開存の増強が認められたが、インドメタシン3mg群と比較すると、いずれも軽度であった。

以上の結果から、1) 妊娠末期の母体ラットに前もってインドメタシン、アスピリンおよびイブプロフェンを投与すると、PGE₂による動脈管の再開存は薬剤の投与量に依存して著しく増強する。2) 帝王切開3時間後では帝王切開6時間後と比べて、PGE₂による動脈管の再開存は強く認められることが明らかとなった。この現象は酸性の非ステロイド性抗炎症剤に共通すると考えられた。

第3章 動脈管の再開存に及ぼすアンギオテンシン変換酵素

阻害剤の影響

エナラプリルは、降圧剤の中でも比較的新しい種類に属するアンギオテンシン変換酵素阻害剤の一つである。エナラプリルは従来から用いられている他の降圧剤と比べ、交感神経作用を維持したまま、脳、心臓、腎臓への血流量を増加させ、降圧作用をもたらすという理由からヒト妊婦によく使用されている (Johnston, 1984 ; Lund-Johansen, 1984)。

最近、妊娠中期から後期にエナラプリルを服用した妊婦から羊水減少症、胎児の発育遅延、頭蓋欠損、腎不全、新生児の動脈管開存症そして死亡例等が報告されている (Kreft-Jais et al., 1988 ; Pryde et al., 1993)。こうした疾病等をPrydeら (1993) は、“アンギオテンシン変換酵素 inhibitor fetopathy” と命名した。

エナラプリルと動脈管開存症との関連については、エナラプリルを帝王切開前に投与すると、新生子ラット動脈管の収縮が遅れ (Takizawa et al., 1994a)、また、新生子ラットにエナラプリルを直接投与すると、動脈管の収縮を抑制し、さらに、一度収縮した動脈管では再開存することも報告されている (Takizawa et al., 1994b)。しかし、エナラプリルと動脈管開存症との関連は未だ明白ではない。

周生期の動脈管は、拡張性に働くプロスタグランジンと収縮性に働く酸素分圧のバランスによって維持されている (Clyman, 1987)。また、第1章で示したように、新生子ラットにおいて、一度収縮した動脈管がPGE₂により再開存することが報告されている (Takizawa et al., 1995)。これらのことから、妊娠後期にエナラプリルを連続投与した結果、PGE₂による動脈管の拡張作用が増強され、それが、エナラプリルを服用した際の動脈管開存症の原因の一つ

とも推測される。そこで、本章では、PGE₂による動脈管の再開存作用がエナラプリルの母体への投与により増強されるかどうか検討した。

第1節 材料と方法

1) 供試動物および飼育環境

第1章に記したものと同様である。

2) 投与液の調整方法

マレイン酸エナラプリル (Sigma, St. Louis, USA) を化学天秤 (Mettler, H80) で正確に秤量し、生理食塩水に溶解し、各濃度の投与液を作製した。

PGE₂は第1章と同様に作製した。

3) 実験方法

妊娠14日から20日までの7日間、エナラプリルを投与した母体から得た新生子を用いて、PGE₂による動脈管の再開存を検討した。

エナラプリル0.1、1および10mg/kgを妊娠14日から7日間、午後1時に母体ラットに経口投与した。妊娠21日の午後1時に断頭放血により殺処分した後、帝王切開により新生子を取り出し、37°Cに設定した保温盤上に放置した。帝王切開3時間後に4 μ g/匹のPGE₂をガラス製シリンジを用いて新生子の背部皮下に投与した。投与直後、15、30、60、90および180分後に新生子をサンプリングした。無処置の母体ラットから得た新生子を3時間放置後、投与群と同様に経時的にサンプリングし対照群とした。サンプリングした新生子はドライアイスアセトン溶液で急速全身凍結し、観察まで-20°Cの冷凍庫に保存した。

4) 新生子の体重、動脈管および肺動脈の内径の測定方法

第1章と同様に実施した。

5) 統計学的処理方法

各群の新生子の体重およびDA/PA比の平均値と標準誤差を求めた。各群間で分散分析 (ANOVA) を行ない、群間に差異が認められた時、Bonferroniの方法を用いて多重比較を行なった。P<0.05の場合、統計学的に有意差があると判断した。

第2節 実験結果

結果を図-16と表-5に示した。

エナラプリル1、10mg/kg投与群の新生子の体重は対照群と比べて有意に低下していた (P<0.001)。

無処置の母体から帝王切開して得た3時間後の新生子に4 μ gのPGE₂を投与すると、投与15分から30分後にDA/PA比は0.38から0.43を示した。一方、エナラプリル1、10mg投与群の母体から得た帝王切開3時間後の新生子に4 μ gのPGE₂を投与すると、投与15分から90分後にかけてそれぞれ0.64から0.60、0.72から0.63を示した。DA/PA比の最高値は、エナラプリル1mg投与群ではPGE₂投与30分後の0.71、エナラプリル10mg投与群では投与15分後の0.72であった。両群ともPGE₂投与15分から90分後にかけてDA/PA比は無処置群に比べて有意に高値を示した。

エナラプリル0.1mg投与群から得た新生子のDA/PA比は無処置群と比べ差異は認められなかった。

第3節 考 察

本実験結果から、妊娠14日～20日までの7日間母体ラットにエナラプリル1、10mg/kgを連続経口投与した後、帝王切開により得た新生子に4 μ gのPGE₂を投与すると、PGE₂による動脈管の再開存が増強されることが明らかとなった。

無処置の母体ラットから得た新生子では、PGE₂投与30分後にDA/PA比は0.43のピークを示したのに対して、エナラプリル1、10mg/kgを母体ラットに投与した新生子では、PGE₂投与15分後から90分後にDA/PA比は約0.6～0.7を示した。エナラプリル0.1mg群では無処置の新生子動脈管と同程度であった。PGE₂による再開存が増強されたエナラプリル1、10mg群では再開存の増強はほとんど同程度であることから、1mg以下ですでにPGE₂による再開存作用が最大となっていると考えられた。

アンギオテンシン変換酵素は肺の毛細血管の内皮細胞の表面に存在する酵素(ectoenzyme)であり、アンギオテンシンIをアンギオテンシンIIに変換する。そしてこのアンギオテンシン変換酵素を阻害することによりアンギオテンシンIIの血中濃度が減少し、降圧効果を示す。同時に、キニンーカリクレイン系に作用して、血管拡張性の血中ブラジキニン値を上昇させるが、ブラジキニンは羊胎子においては動脈管に影響を及ぼさないと報告されている(Friedman et al., 1983)。また、アンギオテンシン変換酵素阻害剤は、PGsの産生を促進するという報告があり(Todd and Heel, 1986)、Swartz (1987)はアンギオテンシン変換酵素阻害剤の種類によってはPGsの産生には影響しないと報告している。また、Takizawaら(1995)の報告によると、新生子ラットにおいてPGE₂による動脈管の再開存作用は4 μ g以下の投与量で最大であり、PGE₂の投与量を増加させても再開存作用は増強されない。これらのことから、エナラプリル投与によりPGsの産生が促進されたとしても、これが動脈管開存を引き

起こしたとは考えにくい。

新生子動脈管の収縮はPGE₂と酸素分圧とのバランスにより調整されている (Clyman, 1987)。正常新生子において、血中PGE₂が肺を通過すると15-ヒドロキシ-プロスタグランジンデヒドロゲナーゼ (PGDH) によって約90%が不活化される (Piper et al., 1970)。今回観察された、動脈管のPGE₂による再開存の増強は、エナラプリルの投与によって、新生子の肺のPGDH活性に異常が生じた結果である可能性も示唆されるがさらなる検討が必要である。

第4節 小 括

妊娠後期の母体ラットにアンギオテンシン変換酵素阻害剤エナラプリルを連続投与したとき、PGE₂による動脈管の再開存が修飾されるか否かを検討した。

エナラプリル0.1、1、10mgを妊娠14日から20日の7日間、母体ラットに経口投与し、妊娠21日に帝王切開して3時間後の新生子にPGE₂ 4 μgを皮下投与した。その後経時的に新生子のDA/PA比を求めた。対照群として、無処置の母体ラットから得た新生子に同様な処置を施し、DA/PA比を求めた。

対照群では、PGE₂投与30分後にDA/PA比は0.43の最大値を示し、その後徐々に低下して、180分後には0になった。一方、エナラプリル1mg群では、投与15分から90分後にかけて動脈管の再開存の増強が認められたが、投与180分後には消失していた。エナラプリル10mg群も同様の傾向を示した。エナラプリル0.1mg群のDA/PA比は、対照群と差異は認められなかった。また、いずれの投与量でも再開存の持続時間は延長しなかった。

以上のことから、妊娠後期の母体ラットにエナラプリルを投与するとPGE₂による動脈管の再開存が増強されることが明らかとなった。

第4章 周生期のラットにおける肺の15-ヒドロキシ-プロスタグランジンデヒドロゲナーゼ活性と母体へのインドメタシンおよびエナラプリル投与の影響

周生期における動脈管の開存維持は主としてPGE₂によって行なわれている (Coceani and Olley, 1973 ; Strling and Elliott, 1974 ; Clyman, 1987) 。特に、胎盤および胎子自身が産生する循環性のPGE₂が動脈管自身が産生するものより重要であり、動脈管の開存維持の主役であると言われている (Clyman et al., 1981) 。

胎子の血中のPGE₂は出生後、肺呼吸の開始に伴い肺循環が確立され、多量の血液が肺を通過することにより、肺に多く存在する15-ヒドロキシ-プロスタグランジンデヒドロゲナーゼ (PGDH) によって不活化される。一回の肺循環で血中のPGE₂は90%以上が不活化されるという (Piper et al., 1970) 。このように血中PGE₂は主として肺に存在するPGDHによって調節されている。

PGDHはÄnggårdらによって1966年にブタ肺で発見された。PGEsの15位の水酸基をケト基に変える反応を触媒するNAD依存性の酵素であり、PGEsの代謝の第一段階に関与している (Änggård et al., 1964 ; 1966) 。この酵素は肺以外にも腎臓および脾臓等で高い活性があると報告されている (Änggård et al., 1971) が、肺がPGE₂代謝の主要臓器と考えられている。また、このPGDH活性にはテストステロンなどの雄性ホルモンが関与しているため雄で高値となっている (Gecse et al., 1979) 。

第2章、第3章において示したように、妊娠末期の母体ラットにインドメタシンやエナラプリルを投与すると、PGE₂による動脈管の再開存は著しく増強された (Takizawa et al., 1996) が、これはインドメタシンとエナラプリルに特

有の現象ではなく、酸性の非ステロイド性抗炎症剤とアンギオテンシン変換酵素阻害剤に共通する現象であった (Takizawa et al., 1998)。この原因として母体ラットにインドメタシンやエナラプリルを投与したことによって、PGDHによるPGE₂の代謝に異常が生じたか、あるいは胎子動脈管に形態学的・機能的な変化が生じ、そのため動脈管がPGE₂に対して感受性を増加させたこと等が推測された。

以上のことから、本章では肺におけるPGE₂の代謝分解に注目して、その主要な代謝分解酵素である肺のPGDH活性の経日的変化について検討し、次に、インドメタシンおよびエナラプリルを妊娠末期の母体ラットに投与した時の新生子の肺のPGDH活性に及ぼす影響を検討した。

第1節 材料と方法

1) 供試動物および飼育環境

第1章に記したものと同一である。

2) 実験デザインと肺の採取

2) -1 周生期のPGDH活性の変化

母体ラットを断頭放血により殺処分した後、帝王切開により胎齢20日および21日の胎子を得た。雄の新生子を選び断頭放血後、胸部を開き肺を採取した。採取した肺は母体ごとにプールし、測定まで-20℃の冷凍庫に保存した。生後3時間、6時間の新生子は帝王切開により取り出し、生後12時間、24時間の新生子については自然分娩によって得た後、同様にして肺を採取した。

2) -2 PGDH活性に及ぼすインドメタシンの影響

インドメタシン3mg/kgを妊娠18、19および20日の午後1時に母体ラットに

胃ゾンデを用いて3日間連続経口投与した。妊娠21日の午後1時に母体ラットを断頭放血した後、帝王切開により新生子を取り出し、37°Cに設定した保温盤上に放置した。本実験では雄性新生子のみを使用した。帝王切開3時間後に新生子を断頭放血し、胸部を開き肺を素早く取り出した。採取した肺は母体ごとにプールし、測定まで-20°Cの冷凍庫に保存した。また、対照群として無処置の母体ラットから得た新生子肺を同様に採取した。

2) -3 PGDH活性に及ぼすエナラプリルの影響

妊娠14日から20日までの7日間エナラプリル10mg/kgを母体ラットに経口投与した。妊娠21日の午後1時に母体ラットを断頭放血により殺処分した後、帝王切開により新生子を取り出し、帝王切開3時間後に上記の2) -2と同様に肺を採取した。対照群として、無処置の母体ラットから得た雄の新生子肺を同様に採取した。

3) 試薬等の調製

インドメタシン（和光純薬）30mgを化学天秤（Mettler, H80）で正確に秤量し、生理食塩水100mlに懸濁し、3mg/10mlのインドメタシン懸濁液とした。

エナラプリル（Sigma）を化学天秤で正確に秤量し、生理食塩水に溶解し、各濃度の投与液を作製した。

PGDH抽出液としてEDTA（Sigma）29.2mgと β -mercaptoethanol（Sigma）56 μ lを0.1Mリン酸緩衝液（PH=7.4）に溶解させ100mlとした。

補酵素としてNAD（Sigma）165.9mgを0.1M重炭酸ナトリウム（PH 9.5）緩衝液に溶解し50mlとした。

15-keto-PGE₂（フナコシ，東京）バイアル1mgを10mlの無水アルコール（和光純薬）に溶解（100 μ g/ml）し、標準曲線用原液とした。

ローリー法の標準曲線用原液として、ウシ血清アルブミン (Sigma) 10mg を50mlの蒸留水に溶解し200 μ g/mlとした。また、健康なヒト血液 (ボランティア: Y. I.) から血清を得て同時再現性検討用のタンパク原液とした。

4) PGDHの抽出法

冷凍庫に保存した新生子肺にEDTA 1mM, β -mercaptoethanol 8mMを含む冷0.1Mリン酸緩衝液 (PH=7.4) を加えて可視的に赤血球を取り除き、同量の上記リン酸緩衝液を加えて氷冷下でテフロン製のホモジナイザーを用いてホモジナイズした。これを、遠心機 (サクマ、50A-8) を用いて冷却遠心分離 (10,000g, 40分, 4°C) し、上清を得て、PGDHの測定に供した。

5) 15-keto-PGE₂の標準曲線

15-keto-PGE₂を1, 5および10 μ g含む0.1M リン酸緩衝液 (PH=7.4) 0.5mlに、0.5N NaOH2mlを加え3分間室温で反応させた。

反応液は分光光度計 (島津、UV-2200) を用いて、500nmにおける最大吸光度を測定した。吸光度は15-keto-PGE₂の増加にともない直線的に増加した (図-17)。

6) 同時再現性と日差再現性の検討

高濃度 (10 μ g/ml) と中濃度 (5 μ g/ml) の15-keto-PGE₂を用いて、5) で求めた標準曲線により、同時再現性 (n=20) と日差再現性 (n=5) を検討し以下の結果を得た。

6) -1 同時再現性

高濃度 平均値=10.0 μ g/ml 標準偏差=1.0

変動係数 (標準偏差 / 平均値 \times 100) =10.0%

中濃度 平均値=4.4 μ g/ml 標準偏差=0.3

変動係数 (標準偏差 / 平均値 \times 100) =6.8%

6) -2 日差再現性

高濃度 平均値=9.0 μ g/ml 標準偏差=0.5

変動係数 (標準偏差 / 平均値 \times 100) =5.8%

中濃度 平均値=4.7 μ g/ml 標準偏差=0.4

変動係数 (標準偏差 / 平均値 \times 100) =8.2%

7) PGDH活性測定法

4) で述べた肺の上清0.1mlを37 $^{\circ}$ Cで10分間加温した後、37 $^{\circ}$ Cで2分間加温したPGE₂10 μ gと、NAD 5mMを含む0.1M重炭酸ナトリウム緩衝液 (PH 9.5) 0.9mlに加え、37 $^{\circ}$ Cで50分間反応させた。その後、反応液を冷却して反応を停止し、反応液0.5mlに0.5N NaOH 2mlを加えて3分間発色させた。発色液は分光光度計を用いて、500nmにおける最大吸光度を測定し、5) において作成した検量線により産生された15-keto-PGE₂ の濃度を求めた。母体ごとにプールしたサンプルについて3回測定して平均値を求めた。PGDH活性は、9) で後述する上清のタンパク濃度で補正し、p mol/min/mg protein で表した。

8) タンパクの標準曲線

ウシ血清アルブミン40、120および200 μ g/mlを含む溶液を作製し、おのおの3回上記タンパク定量法によって測定して検量線を作成し、直線性を求めた。吸光度はウシ血清アルブミンの増加にともない直線的に増加した (図-18)。

8) -1 同時再現性の検討

ヒト血清（推定値：約7.4g/dl）を500倍および1000倍に希釈して、8）で求めた検量線を用いて同時再現性（n=5）を検討し、以下の結果を得た。

500倍希釈 平均値=164.1 $\mu\text{g/ml}$ 標準偏差=1.6
変動係数（標準偏差 / 平均値 $\times 100$ ）=1.0%

1000倍希釈 平均値=84.9 $\mu\text{g/ml}$ 標準偏差=4.0
変動係数（標準偏差 / 平均値 $\times 100$ ）=4.7%

9) ローリー法によるタンパク定量

7) において測定した15-keto-PGE₂をタンパク1mg 当たりの産生量に補正するため、ローリー法（Lowry et al., 1951 ; 菅原と副島, 1986）により肺上清のタンパク定量を行なった。

2%Na₂CO₃（0.1 N NaOH水溶液）50ml と0.5%CuSO₄ · 5H₂O（1%酒石酸カリウム水溶液）1mlを混合してアルカリ性銅試薬とした。また、フェノール試薬（和光純薬）を蒸留水で2倍希釈して用いた。

肺上清を蒸留水で100倍希釈し、その1mlを小試験管に取り、アルカリ性銅試薬を5ml加えた。これをタッチミキサー（Yamato）を用いて素早く攪拌し10分間放置し、フェノール試薬0.5mlを加えて同様に素早く攪拌し30分間放置した。その後、分光光度計で500nmにおける最大吸光度を測定した。8）において作成した検量線からタンパク濃度を求め希釈倍数で補正した。母体ごとにプールしたサンプルについてそれぞれ2回測定し平均値を求めた。

10) 統計学的処理方法

各群の平均値と標準誤差を求め、PGDH活性の経日的変化については、前日の測定値との間で、Studentのt-testを行った。

インドメタシンとエナラプリル投与の実験については、それぞれ対照群との間でStudentのt-testを行なった。P<0.05の場合、統計学的に有意差があると判断した。

第2節 実験結果

2-1 周生期の肺のPGDH活性の変化

結果を図-19と表-6に示した。

胎齢20日の肺のPGDH活性は、 22.4 ± 1.8 p mol/min/mg proteinであり、その後徐々に増加し、胎齢21日では 23.4 ± 1.6 p mol/min/mg proteinとなった。生後3時間の新生子では 27.8 ± 1.0 p mol/min/mg proteinとなった。生後6時間のPGDH活性は、 15.7 ± 2.4 p mol/min/mg proteinとなり急激に減少した。その後、生後12時間には、生後3時間と同程度にまで回復した。一過性に低下の認められた生後6時間の新生子のPGDH活性は、その前の生後3時間の新生子と比べて有意に低値であった。

2-2 PGDH活性に及ぼすインドメタシンの影響

結果を図-20と表-7に示した。

新生子の肺PGDH活性はインドメタシン投与群では 19.6 ± 1.1 p mol/min/mg proteinであり、無処置群の 27.9 ± 2.5 p mol/min/mg proteinと比べて有意に低下していた。

2-3 PGDH活性に及ぼすエナラプリルの影響

結果を図-21と表-8に示した。

エナラプリル10mgを連続投与した母体ラットから得た新生子の肺のPGDH活性は、 30.9 ± 3.1 p mol/min/mg proteinであり、無処置群の母体より得た新

生子の肺のPGDH活性は 27.2 ± 1.4 p mol/min/mg proteinであり、両群間に有意な差は認められなかった。

第3節 考 察

3-1 周生期の肺のPGDH活性

実験結果から、ラットの肺のPGDH活性は、胎齢20日から生後3時間までは徐々に増加し、生後6時間では急激に減少するが、その後、生後12時間ではまた回復する事が明らかとなった。これは、ウサギの肺のPGDH活性が、出生前後に著明に低下する報告と一致する (Printz et al., 1983)。生後3時間まで観察されたPGDH活性の上昇は、動脈管の収縮閉鎖がほぼ生後3時間までに起こるといふ報告 (Takizawa et al., 1992) や、生後、血中PGE₂が急激に減少するといふ報告 (Strasser and Vogel, 1989) と関連しているのかもしれないが、詳細は不明である。また、ヒツジの妊娠末期に胎子コルチゾルが急増し、胎子の肺機能が成熟する (Liggins, 1968) ことから、肺の成熟とともにPGDH活性も増加したものと考えられる。また、TsaiとBrown (1987) の報告によると、合成副腎皮質ホルモンであるデキサメサゾンをも母体ラットに投与すると、新生子の肺のPGDH活性が増加するといふ報告もこの考えを支持するものである。一度収縮した新生子の動脈管において、PGE₂による再開存は生後6時間では生後3時間と比較して有意に減少する (Takizawa et al., 1995) ことから、動脈管のPGE₂に対する感受性が低下していると推測される。そのとき、肺のPGDH活性が減少することを示した本実験結果は非常に興味深い、これらの関連は不明であり、検討が必要である。

3-2 インドメタシンの影響

実験結果より妊娠末期の母体にインドメタシンを投与した後の新生子の肺の

PGDH活性は、無処置群に比べて有意に低下していた。このことから、第2章で示したインドメタシンを母体ラットに投与すると、新生子の動脈管の収縮が遅れること、さらに、PGE₂の投与により起こる動脈管の再開存が著しく増強されることは、新生子肺のPGDH活性の低下によりPGE₂代謝の遅延が生じたためである可能性が示唆された。さらに、PGDHは肺に多く存在し、一回の肺循環で血中のPGE₂は90%が不活化されるという報告 (Piper et al., 1970) も上記の仮説を支持すると考えられる。

インドメタシンや蛋白合成阻害作用を持つピューロマイシンは妊娠後期に投与すると、ラット胎盤のPGDH活性を低下させることが報告されている (Tsuruta and Mori, 1985) が、胎盤循環から肺循環に切り変わった後の新生子において、PGs代謝分解の主要器官である肺のPGDH活性が母体へのインドメタシン投与により低下することは知られていなかった。

合成副腎皮質ホルモンの一つであるデキサメサゾンやベータメサゾンを妊娠後期に服用した場合、新生児の動脈管開存症の発現頻度が低いことが知られており (Clyman et al., 1981)、その原因としてデキサメサゾンが肺のPGDH活性を増加させることが関与していると報告されている (Tsai and Brown, 1987)。また、ベータメサゾンはインドメタシンにより成熟を抑制された動脈管において、成熟促進作用を有するという (Konishi, 1986)。

インドメタシンもベータメサゾンも母体投与により胎子の動脈管を同様に収縮させるが、前者は動脈管の成熟抑制を起こし、後者は動脈管の成熟を促進する。これらの類似点と相異点についての明確な説明はなかった。母体へのインドメタシン投与が新生子の肺のPGDH活性を低下させることを本実験結果が示したので、デキサメサゾンがPGDH活性を増加させる (Tsai and Brown, 1987) という報告と併せると、本実験結果は上記の疑問を解く有力な仮説を提供するものと考えられる。つまり、動脈管開存症の成因のひとつとして、動脈管の成

熟や感受性の変化などが考えられてきたが、さらに、拡張性に働くPGE₂の主要な代謝分解酵素である肺のPGDH活性の抑制的变化が原因の一つである可能性が示唆される。しかしながら動脈管開存症には種々の要因が関与していると予想され、動脈管の収縮の遅れや再開存の増強の原因は肺におけるPGDH活性の低下以外に、インドメタシンを母体に投与した結果、胎子動脈管に形態学的・機能的変化が生じ、そのため動脈管がPGE₂に対して感受性を高めたこと等も考えられる。この点についてはさらに検討が必要である。

3-3 エナラプリルの影響

第3章に記したように、エナラプリルを母体ラットに連続投与すると、PGE₂の投与により生じる動脈管の再開存が増強された。その原因はエナラプリル連続投与により、肺組織中に存在するPGE₂を不活化する酵素のPGDH活性が低下し、そしてPGE₂代謝が遅延したためと推測された。しかし、本章で示したようにPGDH活性には何ら影響を及ぼさなかった。

インドメタシンを妊娠末期の母体ラットに投与した後、PGE₂による新生子動脈管の再開存を検討した第2章の結果によると、動脈管の再開存のピークを増加させ、持続時間も延長させていた。そのとき、本章で示したように肺のPGDH活性は対照群の約3分の2に低下していた (Takizawa et al., 1996)。エナラプリルの投与によりPGE₂による動脈管の再開存は増強されたが、再開存作用の持続時間の延長は観察されず、肺のPGDH活性も変化しなかった。これらのことから、肺のPGDH活性の低下と関連するのは、持続時間も延長するときであると考えられるが、さらに検討が必要である。

本章の結果から、妊娠後期の母体ラットにエナラプリルを連続投与した後に生じるPGE₂による動脈管の再開存の増強は、PGDH活性の低下によるものではないことが明らかとなった。エナラプリル投与により動脈管のPGE₂に対す

る感受性が変化したこと等も考えられるが、さらに検討が必要である。

第4節 小 括

第2章、第3章において母体ラットにインドメタシンあるいはエナラプリルを投与して得た新生子では、動脈管が収縮閉鎖した以降にPGE₂を投与すると動脈管の再開存は著しく増強された。これは胎生期に母体経由でインドメタシンやエナラプリルを投与されたことにより、肺のPGDHによるPGE₂の代謝分解に異常が生じたか、あるいは動脈管そのものに形態学的・機能的変化が生じたことが推測された。

これらのことから、本章では新生子のPGDH活性に注目し、まず、周生期における肺のPGDH活性を経時的に測定した。次いで、妊娠末期の母体ラットへのインドメタシンあるいはエナラプリルの投与が肺のPGDH活性に及ぼす影響を検討した。

周生期における肺のPGDH活性は、胎齢20日から生後3時間まで徐々に増加した。生後6時間ではPGDH活性は一過性に有意に減少したが、その後、生後12時間には、生後3時間と同程度にまで回復した。

インドメタシン3mgを妊娠18日から3日間母体ラットに経口投与し、妊娠21日に帝王切開して新生子を取り出し、3時間後に新生子肺を採取し肺組織中のPGDH活性を測定した。

その結果、肺のPGDH活性はインドメタシン投与群では 19.6 ± 1.1 ($p \text{ mol /min/mg protein}$) であり、無処置群の 27.9 ± 2.5 ($p \text{ mol /min/mg protein}$) と比べて有意に低下していた。

エナラプリル10mgを妊娠14日から20日まで7日間母体ラットに経口投与し、妊娠21日に帝王切開して得た生後3時間の新生子の肺のPGDH活性は、無処置の新生子の肺のPGDH活性と差は認められなかった。

以上のことから、1) 周生期の肺のPGDH活性は、胎齡20日から生後3時間までは徐々に増加し、生後6時間では急激に減少するが、その後、生後12時間ではまた回復する事が明らかとなった。2) 母体ラットにインドメタシンを投与して得た新生子では肺のPGDH活性が低下しており、このためPGE₂の代謝に遅延が生じ、PGE₂による動脈管の再開存が著しく増強されたものと考えられた。3) 母体ラットにエナラプリルを投与しても、新生子の肺のPGDH活性には影響しないことが明らかとなった。

第5章 動脈管の中膜平滑筋細胞の増殖とアポトーシス

およびエナラプリルの影響

第3章では妊娠後期にエナラプリルを母体ラットに連続投与すると、その新生子ではPGE₂に対する反応性が増強し、動脈管の再開存が促進された。この原因はエナラプリルの連続投与によりPGE₂の代謝経路に異常が生じたためであろうと推測し、第4章ではPGE₂代謝の主要酵素である肺のPGDH活性を測定した。しかし、予測に反して妊娠後期の母体ラットへのエナラプリル連続投与は、新生子の肺のPGDH活性には影響を及ぼさないことが示された。

エナラプリルは、血中アンギオテンシンII濃度を減少させることにより降圧効果を示す。アンギオテンシンIIは血管収縮による強力な昇圧作用や副腎のアルドステロン分泌を促進するのみでなく、心筋細胞に対して増殖作用を有し (Khairalla et al., 1972)、血管平滑筋細胞に対しても、増殖および肥大作用を有することが報告されている (Owens, 1989)。また、アンギオテンシンIIは、培養下において血管平滑筋によるコラーゲンやフィブロネクチンの産生を促進し、プロトオンコジーンである*c-fos*, *c-myc*, *c-jun* などの発現も促進するという (Itoh et al., 1991 ; Naftilan et al., 1989 ; Powell et al., 1990)。

近年、レニン-アンギオテンシン系が血管壁にも存在し、局所機能の調節に作用することが明らかとなっている (Dzau, 1988)。エナラプリルを含めて、一般的に、血圧降下剤は単回ではなく長期にわたり服用されることから、エナラプリルの妊娠後期の長期服用が動脈管の平滑筋細胞の増殖や成熟過程に影響を与え、その結果、動脈管開存を生じやすくした可能性が考えられる。

以上のことから、本章では胎子動脈管の中膜平滑筋細胞の増殖とアポトーシス (プログラム細胞死) を検討し、さらに平滑筋細胞の動態と肥大に及ぼすエナラプリルの影響を検討することを目的とした。

増殖細胞のマーカーとしてProliferating cell nuclear antigen（以下、PCNA）を用いた。PCNAは全身性エリテマトーデス患者の血中から見いだされ（Miyachi et al., 1978）、細胞周期のS期直前からS期の細胞核内に出現することから、近年、癌病理診断の指標として使用されている。

アポトーシスの検出には、アポトーシスの生化学的指標であるDNAの断片化を検出し、組織標本上で可視化するTUNEL法（terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling method, Gavriel et al., 1992）を用いた。

