

氏名(本籍)	富 樫 宏 史 (茨城県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第377号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	ラット動脈管の再開存に関する実験的研究
論文審査委員	(主査) 有 嶋 和 義 (副査) 赤 堀 文 昭 若 尾 義 人 政 岡 俊 夫 江 口 保 暢

論 文 内 容 の 要 旨

動脈管は胎生期に特有の血管であり、肺動脈と大動脈を結び肺への血液流入の大部分を大動脈へと迂回させている。動脈管の収縮閉鎖は卵円孔の閉鎖、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、動脈管の収縮が生後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。

出生後、動脈管収縮が順調に進行せず、再開したままとなると動脈管開存症と呼ばれる。また、胎生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)。これらの疾患は新生児の生命の存続に関わり、重要である。また、生後一度収縮した動脈管が再開する現象が知られているが、この再開のメカニズムは不明であり、そ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阻害という薬理作用から、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., 1987)。また、使用時期によっては逆効果を生じるとする報告 (Konishi et al., 1986) もある。

また、アンギオテンシン変換酵素阻害薬であるマレイン酸エナラプリル (エナラプリル) は、降圧薬としてヒト妊婦によく使用されている (Johnston, 1984; Lund-Johansen, 1984) が、その妊婦の新生児において動脈管開存症の発現頻度が高いことが報告されている (Kreft-Jais et al., 1988; Pryde et al., 1993)。

これらのことから本論文では、ラットを用いてインドメタシンやエナラプリル等の薬物が動脈管再開存に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

第1章においては、新生子を用いて、生後一度収縮閉鎖した動脈管の再開存について検討した。PGE₁とPGE₂ (4、10μg/匹)を生後3時間の新生子に投与すると、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、しだいに減退し、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、妊娠末期の母体ラットに非ステロイド系抗炎症薬を投与した時の新生子におけるPGE₂による動脈管の再開存に及ぼす影響を検討した。

妊娠18日から20日の母体ラットにインドメタシン (1、3mg/kg)、アスピリン (100、300mg/kg)、イブプロフェン (10、30mg/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 (4 μg/匹) による動脈管の再開存が著しく増強した。この再開存の増強作用は酸性の非ステロイド系抗炎症薬に共通すると考えられた。

第3章においては、妊娠後期の母体にアンジオテンシン変換酵素阻害薬エナラプリルを投与した時の新生子におけるPGE₂による動脈管の再開存に及ぼす影響を検討した。

妊娠14日から20日の母体にエナラプリル(0.1、1、10mg/kg)を7日間連続投与すると、新生子ではPGE₂による動脈管の再開存が著しく増強した。

第4章においては、経胎盤的に非ステロイド系抗炎症薬(第2章)やアンジオテンシン変換酵素阻害薬(第3章)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明らかにするために、新生子の肺におけるPGE₂代謝に注目し、PGE₂の主要な代謝酵素である肺の15-ヒドロキシ-プロstagランジンデヒドロゲナーゼ(PGDH)活性について検討した。

母体にインドメタシン(3mg/kg)を投与した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(10mg/kg)を投与しても、新生子の肺のPGDH活性は変化しなかったため、エナラプリル投与後のPGE₂による動脈管の再開存の増強には、新生子の肺のPGDH活性は関与していないものと考えられた。

第5章においては、エナラプリルを母体に投与した時、動脈管中膜の平滑筋細胞の増殖とアポトーシスに及ぼす影響を検討した。

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。胎齢19日の動脈管の平滑筋細胞の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。

動脈管のTunel陽性細胞は生後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。電子顕微鏡により観察すると、Tunel陽性細胞はアポトーシス細胞に典型的なクロマチンの凝集像を示していた。母体にエナラプリルを投与すると、新生子の動脈管のTunel陽性細胞の出現パターンが遅延していた。

以上の結果から、動脈管が一度収縮した後でも新生子においては、PGE₂とPGE₁により動脈管は再開存する。インドメタシンやエナラプリルは、経胎盤的に投与されると、新生子において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、インドメタシンを母体に投与すると、新生子の肺のPGDH活性が低下するので、肺におけるPGE₂代謝が遅延し、再開存作用が増強されるものと考えられた。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が、胎生期の動脈管の平滑筋の細胞増殖が抑制され、また、新生子の動脈管のアポトーシス細胞の出現パターンが遅延していた。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増強されたものと結論された。

論文審査の結果の要旨

動脈管は胎生期に特有の血管であり、肺動脈と大動脈を結び肺への血液流入の大部分を大動脈へと迂回させている。出生後、動脈管収縮が順調に進行せず、開存したままとなると動脈管開存症と呼ばれる。また、胎生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文献的に知られている。これらの疾患は新生児の生命の存続に関わり、重要である。また、生後一度収縮した動脈管が再開存する現象が知られているが、この再開存のメカニズムは不明であり、そ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阻害という薬理作用から、動脈管開存症の治療に用いられているが、文献的には成功率は必ずしも高くなく、使用時期によっては逆効果を生じるという。また、アンギオテンシン変換酵素阻害薬であるマレイン酸エナラプリル（エナラプリル）は、降圧薬としてヒト妊婦によく使用されているが、服用した妊婦から生まれた新生児において動脈管開存症の発現頻度が高いことが報告されている。これらの背景から、本論文は、ラットを用いてインドメタシンやエナラプリル等の薬物が動脈管の再開存に及ぼす影響を明らかにすることを目的としている。