また、中膜の平滑筋細胞の細胞数と細胞の肥大を検討するために、Yamamotoら（1986）の報告を参考にし、組織のスライド標本を用いて単位面積あたりの細胞核数を算出し、細胞数と細胞肥大の指標とした。

本章では、これらの方法を用いて、周生期の動脈管の中膜平滑筋細胞の動態について明らかにし、妊娠後期のエナラプリル投与が、動脈管の細胞動態に及ぼす影響を検討した。

第1節 材料と方法

1) 供試動物および飼育環境

第1章に記したものと同一である。

2) 投与液の作成

第1章と同様に行った。

3) 実験方法

3) -1 PCNA標識率とエナラプリルの影響

胎齢18、19、20、21日および生後1、3日の胎子および新生子の動脈管と大

動脈の中膜平滑筋のPCNA標識率を経日的に観察した。

胎齢18日から21日においては、母体ラットを帝王切開後胎子を採取し、直ちに胎子胸部を100%メタノールで24時間固定した。帝王切開は午前9時前後に実施した。新生子ラットは、出産時刻を確認した後、出産終了からそれぞれ24時間、72時間後に同様にサンプリングした。

エナラプリル投与の影響は胎齢19日および20日の胎子の動脈管および大動脈の中膜平滑筋細胞において検討した。

妊娠12日あるいは13日から7日間母体にエナラプリル10mg/kgを経口投与し、それぞれ妊娠19日、20日に帝王切開して胎子を取り出し、同様にサンプリングした。

3) -2 周生期のアポトーシスとエナラプリルの影響

エナラプリル10mg/kgを妊娠14日から20日まで7日間母体ラットに経口投与した、自然分娩により得た生後1、3、5日の新生子をサンプリングした。無処置の母体ラットから得た新生子を対照群とした。サンプリングした新生子は開胸し、4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて4°Cで24時間固定した。

4) 組織標本の作製法

サンプリングした組織片は、常法に従い、アルコール脱水、キシレンによる脱アルコール後、パラプラスチック (Sherwood) 包埋を行ない、ミノー式ミクロトームを用いて、厚さ5 μ mの連続切片を作製した。薄切した切片は、約30°Cに設定した乾燥器で一晩乾燥させた後、PCNAを検出するため免疫組織化学染色を施した。また、TUNEL法には、薄切した切片を約37°Cに設定した乾燥器で一週間乾燥させた。

5) 組織学的検討

細胞増殖を検討するため、細胞増殖のマーカーとして使用されている Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) に対する抗PCNA抗体 (Dako社、PC10) を用いて、堤の報告 (1991) を参考にしてABC法で免疫組織化学染色を行った。また、アポトーシス (プログラム細胞死) の検出には、アポトーシスの生化学的指標であるDNAの断片化を検出し、組織標本上で可視化する TUNEL法 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling method, Gavriel et al., 1992) を用いた。

6) 試薬等の調整法

① PBS

0.01M リン酸緩衝食塩水PH7.2

NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.33g

NaH₂PO₄ · 12H₂O 2.87g

NaCl 8.5g

DDW 1000ml

② 過酸化水素メタノール溶液

純メタノール100mlに30%過酸化水素水を1ml添加

③ ABCキット

ベクタスティンElite ABCキット

(PK6102, VECTOR LABORATORIES, INC.,)

④ 抗PCNA抗体

DAKO社、PC10、PBSで10倍に希釈し-80℃で保存。

使用時にPBSで最終希釈2000倍にして使用。

⑤ DAB-H₂O₂反応液

0.01Mリン酸緩衝食塩水 (PH 7.2) 20mlにDAB10mg (和光純薬、10mg/錠) を溶解させる。使用直前に30%過酸化水素水13.3 μ lを加える。

⑥ 4%パラホルムアルデヒド溶液

(a) 蒸留水 200ml

パラホルムアルデヒド 8g

・60°C前後に温めた蒸留水にパラホルムアルデヒドを溶かす。

・1N NaOHを数滴滴下するととけやすい。

(b) NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.66g

NaH₂PO₄ · 12H₂O 5.74g

(a) に溶かす。

⑦ Proteinase K (20 μ g/ml)

フナコシ、2mg/ml=25mg/12.5mlになるようにPBSに溶かし、

0.5mlずつ分注し冷凍保存する。使用時はこれを49.5mlのPBSで希釈する。

⑧ TdT buffer

Trizma base (PH7.2) 1.0M (6.05g/50ml) 6ml

(トリス=ヒドロキシメチルメタン)

カコジル酸ナトリウム 0.7M (7.5g/50ml) 40ml

塩化コバルト 1.0M (1.3g/10ml) 200 μ l

1N HClでPH7.2に調節しDWを加えて200mlにする。

-4°C以下で保存。

⑨ TdT solution

スライド1枚あたりの量

biotinylated-16-dUTP 0.5 μ l

(ベーリンガー・マーハイム)

TdT (タカラ) 0.5 μ l

TdT buffer 40 μ l

⑩ 2%牛血清アルブミン (BSA)

0.2gのBSAを10.0mlのDWに溶かす

7) PCNA法とTUNEL法の実験手順

7) -1 PCNA法の実験手順

① 脱パラフィン

② 加熱処理による抗原性の賦活化

0.1 M citrate buffer PH6.0 90°C 120分

③ 水洗 5分 DW 5分

④ 過酸化水素加メタノール 30分

⑤ 水洗 5分 DW 5分

⑥ PBS 20分

⑦ 正常ウマ血清 20分

⑧ PBS 5分

⑨ 0.05%アビジン水溶液 20分

⑩ PBS 10分

⑪ 0.001%ビオチン水溶液 20分

⑫ PBS 10分

⑬ 抗PCNAマウスモノクローナル抗体、4°C 1昼夜

- ⑭ PBS 10分
- ⑮ 二次抗体 30分
- ⑯ PBS 10分
- ⑰ ABC複合体 (ABCキット) 30分
- ⑱ PBS 10分
- ⑲ DAB-H₂O₂ 反応 4分
- ⑳ 水洗 5分後、ヘマトキシリンで核染色 (20秒) を施した後、脱水、透徹、封入し、観察する。

7) -2 TUNEL法の実験手順

- ① キシレン 5分、3回
- ② abs 5分、3回 (2回目のabsの後ダコペンで囲み乾燥)
- ③ 100%~70%アルコール 3分
- ④ DDW 3分、室温
- ⑤ PBS 3分、37°C
- ⑥ PBS 3分、37°C
- ⑦ 組織切片の蛋白分解
Proteinase K : 20 μ g/ml 15分、37°C (湿潤箱)
- ⑧ DDW 2分、室温、4回
- ⑨ TdT buffer 10分、室温 (湿潤箱)
- ⑩ TdT solution 70分、37°C (湿潤箱)
- ⑦のあたりに準備する。
- ⑪ PBS (反応停止) 15分、室温
- ⑫ DDW 2分、室温、4回
- ⑬ 2%牛血清アルブミン (BSA) 10分、室温 (湿潤箱)

- ⑭ DDW 10分
- ⑮ PBS 10分
- ⑯ FITC（フナコシ）で発色 25分、37°C（湿潤箱）
※6 μ lのFITCにヘベス1mlの割合
- ⑰ PBS 10分、3回
- ⑱ VECTA SHIELDで封入
- ⑲ 蛍光顕微鏡で観察

8) PCNA標識率の算出

光学顕微鏡を用いて各個体ごとに、1000個以上の動脈管中膜の平滑筋細胞を観察し（総観察細胞数：T）、そのうちのPCNA陽性細胞（P）を数えた。 $100 \times (P/T)$ を求め、PCNA標識率（%）を算出した。大動脈の平滑筋細胞も対照として同様に観察した。

9) 組織スライドを用いた単位面積あたりの細胞核数

光学顕微鏡の接眼レンズに挿入したミラー氏板を用い、免疫組織化学染色を施した組織スライド標本上で一定面積（ $3.75 \times 10^{-3} \text{mm}^2$ ）内の動脈管中膜の平滑筋細胞核数をカウントした。この操作を1個体につき40ヶ所実施し（合計面積 $1.5 \times 10^{-1} \text{mm}^2$ ）、40ヶ所の細胞核数の合計をもってその個体の単位面積（ $1.5 \times 10^{-1} \text{mm}^2$ ）あたりの平滑筋細胞核数とした。なお、参考として大動脈についても算出した。

10) 統計学的処理方法

得られた数値から平均値、標準誤差を求め、PCNA標識率については、角度変換を行った。Studentのt-testを用いて、前日の値との間で、統計処理を実

施し、 $P < 0.05$ の場合、統計学的に有意差があると判断した。また、同日の動脈管と大動脈との間でも統計処理を実施し、 $P < 0.05$ の場合、統計学的に有意差があると判断した。

第2節 実験結果

3-1 体重について

結果を表-9、10に示した。

使用した動物は各胎齢の代表的な胎子、新生子であった（表-9）。エナラブル10mg/kg投与により胎子体重に変化は認められなかった（表-10）。

3-2 PCNA標識率の経日的変化について

結果を図-22と表-9に示した。

動脈管のPCNA標識率は胎齢18日から高値を示し、胎齢19日では $75.4 \pm 4.77\%$ （平均 \pm S.E.）とピークを示した。しかし、胎齢20日には $19.4 \pm 3.55\%$ と急激に減少し、胎齢19日の動脈管と比較して、統計学的に有意な差が認められた。その後は徐々に減少していき、生後のPCNA標識率は $13.4 \pm 5.26\%$ から $7.4 \pm 1.81\%$ であり、胎生期に比べると低値であった。

大動脈のPCNA標識率は、動脈管と同様に胎齢19日では $73.4 \pm 4.39\%$ とピークを示したが、胎齢20日では $22.3 \pm 4.39\%$ と急激に減少し、胎齢19日の大動脈と比較して統計学的有意差が認められた。胎齢21日ではPCNA標識率は $15.9 \pm 4.06\%$ であり、生後1日では $15.2 \pm 3.70\%$ と変化はみられなかった。しかし、生後3日のPCNA標識率は $29.3 \pm 6.93\%$ と著しく増加し、生後1日と比較して有意差が認められた。

動脈管と大動脈を比較すると、胎齢18日から生後1日までのPCNA標識率は同様に推移した。しかし、生後3日においては動脈管では $7.4 \pm 1.81\%$ と低値

であったのに対し、大動脈では $29.3 \pm 6.93\%$ を示し、動脈管と比べて有意に高値であった。

3-3 エナラプリルのPCNA標識率への影響

結果を図-23と表-10に示した。

動脈管のPCNA標識率は、胎齢19日の対照群では $75.4 \pm 4.77\%$ であったのに対し、エナラプリル10mg投与群では、 $43.6 \pm 4.27\%$ と著しく少なく、統計学的な有意差が認められた。

一方、胎齢20日の、対照群では $19.4 \pm 3.55\%$ であり、エナラプリル10mg投与群では $30.9 \pm 2.23\%$ であったが、有意差は認められなかった。

大動脈のPCNA標識率は胎齢19日の対照群では $73.4 \pm 4.39\%$ であり、投与群では $52.2 \pm 2.75\%$ と動脈管と同様に投与群で低値を示した。一方、胎齢20日の大動脈のPCNA標識率は対照群の $22.3 \pm 4.39\%$ に対して、投与群では $31.2 \pm 2.11\%$ であったが、有意差は認められなかった。

対照群の動脈管と大動脈は、ほぼ同等のPCNA標識率を示したが、エナラプリル投与によるPCNA標識率の低下は大動脈よりも動脈管で顕著であった。

3-4 単位面積当たりの細胞核数について

結果を図-24と表-10に示した。

動脈管の単位面積あたりの平滑筋細胞核数は胎齢19日の対照群では 960 ± 20.5 (個/単位面積： $1.5 \times 10^{-1} \text{mm}^2$) であり、投与群では、 865 ± 21.2 となり、単位面積あたりの細胞核数は減少し、統計学的に有意な差が認められた ($P < 0.001$)。

一方、胎齢20日の細胞核数は対照群では 917 ± 29.8 であり、投与群では 858 ± 13.3 であり有意差は認められなかった。

大動脈の単位面積あたりの平滑筋細胞核数は、胎齢19日の対照群では892±23.8、投与群では933±20.6であり、有意差は認められなかった。胎齢20日の細胞核数は、対照群では880±22.9、投与群では865±16.9であり、有意差は認められなかった。

3-5 組織学的観察について

動脈管の横断像を図-25および図-26に示した。

図-25に示すように動脈管と大動脈は隣接している。動脈管壁（図-26）を観察すると、内腔側から内皮細胞が認められ、中膜には輪走する豊富な平滑筋細胞が認められる。また、平滑筋細胞間には波状に線維が存在し、その外側に外膜が存在する。

3-5-1 動脈管のPCNA陽性細胞の変動とエナラプリルの影響

免疫組織染色を施した胎齢21日の無処置群の動脈管を図-26に示した。核が褐色に染まっている細胞がPCNA陽性細胞である。中膜のほとんどの平滑筋細胞が、PCNA陽性であった。妊娠後期の動脈管平滑筋細胞は盛んにDNA合成を行い、増殖していると考えられる。胎齢19日の動脈管（図-27）では、約8割の中膜の平滑筋細胞がPCNA陽性であった。大動脈（図-28）も動脈管と同様に約8割の細胞がPCNA陽性であった。胎齢20日の動脈管（図-29）と大動脈（図-30）では、中膜PCNA陽性細胞は前日と比べて著しく減少していた。動脈管と大動脈を比較してもPCNA陽性細胞は同程度であった。胎齢21日の動脈管と大動脈は胎齢20日と同様であった。生後1日の動脈管（図-31）はすでに収縮し、内腔は閉鎖している。このときの動脈管のPCNA陽性細胞は全体の約1割であり、大動脈（図-32）は大きく拡張したままであるが、PCNA陽性細胞の比率については動脈管と同程度であった。生後3日の動脈管（図-33）

のPCNA陽性細胞は、生後1日（図-31）と比較して変化は認められなかった。しかし、生後3日の大動脈（図-34）では、PCNA陽性細胞は生後1日の大動脈（図-32）と比べて増加しており、さらに生後3日の動脈管と比べても顕著であった。

無処置群の胎齢19日の動脈管を図-35に、エナラプリル投与群の同日の動脈管を図-36に示した。エナラプリル投与群の動脈管（図-36）においては、無処置群（図-35）と比べてPCNA陽性細胞は減少していた。胎齢20日の無処置群の動脈管を図-37に示した。PCNA陽性細胞は全体の約2割であった。一方、エナラプリル投与群（図-38）では、無処置群に比べてPCNA陽性細胞の出現頻度に差は認められなかった。胎齢19日と20日のいずれにおいても、PCNA陽性細胞の出現頻度以外にエナラプリル投与による組織学的な差異は認められなかった。

胎齢19日の無処置群の大動脈を図-39に示した。大動脈においても、ほとんどの平滑筋細胞がPCNA陽性であるのに対し、エナラプリル投与群（図-40）では、PCNA陽性細胞は減少しており、動脈管と同じ傾向が認められた。胎齢20日の大動脈では、無処置群（図-41）と比べ、エナラプリル投与群（図-42）のPCNA陽性細胞の出現頻度に差は認められなかった。動脈管と同様に、各胎齢の対照群と投与群の間にPCNA陽性細胞の出現頻度以外の組織学的な差異は認められなかった。

3-5-2 動脈管のアポトーシスとエナラプリルの影響

無処置ラットでは、胎生期の動脈管にはTUNEL陽性細胞は認められなかった。生後1日（図-43）からTUNEL陽性細胞が出現し、中央部には細胞の集団として、辺縁部では同心円状に散在して認められた。生後3日（図-45）では、生後1日に認められたTUNEL陽性細胞の出現の規則性は消失し、TUNEL陽性

細胞は血管壁全体に散在するようになった。生後5日（図-47）も生後3日（図-45）と同様であった。

エナラプリル投与群においても、胎生期にはTUNEL陽性細胞は対照群と同様に観察されず、生後1日の投与群（図-44）のTUNEL陽性細胞の出現パターンも対照群（図-43）と同様であったが、中央部のTUNEL陽性細胞の集団は対照群と比べてやや少数であった。生後3日の投与群（図-46）においては、生後3日の対照群（図-45）では消失していたTUNEL陽性細胞の出現パターンの規則性は残存しており、中央部に集団として、辺縁部に同心円状に散在して認められた。特に、中央部のTUNEL陽性細胞の集団は対照群と比べて著しく増加していた。生後5日の投与群（図-48）では、生後5日の対照群（図-47）と同様であった。

第3節 考 察

本実験結果から、動脈管の中膜の平滑筋細胞のPCNA標識率は、胎齢18日には約60%であり、胎齢19日には約75%とピークを示し、胎齢20日には約20%と急激に減少することが明らかとなった。その後は徐々に減少し、生後3日には約7%と胎生期に比べると低値であることが示された。また、大動脈のPCNA標識率は胎齢18日から生後1日まで動脈管と同様に推移するが、生後1日の約15%から生後3日には約30%と約2倍に増加することが明らかとなった。胎齢19日までのPCNA標識率の増加は、動脈管内径の増大している時期

（Takizawa et al., 1992）であり、動脈管壁を構成している細胞の増殖を盛んにすることによって、内径も増大しているものと推測される。胎齢20日には、PCNA標識率は急激に減少し、その後も徐々に減少することから、胎齢20日までに動脈管の細胞の増殖はほぼ終了し、その後分化と成熟が進行するものと考えられる。シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドメタシンを妊娠満期の

母体ラットに投与すると、血中のPGsが低下し、胎子の動脈管は収縮する

(Sharpe et al., 1975 ; Momma and Takeuchi, 1983) 。このインドメタシンに対する動脈管の感受性は、ラットでは妊娠時期により異なり (Arishima et al., 1991) 、胎齢19日の午前中には出現せず、同日の夕方から現われる。本章の結果からも、胎齢19日の午前にはPCNA標識率は高値を示すものの翌20日には減少していることは、この前後に動脈管中膜の量的な拡大が終了し、その後分化と成熟が進行することを示唆し、その前後からインドメタシンに対しても反応性を示すものと考えられる。大動脈が、動脈管と生後1日まで同じ傾向を示すのはたいへん興味深い。その後、生後3日の大動脈のPCNA標識率の増加は生後の成長に伴う血流量の増加と血圧上昇を反映したものと考えられる。

エナラプリル10mg/kgを連続投与すると、動脈管のPCNA標識率は対照群と比較して有意に低下した。大動脈についても同様に低下したが、エナラプリル投与によりPCNA標識率が低下した割合は動脈管でより顕著であった。大動脈内皮をバルーンで傷害させると、新生内膜と中膜の平滑筋細胞のDNA合成は増加するが、このとき、アンギオテンシンIIを加えるとDNA合成はさらに増大するという (Daemen et al., 1991) 。逆に、アンギオテンシン変換酵素阻害剤を投与することにより、平滑筋細胞の増殖は抑制される (Powell et al., 1989) 。また、アンギオテンシンIIによる細胞の増殖は、プロトオンコジーンの*c-myc*, *c-fos*の発現を介している可能性がある (Powell et al., 1990) という。これらのことから、胎齢12日から18日までエナラプリルを投与すると、同様なメカニズムにより平滑筋細胞の増殖を抑制し、PCNA標識率を低下させたと考えられる。一方、胎齢20日では、胎齢19日にエナラプリル投与群で認められたPCNA標識率の低下は、動脈管と大動脈においてともに消失していたので、少なくとも胎齢の時期により、感受性が異なることは明らかである。

エナラプリル投与群の胎齢19日の動脈管では、単位面積当たりの細胞核数

は、対照群と比較して減少していた。これは、エナラプリル投与により細胞増殖が抑制されたことを反映した結果と考えられる。また、単位面積当たりの細胞核数が減少したことから細胞が肥大している可能性も示唆されるが、血管の平滑筋は収縮や弛緩が認められるので、単位面積当たりの細胞核数から肥大の程度を論じるのは難しいと考えられ、さらに検討する必要がある。

エナラプリル投与により、動脈管の平滑筋に生じるアポトーシスが対照群と比べて生後1日ではやや軽度となり、生後3日において著しく増強されていることが示された。その結果、無処置の新生子ラットでは、生後3日にはすでに動脈管の萎縮は次の段階に進んでいるのに対して、エナラプリル投与群では、生後5日になってから、この段階に進んでいた。

アンギオテンシンIIのリセプターはAT1とAT2の2種類のサブタイプが存在することが知られている。AT1リセプターは血管の緊張、ホルモンの分泌、組織の成長や神経系の働きに作用していることが報告されている (Sasaki et al., 1991)。一方、AT2リセプターは未熟な胎児組織において豊富に発現しており、成熟した組織においては、ごく一部の組織において低レベルで発現していることが報告されている (Millan et al., 1991) もの、生理的役割はほとんど明らかにされていない (Mukoyama et al., 1993)。Yamada ら (1996) の報告によると、ラットの褐色細胞腫由来の培養細胞においてAT2リセプターを介したアポトーシスが報告されているので、本実験結果は、動脈管におけるAT2リセプターの関与したアップレギュレーションを介した結果とも推測されるが、さらに検討が必要である。

いずれにしても、エナラプリル投与により、アポトーシスの発現が増強し、さらに発現時期が遅延して認められ、その結果、生後の動脈管の再構築が遅延していると考えられ、この結果は、胎生期のPCNA陽性細胞の動態の結果とも一致している。これらのことから、第3章で示したエナラプリル投与後の

PGE₂による動脈管の再開存が増強された原因のひとつは、エナラプリルが動脈管の中膜平滑筋細胞の増殖を抑制し、その結果、平滑筋細胞の成熟化が抑制され、未熟型の動脈管の反応性を示したのではないかと考えられる。また、この仮説は、エナラプリル服用後の動脈管開存症とも関連している可能性がある。

第4節 小 括

動脈管の中膜の平滑筋細胞の動態について抗PCNA抗体を用いて免疫組織化学的に検討し、さらに妊娠後期の母体ラットにエナラプリルを連続投与したとき、動脈管の平滑筋細胞の増殖に影響するか検討した。また、動脈管におけるアポトーシスとエナラプリルの及ぼす影響についても検討した。

動脈管と大動脈のPCNA標識率は、胎齢18日の約60%から増加し胎齢19日には約75%とピークを示した。胎齢20日には約20%に減少し、その後PCNA標識率は徐々に低下し、生後1日には約13%、生後3日の動脈管のPCNA標識率は約7%にまで低下した。一方、生後3日の大動脈のPCNA標識率は約30%を示し、同日の動脈管や前日の大動脈と比較して有意に増加していた。エナラプリル10mg群のPCNA標識率は、動脈管、大動脈ともに対照群と比べて減少したが、動脈管でより顕著であった。しかし、胎齢20日では対照群と投与群で動脈管、大動脈ともにPCNA標識率に差異はなかった。単位面積当たりの細胞核数では、胎齢19日より胎齢20日でわずかに減少していた。

動脈管のアポトーシスは胎生期には観察されず、対照群では生後1日から中央部には集団として、周辺部には散在して認められ、生後3日、5日には中央部のアポトーシス細胞の集団は消失し、血管壁全体に散在して認められた。母体へのエナラプリル投与により、生後3日においても、中央部に著しいアポトーシス細胞の集積が認められた。エナラプリル投与により生後3日のアポトーシスは増強され、対照群と比べて、アポトーシスの出現パターンが遅延していた。

以上のことから、1) 動脈管の細胞増殖は胎齡19日でピークとなり、胎齡20日には急激に減少する。2) 大動脈は生後1日まで動脈管と同様に推移するが、生後3日では細胞増殖が再び盛んになる。3) エナラプリルを連続投与すると、胎齡19日の細胞増殖に抑制的に働き、この作用は動脈管でより顕著である。4) エナラプリル投与により、動脈管のアポトーシスは生後3日に増強して認められ、対照群と比べて出現時期が遅延することが明らかとなった。

結 語

以上、本研究の結果から、

1) 解剖学的閉鎖期のラット動脈管においても、 PGE_1 と PGE_2 により動脈管の再開存が生じ、その作用は PGE_2 の方が強い。 PGE_2 による動脈管の再開存は生後間もないほど強く、時間の経過とともに減退し、生後24時間後には消失する。

2) 妊娠末期の母体ラットにインドメタシン等の非ステロイド性抗炎症剤を投与すると、得られた新生子においては、 PGE_2 による動脈管の再開存が著しく増強する。この作用は酸性の非ステロイド性抗炎症剤に共通すると考えられた。

3) 母体ラットにアンギオテンシン変換酵素阻害剤エナラプリルを連続投与すると、 PGE_2 による動脈管の再開存が増強されたが、再開存の持続時間は延長しなかった。

4) 周生期の肺のPGDH活性は、胎齢20日から生後3時間まで徐々に増加したが、生後6時間には一過性に有意に減少した。その後、生後12時間には生後3時間と同程度にまで回復した。

母体にインドメタシンを投与後に得た新生子の肺のPGDH活性は、対照群より低下していたので、このPGDH活性の低下が PGE_2 代謝の遅延を引き起こし、インドメタシン投与後の PGE_2 による動脈管の再開存の増強をもたらすものと考えられた。

一方、母体にエナラプリルを投与しても新生子の肺のPGDH活性は変化しなかった。

5) 動脈管のPCNA標識率は、胎齢19日のピークから、胎齢20日には急激に減少し、その後、徐々に低下した。大動脈は生後1日まで動脈管と同様に推移

したが、生後3日には再び増加した。

母体へのエナラプリル投与により、胎齡19日の動脈管の細胞増殖は大動脈よりも顕著に抑制されたが、胎齡20日では、動脈管、大動脈ともに変化しなかった。

動脈管のアポトーシスは胎生期には観察されず、生後1日から動脈管の中央部には集団として、周辺部には散在して認められた。生後3日、5日には中央部のアポトーシス陽性細胞の集団は消失し、血管壁全体に散在して認められた。母体へのエナラプリル投与により、生後3日においても、中央部にアポトーシス細胞の著しい集積が認められ、エナラプリルにより生後3日のアポトーシスは増強され、その結果、対照群と比べて、アポトーシスの出現時期が遅延する等の結果が得られた。

これらを一括すれば、解剖学的閉鎖期においても動脈管はPGE₂とPGE₁により再開存する。さらに、動脈管開存症との関連性が報告されているインドメタシンやエナラプリルは、PGE₂による動脈管の再開存を著しく増強させる。その原因を調べたところ、インドメタシンにおいては肺のPGDH活性が低下していたので、肺におけるPGE₂代謝の停滞がその原因のひとつと推測された。しかし、エナラプリルにおいては、肺のPGDH活性は変化していなかった。そこで、さらに組織学的に検討したところ、胎生期の動脈管の中膜平滑筋細胞の増殖が抑制されていることが明らかになった。また、新生子の動脈管のアポトーシスの出現時期が遅延していた。これらのことから、平滑筋細胞の成熟化が抑制され、未熟型の動脈管の反応性を示した結果、動脈管の再開存が増強されたものと結論される。

要 約

動脈管は胎生期に肺動脈と大動脈を結ぶバイパスとして大きく開存し、肺への血液流入の大部分を阻止し、大動脈へと迂回させている。動脈管は弾性線維に富む大動脈や肺動脈とは組織学的に異なり、血管壁の中膜に平滑筋を多く含む筋型動脈であり (Jones et al., 1969)、その構造と出生後に急激に収縮するという特徴から、他に類のない非常にユニークな血管である。動脈管の収縮は卵円孔の閉鎖、臍循環の停止と並んで胎生期循環から成体循環への移行に重要な役割を果たしており、出生後の動脈管の収縮が速やかに非可逆的に起ることは新生児の生存にとって極めて重要である。

動脈管の開存維持は拡張性に働くプロスタグランジン (PGs) と収縮性に働く酸素分圧のバランスにより制御されている (Clyman, 1987)。このPGsを生合成する酵素であるシクロオキシゲナーゼの働きは、インドメタシン等の非ステロイド性抗炎症剤によって阻害されることから、妊娠満期の母体ラットに非ステロイド性抗炎症剤を投与すると、胎子の動脈管は収縮し (Sharpe et al., 1975; Momma and Takeuchi, 1983; Arishima et al., 1991)、その影響は生後にも及ぶ。ヒト胎児においても、妊娠末期に動脈管が収縮すると胎児肺高血圧が生じ、出生後、新生児肺高血圧持続症あるいは胎児循環持続症が起こることが知られている (Momma and Takao, 1987)。

生後の動脈管収縮は血管壁の平滑筋の収縮により生じる機能的収縮と、続いて起こる内皮細胞の破壊、内膜下層の増殖、結合組織の形成そして管腔の密閉による永久的な解剖学的な収縮閉鎖の二段階に分けられ (Jager and Wollensman, 1942; Jones et al., 1969)、比較的長期間に及ぶ解剖学的閉鎖期の後、動脈管索として遺残する。出生後、動脈管の収縮が順調に進行せず、開存が維持されたままとなると動脈管開存症と呼ばれる。この疾患は新生児の生命の存

続と深い関わりを持ち小児科領域では重要である。また、一度収縮した動脈管においてPGE₁とPGE₂による再開存がヒト、ウサギなどで起こることが報告されている (Sharpe and Larsson, 1975 ; Heyman and Rudolph, 1977 ; Momma et al., 1980) が、ラットにおいては検討されていない。

このように周生期における動脈管の開存の維持と収縮閉鎖に関しては未だ知られていないメカニズムが多い。特に一度収縮した動脈管が再開存する現象は興味深く、この再開存現象の解明は動脈管開存症の発生メカニズムの解明にもつながるものと考えられる。

インドメタシンはシクロオキシゲナーゼの阻害という薬理作用から、現在、ヒト未熟児の動脈管開存症の治療に用いられているが、必ずしも成功率は高くない (Heyman et al., 1976 ; MaCarthy et al., 1978) 。また、使用時期によっては逆効果を生じるという報告 (Konishi et al., 1986) もある。

アンギオテンシン変換酵素阻害剤であるエナラプリル (マレイン酸エナラプリル) は、他の降圧剤と比べ、交感神経作用を維持したまま、脳、心臓、腎臓への血流量を増加させ降圧作用をもたらすという理由から、ヒト妊婦によく使用されている (Johnston, 1984 ; Lund-Johansen, 1984) が、新生児の動脈管開存症との関連が報告されている (Kreft-Jais et al., 1988 ; Pryde et al., 1993) 。

これらのことから本論文では動脈管の再開存と、動脈管開存症との関連性が報告されているインドメタシンやエナラプリルの動脈管開存に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、次のような各方面からのアプローチを試みた。

第1章においては、解剖学的閉鎖期の動脈管の再開存について、特にPGE₁とPGE₂によって生じる動脈管の再開存について検討した。

解剖学的閉鎖期のラット動脈管においても、PGE₁とPGE₂ (4、10 μ g/匹)により動脈管の再開存が生じ、その作用はPGE₂の方が強い。PGE₂による動脈管

の再開存は生後間もないほど強く、時間の経過とともに減退し、生後24時間後には消失することが示された。

第2章においては、妊娠末期の母体にインドメタシン等のシクロオキシゲナーゼ阻害剤を投与すると、出生後の動脈管のPGE₂による再開存が修飾されるのではないかと推測されるので、妊娠末期の非ステロイド性抗炎症剤がPGE₂による動脈管の再開存に与える影響を検討した。

妊娠18日から20日の母体ラットにインドメタシン (1、3 mg/kg)、アスピリン(100、300mg/kg)、イブプロフェン (10、30 mg/kg) を3日間連続経口投与すると、得られた新生子においては、PGE₂(4μg/匹)による動脈管の再開存が著しく増強することが示された。この作用は酸性の非ステロイド性抗炎症剤に共通すると考えられた。

第3章においては、妊娠後期の母体ラットにエナラプリルを連続投与したときのPGE₂による動脈管の再開存に及ぼす影響について検討した。

妊娠14日から20日の母体ラットにアンギオテンシン変換酵素阻害剤エナラプリル (0.1、1、10 mg/kg) を7日間連続投与すると、PGE₂による動脈管の再開存が増強されたが、再開存の持続時間は延長しなかった。

第4章においては、第2章、第3章において観察された胎生末期に経胎盤的に非ステロイド性抗炎症剤やアンギオテンシン変換酵素阻害剤を投与すると、PGE₂による動脈管の再開存が著しく増強されるという現象が、どのようなメカニズムによって生じているかを検討するために、肺におけるPGE₂の代謝分解に注目し、PGE₂の主要な代謝分解酵素である肺の15-ヒドロキシ-プロスタグランジンデヒドロゲナーゼ (PGDH) 活性について検討した。

周生期の肺のPGDH活性は、胎齡20日から生後3時間まで徐々に増加したが、生後6時間には一過性に有意に減少した。その後、生後12時間には生後3時間と同程度にまで回復した。

母体にインドメタシン (3 mg/kg) を投与後に得た新生子の肺のPGDH活性は、対照群の約60%に低下していたので、このPGDH活性の低下がPGE₂代謝の遅延を引き起こし、インドメタシン投与後のPGE₂による動脈管の再開存の増強をもたらすものと考えられた。

一方、母体にエナラプリル (10 mg/kg) を投与しても、新生子の肺のPGDH活性は変化しなかった。

第5章においては、動脈管の中膜平滑筋細胞の増殖とアポトーシス (プログラム細胞死) について検討し、エナラプリルの投与が、動脈管の細胞増殖とアポトーシスに影響を及ぼすか検討した。細胞増殖とアポトーシスの指標としてそれぞれPCNA陽性細胞とTUNEL陽性細胞を観察した。

動脈管の中膜平滑筋細胞のPCNA標識率は、胎齡19日のピーク (約75%) から、胎齡20日には約20%と急激に減少し、その後、徐々に低下した。大動脈は生後1日まで動脈管と同様に推移したが、生後3日には約30%と増加した。胎齡19日の動脈管の細胞増殖は母体へのエナラプリル投与により約60%に低下した、この低下は大動脈における低下 (約75%) よりも顕著であった。胎齡20日では、動脈管、大動脈ともに変化しなかった。

動脈管のTUNEL陽性細胞は胎生期には観察されなかったが、生後1日では閉鎖した動脈管の中央部に集団として、周辺部には円周状に散在して認められた。生後3日と5日には中央部のTUNEL陽性細胞の集団は消失し、血管壁全体に散在して認められた。一方、母体へのエナラプリル投与により、新生子の動脈管のTUNEL陽性細胞の出現パターンに明確な変化が認められた。生後1日にお

いては、中央部のTUNEL陽性細胞はやや減少しており、生後3日においては、中央部のTUNEL陽性細胞は著しく増加していた。生後5日においては対照群と差異は観察されなかった。エナラプリルにより生後3日のアポトーシスが增強され、その結果、対照ラットと比べて、アポトーシスの出現時期が遅延していた。

これらの結果から、解剖学的閉鎖期においても動脈管はPGE₂とPGE₁により再開存する。さらに、動脈管開存症との関連性が報告されているインドメタシンやエナラプリルは、PGE₂による動脈管の再開存を著しく增強させる。その原因を調べたところ、インドメタシンにおいては肺のPGDH活性が低下していたので、肺におけるPGE₂代謝の停滞がその原因のひとつと推測された。しかし、エナラプリルにおいては、肺のPGDH活性は変化していなかった。そこで、さらに組織学的に検討したところ、胎生期の動脈管の中膜平滑筋細胞の増殖が抑制されていることが明らかになった。また、新生子の動脈管のアポトーシスの出現時期が遅延していた。これらのことから、平滑筋細胞の成熟化が抑制され、未熟型の動脈管の反応性を示した結果、PGE₂による動脈管の再開存が增強されたものと結論された。

謝 辞

本研究は麻布大学獣医学部解剖学第二研究室教授有嶋和義博士ならびに同助教授山本雅子博士の御指導と御鞭撻ならびに御校閲の賜物であり、ここに深甚なる謝意を表わします。

また、麻布大学名誉教授江口保暢博士には、研究の遂行にならびに論文のとりまとめに際して、懇切丁寧な御指導と御校閲を賜りました、ここに深甚なる謝意を表します。さらに、論文のとりまとめに関して、御校閲と貴重な御助言を賜りました薬理学研究室教授赤堀文昭博士、外科学第1研究室教授若尾義人博士、比較毒性学研究室教授政岡俊夫博士に対して衷心より深謝致します。

最後に、本研究の遂行に当たって、多大の御協力と御支援をいただいた麻布大学獣医学部解剖学第二研究室内の教室員の諸氏に謝意を表わします。

参考文献

- Änggård, E. and Samuelsson, B. (1964) : Metabolism of prostaglandin E₁ in guinea pig : The structures of two metabolites. *J. Biol. Chem.* 239 : 4097 - 4102.
- Änggård, E. and Samuelsson, B. (1966) : Purification and properties of a 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase from swine lung. *Ark. Kemi.* 25 : 293 - 300.
- Änggård, E., Larsson, C. and Samuelsson, B. (1971) : The distribution of 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase and prostaglandin - Δ^{13} - reductase in tissues of the swine. *Acta Physiol. Scand.* 81 : 396 - 404.
- Arishima, K., Yamamoto, M., Takizawa, T., Ueda, Y., Kusanagi, M. and Eguchi, Y. (1991) : Onset of the constrictive effect of indomethacin on the ductus arteriosus in fetal rats. *Acta Anat.* 142 : 231 - 235.
- Clyman, R. I., Mauray, F., Rudolph, A. M. and Heyman, M. A. (1980) : Age-dependent sensitivity of the lamb ductus arteriosus to indomethacin and prostaglandins. *J. Pediatr.* 96 : 94 - 98.
- Clyman, R. I., Ballard, P. L., Sniderman, S., Ballard, R. A., Roth, R., Heymann, M. A. and Granberg, J. P. (1981) : Prenatal administration of betamethasone for prevention of patent ductus arteriosus. *J. Pediatr.* 98 : 123 - 126.
- Clyman, R. I. (1987) : Ductus arteriosus : Current theories of prenatal and postnatal regulation. *Semin. Perinatol.* 11 : 64 - 71.

- Coceani, F. and Olley, P. M. (1973) : The response of the ductus arteriosus to prostaglandins. *Can. J. Pharmacol.* 51 : 220 - 225.
- Daemen, M. J. A. P., Lombardi, D. M. Bosman, F. T. and Schwartz, S. M. (1991) : Angiotensin II induce smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ. Res.* 68 : 450-456.
- Dzau, V. J. (1988) : Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77 (suppl. I) : I 4 - I 13.
- Friedman, W. F., Printz, M. P., Kirkpatrick, S. E. and Hoskins, E. J. (1983) : The vasoactivity of the fetal lamb ductus arteriosus studied in utero. *Pediat. Res.* 17 : 331 - 337.
- Gavriel, Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson. (1992) : Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biology* 119 : 493 - 501.
- Gecse, A., Otlecz, A., Schaffer., I., Bujdos, A. and Telegdy, G. (1979) : Sex differences in prostaglandin metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86 : 643 - 647.
- Heyman, M. A., Rudolph, A. M. and Silverman, N. H. (1976) : Closure of the ductus arteriosus in premature infants by inhibition of prostaglandin synthesis. *N. Engl. J. Med.* 295 : 530 - 533.
- Heyman, M. A. and Rudolph, A. M. (1977) : Ductus arteriosus dilatation by prostaglandin E₁ in infants with pulmonary atresia. *Pediatrics* 59 : 325 - 329.
- Hörnblad, P. Y. (1967) : Studies on closure of the ductus arteriosus. III. Species differences in closure rate and morphology. *Cardiologia* 51 : 262 - 282.

- Itoh, H., Pratt, R. E., Dzau, V. J. (1991) : Interaction of atrial natriuretic polypeptide and angiotensin II on protooncogene expression and vascular cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176 : 1601 - 1609.
- Johnston, C. L. (1984) : Angiotensin converting enzyme inhibitors. pp.272 - 311. *In* : Clinical Pharmacology of Hypertensive Drugs (Doyle, A.E., ed.). Elsevier, Amsterdam.
- Jager, B. V. and Wollenoman, J. Jr. (1942) : An anatomical study of the closure of the ductus arteriosus. *Am. J. Pathol.* 18 : 595 - 613.
- Jarkovská, D., Janatová, T., Hruša, J., Ostadal, B. and Samánek, M. (1989) : The physiological closure of ductus arteriosus in the rat. An ultrastructural study. *Anat. Embryol.* 180 : 497 - 504.
- Jones, M., Barrow, M. V. and Wheat, M. J r. (1969) : An ultrastructural evaluation of the closure of the ductus arteriosus in rats. *Surgery* 66 : 891 - 898.
- Khairalla, P. A., et al., (1972) : Effects of angiotensin II on DNA, RNA and protein synthesis, pp.212-220. *In* : Hypertension. '72 (Ed) . Genest, J. and Kiow, E. Springer Verlag, New York.
- Konishi, T., Momma, K. and Takao, A. (1986) : Inhibition of rat fetal ductus arteriosus maturation by indomethacin. *Acta Neonat. Jpn.* 22 : 430 - 436 (in Japanese).
- Konishi, T. (1986) : Maturation of rat fetal ductus arteriosus by betamethasone. *Acta Neonat. Jpn.* 22 : 945 - 950 (in Japanese).

- Kreft-Jais, C., Plouin, P. F., Tchobroulsky, C. and Boutroy, M. J. (1988) :
Angiotensin-converting enzyme inhibitors during pregnancy : A
survey of 22 patients given captopril and nine given enalapril. *Br. J.
Obstet. Gynaecol.* 95 : 420 - 422.
- Liggins, G. C. (1968) : Premature parturition after infusion of corticotrophin
or cortisol into foetal lambs. *J. Endocr.* 42 : 323 - 329.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) :
Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*
193 : 265 - 275.
- Lund-Johansen, P. (1984) : Hemodynamic effects of antihypertensive
agents. pp. 39 - 66. *In: Clinical Pharmacology of Hypertensive Drugs*
(Doyle, A.E., ed.). Elsevier, Amsterdam.
- MaCarthy, J. S., Zies, L. G. and Gelland, H. (1978) : Age-dependent
closure of the patent ductus arteriosus by indomethacin. *Pediatrics*
62 : 706 - 712.
- Millan, M. A., Jacobowitz, D. M., Auguilera, G. and Catt, K. J. (1991) :
Differential distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor
subtypes in the rat brain during development. *Proc. Natl. Acad. Sci.
USA.* 88 : 11440 - 11444.
- Miyachi, K., Fritzler, M. J. and Tan, E. M. (1978) : Autoantibody to a
nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.* 121 : 2228 - 2234.
- Momma, K., Uemura, S., Nishihara, S. and Ota, Y. (1980) : Dilatation of
the ductus arteriosus by prostaglandins and prostaglandin's
precursors. *Pediatr. Res.* 14 : 1074 - 1077.

- Momma, K. and Takeuchi, H. (1983) : Constriction of fetal ductus arteriosus by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Prostaglandins* 26 : 631 - 643.
- Momma, K. and Takao, A. (1987) : In vivo constriction of the ductus arteriosus by nonsteroidal antiinflammatory drugs in near-term and preterm rats. *Pediatr. Res.* 22 : 567 - 572.
- Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R. E. and Dzau, V. J. (1993) : Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J. Biol. Chem.* 268 : 24539-24542.
- Naftilan, A. J., Pratt, R. E. and Dzau, V. J., (1989) : Induction of platelet-derived growth factor A-chain and *c-myc* gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 83 : 1419 - 1424.
- 日本医薬情報センター編 (1993a) : 1993年日本医薬品集 pp. 18 - 19. 薬業時報社、東京.
- 日本医薬情報センター編 (1993b) : 1993年日本医薬品集 pp. 141 - 143. 薬業時報社、東京.
- Owens, G. K. (1989) : Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 257 : H1755 - H1765.
- Piper, P. J., Vane, J. R. and Wyllie, J. H. (1970) : Inactivation of prostaglandins by the lungs. *Nature (Lond.)* 225 : 600 - 604.

- Powell, J. S., Crozel, J. P., Müller, R. K. M., Kuhn, H., Hefti, F., Hosang, M. and Baumgartner, H.R. (1989) : Inhibitors of angiotensin - converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 245 : 186 - 245.
- Powell, J. S., Müller, R. K. M., Rouge, M., Kuhn, H., Hefti, F. and Baumgartner, H. R. (1990) : The proliferative response to vascular injury is suppressed by angiotensin-converting enzyme inhibition. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16 (suppl. 4) : 42 - 49.
- Printz, M. P., Friedman, W. F. and Skidgel, R. A. (1983) : Prostaglandin biosynthetic pathways in fetal lamb ductus arteriosus and lung : Relationship to ductal patency and closure. *Thromb. Leuk. Res.* 12 : 483 - 489.
- Pryde, P. G., Sedman, A. B., Nugent, C. F. and Barr, M., Jr. (1993) : Angiotensin-converting enzyme inhibitor fetopathy. *J. Am. Soc. Nephron.* 3 : 1575 - 1582.
- Sasaki, K., Yamano, Y., Barhan, S., Iwai, N., Murray, J., Hasegawa, M., Matsuda, Y. and Inagami, T. (1991) : Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type -1 receptor. *Nature (Lond.)* 351 : 230 - 233.
- Sharpe, G. L., Larsson, K. S. and Thalme, B. (1975) : Studies on closure of the ductus arteriosus. XII. in utero effect of indomethacin and sodium salicylate in rats and rabbits. *Prostaglandins* 9 : 585 - 596.
- Sharpe, G. L. and Larsson, K. S. (1975) : Studies on closure of the ductus arteriosus. X. in vivo effect of prostaglandin. *Prostaglandins* 9 : 703 - 719.

- Starling, M. B. and Elliott, R. B. (1974) : The effects of prostaglangins, prostaglangin inhibitors, and oxygen on the closure of the ductus arteriosus, pulmonary arteries and umbilical vessels in vitro. *Prostaglangins* 8 : 187 - 203.
- Strasser, Th. and Vogel, M. (1989) : Prostaglandin E₂ in the lung lavage fluid of premature newborns before and after surgical or medical closure of a patent ductus arteriosus. *Biochim. Biophys. Acta.* 1003 : 63-66.
- 菅原潔、副島正美 (1986) : 蛋白質の定量法 p. 95 - 132. 学会出版センター、東京.
- Swartz, S. L. (1987) : The role of prostaglandins in mediating the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and other antihypertensive drugs. *Cardio. Drugs and Therapy* 1: 39 - 43.
- Takizawa, T., Arisima, K., Yamamoto, M., Kusanagi, M., Somiya, H. and Eguchi, Y. (1992) : Studies on closure of the ductus arteriosus in perinatal rats. *J. Vet. Med. Sci.* 54 : 1195 - 1198.
- Takizawa, T., Arishima, K., Yamamoto, M., Somiya, H. and Shiota, K. (1994a) : Transplacentally-administered enalapril inhibits the spontaneous constriction of the ductus arteriosus in the newborn rat. *Cong. Anom.* 34 : 47 - 51.
- Takizawa, T., Oda, T., Arishima, K., Yamamoto, M., Somiya, H., Eguchi, Y. and Shiota, K. (1994b) : Inhibitory effect of enalapril on the constriction of the ductus arteriosus in newborn rats. *J. Vet. Med. Sci.* 56 : 605 - 606.

- Takizawa, T., Ikeda, Y., Arishima, K., Yamamoto, M., Togashi, H., Namba, Y., Somiya, H. and Eguchi, Y. (1995) : Dilating Effect of prostaglandin on the constricted ductus arteriosus in newborn rats. *J. Toxicol. Sci.* 20 : 29 - 32.
- Takizawa, T., Ikeda, Togashi, H., Yamamoto, M., Arishima, K., Akahori, F., and Masaoka, T. (1996) : Inhibitory effect of indomethacin on neonatal lung catabolism of prostaglandin E₂ : Possible mechanism of the re-opening of the ductus arteriosus after indomethacin therapy. *J. Toxicol. Sci.* 21: 243 - 248.
- Takizawa, T., Ikeda, Y., Kawahata, M., Togashi, H., Yamamoto, M., Arishima, K. and Masaoka, T. (1998) : Increased ductal responsiveness to PGE₂ after maternal treatment with Aspirin and Ibuprofen. *J. Vet. Med. Sci.* 60 : 377 - 379.
- Todd, P. A. and Heel, R. C. (1986) : Enalapril. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. *Drugs* 31 : 198 - 248.
- Tsai, M. Y. and Brown, D. M. (1987) : Effect of dexamethasone on fetal lung 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase : Possible mechanism for the prevention of patent ductus arteriosus by maternal dexamethasone therapy. *Prostaglandins Leukotriens Med.* 27 : 237 - 245.
- Tsuruta, K. and Mori, N. (1985) : Study on PGDH activity in human term placenta - relationship between PGDH activities and perinatal factors -. *Acta. Obst. Gynaec. Jpn.* 37 : 2023 - 2030 (in Japanese).

- 堤 寛 (1991) : 光顕レベルの免疫組織化学の手技と応用
pp.22-39. 組織細胞化学1991、学際企画、東京.
- Yamada, T., Horiuchi, M. and Dzau, V. J. (1996) : Angiotensin II type 2
receptor mediates programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
93 : 156 - 160.
- Yamamoto, M., Arishima, K. and Eguchi, Y. (1986) : The sensitivity of the
fetal rat adrenal gland to adrenocorticotrophic hormone *in vivo* and *in*
vitro. *Biol. Neonate* 50 : 48 - 54.
- 山本尚三、鹿取信 (1986) : プロスタグランジン研究法 (上)、pp. 8 - 9.
現代化学増刊、東京化学同人、東京.

図-1、動脈管の観察手順-1

観察と計測に用いた機器を示す。

- a : 実体顕微鏡 (OLYMPUS)
- b : 簡易凍結装置 (KOMATSU)
- c : 光ファイバー照明装置
(OLYMPUS)

図-2、動脈管の観察手順-2

凍結台に固定した新生子ラットを示す。

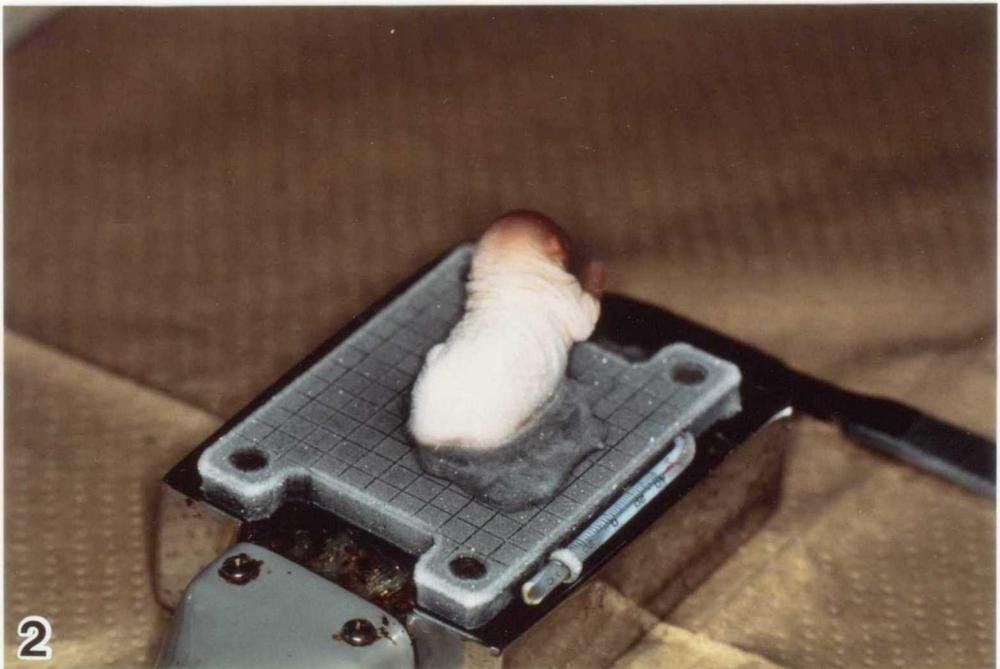
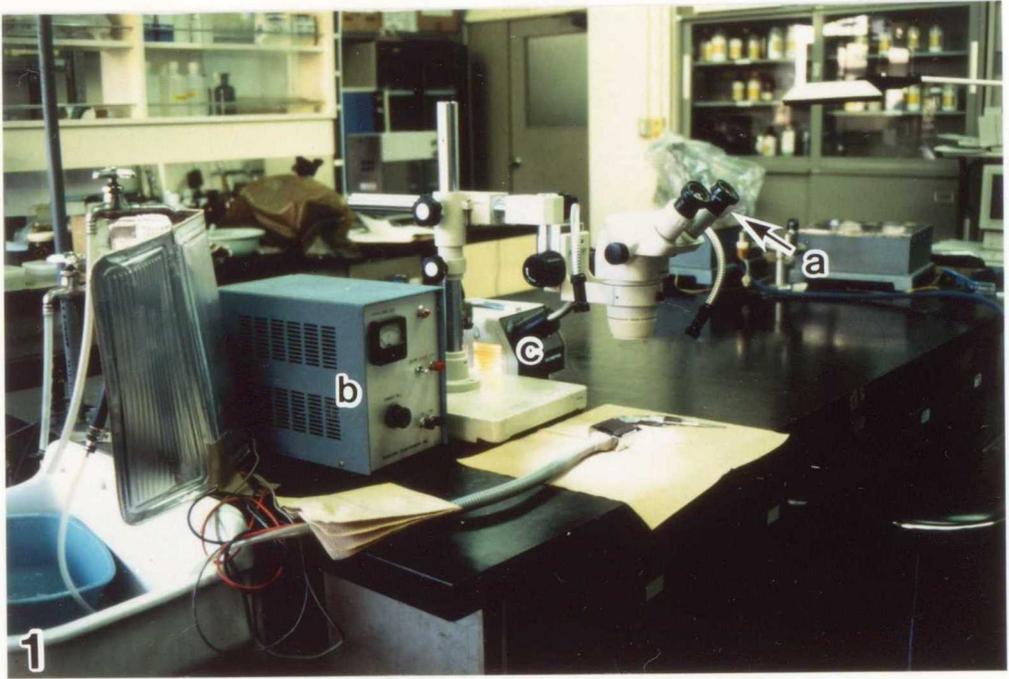


図-3、動脈管の観察手順-3

新生子ラットの背面を水平に切り出した胸椎を示す。左側は頭側を示す。

TV : 胸椎
LL : 左肺
R : 肋骨
x 8.5

図-4、動脈管の観察手順-4

食道および胸大動脈の縦断像を示す。左側は頭側を示す。

E : 食道
TA : 胸大動脈
x 8.5

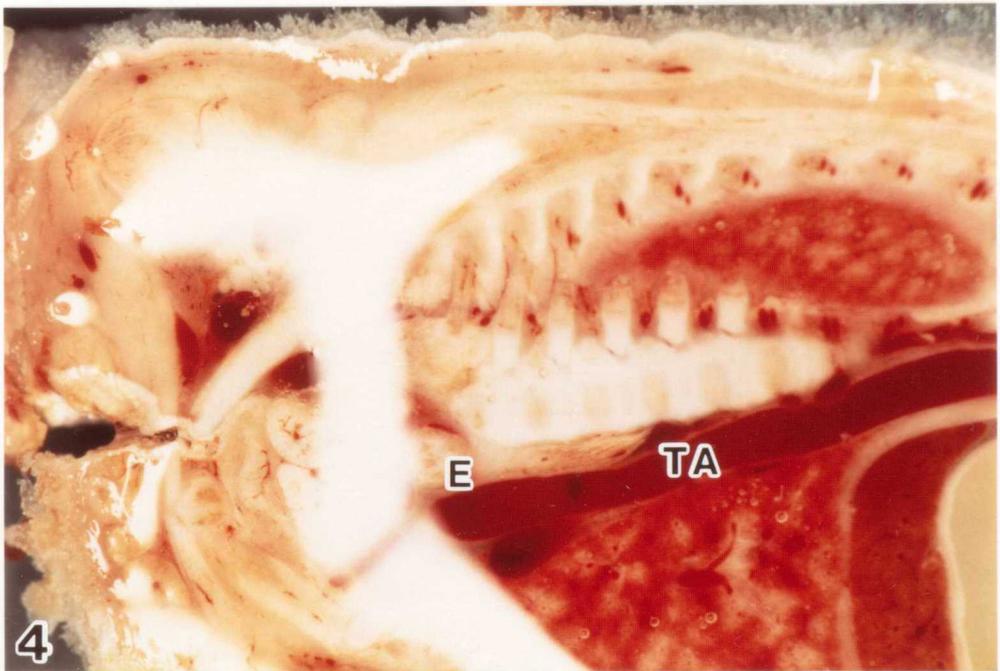
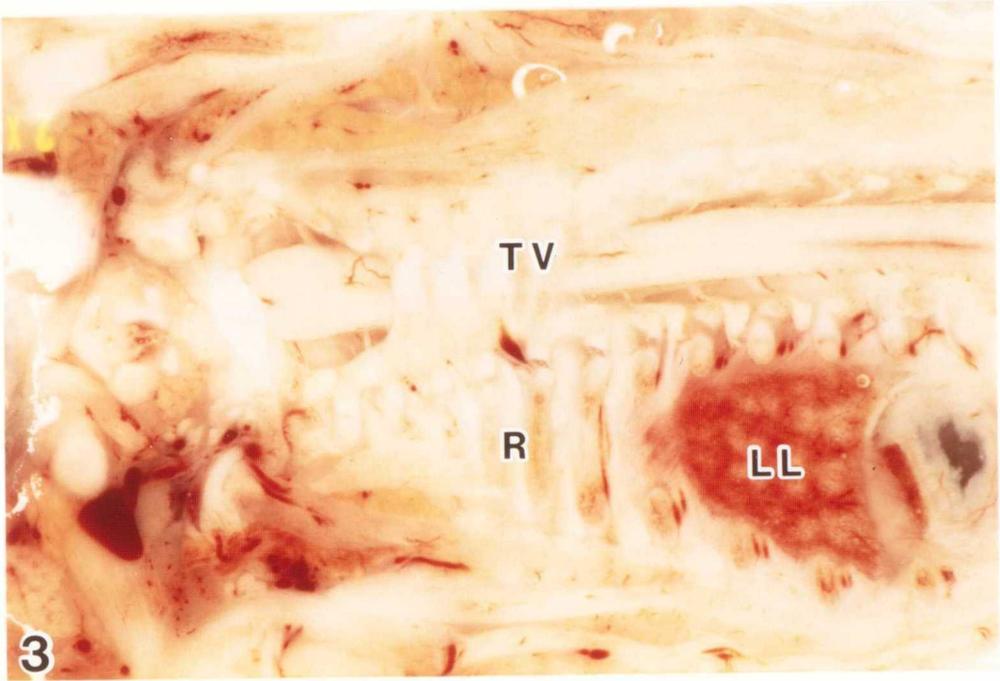