本論文は5章からなっている。

第1章においては、第2章以降で用いる実験系の確立のために、新生子ラットを用いて、生後一度収縮閉鎖した動脈管の再開存について検討している。その結果、 PGE_1 と PGE_2 （4、10 μg /匹）を生後3時間の新生子ラットに投与すると、動脈管の再開存が生じ、その作用は PGE_2 の方が強いこと。 PGE_2 による動脈管の再開存は生後間もないほど強く、しだいに減退し、生後24時間後には消失していた、と述べている。

第2章においては、妊娠末期の母体ラットに非ステロイド系抗炎症薬を投与した時の新生子ラットにおける PGE_2 による動脈管の再開存に及ぼす影響について検討している。

妊娠18日から20日の母体ラットにインドメタシン（1、3mg/kg）、アスピリン（100、300mg/kg）、イブuprofen（10、30mg/kg）を3日間連続経口投与すると、得られた新生子ラットにおいては、 PGE_2 （4 μg /匹）による動脈管の再開存が著しく増強し、この再開存の増強作用は酸性の非ステロイド系抗炎症薬に共通すると考えられた、と述べている。

第3章においては、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薬であるエナラプリルを投与した後の、新生子ラットにおける PGE_2 による動脈管の再開存に及ぼす影響について検討している。

妊娠14日から20日の母体にエナラプリル（0.1、1、10mg/kg）を7日間連続投与すると、新生子では PGE_2 による動脈管の再開存が著しく増強した、と述べている。

第4章においては、第2章、第3章で得られた結果について、その原因を検討している。すなわち、経胎盤的に非ステロイド系抗炎症薬（第2章）やアンギオテンシン変換酵素阻害薬（第3章）を投与すると、 PGE_2 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、どのような機序によって生じているかを明らかにするために、新生子ラットの肺における PGE_2 代謝に注目し、 PGE_2 の主要代謝酵素である肺の15-ヒドロキシ- β -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ている。

母体ラットにインドメタシン（3mg/kg）を投与した後に得た新生子ラットの肺の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 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したと推論している。

一方、エナラプリルの場合、母体ラットにエナラプリル (10mg/kg) を投与した後に得た新生子ラットの肺の PGDH 活性は変化しなかったため、エナラプリル投与後の PGE₂ による動脈管の再開存の増強には、新生子の肺の PGDH 活性は関与していないものと推論している。

第5章においては、エナラプリル投与後の PGE₂ による動脈管の再開存の増強には、インドメタシンとは異なり、新生子ラットの肺の PGDH 活性は関与していない、と前章において結論しているため、本章では、エナラプリルを母体ラットに投与した時、新生子ラットの動脈管の組織学的変化、特に、動脈管中膜の平滑筋細胞の増殖とアポトーシスに及ぼす影響について検討している。細胞の増殖およびアポトーシスの指標としてそれぞれ PCNA 陽性細胞と TUNEL 陽性細胞を観察している。

その結果、胎齢19日の動脈管の平滑筋細胞の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、と述べている。また、動脈管の TUNEL 陽性細胞を観察すると、TUNEL 陽性細胞は生後1日から動脈管の中央部には集団として、周辺部には円周状に散在して認められ、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、と述べている。また、電子顕微鏡の観察により、アポトーシス細胞に典型的なクロマチンの凝集像を動脈管の TUNEL 陽性細胞に認めている。一方、母体にエナラプリルを投与すると、新生子ラットの動脈管の TUNEL 陽性細胞の出現パターンが対照群と比べて遅延することを観察している。これらのことから、エナラプリル投与により、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増強されたと推論している。

このように本論文は、動脈管開存症との関連が報告されているインドメタシンやエナラプリルを母体ラットに経胎盤的に投与すると、新生子ラットにおいて PGE₂ による動脈管の再開存が著しく増強するという新知見を明らかにした。さらに、その原因を調べたところ、インドメタシンについては、新生子ラットの肺の PGDH 活性の低下が肺における PGE₂ 代謝が遅延させ、再開存が増強されると結論している。また、エナラプリルについては、胎子動脈管の平滑筋細胞の増殖が抑制され、新生子の動脈管のアポトーシス細胞の出現パターンが遅延していたことから、エナラプリルが平滑筋細胞の成熟化を抑制するため、動脈管は未熟型の反応性を示し、PGE₂ による動脈管の再開存が増強したものと結論している。

このように本論文は、多方面からの研究方法を駆使し、その結果に多くの新知見を得ている。したがって、本論文は獣医学の発展に貢献するところ大であり、博士 (獣医学) の学位を授与するにふさわしいものと判定した。