図-5、動脈管の観察手順-5

動脈管と大動脈の分岐部を示す。
左側は頭側を示す。

DA : 動脈管
A : 大動脈
E : 食道
T : 胸腺
x 8.5

図-6、動脈管の観察手順-6

動脈管内径の測定部位を示す。
左側は頭側を示す。

DA : 動脈管
A : 大動脈
LL : 左肺
RL : 右肺
T : 胸腺
L : 肝臓
x 8.5

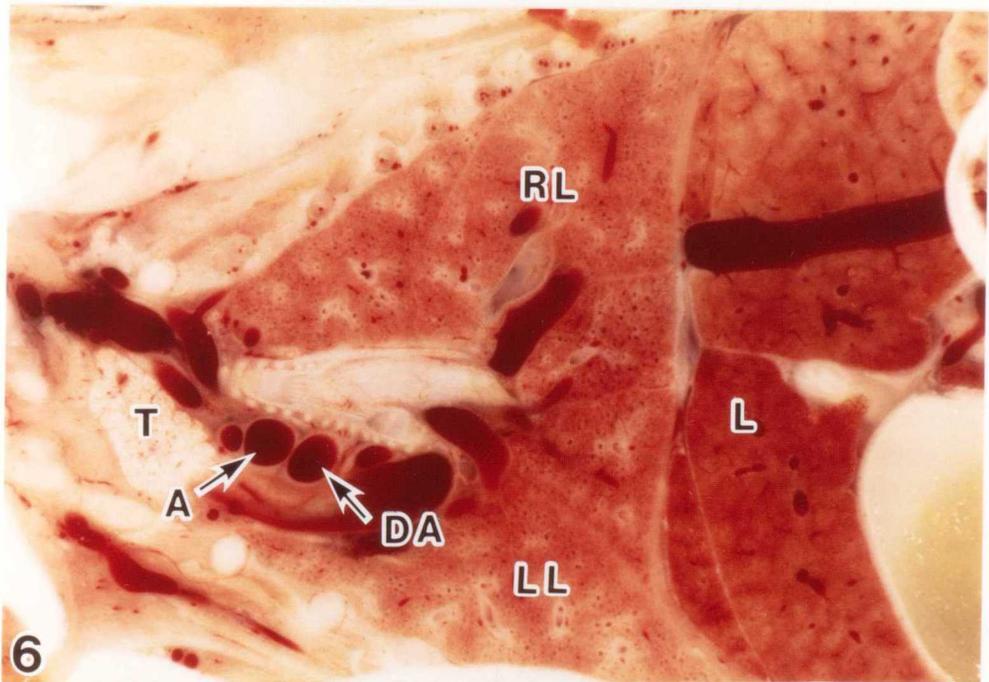
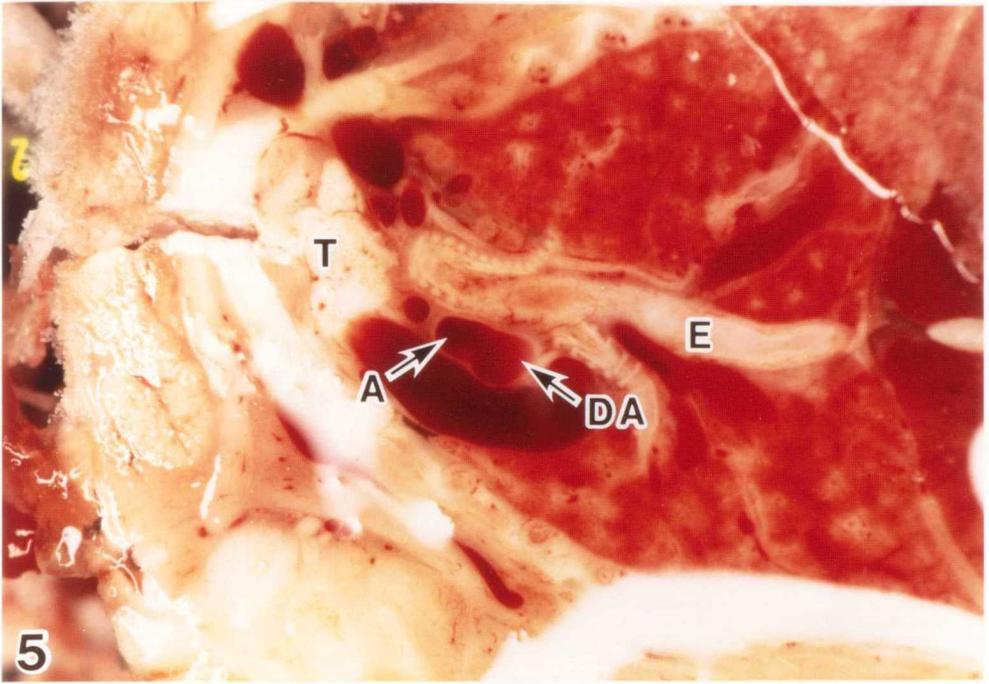


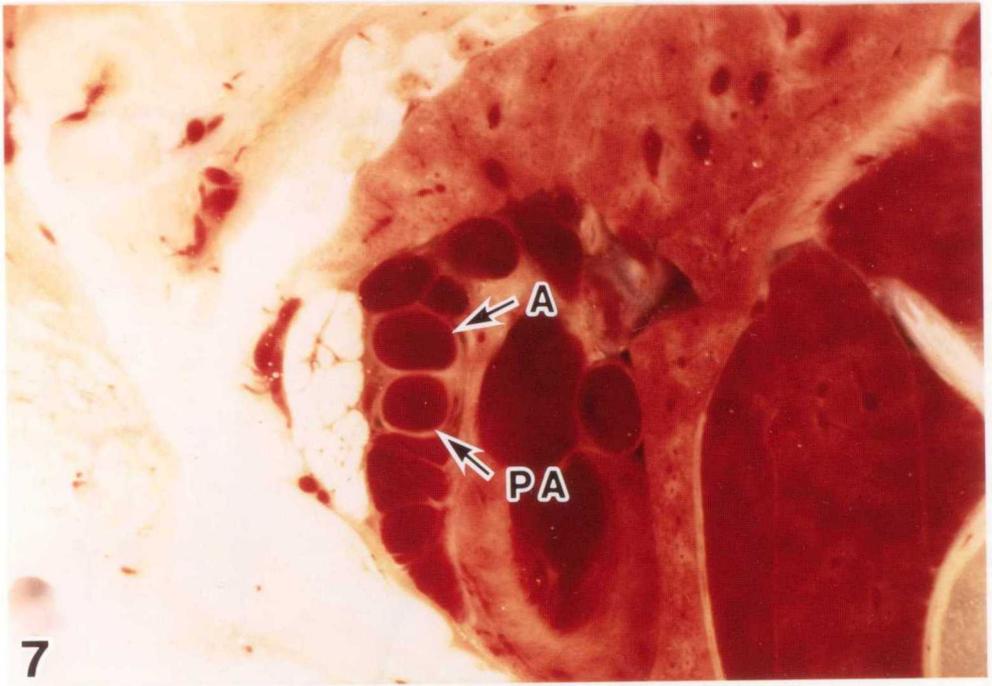
図-7、動脈管の観察手順-7

肺動脈内径の測定部位を示す。
左側は頭側を示す。

A : 大動脈

PA : 肺動脈

x 8.5



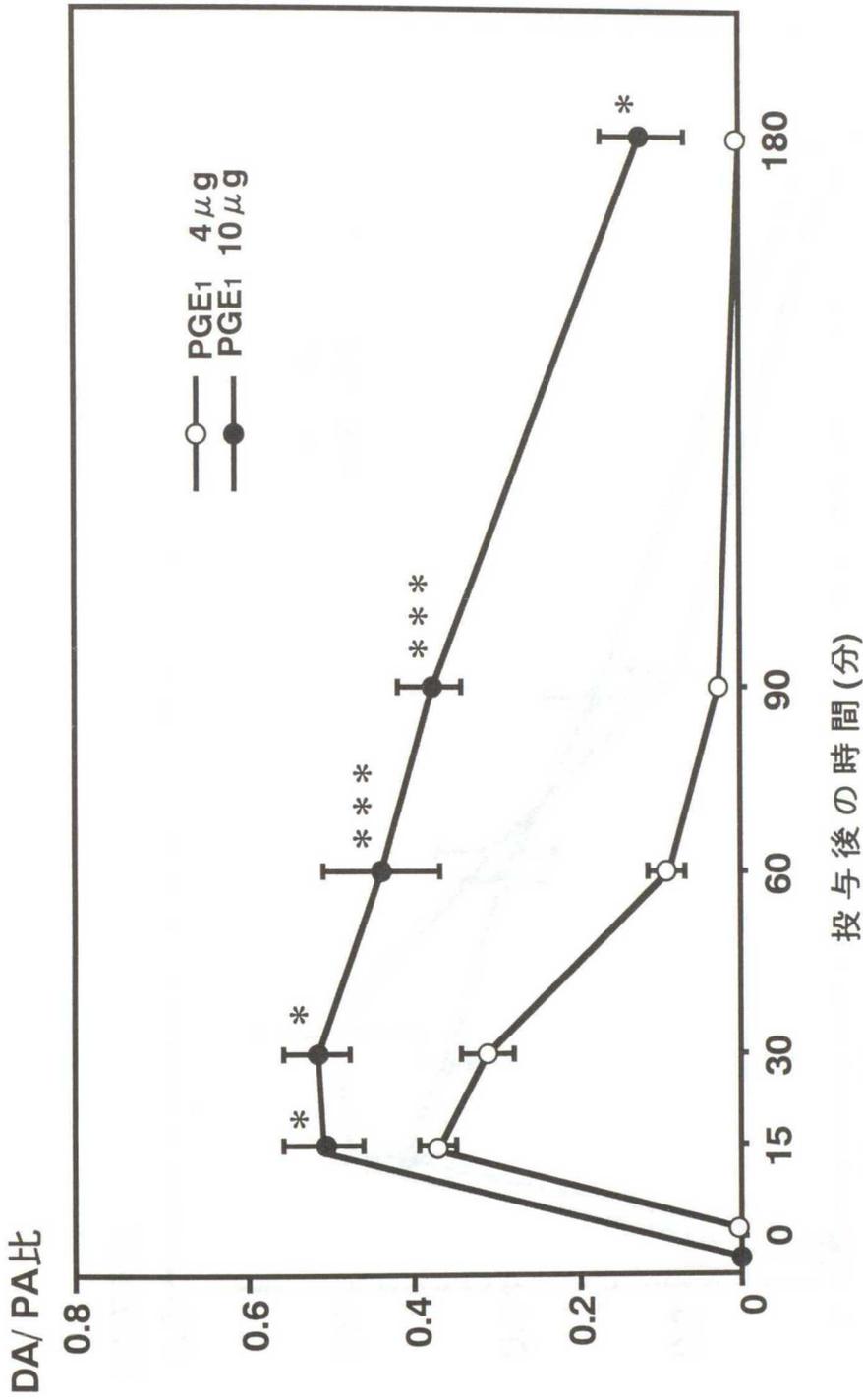


図-8. 帝王切開3時間後の新生子にPGE₁投与後のDA/PA比の変化

各ポイントは平均 ± S.E.を示す (n = 7 ~ 11).

* : 4 μg群と比べて有意差あり (* : P < 0.05, *** : P < 0.001)

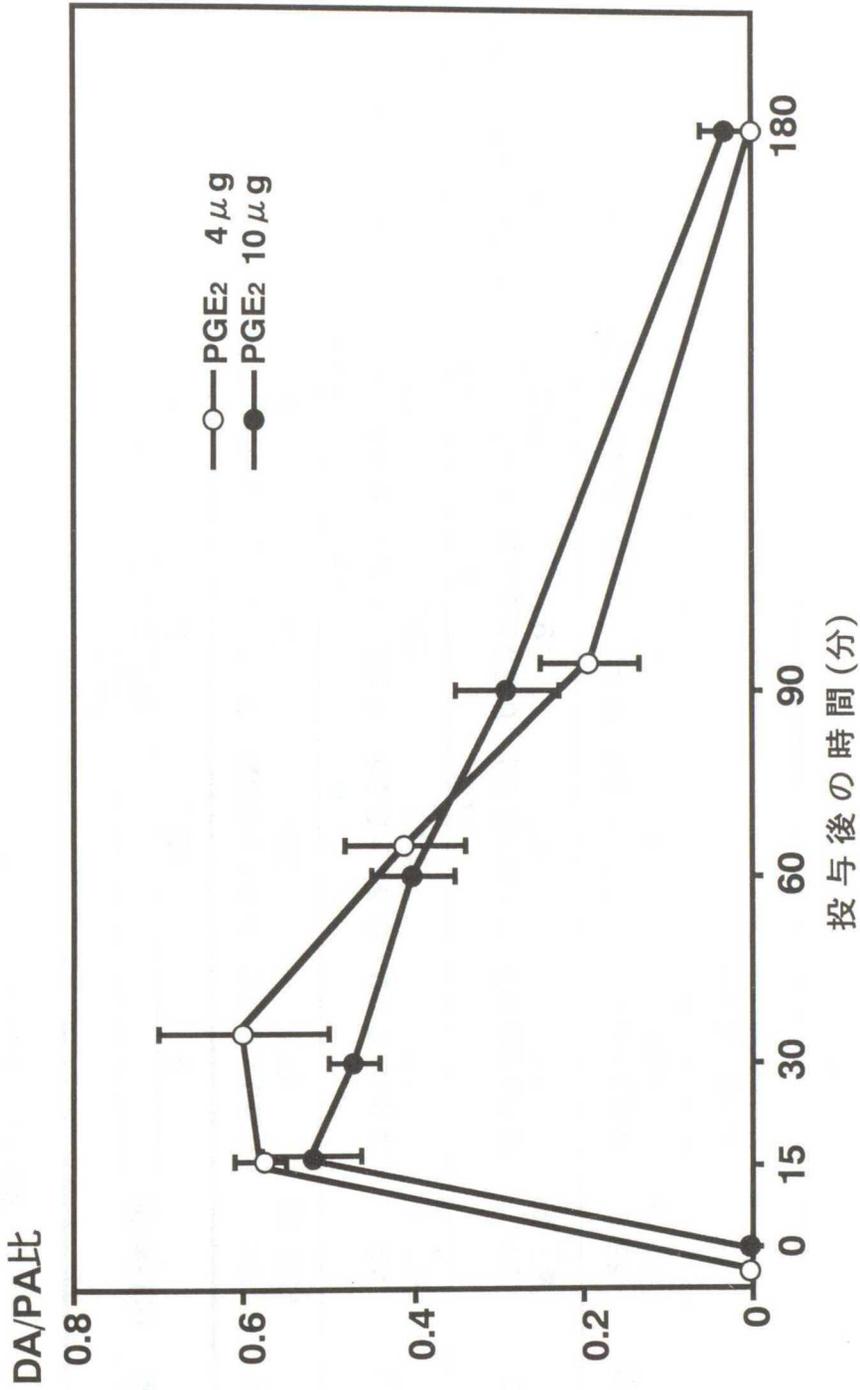


図-9、帝王切開3時間後の新生子にPGE₂投与後のDA/PA比の変化

各ポイントは平均 ± S.E.を示す (n = 6 ~ 11).

表-1. 帝王切開3時間後の新生子にPGEs投与後のDA/PA比の変化

群	薬物	投与量	総観察数	DA/PA比：平均±SEM					体重 平均±SEM (g)	
				投与後の時間 (min)						
				0	15	30	60	90	180	
PGE1	4 μg	50 (5) ※	50 (7)	0.00±0.00	0.37±0.02	0.31±0.03	0.09±0.02	0.03±0.01	0.00±0.00	4.81±0.04 (50)
PGE2	4 μg	50 (4) ※	50 (7)		*	**	***	***	*	4.88±0.06 (50)
				0.00±0.00	0.51±0.05 (11)	0.52±0.04 (9)	0.44±0.07 (7)	0.38±0.04 (7)	0.12±0.05 (8)	4.62±0.04 (49)
PGE2	10 μg	55 (6) ※	55 (8)		***	*	***	***	*	5.13±0.07 (55)
				0.00±0.00	0.52±0.06 (9)	0.47±0.03 (10)	0.40±0.05 (10)	0.29±0.06 (11)	0.03±0.03 (8)	4.88±0.06 (50)
Saline	Saline	54 (21) ※	54 (29)		-	-	-	-	-	4.91±0.06 (54)
				0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.91±0.06 (54)

() ※： () 内の値は母体数
() 内の値は4-6母体から得た例数
*：PGE1 (4 μg) 群と比べて有意差あり (*：P<0.05, ***：P<0.001).
一：実施せず

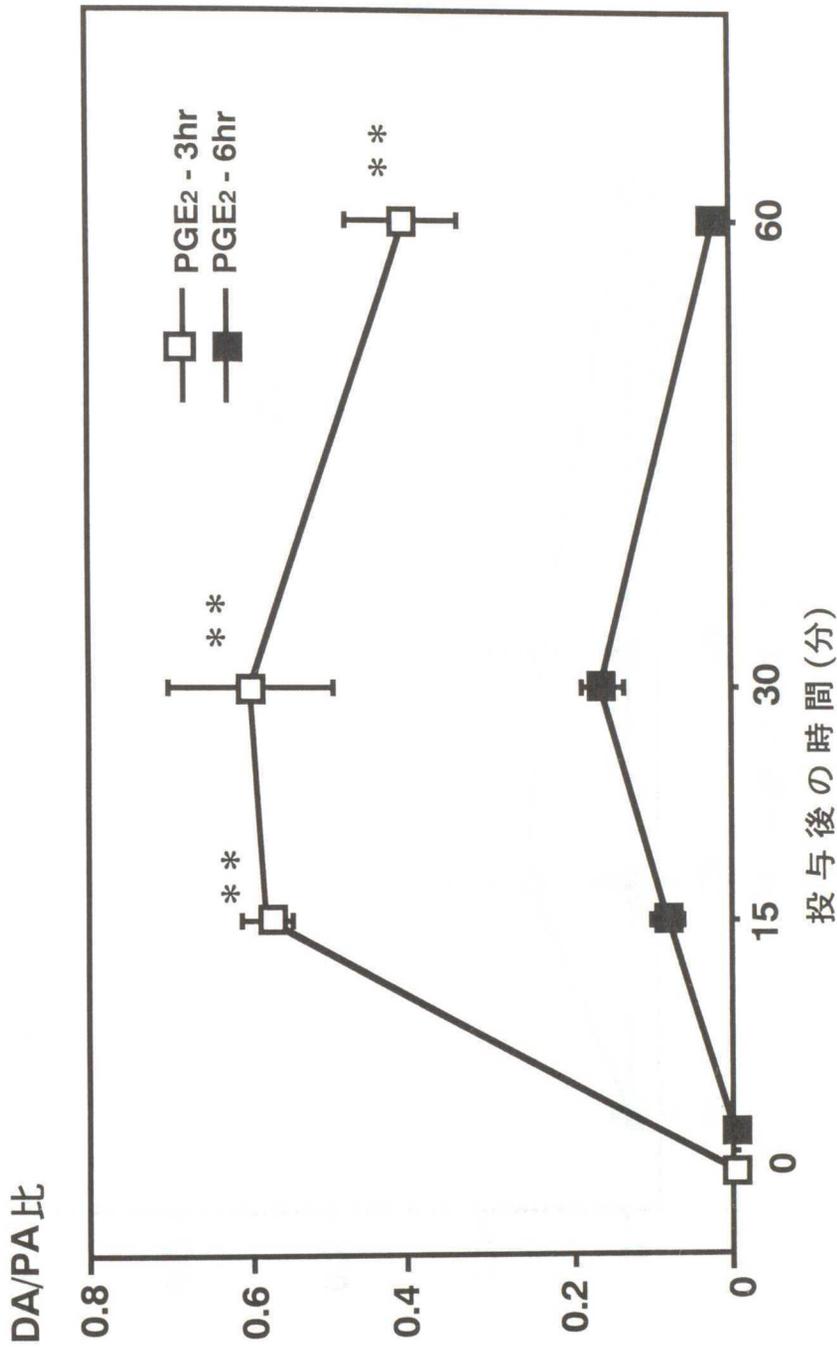


図-10、PGE₂投与後の新生子のDA/PA比に及ぼす生後の時間の影響

各ポイントは平均 ± S.E.を示す (n = 7 ~ 10).

*: 6時間群と比べて有意差あり (**: P < 0.01)

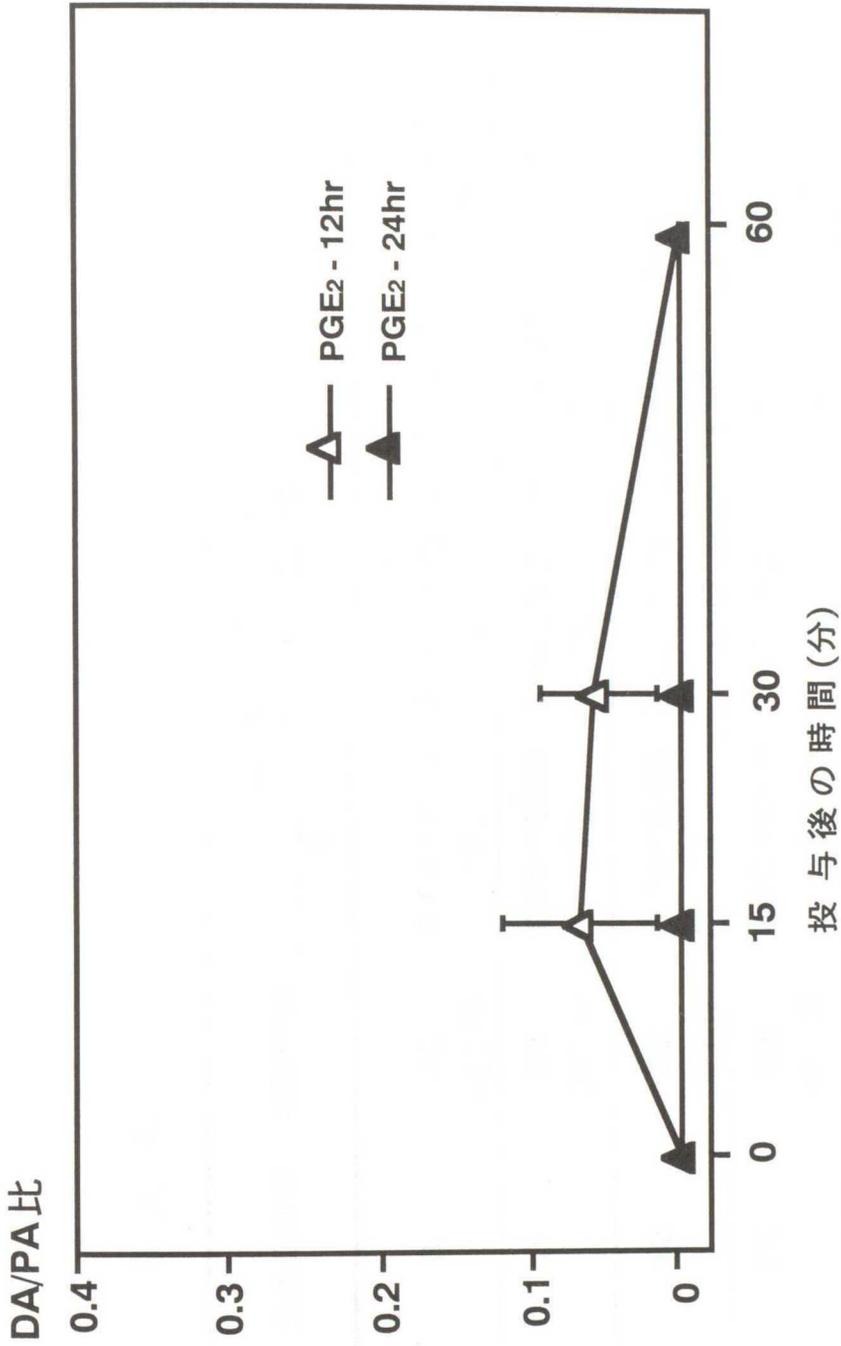


図-11、新生子にPGE₂投与後のDA/PA比に及ぼす生後の時間の影響

各ポイントは平均 ± S.E.Mを示す (n = 4 ~ 7).

表-2. 新生子にPGE2 (4 μg) 投与後の DA /PA 比に及ぼす生後の時間

群	生後の時間	総観察数	DA/PA 比 : 平均 ± SEM			体重 平均 ± SEM (g)	
			0	15	30		60
帝王切開	3	35 (4) ※	0.00 ± 0.00 (7)	0.58 ± 0.03 (9)	0.60 ± 0.10 (9)	0.41 ± 0.07 (10)	4.91 ± 0.07 (35)
	6	34 (6) ※	0.00 ± 0.00 (7)	0.09 ± 0.02 (9)	0.15 ± 0.03 (8)	0.01 ± 0.01 (10)	5.06 ± 0.06 (34)
自然分娩	12	22 (3) ※	0.00 ± 0.00 (4)	0.07 ± 0.05 (7)	0.06 ± 0.04 (6)	0.00 ± 0.00 (5)	5.14 ± 0.16 (22)
	24	23 (3) ※	0.00 ± 0.00 (5)	0.00 ± 0.00 (6)	0.00 ± 0.00 (6)	0.00 ± 0.00 (6)	5.11 ± 0.13 (23)

() ※ : () 内の値は母体数

() 内の値は3-6母体から得た例数

* : 6時間 群と比べて有意差あり(** : P < 0.01).

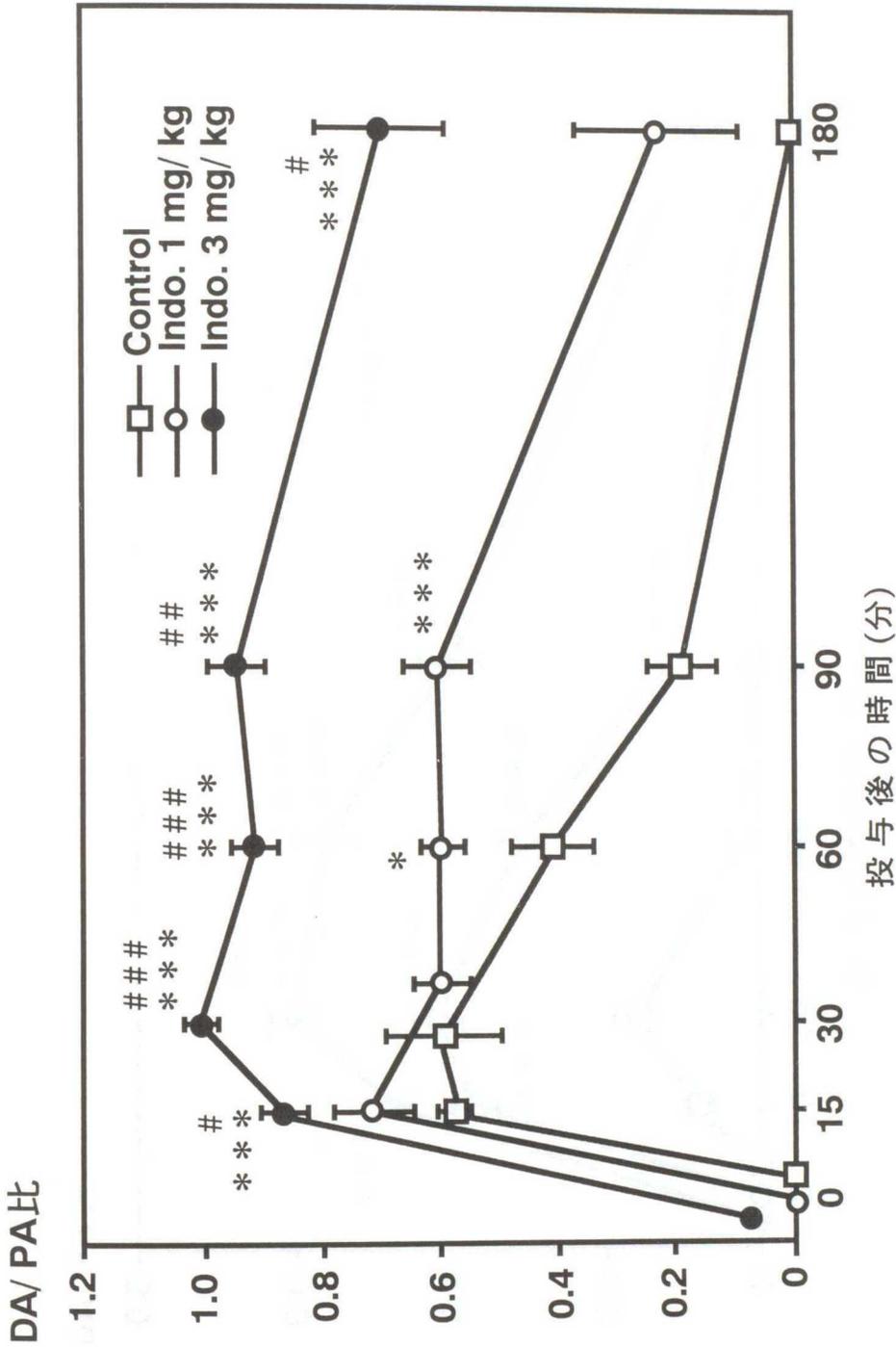


図-12、妊娠18、19、20日にインドメタシンを投与した母体から得た
 生後3時間の新生子にPGE₂投与後のDA/PA比の変化

各ポイントは平均 ± S.E.を示す (n = 4 ~ 10). Indo.: インドメタシン

: 無処置群と比べて有意差あり (: P<0.05, ***: P<0.001)

: インドメタシン 1mg/kg 群と比べて有意差あり (# : P<0.05, ## : P<0.01, ### : P<0.001)

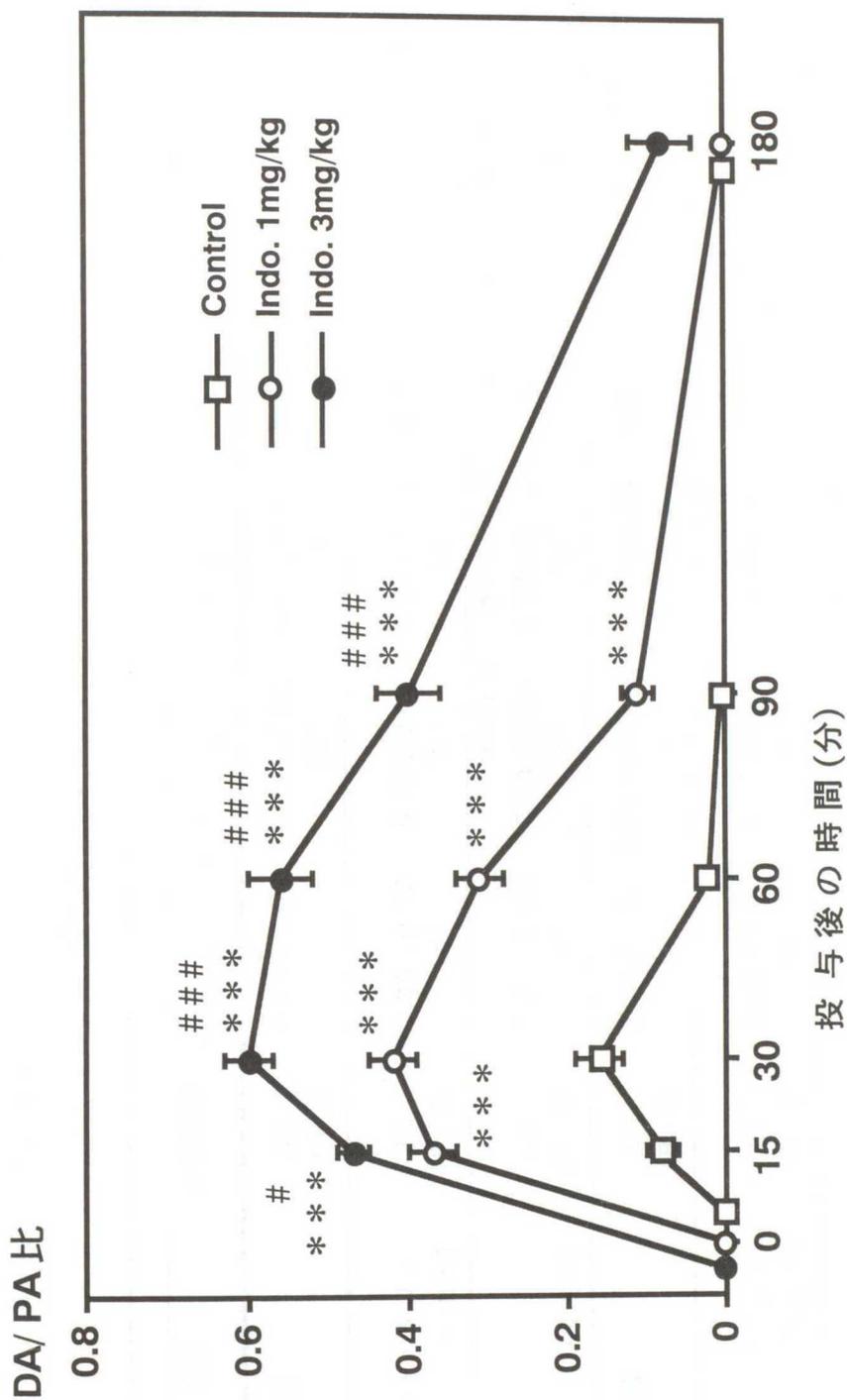


図-13、妊娠18、19、20日にインドメタシンを投与した母体から得た
生後6時間の新生子にPGE₂投与後のDA/PA比の変化

各ポイントは平均 ± S.E.を示す (n = 7 ~ 13). Indo.: インドメタシン
 * : 無処置群と比べて有意差あり (***: P < 0.001)
 # : 1mg/kg 群と比べて有意差あり (# : P < 0.05, ## : P < 0.01, ### : P < 0.001)

表-3. 妊娠18,19,20にインドメタシンを母体に投与して得た新生子にPGE2 (4 μg)投与後のDA/PA比の変化

PGE2 投与の時間	群	母体	総観察数	DA/PA 比: 平均 ± SEM				体重 平均 ± SEM (g)		
				0	15	30	60		90	180
生後3時間	無処置	インドメタシン 1mg/kg	50 (5) ※	0.00 ± 0.00 (7)	0.58 ± 0.03 (9)	0.60 ± 0.10 (9)	0.41 ± 0.07 (10)	0.19 ± 0.06 (9)	0.00 ± 0.00 (6)	4.88 ± 0.06 (50)
		インドメタシン 3mg/kg	36 (5) ※	0.00 ± 0.00 (5)	0.72 ± 0.07 (6)	0.57 ± 0.05 (6)	0.60 ± 0.04 (7)	0.61 ± 0.06 (6)	0.23 ± 0.14 (6)	5.01 ± 0.06 (36)
生後6時間	無処置	インドメタシン 1mg/kg	42 (7) ※	0.07 ± 0.03 (4)	0.88 ± 0.04 (9)	1.01 ± 0.03 (9)	0.92 ± 0.04 (8)	0.95 ± 0.05 (6)	0.71 ± 0.11 (6)	4.28 ± 0.09 (42)
		インドメタシン 3mg/kg	50 (8) ※	0.00 ± 0.00 (7)	0.09 ± 0.02 (9)	0.15 ± 0.03 (8)	0.01 ± 0.01 (10)	0.00 ± 0.00 (8)	0.00 ± 0.00 (8)	5.08 ± 0.05 (50)
生後6時間	無処置	インドメタシン 1mg/kg	52 (5) ※	0.00 ± 0.00 (8)	0.37 ± 0.03 (9)	0.42 ± 0.03 (9)	0.31 ± 0.03 (9)	0.11 ± 0.02 (8)	0.00 ± 0.00 (9)	5.10 ± 0.05 (52)
		インドメタシン 3mg/kg	73 (6) ※	0.00 ± 0.00 (10)	0.47 ± 0.02 (13)	0.60 ± 0.03 (13)	0.56 ± 0.04 (13)	0.40 ± 0.04 (12)	0.08 ± 0.04 (12)	4.70 ± 0.04 (73)

() ※ : () 内の値は母体数

() 内の値は5-8母体から得た例数

* : 無処置 群と比べて有意差あり (* : P < 0.05, *** : P < 0.001).

: インドメタシン1mg/kg群と比べて有意差あり(# : P < 0.05, ## : P < 0.01, ### : P < 0.001).

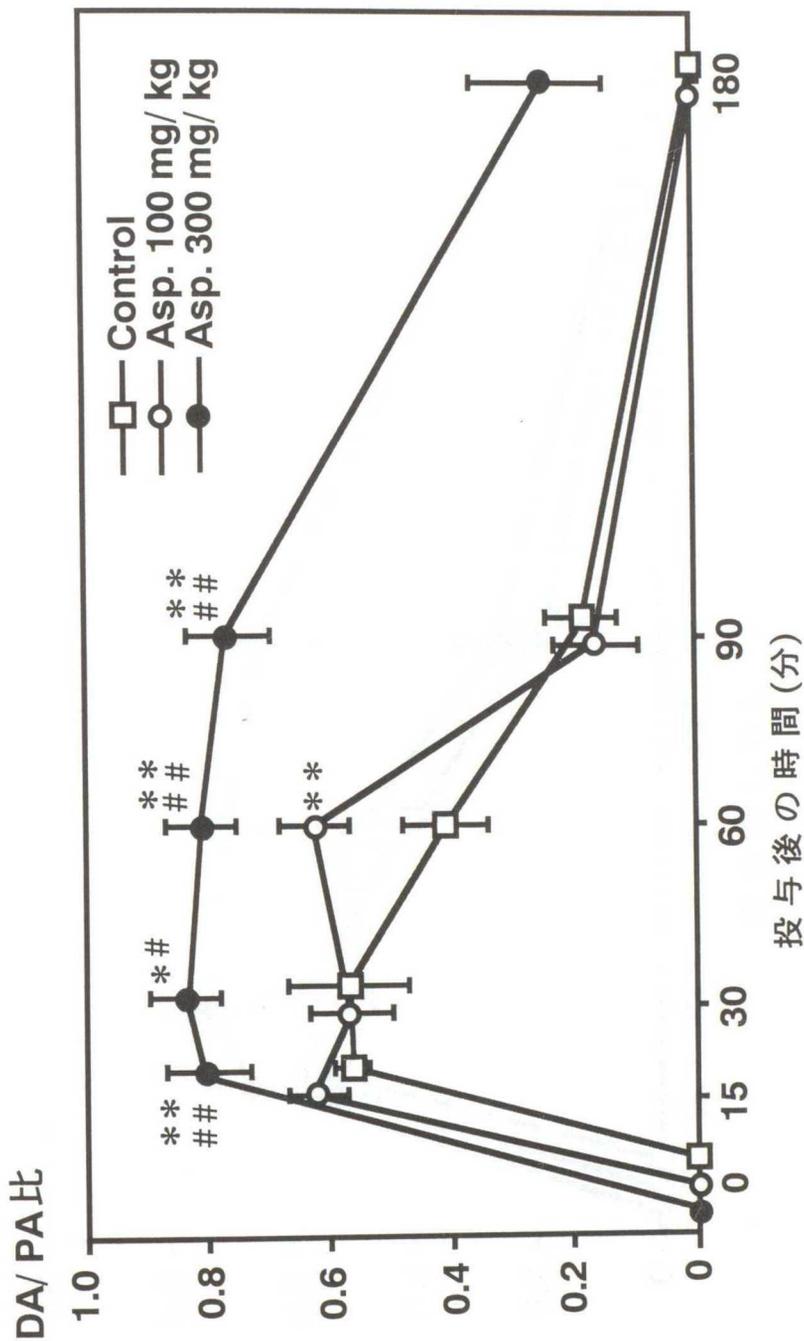


図-14、妊娠18、19、20日にアスピリンを投与した母体から得た
 生後3時間の新生子にPGE₂投与後のDA/PA比の変化

各ポイントは平均 ± S.E.を示す (n = 6 ~ 14). Asp.: アスピリン

* : 無処置群と比べて有意差あり (* : P < 0.05, ** : P < 0.001)

: アスピリン 100mg/kg 群と比べて有意差あり (# : P < 0.05, ## : P < 0.01, ### : P < 0.001)

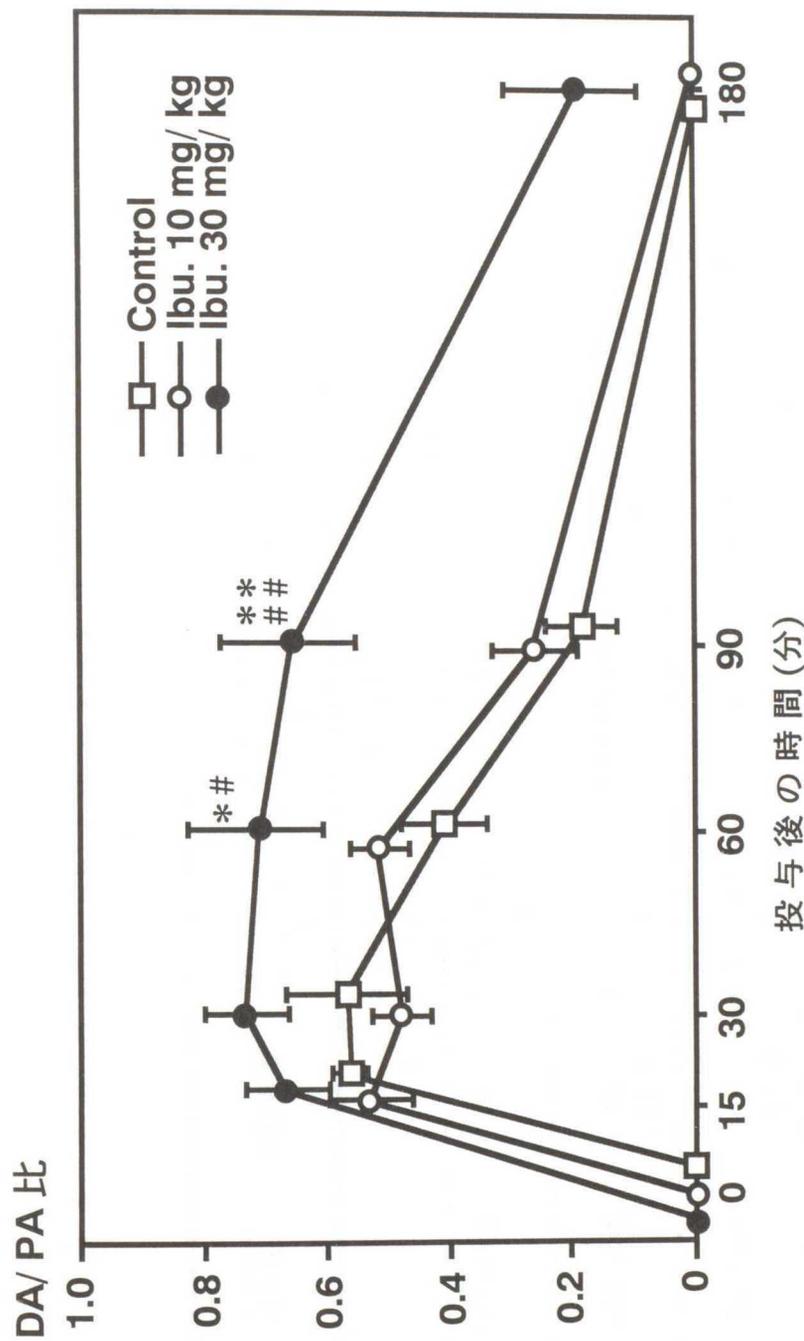


図-15、妊娠18、19、20日にイブプロフェンを投与した母体から得た
生後3時間の新生子にPGE₂投与後のDA/PA比の変化

各ポイントは平均 ± S.E.を示す (n = 5 ~ 12). Ibu.: イブプロフェン

: 無処置群と比べて有意差あり (: P < 0.05, ***: P < 0.001)

#: イブプロフェン 10mg/kg 群と比べて有意差あり (#: P < 0.05, ##: P < 0.01,

###: P < 0.001)

表-4. 妊娠18,19, 20にアスピリンとイブプロフェンを母体に投与して得た新生子に
PGE2 (4 μg)投与後のDA/PA比の変化

群	投与量	総観察数	DA/PA 比: 平均 ± SEM				体重 平均 ± SEM (g)		
			0	15	30	60		90	180
無処置		50	0.00 ± 0.00	0.58 ± 0.03	0.60 ± 0.10	0.41 ± 0.07	0.19 ± 0.06	0.00 ± 0.00	4.88 ± 0.06
		(4) ※	(7)	(9)	(10)	(9)	(6)	(50)	
イブプロフェン	10mg/kg	64	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.05	0.50 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.28 ± 0.06	0.00 ± 0.00	4.80 ± 0.11
		(6) ※	(8)	(11)	(11)	(12)	(11)	(11)	(64)
	30mg/kg	46	0.00 ± 0.00	0.68 ± 0.06	0.73 ± 0.06	0.66 ± 0.10	0.64 ± 0.09	0.17 ± 0.08	4.58 ± 0.10
		(5) ※	(5)	(9)	(8)	(8)	(8)	(8)	(46)
アスピリン	100mg/kg	67	0.00 ± 0.00	0.62 ± 0.04	0.59 ± 0.05	0.63 ± 0.06	0.14 ± 0.08	0.00 ± 0.00	4.84 ± 0.06
		(6) ※	(8)	(14)	(13)	(14)	(9)	(9)	(67)
	300mg/kg	71	0.01 ± 0.01	0.78 ± 0.07	0.81 ± 0.05	0.76 ± 0.05	0.73 ± 0.06	0.21 ± 0.10	4.42 ± 0.06
		(7) ※	(9)	(11)	(14)	(11)	(12)	(13)	(71)

PGE2 (4 μg)投与は帝王切開3時間後に実施した

() ※: () 内の値は母体数

() 内の値は3-8母体から得た例数

: 無処置 群と比べて有意差あり (: P < 0.05, ***: P < 0.001)

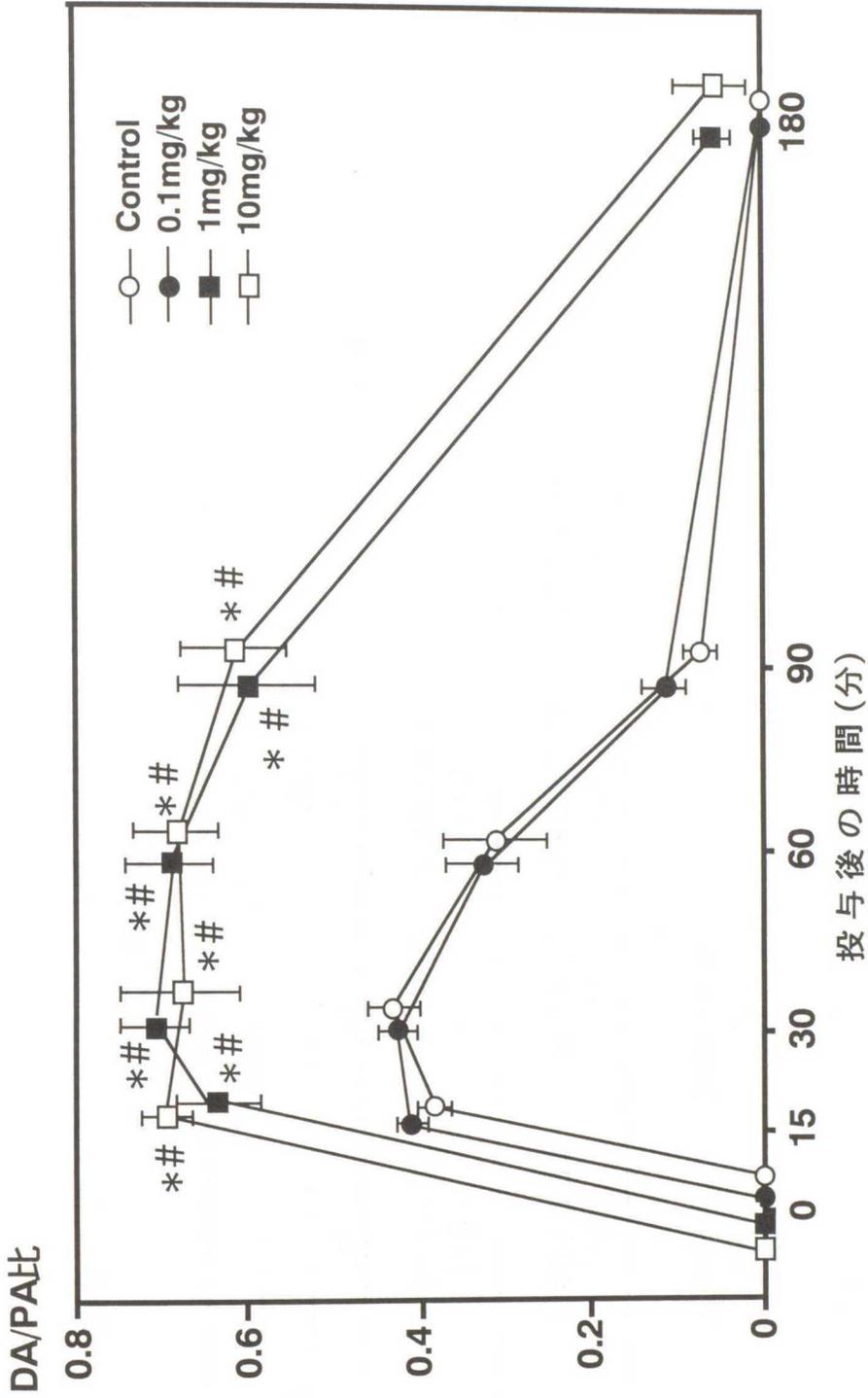


図-16、エナラプリルを投与した母体ラットから得た新生子における PGE₂投与後のDA/PA比の変化

各ポイントは平均 ± S.E.を示す (n = 9 ~ 19).
 * : 対照群との間に有意差あり (* : P < 0.01)
 # : 0.1mg群と比べて有意差あり (# : P < 0.01)

表-5. エナラプリルを7日間連続投与した母体ラットから得た新生子における
PGE2投与後のDA/PA比の変化

投与量 エナラプリル (mg/kg)	DA/PA比：平均±S.E. (例数)					体重 (g) 平均±S.E. (総観察数)	
	0	15	30	60	90		180
0 (対照群)	0.00±0.00 (12)	0.38±0.02 (13)	0.43±0.03 (13)	0.31±0.06 (14)	0.07±0.02 (10)	0.00±0.00 (9)	5.34±0.04 (71)
0.1	0.00±0.00 (16)	0.42±0.02 (14)	0.43±0.02 (19)	0.33±0.04 (14)	0.11±0.02 (14)	0.00±0.00 (11)	5.27±0.03 (88)
1	0.02±0.01 (12)	0.64±0.05 (14)	0.71±0.04 (14)	0.69±0.05 (14)	0.60±0.08 (14)	0.06±0.02 (13)	4.72±0.06 (81)
10	0.03±0.01 (12)	0.72±0.03 (15)	0.70±0.07 (14)	0.69±0.05 (14)	0.63±0.06 (13)	0.10±0.04 (13)	4.62±0.06 (81)

() 内の値は例数

* : 対照群との間に統計学的有意差あり (* : P<0.01)

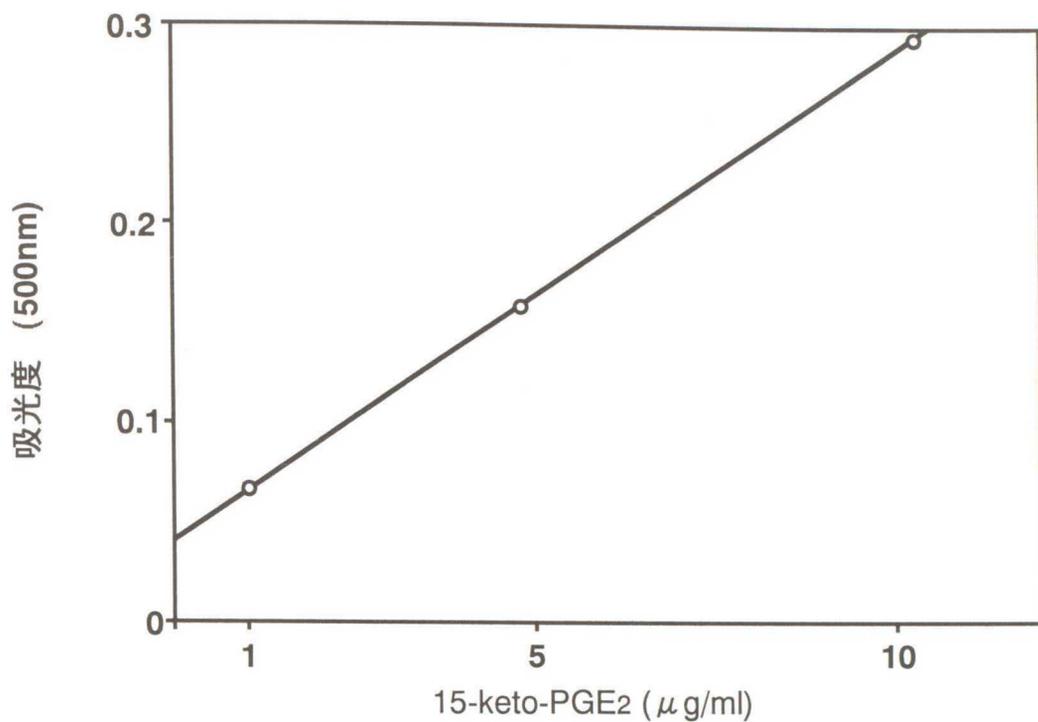


図-17. 15-keto-PGE₂の検量線

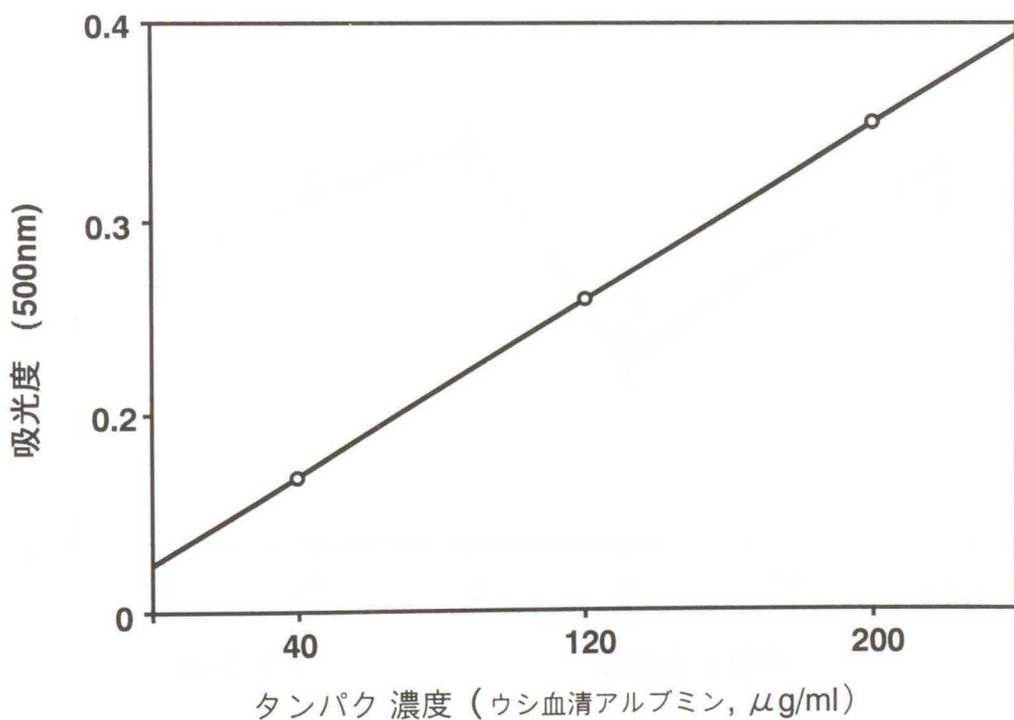


図-18. タンパクの検量線

表-6. 肺組織中のPGDH活性の経時的変化

群	例数	PGDH活性 平均±S.E. (p mol / min / mg protein)
胎子	20日	4 22.1 ± 1.00
	21日	4 25.5 ± 1.19
新生子	生後3時間	3 27.8 ± 1.02
	生後6時間	4 18.3 ± 1.38 *
	生後12時間	3 23.0 ± 1.68
	生後24時間	4 26.9 ± 1.70

* : 前値との間に統計学的有意差あり (* : P < 0.05)

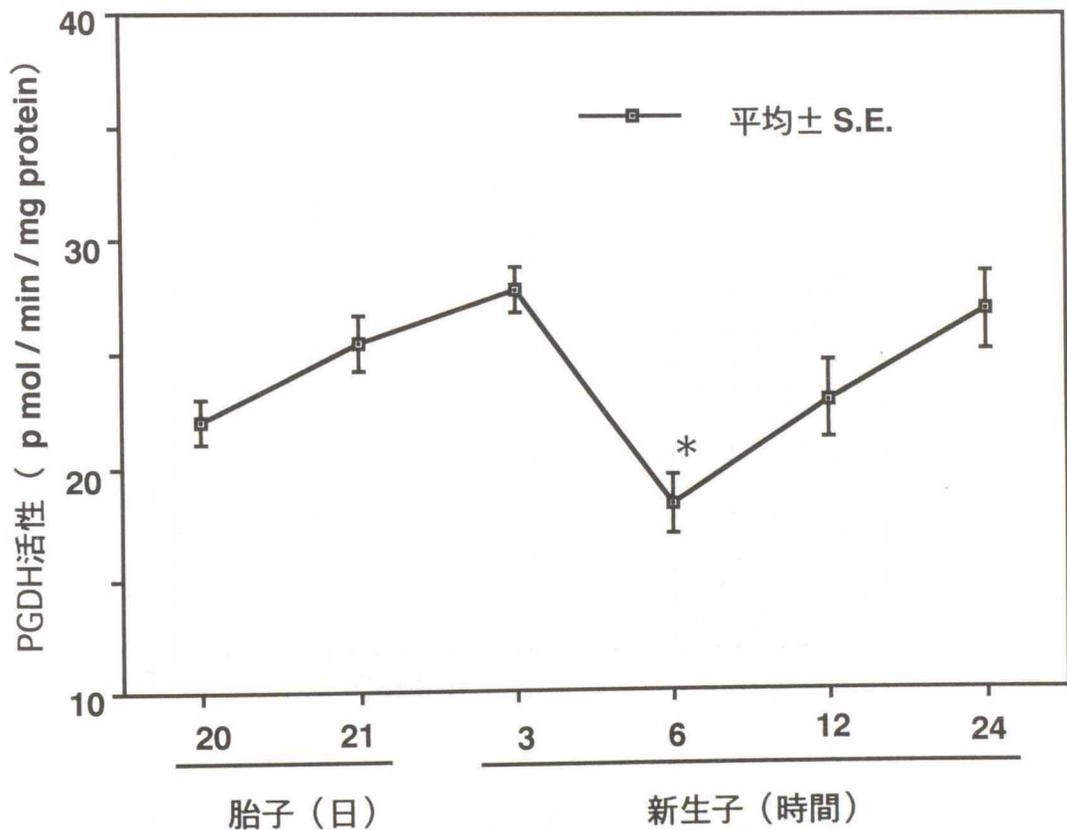


図-19、肺組織中のPGDH活性の経時的変化

* : 前値との間に統計学的有意差あり (* : P < 0.05)

表-7. インドメタシンを投与した母体ラットから得た
新生子の肺の PGDH 活性

インドメタシン 投与量 (mg/kg)	例数	PGDH活性 平均±S.E. (p mol / min / mg protein)
0	6	27.9±2.5
3	6	19.6±1.1 *

母体ラットにインドメタシン3mg/kg/day をを3日間経口投与した。
* : controlとの間に統計学的有意差あり (* : P<0.05)

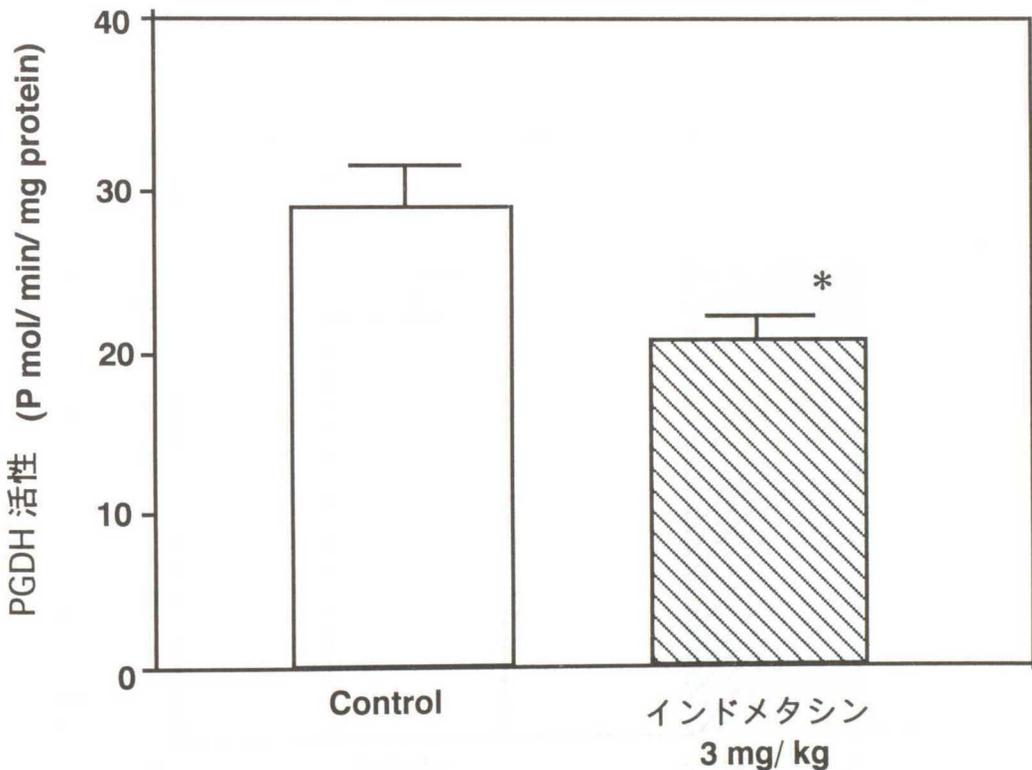


図-20. インドメタシンを投与した母体ラットから得た
新生子の肺のPGDH活性

* : control 群との間に統計学的有意差有り (P<0.05)

表-8. 母体ラットへのエナラプリル連続投与後の
新生子肺のPGDH活性

エナラプリル 投与量 (mg/kg)	例数	PGDH活性 平均±S.E. (p mol / min / mg protein)
0	4	28.0±2.97
10	4	30.9±3.08

母体ラットに7日間エナラプリル10mg/kgを経口投与した

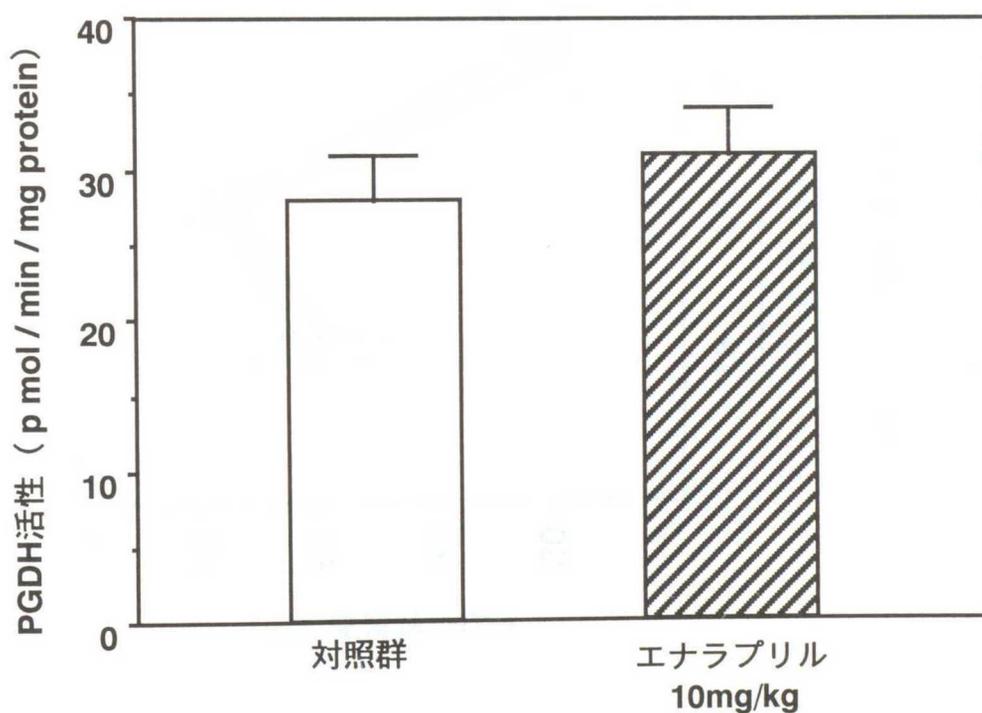


図-21. 母体ラットへのエナラプリル連続投与後の
新生子の肺のPGDH活性

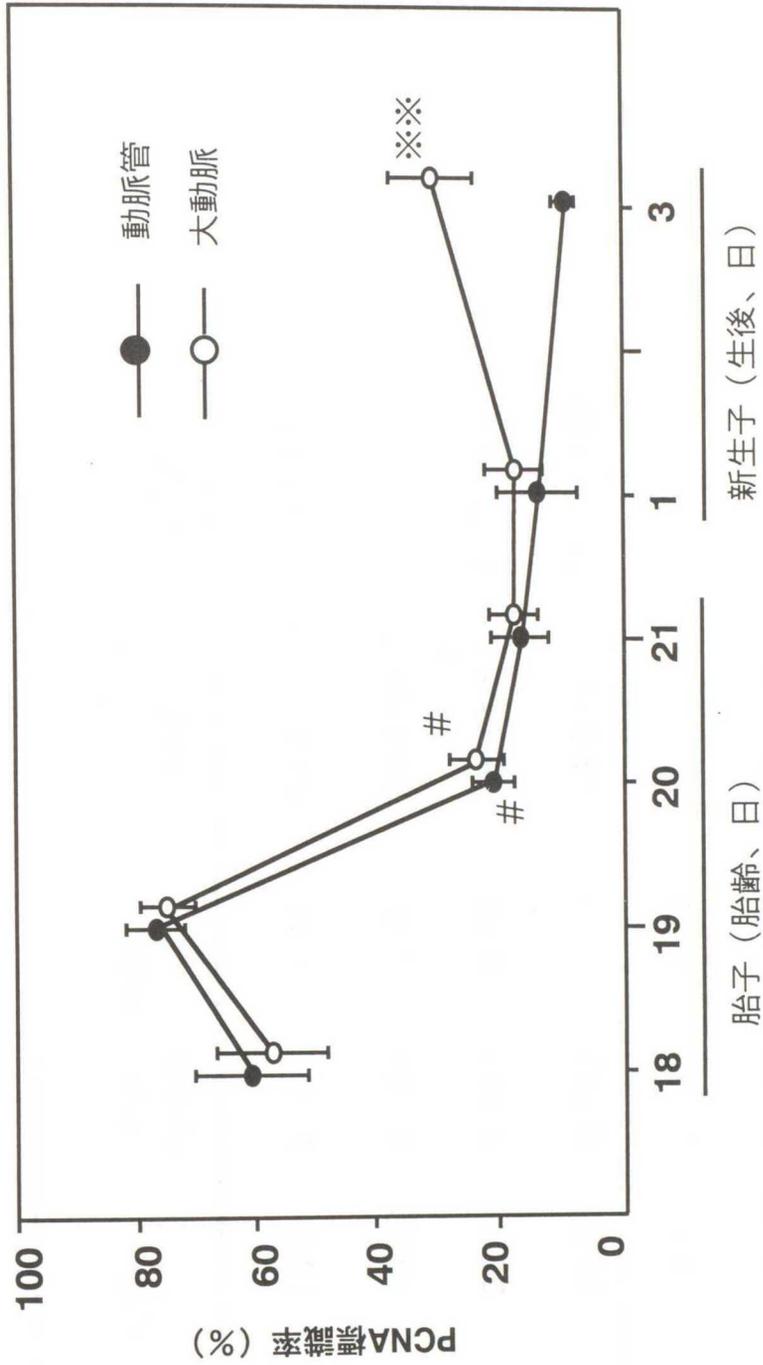


図-22、周生期の動脈管および大動脈の中膜平滑筋細胞の PCNA標識率の変化

: 前日齢の同群との間に有意差あり (# : P < 0.05)
 ※※ : 同日齢の両群間に有意差あり (※※ : P < 0.01)

表-9. 周生期の動脈管および大動脈の中膜平滑筋細胞のPCNA標識率の変化

胎齡	例数 (母体数)	b 体重 (g)	PCNA標識率			
			動脈管	大動脈	動脈管	大動脈
			平均±S.E.	平均±S.E.	角度変換値	平均±S.E.
18日	9 (3)	1.45	60.2±9.37	55.9±9.10	51.3±5.89	48.5±5.66
胎子	9 (3)	2.3	75.4±4.77	73.4±4.39	61.0±3.26	59.5±2.89
20日	9 (3)	3.37	19.4±3.55	22.3±4.39	25.5±2.53	27.3±3.18
21日	9 (3)	4.98	14.9±4.70	15.9±4.06	21.4±3.49	22.0±3.48
新生子	6 (3)	5.75	13.4±5.26	15.2±3.70	20.1±3.99	22.4±2.34
生後1日	6 (3)	11.54	7.4±1.81	29.3±6.93	15.2±2.18	32.0±4.64
生後3日	6 (3)					

b : 体重はサンプリング時、1個体のみ測定した

: 前日齡の同群との間に有意差あり (# : P<0.05)

※ : 同日齡の両群間に有意差あり (※ : P<0.01)

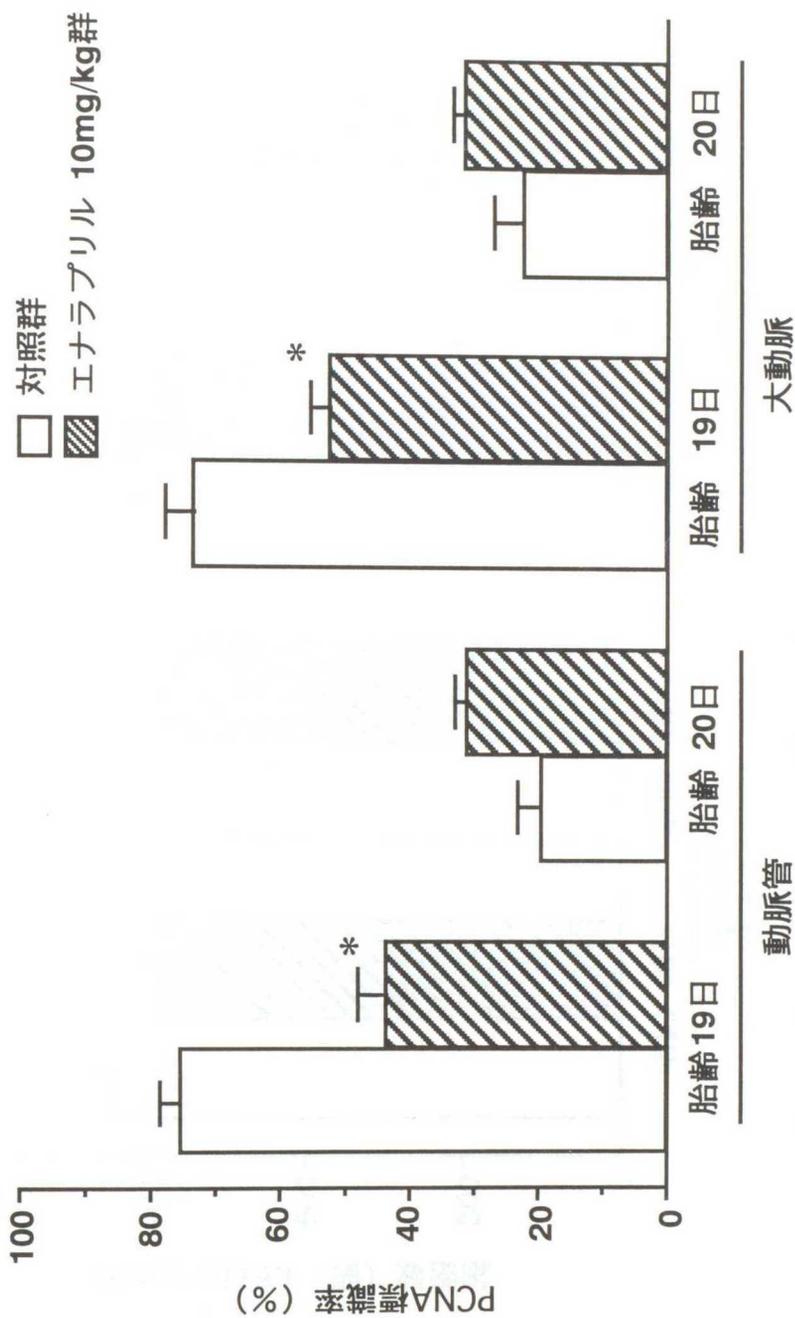


図-23. エナラプリルを母体に投与後の胎子動脈管と大動脈の中膜の平滑筋細胞のPCNA標識率

* : 同日の対照群と統計学的有意差あり (* : $P < 0.05$)

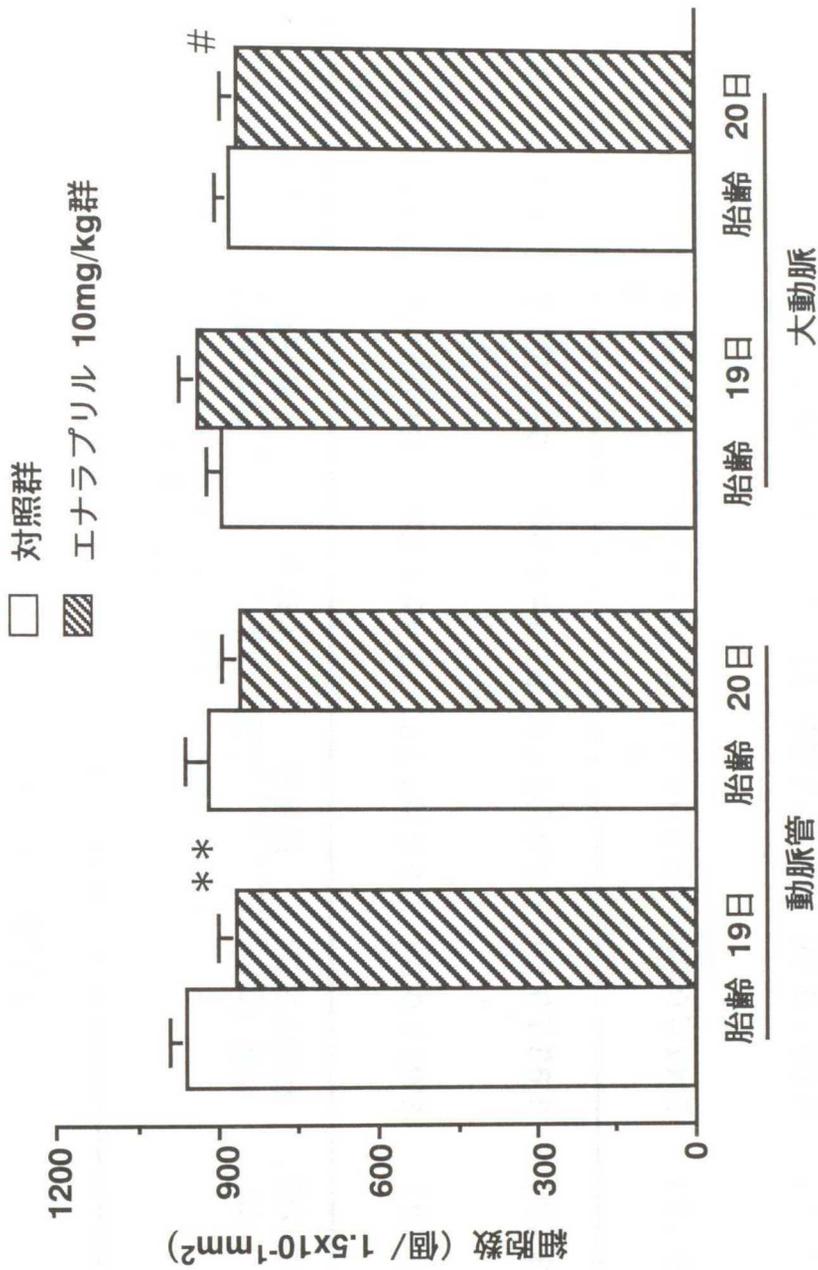


図-24、エナラプリルを母体に投与後の胎子動脈管と大動脈の
中膜平滑筋細胞の単位面積当たりの細胞核数

*：同日の対照群と統計学的有意差あり (**： $P < 0.01$)

#：前日齢の同群との間に有意差あり (#： $P < 0.05$)

表-10. エナラプリルを母体に投与後の胎子動脈管と大動脈の中膜の平滑筋細胞の
PCNA標識率と単位面積当たりの細胞核数

群	胎齡 (日)	例数 (母体数)	体重 (g) 平均±S.E.	PCNA標識率				単位面積当たりの細胞核数 ^b	
				平均±S.E.		角度変換値		平均±S.E.	
				動脈管	大動脈	動脈管	大動脈	動脈管	大動脈
対照群	19	9 (3)	2.63±0.04	75.4±4.77	73.4±4.39	61.0±3.26	59.5±2.89	960±20.5	892±23.8
	20	9 (3)	3.93±0.04	19.4±3.55	22.3±4.39	25.5±2.53	27.3±3.18	917±29.8	880±22.9
投与群 ^a	19	9 (3)	2.41±0.03	43.6±4.27	52.2±2.75	41.2±2.55	46.3±1.59	865±21.2	933±20.6
	20	9 (3)	3.93±0.04	30.9±2.23	31.2±2.11	33.7±1.37	33.9±1.29	858±13.3	865±16.9

a : 母体に7日間エナラプリル10mg/kgを経口投与した

* : 同日の対照群と統計学的有意差あり (* : P<0.01)

: 前日齡の同群との間に有意差あり (# : P<0.05)

b : 個/単位面積 (0.15 square mm)

図-25、胸部の横断像

DA：動脈管
Ao：大動脈
PCNA免疫染色
x 27

図-26、動脈管の横断像

L：血管内腔
E：内皮細胞
S：平滑筋細胞
PCNA免疫染色
x 270

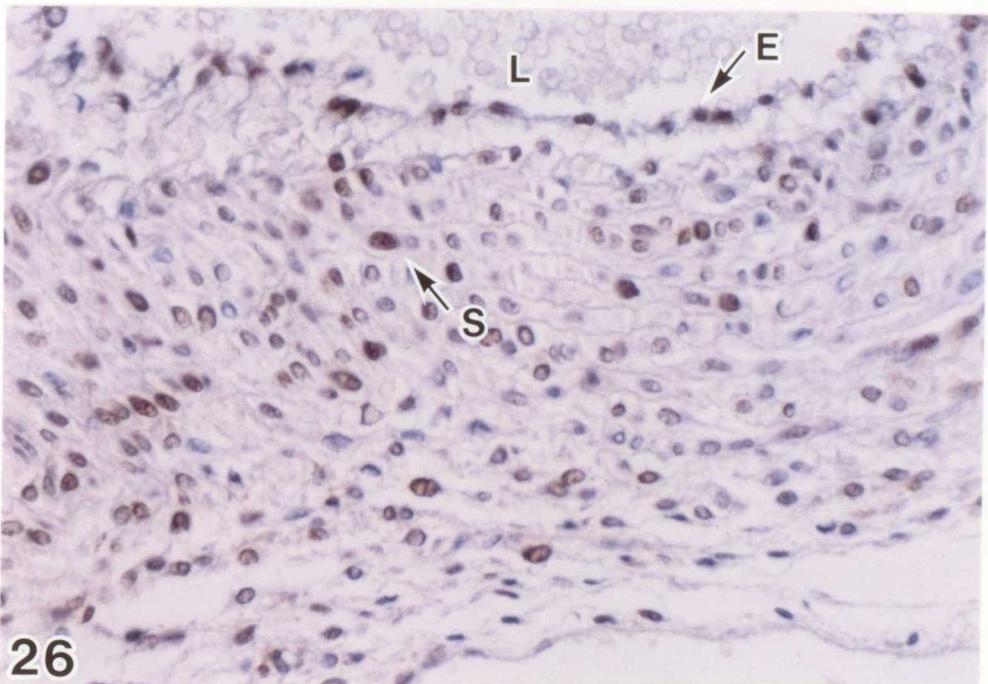
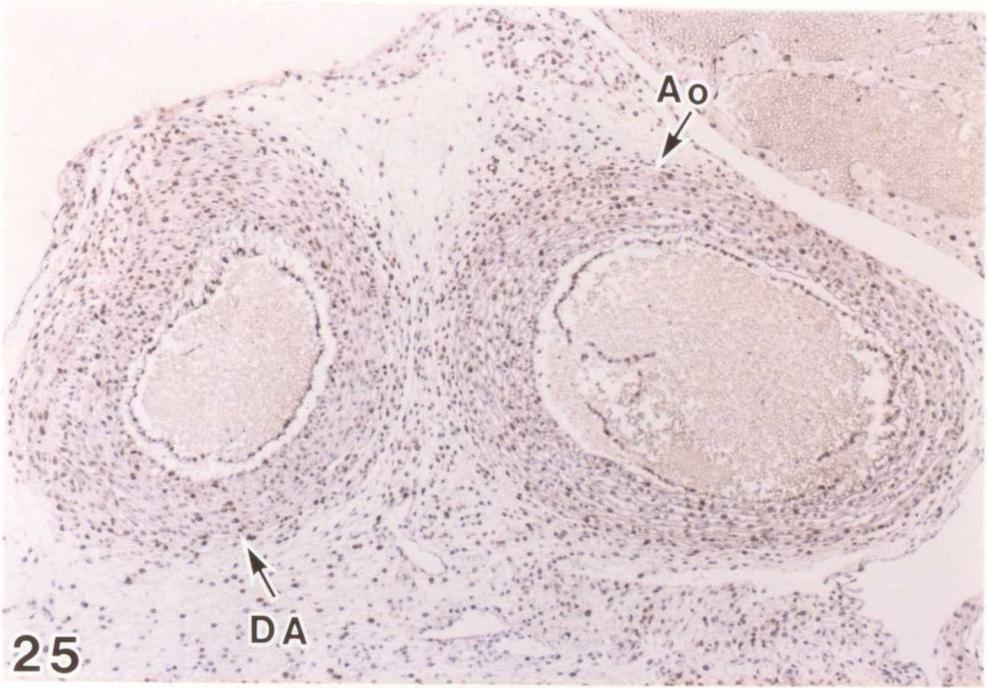


図-27、胎齡19日の動脈管

中膜には豊富な平滑筋細胞が観察され、大半がPCNA陽性細胞である。

L : 血管内腔
↑ : PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

図-28、胎齡19日の大動脈

組織学的には動脈管（図-27）と同様である。中膜には豊富な平滑筋細胞が観察され、大半がPCNA陽性細胞である。

L : 血管内腔
↑ : PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

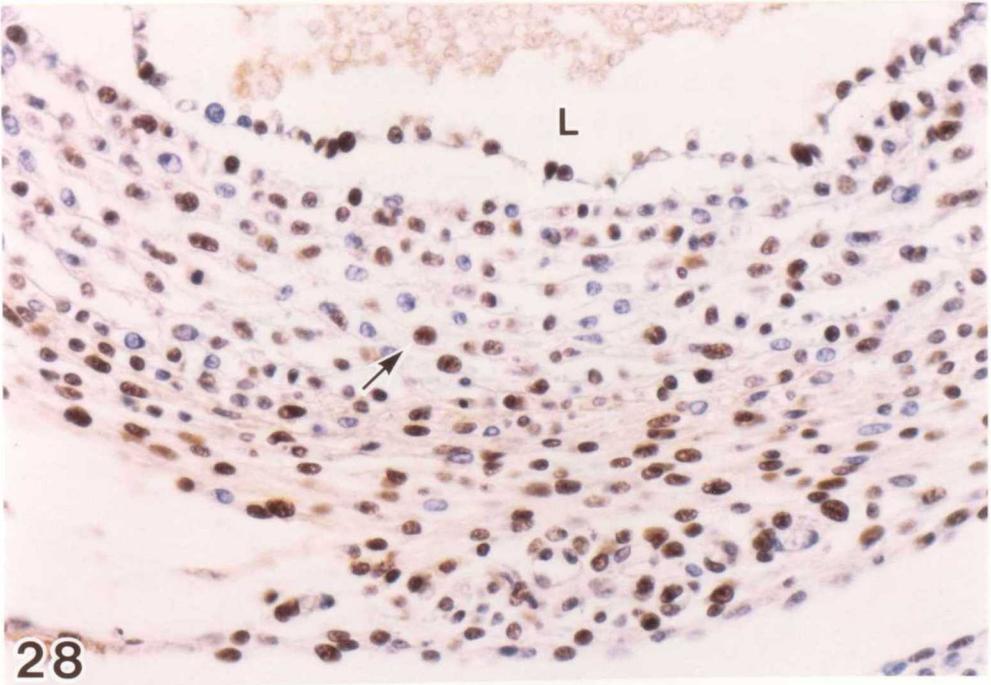
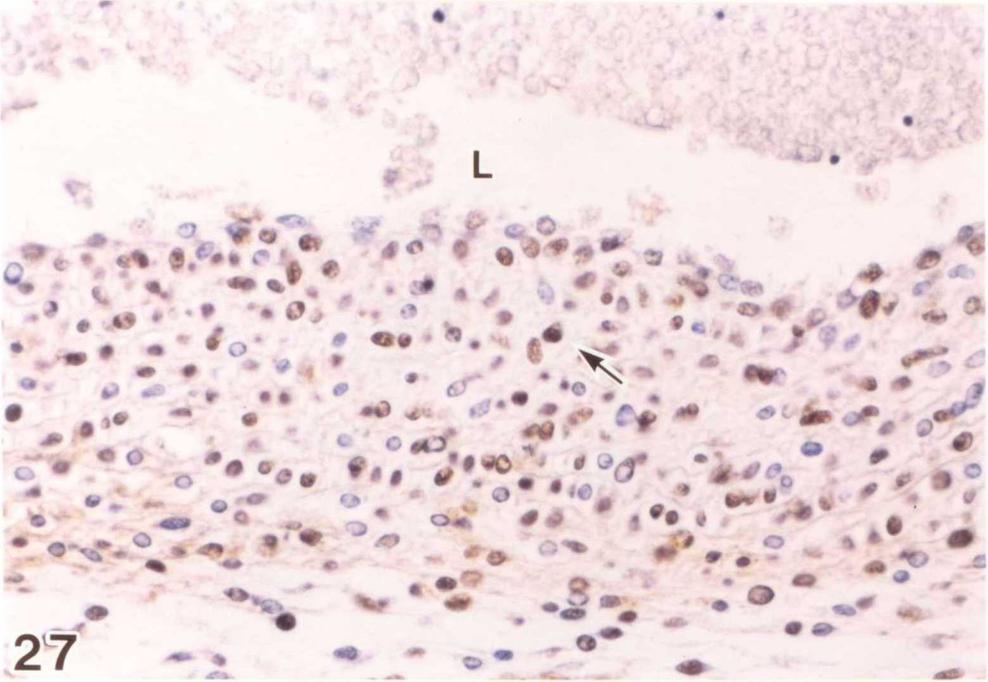


図-29、胎齡20日の動脈管

胎齡19日の動脈管（図-27）と比べると、中膜のPCNA陽性細胞は著しく減少している。

L：血管内腔
↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

図-30、胎齡20日の大動脈

胎齡19日の大動脈（図-28）と比べると、中膜のPCNA陽性細胞は著しく減少している。胎齡20日の動脈管（図-29）とはほぼ同様である。

L：血管内腔
↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

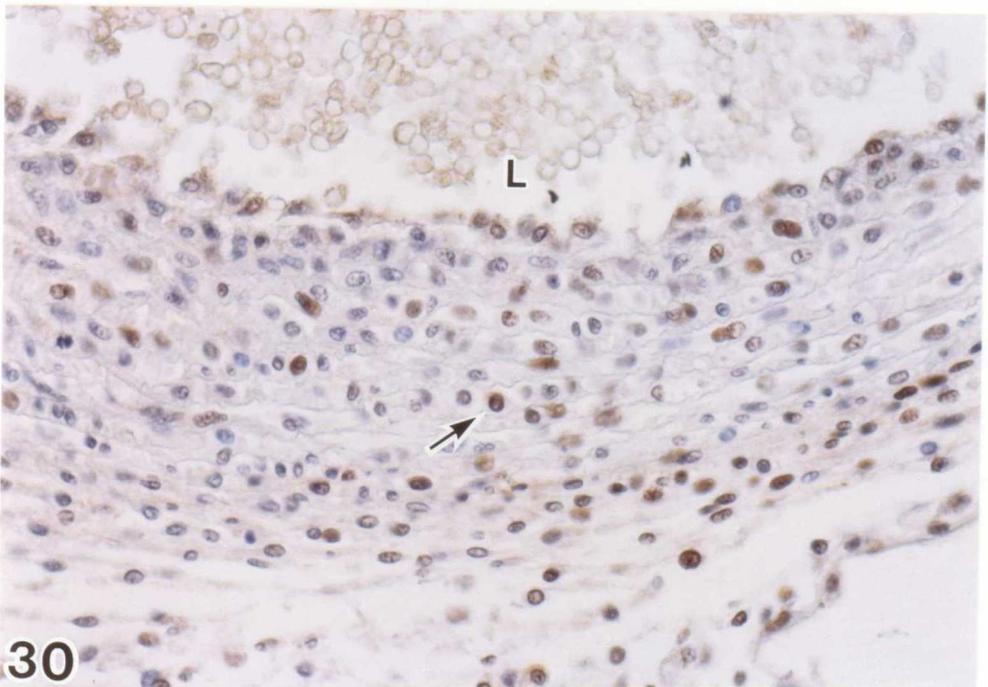
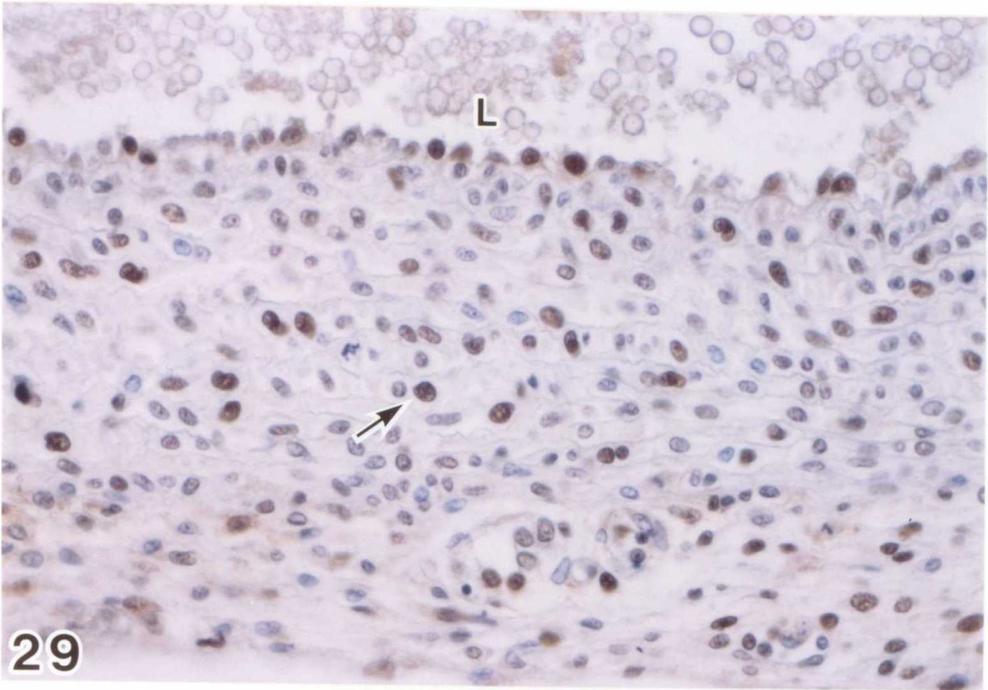


図-31、生後1日の動脈管

胎齡20日の動脈管（図-29）と比べると、
中膜のPCNA陽性細胞はやや減少してい
る。

↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

図-32、生後1日の大動脈

胎齡20日の大動脈（図-30）と比べると、
中膜のPCNA陽性細胞はやや減少してい
る。生後1日の動脈管（図-31）とはほぼ
同様である。

L：血管内腔
↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

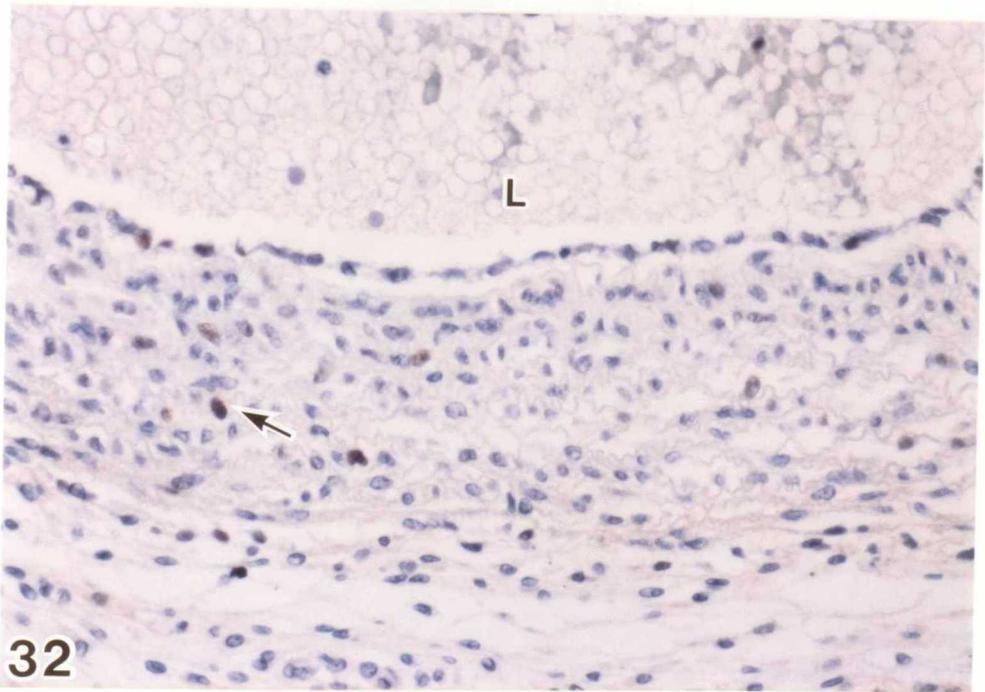
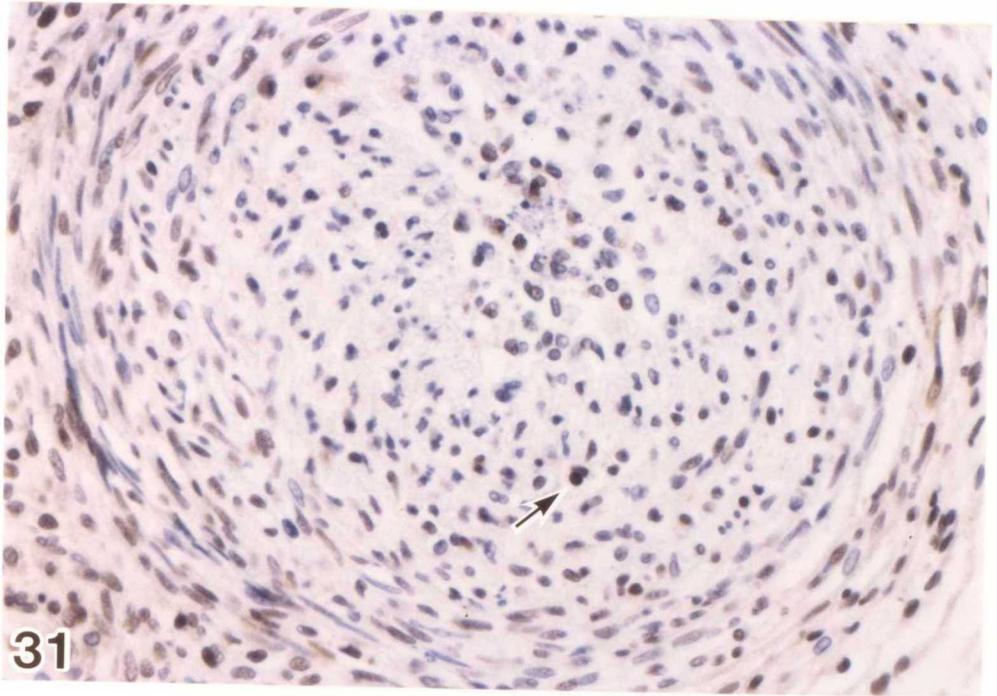


図-33、生後3日の動脈管

生後1日（図-31）と比べると、中膜のPCNA陽性細胞はやや減少している。

↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

図-34、生後3日の大動脈

生後1日の大動脈（図-32）と比べると、中膜のPCNA陽性細胞は増加しており、生後3日の動脈管（図-33）と比べても増加している。

L：血管内腔
↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

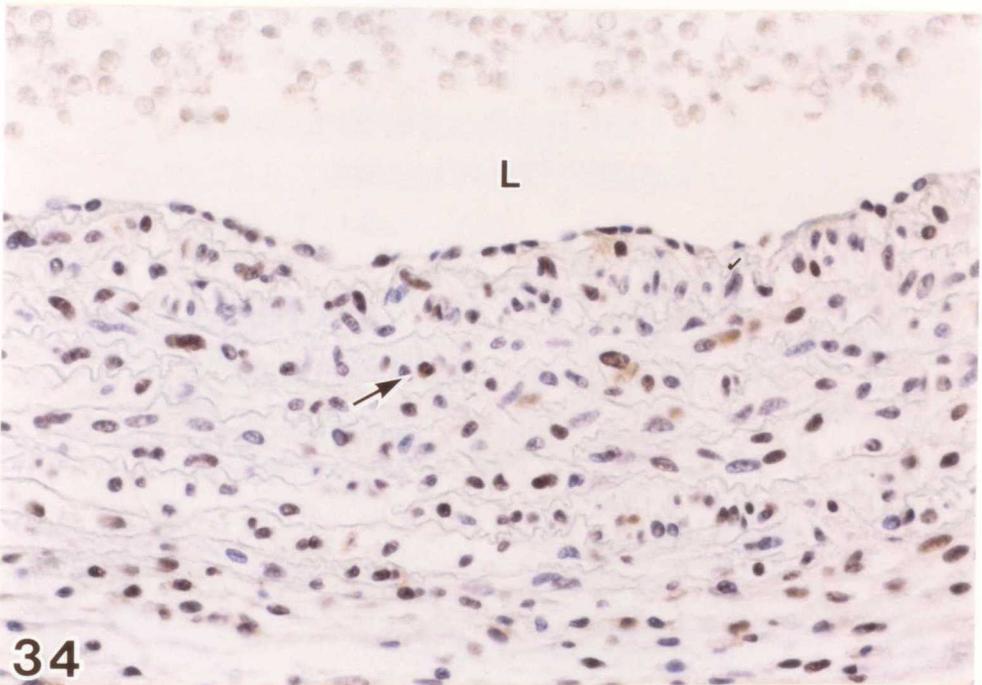
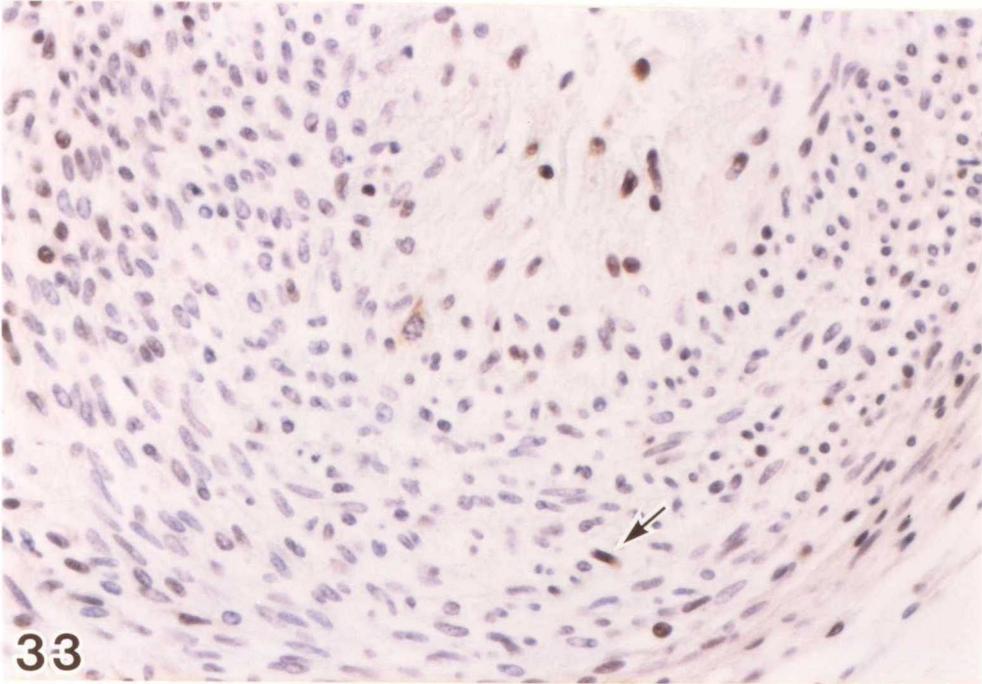


図-35、胎齡19日の無処置の
動脈管

L：血管内腔
↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

図-36、胎齡19日の投与群の
動脈管

対照群の胎齡19日の動脈管（図-35）と
比べると、中膜のPCNA陽性細胞は著し
く減少している。

L：血管内腔
↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

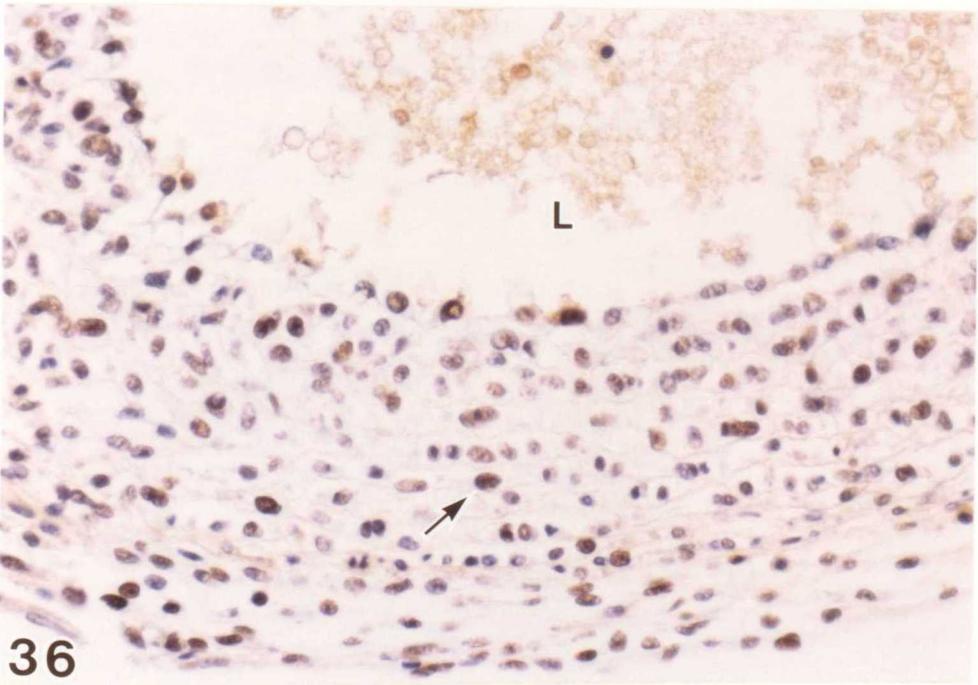
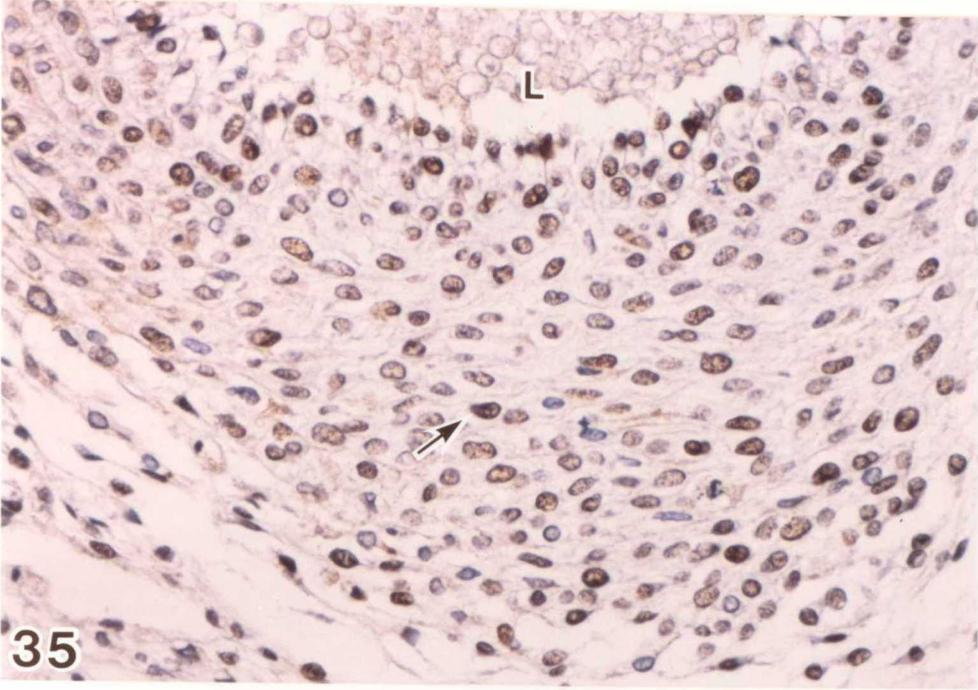


図-37、胎齡20日の無処置の
動脈管

L：血管内腔
↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

図-38、胎齡20日の投与群の
動脈管

対照群の胎齡20日の動脈管（図-37）と
比べると、中膜のPCNA陽性細胞に差
はない。

L：血管内腔
↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

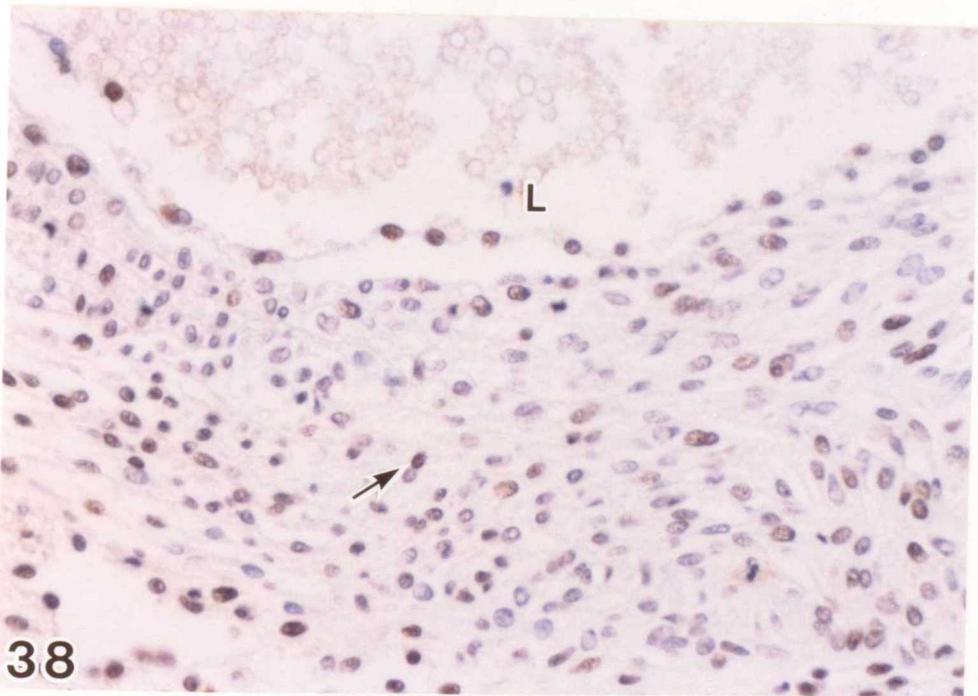
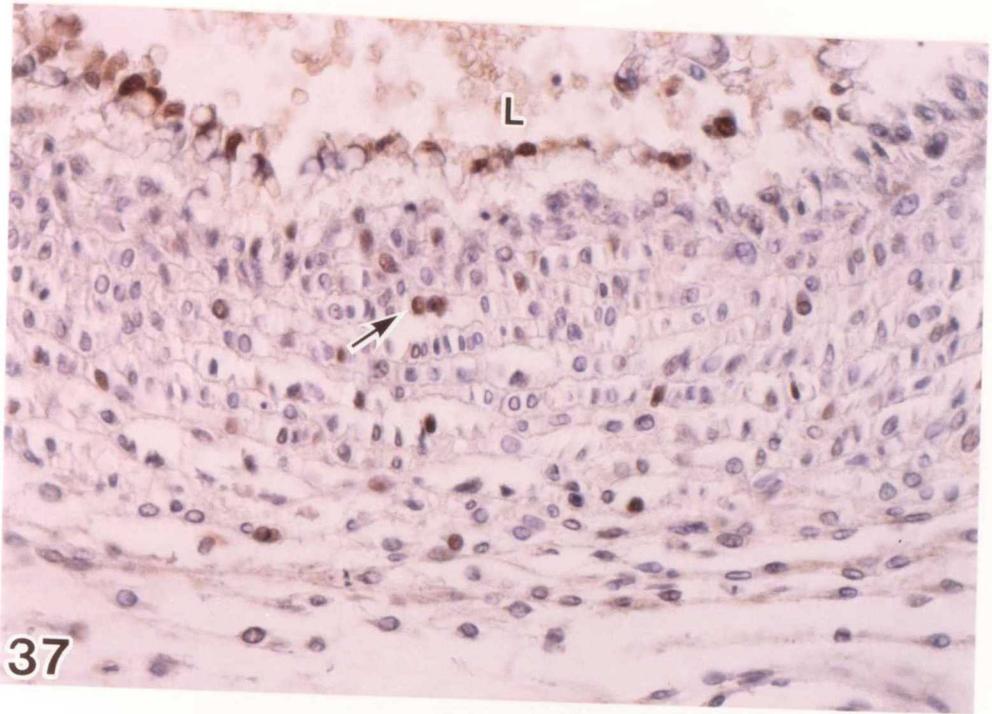


図-39、胎齡19日の無処置の
大動脈

L：血管内腔
↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

図-40、胎齡19日の投与群の
大動脈

対照群の胎齡19日の大動脈（図-39）と
比べると、中膜のPCNA陽性細胞は減少
している。

L：血管内腔
↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

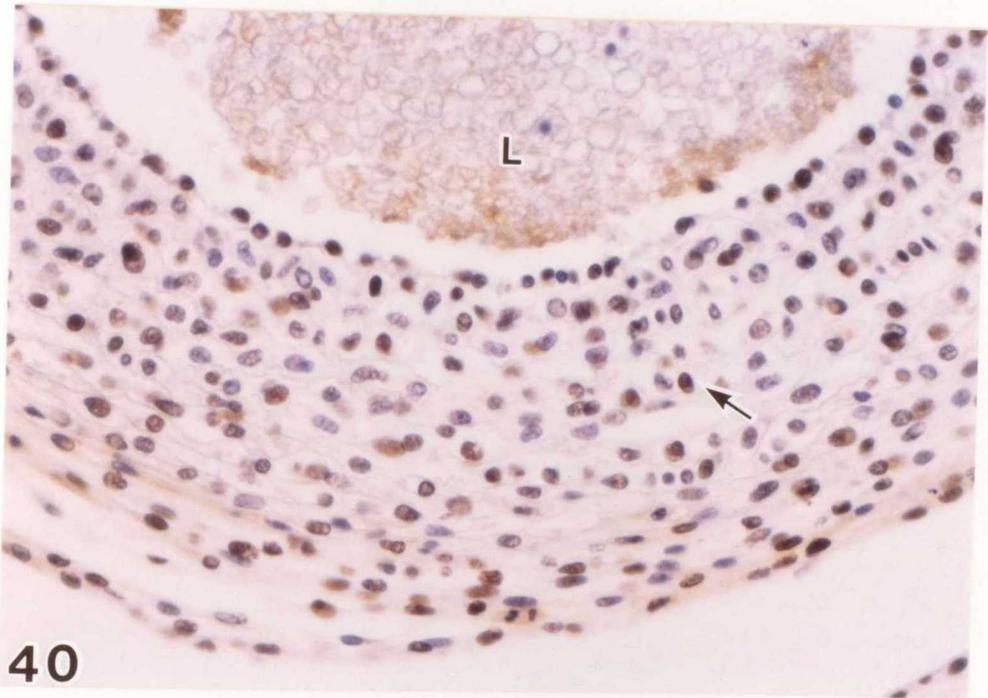
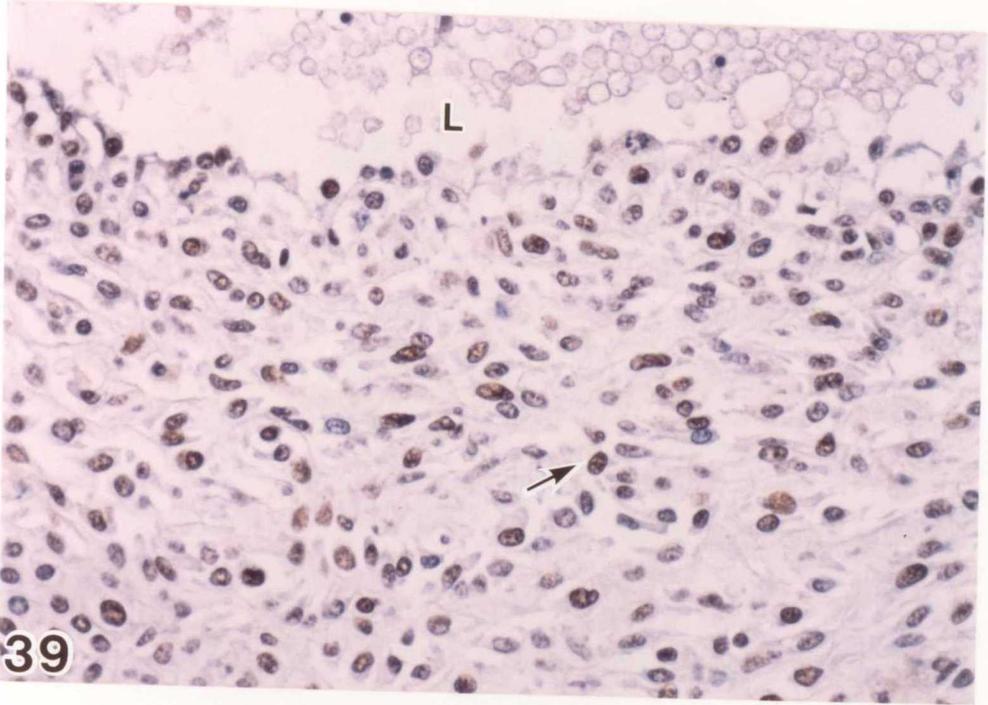


図-41、胎齡20日の無処置の
大動脈

L：血管内腔
↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

図-42、胎齡20日の投与群の
大動脈

対照群の胎齡20日の大動脈（図-41）と
比べると、中膜のPCNA陽性細胞に差は
ない。

L：血管内腔
↑：PCNA陽性細胞
PCNA免疫染色
x 270

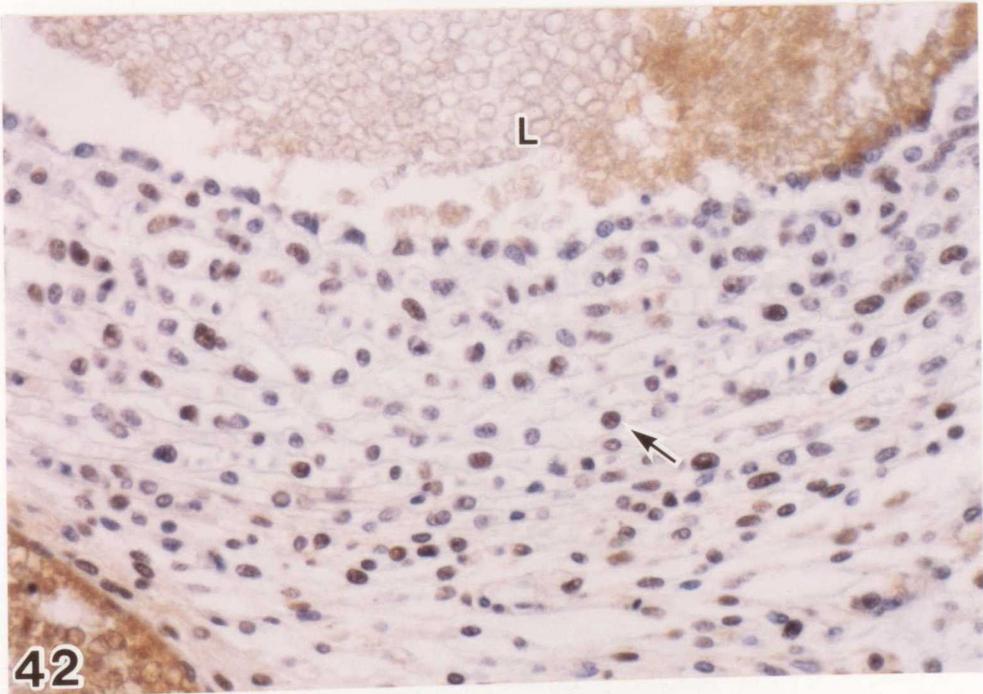
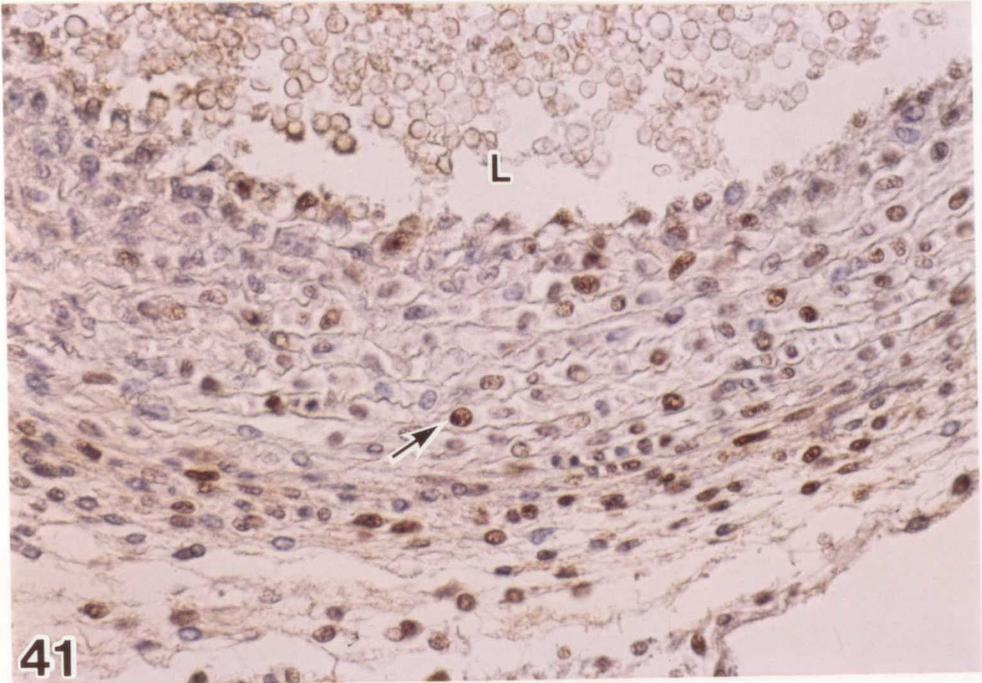


図-43、生後1日の無処置の
動脈管

- a: TUNEL法
- b: 類似切片のヘマトキシリン・エオジン染色像

TUNEL陽性細胞が蛍光を発している。
TUNEL陽性細胞は血管壁の中央部と周辺
に散在して認められる。

x 185

図-44、投与群の生後1日の
動脈管

- a: TUNEL法
- b: 類似切片のヘマトキシリン・エオジン染色像

TUNEL陽性細胞が血管壁の中央部と周
辺に散在して認められる。中央部の
TUNEL陽性細胞は無処置の対照群（図
-43）と比べて、やや減少している。

x 185

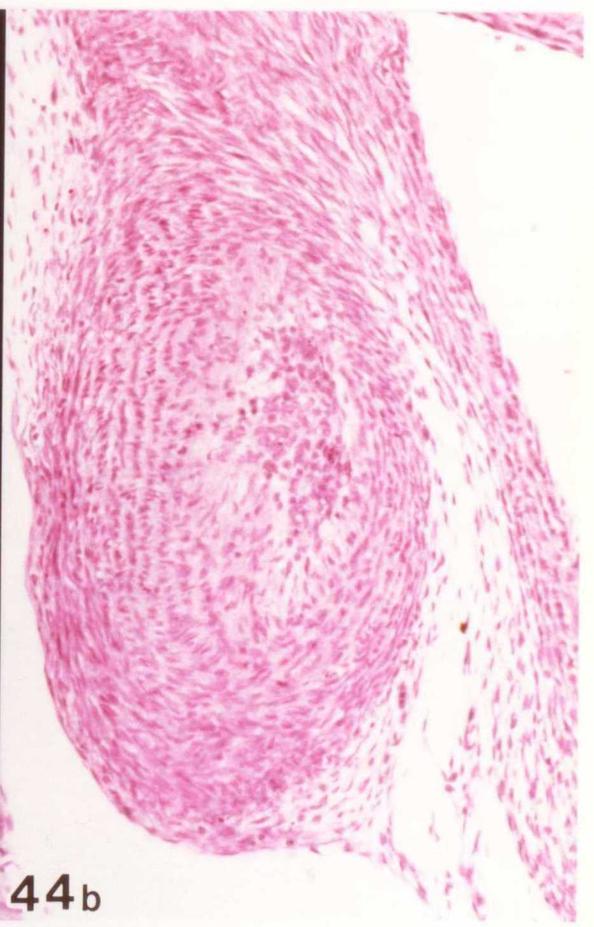
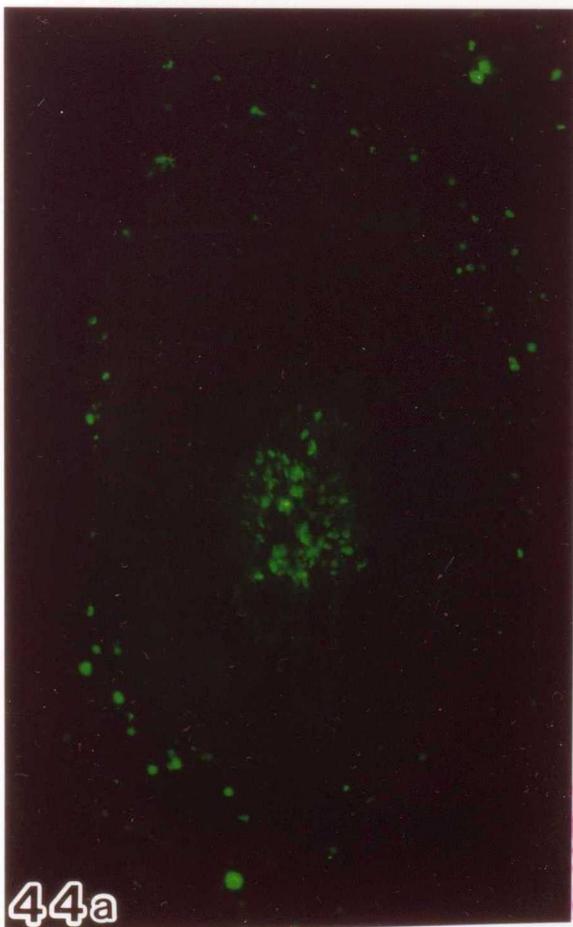
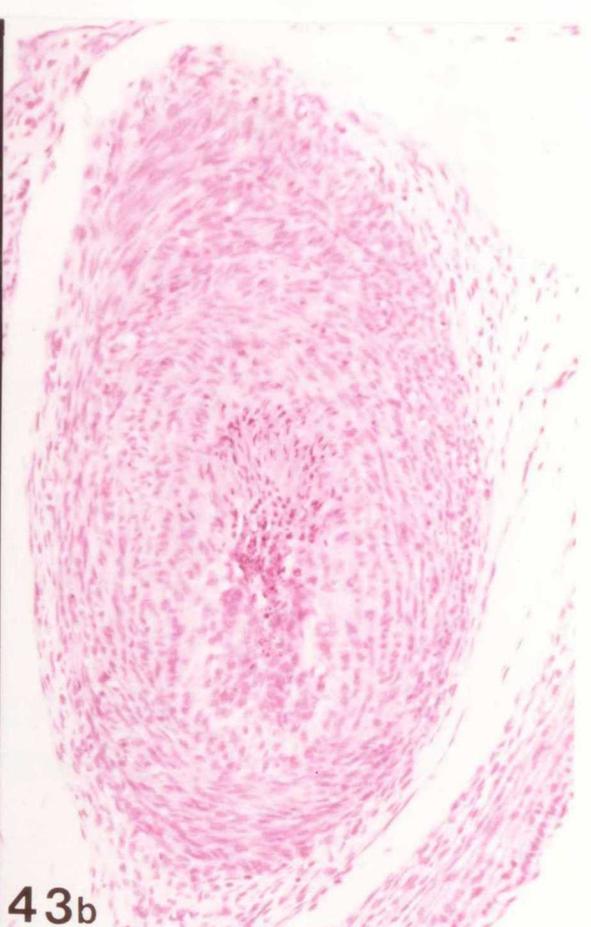
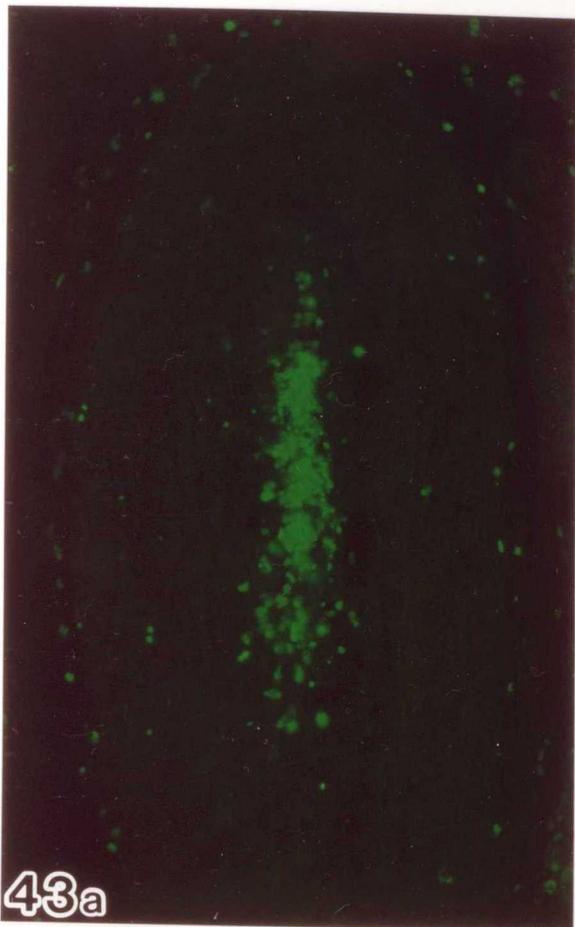


図-45、生後3日の無処置の
動脈管

a : TUNEL法

b : 類似切片のヘマトキシリン・エオジン
染色像

TUNEL陽性細胞は血管壁に散在して認められ、生後1日（図-43）で観察された規則性は消失している。

x 185

図-46、生後3日の投与群の
動脈管

a : TUNEL法

b : 類似切片のヘマトキシリン・エオジン
染色像

TUNEL陽性細胞は生後3日の対照群（図-45）とは異なり、中央部と周辺部に規則的に認められ、生後1日（図-43、44）と同様であるが、中央部のTUNEL陽性細胞の集団は、生後3日の対照群（図-45）と比べて著しく増加している。

x 185

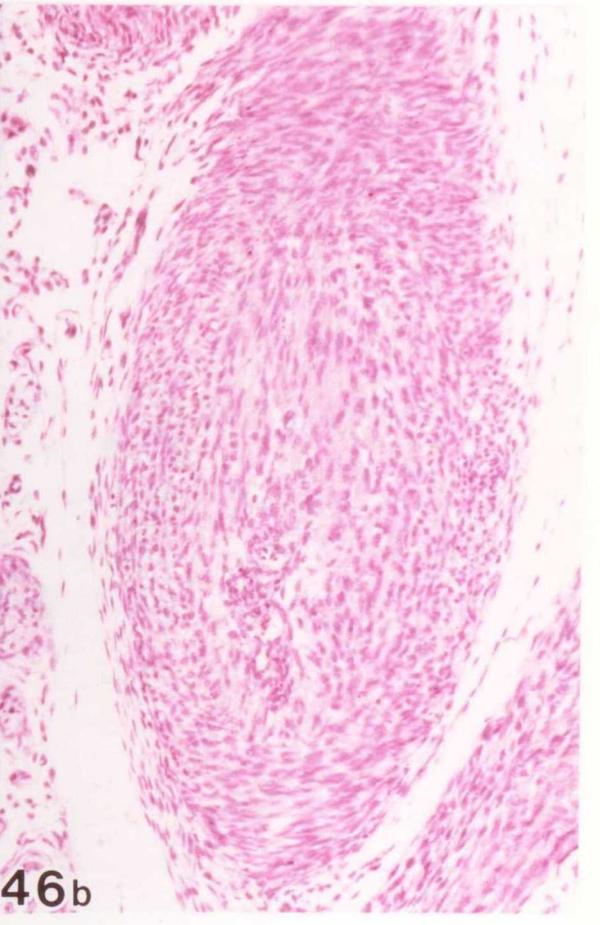
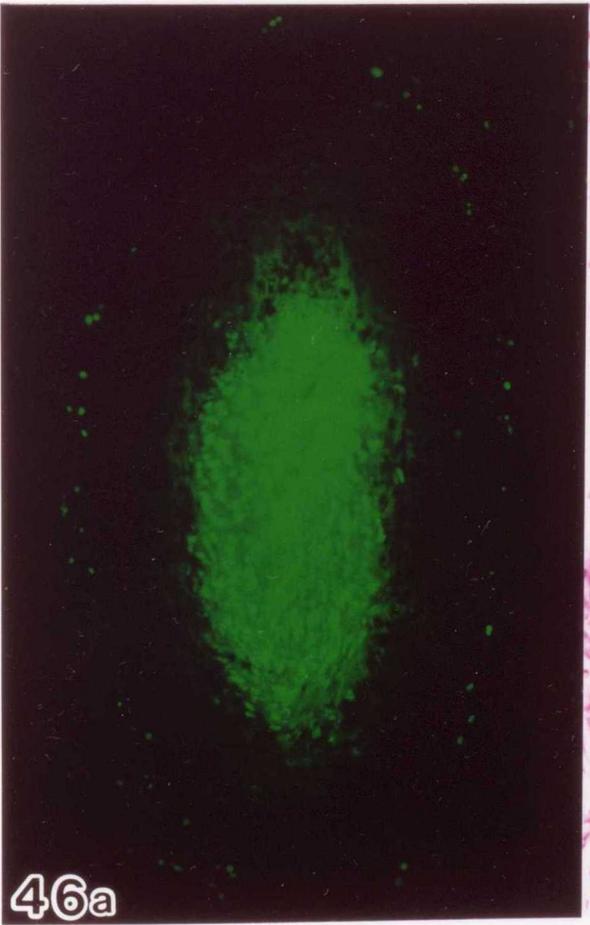
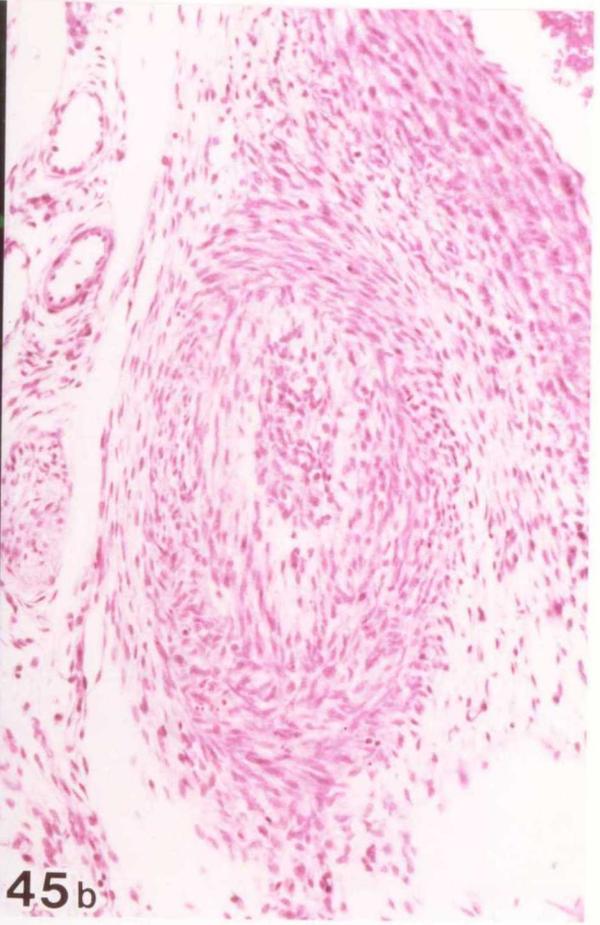
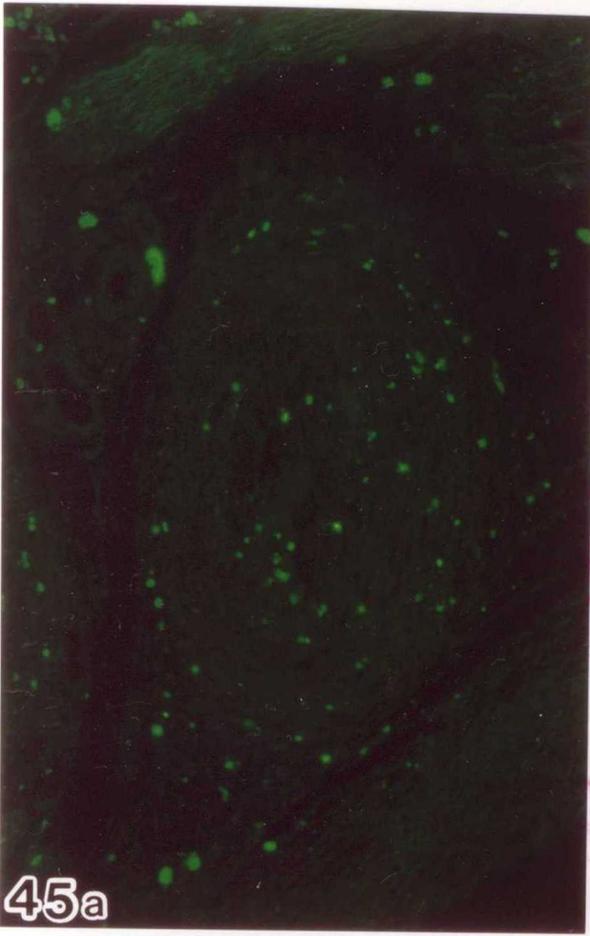


図-47、生後5日の無処置の
動脈管

a: TUNEL法

b: 類似切片のヘマトキシリン・エオジン染色像

TUNEL陽性細胞は血管壁に散在して認められ、生後3日の動脈管（図-45）と同様である。

x 185

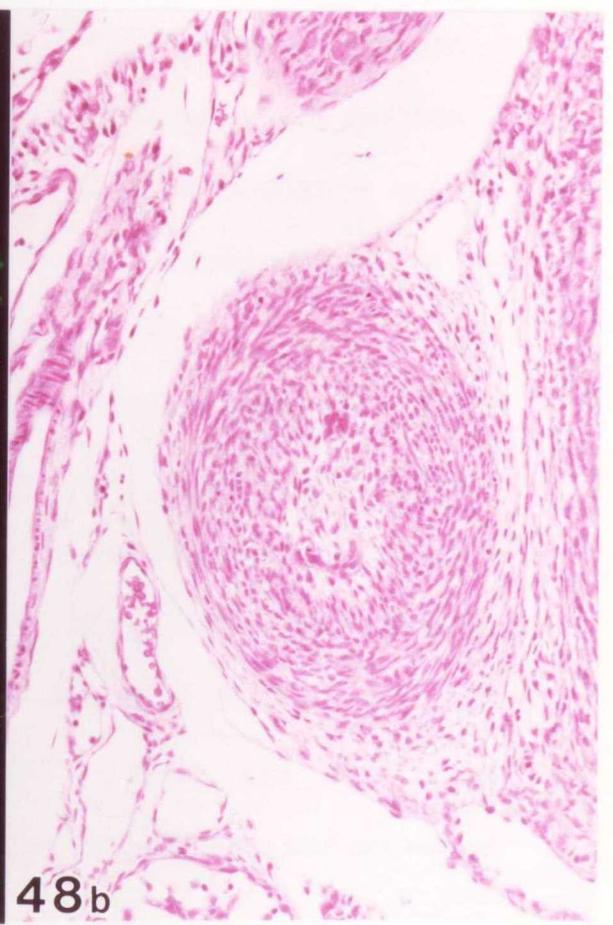
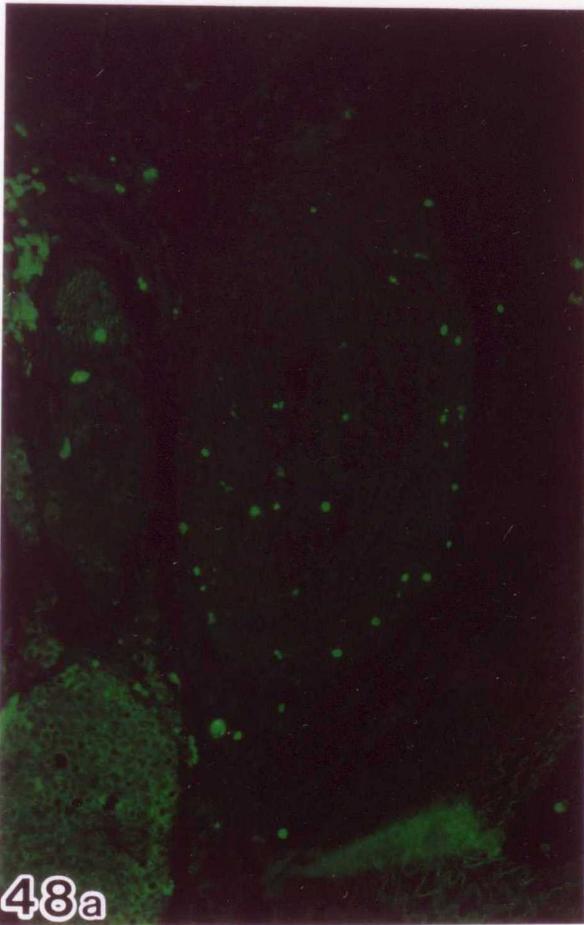
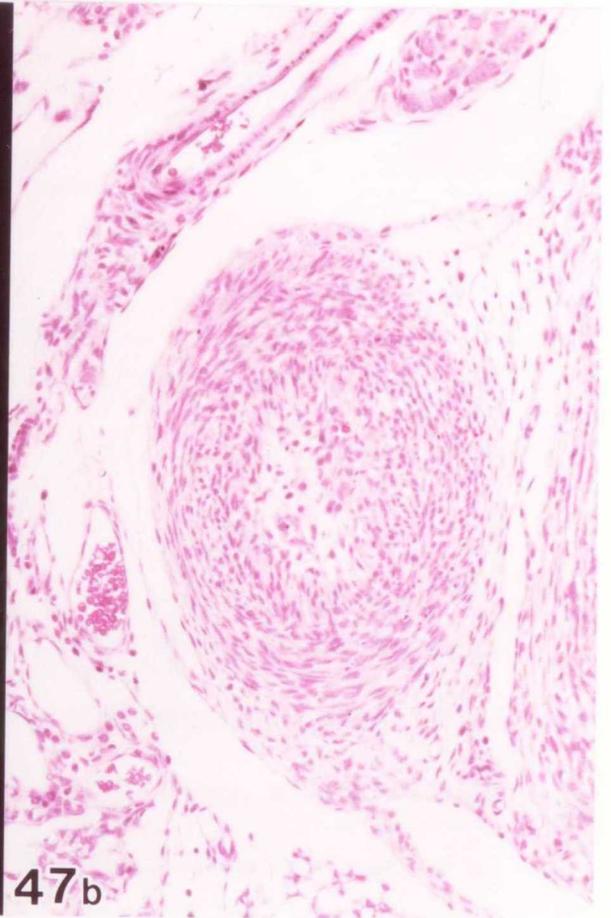
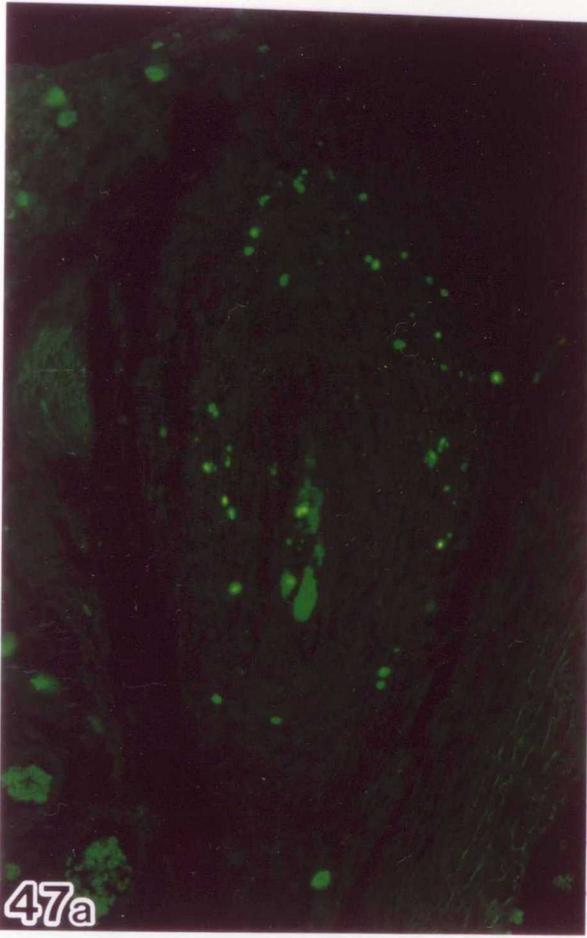
図-48、生後5日の投与群の
動脈管

a: TUNEL法

b: 類似切片のヘマトキシリン・エオジン染色像

TUNEL陽性細胞は血管壁に散在して認められる。生後3日の投与群の動脈管（図-46）と比べると、中央部の陽性細胞の集団は消失し、血管壁に散在して認められ、生後5日の対照群（図-47）と同様である。

x 185



Experimental studies on the re-opening of the ductus
arteriosus in rats

by

Hirofumi TOGASHI

ABSTRACT

The ductus arteriosus (DA) bypasses most of the blood from the pulmonary circulation to the placenta, where oxygenation occurs. This vessel unlike the pulmonary artery (PA) and the aorta, which are both elastic in type, is equipped with the media abundant in smooth muscles as a type of muscular artery (Jones et al., 1969). After birth, with the beginning of respiration, the DA is rapidly closed and transformed into a fibrous cord. Since the survival of newborn placental mammals depends on the closure of the DA, the cessation of the umbilical circulation and the occlusion of the foramen ovale, the DA plays a significant role in the neonatal adaptation required immediately after birth.

The patency of the DA is regulated by a balance of opposing actions of prostaglandin (PG) E₂ and oxygen (Clyman, 1987). Aspirin, indomethacin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are potential inhibitors of cyclooxygenase, a limiting enzyme of the biosynthesis of PGE₂. NSAIDs are observed to constrict dose-dependently the fetal DA after administration to pregnant mothers and animals, and cause fetal pulmonary hypertension, persistent pulmonary hypertension and persistent

fetal circulation in infants (Momma and Takao, 1987).

Closure of the DA after birth occurs in two stages, i.e., initial closure and anatomical (permanent) closure. The initial closure is brought about by contraction of the smooth muscle cells (SMCs) in the wall of the DA (Clyman, 1987). The anatomical closure depends on a series of structural changes. Endothelial cells detach from the internal elastic lamina, and the subendothelial region begins to accumulate extracellular matrix materials and fluid. The internal elastic lamina becomes fragmented, allowing SMCs to migrate into the subendothelial region and obstructing the vessel lumen. Eventually the DA degenerates into the fibrous cord referred to as the ligamentum arteriosus (Jarkovska et al., 1992). A DA not completely closed after birth is referred to as a patent ductus arteriosus (PDA). The treatment of PDA is important to the survival of newborns. PGE₁ and PGE₂ have been shown to induce a re-opening of the DA in humans and rabbits (Heymann and Rudolph, 1977 ; Olley et al., 1976 , 1980 ; Momma et al., 1980). However, the dilating effect of PGs has not been examined in detail in rats, even though rats are often used in studies of reproductive biology.

Since 1976, indomethacin has been used successfully to treat PDA (Heyman et al., 1976) based on its inhibitory effect on PGE₂ synthesis. Re-opening of the DA after indomethacin treatment, however, is quite common, although the reason is unclear (Clyman et al., 1985). In this connection, it is significant that premature infants who have been exposed in utero to indomethacin for threatened labor tend to show a higher incidence of PDA (Norton et al., 1993).

Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors (ACEIs) belong to a relatively new class of antihypertensive drugs. They have been used in women of reproductive age, because compared with conventional antihypertensive agents, they have the advantage of leaving sympathetic functions intact and of enhancing the distribution of blood flow to the kidneys, heart and brain without altering cardiac output (Johnston, 1984 ; Lund-Johansen, 1984). However, some studies have suggested that the continued use of ACEIs during pregnancy may not be safe to the fetus (Kreft-Jais et al., 1988 ; Pryde et al., 1993). It has been noted that the use of ACEIs during the second and third trimesters of pregnancy is associated with PDA (Kreft-Jais et al., 1988 ; Pryde et al., 1993).

As mentioned above, the patency and the closure of the DA are not completely understood. The re-opening of the DA is of particular interest in part because it is thought to be related to the mechanism of PDA. In the present research, therefore, the re-opening of the DA and the effect of NSAIDs and ACEIs on the re-opening of the rat DA induced by PGE₂ were examined. The findings obtained may contribute to make clear the mechanism of the PDA and the relation of PDA and drugs.

Summary of results

1. The dilating effects of PGE₁ and PGE₂ on the once-constricted DA in newborn rats were investigated. Wistar rats were mated and the day on which sperm was found in a vaginal smear was designated as day 0 of gestation. Each newborn pup received subcutaneous injections of PG (4, 10 μ g/pup) at intervals after Cesarean delivery. The ratio of the inner diameter

of the DA to that of the pulmonary artery (PA) was determined at intervals after the injection as an index of the dilating effect on the DA (Arishima et al., 1991 ; Takizawa et al., 1992).

Both PGE₁ and PGE₂ dilated the DA for over 90 min. The maximal effect appeared 15 or 30 min after the injection. The dilating effect was significantly higher in the PGE₂ injected pups than in the PGE₁ injected pups. The dilating effect was significantly decreased in the 6-hr-old pups compared to the 3-hr-old pups. These results indicate that both PGE₁ and PGE₂ have a dilating effect on the once-constricted DA, that the effect decreases with time, and that the dilating activity of PGE₂ was stronger than that of PGE₁.

2. It was also determined whether an NSAID administered prenatally to mother rats could potentiate a re-opening of the neonatal DA induced by PGE₂ after postnatal closure. A subcutaneous injection of PGE₂ (4 µg/pup) was given to newborn rats 3 hr after a Cesarean delivery from pregnant females which had orally received indomethacin (1, 3 mg/kg), aspirin (100, 300 mg/kg) or ibuprofen (10, 30 mg/kg) from day 18 to day 20 of gestation. The DA/PA ratio was determined at intervals after the injection.

The indomethacin, aspirin and ibuprofen treatments each significantly increased the re-opening of the DA and prolonged the duration of re-opening induced by PGE₂. These results suggest that increased ductal responsiveness to PGE₂ in newborns rats seems to be a common response to maternal treatment with an NSAID such as indomethacin, aspirin and ibuprofen.

3. Whether an ACEIs administered prenatally to mother rats could potentiate a re-opening of the neonatal DA induced by PGE₂ after postnatal closure was investigated. A subcutaneous injection of PGE₂ (4 µg/pup) was given to newborn rats 3 hr after a Cesarean delivery from pregnant females which had orally received enalapril (0.1, 1 or 10 mg/kg) from day 14 to day 20 of gestation. The DA/PA ratio was determined at intervals after the injection.

The enalapril treatment significantly increased the re-opening of the DA, except in the low dose (0.1 mg/kg) group, but the duration of re-opening was not prolonged.

4. Early studies of prostaglandin metabolism have revealed that the lung is a major site of prostaglandin inactivation. Piper et al. (1970) showed that the bioactivity of PGEs and PGF_{2α} almost completely disappeared after a single transit through the pulmonary circulation in guinea-pigs. It has been established that 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) is a key enzyme catalyzing the initial reactions in converting the biologically active PGE₂ to its inactive metabolite 15-keto-PGE₂ (Änggård et al., 1964, 1966).

In the present research, the hypothesis that maternal treatment with indomethacin or enalapril would inhibit the catabolism of PGE₂ and that PDA would be partly due to this inhibition was tested. Also, the perinatal changes of lung 15-PGDH activity and the effects of prenatal indomethacin or enalapril treatment on lung 15-PGDH activity were investigated.

The 15-PGDH activity in the lungs of non-treated rats was increased from day 20 of gestation to 3 hrs after birth; however, the activity was transiently decreased in 6 hr-old pups, and at 12 hrs had recovered to the level of 3 hr-old pups. Indomethacin treatment (3 mg/kg) from day 18 to day 20 of gestation significantly decreased the activity of 15-PGDH in neonatal lungs, whereas enalapril treatment did not affect the 15-PGDH activity. These results suggest that the decrease in the catabolism of PGE₂ in the lungs is partly responsible for the failure of indomethacin therapy for PDA, and that the catabolism does not contribute to the PDA after enalapril treatment.

5. SMC proliferation and apoptosis in the media of the DA and the effect of enalapril on this cell proliferation and apoptosis were studied. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive cells and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)-positive cells (Gavriel et al., 1992) were observed as indices of cells proliferation and apoptosis, respectively.

The PCNA indices of the DA and aorta were both approximately 75% in 19-day-old fetuses and significantly declined to about 20% in 20-day-old fetuses. In 3-day-old newborn pups, the PCNA index in the DA further declined from that of 20-day-old fetuses, whereas the PCNA index in the aorta was significantly increased compared to that in the DA.

The effect of enalapril on the PCNA indices of the DA and aorta was examined in perinatal rats. In 19-day-old control fetuses, the PCNA indices of the DA and aorta were about 75%, whereas the indices of these vessels

were significantly decreased when enalapril (10 mg/kg for 7 days) was transplacentally administered. The decline of the PCNA index induced by enalapril was more prominent in the DA compared to the aorta. The PCNA indices of these vessels in 20-day-old fetuses were not altered by the maternal treatment with enalapril. These results indicate that enalapril inhibits the proliferative activity of the fetal vessels, and that this effect was age-dependent and more prominent in the DA compared to the aorta.

TUNEL-positive cells were not observed in the DA of fetuses. In 1-day-old pups, in contrast, TUNEL-positive cells in the DA were regularly observed, as clusters in the center of the DA and as circular arrangements in the outer layer of the media. In 3- and 5-day-old pups, the regular localization of TUNEL-positive cells observed in 1-day-old pups had been lost; the TUNEL-positive cells in the DA were now irregularly scattered in the vessel's wall. In the enalapril-treated group of 3-day-old pups, remarkable TUNEL-positive cells were seen in the center of the DA, and the positive cells were significantly increased in number. In 5-day-old pups, the number and the pattern of localization of the TUNEL-positive cells were the same as in the control group.

Thus, based on the foregoing observations, PGE₁ and PGE₂ have a dilating effect on the once-constricted DA. NSAID or enalapril treatment increased the ductal responsiveness to PGE₂ in newborns rats. Since the neonatal lung 15-PGDH activity was significantly decreased after maternal indomethacin treatment, the decrease in the catabolism of PGE₂ in the lung is partly responsible for the failure of indomethacin therapy for PDA.

However, 15-PGDH activity was not affected after maternal enalapril treatment. The SMC proliferation in the prenatal DA was decreased after maternal enalapril treatment, and the onset of apoptosis in the neonatal DA was delayed, suggesting that the maturation of the SMC in the DA was suppressed after maternal enalapril treatment and that the DA then had an immature response to PGE₂.